

HBV 血清标志物 e 抗原假阴性的原因分析及对策

吴淑梅, 林云, 王辉, 唐平, 秦琴, 沈茜*

(第二军医大学长海医院实验诊断科, 上海 200433)

[摘要] **目的:**分析 ELISA 法检测乙型肝炎病毒(HBV)标志物 e 抗原(HBeAg)出现假阴性的原因并探讨应对措施,防止 HBeAg 阳性漏检。**方法:**凡用 ELISA 法检测的 HBV 标志物 5 项指标结果为表面抗原(HBsAg)和核心抗体(抗-HBc)阳性(俗称 1、5 阳性)而 HBeAg 为阴性的,应用 4 家试剂 2 种方法联合复检 HBeAg 确认结果。具体措施:(1)对每天用 A 试剂检测的 HBV 标志物 5 项指标测得结果仅 1、5 阳性的样品,用 A、B、C 试剂(ELISA 法)联合复检 HBeAg。(2)无论 A、B、C 哪种试剂,只要 HBeAg 复检结果为阳性、弱阳性或样品测定 D 值在灰区范围的,必须用 D 试剂(化学发光法)进一步复检确认阳性,以 D 试剂复检结果为最终确认结果。**结果:**274 份样品用 A、B、C 试剂复检 HBeAg(室内质控值在控),A 试剂结果仍然全部阴性,阳性漏检率为 2.18%,B 试剂结果 5 例阳性,阳性漏检率为 0.36%,C 试剂结果 6 例阳性(5 例阳性与 B 试剂复检样品号码相同,1 例 A、B 试剂复检为阴性 C 试剂复检为阳性),无阳性漏检。复检 6 例 HBeAg 阳性的样品用 D 试剂复检确认仍为阳性,无阳性漏检。**结论:**ELISA 法 A、B 试剂存在比例不等的 HBeAg 假阴性。在日常工作中,对 ELISA 法测定的 HBV 标志物 5 项指标仅 1、5 阳性的样品结果,严格多家试剂联合复检 HBeAg 是非常必要的。

[关键词] 肝炎病毒,乙型;HBeAg;假阴性反应;酶联免疫吸附测定;化学发光测定法

[中图分类号] R 512.62

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2006)07-0768-03

Cause of HBeAg false-negative reaction and its countermeasures

WU Shu-mei, LIN Yun, WANG Hui, TANG Ping, QIN Qin, SHEN Qian* (Department of Laboratory Diagnosis, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To analyze the cause of HBeAg (one of HBV markers) false-negative reaction during ELISA examination and to discuss its countermeasures. **Methods:** The patients who were HBsAg (+), HBcAb (+) and HBeAg (-) by ELISA examination were further detected with the reagents of 4 different manufacturers in 2 steps: (1) The serum samples positive of HBsAg and HBcAb by ELISA using reagent A were further detected by qualitative analysis and Double-antibody sandwich ELISA using reagent A, B and C. (2) Reagent D (chemiluminescence method) was used to confirm the diagnosis if the results were positive or weakly positive of HBeAg, or the D values were within a specific range by ELISA using reagent A, B or C. The result of reagent D was taken as the final result. **Results:** The 274 sera negative of HBeAg were still negative when using reagent A, with the false-negative rate being 2.18%; 5 sera were positive when using reagent B, with false-negative rate being 0.36%; and 6 sera (including the 5 positive ones using reagent B and 1 negative case using reagent A and B) were positive when using reagent C, without false-negative case. All the 6 positive samples were confirmed by chemiluminescence using reagent D. **Conclusion:** It is suggested that ELISA examination using reagent A or B can lead to false-negative results of HBeAg. HBsAg (+), HBcAb (+) and HBeAg (-) sera in ELISA examination should be examined with combinations of reagents of different manufacturers.

[KEY WORDS] hepatitis B virus; HBeAg; false-negative reactions; enzyme-linked immunosorbent assay; chemiluminescent

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(7): 768-770]

控制酶联免疫吸附实验(ELISA)HBeAg 假阴性,从而保证 HBeAg 检测结果准确的方法无可借鉴,也鲜见报道。近来在日常临床检验样品中,我们发现 HBV 标志物 5 项(HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、抗-HBc)指标中检测结果仅 1、5 项指标阳性的较多,从而引起了我们的警惕,并着手实施多家试剂联合复检 HBeAg。从陆续复检的结果看,A、B 试剂有不同程度的 HBeAg 假阴性,尤其是日常使用的 A 试剂阳性漏检率高达 2.18%。由此看来,个

别国产 ELISA 酶免试剂存在一定数量的 HBeAg 假阴性。如果不经多家试剂复检即报告检测结果,将导致原本是大三阳(HBsAg⁺、HBeAg⁺、抗-HBc⁺)结果模式的样品,成为 1、5 阳性(HBsAg⁺、HBeAg⁻、抗-HBc⁺)模式。由于 HBeAg 是表达 HBV 复制的关键性标志物,在观察 HBV 感染和病

[作者简介] 吴淑梅,主管技师。

* Corresponding author. E-mail: msminli@hotmail.com

情进展及治疗疗效中具有极其重要的参考价值。因此,准确的检测结果对于治疗方案的制定非常重要。多家试剂联合复检对防止 HBeAg 假阴性是一个很好的方法。

1 材料和方法

1.1 样品来源 274 份 1、5 阳性复检血清样品,是陆续从我院门诊和住院患者常规样品用 A 试剂检测中得到的。血液凝固后 $2\ 000\ \text{r}/\text{min} \times 20\ \text{min}$ 充分离心,分离血清。

1.2 HBeAg 复检方法和试剂 A、B、C、D 试剂检测原理均为双抗体夹心。A、B、C 试剂为 ELISA 法,试剂盒购自国内 3 家著名公司(具备国家药品食品管理局生产许可证)。由 Multiskan MK3 酶标仪判读结果。D 试剂为化学发光法,采用美国雅培公司配套试剂,由 ARCHITECT i2000SR 测定。所有操作步骤和实验要求完全按 A、B、C、D 试剂实验要求进行。

1.3 灰区范围复检限定及结果判定 ELISA 法 A、B、C 三家试剂的实验方法和临界值(cutoff 值)的计算相同,cutoff 计算均是 2.1×0.05 ,为 0.105。灰区范围限定以: $\text{cutoff 值} \times 0.7 \leq \text{样品测定值} \leq \text{cutoff 值} \times 2$ 。凡是 HBeAg 测定 D 值落在此范围区域的或测定样品结果为 1、5 阳性的严格 A、B、C、D 试剂复检 HBeAg。结果判断:ELISA 法测定样品 D 值 $\geq \text{cutoff 值}$ 为阳性,反之为阴性;化学发光法参考值: $S/\text{CO} < 1$ 为阴性(S 为样品测定 D 值,CO 为 cutoff 值),反之为阳性。

1.4 统计学处理 阳性漏检率误差统计用 Excel 软件。

2 结果

2.1 不同试剂 HBeAg 复检样品结果 四种不同厂家试剂、两种方法 HBeAg 复检样品结果见表 1。ELISA A、B、C 试剂复检,5 例样品的 D 值 $> \text{cutoff}$ 0.105;1 例 D 值在灰区,化学发光 6 例阳性。

表 1 A、B、C、D 试剂 HBeAg 复检样品结果

Tab 1 Positive HBeAg of serum samples detected with reagent A, B, C and D

Reagents	Methods	N	Positive (n)	Serial number of positive sample	False-negative rate(%)
A	ELISA	274	0	-	2.18
B	ELISA	274	5	1,8,14,27,252	0.36
C	ELISA	274	6	1,8,14,27,187,252	0
D	Chemiluminescence	6	6	1,8,14,27,187,252	0

2.2 HBeAg 复检 D 值与结果的关系 ELISA 和化学发光 6 例 HBeAg 复检 D 值与结果的关系,见表 2。A 试剂 6 例阳性漏检,B 试剂 1 例阳性漏检,

C、D 试剂无阳性漏检。ELISA 和化学发光 D 值相差较大。

表 2 ELISA 法和化学发光法 6 例 HBeAg 复检 D 值与结果的关系

Tab 2 Positive reaction and D values obtained by ELISA and chemiluminescence in 6 samples

Reagents	1	8	14	27	187	252	Cutoff value	Negative	Positive
A	0.03	0.01	0.03	0.01	0.06	0.02	0.105	6	0
B	0.33	0.13	0.15	0.09	0.28	0.37	0.105	1	5
C	0.24	0.18	0.20	0.12	0.40	0.32	0.105	0	6
D	2.00	6.30	28.40	29.70	13.52	172.90	$S/\text{CO} < 1$	0	6

3 讨论

HBeAg 与 HBcAg 约有 75% 共同的氨基酸序列^[1],血清中检出 HBeAg 和肝细胞内检出 HBcAg,同样表示病毒复制。由于肝细胞内检测 HBcAg 存在取样困难不便临床普检等因素,所以,在血清中检测

HBeAg 是临床上表达病毒复制较实用的标志物。

急性 HBV 感染 HBeAg 仅存在于感染的早期,持续存在者预示趋向慢性;在慢性 HBV 相关肝病 HBeAg 阳性病例大多病变活动,病毒复制,传染性强。在 HBV 感染过程中,HBeAg 随着 HBV 复制增加,病毒复制激发免疫应答,造成肝细胞破坏,而

后 HBV 被清除,HBV-DNA 和 HBeAg 水平降低或转阴。所以,血清 HBeAg 标志物检测可较准确的观察 HBV 复制的程度和疾病的状态。

在 HBV 感染患者中,1、5 阳性模式所占的比例并不多,属于亚常见模式。主要原因为:(1) 在 HBV 急性感染期治疗过后,HBeAg 阴转而抗-HBe 尚未阳转时,可以有短时间的 1、5 阳性期。(2) 血清中 HBeAg 过剩产生钩状效应而使 HBeAg 表现假阴性结果。(3) 由于 HBeAg 前 C 区变异,不能编码合成 HBeAg,致使 HBeAg 长期处于不表达状态。(4) 有些 HBV 感染 HBeAg 消失后,B 淋巴细胞不表达抗-HBe,至使血清检测长期处于 1、5 阳性模式。但是,除了以上的 4 种原因之外,还要特别注意试剂的质量问题造成的 HBeAg 假阴性。

我们所复检的 274 例 1、5 阳性样品,是陆续从 5 千多例 HBV 血清标志物检测样品中累计得到的,复检发现 6 例 HBeAg 阳性漏检。当然,造成 HBeAg 阳性漏检的原因很多,要查找原因,我们认为主要从以下几个方面:(1) 首先要排除操作方面的原因,我们的每批次检测样品,室内质控值均在控。因此,可以排除操作不当问题。(2) 试剂的质量问题。由于不同的厂家生产的 ELISA HBeAg 定性试剂种类繁多,良莠不齐,选用高质量的试剂显得极为重要。具有国家(包括进口)的生产许可证是首要条件,还应在试剂说明中附有评价材料。与其他免疫测定试剂相仿,HBV 固相酶免测定试剂的质量要求包括特异性、敏感性、检测范围(钩状效应)、稳定性和精密度等,应在说明书中列出,否则使用者很难对此进行评价。我们复检发现的 6 例 HBeAg 阳性漏检样品,可以肯定是试剂的质量问题所致。(3) 要排除 HBeAg 过剩的钩状效应问题。从我们复检时所做的稀释实验来看,钩状效应现象可以排除。此外,要考虑的是 HBeAg 前 C 区变异,或 HBeAg

蛋白决定簇的结构改变^[2]。由于 HBV 的感染血清学筛查试剂都是基于抗原和抗体的机制,突变株造成的抗原变异会影响抗原和抗体的结合,并最终影响到试剂的性能。使用单克隆抗体进行捕获的检测试剂特别容易受到突变株的影响。从我们复检的情况来看,并非此问题。因此,日常工作中对于 1、5 阳性的样品,不管基于以上那一种原因,最好都要进行 HBeAg 多家试剂联合复检,以避免 HBeAg 阳性漏检。

此实验还表明,ELISA 定性复检获得的 6 例阳性的样品测定 D 值均较弱,与化学发光测定 A 值比较相差较多,ELISA 敏感性普遍低于化学发光。

要很好的控制 HBeAg 检测质量,我们认为:(1) 工作中要有较强的责任心,严格按试剂的要求完成操作^[3]。(2) 首选高质量 ELISA 试剂,对本批次 HBeAg 检测质控值在控而 HBV 血清标志物五项指标检测结果为 1、5 阳性的或样品测定 HBeAg D 值在灰区范围或接近灰区下限的,严格采用多家试剂多种方法联合复检 HBeAg,以保证检测结果的准确。由于化学发光检测 HBeAg 的明感性要高于 ELISA,因此复检的 274 例标本中可能还存在 HBeAg 的阳性漏检。我们衷心希望国产 ELISA 试剂盒能在保证特异性的前提下,进一步提高敏感性,以满足临床检测质量的需求。

[参考文献]

- [1] 沈霞,李稻. 临床免疫学与免疫学检验新技术[M]. 北京:人民军医出版社,2002:71.
 - [2] Peng Y. 乙型肝炎病毒编码 HBsAg 区基因突变对免疫检测的影响[J]. 中华检验医学杂志,2005,28:687-690.
 - [3] 吴淑梅,沈茜,郭品娥,等. 乙型肝炎病毒标志物检验的质量控制[J]. 解放军医院管理杂志,2003,10:42-43.
- [收稿日期] 2006-03-10 [修回日期] 2006-06-26
[本文编辑] 曹静