

• 论 著 •

乙型肝炎病毒核心抗体临床意义再研究*

张汉奎, 王伟佳[△], 卢建强, 杜满兴, 罗燕香, 阮小倩, 黄燕华, 冯砚平

(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 分析化学发光微粒子免疫分析法检测乙型肝炎病毒核心抗体(HBcAb)在临床上的应用。方法 收集 2012 年 1 月至 2014 年 11 月乙型肝炎两对半检测 HBcAb 阳性标本 16 830 份, 根据 HBcAb 的 cut off 指数(COI 值)将其分为 3 组: 1.0~<9.0 组、9.0~<11.0 组、≥11.0 组进行统计分析。对乙型肝炎表面抗原(HBsAg)与乙型肝炎表面抗体(HBsAb)均阴性且 HBcAb 的 COI 值大于或等于 11.0 的标本进行乙型肝炎病毒(HBV)DNA 检测。结果 COI≥11.0 组标本 HBsAg(+)HBsAb(-)检出率(13.84%)明显高于其他表现形式($P<0.05$); COI 值为 9.0~<11.0 组各 HBsAg、HBsAb 表现形式检出率比较差异无统计学意义($P>0.05$); COI 值为 1.0~<9.0 组标本 HBsAg(+)HBsAb(-)检出率(0.5%)明显低于其他 2 组($P<0.05$)。HBsAg(-)HBsAb(-)且 COI≥11.0 的标本 304 份, 其中 HBV DNA 阳性 64 份, 阳性率为 21.0%。结论 HBcAb 检测中, COI≥11 和 1.0~<9.0 可分别作为判断 HBV 现症感染和既往感染的参考指标, 临床应用时应联合 HBV 的其他实验室标志物并结合临床综合分析。

关键词:乙型肝炎病毒核心抗体; 化学发光; DNA; 病毒

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.13.014

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)13-1835-03

Further study on clinical significance of hepatitis B virus core antibody*

Zhang Hankui, Wang Weijia[△], Lu Jianqiang, Du Manxing, Luo Yanxiang, Ruan Xiaoqian, Huang Yanhua, Feng Yanping

(Center of Clinical Laboratory, Zhongshan Hospital Affiliated to Sun Yat-Sen

University, Zhongshan, Guangdong 528403, China)

Abstract: Objective To analyse clinical application of hepatitis B virus core antibody(HBcAb) detected by using the chemiluminescence microparticle immunoassay. **Methods** A total of 16 830 specimen with positive HBcAb detected by using the two pairs of semi-hepatitis test from January 2012 to November 2014 were collected, and divided into three groups according to the cut off index(COI)of detection results of HBcAb, including group 1.0~<9.0, group 9.0~<11.0 and group COI≥11.0, and detection results were statistically analysed. The hepatitis B virus(HBV)DNA test was carried out in specimen with negative hepatitis B surface antigen(HBsAg)and hepatitis B surface antibody (HBsAb)and COI≥11.0. **Results** The detection rate of HBsAg(+)HBsAb(-) (13.84%) was significantly higher than other expression patterns in group ≥11.0($P<0.05$). There was no statistically significant differences in positive rate among all expression patterns of HBsAg and HBsAb in the group 9.0~<11.0($P>0.05$). The detection rate of HBsAg(+)HBsAb(-) of group 9.0~<11.0 was significantly lower than that of the other two groups($P<0.05$). A total of 304 specimen were HBsAg(-)HBsAb(-)and COI≥11, among them 64 specimen were HBV DNA positive and the positive rate was 21.0%. **Conclusion** In the detection of HBcAb, COI≥11 and 1.0~<9.0 could be reference indicators for diagnosing current and past HBV infection respectively, which should be combined with other laboratory indicators of HBV clinical data for comprehensive analysis.

Key words: hepatitis B virus core antibody; chemiluminescence; DNA; virus

人体感染乙型肝炎病毒(HBV)后产生乙型肝炎病毒核心抗体(HBcAb), HBcAb 阳性表明机体曾经或正感染 HBV, 因此 HBcAb 成为实验室诊断 HBV 感染, 以及流行病学调查中最常使用的血清标志物之一。然而, 在实际工作中 HBcAb 阳性率远远高于其他 HBV 标志物, 其是否由机体感染 HBV 产生至今尚不确切。Zaatari 等^[1]报道在 HBcAb 单独阳性者中真阳性率仅 5.4%, Dhawan 等^[2]报道仅 1.0%, 而 Yotsuyanagi 等^[3]则报道真阳性率为 38.0%。卫生部临床检验中心 HBcAb 室间质评从 2007 年已取消 HBcAb 的流行病学及临床意义, 表明其对既往或正在感染 HBV 的判别缺乏足够的证据。可见 HBcAb 假阳性的存在及其所带来的困惑。近年来, 随着化学发光微粒子免疫分析法检测技术的广泛推广, 国内越来越多的实验室将其用以 HBcAb 检测。雅培公司 ARCHITECT i2000 HBcAb 检测试剂盒使用重组乙型肝炎病毒核心抗原(rHB-

cAg)与 HBcAb 直接结合技术, 能有效地减少酶联免疫吸附试验(ELISA)竞争法的检测干扰等负面影响, 是国外流行的技术。本课题研究微粒子发光检测 HBcAb 阳性的临床意义, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2012 年 1 月至 2014 年 11 月在本医院体检、门诊、住院的乙型肝炎两对半发光结果中 HBcAb 阳性者 16 830 例, 标本检测时均无溶血、脂血及黄疸。根据目测 HBcAb 发光结果 cut off 指数(COI 值)将其分为 3 组: 1.0~<9.0 组(11 545 例)、9.0~<11.0 组(1 944 例)、≥11.0 组(3 341 例)。

1.2 仪器与试剂 ARCHITECT i2000SR 全自动化学发光免疫分析系统(以下简称 i2000SR)及配套试剂、校准品及质控品, 均由雅培公司提供。实时荧光定量扩增仪(型号 DA-7600)、HBV 核酸定量检测试剂盒均购自中山大学达安基因股

份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 i2000SR 检测 HBcAb 的精密度与准确度验证 参照美国临床实验室标准化协会(CLSI)EPI5-A2 文件^[4]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,即浓度 1~3 分别为 0.18、1.56、2.97 IU/mL,各浓度标本均为高值检测标本采用低值血清进行配制,于-70℃冰箱保存。配制标本的理论值均由连续检测 3 次以后计算其均值获得。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。厂商声明的 HBcAb 批内不精密度[以变异系数(CV)表示]为 1.09%~5.65%,总 CV 为 4.68%~7.25%。同时对 2 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。

1.3.2 HBV DNA 的检测 乙型肝炎表面抗原(HBsAg)与乙型肝炎表面抗体(HBsAb)均阴性且 HBcAb 的 COI 值大于或等于 11.0 的标本进行 HBV DNA 检测。采用聚合酶链反应(PCR)-荧光探针法检测 HBV DNA 病毒载量,线性范围:1.0×10³~1.0×10⁹ IU/mL。最低检出水平:1.0×10³ IU/mL,HBV DNA≥100 为阳性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件进行数据处理与统计分析,计数资料以百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

表 2 HBcAb 阳性标本 HBsAg 与 HBsAb 表现形式(%)

| 组别 | <i>n</i> | HBsAg(+)HBsAb(-) | HBsAg(-)HBsAb(-) | HBsAg(-)HBsAb(+) | HBsAg(+)HBsAb(+) |
|-------------|----------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 1.0~<9.0 组 | 11 545 | 86(0.50) | 5 104(30.33) | 6 348(37.72) | 7(0.04) |
| 9.0~<11.0 组 | 1 944 | 347(2.06) | 757(4.50) | 828(4.92) | 12(0.07) |
| ≥11.0 组 | 3 341 | 2 329(13.84) | 304(1.81) | 688(4.09) | 20(0.12) |
| 合计 | 16 830 | 2 762(16.41) | 6 165(36.63) | 7 864(46.73) | 39(0.23) |

3 讨 论

本研究参照美国 CLSI 发布的仪器性能评价标准文件,对 HBcAb 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试验要求。与 ELISA 法相比,化学发光微粒子免疫分析法检测乙型肝炎两对半的优势在于自动、灵敏、特异,其结果的稳定性与可靠性已得到同行的认可,是国外流行的主要方法。i2000SR 销售数据显示国内越来越多的实验室已经购买应用。本研究可为 HBcAb 阳性结果的分析提供参考。达安基因 HBV 核酸定量检测试剂是获国家食品药品监督管理局(SFDA)认证的产品,PCR-荧光探针法具有 PCR 的灵敏度与荧光探针杂交的特异度,不但可以定量检测 HBV DNA,还可减少漏检率,提高特异度。

乙型肝炎病毒核心抗原(HBcAg)被专家学者用来生产乙型肝炎疫苗,该疫苗对使用 HBsAg 疫苗呈低或无应答的人群大有益处^[5],从中说明 HBcAg 具有高度免疫原性,感染的个体几乎可以产生大量的抗体。这可解释笔者观察到的 HBcAb 的 COI≥11.0 组中 HBsAg(+)HBsAb(-)的检出率(13.84%)明显高于其他 3 种表现形式($P<0.05$),COI 为 1.0~<9.0 组中 HBsAg(+)HBsAb(-)检出率(0.5%)明显低于其他 2 组($P<0.05$),据此采用 HBcAb 的 COI≥11 作为判断 HBV 现症感染的参考指标。然而,本研究也发现 HBcAb 的 COI≥11 的标本中有 304 份 HBsAg(-)HBsAb(-),虽然其 HBV DNA 阳性率为 21.0%,存在一定的隐匿性 HBV 感

2.1 精密度与准确度验证 i2000SR 测定不同浓度 HBcAb 的不精密度 CV 见表 1,结果显示本试验 CV 均小于厂商声明结果。并且 HBcAb 相对定值标准品偏差为(6.30±1.38)%,偏差均小于 10%,符合试验要求。

表 1 i2000 测定 HBcAb 的精密度

| 标本浓度 | COI | 批内不精密度(%) | | 总不精密度(%) | |
|------|------|-----------|------|----------|------|
| | | SD | CV | SD | CV |
| 浓度 1 | 0.18 | 0.010 | 5.65 | 0.014 | 7.25 |
| 浓度 2 | 1.56 | 0.039 | 2.89 | 0.064 | 4.68 |
| 浓度 3 | 2.97 | 0.031 | 1.09 | 0.164 | 5.21 |

2.2 HBcAb 阳性标本 HBsAg 与 HBsAb 表现形式 COI≥11.0 组 HBsAg(+)HBsAb(-)检出率(13.84%)高于其他 3 种表现形式($\chi^2=13.28, P<0.05$)。COI 值 9.0~<11.0 组,各 HBsAg、HBsAb 表现形式检出率比较差异无统计学意义($\chi^2=1.29, P>0.05$);COI 值 1.0~<9.0 组,HBsAg(+)HBsAb(-)检出率(0.5%)低于其他 2 组($\chi^2=44.05, P<0.05$);HBsAg(-)HBsAb(-)与 HBsAg(-)HBsAb(+)总检出率比较差异无统计学意义($\chi^2=2.09, P>0.05$)。各组 HBsAg、HBsAb 表现形式见表 2。HBsAg(-)HBsAb(-)且 HBcAb 的 COI≥11.0 的标本共 304 份,均进行 HBV DNA 检测,阳性率为 21.0%(64/304)。HBsAg(+)HBsAg(+)标本与 HBsAg(+)HBsAg(-)标本 HBcAb 的 COI 指数分布差异无统计学意义($\chi^2=17.16, P>0.05$)。

染,但对于 HBV DNA 阴性者应不存在 HBcAg,从而不能产生 HBcAb。分析原因:虽然 HBV DNA 结果阴性可能低于检测限,但实际上这些患者机体内 HBV 并未真正被清除,可能是因为所用试剂对突变的 HBV 片段检测效率低或存在检测盲区,但并没有足够的证据证明。当然离开了 HBcAg 的高度免疫原性,HBcAb 浓度会下降,所以 HBcAb 的 COI 为 1.0~<9.0 组中 HBsAg(-)HBsAb(-)和 HBsAg(-)HBsAb(+)的总检出率高于 HBsAg(+)HBsAb(-)检出率,据此认为 HBcAb 的 COI 为 1.0~<9.0 可作为 HBV 既往感染的参考指标。又由于人体的免疫系统具有记忆功能,对一些曾经感染过 HBV 且恢复的个体其 HBcAb 会存在数年,并且常与 HBsAb 和(或)抗 HBeAb 同时存在,这可能是由于与 HBsAg(-)HBsAb(-)和 HBsAg(-)HBsAb(+)相比,其 HBcAb 的 COI 值无明显差异。

另外,笔者还统计了 2014 年 4~9 月 HBcAb 阳性率高达 57.7%,远高于 HBsAg 的 8.7%,与 Qiao 等^[6]报道的 HBcAb 为人群中检出率最高的 HBV 标志物相一致。可见 HBcAb 存在一定的假阳性,目前 HBcAb 假阳性的机制仍然不明确。部分学者认为 HBcAb 的产生可能是由于前母 B 淋巴细胞的激活是非特异性的,导致机体未感染 HBV 也可产生相关的分子参与检测^[7];也有学者认为这与目前检测所用的重组抗原 HBcAg 为大肠杆菌细胞内表达的基因工程抗原,而人体内存在大肠杆菌抗体,在 HbC 酶标志物检测体系(下转第 1838 页)

线性关系,线性方程为 $Y=63.729X-1.2435(r=59.675,P=0.005)$ 。

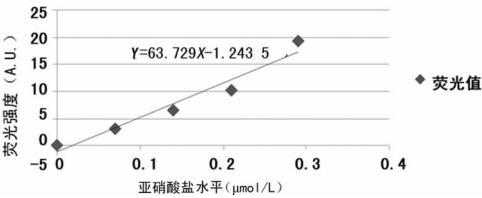


图 1 亚硝酸盐标准曲线

2.2 奶粉荧光强度 6 种奶粉亚硝酸盐水平与国家标准(2 mg/kg)比较差异均有统计学意义($P<0.05$),且均低于国家标准,表明本实验所测 6 种奶粉中亚硝酸盐水平未超标。见图 2。

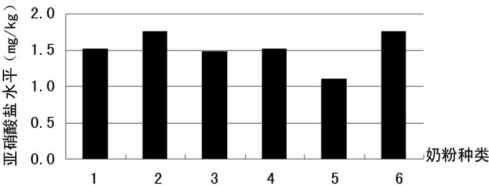


图 2 6 种奶粉中亚硝酸盐浓度柱状图

3 讨 论

亚硝酸盐被血液吸收后,可使正常的血红蛋白变性,从而使其失去携氧功能,出现组织缺氧现象;它还可以与蛋白质的代谢中间产物仲胺反应生成亚硝胺,该物质具有一定的致癌性^[5]。此外,亚硝酸盐参与超氧化物歧化酶(SOD)的代谢,对脏器细胞增殖、组织功能产生不良影响^[6]。奶粉中含有一定量的亚硝酸盐,但由于其使用群体主要为婴幼儿,体质较差,容易受奶粉中亚硝酸盐的危害,因此 1999 年我国对乳粉卫生标准进行了修订,对乳粉中亚硝酸盐的水平提出了严格的限制,即亚硝酸盐的水平不得超过 2 mg/kg。

目前对亚硝酸盐水平的测定方法有气相化学光检测法、离子色谱法、高效液相色谱法和分光光度法等。气相化学光检测法建立在一氧化氮和臭氧反应的基础上,具有较大的检测范围,但增加了设备的复杂性,且反应需要在 600 ℃ 的高温下进行。离子色谱法虽选择性好,灵敏度也较高,但对于非金属元

素的测定较为困难,而且其对相当大一部分元素测定的灵敏度还不令人满意。高效液相色谱法对样品的预处理要求高,操作也比较复杂。盐酸萘乙二胺分光光度法操作简便,灵敏度也较好,但与荧光分光光度法相比还有一定的不足。

荧光分光光度法则投资小,操作简便,方法成熟、重现性好,且准确度高,可用于测定亚硝酸盐在牛奶和奶粉中的水平^[7]。但是奶粉中含有大量蛋白质,配成溶液时极易浑浊,对荧光强度的测定有很大影响,所以本实验采用乙酸锌(2 mL)与亚铁氰化钾(2 mL)沉淀蛋白,可在短时间内过滤得到澄清溶液。本研究结果显示,检测的惠氏、贝因美等 6 种奶粉中亚硝酸盐水平均低于奶粉中亚硝酸盐水平的国家标准(2 mg/L)要求($P<0.05$),亚硝酸盐水平均未超标。

参考文献

[1] 李静. 韩奶粉检出致癌物[J]. 农产品市场周刊, 2011, 12(19): 29.
[2] Wu H, Fan S, Jin X, et al. Construction of a zinc porphyrin-fullerene-derivative based nonenzymatic electrochemical sensor for sensitive sensing of hydrogen peroxide and nitrite[J]. Anal Chem, 2014, 86(13): 6285-6290.
[3] Pistón M, Mollo A, Knochen M. A simple automated method for the determination of nitrate and nitrite in infant formula and milk powder using sequential injection analysis[J]. J Autom Methods Manag Chem, 2011, 2011: 148183.
[4] 方步武, 靳殊华, 林秀珍. 测定血中亚硝酸盐的荧光分光光度法[J]. 中国应用生理学杂志, 2005, 21(2): 235-239.
[5] 刘文. 奶粉中亚硝酸盐含量超标的原因[J]. 监督与选择, 2008, 22(9): 58.
[6] Wang L, Frizzell SA, Zhao X, et al. Normoxic cyclic GMP-independent oxidative signaling by nitrite enhances airway epithelial cell proliferation and wound healing[J]. Nitric Oxide, 2012, 26(4): 203-210.
[7] Li W, Ai L, Guo C, et al. Simultaneous determination of penicillin and their major enzymatic metabolites in milk and milk powder by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Se Pu, 2013, 31(10): 946-953.

(收稿日期: 2015-04-28)

(上接第 1836 页)

中的这些抗体均能与大肠杆菌表达的重组抗原 HBcAg 混杂的菌体蛋白结合而出现假阳性相关^[8]。因此, 将竞争 ELISA 法改为双抗原夹心, 检测更为直接; 或利用杆状病毒表达载体系统来生产重组核心抗体, 或采用酵母、质粒、其他亚型的大肠杆菌等载体来表达核心抗原, 减少非特异性反应。总之, 检测 HBcAb 的技术仍有待提高。

HBcAb 阳性结果尤其是单独弱阳性标本在不同的医院可能有不同的应对措施, 从本研究结果得出如下措施可供参考: 微粒子发光检测乙型肝炎两对半结果中的 HBcAb 阳性, HBcAb 的 COI 值大于或等于 11.0 可作为判断 HBV 现症感染的参考指标; 其 COI 为 1.0~<9.0 可作为判断 HBV 既往感染的参考指标; 其 COI 为 1.0~<9.0 时为灰区, 临床意义不肯定。总之在临床应用时, 应将 HBV 各种标志物综合分析才能提高 HBcAb 的实验室诊断性能。

参考文献

[1] Zaatari M, Kzama H, Majzoub M, et al. Hepatitis B virus DNA in serum of anti-HBc only-positive healthy Lebanese blood donors: significance and possible implications[J]. Hospit Infect, 2007, (66): 278-282.
[2] Dhawan HK, Marwaha N, Sharma R, et al. Anti-HBc screening in

Indian blood donors: still an unresolved issue[J]. World J Gasastroenterol, 2008, 14(34): 5327-5330.
[3] Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, et al. Frequent presence of HBV in the sera of HBsAg-negative, anti-HBc-positive blood donors[J]. Transfusion, 2001, 41(9): 1093-1099.
[4] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP5-A2 User verification of performance for precision and trueness[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2005.
[5] Nassal M, Skamel C, Vogel M, et al. Development of hepatitis B virus capsids into a whole-chain protein antigen display platform: new particulate Lyme disease vaccines[J]. Int J Med Microbiol, 2008, 298(1/2): 135-142.
[6] Qiao CX, Zhai XF, Ling CQ, et al. Health-related quality of life evaluated by tumor node metastasis staging system in patients with hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(21): 2689-2694.
[7] 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.
[8] 成军, 谢珏, 王国政, 等. 乙型肝炎血清学标志物单项抗-HBc-IgG 阳性结果的解释及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(3): 203-205.

(收稿日期: 2015-05-10)