

• 论 著 •

中和确认实验对 HBsAg 弱反应性结果的确认及应用评价

李 欣¹,牟代勇²,张 兵¹

(1. 四川省南充市中心医院检验科 637000; 2. 泸州医学院医学检验系 646000)

摘要:目的 应用中和确认试验对乙型肝炎表面抗原(HBsAg)弱反应性样本的结果进行确认。方法 采用电化学发光免疫分析技术(ECLIA)检测 HBsAg,对从中筛选的 26 例弱反应性样本进行中和确认实验,并对结果进行分析评价。结果 26 例弱反应性标本中,经确认 HBsAg 阳性 22 例(84.6%),HBsAg 阴性 2 例(7.7%),不确定 2 例(7.7%)。结论 对于 HBsAg 弱反应性标本,应采用中和确认实验进行确认。

关键词:肝炎表面抗原,乙型; 弱反应性标本; 确认试验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.20.016

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)20-2334-02

Evaluation of the neutralization confirmatory test for weak reactive result of HbsAg

Li Xin¹, Mu Daiyong², Zhang Bing¹

(1. Department of Clinical Laboratory, The Nanchong Central Hospital, Sichuan 637000, China;

2. Department of Clinical Laboratory, The Luzhou Medical Science College, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To evaluate the weak reactive results of hepatitis B surface antigen(HBsAg) by neutralization confirmatory test. **Methods** Twenty six weak reactive samples for HBsAg were detected again with HBsAg neutralization confirmatory assay by electrochemiluminescence immunoassay(ECLIA). **Results** Among the 26 weak reactive samples, 22(84.6%) were true positive, 2(7.7%) were false positive and 2(7.7%) were uncertain. **Conclusion** The confirmatory assay to weak reactive sample for HBsAg is necessary.

Key words: hepatitis B surface antigens; weak reactive samples; confirmatory assay

乙型肝炎病毒(HBV)感染一直以来都是威胁中国人民健康的重大问题。中国 HBV 慢性感染者约占 9.8%,每年乙型肝炎相关疾病死者约 33 万^[1]。乙型肝炎表面抗原(HBsAg)为 HBV 感染的最主要病原标志。一步法酶联免疫吸附测定(ELISA)检测 HBsAg 多年来已有很多方面的技术改进,灵敏度高、特异性好,但其要求两种单克隆抗体所识别的抗原应相距一定距离,以确保两种反应不互相干扰。因此,该方法对所使用的两种抗体应进行选择^[2]。由于血清学反应中的诸多因素会干扰实验,其重复性较差,有时出现非特异性的假阳性。还有报道称,因一步法反应过于强烈,易引起前带现象,即对待检物浓度很高的样品会出现假阴性反应,灵敏度和特异性受到一定影响^[3]。随着检测方法和技术不断更新,许多实验室采用时间分辨免疫荧光法(TRFIA)和电化学发光法(ECLIA)代替传统的 ELISA 法,其检测的灵敏度、特异性都有了显著提高,有效避免了 HBV 感染的漏检和输血、器官移植中的安全隐患,以及由此引起的医患纠纷。本研究采用 HBsAg 确认试验,对弱反应性标本进行中和确认实验^[4]。

1 资料与方法

1.1 一般资料 26 例取自 2009 年 11 月至 2010 年 4 月本院门诊及住院患者,经 E170 检测为弱阳性标本。

1.2 方法

1.2.1 仪器和试剂

1.2.1.1 仪器 罗氏 E170 全自动电化学发光免疫分析仪。

1.2.1.2 试剂 HBsAg 抗原诊断试剂、定标液和质控品(罗氏)。HBsAg 抗原确认试剂(罗氏)。

1.2.2 检测方法

1.2.2.1 HBsAg 的检测 采用 ECLIA,严格按照 E170 仪器和试剂操作说明进行校准,质控在控时进行标本的检测。所得结果中 cut off 指数(COD)≥1.00 时判断为有反应性。

1.2.2.2 HBsAg 确认实验 经 E170 HBsAg 检测中的弱反应性标本,用证实试剂和对照试剂按平行处理方法。充分混匀以上经处理的反应物,然后置于 2~8 °C 温育过夜。确认试剂中过量的抗 HBsAg 抗体中和标本中的 HBsAg。在随后进行的 Elecsys HBsAg 实验中,标本的 COI 将比原值降低。在测定预处理标本前,先校准、做质控,质控在控后,按常规 HBsAg 试验操作处理后的标本进行检测,见表 1~4。

表 1 COI<7 标本的处理

试剂	确认组	对照组
确认试剂	20 μL	/
对照试剂	/	20 μL
标本	180 μL	180 μL

/: 无数据。

表 2 7≤COI≤30 标本的处理

试剂	确认组	对照组
确认试剂	100 μL	/
对照试剂	/	100 μL
标本	100 μL	100 μL

/: 无数据。

1.3 结果判定 当 precicontrol HBsAg2 与确认试剂反应的 COI 同 precicontrol HBsAg2 与对照试剂反应的 COI 之比小于 50% 时, 实验为有效。确认实验判定方式: 标本与确认试剂反应的 COI/标本与对照试剂反应的 COI 小于 50% 确认阳性; 标本与确认试剂反应的 COI/标本与对照试剂反应的 COI 大于 50% 确认阴性; 标本与对照试剂反应的 COI<1.00 为不确定。

表 3 COI>30 的标本的处理

试剂	确认组	对照组
确认试剂	100 μ L	/
对照试剂	/	100 μ L
1: 20 稀释标本	100 μ L	100 μ L

/: 无数据。

表 4 precicontrol HBsAg2 标本的处理

试剂	确认组	对照组
确认试剂	20 μ L	/
对照试剂	/	20 μ L
precicontrol HBsAg2	180 μ L	180 μ L

/: 无数据。

2 结果

在所有的弱反应性标本中, 经确认试验 22 例 (84.6%) 为阳性, 2 例 (7.7%) 为阴性, 2 例 (7.7%) 不确定, 有 24 例得到了确认。对照实验结果见表 5。

表 5 确认实验结果 (n)

COI	n	阳性	阴性	不确定
1~1.1	2	0	0	2
>1.1~7	9	9	0	0
>7~30	11	10	1	0
>30	4	3	1	0
合计	26	22	2	2

3 讨论

HBsAg 证实试验依据特异抗体中和原理。多克隆抗 HBsAg 抗体与 HBsAg 的免疫决定簇结合, 从而封闭掉对 Elecsys HBsAg 试验所用抗体的结合位点。证实试剂中过量的抗 HBsAg 抗体中和标本中的 HBsAg。在随后进行的 Elecsys HBsAg 实验中, 标本的 COI 将比原值降低。

HBsAg 的检测时, 传统的 ELISA 法面临着如下一些问题: 标本溶血时, 红细胞内的 Hb 游离入血清, 因 Hb 具有类过氧化物酶的活性, 其作用效应与辣根过氧化物酶类似, 如果反应孔因非特异性吸附 Hb 使其残留, 则会催化底物显色造成假阳性; 标本需离心至血清澄清, 若离心不完全, 血液未完全凝固或血清未完全析出就加入标本进行检测, 致使检测反应孔出现凝血现象或残留细胞成分干扰, 导致 HBsAg 出现假阳性。因为纤维蛋白丝或残留细胞成分都会牢固地吸附在包被孔内, 如未被洗掉, 这些成分中的亚铁血红素有类似过氧化物酶的结构, 能将底物中的过氧化氢氧化释放出新生态氧, 将显色液中的四甲基联苯胺氧化生成蓝色的邻甲偶氮苯, 造成 HBsAg 出

现假阳性^[5]; 标本如果受细菌污染, 因菌体中可能含有内源性辣根过氧化物酶同样易产生非特异性显色, 出现假阳性; 标本如果在冰箱中存放过久, 血清中 IgG 聚合成多聚体, 甲胎蛋白 (AFP) 可形成二聚体, 在 ELISA 测定中会导致本底过深, 甚至造成假阳性; 如果人血清中含有类风湿因子、补体、嗜异性抗体、嗜靶抗原自身抗体等非特异性物质, 对 ELISA 测定有干扰作用, 易造成假阳性^[6]。

化学发光免疫测定 (CLIA) 技术是继 ELSA、放射免疫技术和荧光免疫技术之后发展的一项新兴检测技术。ECLIA 是电化学发光 (ECL) 和免疫测定相结合的产物。有研究者用 ECLIA 在检测乙肝标志物时发现用化学发光法灵敏度更高, 专属性更强^[7]。

E170 全自动电化学发光免疫分析仪采用第二代电化学发光法检测 HBsAg, 根据 COI 作出半定量, 其线性范围宽^[8], 同时具有高灵敏度和准确度, 系统精密度好、特异性强, 对于结果的判断很有价值。

本次实验, 26 例弱反应性样本中有 2 例判断为不确定, 占 7.7%, 分析未被确认的原因认为是 COI 值太低 (<1.10), 因阳性值过低, 在预处理过程中, 被对照试剂稀释, 而使得标本与对照试剂反应后 COI<1.00, 无法判定确认结果。26 例弱反应性标本有 24 例得到了确认, 达 92.3%, 2 例为确认阳性, 2 例为确认阴性。

对于无法确认的弱反应性标本, 可复查一次, 如果仍为可疑, 可与临床医生沟通, 是否接受过小鼠单抗治疗或是否为接受高剂量生物素治疗的患者, 在短时间内采集了标本, 建议近期复查观察变化。有报道称 HBV 感染者中存在一部分隐匿性乙型肝炎感染的情况, 即 HBV 持续存在, 肝内可检出病毒, 但血清中不能检出 HBsAg, 病毒 HBV DNA 低水平或阴性。在这种下可出现弱阳性情况。HBV 感染人群中有一部分血清 HBsAg 呈低水平存在, HBsAg 低值弱阳性的 HBV 感染可能与 HBsAg 低水平表达、HBV 的整合、含 HBV 循环免疫复合物的形成有关, 并与来自宿主方面的诸多因素有关^[9-11]。但主要原因是大多数 HBV 感染者随年龄增长 HBV 逐渐清除, HBsAg 逐渐下降, 并有可能伴有血清学转换, 出现抗-HBs 等^[12]。有研究发现, 产生 HBsAg 弱阳性的现象也可能是患者免疫功能受损后, 机体与 HBV 或其产物产生新的平衡反应, 一般情况下不具有严重致命性, 但部分滴度低的 HBsAg 阳性者仍存在 HBV 复制。因此, 在机体免疫功能受损时可导致肝脏病情加重, 甚至癌变。患者血清中 HBsAg 的含量高低与疾病发展的严重程度并不成正比, 多数患者的临床症状轻微, 或无任何临床症状, 但 HBV 可产生慢性的终生隐形感染, 这可能是肝癌发生的因素之一^[13]。

在国外, 检测 HBsAg 呈阳性的样本应报告“有反应性”, 必须经中和试验确认后才能报告“HBsAg 阳性”^[14]。本次实验弱反应性标本出现了不确定和假阳性, 因此使用 Elecsys 检测 HBsAg 出现弱反应性的情况下, 在条件成熟时, 应进行确认实验, 由此可以保证阳性结果的真实性。

参考文献

- [1] 鲍俊杰, 杨红玲, 郭彩娇, 等. 酶联免疫吸附测定(下转第 2338 页)

在本研究中,CAA 组 YY 基因纯合型频率与对照组相比有增加,但差异无统计学意义;而 CAA 组 SY 基因杂合型频率和携带 Y 等位基因频率与对照组相比也有增加,差异有统计学意义。且 SY 基因型频率和携带 Y 等位基因频率也与 CAA 发病相对危险度呈正相关,说明 UCH-L1 基因的 S18Y 多态性的杂合子 SY 可能是 CAA 的遗传易感性基因型,Y 等位基因携带者也对 CAA 有较高的遗传易感性。而 YY 纯合基因型频率与对照组相比虽有增加,但差异无统计学意义,说明 UCH-L1 的 S18Y 多态性与 CAA 之间的关系与 Y 等位基因的量有关,间接印证了 YY 纯合基因型 UCH-L1 对异常蛋白 A β 的清除作用增强,可能对 CAA 具有一定的保护作用,可能降低 CAA 发病率。

综上所述,本实验研究了中国汉族人群 UCH-L1 基因 S18Y 多态性与脑淀粉样血管病的关系。由于本实验样本量较小以及单一位点研究,不能全方位了解 UCH-L1 基因 S18Y 多态性对 CAA 的影响,这是本研究的不足,将来可继续扩大样本,做进一步的研究。另外,鉴于 UCH-L1 基因在 UPS 系统中的重要功能,应该对该基因的其他可能位点和外显子多态位点大样本量联合分析,以分析其单倍型及与 CAA 的相关性,将更有可能揭示 UCH-L1 基因与 CAA 关系。

参考文献

- [1] Smith SD, Eskey CJ. Hemorrhagic stroke[J]. Radiol Chin North Am, 2011, 49(1): 27-45.
- [2] Giorgi FS, Bandettini di Poggio A, Battaglia G, et al. A short overview on the role of alpha-synuclein and proteasome in experimental models of Parkinson's disease[J]. J Ngural Transm Suppl, 2006(70): 105-109.
- [3] Maraganore DM, Lesnick TG, Elbaz A, et al. UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene[J]. Ann Neurol, 2004, 55(4):

(上接第 2335 页)

- 法与化学发光微粒子免疫分析法检测广州地区儿童 HBsAg 结果分析[J]. 中西医结合肝病杂志, 2009, 19(1): 45.
- [2] 王金良. 实用检验医学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 783.
- [3] 刘锡光. 肝炎实验诊断指南[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 18.
- [4] 陈李双, 杨培华, 黄伟. 乙型肝炎表面抗原确认试验的临床应用探讨[J]. 现代医院, 2008, 8(2): 13.
- [5] 郭军芳, 储小勇. ELISA 法检测 HBsAg 影响结果因素的分析[J]. 中国中医药现代远程教育, 2008, 6(7): 727-729.
- [6] 陈望荣, 邱林清. 中和试验在确认 HBsAg 弱反应性样本中的意义[J]. 现代医院, 2008, 8(5): 64.
- [7] 翟艳, 王卉. 化学发光免疫分析及其进展[J]. 长春中医药大学学报, 2009, 25(4): 619-620.
- [8] 赵秀英, 陈俊梅, 辛永梅, 等. 不同方法检测乙型肝炎病毒血清标志物的差异[J]. 肝脏, 2008, 13(4): 303-305.
- [9] 王蕾, 刘华, 王雯静, 等. 中和确认试验对低水平 HBsAg 结果的确

512-521.

- [4] Greenberg SM, Rebeck GM, Vonstted JIG, et al. Apolipoprotein E epsilon 4 and cerebral hemorrhage associated with amyloid angiopathy[J]. Ann Neurol, 1995, 38(2): 254-259.
- [5] 王拥军. 神经病学实验室诊断技术[M]. 北京: 北京科学技术文献出版社, 1998: 8.
- [6] Silke M, Peter B, Juergen T, et al. The S18Y polymorphism in the UCHL1 gene is a genetic modifier in Huntington's disease[J]. Neurogenetics, 2006, 7(1): 27-30.
- [7] Buqiani O, Giaccone G, Rossi G, et al. Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis associated with the E693K mutation of APP[J]. Arch Neurol, 2010, 67(8): 987-995.
- [8] Arvanitakis Z, Leurgans SE, Wang Z, et al. Cerebral amyloid angiopathy pathology and cognitive domains in older persons[J]. Ann Neurol, 2011, 69(2): 320-327.
- [9] Zhang HL, Linn J, Bruckmann H, et al. Prevalence of superficial siderosis in patients with cerebral amyloid angiopathy[J]. Neurology, 2010, 74(17): 1346-1350.
- [10] Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, et al. The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility[J]. Cell, 2002, 111(2): 209-218.

[11] Osaka H, Wang YL, Takada K, et al. Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron[J]. Hum Mol Genet, 2003, 12(16): 1945-1958.

[12] Maraganore DM, Lesnick TG, Elbaz A, et al. UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene[J]. Ann Neurol, 2004, 55(4): 512-521.

(收稿日期: 2011-08-09)

认及其应用评价[J]. 检验医学, 2010, 25(1): 28-29.

[10] Hou J, Wang I, Cheng J, et al. Prevalence of naturally occurring surface gene variants of hepatitis B virus in nonimmunized surface antigen negative Chinese carriers[J]. Hepatology, 2001, 34(5): 1027-1034.

[11] Coursaget P, Yvonne B, Bourdil C, et al. HBsAg positive reactivity in man not due to hepatitis B virus[J]. Lancet, 1987, 330(8572): 1354-1358.

[12] 骆抗先. 乙型肝炎的基础与临床[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 221-223.

[13] 易珍, 汤春园, 徐明辉, 等. 乙型肝炎表面抗原弱阳性结果探讨[J]. 应用预防医学, 2008, 14(3): 183.

[14] 黄伟, 杨培华, 陈健, 等. 乙型肝炎病毒表面抗原确认试验的临床应用[J]. 检验医学, 2008, 23(2): 178.

(收稿日期: 2011-08-09)