

· 短篇论著 ·

化学发光法与 ELISA 法对 HBsAg 和 HBsAb 同时阳性标本检测比较

陈依平 魏寿忠 林桂花 周小婷 彭献香

【摘要】 目的 比较化学发光法(CLIA)和酶联免疫吸附试验(ELISA)在检测 HBsAg 和 HBsAb 同时阳性标本的结果,评价其是否具有的一致性。**方法** 用4种不同浓度 HBsAg 标准品和4种不同浓度 HBsAb 标准品两两配合成16份样本,用 CLIA、ELISA 法分别检测,并于24 h后再次检测;同时用4种不同浓度 HBsAg 血清标本和4种不同浓度 HBsAb 血清标本两两配合成16份样本进行同样检测。**结果** 两种方法 HBsAg 检测结果均随着 HBsAb 浓度的增加而呈下降之势,对于1.5 ng/ml HBsAg,当加入 HBsAb 浓度达到400 mIU/ml时,CLIA 法检测出现阴性结果;低浓度 HBsAb 受到 HBsAg 的影响随 HBsAg 的升高而加大,但随着 HBsAb 浓度的升高,受到 HBsAg 的影响呈现下降趋势,随着 HBsAb 浓度的升高,受到 HBsAg 的影响呈现下降趋势,当浓度为400 mIU/ml时,CLIA 法检测基本不受影响,而 ELISA 法仍然受到150 ng/ml HBsAg 影响。24 h后 HBsAg 和 HBsAb 相互间影响更大,出现更多阴性结果。4种不同浓度 HBsAg、HBsAb 血清标本配成16份样本检测显示类似结果。CLIA 法和 ELISA 法对 HBsAg、HBsAb 同时阳性标本检测的一致性微弱,标本放置24 h后两法一致性加强。**结论** 对于 HBsAg 和 HBsAb 同时阳性的标本,最好在当天能用另一种方法进行检验、印证,如果在24 h以后进行复查,弱阳性一方可能检测出阴性结果,所以最好重新抽取血液检验。

【关键词】 肝炎病毒,乙型; 化学发光测定法; 酶联免疫吸附测定; Kappa 检验

随着化学发光法(CLIA)检测乙型肝炎两对半的广泛应用,越来越多的乙型肝炎两对半少见模式得以呈现。HBsAg 和 HBsAb 同时阳性的模式也由少见转变成“常见模式”。对于此类标本,大多数医院采用重复检测后再发报告,我们采用两种方法互相核对。在工作中,我们发现 CLIA 法 HBsAg 和 HBsAb 同时阳性的标本,在用酶联免疫吸附试验(ELISA)法复检时结果不尽相同,为进一步了解此种情况的原因,我们用4种不同浓度的 HBsAg 标准品和4种不同浓度的 HBsAb 标准品进行两两配合,配成同时含有 HBsAg 和 HBsAb 的16种标本,同时采用 CLIA 和 ELISA 法进行检测比较,结果报道如下。

一、材料与与方法

1. 标本来源:北京科美东雅生物技术有限公司的4种 HBsAg 标准品(1.5 ng/ml、6 ng/ml、30 ng/ml、150 ng/ml)和4种 HBsAb 标准品(20 mIU/ml、60 mIU/ml、200 mIU/ml、400 mIU/ml),进行两两等量(各取500 μ l)配合,混匀,配成同时含有 HBsAg 和 HBsAb 的16份标本;同时选取4种不同浓度 HBsAg (21.36 ng/ml、155.39 ng/ml、236.37 ng/ml、572.49 ng/ml)血清标本和4种不同浓度 HBsAb (42.69 mIU/ml、80.63 mIU/ml、214.71 mIU/ml、320.45 mIU/ml)血清标本两两等量(各取500 μ l)配合成16份血清样本。

2. 试剂仪器:化学发光试剂盒购自北京科美东雅生物技术有限公司,仪器为 CHENCLIN600 化学发光免疫分析仪;ELISA 试剂盒购自英科新创(厦门)科技有限公司,采用 DEM-3 洗板机, Multiskan MK3 酶标仪。

3. 方法:将16份标本各分成2份,一份用 CLIA 法,另一份

用 ELISA 法检测,检测后将标本4 $^{\circ}$ C 密封保存24 h再检测1次。同时对4种 HBsAg 标准品(1.5 ng/ml、6 ng/ml、30 ng/ml、150 ng/ml)和4种 HBsAb 标准品(20 mIU/ml、60 mIU/ml、200 mIU/ml、400 mIU/ml)进行检测。均做双孔检测,计算均值。16份配合的血清样本进行同样检测。CLIA 检测结果采用测定值表示,ELISA 结果采用 s/co 值表示。在进行一致性分析时,以 HBsAg > 0.5 ng/ml, HBsAb > 10 mIU/ml, s/co > 1.0 为判定阳性标准。

4. 统计学方法:利用 SPSS 13.0 统计软件,采用 Kappa 检验来判断不同检测方法结果是否具有的一致性,并进行 U 检验来排除抽样误差的影响。而一致性强弱程度按照 Landis 和 Koch 以 Kappa 系数大小划分6个区段的方法来判断;Kappa 系数 < 0, 极差;0 ~ 0.20, 微弱;0.21 ~ 0.40, 弱;0.41 ~ 0.60, 中度;0.61 ~ 0.80, 高度;0.81 ~ 1.00, 极强^[1]。

二、结果

CLIA 和 ELISA 法对4种 HBsAg 标准品和4种 HBsAb 标准品的检测结果见表1。

CLIA 法与 ELISA 法对 HBsAg 和 HBsAb 同时阳性标本检测结果见表2,可以看出,对于1.5 ng/ml HBsAg 而言,随着 HBsAb 浓度的增加,两种方法的检测结果均呈下降趋势,当加入 HBsAb 浓度达到400 mIU/ml时,CLIA 法检测出现阴性结果,而 ELISA 也仅稍高于临界值。标本放置24 h后,CLIA 法的 HBsAg 测定值较原先均出现明显下降,有6个样本出现阴性(< 0.5 ng/ml)结果。ELISA 法则显示与20 mIU/ml、60 mIU/ml HBsAb 配合的8个样本,HBsAg 测定值较原先未见明显改变,而与 HBsAb 为200 mIU/ml配合的且 HBsAg 低于30 ng/ml的3个样本,及与 HBsAb 为400 mIU/ml配合的4个样本 HBsAg 测定值出现明显下降。标本放置24 h后,HBsAg 用 CLIA 法检测出现6个阴性结果,用 ELISA 法出现2个阴性结果。

DOI:10.3877/cma.j.issn.0785.2012.19.128

作者单位:352100 福建宁德,福建医科大学教学医院 福建省宁德市医院输血科

通讯作者:魏寿忠,Email:weishouzhong2006@126.com

表1 CLIA法和ELISA法对4种HBsAg、HBsAb标准品的检测结果

方法	HBsAg				HBsAb			
	1.5 ng/ml	6 ng/ml	30 ng/ml	150 ng/ml	20 mIU/ml	60 mIU/ml	200 mIU/ml	400 mIU/ml
CLIA	1.48	5.79	29.50	149.60	19.60	61.20	204.90	404.60
ELISA(s/co)	3.72	10.80	26.40	27.90	2.88	6.55	20.40	27.40

表2 CLIA法与ELISA法对HBsAg和HBsAb同时阳性标本检测比较

标本号	实际含量 HBsAg(ng/ml) + HBsAb(mIU/ml)	CLIA		ELISA		CLIA(24 h 后)		ELISA(24 h 后)	
		HBsAg(ng/ml)	HBsAb(mIU/ml)	HBsAg(s/co)	HBsAb(s/co)	HBsAg(ng/ml)	HBsAb(mIU/ml)	HBsAg(s/co)	HBsAb(s/co)
1	1.5 + 20	0.61	7.20	2.18	1.44	0.43	6.91	2.00	0.87
2	1.5 + 60	0.59	21.12	1.34	3.72	0.36	23.73	1.37	3.40
3	1.5 + 200	0.53	104.95	1.30	12.17	0.11	100.95	0.71	5.80
4	1.5 + 400	0.06	188.21	1.06	18.9	0.02	159.31	0.46	18.89
5	6.0 + 20	2.43	8.18	5.82	1.39	1.09	7.97	5.09	0.70
6	6.0 + 60	1.40	20.12	4.04	3.10	0.82	23.65	3.95	2.50
7	6.0 + 200	1.43	107.40	3.90	11.54	0.56	89.98	1.50	9.36
8	6.0 + 400	0.72	185.30	2.88	20.43	0.05	162.46	1.10	17.94
9	30.0 + 20	12.68	4.52	16.26	1.12	7.31	8.93	21.11	0.59
10	30.0 + 60	7.32	21.72	13.92	3.70	2.06	18.89	15.72	1.65
11	30.0 + 200	8.25	54.41	16.20	9.98	2.01	88.98	7.15	7.33
12	30.0 + 400	3.84	184.53	8.31	19.06	0.40	160.75	3.66	12.81
13	150.0 + 20	77.81	1.82	23.67	0.76	62.16	3.61	23.67	0.12
14	150.0 + 60	50.50	20.51	24.33	2.41	30.25	21.99	23.12	0.45
15	150.0 + 200	55.28	39.12	22.11	6.65	22.37	66.98	23.12	3.08
16	150.0 + 400	28.62	183.4	22.34	16.64	6.65	158.16	17.84	12.35

表3 CLIA法与ELISA法对HBsAg和HBsAb同时阳性血清标本检测比较

标本号	实际含量 HBsAg(ng/ml) + HBsAb(mIU/ml)	CLIA		ELISA		CLIA(24 h 后)		ELISA(24 h 后)	
		HBsAg(ng/ml)	HBsAb(mIU/ml)	HBsAg(s/co)	HBsAb(s/co)	HBsAg(ng/ml)	HBsAb(mIU/ml)	HBsAg(s/co)	HBsAb(s/co)
1	21.36 + 42.69	5.62	11.25	14.72	2.76	4.25	4.79	9.58	1.61
2	21.36 + 80.63	2.26	28.88	9.53	10.64	1.61	21.85	3.44	7.93
3	21.36 + 214.71	2.09	91.14	8.56	19.77	0.69	71.38	2.72	18.19
4	21.36 + 320.45	0.72	166.60	4.78	25.49	0.01	164.30	0.61	25.19
5	155.39 + 42.69	63.27	5.62	23.69	1.63	48.31	2.32	22.21	0.85
6	155.39 + 80.63	49.74	17.77	22.63	5.83	40.21	7.74	22.47	2.31
7	155.39 + 214.71	43.79	68.93	22.62	16.99	31.81	37.48	20.13	14.62
8	155.39 + 320.45	42.54	97.03	22.65	22.88	4.88	71.37	11.46	18.06
9	236.37 + 42.69	123.43	2.91	24.18	1.44	117.69	0.68	24.94	0.39
10	236.37 + 80.63	116.31	19.86	24.63	7.13	89.92	4.48	24.25	1.58
11	236.37 + 214.71	95.18	33.12	24.86	13.19	53.21	13.12	23.22	4.86
12	236.37 + 320.45	75.62	80.18	23.74	18.57	13.98	63.42	18.25	15.44
13	572.49 + 42.69	289.51	0.45	26.94	0.24	275.12	0.01	26.88	0.12
14	572.49 + 80.63	280.41	0.75	26.91	0.43	262.26	0.27	26.78	0.14
15	572.49 + 214.71	272.95	2.57	26.81	1.36	251.87	1.08	26.19	0.54
16	572.49 + 320.45	252.73	3.32	26.02	1.58	225.13	2.32	26.16	0.84

对于 HBsAb,浓度为 20 mIU/ml 时,两种方法均显示出受到 HBsAg 的影响随 HBsAg 的升高而加大。随着 HBsAb 浓度的升高,受到 HBsAg 的影响呈现下降趋势,当浓度为 400 mIU/ml 时,CLIA 法检测基本不受影响,而 ELISA 法仍然受到 150 ng/ml HBsAg 的影响。标本放置 24 h 后,用 CLIA 法检测,除 400 mIU/ml HBsAb 的 4 个样本测定值下降外,其他未见明显变化。而 ELISA 法检测,除 400 mIU/ml HBsAb 与 1.5 ng/ml HBsAg 相配的样本外,其他结果均出现明显下降。

16 份配合成的血清样本检测结果见表 3,可以看出结果与表 2 具有相似的趋势。

以 HBsAg > 0.5 ng/ml, HBsAb > 10 mIU/ml, s/co > 1.0 判定为阳性,对 32 份样本的两种检验结果进行比较见表 4,可以看出两种方法在检测 HBsAg、HBsAb 同时阳性标本的结果一致性程度均较弱,放置 24 h 后的 HBsAg、HBsAb 检测结果的一致性分别为中度和高度。

表 4 CLIA 法与 ELISA 法对 HBsAg 和 HBsAb 同时阳性标本检测比较(份)

项目	CLIA	ELISA		Kappa	U 值	一致性程度
		阳性	阴性			
HBsAg	阳性	31	0	0	0	微弱
	阴性	1	0			
HBsAb	阳性	22	0	0.371	1.764	弱
	阴性	7	3			
HBsAg(24 h 后)	阳性	25	0	0.540	2.506	中度
	阴性	4	3			
HBsAb(24 h 后)	阳性	18	1	0.734	5.913	高度
	阴性	3	10			

三、讨论

目前检测乙型肝炎血清标记物有多种方法,既有定性的金标法和 ELISA,又有定量的 TRFIA、CLIA、ECLIA 等。而这些方法学由于采用单位及溯源性不同,结果差异极大,给临床医师和患者正确解读检验报告并将检验结果用于诊疗带来困难。ELISA 是较早应用于乙型肝炎血清标记物检测的技术之一,因其操作

方便、价格低廉,是目前筛检、诊断乙型肝炎的常规方法,而 CLIA 法由于能定量检测且能自动化,是目前敏感性和特异性最好的方法^[2]。由于 CLIA 法的逐渐广泛使用,一些少见或罕见的模式所占比例有一定程度的增加。HBsAg 和 HBsAb 同时阳性的报道已经很多^[3],其原因可能有以下几个方面:(1)抗原-抗体的动态平衡;(2)不同亚型间的转换;(3)不同亚型间的重叠感染;(4)HBV2 感染;(5)S 基因突变株可逃避未变异株所诱生的 HBsAb 的中和作用,导致体内同时存在 HBsAg、HBsAb,或是某个碱基的改变引起亚型改变,进而导致 HBsAg、HBsAb 的共存,此时 HBsAb 的出现并不是传统意义上的治疗好转^[4]; (6)感染恢复期即 HBsAb 出现早期,HBsAg 含量逐渐下降而 HBsAb 含量逐渐升高;(7)检测灵敏度的提高^[5]。对于 HBsAg 和 HBsAb 同时阳性是否正确,还是由于实验室操作的原因,必须进行确认。

本研究显示,CLIA 和 ELISA 检测 HBsAg、HBsAb 同时阳性标本的结果检测的一致性微弱,标本放置 24 h 后两法一致性得到加强,但此时对于 HBsAb 弱阳性标本可能检测出阴性结果。对于 HBsAg 为弱阳性,而 HBsAb 为强阳性的标本,在放置后重做有可能导致 HBsAg 阴性的结果,以 CLIA 更为明显。同样,对 HBsAb 为弱阳性,而 HBsAg 为强阳性的标本,在放置后重做有可能导致 HBsAb 阴性的结果,以 ELISA 法更为明显。出现此情况可能的原因是标本在放置过程中由于 HBsAg、HBsAb 间的相互作用,免疫球蛋白的沉降而导致。所以,临床上对于 HBsAg 和 HBsAb 同时阳性的标本,最好在当天能用另一种方法进行检测、印证,如果在 24 h 以后进行复查,为避免出现假阴性结果,最好重新抽取血液检验。

参 考 文 献

- [1] 杨凡,单咏梅,周宏,等.不同方法学检测乙型肝炎血清标志物结果的评价分析.检验医学,2010,25:723-724.
- [2] 任丽民,邓芳,余明杰,等.化学发光法对 ELISA 检测 HBsAg“灰区”标本的再分析探讨.检验医学与临床,2010,7:434-435.
- [3] 章火祥,丁丽萍.ECL 法与 ELISA 法在测定乙肝血清标志物上的比较.江西医学检验,2004,22:137-139.
- [4] 田拥军,覃莉,刘慎沛.8 种国产 HBsAg 试剂检测变异 HBsAg 的效果分析.临床检验杂志,2007,25:250-253.
- [5] 杨奎真.两种方法检测乙肝患者血清 HBVs、HBVe 系统抗原抗体同时阳性结果分析.国际检验医学杂志,2011,32:179-180.

(收稿日期:2012-06-14)

(本文编辑:戚红丹)