

• 综 述 •

乙肝表面抗原实验室检测方法的进展

刘 杨 综述, 彭道荣 审校
(西京医院检验科, 陕西西安 710032)

关键词: 乙肝表面抗原; 胶体金免疫层析法; 酶联免疫吸附法; 化学发光免疫分析法

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.17.038

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)17-2546-03

由乙型肝炎病毒(HBV)感染引起的乙型肝炎(以下简称“乙肝”)现已成为潜在威胁人类生命的全球性疾病,据世界卫生组织(WHO)2014年6月更新的数据显示,全球已有2.4亿人患慢性肝炎传染病,其中每年就有78万人死于由HBV感染所致的肝衰竭、肝硬化及原发性肝癌等肝脏疾病^[1]。1992年,我国正式将乙肝疫苗纳入免疫规划管理,有效降低了易感人群的数量,但由于我国是一个乙肝大国,乙肝病毒携带者的基数过大,防治工作仍然面临着严峻的挑战。目前,针对HBV感染的实验室检测方法多样,因而选择高效率、高质量的检测方法成为乙肝防治工作的重要前提。

乙肝表面抗原(HBsAg)是临床上应用最多的HBV感染血清检测标志物,它是WHO公认的判断HBV感染的关键指标^[2]。自1972年第一批HBsAg检测试剂盒问世至今,HBsAg的实验室检测经历了从定性、半定量到高定量的发展过程,本文就HBsAg的实验室检测和研究进展作以下综述。

1 HBsAg的形成

HBV属嗜肝DNA病毒科,为部分双链环状DNA。当HBV侵入人体后,经过黏附、脱壳,HBV-DNA可从肝细胞浆内进入细胞核,在此进一步发育完善,使部分双链环状DNA形成共价闭合环状DNA(cccDNA),并以其为模板转录成不同长度的mRNA,mRNA进一步进行翻译。HBsAg是HBV病毒的糖化外膜蛋白,由包膜蛋白基因S编码,包括大蛋白(LH-Bs)、中蛋白(MHBs)以及主蛋白(SHBs)三种类型。HBsAg具有抗原多型性,“a”为共同抗原决定簇,亚型决定簇“d”和“y”,“w”和“r”因互相排斥而组合成不同的亚型。乙肝患者血清中出现的HBsAg除了来自具有感染性的成熟的乙肝病毒颗粒外,还来自非感染性的病毒颗粒:球状及杆状。虽然非感染颗粒不含DNA,但其分泌量远大于前者。由于HBsAg不仅可来自cccDNA的转录翻译,也可来自整合入宿主细胞的HBV-DNA,因此它能更好地反映HBV的转录活性和患者的感染状态^[3-4]。

2 HBsAg的实验室检测

HBsAg在人体感染HBV 1周后,大多数为6周后即可在体内出现^[5]。目前,我国针对乙型肝炎开展的实验室检查项目繁多,包括蛋白质水平的免疫学检测和核酸水平的分子生物学检测。临床上常用于HBsAg的免疫学检测方法有胶体金免疫层析法(GICA)、酶联免疫吸附法(ELISA)、微粒子酶免疫分析法(MEIA)、化学发光免疫分析法(CLIA)等。

2.1 GICA 免疫层析法是九十年代兴起的一种基于免疫胶体金技术的快速诊断技术,GICA亦称金标法,是利用胶体金显色的特点结合免疫层析法,诊断特异性的待测物而发展起来

的^[6]。由于该方法简便快捷,实验仅需一步即可完成,而被各大小医院广泛应用。但是,由于金标法检测HBsAg还没有一个卫生行业标准,临床上对该方法的评价参差不齐。

目前,大量报道显示金标法检测HBsAg特异性高,有一定的检出率,但该方法检测的灵敏度低于临床上常用的其他方法。根据上海市临检中心2009年10月第二次室间评估汇报结果分析,采用金标法检测HBsAg的实验室不合格率非常高,全市6家室间质评未通过的实验室均是采用了金标法。再进一步对该方法进行性能评估发现,其检测灵敏度仅为4 IU/mL,而非市面上大多数试剂说明书中描述的2 IU/mL(1 IU=0.5 ng)^[7],这与孙宗立等^[8]的报道一致。但也有报道显示该方法检测灵敏度可达2 IU/mL^[9]。此外,金标法对灰区标本的检测存在较大缺陷,谢云等^[10]在其研究中指出,经过金标法初筛后的血液样本,分别用进口、国产两种HBsAg ELISA法试剂盒检测,对在灰区(S/CO值大于或等于0.5)且确定为阳性的152份标本,再次用金标法检测,阳性结果仅为35份,符合率为23%,其检测结果与两种ELISA试剂检测结果比较差异均有统计学意义($P<0.01$)。

2.2 ELISA ELISA是在放射免疫分析的基础上发展起来的固相酶联免疫测定方法,它先通过化学反应将待测物与酶连接,再通过免疫反应使待测物可与固相载体上的相应抗原(抗体)结合,加入底物后,酶与底物产生颜色反应,根据其颜色深浅来判读欲测的抗原(抗体)水平。常用于定性或半定量检测。该方法灵敏度高,特异性强,无放射性污染,检测成本较低,是目前临床实验室检测HBsAg最常用的方法,但该方法操作繁琐,耗时长,不确定因素较多,易造成孔间的交叉污染。

ELISA已是临床上运用较成熟的检测方法。我国市面上主要存在进口和国产两类HBsAg ELISA法试剂盒,国内试剂盒的检测品质虽越来越高,但与进口试剂相比仍有差距,而且国产厂家试剂间比较也存在差异^[11]。在孙文利等^[12]的报道中,将国产与进口的HBsAg ELISA法试剂盒质量进行比较,国产与进口ELISA试剂的灵敏度分别为86%和100%,特异性分别为100%和96%,约登指数分别为0.86和0.96,两试剂的重复符合率均为100%,试剂的灵敏度以进口试剂盒较好,但特异性比国产试剂差。此外,实际工作中,当HBsAg浓度低或基因变异时,可出现检测灰区。据陈善华等^[13]报道,用电化学发光法和荧光定量PCR法,对两种国产HBsAg ELISA试剂盒检测结果为灰区组的106例标本($0.6\leq S/CO<1$)及100份阴性组样本($S/CO<0.3$)进行复检发现,灰区组中电化学发光法检测阳性12例,HBV-DNA检测阳性16例,与HBsAg阴性组差异均有统计学意义($P<0.05$),说明ELISA法检

测 HBsAg“灰区”标本时存在一定数量的阳性结果,对这类样本有研究认为应进一步做抗体中和确认试验以确保检测结果的准确性和真实性^[14]。

2.3 CLIA CLIA 是将化学发光测定技术与免疫反应相结合的一种分析方法,它既有化学发光测定技术的高灵敏度,又兼具免疫反应的高特异性,因此临床上应用广泛。与上述两种方法不同的是,由于该方法线性范围宽,临床上常用作 HBsAg 的全定量检测,为监测乙肝患者抗病毒治疗疗效提供帮助。自 1990 年,发现 HBsAg“a”表位 G145R 突变株以来,各种有临床意义的“a”表位变异的 HBsAg 变异株屡见不鲜,这样使得当前的 HBsAg 试剂检测能力下降,对检测试剂的灵敏度提出了更高要求^[15]。目前,CLIA 由于其较高的检测灵敏度和广谱性,现已成为国际上主流的 HBsAg 全定量的检测方法。它包括两代试剂:第一代美国雅培公司的化学发光微粒子免疫检测(CMIA)试剂盒,第二代为德国罗氏诊断公司推出的电化学发光免疫检测(ECLD)试剂盒。这两种试剂盒均可溯源至 WHO 标准品,定量检测结果以国际单位 IU/mL 的形式表示,1 IU/mL 约等于 1~10 ng/mL 的 HBsAg,两者之间也有很好相关性^[16]。

2.3.1 化学发光微粒子免疫分析法 ARCHITECT HBsAg 是利用 CMIA 技术的弹性检测,通过两步免疫测定法,定量检测人血清或血浆中的 HBsAg。第一步,将标本和 Anti-HBs 包被的顺磁微粒子合并。标本中存在的 HBsAg 便结合到 Anti-HBs 包被的顺磁微粒子。洗涤后,在第二步加入吖啶酯标记 Anti-HBs 的结合物。再次洗涤之后,加入预触发液和触发液,复合物中的吖啶酯被氧化发光,发光强度用相对发光值(RLU)表示,标本中的 HBsAg 含量与光学系统所检测到的 RLU 呈正比。

化学发光微粒子免疫分析法因其具有很好的特异性、较高的灵敏度和重复性被认为是免疫检测的金标准^[17]。在马连学等^[18]的报道中,CMIA 法所测得的 113 例阳性标本中,经确认试验阳性数为 103 例,确认阳性率 91.2%,ELISA 法阳性率为 83.2%,两种方法检测结果差异有统计学意义($P < 0.05$)。CMIA 法假阳性标本表面抗原定量值在 0.05~0.12 IU/mL 之间,提示对于弱阳性结果需要做确认试验以保证试验正确性。李美忠等^[19]也就 CMIA 法测定 HBsAg 的临床应用做了评价,Architect iR2000 免疫发光系统及配套试剂检测灵敏度可达 0.2 $\mu\text{g/L}$,而 ELISA 法仅能达到 0.5 $\mu\text{g/L}$ 。重复性试验 HBsAg 低值和高值质控品变异系数(CV)分别为 5.22%及 5.46%,线性试验在 0~250 IU/mL 范围内结果可靠。ARCHITECT 化学发光微粒子免疫分析法作为第一代 HBsAg 化学发光检测试剂盒,其原倍的检测范围最高为 250 IU/mL,不能满足大部分乙肝患者的需求,若进行高值标本的检测需要进一步手工稀释,因此大大降低了实验室检测效率。

2.3.2 电化学发光免疫分析法 Roche Elecsys 是采用单克隆和多克隆 HBs 抗体(小鼠和羊)测定 HBsAg。两种生物素化的抗 HBsAg 单克隆抗与钆复合物标记的一种抗 HBsAg 单克隆抗体和多克隆抗体混合物与待测抗原反应,形成抗原-抗体复合物,复合物可进一步与加入的链霉亲和素包被的微粒结合,微粒通过电磁吸附在电极板上,在电压的作用下,使复合物化学发光,光学系统检测的发光值强度与待测抗原浓度呈正比。

与第一代 CLIA 检测 HBsAg 试剂盒比较,较多报道都显示两者检测结果的相关性较好^[21],但 Roche Elecsys 具有更多优越性,首先表现在对突变株的检出率上。俞莹卿^[21]在对第二代化学发光试剂检测 HBsAg 进行多中心评估时,分别用一代、二代化学发光检测试剂盒及其他酶联免疫试剂盒对 13 株重组乙型肝炎血清突变株和 3 株天然变异株进行检测,结果显示罗氏 ECL 试剂的检出率为 98.1%,雅培的 CLMI 检出率为 87.6%,而科华的 ELISA 试剂盒检出率仅为 19.3%,表示罗氏的二代试剂对突变株敏感性优于一代的雅培试剂,且两代化学发光检测试剂盒对突变株的检出能力大大优于 ELISA 试剂,提高了实验室的检出率,降低假阴性样本。其次,罗氏 ECL 试剂检测线性宽,上机强制 400 倍稀释情况下检测范围可达 52 000 IU/mL,可满足临床大部分患者的检测需求,提高实验室检测效率。此外,何宗忠等^[22]在电化学发光测定低浓度 HBsAg 的研究中报道,与 ELISA 相比,两方法检测高浓度 HBsAg 的总符合率高达 98.88%,一致性很好,但对低浓度 HBsAg 样本的检测符合率仅 72.49%,说明两种方法对低浓度 HBsAg 检测一致性较差,差异有统计学意义($\chi^2 = 7.592$, $P = 0.008$)。

3 小结与展望

当 HBV 感染人体后,机体免疫力会不同程度的对病毒做出免疫应答及清除,使得病毒的感染出现不同的结果,如急性乙型肝炎、慢性乙型肝炎、乙肝病毒携带者等。HBsAg 不仅是判断 HBV 感染的指标,也是临床上检测抗病毒治疗疗效的工具。近些年由于乙肝疫苗及抗病毒药物的广泛应用,加速了 HBsAg 变异株的出现。如研究已证实的 G145R、I131I、C138Y 等表位的突变,可能会导致目前已有的 HBsAg 试剂检测能力下降,从而对临床诊断和血液筛查带来威胁^[23-24],因此,高灵敏度、高特异度的 HBsAg 检测试剂的应用在临床上至关重要。实验室应对各检测方法的性能进行评估和比对,根据检测目的选择最优方法,从而对临床 HBV 感染者的筛查、诊断及治疗提供最有效的帮助。

参考文献

- [1] World Health Organization. Hepatitis B[EB/OL]. [2014-12-20]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>.
- [2] Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, 64(1): 51-68.
- [3] 田晓晨, 闻玉梅. 剖析乙肝病毒的包膜——乙肝表面抗原的生物学功能及其致病机制[J]. 自然杂志, 2010, 32(6): 314-318.
- [4] 胡晨波, 陆培瑜, 陈晓蓉. HBsAg 定量在慢性乙型肝炎自然史及干扰素治疗中的临床意义[J]. 肝脏, 2014, 19(1): 74-76.
- [5] 马明, 刘新钰, 张汉荣, 等. YMDD 变异后继续使用及停用拉米夫定的临床转归分析[J]. 中华传染病杂志, 2005, 23(2): 132-134.
- [6] Valkirs GE, Barton R. ImmunoConcentration—a new format for solid-phase immunoassays[J]. Clin Chem, 1985, 31(9): 1427-1431.
- [7] 朱宇清. 乙型肝炎表面抗原胶体金免疫层析法血清快速测定的性能评估[D]. 上海: 复旦大学, 2012.
- [8] 孙宗立, 任利群, 谷雷, 等. 胶体金免疫层析法检测乙型肝炎病毒表面抗原的应用评估[J]. 医药论坛杂志, 2007, 28(15): 46-47.
- [9] 周迎春, 陈辉, 关平, 等. 3 种方法测定低浓度乙型肝炎病毒表面抗原效果评价[J]. 检验医学与临床, 2007, 4(11): 1070-1071.
- [10] 谢云, 冯惟萍, 李国英, 等. 胶体金法、ELISA 法检测 HBsAg 在献

- 血者初筛中的作用[J]. 甘肃医药, 2014, 33(2): 103-104.
- [11] 贾志远. ELISA 检测试剂的评价方法[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2007.
- [12] 孙文利, 张献清, 穆士杰, 等. 国产与进口 HBsAg ELISA 试剂盒的质量比较[J]. 中国生物制品学杂志, 2006, 19(1): 71-72.
- [13] 陈善华, 朱丽莉, 李浩, 等. ELISA 方法检测 HBsAg 设置灰区的必要性探讨[J]. 中国输血杂志, 2013, 26(10): 1013-1014.
- [14] 王强, 李文郎, 黄国清, 等. 确认试验在乙肝表面抗原弱阳性样本判定中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(5): 619-620.
- [15] 肖勤, 林金明. 化学发光免疫分析新进展[J]. 分析试验室, 2011, 30(1): 111-122.
- [16] Wursthorn K, Jaroszewicz J, Zacher BJ, et al. Correlation between the Elecsys HBsAg II assay and the Architect assay for the quantification of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in the serum[J]. J Clin Virol, 2011, 50(4): 292-296.
- [17] 刘冀珑, 乔惠理, 邓泽沛. 化学发光免疫技术[J]. 化学通报, 2000 (7): 49-53.
- [18] 马连学, 李艳菊, 魏巍. 化学发光微粒免疫法和酶联免疫吸附法检测乙肝表面抗原的结果对比分析[J]. 中国实用医药, 2014, 3(9):

89-90.

- [19] 李美忠, 姜庆波. 化学发光微粒子免疫法测定乙型肝炎表面抗原的临床应用评价[J]. 实用医技杂志, 2010, 17(4): 343-344.
- [20] Sonneveld MJ, Rijckborst V, Boucher CA, et al. A comparison of two assays for quantification of Hepatitis B surface Antigen in patients with chronic hepatitis B[J]. J Clin Virol, 2011, 51(3): 175-178.
- [21] 俞莹卿. 第二代化学发光试剂检测乙肝表面抗原的多中心评估[D]. 上海: 复旦大学, 2011.
- [22] 何宗忠, 裘宇容, 魏东, 等. 电化学发光测定低浓度乙肝病毒表面抗原的临床意义[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(11): 2056-2058.
- [23] Hsu HY, Chang MH, Ni YH, et al. Survey of hepatitis B surface variant infection in children 15 years after a nationwide vaccination programme in Taiwan[J]. Gut, 2004, 53(10): 1499-1503.
- [24] Hollinger FB. Hepatitis B virus genetic diversity and its impact on diagnostic assays[J]. J Viral Hepat, 2007, 14(Suppl 1): 11-15.

(收稿日期: 2015-04-25)

• 综 述 •

铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗菌药的耐药机制研究进展

张 妍 综述, 张 立 审校
(海河医院检验科, 天津 300350)

关键词: 碳青霉烯类抗菌药物; 铜绿假单胞菌; 耐药机制

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.17.039

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)17-2548-03

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)属假单胞菌属,革兰阴性杆菌,是医院感染的重要条件致病菌,能引起人和动物的感染,也是慢性感染的常见致病菌,治疗非常困难。美国国家医院感染监测系统(NNIS)报告指出 PA 在所有院内感染致病菌中检出率居第 5 位,在革兰阴性菌中检出率居第 2 位^[1]。近年来由于大量抗菌药物的广泛使用,PA 耐药率在逐年递增,多药耐药 PA 的数量和耐药率不断上升^[2],为临床带来很大困难。PA 具有目前已知的细菌耐药的主要机制,已经成为引起院内获得性肺炎多重耐药的代表性革兰阴性菌^[3-4]。

碳青霉烯类抗菌药物是新型的 β -内酰胺类抗菌药物,具有高效广谱的特点,是治疗 PA 感染的关键药物之一,对大多数 β -内酰胺酶稳定,通过渗透细菌外膜作用进入细菌内,杀菌活性强大^[5]。近年来,随着大量抗菌药物的使用,特别是碳青霉烯类药物的使用,PA 耐药率不断上升,而各种 β -内酰胺酶的产生是 PA 对抗菌药物的各种耐药机制中最主要的机制^[6]。本文就 PA 的这一耐药机制作一综述。

1 PA 的生物学特性

PA 又名绿脓杆菌,为人体正常菌群,是临床常见的条件致病菌,专性需氧菌,广泛存在于医院环境,引起院内免疫力低下患者感染。其主要引发的感染有肺部感染、心内膜炎以及败血症等,由于菌体很难清除,常引起感染的反复发作^[7-8]。国内有文献报道,老年患者由于多器官功能衰退,PA 也已成为了老年患者感染的主要致病菌,检出率 28.2%,占致病菌的首位^[9]。此外,侵入性操作,如气管插管、留置导尿管、纤维支气

管镜等会引起机械性损伤减低防御功能,从而导致 PA 传播及细菌耐药性的发展^[10-11]。烧伤、创伤患者创面为 PA 的定植感染创造条件。刘树华等^[12]的研究显示迄今为止,引起烧伤患者医院感染的细菌仍以革兰阴性杆菌为主,其中 PA 最常见,当患者出现皮肤黏膜损坏及免疫功能下降时,容易导致创面 PA 感染。

2 碳青霉烯类抗菌药物的抑菌机制

碳青霉烯类抗菌药物是新型 β -内酰胺类药物,其中亚胺培南为世界上第一个碳青霉烯类抗菌药物^[13],该药物抗菌谱广、活性强,对 β -内酰胺酶稳定。亚胺培南对 β -内酰胺酶有耐受作用,对细菌细胞壁外膜有较好的穿透性,抑制细胞壁黏肽的合成,通过阻碍细胞壁合成而起杀菌作用,它对大肠埃希菌等细菌的杀菌作用与第三代头孢菌素类相似,而它对 PA 和厌氧菌有较强大的作用。

3 PA 的耐药现状

PA 对碳青霉烯类抗菌药物的耐药率在整个世界范围内为逐年上升的趋势。亚太地区耐药监测在 2010 年有报道显示,PA 对亚胺培南和美罗培南的耐药率分别为 27.7% 和 21.6%^[14]。在我国,各地区的 PA 对两种药物的耐药性也越来越高,其中华东地区高达 25.7% 和 22.5%^[15]。武晓敏等^[16]研究报道称,PA 对亚胺培南和美罗培南的耐药率高达 30% 以上。彭超等^[17]研究报道称,在神经内科检测出的 PA 菌 200 例与 19 中抗菌药物耐药性检测中,美罗培南的耐药性为 25%,而耐药率最低的为多黏菌素 E,为 8%。PA 对抗菌药物耐药