

• 临床检验研究论著 •

采用 ELISA 差减分析法探讨武汉地区中老年患者 IEM HBsAg 的携带状态*

殷波涛¹, 李方和^{2△}, 张永东³, 张春燕², 陈妍², 周明权⁴

(华中科技大学同济医学院附属同济医院: 1. 检验科; 2. 医学实验中心, 湖北武汉 430030;

3. 武汉市急救中心检验科, 湖北武汉 430024; 4. 湖北省广水市第二人民医院检验科, 湖北广水 432721)

摘要:目的 探讨武汉地区中老年患者血清免疫逃逸变异表面抗原(IEM HBsAg)携带状态。方法 以 2 种不同抗 HBs mAb 包被, 采用酶联免疫吸附法(ELISA)对 1 641 例中老年既往 HBV 感染者的血清标本进行检测, 并以中和实验及广谱 IEM HBsAg 试剂对单一阳性者血清 HBsAg 检测的特异度进行验证。结果 所建立的 G6-ELISA 与 E2-ELISA 具有大致相同的稳定性、特异度与灵敏度, 对该组血清检测的阳性率分别为 29.37%、29.01%。6 例 G6-ELISA 单一阳性血清中, 抗 HBs、抗 HBe、抗 HBc、HBeAg 及 HBV DNA 阳性例数分别为 3、1、6、1、2 例, 抗 HBs 中和实验阳性率为 100.00%, 平均中和率 81.14%。雅培化学发光试剂复核此 6 例均为阳性结果。结论 结合文献与该课题组既往研究分析, 该组中老年患者中存在少量呈优势表达的 IEM HBV 感染者。

关键词:老年医学; 乙型肝炎病毒免疫逃逸变异表面抗原; 酶联免疫吸附测定

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.02.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)02-0129-03

The investigation of immune escape mutant HBsAg in the quinquagenarian carriers in Wuhan area by ELISA differential analysis*

Yin Botao¹, Li Fanghe^{2△}, Zhang Yongdong³, Zhang Chunyan², Chen Yan², Zhou Mingquan⁴

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Medical Experimental Center, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China;

3. Department of Clinical Laboratory, Wuhan Emergency Center, Wuhan, Hubei 430024, China;

4. Department of Clinical Laboratory, Guangshui Second People's Hospital, Guangshui, Hubei 432721, China)

Abstract: **Objective** To investigate the situation of the immune escape mutant HBsAg in the quinquagenarian carriers in Wuhan area by using ELISA differential analysis. **Methods** Two different anti-HBs mAbs were used as coated antibodies to detect HBsAg in 1 641 quinquagenarian HBV carriers under the same reagents and operation condition. Neutralization reactions and broad spectrum immune escape mutant HBsAg reagents were used to verify the specificity of the HBsAg positive reaction in single reagent above-mentioned. **Results** The two reagents respectively named G6-ELISA and E2-ELISA showed similar in the stability, specificity and sensitivity. The positive rates of the two reagents in detecting the quinquagenarian serum HBV carriers were 29.37% and 29.01%, respectively. In the 6 positive samples which were detected by single G6-ELISA, the positive samples of anti-HBs, anti-HBe, anti-HBc, HBeAg and HBV DNA were 3, 1, 6, 1 and 2 respectively. The positive rate in anti-HBs neutralization test was 100.00%, and mean neutralization rate was 81.14%. 6 samples all showed positive reactions in Abbott chemoluminescence reagent. **Conclusion** Combining the bibliographical information and former researches, there were few carriers whose HBV immune escape mutant HBsAg express as dominant strain in serum in this group of quinquagenarian HBV carriers.

Key words: geriatrics; IEM HBsAg; enzyme-linked immunosorbent assay

以相同或不同方法或试剂对临床标本做比对检测曾对乙型肝炎病毒(HBV)免疫标志物(HBVm)检测技术的发展起到过重要推动作用^[1-2], 但它在诊断中潜在的临床价值则较少有人关注。笔者曾在 HBV 免疫逃逸变异表面抗原(IEM HBsAg)的临床检测中对这一实验方式的临床诊断价值进行过探讨^[2-3], 并将其用于既往中老年 HBV 感染者血清 IEM HBsAg 的临床检测。现总结如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 待检血清 1 641 例, 男性 1 059 例, 年龄 52~79 岁, 于 2008 年 3~11 月自本院及市内周边医院采集, 分离血清, 置-20℃冻存至检测, 既往均有乙型病毒性肝炎(简称

乙肝)病史, 近年内血清 HBVm 检测 1 项以上阳性 3 次。对照血清 52 例, 采自华中科技大学 2006 年度体检新生, 全部新生于 1 年内接种乙肝疫苗, 无肝炎病史, 临检、生化与其他免疫学指标均正常。

1.2 仪器与试剂 抗 HBs-G6 mAb IgG(G6 mAb)为同济医学院医学实验中心制备^[2]; 抗 HBs-E2 mAb IgG(E2 mAb)亦由该中心收集并提供, 该抗体针对 HBsAg“a”决定簇, 以其为原料制备的市售试剂具有很好的特异度、灵敏度及稳定性^[3]。酶联免疫吸附法(ELISA)包被板条购自深圳保安塑料制品公司; 酶标记抗 HBs(抗 HBs-HRP)及其他 ELISA 辅助试剂由郑州安图绿科生物工程有限公司提供。rG145R HBsAg 由同济医

* 基金项目: 科技部“国家 2008 年科技重大专项课题: 艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治专项”资助项目(2008ZX10205)。作者简介: 殷波涛, 男, 主管技师, 主要从事免疫临床研究。△ 通讯作者, E-mail: fhli@tjh.tjmu.edu.cn。

院医学实验中心制备^[4];雅培化学发光试剂与 HBsAg ELISA 检测高浓度质控血清(卫生部临床检验中心颁布)等自市售购得;小鼠抗 HBs 多克隆抗体由中国国药集团武汉生物制品研究所赠送。

1.3 方法

1.3.1 血清 HBsAg ELISA 的建立 G6-ELISA 采用二步法双抗体夹心 ELISA,操作流程如下:(1)将 G6-mAb 以 pH9.3 碳酸盐缓冲液稀释,加至酶标反应板各孔中,每孔 100 μL,4 ℃ 放置过夜。(2)以 PBST 洗涤 5 次,每次 1 min,加入 2%BSA,每孔 100 μL,置 37 ℃ 2 h。(3)弃封闭液,加入不同稀释度待测标本与阴、阳性对照物,每孔 50 μL,37 ℃ 反应 30 min。(4)同上洗板,每孔再加入 50 μL 羊抗 HBs-HRP,37 ℃ 反应 30 min。(5)同上洗板,加入 TMB-H₂O₂ 溶液显色 15 min,以 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应,置酶标仪上,450 nm 波长测定 A 值,以 P/N≥2.1 判为阳性。E2-ELISA 同上述二步法双抗体夹心 ELISA 检测。除包被抗体采用抗 HBs-E2 mAb 外,其他辅助器材、试剂及其操作方法等均与 G6-ELISA 相同。

表 1 2 种 ELISA 对 HBsAg 检测特异度的比较

方法	wtHBsAg (50 mg/mL,OD)	rG145R HBsAg (50 ng/mL,OD) *	HBeAg 阳性 血清(OD) **	腺病毒载体培养 上清(OD)	其他对照物(OD) #
G6-ELISA	2.89	3.16	<0.05	<0.05	<0.05
E2-ELISA	3.11	0.23	<0.05	<0.05	<0.05

*:培养上清初提物;** :多种市售试剂检测血清 HBsAg 呈阴性结果;#:包括 2A8 细胞培养上清、1.0% BSA、健康者血清等。

2.1.2 灵敏度 将卫生部临床检验中心 HBsAg 检测 ELISA 质控物系列稀释后,采用 2 种自制 HBsAg 检测试剂以上述方法进行测定,以 P/N≥2.5(或 OD≥0.10)为阳性标准,对其灵敏度进行评价。当质控物含量在 0.062 5 ng/mL 时,2 种方法 450 nm 处的 A 值分别为 0.172 与 0.126。由此认定 2 种方法的灵敏度大致相似。

2.1.3 稳定性 将卫生部临床检验中心 HBsAg 检测 ELISA 质控物准确稀释至 2.00 ng/mL,采用 G6-ELISA 及 E2-ELISA 试剂做重复检测(10 次),以评价方法的稳定性。结果 G6-ELISA 的批内和批间变异系数(CV)分别为 7.8%、9.4%,E2-ELISA 的批内和批间 CV 分别为 8.4%、11.9%。

2.2 血清 HBsAg 的对比检测

1.3.2 方法特征考核 采用替代实验、系列稀释实验以及批内与批间重复实验对方法的特异度、灵敏度与稳定性进行考核,具体实验方法见既往文献报道^[3]。

1.3.3 血清 HBsAg 化学发光检测 采用雅培公司生产的化学发光试剂,在 I 2000 化学发光系统上进行检测。

1.3.4 中和实验 中和实验以 G6-ELISA 为基础。将鼠抗 HBs IgG 稀释至 10.0 μg/mL,与等体积 G6-ELISA 阳性血清混匀,37 ℃ 反应 30 min 后,取 100 μmol/L 混合物加至反应孔中做 G6-ELISA,并根据未中和孔计算其中和率^[3]。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行数据统计分析。计数资料以百分率表示,组间比较采用 χ² 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 方法的建立与考核

2.1.1 特异度 以 2 种不同抗 HBs mAb 包被,在市售试剂基础上建立检测血清 HBsAg G6-ELISA 及 E2-ELISA,采用抗原替代实验对二法的特异度进行考核,实验结果见表 1。

2.2.1 检测阳性率比较 采用 G6-ELISA 与 E2-ELISA 对本组血清进行 ELISA 差减分析检测,2 种方法阳性率分别为 29.37%与 29.01%,前者阳性率较后者略高(P>0.05);G6-ELISA 阳性、E2-ELISA 阴性标本 6 例,而 G6-ELISA 阴性标本无一例 E2-ELISA 呈阳性结果。

2.2.2 阳性反应强度的比较 对 476 例 G6-ELISA 与 E2-ELISA 同时阳性标本的检测信号强度进行分析,2 种方法 A 值大致相当者 384 例(占 80.70%,相差在 30%以内),存在一定偏差者 73 例(占 15.30%,相差 31%~99%),前者 A 值大于后者达 100%或以上者 19 例。此 19 例中有 7 例 E2-ELISA 产物 A 值小于 0.5,12 例 A 值为 0.5~1.43,除 1 例低值标本外,其余标本 A 值均为 G6-ELISA 大于 E2-ELISA。

表 2 ELISA 差减分析实验阳性标本多项 HBVm 的对比检测

标本号	G6-ELISA 法 A 值	E2-ELISA 法 A 值	其他 HBVm 定性检测结果				
			抗 HBs	抗 HBe	HBeAg	抗 HBc	HBV DNA
7	1.89	<0.13	—	—	—	+	—
123	2.38	<0.13	+	—	—	+	+
541	0.79	<0.13	—	—	—	+	+
975	1.24	<0.13	—	—	+	+	—
1 136	0.41	<0.13	+	+	—	+	—
1 342	0.23	<0.13	+	—	—	+	—

2.3 G6-ELISA 单独阳性标本的特异度验证

2.3.1 抗 HBs 中和实验 6 例血清非中和孔平均 A 值为

0.965,中和孔平均 A 值为 0.182,抗 HBs 中和率均大于 70% [平均(81.14±6.45)%]。

2.3.2 广谱试剂印证复核 采用雅培 I 2000 化学发光系统及其配套试剂对上述对比分析阳性(G6-ELISA 检测阳性而 E2-ELISA 检测阴性)血清进行复核,全部血清均呈阳性反应,阳性符合率达 100.00%,HBsAg 定量检测的范围为 1.7~55.6 IU/mL。2 种方法实验信号强度的相关性并不明显。

2.3.3 单项检测阳性标本 HBVm 的比较 对 6 例单独 G6-ELISA 阳性血清标本其他 HBVm 表达状态进行检测,实验结果见表 2。

3 讨论

对 HBVm 临床检测技术的研究推进了检验技术的发展,但其在临床诊断中的潜在价值却一直被忽略。血清 IEM HBsAg 的发现是这种潜在价值的偶然体现^[5-7]。Ijaz 等^[6]及 Louisirirochanakul 等^[7]的研究组先后采用不同临床检测试剂,对 1 组 IEM HBV 感染高危倾向人群做对比检测,发现单一试剂阳性标本中包含着少量 IEM HBV 感染者,其诊断经抗 HBs 中和、HBV DNA 检测及直接法 DNA 测序证实。Bowden^[8]在综合分析大量比对检测资料后,提出不能轻率否定单一试剂检测阳性患者存在 HBV 感染的可能性,在 HBV 感染低发的欧美国家,这一结果需经血清 HBV DNA 检测进行确认。

近十余年来,HBV 感染筛查方法与试剂的研发历经了 2 个主要阶段。前一阶段主要致力于实验方法特异度、灵敏度、稳定性与简便性等技术特征的改善;2005~2010 年则致力于通过对抗 HBs 原料的进一步优化提升其对 IEM HBsAg 检测的性能^[3,8-9]。研发过程中比对结果的差异早期通常归因于实验方法在特异度、灵敏度与稳定性上的差异,最近有学者将其归因于不同试剂对 IEM HBsAg 的检测能力的差异^[3,5-7]。为证实这一推测,笔者所在单位曾致力于高 IEM HBsAg 检测能力抗体的制备研究,提出 ELISA 差减分析的设想,将这些成果用于临床检测,并取得与 Ijaz 等相似的实验结果^[2-3,6,9]。

ELISA 差减分析系指采用 2 种对 wtHBsAg 灵敏度大致相同的试剂或市售试剂做比对检测,并将 IEM HBsAg 检测能力较强的试剂单一阳性者判定为 IEM HBsAg 阳性,以期直观地发现部分呈优势表达的 IEM HBsAg 阳性者。这种简便方法在最初提出时,笔者及其他研究者并未刻意对检测方法进行严格限定,亦未能考虑更多的实验细节。本研究则以 2 种经反复验证的抗 HBs 做包被,在其他实验试剂及其操作条件完全相同的前提下,同步建立 2 种相似的 HBsAg ELISA 法,以期待其结果具有较好的可比性。

在此实验条件下对 1 641 例临床患者进行检测,检出 6 例单一 G6-ELISA 阳性的临床患者,并发现一定数量 2 种方法检测 A 值相差较大的标本。采用中和实验及雅培化学发光试剂进行复核,此 6 例标本的 HBsAg 特异度亦均得以证实,ELISA 差减分析比对实验理念能够成立^[3,6-7]。本研究结果提示本地区既往 HBV 感染中老年人群中聚集着一定数量的 IEM HBV 感染者(包括优势或伴随感染)。

本组中高龄 IEM HBV 感染者的聚集可能与如下因素有关:(1)入选对象 HBV 感染的长期存在为突变提供了充裕的时间;(2)系统治疗尤其是西医抗病毒治疗为病毒突变提供人为的动因;(3)抗 HBV 尤其是既往乙肝疫苗接种诱导的中高

滴度抗 HBs 持续存在为 HBV S 基因的突变提供了进一步的免疫动力。

既往的流行病学调查显示,中老年乙肝患者体内病毒复制水平下降、血清 HBsAg 自然阴转比例增加、社会活动范围及其对社会影响显著缩小,这些因素导致该类人群在 HBV 感染流行病学中的价值长期未得到应有的重视^[10-11]。加之东亚人种对 HBV 的易感性极高,现行疫苗诱导抗 HBs 对 IEM HBV 感染的预防无能,长辈对间代子女的过分溺爱,不文明养育方式的残留(尤其在中老年人群),以及社会对 HBV 感染经生活接触传播的不断弱化^[10-12],使得国内中老年乙肝患者在 HBV 尤其是 IEM HBV 的传播中发挥了重要作用,应引起医务工作者的重视。

参考文献

- [1] Ly TD, Servant-Delmas A, Bagot S, et al. Sensitivities of four new commercial hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) assays in detection of HBsAg mutant forms[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(7): 2321-2326.
- [2] Li FH, Zhang CY, Liu JH, et al. Preparation, identification, and clinical application of anti-HBs monoclonal antibody that binds both wild-type and immune escape mutant HBsAg[J]. Front Med China, 2009, 3(3): 277-283.
- [3] 李方和, 李佩珊, 刘静华, 等. ELISA 差减分析——一种简便实用的免疫逃逸变异 HBsAg 检测新方法[J]. 中国免疫学杂志, 2010, 26(7): 642-645, 654.
- [4] 张波, 李方和, 龚劲松, 等. 重组 G145R HBsAg 亲和纯化方法的建立及其应用[J]. 中国生物制品学杂志, 2007, 20(10): 767-770.
- [5] Coleman PF. Detecting hepatitis B surface antigen mutants[J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12(2): 198-203.
- [6] Ijaz S, Torre F, Tedder RS, et al. Novel immunoassay for the detection of hepatitis B surface "escape" mutants and its application in liver transplant recipients[J]. J Med Virol, 2001, 63(3): 210-216.
- [7] Louisirirochanakul S, Kanoksinsombat C, Theamboonlert A, et al. Mutation of the "a" determinant of HBsAg with discordant HBsAg diagnostic kits[J]. Viral Immunol, 2004, 17(3): 440-444.
- [8] Bowden S. Serological and molecular diagnosis[J]. Semin Liver Dis, 2006, 26(2): 97-103.
- [9] 刘静华, 黄永国, 张春燕, 等. 乙肝泛变异 HBsAg 检测方法的建立及其在临床的初步应用[J]. 中国实验诊断学, 2008, 12(10): 1199-1203.
- [10] 骆抗先, 何超. 老年人中的无症状乙型肝炎病毒感染[J]. 中华流行病学杂志, 1992, 13(2): 65-67.
- [11] 刘丽珍. 老年人无症状乙肝病毒感染特征的探讨[J]. 中国冶金工业医学杂志, 1994, 11(4): 236.
- [12] Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact[J]. J Clin Virol, 2005, 32(2): 102-112.

(收稿日期: 2012-09-18)