

1 种新型国产超敏 HBsAg 试剂 在血液筛查中的应用研究*

欧山海¹ 袁权² 宋浏伟² 林永财¹ 陈长荣^{1△}

(1. 厦门市中心血站 福建 厦门 361004; 2. 厦门大学 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心)

摘要:目的 对 1 种新型国产超敏 HBsAg 试剂在血液筛查中的应用进行评估。方法 用考核试剂 WT CLEIA 分别检测 WHO 标准品、HBV 阴性的血清、各种 HBV 亚型及 HBsAg 突变株标本以及无偿献血者标本,并与参比试剂做比较。结果 WT CLEIA 对 HBsAg 阴性标本的检测特异性为 99.81% (95% CI: 99.57% ~ 99.93%);对 WHO 标准品检测的分析灵敏度可达 0.012 IU/mL,高于参比试剂 Hepanostika HBsAg Ultra 的 0.05 IU/mL 和 Abbott Murex V3 的 0.1 IU/mL;对 HBsAg 突变株及不同亚型的检出率也高于 2 种参比试剂;对近 5 000 份标本的检测结果与参比试剂 Abbott Murex V3 有高度的符合率(99.60%)。结论 该试剂检测性能良好,在血液筛查中有较好的应用前景。

关键词:乙型肝炎病毒;化学发光;隐匿性感染 “a”表位

中图分类号:R446.62 文献标识码:A 文章编号:1004-549X(2013)08-0715-04

Application of a novel domestic hypersensitive HBsAg reagent in blood screening OU Shanhai¹, YUAN Quan², SONG Liuwei², LIN Yongcai¹, CHEN Changrong¹. Corresponding author: CHEN Changrong¹. 1. Xiamen Blood Center, Xiamen 361004, China 2. National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, Xiamen University

Abstract: Objective To study the application of a novel domestic hypersensitive HBsAg reagent in blood screening. **Methods** The reagent for evaluation named WT CLEIA together with reference reagents were used to test WHO standard, HBV negative samples and specimens with various HBV subtypes and HBsAg mutants. **Results** The specificity of WT

CLEIA was 99.81% (95% CI: 99.57% ~ 99.93%). The analytical sensitivity of WT CLEIA was 0.012 IU/ml, which was higher than Hepanostika HBsAg Ultra (0.05 IU/mL) and Abbott Murex V3 (0.1 IU/mL); WT CLEIA also had a higher de-

* 基金项目:福建省自然科学基金面上项目(2011D007);厦门市输血医学重点专科建设项目(2012-2014);△通信作者:陈长荣(1969.10~),男,主任技师,主要从事输血医学研究,电话:0592-2211926,Email:shanhaiou@sina.com

(表 6)。同时输血科大力提高使用血浆的安全性,对所有临床用血浆都作了白细胞滤除,对非长期固定献血者血浆都进行了病毒灭活,减少和避免了血源性传染病的发生^[10]。6 年间所作的 295 例/688 次 TPE 共使用 1 523 380 mL 血浆未发现经血传播传染病。TPE 在临床应用越来越广,各种医疗技术的联合发展使其更有良好的发展前景。如本组中就有 1 例 ANCA 相关性血管炎,经 TPE 联合干细胞治疗取得了良好效果。但还存在许多不良及限制发展的问题,如血浆用于 TPE 的量虽然已占本院医疗用血浆的 30%,但由于血源紧张,TPE 的发展仍会面临血浆短缺的问题。今后我们还要进一步提高临床血浆使用的科学性与合理性,力争达到同等红细胞悬液量相对应的血浆量能够满足临床血浆治疗的需求,更充分地发挥输血治病救人的效用。

参 考 文 献

[1] 钟月华. 血浆置换术的临床应用概况. 广西中医学院学报,

2011, 14(3): 75-76.

- [2] 张卫民,李东明,王欢. 血浆置换在临床中的应用. 哈尔滨医药 2011, 31(6): 455-456.
- [3] 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组. 肝衰竭诊治指南(2012 年版). 中华临床感染病杂志 2012, 5(6): 321-326.
- [4] 岳华,姜鸿,徐世茹. 18 例急性肾衰竭病理及预后分析. 新疆医学 2008, 38(11): 59-60.
- [5] 李碧娟. 治疗性血浆置换术//刘景汉,兰炯采. 临床输血学. 北京:人民卫生出版社 2011: 141-184.
- [6] 刘传苗,徐静,张莉,等. 血浆置换治疗肝衰竭临床分析. 实用肝脏病杂志 2012, 15(3): 241-243.
- [7] 孙先玲,吕运来,马红丽. 冷上清做置换液血浆置换治疗血栓性血小板减少性紫癜. 中国输血杂志 2004, 17(1): 39-40.
- [8] 孙繁九,苏保鑫. 大剂量血浆置换技术及置换液的研究进展. 中国实用医药 2011, 6(19): 243-244.
- [9] 林嘉,何屹. 大量失血患者合理使用血浆研究. 现代预防医学, 2007, 34(15): 2079-2080.
- [10] 安万新. 合理用血保证输血安全. 中国输血杂志 2008, 5(21): 229-230.

(2012-08-23 收稿 2013-07-31 修回)

本文编辑:蔡辉

tection rate of HBsAg mutants and subtypes than these 2 reference reagents. In addition ,WT CLEIA had a high accordant rate with Murex V3 in blood donors HBsAg screening. **Conclusion** WT CLEIA has a good performance in HBsAg screening and would have a good prospect of application in blood screening.

Key words: hepatitis B virus; chemiluminescence; OBI “A” epitope

肝炎(主要是乙型肝炎)是当今世界的三大顽症之一。据世界卫生组织报道^[1 2],全球约 20 亿人曾感染过乙肝病毒(HBV),其中 3.5 亿人为慢性 HBV 感染者,每年约有 100 万人死于 HBV 感染所致的肝衰竭、肝硬化和原发性肝细胞癌(HCC)。我国属 HBV 感染高流行区,卫生部 2006 年开展的全国人群乙肝流行病学的调查结果表明,全国 16~59 岁人群 HBsAg 携带率仍高达 8.57%^[3]。乙型肝炎和与乙型肝炎相关的社会经济现象仍然是我们必须严肃面对的社会问题。

目前,HBsAg 的检测仍然是诊断 HBV 感染的最常用标志之一,尤其在采供血机构,HBsAg 是常规必检项目。国内市场上较为常用的 HBsAg 检测试剂主要为针对 HBV 的 3 个亚型(adrq+ 和 adw2,少数为 ayw3)的酶联免疫法产品,各血站也均应用酶联免疫法(ELISA)试剂进行 HBsAg 的筛查。尽管近年来,ELISA 试剂的检测灵敏度不断得到提升,有的甚至可达 0.15 ng/mL^[4],但在输血传播性病毒的检测上,HBV 的残余风险仍然远远高于 HCV 和 HIV^[5 6]。究其原因,除了检测灵敏度外,还有 1 个重要因素是 HBsAg 突变造成的隐匿性 HBV 感染。近年来新发展的化学发光免疫分析法(chemiluminescence immunoassay,CLIA)具有极高灵敏度和特异性、反应快速、精确定量等特点,显示出很好的应用前景;为此,厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心通过对大量 HBsAg 特异性单克隆抗体的筛选,尤其是针对 HBsAg 变异株,研发了 1 种基于化学发光法的新型 HBsAg 检测试剂 WT CLEIA(另文发表)。本研究则对该试剂的检测性能及其在血液筛查中应用进行评估,报告如下。

1 材料与方法

1.1 无偿献血者标本 收集自 2009 年 5 月~7 月厦门地区的无偿献血者标本 4 997 份。其中男性:2 778 份,占 57.6%;女性:2 219 份,占 42.4%。年龄:18~55 岁。标本经 1 600 g、15 min 离心后分离出血浆,-20℃ 保存待检。同时用考核试剂 WT CLEIA 与参比试剂 Murex HBsAg V3 对其进行平行检测。2 种试剂检测结果不相符的标本用第 3 方试剂罗氏 HBsAg 诊断试剂盒(电化学发光法,Roche Elecsys)进行检测作为确认结果。以上试剂均为中

国药品生物鉴定所批批检合格产品。

1.2 主要试剂 1) 考核试剂:由厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心研发并提供的新型 HBsAg 检测试剂,命名为 WT CLEIA。3) 参比试剂:市面上已获准使用的、质量得到公认的同类检测试剂;本研究特选用国内乃至国外临床上广泛应用的 HBsAg 检测试剂 Heparostika HBsAg Ultra(生物梅里埃,法国,批号:20101001)以及血站系统广泛应用的 HBsAg 检测试剂 Murex HBsAg V3(雅培,英国,批号:L406910)作为本研究的参比试剂。

1.3 主要仪器 STAR 全自动加样仪(瑞士 HAMILTON),FAME24/20 全自动酶免分析仪(瑞士 HAMILTON),Berthold ORION II 微孔板式发光检测仪(德国 Berthold DS),MODULAR Elecsys E170 电化学发光免疫分析仪(瑞士罗氏),超低温冷冻贮存冰箱(浙江中科生命)。

1.4 特异性检测 用考核试剂 WT CLEIA 分别检测 1 035 份临床 HBV 确认阴性的标本(国内各个医院的临床标本,HBV PCR 和雅培 Architect i2000 SR HBsAg 化学发光试剂检测阴性)、2 024 份健康献血者标本(厦门市中心血站的献血者,HBV PCR 和 Murex V3 HBsAg ELISA 试剂检测阴性)。

1.5 分析灵敏度检测 将 WHO 标准品(0.2 IU/mL)用 HBsAg 阴性血清作为稀释液进行系列倍比稀释,得到 0.2、0.1、0.05、0.025、0.012、0.006 IU/mL 6 个浓度梯度;同时用考核试剂 WT CLEIA 与 2 种参比 ELISA 试剂 Heparostika HBsAg Ultra 和 Murex HBsAg V3 对不同浓度梯度的标准品进行检测。

1.6 对各种 HBV 亚型及 HBsAg 突变株标本的检测 从全国各地收集了 22 份不同 HBV 亚型及血清型的血清标本,其中包含 15 份 HBsAg 突变株和 7 份野生株。对这 22 份标本用 HBsAg 阴性血清作为稀释液进行 6 个浓度梯度的倍比稀释,得到总计 132 份标本;然后用考核试剂 WT CLEIA 与 2 种参比试剂 Heparostika HBsAg Ultra 和 Murex HBsAg V3 分别对其进行检测。

1.7 统计学分析 考核试剂与参考试剂检测结果一致性比较采用 Kappa 值进行分析。Kappa 值计算采用以下公式: $P(\text{observed}) = (A + D) / (A + B + C + D)$, $P(\text{chance}) = [(A + B)(A + C) + (B + D)(C + D)] / (A + B + C + D)$, $Kappa \text{ 值} = [P(\text{observed})$

- P(chance)] / [1 - P(chance)]; Kappa 值与一致性的强度关系是: < 0 弱; 0 ~ 0. 2 轻度; 0. 21 ~ 0. 40 尚好; 0. 41 ~ 0. 60 中度; 0. 61 ~ 0. 80 高度; 0. 81 ~ 1. 00 最强。采用 SPSS V17. 0 对数据进行统计学分析 $P < 0. 01$ 或 $P < 0. 05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 WT CLEIA 检测特异性 1 035 临床 HBV 确认阴性的标本中 2 份 WT CLEIA 检测呈阳性 2 02 份标本中有 4 份 WT CLEIA 检测呈阳性。总的检测特异性为 99. 81% (95% CI: 99. 57% ~ 99. 93%) (表 1)。

表 1 WT CLEIA 对 HBV 阴性的临床和献血者标本的检测结果

	n	HBV 阳性	HBV 阴性(%)	特异性(95%CI)
临床 HBV 确认阴性标本	1 035	2	1 033(99. 81)	99. 30 ~ 99. 90
健康献血者标本	2 024	4	2 020(99. 81)	99. 50 ~ 99. 95
合计	3 059	6	3 053(99. 81)	99. 57 ~ 99. 93

2.2 WT CLEIA 检测的分析灵敏度 对 WHO 标准品系列浓度梯度的检测显示 ,WT CLEIA 的检出下限浓度为 0. 012 IU/mL ,而参比试剂 Biomerieux 是 0. 05 IU/mL ,Abbott Murex V3 是 0. 1 IU/mL(表 2)。

2.3 对各种 HBV 亚型及 HBsAg 突变株标本的检测 对 22 份标本 6 个浓度梯度共计 132 份标本的

结果显示 ,WT CLEIA 检出 117 份阳性结果 (88. 6% ,117/132) 检出率明显高于 2 种参比试剂 (Murex 49. 2% 65/132; Biomerieux 67. 4% 89/132) ($P < 0. 01$); 而 2 种参比试剂中 ,Biomerieux 的检出率则明显高于 Murex ($P < 0. 05$) 。对 15 例 HBsAg 突变株的检测 ,WT CLEIA 的检出率为 91. 1% (82/ 90) ,也明显高于 Biomerieux 的 64. 4% (58/90) 与 Murex 的 45. 1% (41/90) ($P < 0. 01$) ,而 Biomerieux 的检出率也显著高于 Murex ($P < 0. 05$) 。对 7 例野生型标本的检测 ,WT CLEIA 的检出率为 83. 3% (35/42) 与 Biomerieux 的检出率 73. 8% (31/42) 无明显差别 ($P > 0. 05$) ,但高于 Murex 的 57. 1% (24/ 42) ($P < 0. 01$) (表 3)。

表 2 3 种试剂对 WHO 标准品系列浓度梯度的检测

HBsAg(IU/mL)	Biomerieux a	Murex V3b	WT CLEIA
0. 2	4. 0	2. 0	21. 4
0. 1	2. 2	1. 3	8. 9
0. 05	1. 2	0. 9	4. 5
0. 025	0. 8	0. 7	2. 0
0. 012	0. 5	0. 6	1. 1
0. 006	0. 4	0. 5	0. 3

注: 表中显示的数据是 S/C. O 值 ,a ,Hepanostika HBsAg Ultra (生物梅里埃 ,法国) ; b ,Abbott Murex V3(雅培 ,英国)

表 3 3 种试剂对不同 HBV 亚型及 HBsAg 突变株标本的检测

序号	血清盘相关参数				HBsAg 检测			
	标本 ID	基因型	血清型	突变类型	起始浓度(IU/mL)	WT CLEIAa	Murex V3d	Biomerieuxc
1	166#	C1	adrq +	Wild	105	5	3	4
2	XJT9	D4	ayw	Wild	1 000	6	4	5
3	171#	Ba	adw2	Wild	5 000	4	2	3
4	YA580	C1	ayr	Wild	4 000	4	3	4
5	202. 203	C2	adrq -	Wild	2 000	6	4	5
6	XA2052	B4	ayw2	Wild	600	4	3	4
7	XA1117	B4	ayw2	Wild	2 000	6	5	6
8	X119	C1	adrq +	G145R	10	4	3	2
9	YA1006	C1	adrq +	C137G	5 000	6	3	4
10	BIX36	D1	ayw1	A159G	200	4	3	4
11	XJG12	Ba	adw2	P127T400	5	2	4	
12	YA356	C1	adrq +	G145A	2 000	6	5	5
13	YA499	Ba	adw2	P127T/T131N/M133S	500	6	4	5
14	TA6082	B3	ayw2	G122R	600	6	4	5
15	XA6031	B3	adw1	F134I	50	6	2	3
16	JM6082	B3	adw3	P127T/M133T	1 000	6	3	5
17	JM4138	C1	ayrq +	P120T/D144A	30	3	0	1
18	SM5082	B4	adw2	M133I/E164A	100	6	2	4
19	HC1002	B3	adw3	P127T/M133T	300	6	1	3
20	JM3090	Ae	adw2	S144A/T131N	2 000	6	3	5
21	TA2043	B4	adw2	G130D/C138Y/F158S	2 000	6	2	4
22	SM4011	C2	adrq +	G112E/T131N/M133S/G145R	300	6	4	4
合计						117	65	89

2.4 对无偿献血者标本的检测 WT CLEIA 共检出 31 例阳性 ,参比试剂 Murex V3 检出 35 例 ,其中 23 例为 2 种试剂同时检测阳性 ,阳性符合率 = 23 / 35 = 71. 4% ,阴性符合率 = 4 954/4 962 × 100% = 99. 84% ,总符合率 = (23 + 4 954) / 4 997 × 100% =

99. 60% ;经计算 KaPPa 值 = 0. 69 ,表明 2 种试剂的检测具有高度的一致性。2 种试剂总共有 20 例检测结果不一致 ,经电化学发光法检测确认 8 例 WT CLEIA 阳性/Murex V3 阴性的标本中有 1 例为真阳性结果; 12 例 WT CLEIA 阴性/ Murex V3 阳性的标

本中也有 1 例为真阳性(表 4)。

表 4 WT CLEIA 与 Murex V3 对献血者标本的检测 (n=4 997)

WT CLEIA		Murex V3		合计
		阳性	阴性	
	阳性	23	8	31
	阴性	12	4 954	4 966
合计		35	4 962	4 997

3 讨论

目前我国对无偿献血者的 HBsAg 筛查和临床患者血清 HBsAg 检测依然采用 ELISA 法进行筛查。虽然近年来 ELISA 方法的检测灵敏度不断得到提升,但仍存在较大比例的 HBV 感染漏检,尤其是国产 HBsAg ELISA 试剂盒漏检情况更为普遍^[7]。此外,由于抗病毒药物和疫苗带来的选择压力,使得 HBsAg 突变现象越来越常见,也给血清 HBsAg 检测带来很多困扰。化学发光分析法作为一种灵敏度高、线性范围宽的检测方法,目前已被广泛应用于医药、生物、食品、环境和微生物等领域的检验分析^[8-9]。厦门大学基于化学发光的方法,最新自主研发了 1 种新型 HBsAg 超敏检测试剂 WT CLEIA,本文中对该试剂检测的特异性、灵敏度以及对各种阳性血清和献血者标本检测情况进行了详细评估。

从结果来看,WT CLEIA 对 3 059 份 HBV 阴性标本的检测只出现 6 例假阳性结果,展示了较为良好的特异性(99.81%);而同 2 种市场上常用的进口 HBsAg ELISA 试剂相比,WT CLEIA 具有更高的检测灵敏度,对 WHO 标准品的检测下限可达 0.012 IU/mL,明显强于 HePanostika HBsAg Ultra 的 0.05 IU/mL 和 Abbott Murex V3 的 0.1 IU/mL。极高的检测灵敏度,使得 WT CLEIA 在对低浓度 HBsAg 阳性标本的检测上会有更高的检出率。

隐匿性 HBV 感染(OBI)是指 HBsAg 检测阴性、HBV DNA 阳性的 1 种 HBV 感染现象,近年来越来越受到人们的关注^[10-11]。形成 OBI 的可能原因很多,比如 HBsAg 检测试剂灵敏度偏低等。除此之外,还有 1 个常见的可能原因是 HBsAg 突变,尤其是主要亲水区的“a”表位突变,导致一般的 HBsAg 检测试剂无法检出^[12,13]。许多国外的主流 HBsAg 检测试剂(包括 Heganostika Ultra、Murex V3 等)通过应用多种 HBsAg 突变株特异性的单克隆抗体联合 HBsAg 特异性的多克隆抗体,使其对 HBsAg 突变株也有很高的检出率^[14]。而本研究中所评估的 WT CLEIA 试剂,在研发过程中也充分考虑了这种思路。从实际检测效果来看,对 15 例不同类型不同浓度梯度的 HBsAg 突变株的检测,WT CLEIA 的检出率为 91.1% (82/90),明显高于 Heganostika Ultra 的

64.4% (58/90) 与 Murex V3 的 45.1% (41/90) (P < 0.01); 其中有 11 株突变株的所有 6 个浓度梯度 WT CLEIA 均能检出,而 Biomerieux 只有 1 株, Murex V3 则没有 1 株所有浓度梯度均能检出。可见,对于 HBsAg 突变株的检测,WT CLEIA 试剂比 2 种参比试剂具有更强的检出能力。而对不同血清型和基因型的野生型 HBV 阳性标本的检测上,WT CLEIA 试剂也不逊于其他 2 种参比试剂。在对无偿献血者 HBsAg 筛查的应用中,WT CLEIA 试剂与参比试剂 Murex V3 具有高度的符合率(99.60%)。2 者各出现几例检测假阳性结果(WT CLEIA 7 例, Murex V3 11 例)和各 1 例漏检,检测性能较为接近。

综上,WT CLEIA 试剂作为 1 种国产新型 HBsAg 检测试剂,具有较高的特异性和极高的灵敏度,尤其对于 HBsAg 突变株的检测,优于 2 种主流的进口 HBsAg ELISA 试剂,在未来的血液筛查和临床应用中,有着较为广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Margolis HS. Hepatitis B virus infection. Bull World Health Organ 1998, 76 (suppl 2): 152-153.
- [2] Kane M. Global programmeme for control of hepatitis B infection. Vaccine 1995, 13 (suppl 1): 47-49.
- [3] 中华人民共和国卫生部公报. 全国法定报告传染病疫情. 2007-1-12.
- [4] Weber B, Van der Taelen-Brulé N, Berger A, et al. Evaluation of a new automated assay for hePatitis B surface antigen (HBsAg) detection VIDAS HBsAg Ultra. J Virol Methods 2006, 135(1): 109-117.
- [5] Comanor L, Holland P. Hepatitis B virus blood screening: unfinished agendas. Vox Sang 2006, 91(1): 1-12.
- [6] 师玲玲, 刘赴平, 王德文, 等. 核酸检测技术在献血者血液筛查中的初步应用. 中国输血杂志 2010, 23(1): 11-13.
- [7] 欧山海, 林永财, 倪宏英, 等. 核酸检测后血液检测模式的探讨. 中国输血杂志 2012, 25(3): 244-246.
- [8] Kricka LJ. Application of bioluminescence and chemiluminescence in biomedical sciences. Methods Enzymol 2000, 305(3): 333-345.
- [9] 杨晓林. 生物发光及化学发光在生物医学领域中应用的进展. 生物物理学报 2000, 16(1): 10-18.
- [10] 黎蕾. 献血者中的隐匿性 HBV 感染. 中国输血杂志, 2010, 23(10): 905-906.
- [11] 欧山海, 林永财, 倪宏英, 等. 闽南地区无偿献血者隐匿性乙型肝炎病毒感染研究. 中国输血杂志 2010, 23(12): 1033-1037.
- [12] 陈长荣, 袁权, 葛胜祥, 等. 无偿献血者中隐匿性乙型肝炎病毒感染及表面抗原突变分析. 病毒学报 2009, 25(3): 178-184.
- [13] Yuan Q, Ou SH, Chen CR, et al. Molecular characteristics of occult hepatitis B virus from blood donors in southeast China. J Clin Microbiol 2010, 48(2): 357-362.
- [14] Louisirirothanakul S, Kanoksinsombat C, O'Charoen R, et al. HBsAg diagnostic kits in the detection of hePatitis B virus mutation within "a" determinant. Viral Immunol. 2006, 19(1): 108-114.

(2012-12-13 收稿, 2013-05-06 修回)

本文编辑: 尚云 刘晓明