

# NAT 检测及化学发光免疫技术在乙型肝炎病毒检测中的应用

宁韶辉<sup>1</sup>, 尹冠群<sup>2</sup>, 唐翠连<sup>1</sup>, 伍美兰<sup>1</sup>, 廖晓<sup>1</sup>

1. 邵阳学院附属第二医院, 湖南 邵阳 422000; 2. 长沙市妇幼保健院, 湖南 长沙 410007

**摘要:** **目的** 分析核酸检测(nucleic acid testing, NAT)及化学发光免疫技术检测在乙型肝炎病毒检测中应用价值。 **方法** 对邵阳学院附属第二医院 2019—2021 年采集的 20 000 份血检标本, 首先采用常规 ELISA 检测, HBsAg 双试剂阴性进行 NAT 检测。对 HBsAg-/HBV DNA+标本再采用化学发光免疫法分析其乙肝血清学特征。 **结果** 20 000 份血标本中检出 HBsAg(+) HBV DNA(+) 6 400 份, 占 32.00%; HBsAg(+) HBV DNA(-) 780 份, 占 3.90%; HBsAg(-) HBV DNA(+) 755 份, 占 3.78%; HBsAg(-) HBV DNA(-) 12 065 份, 占 60.33%。对 755 份 HBsAg(-) HBV DNA(+) 进行乙肝血清学检测, 其中乙肝二对半检出模式中 HBsAb、抗-HBe、抗-HBc 均(+) 占 41.99%(317 份), HBsAb、抗-HBc 均(+) 占 30.99%(234 份), 抗-HBc(+) 占 10.99%(83 份), 乙肝五项全阴性占 16.02%(121 份)。 **结论** NAT 检测可有效检出 HBsAg-/HBV DNA+标本, 保证血检标本中乙肝病毒阳性被检出。借助化学发光免疫技术能有效分析隐匿性乙型肝炎病毒感染血清学特征, 可为血液安全的管理策略提供科学的依据。

**关键词:** 核酸检测; 化学发光免疫技术; 乙型肝炎病毒; 隐匿性乙肝

**中图分类号:** R446.6 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2022)06-0759-03 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2022.06.028

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)作为一类嗜肝细胞病毒, 主要通过血液途径传播<sup>[1]</sup>。如何采用有效的方法检测 HBV 抗原、抗体成为当前医学检测界关注的重点课题之一。研究发现部分血清标本 HBV 的复制率较低, 采用常规 ELISA 方法难以有效检出, 这是由于受检者携带病毒的特点是 HBsAg 呈阴性, 但血清中 HBV DNA 却呈阳性, 表达为隐匿性乙肝(occult hepatitis B, OBI)患者<sup>[2]</sup>。HBV 在人群中的携带率较高, 常规 ELISA 法难以有效检测到 OBI, 因此核酸检测(nucleic acid testing, NAT)方法可检测出 HBsAg-/HBV DNA+, 对于提升 OBI 检测效果有重要作用<sup>[3]</sup>。要明确 HBsAg-/HBV DNA+的血清学状态, 还需要借助化学发光免疫技术(chemiluminescence immunoassay, CLIA), 该方法可以结合 NAT 检测有效分析 OBI 血清学特征。

## 1 样本与方法

**1.1 检测样本** 研究标本来自邵阳学院附属第二医院 2019—2021 年采集的血检标本, 共 20 000 份。年龄为 22~56 岁, 男性与女性比例为 1.02:1。

### 1.2 试剂与仪器

**作者简介:** 宁韶辉(1986-), 女, 湖南省邵阳市人, 本科学历, 主管检验师, 主要从事分子生物临床检验工作。

**通信作者:** 尹冠群, E-mail: ygq0071236139@163.com。

**1.2.1 ELISA** HBsAg [批号 201804564、201807356 (厦门英科新创科技公司), 批号 B20180365、B20180614 (及北京万泰生物药物股份公司)]; 全自动酶免处理系统(美国雅培公司 ARCHITECT I4000SRP 全自动免疫分析仪)。

**1.2.2 NAT** 荧光聚合酶链反应(Real-Time PCR)检测。

**1.2.3 CLIA** 意大利 DiaSorin 公司, 批号: 2020125131。

**1.3 NAT 联合 CLIA 检测** 对于 20 000 份血检标本首先采用常规 ELISA 检测, HBsAg 双试剂阴性再进行 NAT 检测。NAT 检测依据试剂盒说明, 8 份(150  $\mu$ L/份)加以混检, 如果检测为阳性, 8 份标本进行单个检测, 确定是否为阳性。对 HBsAg 双试剂阴性、NAT 检测阳性标本采用 CLIA 进行乙肝(HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、抗-HBc)检测。

**1.4 统计学分析** 采用 SPSS 20.0 软件统计学分析, 计数资料采用例数(%)表示, 描述性分析标本检测情况及 OBI 患者血清学特征。

## 2 结果

**2.1 标本检测情况** 20 000 份血检标本检出 HBsAg(+) HBV DNA(+) 6 400 份, 占 32.00%; HBsAg(+) HBV DNA(-) 780 份, 占 3.90%; HBsAg(-) HBV DNA(+) 755 份, 占 3.78%; HBsAg(-) HBV DNA(-) 12 065 份, 占 60.33%。

表 1 20 000 份血检标本 NAT 检测结果

检测结果	例数	比值(%)
HBsAg(+) HBV DNA(+)	6 400	32.00
HBsAg(+)HBV DNA(-)	780	3.90
HBsAg(-)HBV DNA(+)	755	3.78
HBsAg(-)HBV DNA(-)	12 065	60.33

2.2 标本 HBsAg 无反应 HBV 核酸分析 如果患者携带的 HBV 具有较低的 DNA 载量时,检测 HBsAg 会有假阴性现象。为了表明 HBsAg 假阴性与标本 HBV DNA 核酸浓度存在的相关性,对 HBsAg 无反应性标本分析了 HBV DNA 载量。从浓度确定出 HBV 标准品与 PCR 检测 Ct 值,构建了 HBV DNA 浓度与 Ct 值曲线(图 1)。对于 HBsAg 无反应性标本实施 HBV DNA 检测,分析 Ct 值分析,发现标本 HBV 核酸 Ct 值 >31(图 2)。分析曲线,发现如果标本中 HBV 核酸浓度低于 200 IU/ml,检测 HBsAg 易存在假阴性。

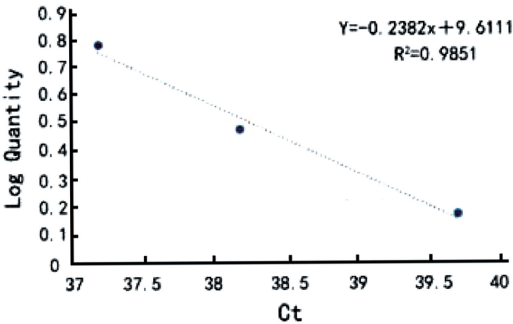
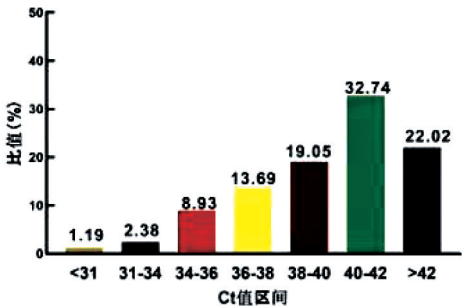


图 1 HBV DNA 浓度与 Ct 值标准曲线



注:HBsAg 阳性越弱 CT 值越大。

图 2 HBsAg 无反应性标本 HBV DNA 检测 CT 值

2.3 OBI 血清学特征 对755 份HBsAg(-)HBV DNA (+)OBI 采用化学发光免疫法分析其 HBV 血清学特征,HBsAb、抗-HBe、抗-HBc 均(+)占 41.99%(317 份),HBsAb、抗-HBc 均(+)占 30.99%(234 份),抗-HBc(+)占 10.99%(83 份),乙肝五项全阴性占 16.02%(121 份)。

3 讨论

如何保证血液安全是当前医学界关注的重点课

题,但是受到检测“窗口期”的影响,存在隐匿性肝炎低病毒与病毒发生变异等因素的影响,导致当前输血发生 HBV 感染的风险依然存在<sup>[4]</sup>。当前国内外一直在探索新的检测技术,提高其检测的灵敏度。本研究分析了 NAT 检测及 CLIA 检测在 HBV 检测中的应用,对于 20 000 份血检标本,其中 HBsAg(-)HBV DNA (+)755 份,占 3.78%。从结果可以看出 NAT 检测能有效检测出 HBsAg(-)HBV DNA (+)阳性标本,NAT 检测 HBV DNA 可以保证阳性检出率。ELISA 的应用会受到“窗口期”的影响,并且受到检测试剂灵敏度不高的影响。HBV 如果 S 基因发生变异会对 HBsAg 的抗原性受到影响<sup>[5]</sup>。研究表明,如果患者携带的 HBV 具有较低的 DNA 载量时,检测 HBsAg 会有假阴性现象。HBsAg 如果浓度较低时,会有漏检产生,提高灵 ELISA 试剂检测 HBsAg 的灵敏度可有效降低了输血感染 HBV 的风险<sup>[6-10]</sup>。

血清学检测不仅要注重提高现有检测试剂灵敏度与特异性,还需要注重引入先进的技术,本研究对 755 份HBsAg(-)HBV DNA (+)OBI 采用 CLIA 分析其乙肝血清学特征,其中HBsAb、抗-HBe、抗-HBc (+)占 41.99%,HBsAb、抗-HBc (+)占 30.99%,抗-HBc (+)占 10.99%,乙肝五项全阴性占 16.02%。可以看出 CLIA 可以结合 NAT 检测有效分析 OBI 血清学特征。CLIA 特点是将物理发光原理与免疫反应加以结合对抗原或抗体进行检测,可以保证更高的灵敏度(0.05 ng/ml)<sup>[11-14]</sup>。一些发达国家已普遍采用 CLIA,与 ELISA 不同,CLIA 的优势是可以有效缩短窗口期,降低漏检率,并可以定量检测<sup>[15]</sup>。有报道称美国采用 PRISM HBsAg 实施微粒子化学发光法,可以将灵敏度从现有的 0.08 ng/ml 大幅提高到 0.005 ng/ml<sup>[16]</sup>。虽然血清学检测表明 HBsAg 阴性,也存在传播 HBV 的可能性<sup>[17]</sup>。输血中引发 HBV 传播的主要媒介是 HBsAg 阴性。HBV-DNA 阳性的供血者,导致输血安全面临很大的危险<sup>[18]</sup>。此外 HBV 筛查还要考虑到该地区 HBV 的流行特点,针对流行率较低的地区,只需要实施 HBsAg 与抗 HBc 筛查,但是针对高流行率地区,要检测 HBsAg 与丙氨酸氨基转移酶(ALT)。但是在实践中也发现,利用 ELISA 对 HBsAg 进行检测时,仍存在漏检风险,有研究资料报道,进行 ELISA 检测 HBsAg 存在 1/6.3 万的漏检率<sup>[19]</sup>。

NAT 是直接对各类病原体核酸加以检测的一系列技术总称。针对血液筛查应用的 NAT 检测方法包括聚合酶链反应与转录介导扩增。对比血清学抗原抗体检测技术可以发现,NAT 体现出的优势不但可以有

效缩短病毒发生感染“窗口期”<sup>[20]</sup>,还可以保证检测的灵敏度与特异性,解决血清学检测“窗口期”长、易发生病毒变异的问题。有研究文献表明,当前 ELISA 检测 HBV 存在的“窗口期”约为 55 d,而实施 20 人份混样式的 NAT 检测,可以将“窗口期”缩短到 10 d<sup>[21]</sup>。如果实施单人份检测,可以将“窗口期”控制到约为 30 d。NAT 的优势还可以检测出病毒变异株,体现出较高的灵敏度,HBV 在发生感染后病毒颗粒会早于 HBsAg 过快释放,血液检测在“窗口期”内针对感染者的检测 HBsAg 为阴性,而血液却存在传染性。NAT 技术的应用虽然难以完全解决感染窗口期,但是可以将输血中传播病毒的概率降低到极低的程度。当前国内外针对 NAT 应用于血液筛查多采用了少量样本汇集,采用了三重核酸检测(MP-NAT)模式与单人份核酸检测模式(ID-NAT)。但是有研究发现,HBV ID-NAT 可以保证敏感性与检出率,与 MP-NAT 相比具有优势,应用 NAT 技术可以有效提高血液的安全性。

我国作为 HBV 高流行地区,输血后发生 HBV 感染存在较高的风险。当前核酸检测技术应用于血液筛查仍处于探究阶段,但从检测结果来看,已初步表明 NAT 检测应用于血液筛查的可行性。血液筛查常规项目增加 NAT 检测还有许多问题需要解决,首先受到检测成本制约,这也是难以大范围开展 NAT 检测的关键问题。随着国产试剂可靠性增强与生产成本的降低,NAT 技术将具有广泛的应用前景。

## 参考文献

- [1] 何成山,马晨芸,陆志成.化学发光免疫分析法检 HBcAb 阳性、HBsAg 阴性血清中隐匿性乙型肝炎病毒感染的分析[J]. 标记免疫分析与临床,2019,26(1):130-133,172.
- [2] Eilard A,Andersson M,Ringlander J,et al.Vertical acquired occult hepatitis B virus infection may become overt after several years[J].J Infect, 2019,78(3):226-231.
- [3] 徐利强,李建华,倪修文,等. ELISA 联合 NAT 技术在献血者血液筛查和输血残余风险分析中的应用[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2018,32(4):407-410.
- [4] 安哲,李思鹏,张妮,等. 抗 HBs 对 HBsAg 和抗 HBs 共存慢性 HBV 感染者的临床价值[J]. 标记免疫分析与临床,2018,25(8):1104-1106.
- [5] 蒋呢真,王金花,陈晓莉. 单独抗-HBs 阳性献血者 HBVDNA 阳性原因分析[J]. 中国输血杂志,2019,32(4):370-373.
- [6] 杨廷荣. 乙肝病毒 HBV DNA 定量与乙肝血清学标志物定量联合检测 HBV 感染的效果研究[J]. 临床检验杂志,2019,8(2):91-92.
- [7] Li L,Han TT,Zang L,et al. The current incidence, prevalence, and residual risk of hepatitis B viral infections among voluntary blood donors in China[J]. BMC Infect Dis. 2017,17: 154.
- [8] Huang X,Hollinger FB.Occult hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma: a systematic review[J]. J Viral Hepat,2014,21(3):153-162.
- [9] World Health Organization (WHO).Progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2019[EB/OL]. (2020-07-21) [2022-02-21]. <https://www.who.int/zh/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>.
- [10] Vitale F,Tramuto F,Orlando A,et al. Can the serological status of anti HBe alone be considered a sentinel marker for detection of occult HBV infection[J]. J Med Virol,2008,80(4):577-582.
- [11] Azarkar Z,Ziaee M,Ebrahimzadeh A,et al.Epidemiology, risk factors, and molecular of occult hepatitis B infection among anti-hepatitis B core antigen alone subjects[J]. J Med Virol,2019,91(4):615-622.
- [12] 国家卫生健康委员会.血站技术操作规程(2019 版)[Z]. 2019-08-20.
- [13] 张叁涛,彭华丽,段元山,等. 核酸检测与血清学检测在输血传染病筛查中的应用[J]. 临床输血与检验,2018,20(6):578-581.
- [14] World Health Organization. Hepatitis B[EB/OL]. (2020-07-27) [2022-02-21]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>.
- [15] 王富珍,郑徽,孙校金,等. 中国控制乙型病毒性肝炎的成就与展望[J]. 中国疫苗和免疫,2019,25(5):487-492.
- [16] Makvandi M. Update on occult hepatitis B virus infection[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(39):8720.
- [17] 邹军,王杰,王露楠,等. 隐匿性乙型肝炎病毒感染及相关输血安全问题的研究进展[J]. 中华传染病杂志,2020,38(6):385-388.
- [18] Raimondo G,Locarnini S,Pollicino T,et al. Update of the statements on biology and clinical impact of occult hepatitis B virus infection[J].J Hepatol, 2019, 71(2):397-408.
- [19] Nguyen K, Van Nguyen T, Shen D, et al. Prevalence and presentation of hepatitis B and C virus (HBV and HCV) infection in Vietnamese Americans via serial community serologic testing[J]. J Immigr Minor Health, 2015, 17(1):13-20.
- [20] 鲁凤民,廖昊,刘永振,等. 隐匿性乙型肝炎病毒感染再认识[J]. 中华预防医学杂志,2019,53(5):445-449.
- [21] Lelie N,Bruhn R,Busch M,et al. Detection of different categories of hepatitis B virus (HBV) infection in a multi-regional study comparing the clinical sensitivity of hepatitis B surface antigen and HBV-DNA testing[J]. Transfusion, 2017, 57(1):24-35.

收稿日期:2022-01-20