

抗戊型肝炎病毒 IgG 抗体定量线性标准品的标定及初步应用

黄维金¹ 吴星¹ 周诚¹ 何鹏¹ 葛胜祥² 乔杉³ 张华远¹ 蓝海云¹ 辜文洁¹ 梁争论¹ 祁自柏¹ 李河民¹

【摘要】 目的 建立抗戊型肝炎病毒 (Anti-HEV) IgG 抗体的定量线性标准品, 并进行初步应用。方法 利用抗-HEV IgG 和抗-HEV IgM ELISA 检测试剂筛选出 1 份抗-HEV IgG 阳性血清 L9, 经基因 1 型和 4 型的 HEV ORF2 C-端抗原及 239 抗原进行 Western blot 确认后, 用 WHO 定量标准品, 由 3 个实验室协作标定, 利用量反应平行线法计算其抗-HEV IgG 的含量。考察已标定的 L9 血清的稳定性, 并用所标定的 1.5 倍系列稀释的血清对国内外 6 家抗-HEV IgG 试剂的灵敏度进行检测。选择一灵敏度较高的试剂, 在其线性范围内取 L9 的 5 个稀释度作为抗-HEV IgG 抗体定量线性标准, 对高、中、低浓度的 3 份临床血清重复检测 5 次, 考察其重复性; 对实验感染猴的系列血清中抗-HEV IgG 含量进行定量检测, 考核该定量线性标准品的应用效果; 并对每次定量试验中的线性方程进行分析, 确定相关系数 r 值和斜率 k 值的范围。结果 经国内外试剂检测筛选出的阳性血清 L9 与基因 1 型和 4 型的 HEV ORF2 C-端抗原及 239 抗原均有阳性反应。经协作标定, L9 血清抗-HEV IgG 含量为 16.9 U/ml。L9 血清在 -20℃ 下保存 6、12、18 个月, 2~8℃ 保存 24、48、96 h 后, 定量结果均在 95% 置信区间内, 且抗-HEV IgG 含量均未明显下降。6 家抗-HEV IgG 检测试剂灵敏度差异较大, 范围为 0.03~5.00 U/ml。确定 L9 血清从 0.42 U/ml 开始的 5 个 1.5 倍系列稀释度, 作为某一试剂抗-HEV IgG 抗体定量线性标准品。利用该线性定量标准检测高、中、低浓度的 3 份临床血清, 定量结果重复性较好; 对实验感染猴系列血清进行定量检测, 结果可有效地反映抗体水平变化趋势; 94% 的定量检测试验, $r = 0.98, 1.15$ $k = 0.95$ 。结论 已建立了抗-HEV IgG 抗体定量线性标准品, 可用于疫苗免疫原性评价和流行病学调查。

【关键词】 戊型肝炎病毒; IgG 抗体; 标准品; 定量

Calibration and Preliminary Application of Linear Quantitation Standard for Anti-HEV IgG Antibody

HUANG Wei-jin, WU Xing, ZHOU Cheng, et al (National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To develop a linear quantitation standard for anti-hepatitis E virus (HEV) IgG antibody. Methods An anti-HEV IgG positive serum sample L9 was screened by using Anti-HEV IgM ELISA kit and Anti-HEV IgG ELISA kit and confirmed by Western blotting with HEV ORF2 C-terminal antigen of genotypes 1 and 4 and 239 antigen, then calibrated by 3 laboratories using WHO quantitation standard. Calculate the anti-HEV IgG content by dose-response parallel line assay, and evaluate the stability of calibrated serum sample. The sensitivities of 6 domestic and imported anti-HEV IgG ELISA kits were evaluated with the calibrated serum sample diluted 1.5-fold serially. A linear quantitation standard for anti-HEV IgG antibody consisted of 5 dilutions of L9 within the linear determination range of a highly sensitive kit and evaluated for reproducibility by repeat test for 3 clinical serum samples, at high, moderate and low anti-HEV IgG contents respectively, for 5 times. The anti-HEV IgG contents in serum samples of HEV-infected monkeys were determined by the standard, and the determination curves were analyzed to define correlation coefficient r and slope k . Results Serum sample L9 showed positive reaction with HEV ORF2 C-terminal antigen of genotypes 1 and 4 and 239 antigen, and its anti-HEV IgG content was calibrated as 16.9 U/ml. After storage at -20℃ for 6, 12 and 18 months or at 2~8℃ for 24, 48 and 96 h, all the quantitative determination results were within the 95% CI, and anti-HEV IgG content showed no significant decrease. The sensitivities of 6 kits evaluated with the L9 ranged from 0.03 to 5.00 U/ml. The linear quantitation standard for anti-HEV IgG antibody consisted of 5 dilutions of L9, starting from a concentration of 0.42 U/ml. The determination results of 3 clinical serum samples showed good reproducibility of the standard. The determination results of sera of HEV-infected monkeys reflected the change of antibody level effectively. The r values of 94% of quantitative determination curves were not less than 0.98, and the k values ranged from 1.15 to 0.95. Conclusion A linear quantitation standard for anti-HEV IgG antibody was established, which was suitable for the evaluation of immunogenicity and epidemical investigation of vaccine.

【Key words】 Hepatitis E virus; IgG antibody; Standard; Quantitation

作者单位: 1 中国药品生物制品检定所 北京 100050; 2 厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 厦门 361005; 3 万泰生物药业有限公司 北京 518020。

通讯作者: 周诚, E-mail: zhouch.nicpbp@yahoo.com.cn

目前,对戊型肝炎 Hepatitis E, HE) 预防性疫苗的研究工作正处于临床观察阶段。GSK 公司已经完成 / 期临床观察,国内万泰生物药业有限公司正在进行 期临床观察。初步研究表明,IgG 抗体对 HE 具有一定的保护效果。为了评价疫苗免疫后抗-HEV IgG 抗体的水平,研究在 HE 感染过程中抗-HEV IgG 抗体的变化以及确定抗-HEV IgG 抗体的保护性水平等,迫切需要建立一套抗-HEV IgG 定量线性标准,对其抗体水平进行定量。WHO 已建立抗-HEV Ig 的定量标准品,含量为 100 U/ml。为了适应大量应用的需要,本研究以 WHO 抗 HEV Ig 标准品为依据,标定了一份血清,并针对某一灵敏度较高的试剂,制备了一套 1.5 倍系列稀释的抗-HEV IgG 的定量线性标准,以其作为定量线性标准,用于检测临床标本和实验感染猴系列血清。

1. 材料与方法

1.1 试剂

抗-HEV IgM ELISA 检测试剂为新加坡 Genelabs 和万泰生物药业有限公司产品;抗-HEV IgG ELISA 检测试剂为新加坡 Genelabs、北京万泰、上海科华、沈阳惠民、河南华美、北京高达等公司产品;95/584 为抗-HEV Ig 的 WHO 定量标准品;筛选血清来自兰州、武汉;高、中、低浓度的 3 份临床戊肝患者血清来自北京佑安医院;戊肝病毒粪便悬液实验感染猴的系列血清,感染过程同文献^[1];基因 1 型和 4 型戊型肝炎病毒 ORF2 的 C-端抗原由中国药品生物制品检定所构建、表达并纯化^[2];239 抗原^[3]由万泰生物药业有限公司提供;羊抗人 IgG 共价结合碱性磷酸酶购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 抗-HEV IgG 阳性和阴性血清的筛选

利用抗-HEV IgM 和抗-HEV IgG ELISA 检测试剂筛选血清,操作按照说明书进行。经两种试剂检测均为阴性的血清作为稀释用血清;经两种试剂检测均为阳性,且抗-HEV IgG 呈强阳性的血清作为待标定血清。

1.3 L9 血清的确认

采用 Western blot 法。将大肠杆菌表达的基因 1 型和 4 型 HEV ORF2 C-端抗原 (1 型 416-660 aa, 4 型 430-674 aa)^[2]及 239 抗原 (1 型 368-606 aa)^[3],经 12% SDS-PAGE 后,转至 PVDF 膜;EIA 封闭液封闭 2 h, PBST 洗膜 4 次;加入 L9 血清 (1:100 稀释),室温作用 4 h, PBST 洗膜 4 次;加入羊抗人 IgG 共价结合碱性磷酸酶 (1:2 000 稀释),室温作用 1.5 h, PBST 洗膜 4 次;加入底物显色,水洗终止。检测血清

与抗原在相对分子质量对应的位置是否出现条带。

1.4 L9 血清的标定

将 WHO 95/584 标准品按照说明书用无菌水溶解,用阴性血清 WH14 将 WHO 标准品和 L9 血清进行 1.5 倍系列稀释,在同一酶标板上,每个稀释度设平行双孔,检测 L9 血清的抗-HEV IgG 含量,检测结果采用量反应平行线法进行定量分析。由 3 个实验室进行协作定量,最后计算加权平均值^[4],作为 L9 血清的定量结果。

1.5 L9 血清的稳定性试验

将 L9 血清分别于 -20℃ 保存 6、12、18 个月,2~8℃ 保存 24、48、96 h 后,用 WHO 标准品进行重新定量,考察其稳定性。

1.6 国内外试剂的灵敏度及定量检测方法的建立

用国内外抗-HEV IgG ELISA 试剂检测系列稀释的线性定量标准品,以线性定量标准品的定量值与 A 值双对数建立直线方程,将其 Cutoff 值代入方程,计算出其理论灵敏度。

选择一灵敏度较高的试剂,将 L9 血清稀释至其线性范围,再 1.5 倍系列稀释 5 个稀释度,作为定量线性标准,对待检血清进行定量检测,定量线性标准平行双样,待检血清进行 1:4 系列稀释,将落入线性范围的第 1 个点带入定量线性标准品浓度与 A 值的双对数曲线,进行计算。

1.7 定量线性标准品的重复性

利用建立的定量检测方法,对 3 份高、中、低浓度的临床血清重复检测 5 次,考核定量线性标准品的重复性 (实验室内精密性)^[5]。

1.8 实验感染猴系列血清的定量检测

用定量线性标准品对戊肝病毒粪便悬液实验感染猴的系列血清进行定量检测,以考核该定量线性标准品的应用效果。同时对该定量线性标准品在每次定量试验中的线性方程进行分析,确定其相关系数 r 值和斜率 k 值的范围。

2. 结果

2.1 抗-HEV IgG 阳性和阴性血清的筛选

经国内外试剂的检测,将抗-HEV IgG 和抗-HEV IgM 均为阳性的 L9 血清作为待标定血清,同时筛选出抗-HEV IgG 和抗-HEV IgM 均为阴性的血清 WH14 作为阴性稀释液,用于 WHO 标准品和 L9 血清的系列稀释。

2.2 L9 血清的确认

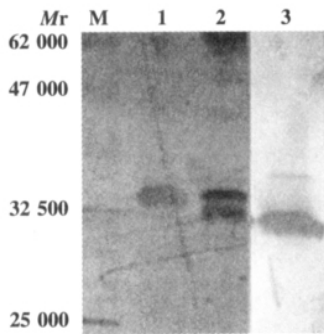
Western blot 结果可见,L9 血清与基因 1 型和 4 型 HEV ORF2 的 C-端抗原及 239 抗原均有阳性反

应, 见图 1, 确认其为抗-HEV IgG 阳性。

2.3 L9 血清的标定

采用量反应平行线法计算相对含量, 其中的一次试验见图 2。方差分析表明, WHO 标准品和 L9 血清两组间差异有显著意义 ($F = 164.92, P < 0.01$); 平行性检验和线性检验, 两组间差异无显著意义 ($F_1 = 0.49, F_2 = 1.29, P > 0.05$), 表明两直线线性和平行性均成立。经计算, L9 血清含抗-HEV IgG 18.59 U/ml。

经过 3 个实验室的 23 次有效标定, 方差齐性检验表明, 实验室间差异无显著意义 ($F = 1.27, P > 0.05$)。直接计算加权平均值, 确定 L9 血清含抗-HEV IgG 16.9 U/ml。95% 置信区间为 14.8 ~ 19.3; 最大值 20.3, 最小值 13.2, 中位数 17.2; 变异系数 (CV) 为 12.6%。



M: prestained Mr marker; 1: recombinant HEV ORF2 C-terminal antigen genotype 4(430 ~ 674 aa); 2: recombinant HEV ORF2 C-terminal antigen genotype 1(416 ~ 660 aa); 3: 239 antigen genotype 1(368 ~ 606 aa).

图 1 L9 血清的 Western blot 确认试验

Fig 1. Confirmation of L9 serum sample by Western blot

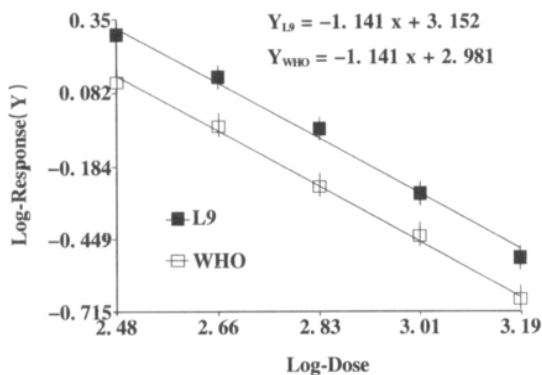


图 2 量反应平行线法计算 Anti-HEV IgG 的相对含量

Fig 2. Calculation of relative potency of anti-HEV IgG by dose-response parallel line assay

2.4 L9 血清的稳定性

L9 血清在 -20 °C 下保存 6、12、18 个月, 2 ~ 8

保存 24、48、96 h 后, 用 WHO 标准品进行重新定量, 定量结果均在 95% 置信区间内, 且抗-HEV IgG 含量均未明显下降, 表明 L9 血清具有良好的稳定性。

2.5 国内外试剂的灵敏度

对国内外 6 家抗-HEV IgG 试剂的灵敏度分析结果表明, 试剂的灵敏度差异较大, 灵敏度范围为 0.03 ~ 5.00 U/ml, 分别为 0.50 (Genelabs)、0.03 (国产 1)、0.35 (国产 2)、2.00 (国产 3)、1.31 (国产 4) 和 5.00 (国产 5)。选择国产 1 试剂, 根据其线性范围, 将 L9 血清由 0.42 U/ml 起 1.5 倍系列稀释 5 个稀释度, 作为该试剂的定量线性标准, 进行定量检测的应用。

2.6 定量线性标准品的重复性

高、中、低浓度的 3 份临床血清定量检测结果, 均数分别为 124.2、17.2 和 1.9 U/ml, 标准差分别为 10.6、1.9 和 0.4, 变异系数 (CV) 分别为 8.5%、10.8% 和 18.9%。

2.7 实验感染猴系列血清的定量检测

对采集的实验感染猴系列血清进行定量检测, 结果抗-HEV IgG 第 3 周即阳转, 第 5 周可达到高峰 (230.0 U/ml), 直至观察期末的 21 周仍为阳性 (12.8 U/ml)。抗-HEV IgG 变化趋势见图 3。

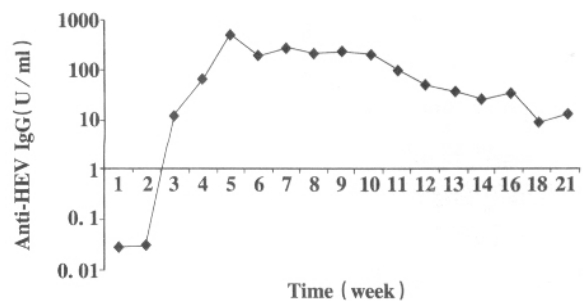


图 3 戊型肝炎病毒实验感染猴系列血清的抗-HEV IgG 水平

Fig 3. Determination of anti-HEV IgG level of HEV-infected monkey by the established quantitation standard

2.8 定量线性标准品的 r 值和 k 值范围

对定量线性标准品在每次定量检测试验中的线性方程进行分析, 结果在 100 次试验中, 有 94 次 $r > 0.98, 1.15 > k > 0.95$, 为保证定量结果的可靠, 可以此作为定量试验有效性的条件。

3. 讨论

抗-HEV IgG 目前被认为是保护性抗体, 但保护性水平尚未确定, 同时, 抗-HEV IgG 也没有统一的

定量标准。WHO 经过联合标定,推出了 1 支总免疫球蛋白 Ig 的定量标准 95/584,其含量为 100 U/ml。该标准来自患者的恢复期血清,含有保护性 Ig 抗体,恢复期的免疫球蛋白中以 IgG 为主。由于目前尚没有抗-HEV IgG 的国际标准品,本研究将 95/584 假定含有 100 U/ml 的抗-HEV IgG,利用该标准标定出 1 份抗-HEV IgG 的定量线性标准品,经过初步应用,证明其可作为抗-HEV IgG 抗体定量标准使用。这样可改变目前广泛使用稀释度的半定量状态,使不同实验结果间具有可比性。采用 WHO 抗-HEV Ig 标准品标定,保证了本标准在国际上的可溯源性。

国外研究表明,抗体水平大于 30 WRU/ml 为最佳界值⁹,可区分真假戊肝抗体阳性。WRU 与 WHO U 的换算关系为 1 WRU/ml = 0.125 WHO U/ml,因此相当于 3.75 U/ml 以上即可确认为阳性。本实验中的 L9 血清经联合标定后,抗-HEV IgG 含量为 16.9 U/ml,可以确认为阳性。同时,经 Western blot 确认,L9 血清与基因 4 型和 1 型 ORF2 C-端抗原均有明显的阳性反应,由此也可确认为戊肝 IgG 抗体阳性。基因 1 型和 4 型是我国目前发现的戊肝病毒 ORF2 抗原主要基因型,以 L9 血清作为定量标准品,适用于我国临床血清的抗-HEV IgG 定量检测。

疫苗的免疫效果评价应以检测出中和抗体为准,国内外研究表明,戊型肝炎病毒中和表位位于 ORF2^{7,9},L9 血清对 ORF2 抗原的免疫印迹呈阳性,表明 L9 血清的抗体谱中含有针对 ORF2 的中和抗体部分,因此利用 L9 血清建立的定量线性标准可适用于疫苗免疫效果评价。

为了验证该定量线性标准品的重复性,对高、中、低浓度的 3 份临床血清进行了 5 次定量检测,结果 CV 分别为 8.5%、10.8%和 18.9%,虽然检测低浓度血清的 CV 较高,但仍比目前用稀释度来衡量抗-HEV IgG 水平的方法更为准确。用该标准品定量检测实验感染猴的系列血清,能有效地反映抗体水平变化趋势。94%的定量检测试验,其定量标准品 r 值能控制在 0.98 以上,斜率 k 能控制在 0.95~1.15 之间。

以上数据均表明,以 L9 血清建立的系列定量标准血清可用于抗-HEV IgG 的定量检测、疫苗的免疫原性评价及戊肝流行病学的调查研究。该套标准品在戊肝疫苗的 I、II 期临床观察中得到了应用,定量效果较好。

国内外戊型肝炎的抗体检测试剂已经有了很大的发展,但因检测 HEV 抗体所用抗原不同,可能导致不同试剂间的灵敏度不同。特别是那些基于 ORF3

的合成肽或重组蛋白在检测恢复期血清时,往往不能满足检测灵敏度的需要。依据 ORF2 抗原研制抗-HEV 诊断试剂要比依据 ORF3 研制的试剂敏感^{1,10},ORF3 合成肽联合 ORF2 重组抗原,可提高灵敏度。本研究对 6 家试剂的灵敏度进行了比较,表明目前的试剂灵敏度差距比较大,由 0.03 到 5.00 U/ml。如采用不同试剂进行临床血清检测或者流行病学调查时,对低浓度样品,部分试剂可能出现假阴性反应,因此应对抗-HEV IgG 的定量水平进行临床和流行病学意义的研究,之后对灵敏度做出控制,统一抗-HEV IgG 检测试剂的质量标准。

综上所述,本研究建立了抗-HEV IgG 的定量标准品,并以一种抗-HEV IgG 检测试剂为基础,建立了一套定量线性标准品,可用于抗-HEV IgG 检测试剂的灵敏度控制以及戊肝疫苗的免疫学效果评价,同时也为戊肝的临床诊断及戊肝抗体水平的流行病学调查提供了参考。

参考文献

- [1] 周诚,黄维金,吴星,等.戊型肝炎病毒感染动物模型应用于抗-HEV 试剂评价的初步研究.中华流行病学杂志,2008,29(1):48-51.
- [2] 何鹏,张华远,王佑春,等.1 型和 4 型戊型肝炎病毒 ORF2 抗原性比较.中华微生物学和免疫学杂志,2006,26(3):210-214.
- [3] Li SW, Zhang J, Li YM, et al. A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates. Vaccine, 2005, 23(22): 2893-2901.
- [4] 周海钧.药品生物检定.1 版.北京:人民卫生出版社,2005:138-141.
- [5] 王军志.生物技术药物研究开发和质量控制.2 版.北京:科学出版社,2007:129-150.
- [6] Innis BL, Seriwatana J, Robinson RA, et al. Quantitation of immunoglobulin to hepatitis E virus by enzyme immunoassay. Clin Diagn Lab Immunol, 2002, 9(3): 639-648.
- [7] Meng J, Dai X, Chang JC, et al. Identification and characterization of the neutralization epitope of the hepatitis E virus. Virology, 2001, 288(2): 203-211.
- [8] Schofield DJ, Glamann J, Emerson SU, et al. Identification by phage display and characterization of two neutralizing chimpanzee monoclonal antibodies to the hepatitis E virus capsid protein. J Virol, 2000, 74(12): 5548-5555.
- [9] Gu Y, Zhang J, Wang YB, et al. Selection of a peptide mimicking neutralization epitope of hepatitis E virus with phage peptide display technology. World J Gastroenterol, 2004, 10(11): 1583-1588.
- [10] 庞立丽,毕胜利.戊型肝炎检测研究进展.中华实验和临床病毒学杂志,2006,20(2):94-96.

(收稿日期:2007-12-27)