



8-10

## 乙型肝炎表面抗原疑难判定血清的研究

林京香, 王佑春, 张华远

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

R373.21

R512.620.4

**摘要:**用中国药品生物制品检定所检定合格的国内外 HBsAg EIA 试剂及 ABBOTT 抗-HBs、抗-HBc EIA 试剂, 对所收集的 13 份 HBsAg 疑难判定血清进行检测, 并用 PCR 方法检测血清中 HBV DNA, 结果显示国内外 HBsAg 试剂对部分 HBV DNA 阳性样品的检出率差异较大, 提示这些样品可能为 S 基因突变株或 HBsAg 含量较低, 因此, HBsAg EIA 试剂的敏感度仍有待进一步提高, 并应进一步研制检测 S 基因突变株的 HBsAg 诊断试剂。

**关键词:**乙肝表面抗原; S 基因突变; 诊断试剂

**中图分类号:** R373.21 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2000)01-0008-03

乙型肝炎表面抗原

近年, 国内外均有许多关于乙型肝炎病毒(HBV)基因突变的报道, HBV S 基因突变可以逃避机体抗-HBs 免疫, 使乙肝疫苗免疫失败<sup>[1-3]</sup>。通过对 HBsAg 突变体基因表达产物的抗原性分析, 显示不同突变体之间存在着抗原性的差异<sup>[4,5]</sup>。因此, 用不同 HBsAg 酶联免疫(EIA)试剂检测同一份血清, 其结果有可能截然不同, 即临床上发现 HBsAg 指标漏检。我们从国内不同地区收集用两种以上试剂检测结果不一致的血清, 分别用 ABBOTT 等 4 家进口和 17 家国产 HBsAg EIA 国家批批检定合格试剂及 ABBOTT 抗-HBs、抗-HBc EIA 试剂进行检测, 并用 PCR 方法检测血清中的 HBV DNA, 以便确诊是否为 HBV 感染, 现将结果报告如下:

## 1 材料和方法

**1.1 血清** 13 份 HBsAg 疑难判定血清, 分别来自于北京血液中心、武汉生物制品研究所、成都生物制品研究所、兰州生物制品研究所、厦门新创科技有限公司、洛阳华美生物工程公司。

**1.2 试剂** 17 家国产 HBsAg EIA 试剂为国家批批检定合格产品; 4 家国外 HBsAg EIA 诊断试剂分别来自美国亚培制药有限公司、美国强生傲拓诊断系统有限公司、荷兰阿克苏若贝尔公司和美国 Genetic systems 公司; 抗-HBs EIA 和抗-HBc EIA 为美国亚培制药有限公司产品。

**1.3 免疫学检测方法** 国内外 HBsAg EIA 试剂及抗-HBc 试剂对 13 份血清样本的检测, 均严格按使用说明书操作及判断结果。HBsAg 阳性样品以实际 OD 值与试剂临界值(cutoff value)之比(S/C)表示。

**1.4 HBV DNA PCR 检测** 按华美公司 DNA 提取试剂盒操作说明书提取 DNA, 取 5  $\mu$ L DNA 提取液, 加 5  $\mu$ L 10  $\times$  buffer, 4  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L), 1  $\mu$ L dNTP (10 mmol/L), 25 pmol/L 外引物, 2.5 u Taq DNA 聚合酶, 加去离子水至 50  $\mu$ L 反应体积。扩增程序为: 94  $^{\circ}$ C 1 min, 55  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取第一轮 PCR 产物 5  $\mu$ L, 内引物各 25 pmol/L, 其它试剂量及反应程序同上, 进行第二轮 PCR 扩增。

收稿日期: 1998-09-28, 修回日期: 1998-11-23

作者简介: 林京香(1954-), 女, 山东省文登县人, 助研, 北京大学本科毕业, 从事乙肝、戊肝诊断试剂质控参考品研制及试剂质量的研究。

## 2 结果

**2.1 国外四种 HBsAg 试剂的检测结果** 用四种进口 HBsAg 试剂检测 13 份血清, 结果有 4 个样品, 即 1、2、3 和 13 号(占 4/13)为四种试剂全部阳性; 有 1 个样品, 即 3 号(占 1/13), 为三种试剂阳性; 有 1 个样品, 即 9 号(占 1/13), 为二种试剂阳性; 有 4 个样品, 即 5、6、7 和 10 号(占 4/13), 为一种试剂阳性; 有 3 个样品, 即 8、11 和 12 号(占 3/13), 为四种试剂全部阴性(见表 1)。

表 1 13 份 HBsAg 可疑样品的检测结果

Table 1 Detection of 13 indeterminate HBsAg samples

编号 No.	ABBOTT *	Alks *	Or *	Gen *	PCR	cAb	SAb *	国内 # In China
1	3.7	1.3	13	28	+	-	-	5/17
2	1.9	1	2.5	2	+	+	-	1/17
3	30	3.9	41	-	+	+	-	3/17
4	2.2	8.5	5.4	2	-	-	-	0/15
5	29	-	-	-	+	+	-	0/15
6	14	-	-	-	+	+	1.5	0/15
7	27	-	-	-	-	+	1.4	0/15
8	-	-	-	-	+	+	23	7/17
9	-	1.1	41	-	+	+	16	6/17
10	-	-	-	2.7	+	+	-	7/17
11	-	-	-	-	+	+	-	6/15
12	-	-	-	-	+	+	3.8	3/15
13	9.5	4.1	26	13	+	+	-	10/14

注: \* : "-" 表示阴性, 阳性者以 S/CO 值表示, S/CO > 1 者为阳性;

\* : "-" represents negative; The positive is showed as S/CO value.

# : 分母表示所用试剂数, 分子表示为阳性反应的试剂数。

# : Denominator represents numbers of used kits and numerator represents numbers of reactive kits.

**2.2 HBV DNA PCR 检测结果** 用 PCR 法检测 13 份样品中 HBV DNA, 结果见表 1。4 份用四种进口 HBsAg 试剂检测均阳性者中, 有 3 例为 HBV DNA 阳性; 1 份用 3 种进口 HBsAg 试剂检测阳性者为 HBV DNA 阳性; 1 份用 2 种进口 HBsAg 试剂检测阳性者为 HBV DNA 阳性; 4 份用一种进口 HBsAg 试剂检测阳性者中, 有 3 例为 HBV DNA 阳性。说明 HBsAg 与 HBV DNA 的检测结果不一致, 因此, 对疑难血清的判断应以 DNA 检测结果为准。

**2.3 抗-HBc 检测结果** 除 1 和 4 号为抗-HBc 阴性以外, 其余均为阳性(见表 1)。特别是 4 份用 4 种进口 HBsAg 试剂检测均为阴性者而 HBV DNA 为阳性的血清, 其抗-HBc 也为阳性, 提示在献血员的筛选中增加抗-HBc 指标可以减少 HBV 漏检的机率。

**2.4 抗-HBs 检测结果** 用抗-HBs 试剂检测 13 份血清, 结果见表 1。6 份 HBV DNA 阳性血清其抗-HBs 为阴性; 而 4 份 HBV DNA 阳性血清其抗-HBs 也为阳性, 这可能为 HBV 滴度较低或 HBV 基因序列发生变异, 造成 HBV 与抗-HBs 共同存在。

**2.5 国内 17 种 HBsAg EIA 试剂检测结果** 用国内 17 种 HBsAg EIA 试剂对 13 份血清进行检测, 对 11 份 HBV DNA 阳性血清, 即 1、2、3、5、6、8、9、10、11、12 和 13 的检出率分别为 5/17、1/17、3/17、0/15、0/15、0/15、7/17、6/17、7/17、6/15、3/15 和 10/14。说明我国不同厂家 HB-

sAg EIA 诊断试剂检出率不同,其敏感度仍有待进一步提高。

### 3 讨论

目前认为初期感染野型株 HBV 的患者,当恢复期体内出现抗-HBs 后,野型株逐渐被清除,但在抗体压力下,部分野型株可能演化成 S 基因突变株,从而抗-HBs 和 HBsAg 同时存在;即使体内尚无 S 基因突变形成,由野型株感染引生的抗-HBs,只能防止野型株再感染而不能防止 S 基因突变株再感染。在这种情况下,体内就有可能同时存在野型株感染引起的抗-HBs 和 S 基因突变株的持续感染,而且这种 HBsAg 不易被目前诊断试剂检出。本研究检测的 5 份抗-HBs 阳性样品中有 4 份 HBV DNA 阳性,说明 HBV DNA 与抗-HBs 抗体同时存在,这种 HBV DNA 可能为 S 基因突变株(有待进一步测序证实)。用抗-HBc 试剂检测发现,部分 HBV DNA 阳性而 HBsAg 阴性的样品,其抗-HBc 为阳性。由于 HBV 经血传播,目前只筛选 HBsAg,但由于存在着变异株,不易被当前 HBsAg 诊断试剂检出。因此,研究对变异株的检测方法是减少输血后传染肝炎的当务之急。

本研究所用免疫检测试剂为中国药品生物制品检定所检定的特异性、敏感度、精密度等均合格的国内外试剂。实验表明,得出可靠、可信的结果,试剂的质量是关键,但操作人员素质以及实验室条件也是不可忽视的问题,特别是 PCR 高效扩增,其产物污染极易导致假阳性,因此,在实验室中应建立核酸提取、母液配制、产物检测等相对封闭的空间,以减少 PCR 的污染。

### 参 考 文 献

- [1] 吕晴,朱启荣,段怒城等.乙型肝炎疫苗免疫失败小儿 S 基因变异及临床特点的研究[J].中华肝脏病杂志,1997,5(1):15~16
- [2] Yamamoto M, Okamoto H, Mayumi A *et al.* Naturally occurring escape mutant of hepatitis B virus with various mutants in S gene in carriers seropositive for antibody to hepatitis surface antigen [J]. *J Virol*, 1994, 68:2671~2676
- [3] Carman WF, Zaretti AR, Karayanidis P *et al.* Vaccine induced escape mutant of hepatitis virus [J]. *Lancet*, 1990, 336:325~329
- [4] 钟熙,王佑春, R Ling 等.用现行国产 HBsAg EIA 检测乙肝 S 基因突变体问题的研究[J].中华微生物学和免疫学杂志,1998,18(2):85~87
- [5] 王佑春, R Ling, 倪建等.乙型肝炎病毒 S 基因变异株抗原表位的研究[J].中国生物制品学杂志,1997,10(2):68~70

## Study on Indeterminate HBsAg Samples

LIN Jing-xiang, WANG You-chun, ZHANG Hua-yuan

(Dept. of Hepatitis, National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

**Abstract:** Thirteen indeterminate HBsAg samples were tested with 21 sorts of HBsAg kits, anti-HBs and anti-HBc kits. HBV DNA was detected with nested PCR. The results showed that all of HBsAg kits can not easily detected HBsAg from some HBV DNA positive samples. It indicated that HBsAg concentration may be lower or HBV may be S mutants in those samples. So it is necessary to improve the sensitivity of HBsAg and to develop the diagnostic kit to detect HBV S mutants.

**Key words:** HBsAg; S gene mutant; Diagnostic kit