

采用离心浓集法提高乙型肝炎病毒表面抗原检出率的可行性研究^{*}

斯 健, 连晓孚, 黄远荀, 周 芸(广州医学院第二附属医院检验科 510260)

【摘要】 目的 探讨离心浓集法预处理血清标本对提高乙型肝炎血清学标志物乙型肝炎表面抗原(HBsAg)检出率的可行性研究。**方法** 收集广州市内各大医院 2009 年 52 例 HBsAg 阳性者和疑似乙型肝炎感染者血清标本, 分别用酶联免疫吸附试验(ELISA)和化学发光免疫分析法(CLIA)测定 HBsAg。再以 PEG6000 为沉淀剂, 将标本进行高速离心浓集(30 000 r/min)25 ℃, 40 min, 取沉淀用 TE Buffer 溶解, 采用上述相同方法分别进行测定, 比较离心前后其 HBsAg 的 S/CO 值与 HBsAg 定量值的上升情况, 用 SPSS 统计学软件对数据进行非参数检验, 分析其差别是否有统计学意义。**结果** 健康对照组与空白对照经高速离心处理前后的 HBsAg 检测结果差异均无统计学意义($P>0.05$), 而疑似 HBV 感染组和 HBV 感染组患者血清经高速离心预处理后的测定结果均明显高于处理前($P<0.01$)。**结论** 离心浓集法预处理对于血清中有低水平乙型肝炎病毒颗粒的感染者有效, 血清中的病毒颗粒可通过高速离心处理后得到浓缩, 提高临床实验室常规诊断手段的灵敏度的范围, 使隐匿型乙型肝炎的检出率有所提高。

【关键词】 离心浓集; 乙型肝炎病毒; 血清标志物; 聚乙二醇

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.14.005 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)14-1675-03

Feasibility study on improving detection rate of HBsAg in serum samples by centrifugation-concentration method SI Jian, LIAN Xiao-fu, HUANG Yuan-xun, ZHOU Yun (Department of Clinical Laboratory, Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, 510260, China)

【Abstract】 Objective To study the possibility of improving detection rate of HBsAg in serum samples by centrifugation-concentration method. **Methods** 52 serum samples of suspect-HBV patients and HBV infected patients were collected. Then the levels of HBsAg in these samples were tested by ELISA and chemiluminescence immunoassay. After that, the serum samples were treated by polyethylene glycol (PEG) and 40 min's ultracentrifugation (30 000 r/min). The precipitation obtained from each serum was dissolved with TE buffer and the same tests which had been used to test serum samples were carried on them. The anterior-posterior results were compared for statistical significant difference with SPSS 17.0. **Results** In the HBsAg negative control group, there was no statistical difference in the result of the levels of HBsAg with pretreatment of centrifugation between the two groups ($P>0.05$). But there was a significant difference in HBV infected group ($P<0.01$). The level of HBsAg in HBV infected group also increased obviously ($P<0.01$). **Conclusion** HBV particle in serum could be concentrated by centrifugation, and which can extend the sensitive range of routine laboratory diagnosed method as well as improve the detection capability of Hepatitis B virus infection.

【Key words】 centrifugation-concentration; HBV; serum marker; polyethylene glycol

当前确认乙型肝炎(以下简称乙肝)病毒感染的实验室检测手段以酶联免疫吸附试验(ELISA)和化学发光免疫分析(CLIA)方法检测乙肝病毒血清标志物乙肝表面抗原(HBsAg)、乙肝表面抗体(抗-HBs)、乙肝抗原(HBeAg)、乙肝核心抗体(抗-HBe)、乙肝核心抗体(抗-HBc)最为常见。而临床上约有 5%~10% 的慢性乙肝患者为隐匿性乙肝病毒(HBV)感染者, 无法通过血清学检测确定 HBV 感染, 但部分患者可通过肝穿刺结合 HBV DNA 检测到 HBV, 原因之一是隐匿性 HBV 感染者血清中病毒颗粒浓度低或者血清学标志物的低表达^[1-3]。如果针对性的采取离心浓集的标本预处理过程, 则有可能提高血清学检测的灵敏度。本次研究根据参考文献^[4-5]设计了离心浓集法对样本进行预处理, 从而大大提高了血清学检测的灵敏度。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2009 年广州各大医院乙肝及不明原因肝炎患者血清 52 例。其中男 27 例, 女 25 例, 平均(35.18±6.45)岁。分为疑似 HBV 感染组和 HBV 感染组。另设健康对照组和生理盐水空白对照组。疑似 HBV 感染组(45 例)为 HBsAg 阴性(S/CO 值小于 1)及抗-HBs 阴性; HBeAg、抗-HBe、抗-HBc 3 项中有一项或多项阳性; 肝功能生化检测不正常, 例如转氨酶偏高等, 并排除其他已知的继发性或病毒性肝病的患者。HBsAg 感染组(7 例)为已确诊的乙肝患者。健康对照组为肝功能、肝生化检查正常的健康人, 乙肝 ELISA 检测结果除抗-HBs 阳性外为阴性, CLIA 分析重复测定 3 次均小于 0.05 U/mL 的健康人。

1.2 标本采集 所有血清样本采集均满足以下条件: 空腹

* 基金项目: 广州市医药卫生科技项目(2009-YB-161)。

12 h 以上,抽取静脉血 5 mL,待血液凝固后即刻分离血清,置于-20 ℃冰箱保存。

1.3 试剂与仪器 试剂:ELISA 试剂主要采用 HBsAg 诊断试剂盒购自沈阳惠生物工程有限公司。CLIA 试剂 HbsAg 诊断试剂盒购自雅培公司。20% (w/v) 聚乙二醇(PEG)6000 (PEG6000 分析纯,3.5 mol/L NaCl 溶液)。TE Buffer (10 mmol/L Tris-HCl pH7.5,10 mmol/L EDTA,0.1 mol/L NaCl)。仪器:美国 ELX800 全自动酶标分析仪,ABBOTT i2000SR 化学发光免疫分析仪及 Beckman Microfuge 低温高速离心机。

1.4 方法 分别采用 ELISA 法、CLIA 法测定各组样本的 HBsAg,记录测定结果,再对所有样本进行浓集离心处理:取样本 500 μL 加等量 20% (w/v) PEG6000,混匀后 4 ℃过夜。然后 30 000 r/min 离心 40 min,取沉淀物溶解于 150 μL TE Buffer,测定 HBsAg 并记录结果。

1.5 统计学方法 使用 SPSS17.0 软件包对各组血清标本离心前后的血清标志物 HBsAg 的 S/CO 值(ELISA 法),HBsAg 定量值(CLIA 法)分别进行配对资料的秩和检验。以 $P<0.05$

差异为有统计学意义。

2 结 果

表 1 及表 2 显示疑似 HBV 感染组用高速离心预处理后 HBsAg 的 S/CO 值的提高率平均为 49.67%,CLIA 测得的 HBsAg 定量值提高率平均为 49.31%,检测结果均高于高速离心处理前,差异有统计学意义($P<0.01$)。HBV 感染组的 HBsAg S/CO 值和定量值亦有明显提高,差异有统计学意义($P<0.05$)。HBsAg 阴性组与生理盐水空白对照经高速离心处理前后,HBsAg 检测结果均为阴性,其差异均无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 3 组血清标本预处理前后 HBsAg 的 S/CO 值与 HBsAg 定量值的比较

组别	总例数	预处理后—预处理前			定量后—定量前		
		负号秩	正号秩	P	负号秩	正号秩	P
疑似 HBV 感染组	45	34.00	912.00	0.000	5.50	459.50	0.000
HBV 感染组	7	0.00	28.00	0.018	0.00	28.00	0.018
健康对照组	10	29.50	29.50	0.838	9.50	11.50	0.838

表 2 各组血清标本离心处理前后 ELISA 测定 HBsAg 的 S/CO 值的比较

组别	ELISA(S/CO 值)			CLIA(U/mL)		
	处理前(阴性)	处理后(阳性)	平均提高率(%)	处理前(阴性)	处理后(阳性)	平均提高率(%)
HBV 感染组	6.86	9.92	26.14 [#]	21.94	49.16	61.29 [*]
疑似 HBV 感染组	0.55	0.80	49.67 [△]	0.20	0.31	49.31 [▲]
HBsAg 阴性组、空白对照	阴性	阴性	—	阴性	阴性	—

注: [#] 与 ^{*} 比较, $Z=-2.366, P=0.018$; [△] 与 [▲] 比较, $Z=-4.691, P<0.001$; [#] 与 [▲] 比较, $Z=-5.303, P<0.01$, —表示无数据。

表 3 疑似 HBV 感染组中 10 例 HBsAg 阳性血清标本 ELISA 与 CLIA 的检测结果

标本号	ELISA(S/CO 值)		CLIA(U/mL)	
	处理前	处理后	处理前	处理后
1	0.40	1.02	0.02	0.04
11	0.98	1.09	0.06	0.24
15	0.41	0.58	0.02	0.05
23	0.46	2.39	0.01	0.03
39	0.60	1.09	1.49	1.89
34	0.66	1.58	0.20	0.23
58	0.61	1.12	0.24	0.31
69	0.70	1.21	1.15	2.39
72	0.76	1.01	0.26	0.26
62	0.54	1.02	0.92	1.27

注:ELISA S/CO 值>1 者,CLIA 定量>0.05 U/mL 者判为阳性。其中 1 号、23 号处理后 ELISA 结果由阴性转为阳性,而 CLIA 定量结果为阴性;15 号处理后 ELISA 结果为阴性,而 CLIA 定量结果由阴性转为阳性。

3 讨 论

目前隐匿型乙肝患者的确诊无法依靠常规的实验室血清学检查,虽然通过 HBV DNA 检测结合肝活体穿刺可以进行确诊,但是这种方法对患者损伤大,一般不推荐采用。对于隐匿性 HBV 感染患者,其血清标志物的检测中有两种情况出现,一种是任意血清学标志物都无法检测到,另一种则是可以检测到除 HBsAg 外的其他一种或几种血清学标志物^[6]。大约有 10% 左右的感染者由于血清 HBV 水平低下而无法用血清学检测方法确诊。而根据有关报道,HBV 携带者血清中

HBsAg 低表达的发生机制可有两大类:一类是多种原因诱导的病毒基因变异引起其位点改变,使其与单克隆抗体亲和力下降,或引起 HBsAg 合成障碍,从而使 HBV 关键血清标志无法被检测^[9-10];另一类是由于病毒低水平复制、宿主因素、其他病毒、寄生虫或化学物质(如乙醇)影响导致 HBV 在宿主体内表达水平下调,超出血清学检测方法灵敏度检测范围,从而导致 HBV 标志物无法被检测^[11-15]。高速离心法允许病毒颗粒从大量的血清被浓缩,因此增加了 HBV 检出的敏感度,对提高后一种情况的检出率十分有效^[7-8]。

本研究中对 62 例血清标本进行分析,HBV 感染组和疑似 HBV 感染组的血清标本浓集离心处理后测定结果均有不同程度的提高($P<0.05$)。而 HBsAg 阴性组和空白对比差异无统计学意义($P>0.05$)。其中疑似 HBV 感染组的部分标本(10 例,24.4%)离心后被检出 HBsAg 阳性,以此可以推测这部分标本离心前检测不出 HBsAg,可能是 HBV 病毒低水平复制或血清 HBsAg 低表达所致。在高速离心对其进行浓缩后,使 HBsAg 在血清中的表达率有显著的提高,从而使乙型肝炎的检出率得到提高;而一部分标本血清(6 例,13%)经过离心处理后再测定其 HBsAg S/CO 值变化不大,而用 CLIA 对其定量检测却有明显的提高,由此可以推测,可能是由病毒基因变异引起的 HBV 病毒颗粒表面抗原位点变异,使其与单克隆抗体的亲和力下降,超出的目前 ELISA 试剂盒所能达到的检测水平所致。也有相当一部分标本(5 例,10%)经离心后的 HBsAg 血清标志物(包括 ELISA 和 CLIA)检测均为阴性。可能是这些疑似血清 HBsAg 本身为阴性,或病毒变异使其表位超出了 ELISA、CLIA 试剂盒所能检测的范围,又或者是由于本

实验所使用的离心速度偏低,或离心时间不够,沉淀剂和缓冲液的效果未能达到最佳,而导致乙肝病毒颗粒的浓缩程度达不到检测的有效范围。上述的推测均有待作进一步研究。

综上所述,浓集离心的预处理方法使乙肝病毒颗粒得到浓缩,可以有效地提高血清学检测方法对部分隐匿型乙肝患者的检出率。

参考文献

- [1] 王霞,陈常云,张加军,等. 隐匿性乙型肝炎病毒感染的检测及临床特点分析[J]. 临床肝胆病杂志,2007,34(4):243-245.
- [2] Honarkar Z, Alavian SM, Samiee, et al. Occult hepatitis B among chronic liver disease patients[J]. Saudi Med J, 2005,26(4):601-606.
- [3] Ergunay K. Occult hepatitis B infection [J]. Mikrobiyol Bul,2005,39(2):241-249.
- [4] 陈晓东,陶志华,王忠永,等. PEG 沉淀提取法在提取 HBV DNA 中的应用[J]. 临床检验杂志,2002,20(4):219.
- [5] 顾炳权,郭粉雪,庄国忠,等. 聚乙二醇超速离心清除丙种球蛋白制剂中的乙型肝炎病毒[J]. 第四军医大学学报,1992,13(1):22.
- [6] Takahashi T, Nakagawa S, Hashimoto T, et al. Large-scale isolation of DANE particles from plasma containing hepatitis B antigen and molecule extruding directly from their cores [J]. J Immunol,1976,117(4):1392-1397.
- [7] Conjeevaram HS, Lok AS. Occult hepatitis B virus infection;a hidden menace[J]. Hepatology,2001,34(5):204-206.
- [8] 李建民,苟凝虹,陈金元,等. 乙肝病毒 Dane 颗粒的纯化

及形态学观察[J]. 临床输血与检验,2007,9(4):322-324.

- [9] Hou J, Wang Z, Cheng J, et al. Prevalence of naturally occurring surface gene variants of hepatitis B virus in non-immunized surface antigen-negative Chinese carriers [J]. Hepatology,2001,34(5):1027-1034.
- [10] Koyanagi T, Nakamuta M, Saka H, et al. Analysis of HBs antigen negative variant of hepatitis B virus: unique substitution Glu129 to Asp and Gly 145 to Ala in the surface antigen gene[J]. Med Sci Monit,2000,6(6):1165-1169.
- [11] Chu CM, Yeh CT, Liaw YF, et al. Low level viremia and intracellular expression of HBsAg in HBsAg carriers with concurrent hepatitis C virus C[J]. J Clin Microbiol, 1995,36(7):2084-2086.
- [12] Tsuji H, Shimomura H, Fujio K, et al. Relationship of serum markers of hepatitis B and C virus replication in coinfectd patients[J]. Acta Med Okayama,1996,50(3):113-144.
- [13] Zervou EK, Dalekos GN, Boumba DS, et al. Value of anti-HBc screening of blood donors for prevention of HBV infection; result s of a 32year prospective study in North-western Greece[J]. Transfusion,2001,41(5):652-658.
- [14] Mcclary H, Koch R, Chisari FV, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication during Schistosoma Mansoni infection in transgenic mice[J]. Exp Med,2000,192(2):289-294.
- [15] 杨飞飞,卢洪洲,尹有宽,等. HBsAg 阴性慢性肝炎患者肝穿刺的临床意义[J]. 肝脏,2005,10(1):30-31.

(收稿日期:2011-02-25)

(上接第 1674 页)

以上,高于广州报道水平^[3];大肠埃希菌对于环丙沙星、左氧氟沙星的耐药率达到了 60%以上,这要引起临床高度重视。

非发酵菌中铜绿假单胞菌耐药率最低的是多黏菌素 B(0%)、亚胺培南(5.6%)、头孢哌酮/舒巴坦(6.9%)、头孢他啶(11.1%)、氨基曲南(11.1%);鲍曼不动杆菌耐药率最低的是多黏菌素 B(0%)、头孢哌酮/舒巴坦(8.3%)、亚胺培南(8.5%)。对于嗜麦芽窄食单胞菌复方新诺明(10%)和左氧氟沙星(10%)保持较低的耐药率。

在葡萄球菌中未分离到万古霉素和利奈唑胺不敏感的葡萄球菌,其中氯霉素的耐药率都在 15%以下。监测的肺炎链球菌对于红霉素和复方新诺明耐药率达到了 100%和 94.7%,高于文献报道的 87.5%和 43.8%^[8],红霉素类的阿奇霉素耐药率也为 100%,这也是本院耐药监测的另一个特点。在其他链球菌中未发现万古霉素不敏感株。

通过监测本研究发现本区域细菌的耐药性与全国和其他地方有很多相似之处,但是又体现出很多差异,所以针对各自区域的耐药监测尤为重要。区域的监测结果对于本区域临床合理使用抗生素又更加直接的指导作用。

参考文献

- [1] 朱德妹. 进一步加强细菌耐药监测[J]. 中华检验医学杂

志,2006,29(10):865-866.

- [2] 黄东标,周茂亮,李嫦珍,等. 2005~2009 年临床分离病原菌分布及耐药性变迁[J]. 中华医院感染学杂志,2011,21(6):1216-1219.
- [3] 卓超,苏丹虹,钟南山. 2007 年广州地区耐药性监测分析[J]. 中华检验医学杂志,2009,32(4):397-402.
- [4] 何学贤,王显扬. 血培养 3 250 份标本结果分析[J]. 中华检验医学杂志,1999,22(2):96-97.
- [5] 杨敬芳,李继红,王鑫,等. 6 445 份血培养分离菌的分布特征及耐药谱型研究[J]. 中华医院感染学杂志,2003,13(6):575-577.
- [6] 李光辉,汪复. 重视与加强深部真菌感染的临床研究[J]. 中国抗感染化疗杂志,2005,5(4):193-194.
- [7] 李家泰,李耘,齐慧敏. 2002~2003 中国革兰阴性细菌耐药性研究[J]. 中华检验医学杂志,2005,28(1):19-29.
- [8] 杨启文,王辉,徐英春,等. 中国 14 家教学医院院内菌血症与肺炎和腹腔感染病原菌的抗生素耐药监测[J]. 中华检验医学杂志,2009,32(12):1367-1375.

(收稿日期:2011-02-19)