

# 酶联免疫吸附试验和电化学发光免疫法检测孕妇乙型肝炎表面抗原结果的比较

熊海燕 罗业飞 刘海燕 韩文晖 胡安群 汪艳 郑英杰

200032 上海,复旦大学公共卫生学院卫生微生物学教研室(熊海燕、罗业飞、郑英杰),国家卫生和计划生育委员会卫生技术评估重点实验室(熊海燕、郑英杰),公共卫生安全教育部重点实验室(熊海燕、罗业飞、郑英杰); 246003 安徽省安庆市市立医院检验科(刘海燕、胡安群),妇产科(韩文晖、汪艳)

通信作者:郑英杰, Email: yjzheng@shmu.edu.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2017.11.020

**【摘要】** 目的 比较ELISA和电化学发光免疫法(ECLIA)检测HBsAg的一致性,探讨其相关的因素和基因进化特征。方法 2014年1月1日至2015年1月31日连续招募安庆市市立医院产科初次住院活产孕妇2 296例,收集其人口学特征,并对采集的血清应用ELISA和ECLIA检测HBsAg,采用Kappa检验评价两种方法检测结果的一致性;对HBV S基因片段进行巢式PCR扩增、测序及进化分析。结果 两种方法具有一致性,  $Kappa=0.71$ 。共获得123株HBV S基因片段序列,其中113株为B基因型(adw2血清型112株, adw3血清型1株), 10株为C基因型(全为adr血清型)。两种方法检测不同基因型或血清型病毒株的结果显示, ECLIA对B基因型和adw2血清型的检测明显优于ELISA, 差异有统计学意义。113株B基因型序列进化分析显示, 两种检测方法或不同阳性组别在各位点替换率的差异均无统计学意义。发生于HBsAg主要亲水区域(MHR)的氨基酸变异显示, ELISA/ECLIA单纯阳性组出现完全不同的替换位点。结论 两种方法检测HBsAg具有高度的一致性,但在ELISA/ECLIA单纯阳性组中仍获得34株(32.4%)HBV S基因片段,且存在MHR的氨基酸替换位点互补。因此在控制HBV传播中应考虑ELISA/ECLIA单纯阳性的感染者在人群中可能的静默传播作用, 还需优化临床检测程序。

**【关键词】** 乙型肝炎表面抗原; 酶联免疫吸附试验; 电化学发光免疫法

基金项目:国家自然科学基金(81373065)

**Comparison of results of two immunoassays for detection of hepatitis B surface antigen in pregnant women** Xiong Haiyan, Luo Yefei, Liu Haiyan, Han Wenhui, Hu Anqun, Wang Yan, Zheng Yingjie

Department of Hygienic Microbiology, School of Public Health (Xiong HY, Luo YF, Zheng YJ); Key Laboratory for Health Technology Assessment, National Commission of Health and Family Planning (Xiong HY, Zheng YJ); Key Laboratory for Public Health Safety, Ministry of Education-School of Public Health (Xiong HY, Luo YF, Zheng YJ), Fudan University, Shanghai 200032, China; Department of Clinical Laboratory (Liu HY, Hu AQ), Department of Gynaecology and Obstetrics (Han WH, Wang Y), Anqing City Hospital, Anqing 246003, China

Corresponding author: Zheng Yingjie, Email: yjzheng@shmu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To evaluate and compare the detection consistency of hepatitis B surface antigen (HBsAg) by two immunoassays: enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and electrochemiluminescent immunoassay (ECLIA). **Methods** A prospective study was conducted among 2 296 pregnant women recruited consecutively from January 1, 2014 to January 31, 2015 in a hospital. Blood samples were collected from them for the detection of HBsAg by using ELISA and ECLIA, Kappa test was performed on the results. Nested polymerase chain reaction and sequencing of HBV S gene were also performed in all samples. Phylogenetic analysis was performed using Mega 6.0 software. **Results** The two methods had high detection consistency of HBsAg ( $Kappa=0.71$ ). There were significant differences in detection result of B genotype and adw2 serotype HBV strains between two methods. Among 123 identified HBV strains, 113 belonged to genotype B and available for further

analysis. The difference in detection of substitution rates between two methods or different positive groups were not significant. Compared with ELISA single positive group, the ECLIA single positive group had completely different substitution sites. **Conclusion** The two methods had high detection consistence of HBsAg, but there were still 32.4% HBV DNA positive cases in ELISA/ECLIA single positive group, and complete complementary substitution sites between ELISA single positive group and ECLIA single positive group. Our results suggested that more effective detection procedure should be considered for the possible impact of the HBV silent transmission and infection.

**【Key words】** Hepatitis B surface antigen; Enzyme-linked immunosorbent assay; Electrical chemiluminescent immunoassay

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81373065)

HBV 显性感染的常规判定标准为 HBsAg 检测阳性,目前常用的检测方法有 ELISA、电化学发光免疫法 (ECLIA)、时间分辨荧光免疫分析技术 (TRFIA) 及化学发光免疫分析法 (CLIA) 等。其中 ELISA 常用于 HBsAg 定性检测,而灵敏度更高的 ECLIA 可用于定量或半定量检测<sup>[1]</sup>,但对于两种方法检测结果不一致样本的判定还存在疑问,其中仍可能存在 HBV DNA 阳性样本。母婴传播是 HBV 感染的主要途径<sup>[2-4]</sup>,因此对孕妇人群 HBV 感染判定的准确性尤为重要,且直接影响新生儿接受乙型肝炎疫苗的免疫策略<sup>[5]</sup>。为此本研究建立孕妇队列,采用 ELISA 和 ECLIA 两种方法检测 HBsAg,评价两者的一致性及其影响因素,分析不同阳性组别 HBV S 基因片段分子进化特征。

## 对象与方法

1. 标本来源:招募2014年1月1日至2015年1月31日安庆市市立医院收住的所有分娩孕妇,其中分娩活产儿的孕妇为研究对象。排除标准为非活产(包括流产、引产、死胎等)、拒绝参与本研究及血标本量不足的孕妇。共纳入住院活胎分娩孕妇2 296例。

2. 研究方法:通过医院电子病历信息系统取得入院临床记录,本研究自拟调查问卷收集孕妇人口学等资料。并在知情同意下,于孕妇入院后第2天,抽取外周静脉血5 ml;室温静置约1 h后,以4 000 r/min 离心15 min,吸取足量的上清液置于灭菌Eppendorf管,双管(A、B)分装,置-80℃保存备检。孕妇血清A管使用ELISA和ECLIA进行HBsAg平行检测。ELISA检测结果判定按试剂厂家说明书规定的Cut-off值作为判断标准,夹心法检测HBsAg S/CO $\geq$ 1.0为阳性。ECLIA检测HBsAg阳性的判断标准为结果值 $>0.05$ 。对所有B管血清采用天根生化科技(北京)有限公司生产的TIANamp Virus DNA/RNA Kit试剂盒(批号:DP315),严格按操作说明书抽提DNA,储存于-20℃备检。使用巢式PCR检测HBV S和pre S片段,阳性结果需不同实验室和不同

操作者再次重复实验,结果仍为阳性者确认为阳性,本实验室HBV S和pre S片段PCR扩增灵敏度分别为118~1 180拷贝/ml和11.8~118拷贝/ml。

3. 统计学分析:统计分析采用SPSS 19.0软件。定量资料采用 $M$ 和四分位间距( $Q_R$ );定性资料的比例比较使用Pearson  $\chi^2$ 检验或行 $\times$ 列表 $\chi^2$ 检验或Fisher确切概率法或Possion检验,对其中三组总体不全一致的进行四格表 $\chi^2$ 检验或Fisher确切概率法两两比较,并采用Bonferroni校正。定量指标比较使用Kruskal-Wallis秩检验,对其中三组总体不全一致的进行Mann-Whitney检验两两比较,并采用Bonferroni校正。所有 $P$ 值均为双侧检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 两种方法检测HBsAg的比较:2 296例孕妇标本中,ELISA检出164例阳性,阳性率为7.1%;ECLIA检出227例阳性,阳性率为9.9%。两种方法检测一致率为95.4%, $Kappa=0.71$ ,两种方法的一致性程度较高(表1)。以ECLIA为确证法计算,ELISA灵敏度为63.0%,特异度为99.0%。按不同的人口学特征分组,两种方法检测结果比较均为ECLIA优于ELISA。依据ELISA和ECLIA检测HBsAg阳性结果,分为ELISA单阳组、ELISA和ECLIA双阳组以及ECLIA单阳组,分析显示三组孕妇在年龄、孕周及婚姻状况的差异无统计学意义;ELISA单阳组与ECLIA单阳组比较,在年龄和居住地的差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表2。

表1 ELISA和ECLIA检测HBsAg结果的比较

变量	ELISA	ECLIA		一致率 (%)	Kappa值
		+	-		
HBsAg	+	143	21	95.4	0.71
	-	84	2 048		

注:ELISA为酶联免疫吸附试验;ECLIA为电化学发光免疫法

2. HBV S基因片段进化树分析:共获得HBV S基因片段序列123条,进化树见图1。其中B基因型

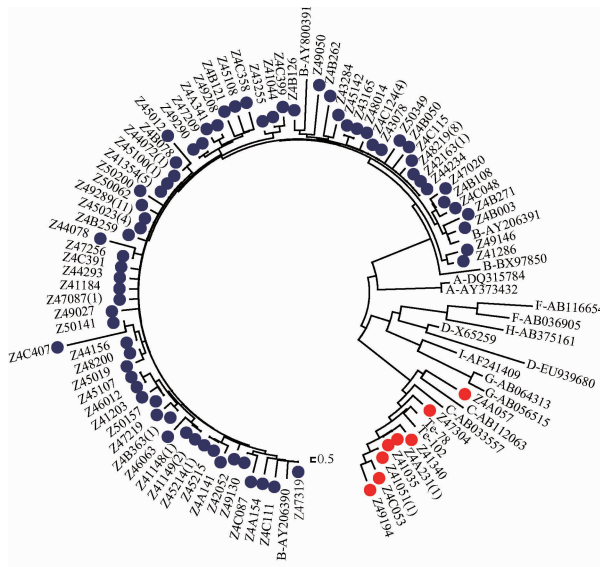
表2 HBsAg不同检测方法阳性组孕妇人口学特征

特征	ELISA单阳组 (n=21)	双阳组 (n=143)	ECLIA单阳组 (n=84)	$\chi^2$ 值	P值
年龄(岁) <sup>a</sup>	30.0(27.0~33.0)	27.0(25.0~31.0)	27.0(25.0~31.0)	5.063	0.08
孕周 <sup>a</sup>	38.0(36.4~39.4)	38.4(36.7~39.1)	38.6(37.4~39.6)	1.526	0.466
居住地为安庆市 <sup>b</sup>	16(80.0)	132(94.3)	79(95.2)	6.445	0.04
婚姻状况为已婚 <sup>b</sup>	21(100.0)	133(93.7)	76(90.5)	2.532	0.282

注:双阳组为ELISA和ECLIA均阳性;ELISA为酶联免疫吸附试验;ECLIA为电化学发光免疫法;<sup>a</sup>括号外、内数据分别为中位数和四分位间距;<sup>b</sup>括号外、内数据分别为例数和比例(%)

因C基因型HBV株数少,故只分析B基因型。结果显示两种方法检测不同变异位点的差异均无统计学意义。分析HBsAg不同阳性组别序列变异,总体核苷酸和氨基酸位点替换率的差异无统计学意义[ELISA单阳组,核苷酸为3.7‰即12/(6×544),氨基酸为8.3‰即9/(6×181);ELISA和ECLIA双阳组,

核苷酸为4.0‰即172/(80×544),氨基酸为6.6‰即95/(80×181);ECLIA单阳组,核苷酸为2.5‰即36/(27×544),氨基酸为7.4‰即36/(27×181)], $P>0.05$ 。共95个位点发生核苷酸替换,ELISA单阳组、ELISA和ECLIA双阳组及ECLIA单阳组分别出现10、81和26个;三组间核苷酸替换率的差异无统计学意义。共49个位点发生氨基酸替换,ELISA单阳组、ELISA和ECLIA双阳组及ECLIA单阳组分别出现8、40和16个;主要亲水区(MHR)99~169位的氨基酸共16个位点发生非同义替换(表4),其中ELISA单阳组和ECLIA单阳组未在任一相同位点出现替换(图2)。三组间氨基酸替换率的差异无统计学意义。



注:●B基因型;●C基因型;括号内数据为各组中有N条与之相同的序列

图1 HBsAg阳性孕妇HBV S基因片段分子进化树

113条(91.7%),C基因型10条(8.3%);adw2血清型112条(91.1%),adw3血清型1条(0.8%),adr血清型10条(8.1%)。两种方法检测不同基因型病毒株,结果显示B基因型的差异有统计学意义( $P<0.05$ ),C基因型的差异无统计学意义;检测不同血清型的结果显示,adw2血清型差异有统计学意义( $P<0.05$ ),adw3和adr血清型差异均无统计学意义(表3)。ELISA单阳、ELISA和ECLIA双阳以及ECLIA单阳组间基因型与血清型分布的差异无统计学意义。

3. 基因B型孕妇的HBV S基因序列变异分析:

表3 两种方法检测孕妇不同基因型或血清型HBV病毒株的比较

变量	ELISA阳性	ECLIA阳性	$\chi^2$ 值	P值
基因型				
B	86(76.11)	107(94.69)	15.649	0.000
C	9(90.00)	10(100.00)	-	-
血清型				
adw2	85(75.89)	106(94.64)	15.673	0.000
adw3	1(100.00)	1(100.00)	-	-
adr	9(90.00)	10(100.00)	-	-

注:ELISA为酶联免疫吸附试验;ECLIA为电化学发光免疫法;括号外数据为例数,括号内数据为比例(%)

讨论

本研究发现ELISA和ECLIA检测孕妇HBsAg具有高度的一致性,但两种方法检测HBV病毒株B基因型和adw2血清型结果的差异有统计学意义,均为ECLIA优于ELISA。B基因型病毒株进化分析显示,两种方法检测氨基酸或核苷酸替换位点的差异无统计学意义,但ELISA单阳组和ECLIA单阳组在MHR第110~160位出现完全互补的氨基酸替换位点。

既往研究显示ELISA与ECLIA检测HBsAg均有较好的一致性<sup>[6-8]</sup>。本研究采用ELISA初步检验,阳性者采取ECLIA复测,结果阳性则判定为阳性,若阴性则判定为假阳性。然而发现在ELISA单阳组,即“假阳性组”和ECLIA单阳组分别仍存在28.6%和33.3%的HBV DNA阳性率。因此本研究进一步探讨不一致性可能的分子差异。

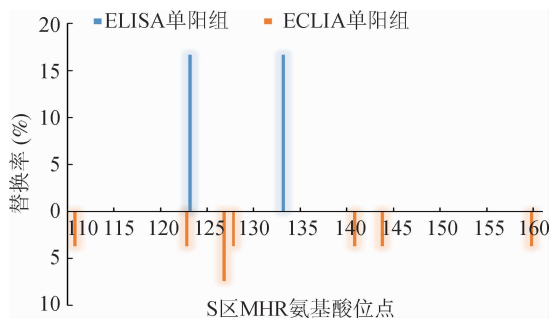
现有的HBsAg检测技术主要是基于 $\alpha$ 抗原决定簇的抗原抗体反应而建立, $\alpha$ 抗原决定簇位于HBsAg的MHR内,是第124和147位氨基酸间的蛋白三级结构。本研究未发现两种方法检测结果或不同阳性组别在MHR的核苷酸或氨基酸替换位点的差异有统计学意义。持续性HBV DNA阳性也可呈



**表4** HBsAg 阳性孕妇不同检测组 HBV S 基因病毒株主要亲水区核苷酸和氨基酸替换情况

核苷酸位点	核苷酸替换频数(株数)			氨基酸位点
	ELISA 单阳组 (n=6)	双阳组 (n=80)	ECLIA 单阳组 (n=27)	
A457C	0	1	0	Q101H
A482C	0	2	1	I110L
A519G	0	0	1	K122R
A521G	0	1	0	T123A
C522T	1	0	0	T123I
A530G	0	3	1	T126A <sup>a</sup>
A530T	0	3	1	T126S
C533A	0	1	1	P127T
A540G	0	1	0	Q129R
C546A	0	1	0	T131N
C546T	0	3	0	T131I
A551T	1	1	0	M133L
T552C	0	3	0	M133T
T554A	0	1	0	F134R
T555G	0	1	0	F134R
T556A	0	1	0	F134R
C558T	0	1	0	P135L
C573T	0	2	1	T140I/L
A581T	0	0	1	T143S
T627C	0	1	0	F158S
A636C	0	2	0	Y161S
A636T	0	4	0	Y161F <sup>a</sup>
A645G	0	1	0	E164G
合计	2	34	7	

注:各位点氨基酸替换类型均为非同义型; ELISA 为酶联免疫吸附试验; ECLIA 为电化学发光免疫法; 双阳组为 ELISA 和 ECLIA 均阳性; <sup>a</sup> 隐匿性 HBV 感染(OBI)常见的突变位点



注:ELISA 为酶联免疫吸附试验; ECLIA 为电化学发光免疫法; MHR 为主要亲水区

**图2** HBV 基因 B 型 ELISA 单阳组与 ECLIA 单阳组病毒株 MHR 氨基酸替换比较

ECLIA 单阳组所获得的病毒株未出现相同的位点变异,提示其可能不具有 OBI 病毒株的明显特征。

将 ELISA 和 ECLIA 两单阳组比较发现,在 MHR 第 110~160 位出现完全不重叠的氨基酸替换位点,即两种方法可以识别不同的变异位点,提示该两种方法同时使用可能更准确的检出 HBsAg 阳性感染者,从而降低该两组感染者在孕妇中可能造成的静默传播和母婴传播。

本研究存在不足。如无 HBV DNA 定量检测结果,无法更好阐述两种方法的一致性程度。基于本研究是大样本队列分析结果,故建议临床检验应合并使用 ELISA 和 ECLIA 检测,以防控孕妇人群 HBV 感染保障母婴健康。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Kim H, Oh EJ, Kang MS, et al. Comparison of the Abbott Architect i2000 assay, the Roche Modular Analytics E170 assay, and an immunoradiometric assay for serum hepatitis B virus markers[J]. Ann Clin Lab Sci, 2007, 37(3):256-259.
- [2] Giles ML, Visvanathan K, Lewin SR, et al. Chronic hepatitis B infection and pregnancy[J]. Obstet Gynecol Surv, 2012, 67(1):37-44. DOI: 10.1097/OGX.0b013e31823e464b.
- [3] Saito T, Shinzawa H, Uchida T, et al. Quantitative DNA analysis of low-level hepatitis B viremia in two patients with serologically negative chronic hepatitis B [J]. J Med Virol, 1999, 58(4):325-331. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9071(199908)58:4<325::AID-JMV2>3.0.CO;2-L.
- [4] Yao QQ, Dong XL, Wang XC, et al. Hepatitis B virus surface antigen (HBsAg)-positive and HBsAg-negative hepatitis B virus infection among mother-teenager pairs 13 years after neonatal hepatitis B virus vaccination[J]. Clin Vaccine Immunol, 2013, 20(2):269-275. DOI: 10.1128/CVI.00539-12.
- [5] 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2015 年最新版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 31(12):1941-1960. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2015.12.002. Chinese Society of Hepatology, Chinese Medical Asso, Chinese Society of Infectious Diseases, Chinese Med. The guideline of prevention and treatment for chronic hepatitis B: a 2015 update [J]. J.Clin Hepatol, 2015, 31(12):1941-1960. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2015.12.002.
- [6] 左立新. 不同方法学检测乙型肝炎血清标志物结果的应用研究[J]. 当代医学, 2014, 20(23):116-117. DOI: 10.3969/j.issn.1009-4393.2014.23.085.
- [7] Zuo LX. Study on the application of different methods in the detection of hepatitis B serum markers[J]. Contemp Med, 2014, 20(23):116-117. DOI: 10.3969/j.issn.1009-4393.2014.23.085.
- [8] Xu WZ, Li Y, Wang M, et al. Comparison of two immunoassays for determining hepatitis B virus serum markers[J]. Clin Chem Lab Med, 2011, 50(1):153-157. DOI: 10.1515/CCLM.2011.721.
- [9] Liu C, Chen TB, Lin JP, et al. Evaluation of the performance of four methods for detection of hepatitis B surface antigen and their application for testing 116, 455 specimens [J]. J Virol Methods, 2014, 196:174-178. DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.10.039.
- [10] Samal J, Kandpal M, Vivekanandan P. Molecular mechanisms underlying occult hepatitis B virus infection[J]. Clin Microbiol Rev, 2012, 25(1):142-163. DOI: 10.1128/CMR.00018-11.
- [11] Hsu CW, Yeh CT, Chang ML, et al. Identification of a hepatitis B virus S gene mutant in lamivudine-treated patients experiencing HBsAg seroclearance[J]. Gastroenterology, 2007, 132(2):543-550. DOI: 10.1053/j.gastro.2006.12.001.
- [12] Carman WF, Karayiannis P, Waters J, et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus[J]. Lancet, 1990, 336(8711):325-329. DOI: 10.1016/0140-6736(90)91874-A.
- [13] Huang CH, Yuan Q, Chen PJ, et al. Influence of mutations in hepatitis B virus surface protein on viral antigenicity and phenotype in occult HBV strains from blood donors [J]. J Hepatol, 2012, 57(4):720-729. DOI: 10.1016/j.jhep.2012.05.009.

(收稿日期:2017-03-21)  
(本文编辑:张林东)

现为 OBI, 是血清学 HBsAg 检测为阴性的 HBV 感染, 即出现检测逃避<sup>[9]</sup>; OBI 病毒株中报道较多的 MHR 变异有 G145R、P120T、I/T126N/A、Y161F 等<sup>[10-11]</sup>, 本研究所获得的病毒株出现相同的变异有 T126A 和 Y161F。Huang 等<sup>[12]</sup> 研究发现, OBI 病毒株发生在 MHR 的 C124R、C124Y、K141E 以及 D144A 位点变异可以显著降低常见 HBsAg 检测试剂的灵敏度(包括本研究所使用的试剂盒), 本研究中 ELISA 和