

对比研究[J]. 河北医药, 2010, 32(18): 2600-2601.  
 [12] 何静, 陈方祥, 刘建忠, 等. BioVue 微柱凝胶法检测孕妇产前抗体效价分析[J]. 重庆医学, 2007, 36(24): 2482-2493.  
 [13] 李凌波, 王冬倩, 陈云声, 等. 国产微柱凝胶免疫检测试剂卡检测孕妇 IgG 血型抗体效价的实验研究[J]. 中国免疫学杂志, 2008, 24(12): 1138-1141.  
 [14] 刘智勇, 董玉红, 何凤娥, 等. 微柱凝胶法在检测孕妇 IgG 抗体中的应用研究[J]. 成都医学院学报, 2010, 5(2): 149-151.  
 [15] 吴穗, 董伟群, 佟力, 等. 孕妇血型抗体效价检测的方法学探讨[J]. 昆明医学院学报, 2010, 31(9): 49-51.  
 [16] 张健, 董建红, 孙佰秀, 等. 微柱凝胶法检测 1 610 例 O 型血孕妇

IgG 抗体效价的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2008, 16(2): 67.  
 [17] 李建新, 吴夏枫, 陈梅莲, 等. 抗人球蛋白微柱凝胶法和试管法检测孕妇 IgG 抗-A(B) 的比较[J]. 临床检验杂志, 2006, 24(3): 213-214.  
 [18] 谢一唯. 孕妇血清 IgG 抗-A(B) 抗体效价微柱凝胶法室内参考值测定[J]. 全科医学临床与教育, 2009, 7(5): 476-477.  
 [19] 彭小虎, 刘竞, 赵国胜, 等. 微柱凝胶法测定孕妇 IgG 抗-A(B) 效价的评价[J]. 实用预防医学, 2006, 13(3): 773-774.

(收稿日期: 2012-02-20)

• 检验技术与方法 •

## 自制乙型肝炎病毒表面抗原中和抗体的临床应用

曹树正, 范庆坤<sup>△</sup>, 王文武, 张真路

(湖北省武汉市亚洲心脏病医院检验中心 430022)

**摘要:**目的 通过自制乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)中和抗体, 评价其在临床检验中的应用。方法 选取 HBsAg 经微粒子酶免疫分析技术(MEIA)初筛标本速率值/临界值(S/CO)在 0.80~10.0 之间的血清标本 149 例, 使用自制 HBsAg 中和抗体进行验证。结果 149 例标本经自制 HBsAg 中和抗体验证后, 112 例(75.2%)结果确认为阳性, 5 例(3.3%)为阴性, 26 例(17.5%)为假阳性, 6 例(4.0%)为不确定。自制 HBsAg 中和抗体与罗氏确证试剂对 30 例标本进行比对验证, 总符合率 96.7%(29/30)。结论 自制 HBsAg 中和抗体验证试验可提高 HBsAg 检测准确性, 处于灰区水平的检测结果应采用更灵敏的方法进行验证。

**关键词:** 肝炎表面抗原, 乙型; 中和抗体; 验证试验

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.11.031

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)11-1349-02

乙型肝炎病毒(HBV)感染呈世界性流行, 但不同地区 HBV 感染的流行强度差异很大。中国属 HBV 感染高流行区<sup>[1]</sup>。乙型肝炎的筛查和诊断常用血清学指标中以乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)最为重要<sup>[2]</sup>。因此, 对于 HBsAg 检测的准确度就显得尤为重要。目前, 检测方法主要有 ELISA 法、微粒子酶免疫分析(MEIA)法、电化学发光分析(ECLIA)法等。由于各种方法均设定阳性判断值(cutoff), 处于 cutoff 周围的弱反应性的标本则可能影响较大<sup>[3]</sup>。因此, 国内外报道均提出如 HBsAg 检测结果呈有反应性则需进一步验证<sup>[4-6]</sup>。目前, 国内外 HBsAg 确证试剂价格昂贵, 未能广泛应用于常规检测。基于现状, 本院自制 HBsAg 中和抗体, 针对弱反应性标本做验证试验, 对其临床应用进行初步分析。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 本院 2009 年 1~10 月血清标本 13 772 例, 选择 HBsAg 经 MEIA 法检测标本速率值/临界值(S/CO)在 0.80~10.0 之间的标本做验证试验, 最终入选 149 例。并从 149 例标本中随机选取 30 例标本, 以德国罗氏公司 HBsAg 确证试剂作为标准, 与自制 HBsAg 中和抗体验证试验结果进行比对。

**1.2 仪器与试剂** 美国雅培公司 AxSYM 免疫分析系统, 德国罗氏公司 E601 免疫检测系统, 芬兰 Labsystems Dragon Multiskan III 酶标仪。美国雅培公司 AxSYM 配套 HBsAg(V2)试剂盒, 批号: 78264LF03; 德国罗氏公司 E 601 配套 HBsAg II、乙型肝炎病毒表面抗体(HBsAb)试剂盒, 批号分别为: 152836、152088; 罗氏公司 HBsAg 中和试剂盒, 批号: 152443-01。上海科华生物工程股份有限公司乙型肝炎两项(HBsAg、HBsAb)

ELISA 法诊断试剂盒。

### 1.3 方法

**1.3.1 原理** 自制 HBsAg 中和抗体验证试验反应原理参照美国雅培公司 ARCHITECT HBsAg V.1 确证试剂说明书。HBsAg MEIA 法检测灵敏度为 0.1~0.6 ng/mL, ECLIA 法检测灵敏度为 0.05~0.1 ng/mL。所有操作及结果判定严格按照试剂说明书进行。

**1.3.2 自制含 HBsAg 中和抗体血清及对照血清的筛选与制备** 所选血清标本均要求无溶血、黄疸、脂血, 甲型肝炎病毒 IgM 抗体、丙型肝炎病毒抗体、艾滋病毒抗体、梅毒抗体检测均为阴性。其中, 选择数例( $n > 30$ )经 ELISA 法检测 HBsAg 阴性、HBsAb S/CO > 20.0 的血清混合制备 HBsAg 中和抗体血清; 选择数例( $n > 30$ )经 ELSIA 法检测 HBsAg、HBsAb 均阴性的血清混合制备对照血清。经 56 °C 水浴灭活 10 h, 最终分别经 ECLIA 法检测, 含 HBsAg 中和抗体血清: HBsAg S/CO < 0.500, HBsAb > 3 000 IU/L; 对照血清: HBsAb < 2.00 IU/L, HBsAg S/CO < 0.500。分装并放置 -80 °C 冰箱中保存、备用。

**1.3.3 验证试验** 取 50  $\mu$ L 含 HBsAg 中和抗体血清及对照血清分别与 200  $\mu$ L 被检血清混合, 并分别标记为中和管、对照管, 同时加做阳性、阴性质控。放置 37 °C 水浴 1 h, 采用 MEIA 法检测各管 HBsAg, 经 MEIA 法初筛标本 HBsAg S/CO < 1.00 时, 则延长反应时间, 另用 ECLIA 法检测 HBsAg, 以 ECLIA 法作为结果判断标准, 所测得 S/CO 值计算 HBsAg 的抑制率, 计算公式为:

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: fanqingkun@hotmail.com.

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照管 S/CO 值} - \text{中和管 S/CO 值}}{\text{对照管 S/CO 值}} \times 100\%$$

### 1.4 验证试验结果判读

1.4.1 阴、阳性质控标本被检测出,同时对对照管 HBsAg 检测 S/CO ≥ 1.00,判断为有效;反之,判断为验证试验无效,需重新检测被检血清或重做验证试验。

1.4.2 HBsAg 阳性判定试验有效后,若被检标本的抑制率大于或等于 50%,则判读被检标本 HBsAg 阳性;若抑制率小于 50%,且中和管 S/CO > 1.0,需将被检标本稀释 500、20 000 倍后,再做中和试验,若抑制率大于或等于 50%,则判读 HBsAg 阳性;如标本稀释至 20 000 倍时抑制率小于 50%,则判读为 HBsAg 阴性或不确定。若对照管的 S/CO 高于原始 HBsAg 结果,则怀疑该标本存在钩状效应。则需提高标本稀释倍数。

## 2 结果

### 2.1 自制 HBsAg 中和抗体验证试验弱反应性标本检测结果

149 例标本经自制 HBsAg 中和抗体验证后,112 例(75.2%)结果确诊为阳性,5 例(3.3%)为阴性,26 例(17.5%)为假阳性,6 例(4.0%)为不确定,见表 1。

表 1 自制 HBsAg 中和抗体验证试验结果

| HBsAg S/CO 值       | 检测方法  | n  | 阳性率<br>[n(%)] | 假阳性率<br>[n(%)] | 不确定率<br>[n(%)] |
|--------------------|-------|----|---------------|----------------|----------------|
| 0.80 < S/CO ≤ 0.99 | EMIA  | 9* | 0(0.0)        | —              | 0(0.0)         |
|                    | ECLIA | 9* | 4(44.4)‡      | —              | 0(0.0)         |
| 0.99 < S/CO ≤ 2.00 | EMIA  | 50 | 25(50.0)      | 21(42.0)       | 4(8.0)         |
| 2.00 < S/CO ≤ 5.00 | EMIA  | 52 | 46(88.5)      | 4(7.7)         | 2(3.8)         |
| 5.00 < S/CO ≤ 10.0 | EMIA  | 38 | 37(97.4)△     | 1(2.6)         | 0(0.0)         |

\*:相同标本;‡:另有 5 例(3.3%)确认为阴性;△:1 例标本经稀释 500 倍后检测为阳性;—:无数据。

### 2.2 自制 HBsAg 中和抗体确认试验与罗氏 HBsAg 确证试验结果对比 见表 2。

表 2 自制 HBsAg 中和抗体验证试验与罗氏 HBsAg 确认试验结果对比

| HBsAg S/CO 值       | n  | 自制验证试验<br>阳性/阴性(n/n) | 罗氏确证试验<br>阳性/阴性(n/n) |
|--------------------|----|----------------------|----------------------|
| 0.80 < S/CO ≤ 0.99 | 5  | 3/2                  | 3/2                  |
| 1.00 ≤ S/CO ≤ 2.00 | 8  | 8/0                  | 8/0                  |
| 2.00 < S/CO ≤ 5.00 | 11 | 11/0                 | 10/0*                |
| 5.00 < S/CO ≤ 10.0 | 6  | 6/0                  | 6/0                  |
| 合计                 | 30 | 28/2                 | 27/2*                |

\*:1 例结果为不确定。

## 3 讨论

在中国,流行的 HBV 血清型主要是 adrq+ 和 adw2,少数为 ayw3(主要见于新疆、西藏和内蒙古自治区),基因型主要为 C 型和 B 型<sup>[7]</sup>。HBsAg 是感染 HBV 的临床判断的重要指标之一。目前,由于 HBsAg 的检测影响因素很多,包括试剂对突变株的检测能力<sup>[8]</sup>。cutoff 值的设定、患者标本的内源性及其外源性干扰因素。其中内源性干扰因素包括类风湿因子、补体、高浓度的非特异免疫球蛋白、异嗜性抗体、某些自身抗体、交叉反应物质等,外源性干扰因素包括标本溶血、细菌污染、贮存时间过长、凝固不全等<sup>[5]</sup>。并且有报道低水平血清 HBsAg

阳性人群占有一定的比例<sup>[9]</sup>。实验室对于 HBsAg 检测呈反应性的标本有必要采取进一步的验证措施。

笔者选择 HBsAg 经 MEIA 法检测呈低反应性标本,选用自制 HBsAg 中和抗体进行验证试验,同时随机选择部分标本与罗氏中和抗体验证试验进行比对。研究结果提示,自制 HBsAg 中和抗体验证试验可提高 HBsAg 检测准确性,自制中和抗体与罗氏中和抗体试剂有很好的相关性。自制中和抗体是选择多例高 HBsAb 浓度的血清标本制备而成,与检测标本一起孵育,若标本中含有 HBsAg,会被 HBsAb 中和掉,通过测定标本中 HBsAg S/CO 值变化来判断 HBsAg 的抑制率。

研究数据显示,对 EMIA 法 HBsAg 初筛结果处于灰区低水平(0.80 < S/CO ≤ 0.99)的标本中通过验证发现 4 例标本阳性,因此 HBsAg 处于灰区水平时应尽可能选择更灵敏的方法(如 ECLIA 法)进行验证。其中,出现 1 例标本需稀释 500 倍后,做验证试验为阳性,这可能是由于 HBsAg 浓度过高所致<sup>[3]</sup>。50 例 HBsAg S/CO 值在 1.00~2.00 之间的标本,假阳性率达到 42%(21/50),这应引起研究者的注意。通过与罗氏确认试验结果的比对,两种试验总体符合率很高,达到 96.7%,但仍存在 1 例不确定的结果,具体原因有待进一步跟踪研究。

自制 HBsAg 中和抗体制作简便,成本低廉。但是,由于 HBV 基因型和突变株存在着地区、种族差异以及乙型肝炎患者受药物治疗而导致基因位点突变<sup>[10]</sup>,HBsAg 中和抗体血清受筛选血清的影响,并不能适合所有人群。此次研究入选的标本量有限,自制中和抗体验证不能完全代替 HBsAg 确证试验,其临床应用价值有待进一步证实。

综上所述,自制 HBsAg 中和抗体验证试验可提高 HBsAg 检测准确性,处于灰区水平的检测结果应采用更灵敏的方法进行验证。HBsAg 初筛结果 S/CO 值越低,假阳性率越高,必须对结果进行验证。

## 参考文献

- [1] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南[J].中华肝脏病杂志,2011,16(1):2-16.
- [2] 李金明.乙型肝炎病毒血清标志物测定及结果解释的若干问题[J].中华检验医学杂志,2006,29(5):385-389.
- [3] 方筠,韩晓辉,张晓航,等.一种国产 HBsAg 确认试剂的临床应用评价[J].中华检验医学杂志,2009,32(6):696-699.
- [4] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3版.南京:东南大学出版社,2006:618-619.
- [5] 李金明.感染性疾病血清学检验中应重视对弱反应性标本的确认[J].中华检验医学杂志,2006,29(7):577-580.
- [6] Weinbaum CM, Williams I, Mast EE, et al. enters for Disease Control and Prevention. Recommendations for identification and public health management of persons with chronic hepatitis B virus infection[J]. MMWR Recomm Rep, 2008, 57(RR-8): 1-20.
- [7] 范金水,庄辉,李远贵,等.我国 8 城市 HBsAg 阳性和阴性乙型肝炎患者的病毒血清型和基因型分析[J].中华微生物学和免疫学杂志,1998,18(2):88-91.
- [8] 祝长城,罗春贞,王纛.乙肝表面抗原突变体的表达及其初步应用[J].细胞与分子免疫学杂志,2007,23(12):1136-1139.
- [9] 陈瑜,钟步云,徐根云,等.低水平血清乙肝病毒表面抗原测定及其临床意义[J].中华检验医学杂志,2001,24(1):39-41.
- [10] 马亚平,曹红,李俊枫.乙型肝炎病毒基因型、YMDD 变异与病毒复制水平的关系[J].国际检验医学杂志,2011,32(3):400-401.