

文章编号:1002-2694(2008)12-1087-03

两种戊型肝炎 IgG 抗体检测试剂的比较

闫强,杜海莲,王颖彬,葛胜祥,黄守杰,江浪,张军,夏宁邵

摘要:目的 比较 2 种国产戊型肝炎 IgG 抗体诊断试剂 (E2-IgG 和 X-IgG) 的特异性与敏感度。方法 利用 2 种试剂对 2006 年江苏省某市普通人群的流行病学调查血清标本 460 份和经过巢式逆转录聚合酶链式反应 (nest-RT-PCR) 鉴定为 HEV 核酸阳性的临床戊型肝炎患者血清标本 72 份进行平行检测,并以免疫印迹实验 (Western blot, WB) 和中和单抗阻断试验进行验证。结果 1. 460 份流行病学调查血清标本中 WB 阳性 188 份。2. 188 份 WB 阳性标本中 E2-IgG 的检测敏感度为 99.5%,特异度为 99.6%,阳性预测值 99.5%,阴性预测值 99.6%,准确性 99.6%;X-IgG 的检测敏感度为 21.3%,特异度为 97.4%,阳性预测值 85.1%,阴性预测值 64.1%,准确性 66.3%。3. E2-IgG 阴、阳性 A_{450}/A_{620} 值的分布在临界值附近分界明显,小于临界值的 A_{450}/A_{620} 值取对数后呈正态分布,而阳性血清 A_{450}/A_{620} 值的高低与其 WB 的反应强度正相关。4. E2-IgG 阳性、X-IgG 阴性的血清共 148 份,中和单抗阻断阳性率为 98%,WB 阳性率 99.3%。5. 经 PCR 鉴定为 HEV 核酸阳性的急性戊型肝炎患者血清中 E2-IgG 敏感度 98.6%,X-IgG 敏感度 80.6% ($\chi^2 = 10.7, P < 0.01$)。结论 E2-IgG 在不同人群中均能较好的反映体内戊型肝炎抗体存在的真实情况。

关键词: 戊型肝炎, IgG; 诊断试剂; 免疫印迹; 中和单抗

中图分类号: R373 **文献标识码:** A

Comparison of two diagnostic reagents to detect anti-hepatitis E virus IgG antibodies

YAN Qiang, DU Hai-lian, WANG Ying-bin, GE Sheng-xiang,
HUANG Shou-jie, JIANG Lang, ZHANG Jun, XIA Ning-shao

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

ABSTRACT: The sensitivity and specificity of two diagnostic reagent to detect the presence of anti-hepatitis E virus IgG antibodies (E2-IgG and X-IgG) were tested in 460 serum samples taken from population undergoing an epidemiological investigation of Jiangsu province in 2006 and 72 serum samples taken from patients with hepatitis E virus (HEV) infection identified by nest RT-PCR, and the results were also confirmed with Western blot assay and the blocking test with neutralizing monoclonal antibody (mAb). It was found that the sensitivity, specificity, positive or negative prediction values as well as accuracy of E2 were 99.5%, 99.6%, 99.5%, 99.6% and 99.6%; while those of X-IgG were 21.3%, 97.4%, 85.1%, 64.1% and 66.3% respectively. The positive and negative A_{450}/A_{620} values of E2-IgG were distinct around the cut-off value, and the log value of the A_{450}/A_{620} smaller than the cut-off value showed a pattern of normal distribution, while the A_{450}/A_{620} value of the positive serum correlated with the intensity of Western blot assay. In addition, the positive rates of 148 samples of positive E2-IgG but negative X-IgG as demonstrated by neutralizing mAb blocking test and Western blot assay were 98.0% and 99.3%, and the sensitivities of E2-IgG and X-IgG tested in serum samples of patients with acute HEV infection with positive HEV nucleic acid as demonstrated by PCR were 98.6% and 80.6% respectively ($\chi^2 = 10.7, P < 0.01$). It is apparent that the diagnostic reagent E2-IgG in comparison with X-IgG, can reflect a better performance on the real condition of HEV IgG antibodies in different groups of populations.

KEY WORDS: hepatitis E; IgG; diagnostic reagents; Western blotting; neutralizing antibody

目前,抗戊型肝炎病毒 (HEV) IgG 检测试剂主要有两类,一类为以线性表位为基础的传统试剂,包括新加坡 Genelabs 公司和国内大部分公司提供的戊肝抗体检测试剂;一类为以 HEV ORF2 构象依赖性免疫优势表位为基础的新型诊断试剂。传统

HEV IgG 检测试剂由于未采用 HEV 的免疫优势表位,对抗 HEV IgG 抗体的免疫应答不强,且在患

通讯作者:夏宁邵, Email: nsxia@xmu.edu.cn

作者单位: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

者感染急性期后会明显减弱或消失^[1]。以 HEV ORF2 构象依赖性免疫优势表位为抗 HEV 体液免疫应答的主要表位,不仅对抗 HEV IgG 抗体的应答强,且能在患者体内长时间高滴度存在^[2]。我们利用大肠杆菌表达的 NE2^[3]中的二个构象依赖性表位^[4],成功建立了抗 HEV IgG 的 ELISA 检测试剂(E2-IgG)。大量的动物实验与临床标本检测显示 E2-IgG 较传统的抗 HEV-IgG 试剂有明显较高的阳性率,能更好地反映体内戊型肝炎抗体的水平^[5-8],但是其特异性一直未得到比较中肯的评价。目前 HEV 病毒尚无法大量培养,也无法利用 HEV 全病毒抗原进行 WB 检测,基于重组抗原的 WB 方法进行戊肝 IgG 抗体的确认是被认可的^[9],本研究用 E2-IgG 与一种传统戊型肝炎抗体检测试剂(X-IgG)平行检测 460 份中经 WB 确证的 188 份普通人群标本,并用中和单抗阻断实验进一步验证其特异性;同时平行检测 72 份 HEV 核酸阳性的临床戊型肝炎患者血清,进一步比较这两种试剂的敏感度和特异性。

1 材料与与方法

1.1 标本来源 选取 2006 年江苏省东台市普通人群的流行病学调查标本中的随机样本 460 份,另外选取 HEV 核酸阳性的急性戊型肝炎的血清标本 72 份,均 -20℃ 冻存。

1.2 诊断试剂 国内一家诊断公司生产的抗 HEV IgG 试剂(X-IgG,批号 20061023)和北京万泰生物药业有限公司生产的抗 HEV IgG 试剂(E2-IgG,批号 EG20061101)。以上试剂操作及结果判定严格按照各自说明书进行。

1.3 重组抗原和单克隆抗体 重组抗原 P239 为大肠杆菌表达的 HEV ORF2 aa368-606,在体外可形成类病毒颗粒,具有较强的构象型表位,与戊型肝炎患者恢复期血清反应性良好,动物实验证实具有较好的免疫原性和免疫保护性^[10]。阻断实验用 HEV 中和单抗 8C11 和 8H3 由 NE2 抗原制备^[11]。

1.4 HEV RNA 检测 采用 nest-RT-PCR 对所选标本进行 HEV 核酸检测^[12],引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.5 WB 检测 重组抗原 P239 经 12% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后转移到硝酸纤维素膜进行杂交;用 5% 脱脂奶封闭 2 h,加待检血清 4 h 反应过夜;用 TNT 洗膜 3 次,每次 10 min;加羊抗人碱性磷酸酶反应 1 h;用 TNT 洗膜 3 次,每次 10 min;NBT 和 BCIP 显色。

1.6 抗 HEV mAb 对待检血清的阻断实验 对待检血清标本进行单克隆抗体阻断试验^[5],以未阻断孔 A_{450}/A_{620} 值在 0.8~1.5 之间的稀释度计算阻断率,阻断率 = $(1 - \text{阻断孔 } A / \text{未阻断孔 } A) \times 100\%$,阻断率 > 50% 为阻断阳性。

1.7 统计学分析 以 WB 检测为金标准,计算 E2-IgG 和 X-IgG 的敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值、准确性。

2 结果

2.1 WB 检测结果 使用重组抗原 P239 对 460 份一般人群血清进行 WB 检测,结果确定阳性标本 188 份,占 40.9%;阴性标本 272 份,占 59.1%。对 460 份标本 WB 的反应强度进行分级,见图 1,其中阴性(-)272 份,弱阳性(+)80 份,阳性(++)51 份,强阳性(+++)57 份。

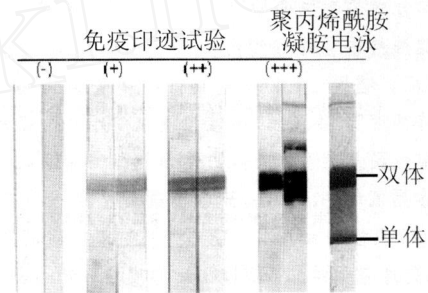


图 1 免疫印迹试验反应强度分级

Fig. 1 The response intensity of Western Blotting test

2.2 两种试剂在普通人群中的平行比较 见表 1,在上述 188 份 WB 检测阳性的标本中,E2-IgG 检出 187 份,X-IgG 检出 40 份;在 272 份 WB 检测阴性的标本中,E2-IgG 阴性为 271 份,X-IgG 阴性为 265 份。在 460 份总体样本的检测中,E2-IgG 检出 188 份,X-IgG 检出 47 份。E2-IgG 阴阳性 A_{450}/A_{620} 值的分布在临界值附近分界明显,见图 2,小于临界值的 A_{450}/A_{620} 值取对数后呈正态分布(A_{450}/A_{620} 值的几何平均值为 0.009),而阳性血清 A_{450}/A_{620} 值的高低与其 WB 的反应强度正相关,见图 3。

表 1 E2-IgG 和 X-IgG 检测能力的评价

Table 1 The detective ability evaluation of E2-IgG and X-IgG

检测方法	WB 实验		合计
	+	-	
E2-IgG			
+	187	1	188
-	1	271	272
X-IgG			
+	40	7	47
-	148	265	413

根据表 1 计算,得出 E2-IgG 检测敏感度 99.5%,特异度 99.6%,阳性预测值 99.5%,阴性预测值 99.6%,准确性 99.6%。X-IgG 检测敏感度 21.3%,特异度 97.4%,阳性预测值 85.1%,阴性预测值 64.1%,准确性 66.3%。

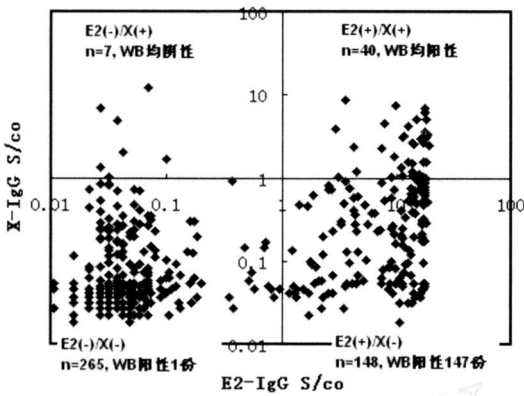


图2 E2-IgG、X-IgG 与免疫印迹试验结果的平行比较
Fig. 2 Parallel comparison of results of E2-IgG, X-IgG and WB in 460 healthy subjects

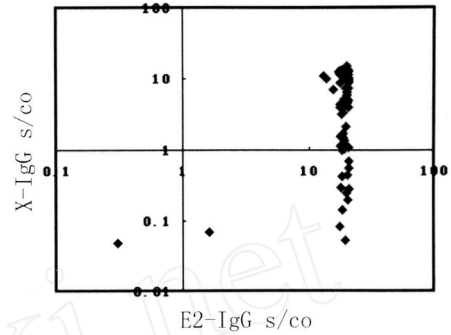


图4 HEV核酸阳性标本中两种试剂的比较
Fig. 4 Comparison of E2-IgG and X-IgG in serum samples of HEV RNA positive

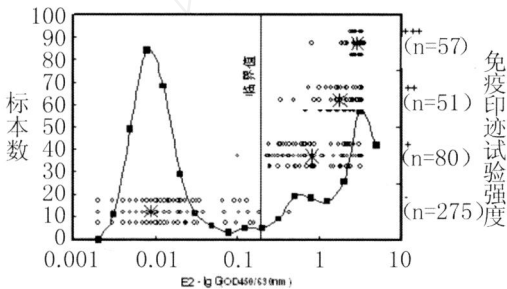


图3 E2-IgG A_{450}/A_{620} 值的对数频数分布及与免疫印迹结果的比较
Fig. 3 Frequency distribution of log OD_{450/620nm} value of E2-IgG and comparison with the result of WB

注:■为 E2-IgG A_{450}/A_{620} 值的对数的频数分布,○为在不同免疫印迹试验反应强度下标本的 E2-IgG A_{450}/A_{620} 值的对数,*为在不同免疫印迹试验反应强度下标本的 E2-IgG A_{450}/A_{620} 值的对数的平均值

2.3 中和单抗阻断试验 为了进一步验证 E2-IgG 的特异性,对上述 148 份中 E2-IgG 阳性而 X-IgG 阴性的标本利用中和单抗 8C11 和 8H3 进行阻断,其中 145 份阻断率大于 50%,阻断率从 51%到 98.8%不等,平均 $(75.5 \pm 1.9)\%$,成功阻断率为 98.0%,在上述 148 份标本中 WB 阳性 147 份,阳性率 99.3%。 $(\chi^2 = 0.021, P > 0.05)$,经卡方检验提示中和单抗阻断实验和 WB 实验对上述 148 份阳性标本的检验结果没有差异。

2.4 两种试剂对急性戊型肝炎血清标本的检出情况:利用两种试剂平行检测 72 份经 nest-R T-PCR 鉴定为 HEV 核酸阳性的急性肝炎血清标本, E2-IgG 检出 71 份, X-IgG 检出 58 份,对二者的 s/co 比较发现, E2-IgG 的 s/co 较高,且阴阳性反应的分界比较明显,见图 4。

3 讨论

本研究表明不论在普通人群或急性戊型肝炎患

者中,基于构象型免疫优势表位的戊型肝炎抗体检测试剂(E2-IgG)可以更真实地反映机体内抗戊型肝炎抗体存在的情况,更适用于戊肝的血清流行病学调查。在 72 份 HEV RNA 阳性的急性戊型肝炎临床标本中, E2-IgG 检出 71 份, X-IgG 检出 58 份。在 272 份 WB 阴性的普通人群标本中, E2-IgG 的特异性(99.6%)要稍好 X-IgG(97.4%),但差异无统计学意义;而在 WB 阳性的 188 份标本中, E2-IgG 敏感度(99.5%)明显高于 X-IgG(21.3%, $P < 0.05$)。

已有的研究表明 E2-IgG 在普通人群中具有较高的阳性率^[6-7],但其特异性一直未得到很好的验证。此次研究的 460 份普通人群标本中, E2-IgG 阳性 148,阳性率为 40.9%,高于 X-IgG 的 10.2%。在这 148 份样本中, 147 份为 WB 阳性, 145 份能被中和单抗成功阻断,证实了 E2-IgG 较传统试剂有更高的检出率是由于其拥有更高的灵敏度,而不是假阳性造成的。

抗体检测试剂所用的抗原直接影响试剂的品质,包括特异性和敏感度。传统抗戊型肝炎抗体检测试剂包被用抗原为合成多肽或/和重组抗原^[13],由于不具 HEV 的免疫优势表位, HEV 感染后机体相应抗体的阳转率不高,反应性不强,在感染后容易消退^[1]。此外,由于 HEV 的非免疫优势表位在不同的基因型间存在差异,因此不同的传统试剂在检测人群戊肝抗体时相互间差异较大,准确性低^[14]。基于可形成构象依赖性表位的重组抗原 NE2 进行商品化生产的新型抗戊型肝炎抗体检测试剂 E2-IgG 在普通人群和临床急性戊型肝炎标本中都有较高的检出率和较低的假阳性率。因此,新型抗戊型肝炎抗体检测试剂较传统抗 HEV-IgG 试剂在人群流行病学调查时可更好估计戊型肝炎的流行情况。

(转第 1099 页)

- major outer membrane protein [J]. J Exp Med, 1992, 175(1): 227-235.
- [2] Stamm WE. *Chlamydia trachomatis* infections: progress and problems [J]. J Infect Dis, 1999, 179(Suppl 2): S380-3.
- [3] Gunn RA, Rof's RT, Greenspan JR, et al. The changing paradigm of sexually transmitted disease control in the era of managed health care [J]. JAMA, 1998, 279(9): 680-684.
- [4] Lehmann M, Groh A, Rodel J, et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* DNA in cervical samples with regard to infection by human papillomavirus [J]. J Infect, 1999, 38(1): 12-17.
- [5] Hagensee M, Galloway D. Growing human papillomavirus and virus-like particles in laboratory [J]. Papillomavirus Rep, 1993, 4: 121-124.
- [6] Ault KA, Giuliano AR, Edwards RP, et al. A phase I study to evaluate a human papillomavirus (HPV) type 18 L1 VLP vaccine [J]. Vaccine, 2004, 22(23-24): 3004-3007.
- [7] Dupuy C, Buzoni Gate D, Touze A, et al. Nasal immunization of mice with human papillomavirus type 16 (HPV-16) virus-like particles or with the HPV-16 L1 gene elicits specific cytotoxic T lymphocytes in vaginal draining lymph nodes [J]. J Virol, 1999, 73(11): 9063-9071.
- [8] Stanley MA. Progress in prophylactic and therapeutic vaccines for human papillomavirus infection [J]. Expert Rev Vaccines, 2003, 2(3): 381-389.
- [9] Nardelli-Haeffiger D, Lurati F, Wirthner D, et al. Immune responses induced by lower airway mucosal immunisation with a human papillomavirus type 16 virus-like particle vaccine [J]. Vaccine, 2005, 23(28): 3634-3641.
- [10] Lifang Zhang, Jian Zhou, Ian H Frazer, et al. HPV6b L1 virus like particles are potent immunogens without adjuvant in man [J]. Vaccine, 2000, 18(11-12): 1051-1058.
- [11] 张丽芳, 陈韶, 赵孔南, 等. 人乳头瘤病毒 6bL1/16E7 嵌合蛋白的基因克隆和表达 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2001, 21(4): 373-376.
- [12] Nieland JD, Da Silva DM, Kast WM, et al. Chimeric papillomavirus virus-like particles induce a murine self-antigen-specific protective and therapeutic antitumor immune response [J]. H Cell Biochem, 1999, 73: 145-152.
- [13] Ortiz L, Demick KP, Petersen JW, et al. *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein (MOMP) epitopes that activate HLA class II-restricted T cells from infected humans [J]. J Immunol, 1996, 157(10): 4554-4567.
- [14] Su H, Messer R, Whitmire W et al. Subclinical chlamydial infection of the female mouse genital tract generates a potent protective immune response: implications for development of live attenuated chlamydial vaccine strains [J]. J Exp Med, 1990, 172(1): 203-211.
- [15] Roden RB, Greenstone HL, Kirnbauer R, et al. In vitro generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype [J]. J Virol, 1996, 70(9): 5875-5883.

收稿日期: 2008-06-18; 修改日期: 2008-10-22

(接第 1089 页)

参考文献:

- [1] Mast EE, Alter MJ, Holland PV, et al. Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel. Hepatitis E virus antibody serum panel evaluation group [J]. Hepatology, 1998, 27: 857-861.
- [2] Irshad M. Hepatitis E virus: an update on its molecular, clinical and epidemiological characteristics [J]. Intervirology, 1999, 42: 252-262.
- [3] 李少伟, 张军, 何志强, 等. 大肠杆菌表达的戊型肝炎病毒 Orf2 片段的聚合现象研究 [J]. 生物工程学报, 2002, 18: 463-467.
- [4] 顾颖, 葛胜祥, 黄果勇, 等. 戊型肝炎病毒中和性单克隆抗体的鉴定 [J]. 病毒学报, 2003, 19: 217-223.
- [5] 葛胜祥, 张军, 彭耿, 等. 基于多聚化重组抗原的检测戊型肝炎病毒 IgM 与 IgG 抗体的 ELISA 的建立及初步评估 [J]. 病毒学报, 2003, 19: 74-82.
- [6] 李新兰, 任晖, 梁新海, 等. 感染戊型肝炎 10 年后患者血清抗病毒抗体的检测 [J]. 地方病通报, 2002, 17: 14-17.
- [7] 王延臣, 葛胜祥, 孙鲁民, 等. 戊型肝炎流行区病毒感染的特点 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20: 147-150.
- [8] Zhang J, Ge SX, Huang GY, et al. Evaluation of antibody-based and nucleic acid-based assays for diagnosis of hepatitis E virus infection in a rhesus monkey model [J]. J Med Virol, 2003, 71: 518-526.
- [9] Innis BL, Seriwatana J, Robinson RA, et al. Quantitation of immunoglobulin to hepatitis E virus by enzyme immunoassay [J]. Clin Diagn Lab Immunol. 2002 May; 9(3): 639-48.
- [10] 何志强, 张军, 李少伟, 等. 颗粒化重组戊型肝炎病毒衣壳蛋白及其抗原性与免疫原性 [J]. 生物工程学报, 2004, 20: 262-268.
- [11] Zhang J, Gu Y, Ge SX, et al. Analysis of hepatitis E virus neutralization sites using monoclonal antibodies directed against a virus capsid protein [J]. Vaccine, 2005, 23: 2881-2892.
- [12] 葛胜祥, 郭清顺, 李少伟, 等. 基因型戊型肝炎病毒高灵敏度通用引物的设计和初步应用 [J]. 病毒学报, 2005, 21: 181-187.
- [13] 庄辉, 崔怡辉, 朱万孚, 等. 戊型肝炎病毒 IgG 抗体酶联免疫诊断试剂盒研制 [J]. 中华预防医学杂志, 2001, 05:
- [14] Goldsmith R, Yarbough PO, Reyes GR, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of acute sporadic hepatitis E in Egyptian children [J]. Lancet, 1992, 339: 328-331.

收稿日期: 2008-06-14; 修回日期: 2008-10-06