

一种联合检测乙型肝炎病毒前 S1 抗原与核心抗原方法的建立及其与病毒核酸检测结果的一致性

袁权¹, 葛胜祥¹, 闫强¹, 赵昱², 熊君辉¹, 张军¹, 夏宁邵¹

(1. 厦门大学 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 厦门 361005;

2. 北京万泰生物药业有限公司, 北京 102200)

摘要:本研究以与血清中 HBV DNA 含量高度相关的两种 HBV 抗原(前 S1 抗原与核心抗原)为靶标,建立了联合检测这两种 HBV 核酸相关抗原(NRAg)的双抗体夹心法 ELISA 试剂。对系列稀释血清的检测表明,该试剂的平均分析灵敏度为 $10^{3.2}$ 基因组拷贝/mL (95% 可信限 $10^{2.2-4.2}$ 基因组拷贝/mL),显著高于前 S1 抗原或核心抗原的单独检测。对 994 份 HBsAg 阴性血清的检测结果表明 NRAg ELISA 的特异性为 99.7% (95% 可信限:99.1% ~ 99.9%)。对 271 份临床慢性肝炎血清进行检测,结果 NRAg ELISA 与 HBV DNA 结果的总符合率达 96.3% (95% 可信限:93.3% ~ 98.2%), NRAg ELISA 的读值/临界值比(S/CO)与 HBV 基因组拷贝数呈正相关。利用 NRAg 试剂,发现了 1 例 HBsAg“a”抗原表位突变的变异株。这些结果显示 HBV NRAg ELISA 与 HBV DNA 具有高度相关性,并能够检测出 HBsAg 抗原变异株,有望成为 HBsAg 变异株筛选的有力工具,并为广大基层医疗单位提供一种便捷的替代 HBV DNA 定性检测的手段。

关键词:乙型肝炎病毒;核酸相关抗原;表面抗原突变

中图分类号: R373.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8721(2007)04-0252-06

乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)感染是全世界最重要的公共卫生问题之一。近年来,随着乙肝疫苗的普及、核苷类药物的推广及高效乙肝免疫球蛋白的应用,各种变异株不断出现。尤其乙肝表面抗原(HBsAg)“a”抗原表位的变异可能导致现有 HBsAg 试剂假阴性,造成临床诊断治疗的困难^[1,2]。此外,这些变异株能避开目前血制品的筛查,而成为输血安全的重大隐患^[3,4]。当前对 HBsAg 变异株的发现主要依赖于核酸检测,只有少数有条件的单位才能小规模地进行,所获取的信息十分有限,迫切需要一种能够用于变异株大规模筛查的简便检测试剂,为上述研究提供关键技术手段。在 HBV 的各种蛋白中,前 S1 抗原和乙肝核心抗原(HBcAg)与 HBV DNA 含量密切相关^[5-9]。本研究采用一步法病毒颗粒裂解技术,建立了联合检测前 S1 抗原和 HBcAg 这两个 HBV 核酸相关抗原(Nucleic acids related antigen, NRAg)的酶联免疫吸附

检测(ELISA)方法,证实其检测结果与 HBV 定量 PCR 检测结果符合良好,并能够有效检测出 HBsAg 抗原变异株,有望成为 HBsAg 变异株筛选的有力工具,并为广大基层医疗单位提供一种便捷的替代 HBV DNA 定性检测的手段。

材料与方法

1 单克隆抗体 抗 HBV 前 S1 AA21-47 片段的单抗 7H11 和 4D11,以及抗 HBcAg 单抗 GA 和 CZ 均为本室制备并纯化。

2 单克隆抗体的辣根过氧化物酶(HRP)标记 采用改良过碘酸钠法对 4D11 和 CZ 进行 HRP 标记^[10]。

3 双抗体夹心 ELISA 法检测 HBV 前 S1 抗原或 HBcAg 以 0.02 mol/L 磷酸包被缓冲液(PB, pH 7.4)稀释单抗 7H11 (检测前 S1 抗原)或单抗 GA (检测 HBcAg)至 1 μg/mL, 100 μl/孔包被 96 孔聚苯乙烯微量滴定板,4 过夜; PBST 洗液洗涤 1 遍, 200 μl/孔封闭液(含有 20% 小牛血清, 10% 蔗糖的 PBS 溶液)37 封闭 2h, 甩尽、拍干后真空密封, 4 保存备用。检测时, 每孔加入 50 μl 样品裂解液; 再加入 50 μl 待测血清, 混匀, 37 温育 60 min; PBST 洗涤 5 次, 扣干后每孔加入 100 μl 1:1000 稀释的 4D11-HRP (检测前 S1 抗原)或 CZ-HRP (检测 HBcAg), 37 温育 30 min; PBST 洗涤 5 次并扣干, 加入 TMB 显色剂, 37 温育 15 min, 终止, 读取 OD_{450/620nm} 的读值。

收稿日期: 2006-10-17; 修回日期: 2007-04-19

基金项目: 863 计划(2006AA02Z442), 福建省科技重大专项(2004YZ01-1), 厦门市科技重大项目(3502Z20041008), 教育部新世纪优秀人才培养计划。

作者简介: 袁权(1982-)男, 硕士研究生, 分子病毒学, Tel: 86-592-2184113; E-mail: yuanquan@xmu.edu.cn

通讯作者: 夏宁邵 (E-mail: nsxia@xmu.edu.cn)

4 双抗体夹心法 ELISA 联合检测 HBV 前 S1 抗原及 HBcAg (NRAg ELISA) 以 0.02mol/L 磷酸包被缓冲液 (PB_pH7.4) 混合稀释 7H11 和 GA 各 1μg/mL,100μl/孔混合液包被 96 孔聚苯乙烯微量滴定板,4 过夜;PBST 洗液洗涤 1 遍,200μl/孔封闭液 (含有 20% 小牛血清,0.1% Casin 和 10% 蔗糖的 PBS 溶液) 37 封闭 2h,甩尽、拍干后真空密封,4 保存备用。检测时,每孔加入 50μl 样品裂解液;再加入 50μl 待测血清,混匀,37 温育 60min;PBST 洗涤 5 次,扣干后每孔加入 100μl 4D11-HRP/CZ-HRP 混合液 (各 1:1000 稀释),37 温育 30min;PBST 洗涤 5 次并扣干,加入 TMB 显色剂,37 温育 15min,终止,读取 OD_{450/620nm} 的读值。

5 血清标本 271 份临床慢性肝炎患者血清标本收集自泉州第一医院 (215 份) 和厦门市中医院 (56 份),994 份 HBsAg 阴性 (雅培试剂) 献血员血清标本来自北京红十字血液中心。

6 HBV DNA 检测 HBV FQ-PCR 试剂购自英科新创 (厦门) 科技有限公司 (PCR 试剂 A) 及深圳匹基生物工程有限公司 (PCR 试剂 B),检测程序及结果判定严格按照说明书进行。标本首先以 PCR 试剂 A 进行检测,阴性者用 PCR 试剂 B 进行复检,仍为阴性者分别进行前 C 区、S 区套式 PCR 检测。套式 PCR 方法如下:血清 DNA 以蛋白酶 K 法提取,分别采用适当引物进行套式 PCR,PCR 反应程序均为 95 10min,95 40s,55 40s,72 40s,35 个循环 (第二轮 25 个循环),72 10min。前 C 区外侧引物 cF1:5-CACCTCTGCCTAATCATCTC-3 和 cR1:5-ATGCTCAGGAGACTCTAAGG-3,内侧引物 cF2:5-ACTGT-TCAAGCCTCCAAGCT-3 和 cR2:5-AAGGAAAGAAGT-CAGAAAGCC-3^[11];S 区外侧引物 aF1:5-GTCTCGCGGTTT-TATC-3 和 aR1:5-ACAGTGGGGGAAAGC-3,内侧引物 aF2:5-TGCCCGTTTGTCTCTA-3 和 aR2:5-AGAACGGRCT-GAGCC-3。引物均由上海英骏公司合成。

7 其他乙肝酶联免疫检测试剂 HBsAg ELISA 试剂购自北京万泰生物药业有限公司、英科新创 (厦门) 科技有限公司及上海实业科华生物技术有限公司,HBcAg 试剂、HBcAb 试剂购自北京万泰生物药业有限公司。检测程序及结果判定严格按照说明书进行。进行 HBsAg 检测时,使用以上三种试剂平行检测,以两家以上试剂相同结果为判断标准。商品化

HBV 前 S1 抗原酶联免疫检测试剂 (均具有生产文号) 分别购自上海复星长征医药科技有限公司 (前 S1 试剂 1,国药准字 S20020072) 及上海阿尔法生物技术公司 (前 S1 试剂 2,国药准字 S2000062),检测程序及结果判定严格按照说明书进行。

8 主要仪器与试剂 Taq DNA 聚合酶、dNTP 为 Promega 公司产品。PCR 仪为德国 Biometra T3 型,荧光定量 PCR 仪为 Rotorgene3000,酶标仪及洗板机为瑞士 Tecan Sunrise 型。各种生化试剂购自 Sigma 公司或国产分析纯。

结 果

1 HBV NRAg ELISA、HBV 前 S1 ELISA 和 HBcAg ELISA 的建立

优化病毒裂解液和 ELISA 反应条件后,对 8 份倍比稀释的 HBV DNA 阳性的乙肝患者血清 (P1~P8) 和 30 份 HBV DNA 及 HBsAg 阴性血清分别以 HBV NRAg ELISA、HBV 前 S1 ELISA、HBcAg ELISA 检测 (检测方法见“材料与与方法”),P1~P8 阳性稀释系列血清同时用两种商品化前 S1 试剂进行检测。结果 HBV NRAg ELISA、HBV 前 S1 ELISA、HBcAg ELISA 检测阴性血清的 OD 值均低于 0.03,阳性血清 OD 值大于 3.0。以 0.12 + Nc (阴性均值) 为试剂临界值 (CO),每份血清的 HBV NRAg ELISA、HBV 前 S1 ELISA、HBcAg ELISA 的滴度均为 NRAg > 前 S1 > HBcAg,三种试剂的几何平均滴度 (GMT) 分别为 1 6098、1 1810 和 1 320,差别均具有统计学意义 (P < 0.01) (表 1)。商品化前 S1 试剂 1 和试剂 2 的几何平均滴度分别为 1:269、1 2。除前 S1 试剂 2 外,NRAg、前 S1、HBcAg 和前 S1 试剂 1 的分析灵敏度相对比值依次为 23 7 1 1。NRAg ELISA 的平均分析灵敏度为 10^{3.2} 拷贝/mL (95% 可信限 10^{2.2} ~ 10^{4.2} 拷贝/mL)。

表 1 不同 ELISA 试剂对 HBV DNA (+) 血清的检测比较

Table 1 Comparison of several ELISA reagents in testing sera with HBV viremia

HBV positive serum	HBV genome copies	HBV ELISA-titer 1				
		NRAg	Pre S1	HBcAg	PreS1 test 1	PreS1 test 2
P1	2.5 × 10 ⁷	5120	1280	640	320	10
P2	2.0 × 10 ⁷	10240	2560	640	320	1
P3	1.9 × 10 ⁷	10240	2560	320	320	1
P4	1.7 × 10 ⁷	10240	2560	320	320	1
P5	9.2 × 10 ⁶	10240	2560	320	640	10
P6	2.8 × 10 ⁶	5120	1280	160	320	1
P7	1.2 × 10 ⁷	1280	640	320	80	Neg
P8	1.4 × 10 ⁶	5120	2560	160	160	1
GMT ±SD	9.6 × 10 ⁶ ± 2.8	6089 ± 20	1810 ± 17	320 ± 17	269 ± 18	2 ± 5

Note: Pres1 test 1 and Pres1 test 2 used two kinds of commercial ELISA reagents.

2 HBV NRAg ELISA 的特异性

对 994 份经雅培 HBsAg 试剂检测为阴性的血清以 HBV NRAg ELISA 检测(图 1)。结果仅 3 份标本超过试剂临界值,HBV NRAg ELISA 的特异性为 99.7% (95%可信限:99.1%~99.9%)其中绝大多数标本(980 份,98.6%) OD 值不超过 0.05, OD 均值为 0.016 ±0.015。

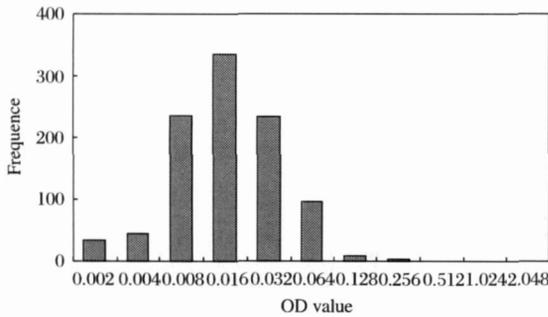


图 1 HBV NRAg ELISA 检测 HBsAg 阴性血清的 OD 值分布

Figure 1 OD value distribution of HBV NRAg ELISA in HBsAg negative sera

3 临床 HBV DNA(+)血清标本中的 NRAg 阳性率

对 271 份临床肝炎患者血清标本进行 HBV DNA 检测。首先以 PCR 试剂 A 检测,227 份阳性;对阴性标本以 PCR 试剂 B 进行复查,其中 3 份阳性;剩余阴性标本再以多区段 HBV DNA 套式 PCR 检测,1 例阳性。这 231 份 HBV DNA 阳性血清的 HBV 基因组拷贝数最高为 9.7×10^8 拷贝/mL,最低为 200 拷贝/mL,平均为 1.3×10^6 拷贝/mL。231 份 HBV DNA(+)血清中,NRAg 阳性 227 份,阳性率为 98.3% (95%可信限:95.6%~99.5%),与 PCR 试剂 A 相同。其中 PCR 试剂 A 漏检的 4 份血清 NRAg 均为阳性,而 NRAg 阴性的 4 份血清 HBV DNA 含量均很低,1 份为 4 700 拷贝/mL 外,另外 3 份低于 500 拷贝/mL。

计算 NRAg ELISA 检测各个 S/CO 值范围内

表 2 不同 HBV 感染指标模式的慢性肝炎患者中 NRAg 的阳性率

Table 2 NRAg positive rate in chronic hepatitis patients with different models of HBV infection marker

Model of HBV marker				n	Mean genome copies per mL	NRAg (+)	%
DNA	HBsAg	HBeAg	HBeAb				
+	+	+	-	113	$1.1 \times 10^7 \pm 9.2$	113	100
+	+	+	+	3	$4.4 \times 10^6 \pm 10.9$	3	-
+	+	-	-	44	$1.0 \times 10^5 \pm 52.9$	41	93.2
+	+	-	+	69	$1.1 \times 10^5 \pm 67.7$	69	100
+	-	+	-	1	8.3×10^4	1	-
+	-	-	-	1	2.0×10^2	0	0
Subtotal				231	$1.3 \times 10^6 \pm 49.8$	227	98.3
-	+	-	+	6		5	83.3
-	+	-	-	11		0	0
-	-			23		1	4.3
Subtotal				40		6	

的 DNA 阳性标本平均基因组拷贝数,可见 NRAg ELISA 的 S/CO 值与 HBV 基因组拷贝数呈正相关(图 2)。

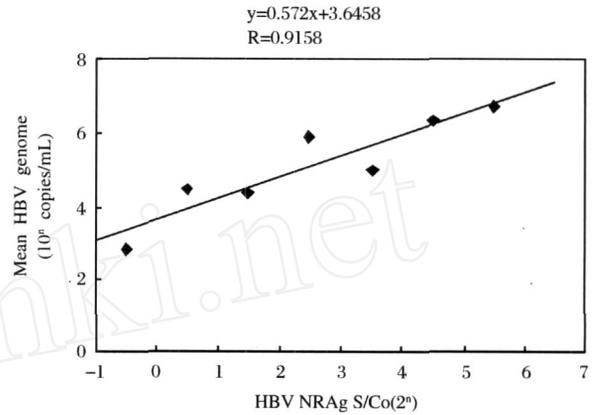


图 2 HBV NRAg ELISA S/CO 值与 HBV DNA 含量的相关性

Figure 2 The relativity of HBV genome copies with S/CO values in HBV NRAg ELISA

4 不同 HBV 感染指标模式的患者的 NRAg 阳性率

表 2 显示了具有不同 HBV 感染指标模式的患者的平均 HBV DNA 含量和 NRAg 阳性率。无论 HBeAg 和 HBeAb 的模式如何,HBV DNA(+)患者的 NRAg 阳性率均没有统计学差异 ($P > 0.05$)。除 HBeAg(-)且 HBeAb(-)的患者 NRAg 阳性率为 93.2% 外,其余 HBV DNA(+)患者的 NRAg 阳性率均为 100%。在 HBV DNA(-)的患者中,17 例 HBsAg(+)者 HBeAg 均为(-)。其中 6 例 HBeAb(+)者有 5 例 NRAg(+),而 11 例 HBeAb(-)者 NRAg 均为(-),差别具有统计学意义(Fisher 精确概率 $P < 0.001$) (表 2)。在全部 271 例临床肝炎患者中,NRAg 与 HBV DNA 的总符合率为 96.3% (95%可信限:93.3%~98.2%),阳性符合率为 98.3% (95%可信限:95.6%~99.5%),阴性符合率为 85.0% (95%可信限:70.2%~94.3%) (表 3)。

表3 HBV NRAg ELISA 与 HBV DNA 检测结果的一致性

Table 3 Consistence of the results when detection using HBV NRAg ELISA and HBV DNA

HBV DNA	HBV NRAg ELISA			Consistence rate (95%CI)
	+	-	Total	
+	227	4	231	98.3% (95.6%-99.5%)
-	6	34	40	85.0% (70.2%-94.3%)
Total	233	38	271	96.3% (93.3%-98.2%)

5 HBV DNA(+)血清中不同 HBV 免疫指标的阳性率比较

从 231 份 HBV DNA (+) 血清中随机抽取 108 份,以 PCR 试剂 A、NRAg ELISA、前 S1 试剂 1、试

表4 HBV DNA 阳性血清几种 HBV 商业试剂盒的检测阳性率

Table 4 Positive rates of several commercial HBV kits in testing HBV DNA psotive sera

HBV genome (Copies/mL)	n	Positive rate (%)			
		PCR test A	NRAg ELISA	Pre S1 test 1	Pre S1 test 2
1 000	98	95 (96.9%)	98 (100%)	88 (89.8%)	63 (64.3%)
< 1 000	10	10 (100%)	7 (70.0%)	6 (60.0%)	3 (30.0%)
Total	108	105 (97.2%)	105 (97.2%)	94 (87.0%)	66 (61.1%)

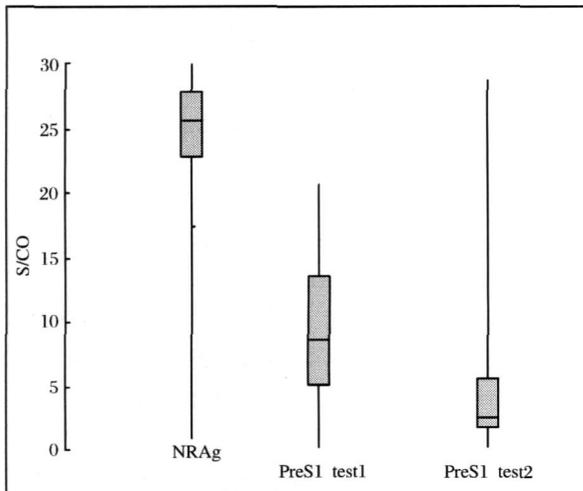


图3 HBV NRAg ELISA 与商业化前 S1 ELISA 试剂检测 HBV DNA 阳性血清的 S/CO 分布

Figure 3 S/CO value distribution of HBV DNA psotive sera when tested by HBV NRAg ELISA kit or commercial PreS1 ELISA kits

6 对 HBsAg(-) 的 HBV DNA(+) 血清的检测

在上述 231 份 HBV DNA (+) 血清中,2 份 HBsAg (-)。对这 2 份标本进行“a”抗原表位区段 PCR 扩增,成功扩增出其中 1 份。该份血清 HBsAb (-)、HBeAg (+)、HBeAb (-)、HBcAb (+)、前 S1 试剂 1 和试剂 2 均为 (-),HBV DNA 载量为 8.3×10^4 拷贝/mL,前 C 区和 S 区分区 PCR 均检为阳性。对该标

剂 2 进行平行检测(表 4)。结果在 HBV 基因组高于 1 000 拷贝/mL 的 98 份标本中,NRAg ELISA 阳性率 100.0%,PCR 试剂 A 阳性率 96.9%,前 S1 试剂 1 阳性率 89.8%,而前 S1 试剂 2 阳性率 64.3%。10 份 HBV 基因组低于 1 000 拷贝/mL 的标本中,PCR 试剂 A 全部检出,NRAg ELISA 检出 7 份,前 S1 试剂 1 和试剂 2 分别检出 6 份和 3 份。在全部标本中,NRAg ELISA 阳性率 (97.2%) 和 PCR 试剂 A 相同,均显著高于两种商品化前 S1 试剂 ($P < 0.01$)。从 108 份 DNA (+) 血清的检测 S/CO 来看,HBV NRAg 显著高于两个商品化前 S1 ELISA 试剂,提示 NRA 试剂具有更好的反应模式(图 3)。

本的“a”抗原表位区段 PCR 产物进行多克隆双向序列测定及氨基酸序列比对,结果显示该毒株 HBsAg 基因的 140 位氨基酸的 Thr 突变为 Ile (T140I),证实其为 HBsAg“a”抗原表位突变株。

讨论

乙肝病毒复制活动状态的判断对于乙肝患者治疗方案的制定具有重要指导意义。HBcAg 在肝细胞内参与了 HBV 子代病毒的复制和装配,与 HBV DNA 的关系密切。由于 HBcAg 在细胞外仅存于 Dane 颗粒内,为病毒外膜所包裹,无法直接检出,因此,临床上一直采用与 HBcAg 具有 75% 共同氨基酸序列但能分泌到血液中的 HBeAg 作为判断体内 HBV 复制活动性的替代指标。然而,长期的临床观察发现,HBeAg 并不是一个十分灵敏的指标。尤其在 HBV 分子生物学检测技术问世后,发现许多 HBeAg 阴性病人血清中仍存在着高滴度的 HBV 基因组,因此 HBV DNA 的直接检测结果已逐渐成为指导乙肝治疗的更重要依据。HBV DNA 检测主要有分子杂交和 PCR 两类方法。分子杂交试剂较为昂贵,操作复杂,灵敏度一般不超过 $10^5 \sim 10^6$ 基因组拷贝/mL;PCR 方法灵敏度一般在 $10^2 \sim 10^3$ 拷贝/mL,但对操作环境、技术人员有很高的要求,试剂也十分昂贵。近年来,前 S1 抗原的检测得到越

来越多的重视。前 S1 抗原同样与 HBV DNA 密切相关,而且可在血清中直接检出。但现有前 S1 试剂的灵敏度仍存在较大缺陷,在本研究中比较的两种在国内应用较广泛的前 S1 商业试剂,在血清 HBV DNA 超过 1 000 拷贝/mL 的患者中,分别漏检 10%和 36%(表 4)。这一缺陷造成了对前 S1 试剂检测结果临床意义理解上的较大困难,临床上仍希望能找到更理想的 HBV DNA 替代检测指标和方法。

人体内与 HBV DNA 关系最为密切的两个抗原都主要存在于 Dane 颗粒上。HBcAg 几乎完全包裹于病毒外膜内,而约 50%的前 S1 抗原位于病毒外膜的内侧。因此,若能有效裂解病毒,使 Dane 颗粒的 HBcAg 和前 S1 抗原得以充分暴露,则有可能显著提高试剂检测结果与 HBV DNA 的符合率。基于这一思路,我们先后对数十种的病毒裂解液配方进行了筛选,同时从数十株前 S1 或 HBcAg 单克隆抗体中筛选到了各 1 对前 S1 或 HBcAg 单抗(结果另文发表),建立了 HBV NRAg ELISA 检测方法,通过对血清中前 S1 和 HBcAg 的联合检测,提高检测结果与 HBV DNA 的符合率。

通过多种手段和不同样本的检测验证表明,HBV-NRAg ELISA 具有很高的分析灵敏度及良好的特异性,其定性结果与 HBV DNA 高度相关,S/CO 值与 HBV 基因组拷贝数呈正相关(图 2)。无论 HBeAg 和 HBeAb 的模式如何,HBV DNA(+)患者的 NRAg 阳性率均没有统计学差异($P > 0.05$),提示 NRAg 的检测结果与 HBeAg 或 HBeAb 没有直接联系,而仅与 HBV DNA 密切相关。然而,在 HBV DNA(-)但 HBsAg(+)的 17 例患者中,HBcAg 均为(-),但 6 例 HBeAb(+)者有 5 例 NRAg(+),而 11 例 HBeAb(-)者 NRAg 均为(-),差别具有统计学意义($P < 0.001$)(表 2)。可能是由于这些标本均来自临床慢性肝炎患者,HBcAg(+)患者可能意味着病毒复制活动刚被抑制,血清内仍然残存着一定量的管形颗粒,而 HBeAb(-)患者可能意味着病毒已长期不活动。在这 5 例 NRAg(+)者中,HBsAg 的 S/CO 值均超过 20,而其余 12 例 NRAg(-)者仅有 1 例 HBsAg 的 S/CO 值超过 20,另 11 例的 HBsAg 的 S/CO 值位于 1.1~2.5 之间(结果未显示),这一现象也支持上述解释。

HBcAg 通常包裹于 HBV 内部,避免了机体体液免疫的选择压力,而前 S1 区的 AA21-47 肽段是 HBV 与肝细胞结合位点之一,在各型中均十分保

守。本研究随机抽取的 108 份 HBV DNA 不低于 1 000 拷贝/mL 的标本中,NRAg 均为阳性,而 PCR 试剂 A 出现 3 份漏检,其中 1 份 PCR 试剂 B 也漏检。这一结果提示,NRAg 试剂可能弥补由于 HBV 变异引起的 PCR 漏检。在本研究中,发现了 2 份 HBsAg(-)的 HBV DNA 阳性血清,HBV-NRAg ELISA 检出 1 份并经测序正式为 HBsAg“a”抗原决定簇突变株。提示本研究采用的联合检测抗原模式,可能是弥补因突变而造成的 HBsAg 漏检。

鉴于 NRAg ELISA 是一种联合的抗原检测试剂,其可能弥补由于单一抗原变异或漏检而造成的假阴性。在本研究中其确能检出某些单引物 PCR 试剂的假阴性,或是 HBsAg 变异造成的 HBsAg 假阴性。因而,HBV NRAg ELISA 试剂可能成为 HBV 变异株的大规模研究重要的工具,若用于血液筛查,有可能降低由 HBsAg 变异株带来的输血安全风险。

参考文献:

- [1] Toshimasa K, Makoto N, Hironori S, et al. Analysis of HBs antigen negative variant of hepatitis B virus: Unique Substitutions, Glu129 to Asp and Gly145 to Ala in the surface antigen gene[J]. *Med Sci Monit*, 2000, 6(6): 1165-1169.
- [2] Oon C J, Chen W N. Current aspects of hepatitis B surface antigen mutants in Singapore[J]. *J Viral Hepatol*, 1998, 5(Suppl. 2): 17-23.
- [3] Steven J M, Wan C C, Yi Z, et al. Wild-type and a epitope variants in chronic hepatitis B virus carriers positive for hepatitis B surface antigen and antibody[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2002, 17: 148-152.
- [4] Marcus S, Thomas P, Jens R. Isolation, characterization and biological significance of hepatitis B virus mutants from serum of a patient with immunologically negative HBV infection[J]. *J Hepatol*, 2000, 33: 799-811.
- [5] Tatsuji K, Akinori R, Akihiro M, et al. New enzyme immunoassay for detection of hepatitis B virus core antigen (HBcAg) and relation between levels of HBcAg and HBV DNA[J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41: 1901-1906.
- [6] Sadakazu U, Hiroaki O, Fumio T, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibodies for the determination of phosphorylated hepatitis B core protein(p21c) in serum[J]. *J Virol Meth*, 1998, 72: 95-103.
- [7] Guillou D B, Duclos-Vallee J C, Eberle F, et al. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detec-

- tion and quantification of hepatitis B virus PreS1 envelope antigen in serum samples: comparison with two commercial assays for monitoring hepatitis B virus DNA[J]. *J Viral Hepatol*, 2000, 7: 387-392.
- [8] Theilmann L, Klinkert M Q, Gmelin K, et al. Detection of PreS1 proteins in serum and liver of HBsAg-positive patients: a new marker for hepatitis B virus infection[J]. *Hepatology*, 1986, 6: 186-190.
- [9] Kuijpers L, Koens M, Murray-Lyon I, et al. Pre-S proteins in hepatitis B[J]. *J Virol Meth*, 1989, 28: 47-51.
- [10] Tijssen P, Kurstak E. Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase-antibody conjugates for enzyme immunoassays[J]. *Anal Biochem*, 1984, 136: 451-457.
- [11] Petit M A, Guillou D B, Roche B, et al. Residual hepatitis B virus particles in liver transplant recipients receiving lamivudine: PCR quantitation of HBV DNA and ELISA of PreS1 antigen[J]. *J Virol Meth*, 2001, 65: 493-504.

Establishment of a New Combined Enzyme Immunoassay for Detection of HBV PreS1 and Core Antigens and the Consistency with HBV DNA Test

YUAN Quan¹, GE Sheng-xiang¹, YAN Qiang¹, ZHAO Yu²,
XIONG Jun-hui¹, ZHANG Jun¹, XIA Ning-shao¹

(1. National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Disease, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. Beijing Wantai Pharmacy Enterprise Co. Ltd, Beijing 102200, China)

Abstract: In this study, a new combined enzyme immunoassay (NRAg ELISA) for detection of HBV PreS1 and core antigens which was highly consistent with serum HBV DNA test was established. The serial serum dilution test indicated that the average sensitivity of the assay was $10^{3.2}$ genome copies/mL (95% CI: $10^{2.2-4.2}$ genome copies/mL), which was notably higher than the test performed on Pre S1 or core antigen alone. The test with sera from 994 blood donors whose HBsAg were negative demonstrated that the specificity of this assay was 99.7% (95% CI: 99.1%-99.9%). 271 serum samples from chronic hepatitis patients were also examined and the result showed that the total consistent rate between NRAg ELISA and HBV DNA was 96.3% (95% CI: 93.3%-98.2%). The NRAg ELISA S/CO (signal/cutoff) was closely correlated with HBV genome copies ($R = 0.9158$, $n = 231$). Furthermore, by using this assay, we found a patient whose HBsAg was negative but HBV DNA was positive. Sequencing result showed that HBV genome from this patient had a point mutation in the "a" epitope of S gene. Our results indicate that HBV NRAg ELISA has a high relativity with HBV DNA test, and can effectively detect the mutation of HBsAg, it is expected to be a potent tool for screening HBsAg mutant and is a convenient method for substituting HBV DNA test.

Key words: hepatitis B virus; nucleic acids related antigen (NRAg); HBsAg mutation

Corresponding author: XIA Ning-shao, E-mail: nsxia@xmu.edu.cn