

| | | | |
|------------------|---------|----------|-------|
| 2次施設名 () | | 症例番号 () | |
| 風疹症例フォーム | | | |
| | | 平成 | 年 月 日 |
| | | (週 | 日) |
| 貴施設症例番号 () | | | |
| 生年月日 | 年 月 日 | 年齢: | 歳 |
| 住 所 | | | |
| 職 業 歴 | | | |
| 既 往 歴 | | | |
| 風疹既往歴: | あり | なし | 不明 |
| ワクチン歴: | あり (歳) | なし | 不明 |
| 抗体測定歴: | あり | なし | 不明 |
| 「あり」の場合: | | 歳, 測定値: | |
| 月 経 歴 | 初経: 歳 | 周期: 日 | 持続: 日 |
| 産 科 歴 | G () | P () | |
| 子 ども | () 名 | | |
| 子ども, 夫の風しんワクチン歴: | | | |
| | あり | なし | 不明 |
| 貴施設初診日 | 年 月 日 | 妊娠週数: | w d |
| 最終月経 | 年 月 日 | | |
| 予 定 日 | 年 月 日 | | |
| 現 病 歴 | | | |
| 発疹の有無: | あり | なし | 不明 |
| 風疹患者との接触: | あり | なし | 不明 |
| 周囲での流行の有無: | あり | なし | 不明 |
| 抗体測定値: | | | |
| 貴施設名 | | | |
| 主治医名 | | | |
| 連 絡 先 | | | |

図 3-a 問い合わせ用風疹症例フォーム

とくに子どもの多い場所を避けるように指導するべきである。また、妊婦自身は風しんワクチン接種は受けられないので、ご主人やお子さんへの予防接種を勧奨している。これは、風しんワクチン接種を受けても抗体獲得ができない女性たちの場合にも同じであり、妊娠を計画する前に家族に風しんワクチン接種を受けてもらうように説明している。

これらの症例に対する先天性風疹症候群予防

対策のためのもう一つの指導は、分娩後の風しんワクチン接種である。この場合、接種もれを防ぐためには、分娩直後の退院する前に接種をすることをお奨めしている。授乳に影響するようなこともない。実際のところ、出産直後は妊娠の可能性の少ない安全な時期である。出産直後はワクチンの効果が低い、あるいは副作用が強いという報告はないため、産科入院中でも可能である。ただし、授乳中だから妊娠しないと

貴施設症例番号 ()

患者氏名は匿名化して、貴施設ごとの症例通し番号を付けて下さい。

生年月日 年 月 日 年齢: 歳 重要.

住 所 市町村レベルまでで結構です.

職 業 歴 何を, いつから, いつまで. 子どもとの接触の多寡について.

既 往 歴

風疹既往歴: あり なし 不明

いつ? 周囲でも流行していたか, はっきりとした記憶があるか?

診断根拠 (抗体測定は?)

ワクチン歴: あり (歳) なし 不明

多分とかおそらくではなく, 明らかな記憶があるか, 記録, 証明の有無も確認する.

また, ワクチン後の抗体獲得の有無の確認は?

抗体測定歴: あり なし 不明

「あり」の場合: 歳, 測定値:

数値の確認を, 前医への問い合わせ, 母子手帳の確認.

月 経 歴 初経: 歳 周期: 日 持続: 日

産 科 歴 G () P () 抗体測定歴は?

子 ども () 名 重要.

子ども, 夫の風しんワクチン歴:

あり なし 不明

貴施設初診日 年 月 日 妊娠週数: w d

最終月経 年 月 日

予 定 日 年 月 日

現 病 歴

発疹の有無: あり なし 不明

ありの場合, 発疹の時期, 特徴, 持続期間, 他の症状の有無なども記載して下さい.

風疹患者との接触: あり なし 不明

ありの場合, いつ, どこで, どの程度の接触があったのか記載して下さい.

周囲での流行の有無: あり なし 不明

抗体測定値:

検査の日付と妊娠週数, 検査会社名, 検査方法, カットオフ値など. IgG よりも HI を, IgM は EIA 法を, 原則的にペア血清で2回測定.

できれば施設内検査でなく企業で.

残血清検体の有無の確認を依頼してください.

図 3-b 風疹症例フォームの記載のポイント

いう保証はないので, 出産後から数カ月たってしまった場合には, たとえ授乳中であっても避妊指導は不可欠である.

VI. 妊娠中に風疹を疑われたら

万が一, 妊娠中に発疹が出てしまったり, 風疹患者と接触した場合には, まずは電話で連絡

するように説明しておく. いきなり産婦人科に来院されてしまうと, 周囲の他の妊婦さんへ感染させてしまう危険性があるためである. 診察時間をずらしたり, 内科や皮膚科と連携して確定診断を受けるように配慮する.

一方, 妊婦自身には何も症状がなく, 風疹患者との接触がなければ, 抗体検査の結果から風疹の疑いがあると判断されても, 過剰な心配は禁物である. 周囲で風疹が流行していないかど

うかの再確認、ワクチン接種歴や既往歴の詳細などを注意深く問診しなおすこと、風疹抗体の再検査は必要であろう。しかしこのような症例からの先天性風疹症候群の発生は、流行地域を除けば極めて稀である。

先天性風疹症候群の出生も確かに問題であるが、このような風疹疑い症例での無用な人工妊娠中絶の増加も懸念されている。当施設でこれまでに胎児診断を実施した114例のうち、発疹あり、接触ありという症例では胎児の感染率は60%にも及んだが、いずれにも相当しなかった妊婦の場合は胎児の感染率はわずかに4.2%であった。胎内感染が陽性でも先天異常を示さない児もいるため、実際の先天性風疹症候群の発生率はもっと低いと予想される。さらにワクチン接種歴が明らかであった妊婦に至っては、胎児への感染率はゼロであった。

以上をふまえ、まずは主治医（第1次施設）から第2次専門施設（表1）に問い合わせ、追加すべき問診内容や検査について検討する（図2）。この際には、問い合わせ用の専用書式（図3-a, b）を用いて、主治医から妊婦への再問診を依頼している。そのうえで2次施設、場合によっては第3次専門施設からのコメントをもとに、主治医から妊婦への結果説明とカウンセリングを実施してもらっている。

VII. 胎児の検査

風疹と診断されて妊娠継続を迷う症例に対し

ては、十分なカウンセリングのうえで夫婦からの強い希望があれば胎児診断も考慮される。羊水や胎児血などを採取し、polymerase chain reaction (PCR) 法の応用によりウイルスのRNAを検出して胎児の診断を行う方法である³⁾。ただし、発疹や風疹患者との接触もなく、抗体検査のみで風疹を疑われた妊婦の場合、実際にはほとんど先天性風疹症候群の発生が認められていない。このような症例に対して、母児ともに侵襲性のある検査をするか否かは安易に決定されるべきではない。また本検査で胎児感染が陽性と判定されても、必ずしも先天性風疹症候群としての先天異常を示さない。感染のみにとどまるケースも少なくないのである。

当施設でも、たとえ胎児感染の結果が陽性であっても出産を決意されたご家族が多数存在する。検査後の専門医からのカウンセリングは不可欠であり、胎児診断はあくまでも妊娠継続を決断していただくための補助的な胎児の精密検査であると考えている。

文 献

- 1) 厚生労働科学研究「風疹流行にともなう母児感染の予防対策構築に関する研究」(班長：平原史樹)：風疹流行および先天性風疹症候群の発生抑制に関する緊急提言，2004
- 2) Tanemura M et al: Diagnosis of fetal rubella infection with reverse transcription and nested polymerase chain reaction; A study of 34 cases diagnosed in fetuses. Am J Obstet Gynecol 174: 578-582, 1996

Short communication

Evaluation of 10 commercial diagnostic kits for in vitro expressed hepatitis B virus (HBV) surface antigens encoded by HBV of genotypes A to H

Toshiaki Mizuochi*, Yoshiaki Okada, Kiyoko Umemori,
Saeko Mizusawa, Kazunari Yamaguchi*Department of Safety Research on Blood and Biological Products, National Institute of Infectious Diseases,
4-7-1 Gakuen Musashi-Murayama-shi, Tokyo 208-0011, Japan*

Received 26 January 2006; received in revised form 15 March 2006; accepted 21 March 2006

Available online 16 May 2006

Abstract

Genetic variability of the hepatitis B virus (HBV) constitutes one of the major challenges for diagnosis of HBV infection. It is plausible that amino acid substitutions in the “a” determinant of the HBV surface antigen (HBsAg) that affect antigenic sites, whether originating from genetic diversity or from mutations in the HBV strain itself, will affect the sensitivity of some diagnostic kits. In fact, recent studies have indicated that some diagnostic kits had false negative results with particular HBsAg mutants. There have been, however, few substantial studies evaluating sensitivities of diagnostic kits to the HBsAg encoded by different HBV genotypes. Our recent study found that 10 diagnostic kits available in Japan were able to detect HBsAg irrespective of whether it originated from HBV genotypes A, B or C, with the latter two genotypes being the dominant species in East Asia. In this study, we extended our previous efforts by assessing the ability of diagnostic kits to detect recombinant HBsAg derived from HBV genotypes A to H. Our results demonstrated that 9 out of 10 diagnostic kits evaluated were able to detect as low as 0.2 International Units (IU)/ml HBsAg, irrespective of HBV genotype. The genotypic differences in the HBV family thus appear to have little impact on the sensitivity of currently available HBsAg diagnostic kits.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: HBsAg; Diagnostic kits; HBV genotype

Based on an intergroup divergence of 8% or more in the complete nucleotide sequence of approximately 3200 nucleotides, HBV has been classified into eight genotypes, designated as A to H (Okamoto et al., 1988; Norder et al., 1994; Stuyver et al., 2000; Arauz-Ruiz et al., 2002). The prevalence of specific genotypes varies geographically: genotypes A and D are widely distributed throughout the Old World, while genotypes B and C are dominant in East Asia. Furthermore, the distribution of HBV genotypes may vary over time and with population migration. It is therefore critical for diagnostic kits to be able to detect HBsAg encoded by various HBV genotypes with comparable sensitivity. Moreover, given the accumulating body of evidence that certain HBV genotypes correlate with disease features and treatment outcomes, including the severity of liver disease (Mayerat et

al., 1999; Kao et al., 2000a; Orito and Mizokami, 2003), HBe antigen seroconversion (Chu et al., 2002; Ishikawa et al., 2002), and susceptibility to anti-viral drugs (Kao et al., 2000b; Wai et al., 2002; Kao et al., 2002; Zollner et al., 2004), from a treatment perspective the specificity and sensitivity of assays for sub-typing HBV genotypes is also critical. In our previous report (Mizuochi et al., 2005), we evaluated the sensitivity of 10 diagnostic kits to serum/plasma samples containing HBsAg as well as recombinant HBsAg encoded by HBV of genotypes A, B, and C. None of the diagnostic kits examined failed to detect HBsAg of genotypes A, B, and C at the concentration of 0.2 IU/ml. Furthermore, there was no difference between naturally derived antigens, i.e. serum/plasma samples, and recombinant antigens in the outcome of assays. In the present study, we sought to extend our previous study by evaluating the same diagnostic kits for their sensitivity to HBsAg encoded by HBV of all the genotypes reported to date, i.e. A to H.

Plasma specimens of HBV Genotypes A and D were obtained from International Reagents Corporation (Kobe, Japan).

Abbreviations: HBV, Hepatitis B virus; HBsAg, Hepatitis B virus surface antigen; IU, International unit

* Corresponding author. Tel.: +81 42 561 0771; fax: +81 42 562 7892.

E-mail address: miz@nih.go.jp (T. Mizuochi).

Table 1
HBsAg diagnostic kits used in this study

| No. | Method | Antibody (capture/detection) |
|-----|--------|--|
| 1 | CLIA | Monoclonal/polyclonal |
| 2 | EIA | Monoclonal/polyclonal |
| 3 | CLIA | Monoclonal/polyclonal |
| 4 | EIA | Monoclonal/polyclonal |
| 5 | EIA | Monoclonal/monoclonal($\times 2$) ^a |
| 6 | CLEIA | Polyclonal/monoclonal($\times 2$) ^a |
| 7 | CLEIA | Monoclonal/monoclonal($\times 2$) ^a |
| 8 | EIA | Polyclonal/monoclonal |
| 9 | CLIA | Monoclonal/monoclonal |
| 10 | CLIA | Monoclonal/monoclonal |

CLIA: Chemiluminescent immunoassay; EIA: enzyme immunoassay; CLEIA: chemiluminescent enzyme immunoassay.

^a ($\times 2$): Two different monoclonal antibodies.

Genotypes B and C were kindly supplied by Taiwan FDA and Japanese Red Cross, respectively. Genotypes E, F, G, and H were purchased from Teragenix Co. (Ft. Lauderdale, FL, USA). All the HBV full genomes except for genotype H were cloned into plasmids by the method described by Günther et al. (1995). All the plasmids containing HBV full genomes were able to produce HBsAg in culture supernatant by transfection into HuH-7 cells (Nakabayashi et al., 1982) with lipofectin reagent (Invitrogen Co., San Diego, CA, USA). The amount of HBsAg produced by each genotype of HBV is highly variable, depending on the promoter activity of each clone (data not shown). To minimize this variation among the genotypes, S genes were amplified by PCR from plasmids containing HBV full genomes and then cloned into the pEF6/V5-His (Invitrogen Co., San Diego, CA, USA) which has the elongation factor-1 α promoter to express the inserted S genes. The S gene of genotype H was amplified with DNA extracted from the plasma sample by PCR and cloned into the same plasmid. The genotypes of all the cloned S genes were determined by sequencing. Three micrograms plasmid of each genotype were transfected into 2×10^5 HuH-7 cells/well in a six-well culture plate (Asahi Technoglass Co., Chiba, Japan) with 10 μ g lipofectin reagent (Invitrogen Co., San Diego, CA, USA), and the cells were cultured at 37 °C in 5% CO₂. Culture supernatants were harvested after 3 days and stored at –20 °C until use.

The concentration of each recombinant HBsAg sample was tentatively determined by utilizing ARCHITECT HBsAg QT (Abbott Japan Co. Ltd., Chiba, Japan), which is the only quantitative assay kit approved in Japan, and expressed in IU/ml. The concentration of each sample was adjusted to 10 IU/ml with a multi-marker negative matrix (Accurun 810; BBI Co. Ltd., Boston, MA, USA). The samples were subsequently diluted to make two different concentrations (0.2 and 1.0 IU/ml). These test samples of various HBV genotypes were analyzed with 10 diagnostic kits as listed in Tables 1 and 2. Tests were performed according to the manufacturer's instruction and results were expressed as C.O.I. (cut-off index) as shown in Fig. 1A and B. All of the HBsAg samples, irrespective of their HBV genotype, tested positively in all assay kits at the concentration of 1.0 IU/ml (Fig. 1A). When the HBsAg samples at the lower concentration (0.2 IU/ml) were tested, 9 out of 10 kits gave positive

Table 2
HBsAg diagnostic kits used in this study listed in alphabetical order of manufacturers

| Product name | Manufacturer |
|-----------------------------|------------------------|
| AxSYM HBsAg | Abbott Japan Co. Ltd. |
| IMx HBsAg | Abbott Japan Co. Ltd. |
| ARCHITECT HBsAg | Abbott Japan Co. Ltd. |
| PRISM HBsAg | Abbott Japan Co. Ltd. |
| ADVIA Centaur HBsAg Assay | Bayer Medical Ltd. |
| VIDAS HBsAg Ultra | bioMérieux Japan Ltd. |
| Monolisa HBsAg | Bio-Rad Fujirebio |
| Lumipulse II HBsAg | FUJIREBIO INC. |
| Vitros Immunodiagnosics | Ortho-Clinical |
| Products HBsAg Reagent Pack | Diagnostics K.K. |
| Elecsys HBsAg | Roche Diagnostics K.K. |

Note: The order of kits in this table is not corresponding to that of Table 1.

results. Only one kit (No. 8) gave negative results for the HBsAg of genotypes E and F (Fig. 1B). This sensitivity (0.2–1.0 IU/ml) approaches the satisfactory criterion according to the “Guidance for Industry” issued by the FDA or the “CTS” (Common Technical Specification) defined by the EU. Only one kit failed to give positive results for the low concentration of HBsAg (0.2 IU/ml) encoded by the HBV of genotypes E and F (Fig. 1B). The results shown in this study thus confirmed the sensitivity of currently available diagnostic kits to HBsAg encoded by HBV of genotypes A to H.

Since HBsAg genotypes F and H are genetically distant from the other six genotypes (Norder et al., 2004), concerns have been raised as to the ability of the detection of these genotypes by currently available diagnostic kits. The data in this study

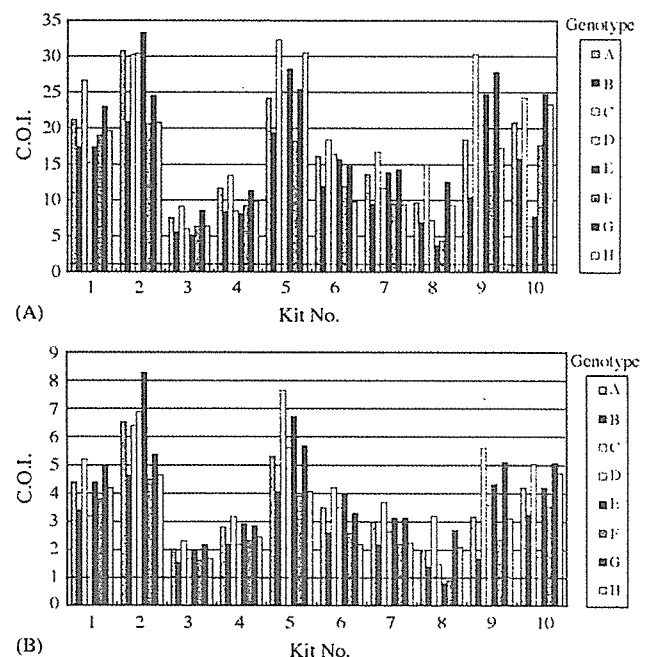


Fig. 1. Detection of recombinant HBsAg (A: 1.0 IU/ml, B: 0.2 IU/ml) derived from HBV of genotypes A to H were assayed by utilizing 10 diagnostic kits listed in Tables 1 and 2. Results were expressed as C.O.I. (cut-off index). The inserted horizontal lines indicate “C.O.I. = 1.0”.

show that 9 out of 10 kits tested are capable of detecting as low as 0.2 IU/ml HBsAg including HBV genotypes F and H, alleviating this concern.

Acknowledgments

We are grateful to the manufacturers who kindly supplied us with the HBsAg diagnostic kits and helped us in performing the assays.

References

- Arauz-Ruiz, P., Norder, H., Robertson, B.H., Magnius, L.O., 2002. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J. Gen. Virol.* 83, 2059–2073.
- Chu, C.J., Hussain, M., Lok, A.S., 2002. Hepatitis B virus genotype B is associated with earlier HBeAg seroconversion compared with hepatitis B virus genotype C. *Gastroenterology* 122, 1756–1762.
- Günther, S., Li, B.-C., Miska, S., Kruger, D.H., Meisel, H., Will, H., 1995. A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. *J. Virol.* 69, 5437–5444.
- Ishikawa, K., Koyama, T., Masuda, T., 2002. Prevalence of HBV genotypes in asymptomatic carrier residents and their clinical characteristics during long-term follow-up: the relevance to changes in the HBeAg/anti-HBe system. *Hepatol. Res.* 24, 1–7.
- Kao, J.H., Chen, P.J., Lai, M.Y., Chen, D.S., 2000a. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 118, 554–559.
- Kao, J.H., Wu, N.H., Chen, P.J., Lai, M.Y., Chen, D.S., 2000b. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *J. Hepatol.* 33, 998–1002.
- Kao, J.H., Liu, C.J., Chen, D.S., 2002. Hepatitis B viral genotypes and lamivudine resistance. *J. Hepatol.* 36, 303–304.
- Mayerat, C., Mantegani, A., Frei, P.C., 1999. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J. Viral Hepat.* 6, 299–304.
- Mizuochi, T., Okada, Y., Umemori, K., Mizusawa, S., Sato, S., Yamaguchi, K., 2005. Reactivity of genotypically distinct hepatitis B virus surface antigens in 10 commercial diagnostic kits available in Japan. *Jpn. J. Inf. Dis.* 58, 83–87.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., Sato, J., 1982. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* 42, 3858–3863.
- Norder, H., Courouge, A.M., Magnius, L.O., 1994. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 198, 489–503.
- Norder, H., Courouge, A.-M., Coursaget, P., Echevarria, J.M., Lee, S.-D., Mushahwar, I.K., Robertson, B.H., Locarnini, S., Magnius, L.O., 2004. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* 47, 289–309.
- Okamoto, H., Tsuda, F., Sakugawa, H., Sastrosoewignjo, R.I., Imai, M., Miyakawa, Y., Mayumi, M., 1988. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J. Gen. Virol.* 69, 2575–2583.
- Orito, E., Mizokami, M., 2003. Hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma in Japan. *Intervirology* 46, 408–412.
- Stuyver, L., De Gendt, S., Van Geyt, C., Zoulim, F., Fried, M., Schinazi, R.F., Rossau, R., 2000. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J. Gen. Virol.* 81, 67–74.
- Wai, C.T., Chu, C.J., Hussain, M., Lok, A.S., 2002. HBV genotype B is associated with better response to interferon therapy in HBeAg(+) chronic hepatitis than genotype C. *Hepatology* 36, 1425–1430.
- Zollner, B., Petersen, J., Puchhammer-Stockl, E., Kletzmayer, J., Sternecker, M., Fischer, L., Schroeter, R., Feucht, H.H., 2004. Viral features of lamivudine resistant hepatitis B genotypes A and D. *Hepatology* 39, 42–50.