

# 乙型肝炎病毒表面抗原和表面抗体同时阳性样本的体外中和反应特性分析\*

朱浩稳, 黄剑臻, 林曼跃(湖南省第二人民医院检验科, 长沙 410007)

**【摘要】** 目的 研究同时阳性样本的乙型肝炎病毒(HBV)表面抗原(HBsAg)和乙型肝炎病毒表面抗体(抗-HBs)的体外中和反应特性。方法 运用化学发光定量检测技术在 HBsAg 阳性样本中收集抗-HBs 同时阳性的样本血清作为研究对象;选择单纯 HBsAg 阳性的样本和单纯抗-HBs 阳性的样本分别与同时阳性的研究组样本中的抗-HBs 和 HBsAg 进行体外血清学中和反应,测定中和物中的 HBsAg 和抗-HBs 含量;测定 HBsAg 单阳性样本的基因型和 HBsAg 亚型,记录各测定结果。结果 获取 1 例 HBsAg(130.21 ng/mL)和抗-HBs(50.6 U/L)双阳性样本,HBV 基因型为 B 型,HBsAg 亚型为 adw;20 例 HBsAg 单阳性样本中有 6 例能中和研究组样本中的抗-HBs(中和物抗-HBs $\leq$ 6.5 U/L);20 例抗-HBs 单阳性样本均能中和研究组样本中的 HBsAg(中和物 HBsAg $\leq$ 0.06 ng/mL)。结论 同时阳性样本中的抗-HBs 不是与其共存的 HBsAg 的特异性抗体。

**【关键词】** 乙型肝炎病毒表面抗原; 乙型肝炎病毒表面抗体; 体外中和反应

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.12.001 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)12-1409-02

Study on neutralization reaction characteristics in vitro of HBsAg and anti-HBs coexist positive samples ZHU Hao-wen, HUANG Jian-zhen, LIN Man-yue (Hunan Provincial Second People's Hospital, Chansha, Hunan 410007, China)

**【Abstract】** Objective To study the neutralization reaction characteristics in vitro of HBsAg and anti-HBs coexist positive samples. Methods Using chemiluminescent assay, the anti-HBs-positive serum samples were collected from serum HBsAg-positive samples as the research group. Simple HBsAg-positive samples and simple anti-HBs-positive samples were respectively selected and performed the serum neutralization reaction with anti-HBs and HBsAg in HBsAg and anti-HBs coexist positive samples of the research group. The HBsAg and anti-HBs levels in the corrective were detected. The genotypes and HBsAg subtypes of simple HBsAg-positive samples were detected. The detection results were recorded. Results 1 case of coexist positive HBsAg(130.21 ng/mL) and anti-HBs(50.6 U/L) was detected, HBV genotype was B-type, HBsAg subtypes was adw. Among 20 simple HBsAg-positive samples, 6 cases could completely neutralized anti-HBs existing in coexist positive samples, (corrective anti-HBs $\leq$ 6.5 U/L). All 20 simple anti-HBs positive samples could completely neutralized HBsAg existing in coexist positive samples (HBsAg $\leq$ 0.06 ng/mL). Conclusion Anti-HBs in HBsAg and anti-HBs coexist positive samples is not the coexist HBsAg-specific antibodies.

**【Key words】** HBsAg; anti-HBs; neutralization reaction in vitro

在检验工作中可观察到少数样本血清乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)和乙型肝炎病毒表面抗体(抗-HBs)同时阳性的现象<sup>[1]</sup>,给检验结果解释和临床诊断带来一定的困惑。本文对同时阳性样本中 HBsAg 和抗-HBs 的体外特性进行分析,报道如下。

## 1 材料与与方法

### 1.1 样本来源

**1.1.1** HBsAg 和抗-HBs 双阳性样本的来源 在日常工作中应用全自动免疫发光检测技术在血清 HBsAg 阳性样本中收集到 1 例抗-HBs 阳性的血清样本。

**1.1.2** 单阳性样本的来源 HBsAg 单阳性样本:在日常工作中收集 20 例血清 HBsAg 阳性并且血清抗-HBs 阴性的样本,每例样本血清用生理盐水调整 HBsAg 至相近浓度。抗-HBs 单阳性样本:在日常工作中收集 20 例血清 HBsAg 阴性并且血清抗-HBs 和乙型肝炎病毒 e 抗体(抗-HBe)和乙型肝炎病毒核心抗体(抗-HBc)阳性的样本,每例样本血清用生理盐水调整抗-HBs 浓度至相近浓度。

**1.2 仪器** Multiskan MK3 酶标仪(上海雷勃生物技术有限

公司产品);Fluo Cycle 型核酸扩增荧光检测仪(上海科华实验系统有限公司产品);化学发光仪(日本东曹 AIA-1800ST 公司产品)。

**1.3 试剂** 乙型肝炎血清学标志物定量检测试剂盒(日本东曹公司产品)。HBV 基因分型检测试剂(上海科华生物工程股份有限公司产品)。HBsAg 确认试剂盒(中和试验法)(珠海丽珠试剂股份有限公司产品)。HBsAg 亚型检测试剂(上海科华生物工程股份有限公司产品)。

### 1.4 方法

**1.4.1** 血清学标志物的测定 采用化学发光定量方法进行 HBV 5 项血清学标志物(HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、抗-HBc)的定量检测,检测按仪器标准操作规程进行操作。

#### 1.4.2 血清学中和反应

**1.4.2.1** 实验样本各反应物浓度的配制 根据实验设计,用生理盐水调控双阳性样本的 HBsAg 浓度为 4.5 ng/mL;用生理盐水调控 20 例 HBsAg 单阳性样本的浓度为 4.5 ng/mL 左右;用生理盐水调控 20 例抗-HBs 单阳性样本的浓度为 640 U/L 左右。

\* 基金项目:湖南省第二人民医院重点专科基金资助项目(湖南省卫生厅 2010 年序号 04)。

**1.4.2.2 双阳性样本中 HBsAg 的中和试验** 试验组:参照文献[2]HBsAg 与抗-HBs 体外中和反应比例,在抗-HBs 过量情况下,将已编号的 20 支试管中各加入 HBsAg 已经调控为 4.5 ng/mL 左右的双阳性标本 0.2 mL,再分别加入 0.2 mL 上述抗-HBs 单阳性的样本,充分混匀,37 °C 孵育,孵育过程中不时摇匀以进行 HBsAg 与抗-HBs 体外中和反应。2 h 后测定每个试管中中和物的 HBsAg 含量,记录定量结果。对照组:取 1 例 HBsAg 单阳性样本 0.2 mL 代替双阳性样本的 HBsAg 做平行分析,记录各组结果。

**1.4.2.3 双阳性样本中抗-HBs 的中和试验** 试验组:参照文献[2]HBsAg 与抗-HBs 体外中和反应比例,在 HBsAg 过量情况下,将已编号的 20 支试管中各加入抗-HBs 原始浓度的双阳性标本 0.2 mL,再向每个试管中分别加入 0.2 mL 上述已经调控为 810 ng/mL 左右浓度的 HBsAg 单阳性的样本,充分混匀,37 °C 孵育,孵育过程中不时摇匀以进行 HBsAg 与抗-HBs 体外中和反应。2 h 后测定每个试管中中和物的抗-HBs 含量,记录定量结果。对照组:取 1 例抗-HBs 单阳性样本 0.2 mL 代替双阳性样本的抗-HBs 做平行分析,记录各组结果。

**1.4.3 测定双阳性样本及 20 例 HBsAg 单阳性样本的 HBV 基因型和 HBsAg 亚型**

**1.4.3.1 HBV 基因型测定** 采用上海科华生物科技有限公司血清 DNA 抽提试剂盒,按上海科华生物科技有限公司血清 DNA 抽提试剂盒说明书进行操作,用浓缩裂解法提取血清 HBV DNA。取 2 μL 提取液为模板做聚合酶链反应(PCR)扩增,按照文献[3]介绍型特异性引物分型法,利用巢式 PCR 技术

对提取的血清 HBV DNA 进行基因分型,记录各组测定结果。

**1.4.3.2 HBsAg 亚型的测定** HBsAg 亚型测定外送上海生物工程技术有限公司测定。

**1.4.4 判断标准** 化学发光定量检测技术测定的血清学标志物按说明书判断阴阳性结果来设定正常参考范围,即:HBsAg 大于 0.06 ng/mL 为阳性,抗-HBs 大于 6.5 U/L 为阳性;HBV 基因分型根据 HBV 全基因核苷酸序列异源性大于或等于 8% 或者 S 基因区核苷酸序列异源性大于或等于 4% 将不同病毒株分为不同的基因型,迄今为止,HBV 可以分为 8 个基因型,即 A、B、C、D、E、F、G 和 H 型<sup>[3]</sup>。

**1.5 统计学方法** 采用  $\chi^2$  检验进行统计学处理。

**2 结 果**

**2.1 血清学标志物及 HBV 基因型测定结果** 从 2 566 例日常检测中获取 1 例 HBsAg 和抗-HBs 双阳性样本:HBsAg 为 130.21 ng/mL、抗-HBs 为 50.60 U/L、HBV 基因型为 B 型,HBsAg 亚型为 adw;获取 20 例 HBsAg 单阳性样本,HBsAg 浓度大于 800 ng/mL;获取 20 例抗-HBs 单阳性伴随抗-HBe 和抗-HBc 阳性样本,抗-HBs 浓度大于 600 U/L。

**2.2 血清学中和反应结果** 双阳性样本中 HBsAg 的中和试验结果见表 1。20 例不同来源的抗-HBs 体外均能中和双阳性样本中的 HBsAg;双阳性样本中抗-HBs 的中和试验结果见表 2。20 例不同来源的 HBsAg 单阳性样本中,有 6 例能中和双阳性样本中的抗-HBs(中和物抗-HBs 浓度小于 6.5 U/L)。双阳性样本中 HBsAg 和抗-HBs 的体外中和反应差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

表 1 双阳性样本 HBsAg(4.5 ng/mL)与 20 例抗-HBs 单阳性样本体外中和反应结果(n=20)

组别	抗-HBs 单阳性样本(浓度 U/L 与血清学模式)		体外中和物 HBsAg 浓度(ng/mL)	
	抗-HBs 单阳性样本浓度	抗-HBs(+),抗-HBe(+),抗-HBc(+)	>0.06	≤0.06
试验组	650.5±25.9	20	0	20
对照组	640.5±26.1	20	0	20

表 2 双阳性样本中抗-HBs(50、60 U/L)与 20 例 HBsAg 单阳性样本体外中和反应结果(n=20)

组别	HBsAg 单阳性样本(浓度 ng/mL 与 HBV 基因型/HBsAg 亚型)			体外中和物抗-HBs 浓度(U/L)	
	HBsAg 单阳性样本浓度(ng/mL)	HBV 基因型 adw	HBsAg 亚型/adr	>6.5	≤6.5
试验组	811.5±5.9	14	6	14	6
对照组	813.5±4.9	14	6	0	20

**3 讨 论**

乙型肝炎病毒(HBV)基因组全长 3 215 bp,含有 4 个开放读码框架,分别为 S、C、P 和 X 区。S 基因编码 HBV 前 S1、前 S2 和主蛋白。病毒在肝脏实质细胞中产生的 HBsAg 不仅镶嵌于病毒包膜的脂质双层中参与组装完整的病毒,更有过量表达的 HBsAg 释放到血液中<sup>[4]</sup>。HBsAg 具有较强的免疫原性,可诱导机体产生具有保护性作用的抗-HBs。

HBsAg 和抗-HBs 的中和反应是机体免疫 HBV 的基础。当 HBsAg 诱导机体产生抗-HBs 时,在同一机体内环境下,二者会连续进行特异性中和反应。实验室检测离体血清学标志物发现,当 HBsAg 过量时,只能检出 HBsAg,当抗-HBs 大量产生时,体外只能检出抗-HBs。但在临床实践中,可观察到 HBsAg 或抗-HBs 同时出现阳性的现象,多见于慢性 HBV 感染者<sup>[5]</sup>。

本研究是经过长时间收集血清,最终获得的 1 例慢性乙肝患者血清,化验复核后证实为 HBsAg 阳性,同时抗-HBs 亦为阳性。抗-HBs 均检测 2 次以上,并应用了不同厂家不同检测

生产的抗-HBs 检测试剂盒核实无误。

抗-HBs 产生有下列 2 个方面的因素可以诱导:(1)接种乙肝疫苗后,获得了免疫力,是一种好现象;(2)乙肝恢复期或曾患乙肝已愈,表示已有免疫力。机体未接种过乙肝疫苗具有的抗-HBs 是机体隐性感染 HBV 引起机体产生的抗体。此种隐性感染的 HBV 是当地流行的基因型病毒,属于野生型病毒。我国以 B 型和 C 型为主。机体产生的抗体只是针对 B 型 HBV 或 C 型 HBV 的野生型抗体,只具有各自型的特异性,此时机体内往往同时存在抗-HBe 和抗-HBc。此时机体内往往同时存在抗-HBe 和抗-HBc。20 例来自不同个体的野生型抗-HBs 分别与本研究双阳性样本中的 HBsAg 反应体外全部完全中和。双阳性样本中的 HBsAg 是普通流行的野生型。

HBsAg 有 4 种亚型<sup>[6]</sup>(adr、adw、ayw、ayr),有较明确的地理和民族分布特征,具有流行病学意义。据报道,我国主要存在 adr、adw、和 ayw 3 种亚型,北方以 adr 亚型为主,南方以 adw 亚型为主,新疆、西藏和内蒙古等少数(下转第 1412 页)

表 2 207 例产前筛查阳性病例产前诊断异常情况

病例	年龄(岁)	筛查风险概率	染色体诊断结果
1	25	18-三体 1:50	有部分核型 13 号和 20 号互相易位
2	29	21-三体 1:295	46,XY,1qh+
3	31	21-三体 1:34	47,XX+21
4	22	21-三体 1:86	46,XX,inv(20)(p12q11)
5	33	21-三体 1:151	45,X[5]/46XY[68]
6	25	21-三体 1:210	46,XX,22pstk+
7	30	21-三体 1:200	46,XY,Yqh+
8	28	21-三体 1:146	47,XY,+20(3)/46,XY(57)
9	25	21-三体 1:212	45,XY,inv(9)(p11q13)
10	35	21-三体 1:56	46,XX,inv(9)(p11q13)
11	37	21-三体 1:210	47,XY+13
12	33	NTD 1:50	罗宾逊易位

3 讨 论

近年来孕妇血清标记物在唐氏综合征的产前筛查技术得到迅速发展<sup>[1]</sup>,并逐渐被广大孕妇所接受<sup>[2]</sup>。唐氏综合征的风险是随着孕妇的年龄增长而增加的,即胎儿发生先天性畸形的概率同孕妇年龄呈正相关。以往只筛查大于 35 岁孕妇,认为高龄初产妇会加剧婴儿患有先天性缺陷的风险。随着我国现行的计划生育政策已向保持稳定的人口低增长率发展,35 岁以上的孕妇已少,有资料显示,只有 15%~31%是发生在 35 岁以上孕妇,有 69%~85%是发生在小于 35 岁孕妇。本文研究资料也说明了这一点,筛查中小于 35 岁的孕妇占 96.2%(2 459/2 555),大于 35 岁者仅占 3.8%,说明小于 35 岁的低龄孕妇占大多数,母亲年龄有偏低倾向(表 1)。大于 35 岁的孕妇高风险中仅检出 2 例唐氏综合征患儿,10 例年龄均小于 35 岁,最小的只有 22 岁(表 2),与报道基本一致<sup>[3-4]</sup>。所以如果仅对 35 岁以上孕妇进行羊水产前诊断,那么只能防止部分唐氏综合征胎儿出生,而 35 岁以下孕妇人群中得不到有效地防治。因此,任何年龄孕妇都应成为产前筛查的目标。

本研究 2 555 例孕妇中,筛查出唐氏综合征高风险 210

例,阳性率 8.2%;18-三体高风险 26 例,阳性率 1.0%;NTD 高风险 29 例,阳性率的 1.1%。高风险孕妇中有 207 例进行了羊水细胞染色体检查或胎儿脐血染色体检查,检测出染色体异常核型 12 例,异常率为 5.8%,与文献<sup>[5]</sup>报道较一致。

在高风险孕妇人群中作者随访了 200 例,随访率 95%。随访率不全的最主要原因是孕妇填写信息资料时出错或孕妇手机停机,造成无法与孕妇联系。有条件的话还应做好低风险孕妇的随访工作。

孕妇血清唐氏综合征、18-三体综合征、NTD 筛查胎儿先天缺陷是行之有效的方法,可以作为胎儿染色体异常产前筛查的常规项目<sup>[6-7]</sup>。

参考文献

- [1] 李光辉,黄醒华. 孕妇血清标记物在产前诊断中的应用[J]. 中国妇产科杂志,1998,33(4):252-254.
- [2] Gilliam M. Cesarean delivery on request: reproductive consequences[J]. Semin Perinatol,2006,30(5):257-260.
- [3] 吴刚,伦玉兰. 中国优生科学[M]. 北京:科学技术文献出版社,2000:306.
- [4] 刘杰,刘玉芝,谭凤钦,等. Down's 综合征母亲趋于年轻化分析[J]. 中国优生与遗传杂志,2004,12(2):40.
- [5] 杨瑞芳,王明毅,丁风华,等. 2 000 例孕中期唐氏综合征的筛查分析[J]. 现代妇产科进展,2003,12(5):3-5.
- [6] 蔡徐山,黄秋兰,齐结华,等. 孕中期母血清标记物筛查唐氏综合征及其他先天性畸形的临床价值[J]. 检验医学与临床,2010,8(7):861-862.
- [7] 陈涛. 唐氏综合征的产前筛查[J]. 检验医学与临床,2011,1(8):56-57.

(收稿日期:2011-12-20)

(上接第 1410 页)

民族居住地区以 ayw 亚型为主<sup>[7]</sup>。20 例来自不同个体的野生型 HBsAg 分别与本研究双阳性样本中的抗-HBs 反应,体外 6 例能完全中和(被中和)抗-HBs,14 例无反应。双阳性样本中的抗-HBs 只能与部分野生株 HBsAg 进行特异性中和反应。同时阳性样本中的抗-HBs 不是与其共存的 HBsAg 的特异性抗体,在体内不发生特异性中和反应,体外血清学标志物检测呈同时阳性。

综上所述,HBsAg 和抗-HBs 同时阳性样本中,机体内 HBsAg 是普通流行的野生型 HBsAg,抗-HBs 与机体隐性感染产生的野生型抗-HBs 在体外血清学中和反应的范围有显著性差异,该抗-HBs 是针对某种 HBV 基因型的特异性有效保护性抗体,与机体本身携带的 HBsAg 无特异性关系。

参考文献

- [1] 王珍光,邓芝云,郭建巍,等. 乙型肝炎病毒表面抗原与表面抗体同时阳性的血清学模式初步研究[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(13):145-146.
- [2] 滕龙. HBsAg 与抗-HBs 中和比的研究及应用探讨[J]. 医学研究通讯,2005,10(6):17-20.

- [3] Naito H, Hayashi S, Abe K. Rapid and specific genotyping system for Hepatitis B Virus corresponding to six major genotypes by PCR using type specific primers[J]. J Clin Microbiol,2001,39(1):362-364.
- [4] Montineri A, Nigro L, La Rosa R, et al. Treatment induced seroconversion to HBsAb following HBV reactivation in the immunosuppressed haematology and oncology patient: a clinical survey of 5 cases in Catania, Italy[J]. Clin Virol,2011,52(4):284-287.
- [5] 张振华,夏剑,波彭静,等. HBsAg 和 HBsAb 双阳性检测结果的初步分析[J]. 实用肝脏病杂志,2009(12)3:187-188.
- [6] 周正菊,雷鸿斌,龙聪. 血清 HBsAg、抗-HBs 双阳性结果的初步分析[J]. 国际检验医学杂志,2012,(33)4:497-498.
- [7] 董梅,张跃新. 乙型肝炎病毒基因型分布及临床意义[J]. 中华肝脏病杂志,2005,13(1):56-57.

(收稿日期:2011-12-25)