

## • 临床检验研究论著 •

# 乙型肝炎病毒表面抗原高值阴性样本的研究\*

张汉奎, 王伟佳<sup>△</sup>, 黄燕华, 杜满兴, 梁培松

(中山大学附属中山医院检验医学中心, 广东中山 528403)

**摘要:**目的 研究乙型肝炎病毒表面抗原阴性高值样本的漏检状况并探讨减少漏检的方法。方法 参照临床与实验室标准化协会(CLSI)颁布的 EP15-A2 文件验证 ARCHITECT I2000 定量乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)的检测精密度和准确度, 保证仪器条件符合实验要求。研究期间内收集 ELISA 法定性 HBsAg 结果的样本吸光度值/临界值之比(S/CO)值为 0.30~0.99 范围的 1 130 例样本进行复检, 复检后 S/CO 值仍为 0.30~0.99 的 387 例样本, 采用雅培 I2000 进行 HBsAg 定量检测的结果作为参考, 研究 HBsAg 阴性高值样本的漏检状况, 并采用 ROC 曲线对 ELISA 法定性判定乙型肝炎病毒核心抗体(HBcAb)阳性人群的 HBsAg 阳性结果判断值的确定, 寻找更好的诊断性能。结果 i2000SR 检测 HBsAg 的结果具有良好的重复性, 总不精密度小于 9.88%, 与定值校准品的偏差小于 3.91%, 符合临床检测要求。该研究发现 S/CO 值为 0.30~0.99 HBsAg 的样本在不同的批次检验中分布差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 且该研究期内有 261 例出现 HBsAg 漏检; HBcAb 阳性组的样本利用 ROC 曲线对 ELISA 定性 HBsAg 结果重新进行临界值的再确定为 0.51 后, 其中 239 例重新判断为阳性。结论 提高 ELISA 法定性检测 HBsAg 的重复性和 HBcAb 阳性人群建立新的 ELISA 法定性 HBsAg 阳性判断值 0.51, HBsAg 对于 S/CO 值为 0.30~0.99 的样本具有更好的诊断性能。

**关键词:**肝炎表面抗原, 乙型; 酶联免疫吸附测定; 实验室技术和方法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.15.029

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)15-2035-03

## Research on HBsAg negative samples with high value\*

Zhang Hankui, Wang Weijia<sup>△</sup>, Huang Yanhua, Du Manxing, Liang Peisong

(Laboratory Medicine Center, Affiliated Zhongshan Hospital, Sun Yat-sen University, Zhongshan, Guangdong 528403, China)

**Abstract: Objective** To study the situation of missing detection of HBsAg negative samples with high value and to explore the ways for reducing the missing detection. **Methods** According to the document EP15-A2 issued by the Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI), the precision and accuracy of the HBsAg quantitative detection by the ARCHITECT I2000 were verified for ensuring the instrument conditions conforming to the test requirements. The 1 130 samples with the ratio of the sample absorbance value to critical value(S/CO) in the range 0.30—0.99 in the HBsAg qualitative results by ELISA were collected during the study period and re-tested. After re-testing, the quantitative HBsAg of 387 samples, in which the ratio of S/CO was still in the range 0.30—0.99, were detected by the ARCHITECT I2000 and the detection results were taken as the reference. The missing detection situation of HBsAg negative samples with high value was researched. The ROC curve was adopted to reassess the cutoff value of negative HBsAg with positive HBcAb for searching better diagnostic performance. **Results** The HBsAg detection results by the i2000SR had good repeatability with total imprecision of less than 9.88% and the deviation value with calibrator was less than 3.91%, which conformed to the clinical testing requirements. This study found that the HBsAg samples with the S/CO ratio of 0.30—0.99 had the significant distribution differences in the different batches of test ( $P<0.05$ ). In the study period, 261 cases of HBsAg missing detection occurred; then the critical value of HBsAg qualitative results detected by ELISA in the HBcAb positive group was re-determined as 0.51 by using the ROC curve, among them 239 cases were rejudged as positive. **Conclusion** Increasing the repeatability of HBsAg qualitative detection by ELISA and establishing the new positive judgement value of ELISA for qualitative HBsAg in the HBcAb positive population as 0.51 possesses better diagnostic performance for detection the HBsAg samples with the S/CO ratio of 0.30—0.99.

**Key words:** hepatitis B surface antigens; enzyme-linked immunosorbent assay; laboratory techniques and procedures

乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)诊断人体感染乙型肝炎病毒(HBV)的已成常识, 但由于其受限于方法学或所用试剂检测灵敏度低等原因在日常工作中难免出现漏检, 导致了一部分隐匿性 HBV 感染<sup>[1]</sup>。目前检测 HBsAg 的方法有多种, 最为常用最为广泛的方法仍然是酶联免疫吸附试验(ELISA), 而 ELISA 法与化学发光法相比灵敏度低。因 ELISA 法灵敏度低所致的 HBsAg 漏检现状及如何减少 HBV 隐匿性感染的发

生是本研究课题的重点。对此, 本研究参考美国雅培公司 i2000SR 化学发光检测系统检测 HBsAg 的结果, 对 ELISA 定性 HBsAg 的 S/CO 值为 0.3~0.99 的人群进行了研究, 现报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2012 年 4 月至 2013 年 10 月在本院体检科、门诊、住院部就诊的人群中 ELISA 定性 HBsAg 结果 S/

\* 基金项目: 广东省中山市科技局医疗卫生科研基金(20132A114)。 作者简介: 张汉奎, 男, 副主任技师, 主要从事检验医学免疫学研究。

△ 通讯作者, E-mail: zhanghankui@126.com。

CO 值为 0.3~0.99 的 HBsAg 样本 1 130 例,其中男性 954 例,女性 568 例,年龄均为 2~86 岁。分离 300 μL 血清分装于 -70 ℃ 冰箱保存。血清均无肉眼可见溶血、脂血及黄疸。

**1.2 仪器与试剂** 瑞士产 Xiril 智能液体处理工作站加标本,德国 Dade Behring 公司产 BEPⅢ 全自动酶联分析仪进行后处理。定性试剂由中山生物工程有限公司提供;i2000SR 发光分析仪及其配套试剂、校准品及质控品,均由美国雅培公司提供。

**1.3 样本分析** 用同一 ELISA 检测系统对实验样本复检两对半,记录并分析数据。从复检样本中再次挑选 HBsAg 的 S/CO 值为 0.30~0.99 并伴 HBcAb 阳性的样本,用雅培 i2000SR 进行定量检测 HBsAg 记录数据并分析。考虑到厂商声明的 HBsAg 检测假阳性标本浓度范围为 0.05~0.15 IU/mL 范围,由此将 HBsAg 定量结果大于或等于 0.15 IU/mL 为阳性,反之为阴性。

**1.4 i2000SR 检测 HBsAg 精密度与准确度验证** 参照 CLSI EPI5-A2 文件对精密度的验证要求,并根据仪器说明书,选定接近说明书中厂商对分析物的评价浓度为实验浓度,分别选用(0.03、0.26、90.75、161.91 IU/mL),浓度样本均为高值检测标本采用低值血清进行配制后,-70 ℃ 冰箱保存。配制样本的理论值均连续检测 3 次以后算其均值求得。然后将以上每个浓度标本分为 20 份,每天检测 4 份,连续检测 5 d,记录并分析数据。同时对两个水平不同批号的定值校准品进行重复检测,取均值与校准品标识值进行比较,计算相对偏差,以相对偏差小于或等于 10% 判断准确度性能的可接受性。

**1.5 临界值建立** 通过 ROC 曲线对 HBcAb 阳性的人群重新进行 ELISA 定性 HBsAg 结果临界值的确定并分析其必要性。参考雅培 i2000SR 定量检测 HBsAg 的阴、阳性结果,对 HBcAb 阳性时的 ELISA 定性 HBsAg 检测结果进行综合分析,其中设定真阳性诊断界值为 1.0,真阴性诊断界值为 0.0,建立 HBcAb 阳性人群的 HBsAg 诊断 HBV 感染的临界值。

**1.6 统计学处理** 采用统计软件 SPSS17.0 对数据进行分析,两组数据均值间比较采用 t 检验, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 精密度与准确度验证** i2000SR 测定不同浓度 HBsAg 不精密度见表 1。在所选浓度范围内,厂商声明的 HBsAg 批内不精密度 CV 为 2.4%~8.7%,总不精密度 CV 为 4.2%~11.9%。从表 1 可见,本实验结果均小于厂商声明结果。HBsAg 相对定值标准品偏差为(7.2 ± 1.28)%,偏差均小于 10%,符合实验要求。浓度 4 结果均小于阳性判断值 0.05,不精密度可接受。

表 1 i2000 测定 HBsAg 的精密度

标本类型	$\bar{x}$ (IU/mL)	批内不精密度		总不精密度	
		s(IU/mL)	CV(%)	s(IU/mL)	CV(%)
浓度 1	0.2575	0.018	6.850	0.0254	9.880
浓度 2	161.91	5.650	3.490	7.5770	4.680
浓度 3	90.750	2.532	2.790	4.3740	4.821

**2.2 S/CO 值为 0.3~0.99 的 HBsAg 样本 ELISA 定性复检结果分析** S/CO 值处于 0.30~0.99 的样本由原来 1 130 例复检后减少到 399 例,例数明显减少( $P < 0.05$ ),其中 S/CO < 0.3 有 717 例,≥1.0 有 26 例。复检后 S/CO 值均值为 0.41 与复检前 0.67 明显降低( $P < 0.05$ )。S/CO 值处于 0.30~

0.99 范围并伴 HBcAb 阳性样本有 387 例。再将 387 例用 i2000SR 定量 HBsAg 阳性(结果大于或等于 0.15 IU/mL)为 261 例,占其 387 例总数的 67.4%。

**2.3 临界值建立** 通过 ROC 曲线对 HBcAb 阳性时 ELISA 定性 HBsAg 结果重新确定的临界值见图 1。判断值、准确度、敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值、ROC 曲线下面积及 Youden 指数分别为 0.51、94.7%、92.7.0%、97.6%、92.4%、84.8%、0.990 及 0.94。可见 ROC 曲线下面积均为 0.983,阳性伴判断值为 0.51 时 HBsAg 能很好地诊断伴 HBcAb 阳性人群的 HBV 感染,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。说明 ELISA 定性 HBsAg 结果对 HBcAb 阳性人群诊断 HBV 感染时有必要建立新的阳性判断值。ROC 曲线图见图 1。

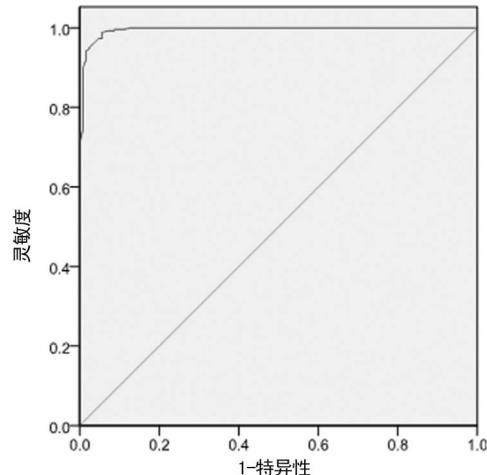


图 1 ROC 曲线图

## 3 讨 论

本研究参照美国临床与实验室标准化协会发布的仪器性能评价标准文件,对 HBsAg 检测仪器 i2000SR 的检测精密度和准确度进行评价,证实其分析性能符合本实验要求。i2000SR 定量检测 HBsAg 试剂盒所用抗体是可针对多种突变株、具有高亲和力抗原决定簇的多种单克隆抗体,能有效地识别各种逃逸变异株而避免漏诊,已经成为国外检测病毒性肝炎血清学指标的主流试剂<sup>[2]</sup>。i2000SR 定量检测 HBsAg 技术灵敏度高、特异性强、重复性好,结果准确可靠符合本实验要求。

本研究发现高值阴性样本在不同的批次检验中的分布差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),当实验成功,阴性对照、本底吸光度值等实验室指标处于最好水平时高值阴性样本所占比例为 1%~3%,反之可达 21%。这不但印证了 ELISA 技术重复性差,同时也说明 ELISA 操作技术要求高、工作细心及责任心强才能保证实验成功,这要求可能与平时所说 ELISA 法操作简便相矛盾。在本研究期内本实验室有 261 例 ELISA 定性 HBsAg 阴性伴 HBcAb 阳性样本而 i2000 定量检测阳性。显而易见这与其他研究报道的 ELISA 法灵敏度不及发光法一致<sup>[3]</sup>,对此对 HBcAb 阳性组的样本利用 ROC 曲线对 ELISA 定性 HBsAg 结果重新进行临界值的再确定为 0.51 后,其中 239 例判断为阳性,明显减少了 ELISA 定性 HBsAg 假阴性的样本( $P < 0.05$ ),说明了新的阳性判断值具有更好的诊断性能。从 HBsAg S/CO 值分析中发现其呈偏态分布,且随着 S/CO 值数值越大,诊断 HBsAg 阳性的可能性也越大,对于伴 HBcAb 阳性的样本中,假阳性假阴性分布在 0.32~0.57 范围,由此可建立灰区或可疑范围。

(下转第 2039 页)

发性不孕，而原发性不孕患者体内自身抗体的产生机制目前尚未完全明确。

如图 4(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)所示，比较不同病因引起的继发性不孕患者自身抗体阳性率，差异无统计学意义( $P>0.05$ )，表明不孕相关抗体的表达与患者的基础病因无直接相关性。

ANA 广义上是针对细胞内所有抗原成分的自身抗体的总称，与前述抗体比较，无器官特异性和种属特异性<sup>[15]</sup>。本研究发现，虽然不孕组中 ANA 的阳性率与对照组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )，但抗体滴度多大于或等于 1:100，而且不孕相关性抗体阳性患者的 ANA 阳性率与抗体阴性患者比较，差异有统计学意义( $P<0.05$ )。表明患者体内自身抗体的产生可能与器官特异性抗体的异常表达，激活体内免疫应答，诱导 ANA 基础水平升高有关。同时，Reimand 等<sup>[16]</sup>的研究也证实多囊卵巢综合症等引起的继发性不孕患者，ANA 水平升高，有发展为自身免疫疾病的倾向，应该引起临床医生的重视。

总之，女性不孕症与自身免疫抗体存在密切关系。应用蛋白微阵列技术同步联合检测多种不孕不育自身抗体，可以提高诊断方法的特异性和灵敏度，更适用于临床的辅助诊断。研究者需加强认识自身免疫抗体对女性不孕的影响，不孕原因不明确时，应考虑到免疫性因素的影响。

## 参考文献

- [1] 曹泽毅. 中华妇产科学: 下册 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 2590-2591.
- [2] 王铮, 仇东辉. 不孕不育妇女自身免疫抗体的研究 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2008, 16(1): 10-11.
- [3] Damario MA. General aspects of fertility and infertility [J]. Methods Mol Biol, 2014, 1154(1): 3-23.
- [4] Narayanan M, Murthy PS, Munaf SA, et al. Potential health hazards of assisted human reproduction. Possible immunological com-

(上接第 2036 页)

HbsAg 诊断人体 HBV 感染的指标已成常规，但因测定技术不够灵敏度等原因导致呈现低水平或不能检出而至灵敏度不理想。呈现低水平可能原因包括以下方面<sup>[4]</sup>：(1)HBV S 基因的变异导致 HBsAg 结构和抗原性发生变化，从而引起抗原抗体结合异常，反应信号下降，而出现假阴性或者弱阳性，而实际上体内 HBsAg 仍处于高水平表达。(2)因个体的免疫应答水平低下、抗病毒治疗等原因，使得 S 基因表达低下，而出现实际的低水平。由此可见 ELISA 定性 HBsAg 出现低水平或不能检出是不可避免的。另外，当机体被 HBV 感染后产生的 HBcAb 不是保护性抗体，可伴随乙肝病毒存在且 HBcAb 可以不随乙肝病毒感染的康复而消失，HBcAb 的阳性率达 20%，Chevrier 等<sup>[5]</sup>研究发现 HBcAb 滴度与 HBV 隐匿性感染有一定的相关性，不仅可以作为既往 HBV 感染的标志，也可以提示隐匿性 HBV 感染的可能。说明 HBcAb 阳性可以佐证 HBV 感染的指标。显然在理论上 ELISA 定性 HBsAg 结果联合 HBcAb 可以增加对 HBV 感染的诊断性能是可能的，这与本研究结果一致。

我国仍是 HBV 高流行区域，隐匿性 HBV 感染多见。为减少因 ELISA 灵敏度不高而导致的隐匿性 HBV 感染，根据研究成果，试制定如下程序：(1)严格规范 ELISA 定性 HBsAg 检测的每一环节，强化操作责任心；(2)结果处于“S/CO 值为

- plications[J]. Hum Reprod, 1996, 11(4): 701-702.
- [5] Feng HL, Han YB, Sparks AE, et al. Characterization of human sperm antigens reacting with anti-sperm antibodies from an infertile female patient's serum[J]. J Androl, 2008, 29(4): 440-448.
- [6] Mathur S, Garza DE, Smith LF. Endometrial autoantigens eliciting immunoglobulin(Ig) G, IgA, and IgM responses in endometriosis [J]. Fertil Steril, 1990, 54(1): 56-63.
- [7] Koyama K, Hasegawa A, Mochida N, et al. Follicular dysfunction induced by autoimmunity to zona pellucid[J]. Reprod Biol, 2005, 5(3): 269-278.
- [8] Amato F, Warnes GM, Kirby CA, et al. Infertility caused by HCG autoantibody[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(3): 993-997.
- [9] 陈桂冰, 黄绍坤. 免疫不孕患者自身抗体检测结果分析 [J]. 职业与健康, 2008, 24(1): 1725-1726.
- [10] 钟春英, 彭蓉. 蛋白芯片技术 [J]. 生物技术通报, 2004, 20(2): 34-37.
- [11] 李泽松, 张文, 曹恒杰. 蛋白微阵列研究进展 [J]. 生物技术通报, 2003, 14(1): 333-335.
- [12] Monnier-Barbarino P, Forges T, Faure GC, et al. Gonadal antibodies interfering with female reproduction [J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2005, 19(1): 135-148.
- [13] 张建平, 余裕炉. 不孕不育妇女四项自身免疫抗体的研究 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2003, 11(5): 135-153.
- [14] Akhter S, Alam H, Khanam NN, et al. Characteristics of infertile couples[J]. Mymensingh Med J, 2011, 20(1): 121-127.
- [15] 毕胜利. 临床检验免疫学 [M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2008: 66-67.
- [16] Reimand K, Talja I, Metsküla K, et al. Autoantibody studies of female patients with reproductive failure [J]. J Reprod Immunol, 2001, 51(2): 167-176.

(收稿日期: 2014-02-10)

0.51~1.00”并伴 HBcAb 阳性的样本用 i2000 定量复检，如是阴性发出。(3)如果定量阳性的样本与临床沟通，并建议进行 HBV DNA 检测或定期复查。本程序于 2013 年 12 月试行以来收到的临床正面的反馈信息。

## 参考文献

- [1] 张振华, 叶瑁, 杨东亮. 隐匿性乙型肝炎病毒感染的研究进展 [J]. 实用肝脏病杂志, 2008, 11(1): 200-203.
- [2] Scheiblauer H, Soboll H, Nick S. Evaluation of 17 CE-Marked HBsAg assays with respect to clinical sensitivity, analytical sensitivity, and hepatitis B virus mutant detection [J]. J Med Virol, 2006, 78 Suppl 1: S66-70.
- [3] 李金明. 临床酶免疫测定技术 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2005: 104.
- [4] 王蕾, 刘华, 王雯静, 等. 低水平乙型肝炎表面抗原的检测及其临床价值评估 [J]. 微生物与感染, 2009, 4(1): 9-12.
- [5] Chevrier MC, St-Louis M, Perreault J, et al. Detection and characterization of hepatitis B virus of anti-hepatitis B core antigen-reactive blood donors in Quebec with an in-house nucleic acid testing assay [J]. Transfusion, 2007, 47(10): 1794-1802.

(收稿日期: 2014-02-24)