

• 检验技术与方法 •

低水平 HBsAg 标本的检测及其临床意义

刘 琴, 彭 辉

(新疆维吾尔自治区中医医院临检中心, 新疆乌鲁木齐 834000)

摘要:目的 探讨低水平乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)的检测方法及其临床意义。方法 血清样本为上海科华公司生产的 HBsAg 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒或罗氏 cobas E601 分析仪免疫发光分析仪初筛为弱阳性的标本;用丽珠 HBsAg 中和试剂盒(酶联免疫法)或罗氏 cobas E601 进行确认试验,并结合相应样本的肝功能及 HBV-DNA 检测结果进行分析。结果 经科华试剂盒初筛为弱阳性的 53 例样本中,丽珠 HBsAg 中和试剂盒检测为阳性 37 例、阴性 16 例;经电化学发光法检测为弱阳性的 18 例样本中,丽珠 HBsAg 中和试剂盒检测为阳性 4 例,阴性 6 例。结论 不同检测系统检测低水平 HBsAg 的结果存在差异,低水平 HBsAg 的临床价值有待进一步研究。

关键词:乙型肝炎表面抗原; 低水平; 临床意义

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.17.042

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)17-2364-03

Detection of low-concentration HBsAg and its clinical significance

Liu Qin, Peng Hui

(Department of Clinical Laboratory, Traditional Chinese Medicine Hospital of the Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi, Xinjiang 834000, China)

Abstract: Objective To investigate the methods for the detection of serum samples with low-concentration HBsAg and its clinical value. **Methods** Serum samples with HBsAg weak positive were measured by ELISA or using Roch cobas e601 were collected from the clinical laboratory. The samples with low-concentration HBsAg were confirmed by neutralization assay by using Lizhu ELISA reagent Kit or Roch cobas e601 analyzer. at the same time, ALT/AST concentrations and HBV DNA copies were also determined. **Results** Among 53 samples that showed weak positive reaction by using Kehua reagent kit, 37 samples were positive in neutralization test, while the other 16 samples were negative. Among 18 samples that showed weak positive reaction tested by using Roch cobas e601 analyzer, 13 samples showed positive in neutralization test, and the other 5 samples showed negative. **Conclusion** The results of HBsAg test varies in different detection System. The clinical significance of samples with low-concentration HBsAg needs further study.

Key words: Hepatitis B virus surface antigen; low leve; clinical value

乙型肝炎病毒(HBV)感染的流行病学调查表明,我国乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)携带者超过 1.2 亿,慢性乙型肝炎患者约占 3 000 万,每年报告新发乙型肝炎病例约 50 万。在 HBV 感染的诊断和治疗中,其血清标志物的检测非常重要,可采用酶联免疫吸附试验(ELISA)、微粒子酶免疫试验(MEIA)、电化学发光免疫试验(ECLIA)、时间分辨荧光免疫分析(TRFIA)等方法进行检测。在我国,超过 80% 的医院通过 ELISA 来完成 HBV 感染的初筛,但 ELISA 因方法学的局限存在“灰区”,即在检测低水平 HBsAg 标本时会无法避免地出现假阳性、假阴性。ECLIA 完全由仪器自动检测,灵敏度高,干扰误差小,是将来可能普及的检测方法。随着检测技术的发展,检测下限越来越低,低水平 HBsAg 的阳性检出率也在逐步增加,经常出现一些浓度值非常低的阳性报告,让人们不得不质疑此类检测结果的可靠性及其临床意义。因此,笔者对此进行了研究。

1 材料与方法

1.1 标本来源 检测标本为本院临检中心免疫室日常工作中留取的 HBsAg 弱阳性血清及其全血标本。其中 ELISA 检测到的 HBsAg 弱阳性样本 53 例,其吸光度值和临界值的比值

(S/CO)为 1~5;ECLIA 检测到的 HBsAg 弱阳性样本 18 例,报告值为 0.05~2.00 IU/mL,并且临界指数(COI)≤7.0。本试验所用 ECLIA 系统 HBsAg>0.05 IU/mL 视为阳性。

1.2 仪器与试剂 主要仪器包括郑州安图 PHOMO 酶标仪,深圳汇松 PW960 洗板机,罗氏 cobas E601 电化学发光全自动免疫分析仪,达安 DA7600PCR 扩增仪,Beckman Couter 5800 全自动生化分析仪。试剂包括科华 HBsAg ELISA 试剂盒,罗氏 cobas E601 电化学发光免疫分析仪的 HBsAg 检测、确认、对照试剂及配套耗材,丽珠 HBsAg 中和试剂盒,达安基因 HBV-DNA 相关配套试剂,Beckman Couter 5800 全自动生化分析仪原装 ALT 和 AST 检测试剂。

1.3 方法

1.3.1 HBsAg 的 ELISA 检测和中和试验 操作过程严格按照实验室 SOP 和试剂盒说明书进行。在中和试验中,计算抑制率,抑制率大于或等于 50%,判断为 HBsAg 阳性;抑制率小于 50% 且对照孔 A 值小于 2.0,判断为阴性;样本抑制率小于 50%,但对照孔 A 值大于等于 2.0,则应用生理盐水对样本进行 1:100 稀释,稀释后样本作为待测样本重复进行中和试验。如稀释后样本抑制率小于 50%,且对照孔 A 值大于等于 2.0,

则再作更大倍数稀释重复进行中和试验。

1.3.2 ECLIA 检测 HBsAg 和 HBsAg 确认试验 分析仪经厂家校准, 试验前严格按作业指导书保养维护, 确保其性能良好并按实验室 SOP 步骤进行操作。

1.3.3 HBV-DNA 检测 样本的 DNA 严格按照 SOP 操作步骤使用 HBV-DNA 试剂盒提取; 然后按照 HBV-DNA 扩增操作程序在达安 DA7600 仪上进行扩增, 检测样本的 HBV-DNA 拷贝数。

1.3.4 肝功能检测 Beckman Coulter 5800 全自动生化分析仪经厂家校准, 试验前严格按作业指导书保养维护, 确保其性能良好, 并按实验室 SOP 步骤操作。此次肝功能只包含 AST 和 ALT, 只要有一项指标出现异常视为肝功能异常。

2 结 果

经科华 HBsAg 试剂盒初筛为弱阳性的 53 例样本的 ELISA 中和试验结果见表 1。经罗氏 cobas E601 分析仪初筛为弱阳性的 18 例样本, 用科华 HBsAg 试剂盒初筛结果均为阳性, 其 ELISA 中和试验和用配套 HBsAg 确认试剂进行确认试验结果见表 2。71 例低水平 HBsAg 样本的肝功能及 HBV-DNA 检测结果见表 3。

表 1 科华 HBsAg 试剂盒初筛为弱阳性标本的中和试验

科华试剂盒初筛值(S/CO)	ELISA 法中和试验(n)		合计 (n)
	阴性	阳性	
1~<2	5	14	19
2~<3	9	13	22
3~<4	2	5	7
4~<5	0	5	5
合计	16	37	53

表 2 ECLIA 初筛为弱阳性样本的 ELISA 中和试验及确认实验

ECLIA 初筛 初筛值(IU/mL)	ELISA 法中和试验(n)		ECLIA 法确证试验(n)	
	阴性	阳性	阴性	阳性
0.05~1.00	5	5	0	10
1.00~2.00	0	8	10	8
合计	5	13	0	18

表 3 71 例低水平 HBsAg 样本的肝功能及 HBV-DNA 检测[n(%)]

ECLIA 检测值 (S/CO)	n	肝功能异常	HBV-DNA 阳性
1.0~3.0	22	6(27.2)	2(9.0)
3.0~4.0	46	18(39.1)	8(17.4)
4.0~5.0	3	1(33.3)	2(66.6)
合计	71	25(35.2)	8(16.9)

3 讨 论

本次试验的 71 例低水平 HBsAg 血清样本中, ELISA 确认试验认为 HBsAg 阳性 45 例、阴性 26 例; ECLIA 初筛为弱阳性的 18 例样本经 ECLIA 确认试验 18 例样本均为 HBsAg 阳性, 但 ELISA 中和试验只确认了初筛值大于 1.0 IU/

mL 的 8 例样本, 可见 ELISA 与 ECLIA 检测低水平 HBsAg 结果存在不一致性。本研究中 HBsAg 中和试剂盒所采用的方法由方筠等^[1]建立, 黄伟等^[2]曾对这种 HBsAg 确认试验进行过临床试验, 认为该产品适用于检测 HBsAg 筛查呈阳性的血清或血浆的 HBsAg。在国外, 检测呈阳性的样本应报告“有反应性”, 必须经确认后才能报告“HBsAg 阳性”, 且试剂盒有配套的确认试剂。国产一步法 ELISA 试剂手工检测 HBsAg, 简便、经济、快速, 但影响因素较多^[3], 有时会出现假阳性和假阴性反应。因此, 低水平的 HBsAg 筛查值的确认试验非常重。灵敏度不高的试剂影响低水平 HBsAg 的检出, 据车文英等^[4]的报道, 国产的两种 ELISA 只能检出 1.0 ng/mL 的 HBsAg(1 IU/mL HBsAg 约为 0.5 ng HBsAg), 一种进口的 ELISA 能检测到 0.125 ng/mL 的 HBsAg。ELISA 试剂盒的灵敏度受多种因素影响, 除了研发、生产技术局限的影响以外, 不同的保存条件及保存时间均会影响试剂盒灵敏度^[5]。王岚等^[6]用不同方法检测乙型肝炎血清标志物, 以 Abbott AxSYM 测定结果作为标准, 国产 ELISA 试剂测定 HBsAg 的特异度为 98.69%, 即有 1.31% 假阳性。《全国临床检验操作规程》建议必要时应采用中和试验进行确认^[7], 特别是弱阳性的检测结果需进一步确认。虽然低水平 HBsAg 者病毒感染阳性的比例很低, 但在临床实践中, 低水平的 HBsAg 样本(低于国产试剂的检测下限)也经常能被发现为 HBV 感染阳性。血清 HBsAg 水平较低可能有多种原因, 但主要原因是大多数 HBV 感染患者随着年龄增长, HBV 逐渐清除, HBsAg 逐渐下降, 并可能伴有血清学转换^[8], 出现抗-HBsAg 抗体等。“弱反应性”检测结果的确认应使用灵敏度更高的方法, 比如 ECLIA、MEIA。MEIA 敏感度为 0.095 IU/mL^[9], 明显比 ELISA 法高。TR-FIA 的敏感度约为 0.0356 ng/mL^[10]。而本研究采用的 ECLIA 系统检测的空白限和检测下限分别为 0.03 IU/mL 和 0.05 IU/mL, 18 例样本 HBsAg 的 COI<7.0, 其确认试验全部为 HBsAg 阳性, 但其用 ELISA 法进行中和试验, HBsAg 浓度 0.05~1.00 IU/mL 范围内的样本确认阳性率只有 50%, 因此 HBsAg 弱阳性反应标本应采用先进的确认的试验降低误差率。

隐匿性 HBV 感染者血清 HBsAg 呈低水平甚至阴性, 杨朝国等^[11]用 ECLIA 对 61 例隐匿性 HBV 感染患者样本的检测中发现, 血清 HBsAg 未检出有 8 例, 在 0.05~0.10 ng/mL 有 27 例, 0.10~0.50 ng/mL 有 21 例, 0.50~10.00 ng/mL 有 5 例。值得注意的是, HBV-DNA 作为 HBV 感染的直接标志, 但目前普遍把低于 10^3 copies/mL 的 HBV-DNA 检测值认为阴性, 而隐匿性 HBV 感染者血清的 HBV-DNA 可能低于 10^3 copies/mL, 因此不能单靠 HBV-DNA 检测值来判定低水平 HBsAg 人员是否存在 HBV 感染。低水平 HBsAg 人员最好数周或数月后取样本复检。

有研究表明, HBsAg 阳性特别是低水平阳性并不能确诊为 HBV 感染。由于 HBsAg 是 HBV 的外衣壳, 可单独存在于血液中, 特别是近期注射过乙肝疫苗的患者, 单凭 HBsAg 阳性并不能说明受检者体内存在 HBV。如果单纯提高 HBsAg 检测灵敏度, 那么 HBsAg 阳性检出率也会增高, 也就造成假阳性结果增多, 对临床诊断并无意义, 反而给受检者增加精神负担和压力^[12]。王蕾等^[9]报道, 97 例低水平 HBsAg 患者明确诊断为乙型肝炎相关疾病的仅有 19 例(54 例诊断为其他疾

病,其余 24 例未确诊),此 97 例患者 HBV-DNA 阳性率仅为 17.5%。本次试验 71 样本 HBV-DNA 阳性率为 16.9% 与相关文献报道一致,肝功能阳性率为 35.2%,但样本缺乏明确诊断资料,低水平 HBsAg 的临床价值尚有待进一步探讨。

参考文献

- [1] 方筠,张久春,陈健,等.乙型肝炎病毒表面抗原确认试验方法的建立[J].检验医学,2006,21(5):478-480.
- [2] 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):176-178.
- [3] 岳希全,石宏,李迎.ELISA 法检测 HBsAg 影响结果的重要因素的分析[J].中国实验诊断学,2007,11(2):213-215.
- [4] 车文英,谭延国.不同检测系统测定乙肝病毒表面抗原检测灵敏度的探讨[J].中外医学研究,2009,7(8):20-21.
- [5] 李宁宁,杨继红.乙肝表面抗原 ELISA 试剂灵敏度变化的动态研究[J].湖北预防医学杂志,2001,12(5):21.
- [6] 王岚,沈立松.不同方法检测乙型肝炎血清学标志物的结果比较

(上接第 2363 页)

志谢:本研究得到了重庆医科大学附一院检验科张莉萍教授、重庆医科大学附二院检验科陈维贤副教授、重庆市长寿区人民医院检验科李泉主任技师的悉心指导。

参考文献

- [1] 中华医学会肝病学分会,中华医学会感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J].中华肝脏病杂志,2011,19(1):13-24.
- [2] 罗杰,赖菁,谢俊强,等.肝移植术后 6 年乙型肝炎复发的临床分析[J].中华临床感染病杂志,2012,5(1):37-38.
- [3] 罗杰,李向永,吴元凯,等.国产试剂 HBV DNA 检测下限与核苷(酸)类似物停药后乙肝复发的分析[J].广东医学,2013,34(4):544-546.
- [4] 中国合格评定国家认可委员会.ISO15189 医学实验室质量和能力认可准则[S].北京:中国合格评定国家认可委员会,2008.

[J].检验医学,2004,19(6):535-537.

- [7] 中华人民共和国卫生部医政司编.全国临床检验操作规程[M].3 版.南京:东南大学出版社,2006:619.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 谭玉华,陈鲜关,卢顺舵,等.时间分辨荧光免疫分析法乙型肝炎血清标志物分析灵敏度的建立与分析[J].中国医学检验杂志,2006,7(4):228.
- [11] 杨朝国,张玲英,许建.隐匿性乙型肝炎病毒感染者血清 HBsAg 阴性原因探讨[J].四川省卫生管理干部学院学报,2009,28(2):103-104.
- [12] 林国英,陈国良,周宁.低水平乙肝病毒表面抗原的结果分析[J].临床军医杂志,2003,31(2):116-117.

(收稿日期:2014-05-08)

- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute Standard. EP6-A Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: statistical approved guideline[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2003.
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute Standards. EP17-A Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation: statistical approved guideline[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2004.
- [7] 吴斌,李彩东,李惠军,等.两种国产乙型肝炎病毒核酸定量试剂盒检测结果分析[J].国际检验医学杂志,2013,34(14):1880-1881.
- [8] 巢薇.比对两台荧光定量 PCR 仪检测 HBV-DNA 结果一致性研究[J].国际检验医学杂志,2013,34(16):2162-2163.
- [9] 毕波,吕元.定量检测方法学性能验证的系统设计[J].中华检验医学杂志,2007,30(2):143-145.

(收稿日期:2014-06-08)

生物标志物助力感染性疾病临床诊疗

近日,由中国医师协会急诊医师分会主办,罗氏诊断产品(上海)有限公司协办的“感染诊断新技术临床应用中国行 2014”启动会暨专家研讨会在北京召开,由中国医师协会急诊医师分会长、北京协和医院急诊科主任于学忠教授担任大会主席。与会国内权威急诊专家重点探讨了感染标志物降钙素原(PCT)与白细胞介素 6(IL-6)的临床应用价值。

作为血清降钙素(CT)的前肽物质,PCT 在感染开始后最初 3 h 即可测得,6~12 h 后可达最高峰值,与传统生物标志物相比,PCT 半衰期接近 24 h,且几乎不受肾功能状态、激素治疗的影响。独特的生物学特点,使 PCT 对机体感染的反映具有快速准确的特征,并被 2008 版《美国重症成人患者新发发热指南》等推荐用于指导临床感染治疗。

动态监测 PCT 水平的变化趋势可以指导抗菌药物的合理应用,减少临床非必需抗菌药物的使用和重症监护室(ICU)的再感染率,减少脓毒症患者的住院时间,且对 ICU 脓毒症患者死亡率与存活率有很好的预测作用。

IL-6 具有调节免疫应答、急性期反应及造血功能的作用,在机体抗感染免疫反应中起重要作用,可作为有效的预测指标,在重症医学、急诊医学、早发型新生儿脓毒症、创伤危险分层和预后、术后风险等领域应用尤为突出。

作为脓毒症预后的生物标志物,若入院时 IL-6>1 000 ng/mL,预示患者死亡高风险。此外,脓毒症是新生儿发病和死亡的主要原因之一,每 1 000 名新生儿中就可能有 1~10 例发病。创伤患者和术后患者亦有发生脓毒症的风险,应用生物标志物检测有助于其诊断和预后。

在实际操作中,PCT 联合 IL-6 检测可以避免单一指标对感染类别判断的误差,及时帮助临床医师尽快确定患者的治疗方案,进而提高患者治疗成功率,具有重要的临床应用价值。“感染诊断新技术临床应用中国行 2014”将覆盖全国 10 个省市,旨在通过与全国各地区急诊医师的学术研讨和互动交流,推进感染诊断技术在急诊感染领域的应用和发展,造福更多患者。