

疾病预防控制中心下发,在有效期内使用。双向肝浸液培养基为本实验室自配,高压灭菌后备用。血样采自 2010 年疾病预防控制中心对从事养殖业(放羊人员、兽医、屠宰工人)600 例高危人群。

1.2 方法 600 例高危人员的血样同时做虎红平板凝集反应、抗体测定试管凝集试验和细菌学检验。虎红凝集反应采用快速玻片血清凝集反应。抗体测定采用试管凝集试验参考标准河南省布氏菌病疫情监测方案布氏菌诊断标准及处理原则 1:100++ 及以上判定为阳性,同时将血样接种于双向肝浸液培养基培养分离布氏菌。

2 结 果

2.1 虎红平板凝集试验 600 例高危人员有 125 例虎红平板凝集反应判为阳性,其他均判为阴性。

2.2 抗体测定 600 例高危人员有 18 例试管凝集试验效价在 1:100++ 及以上判为阳性,2 例 1:50++ 判为可疑,其余均判为阴性。

2.3 细菌学检验 600 例高危人员的血样接种于双向肝浸液培养基分离培养后,有 22 例分离出布氏菌,检出率为 3.7%。其中在抗体测定的 2 例疑似、2 例阴性中也分离出了布氏菌。

2.4 结果对比分析 600 例血样经快速平板凝集反应结果判为阳性有 125 例,抗体测定结果判为阳性的有 18 例、2 例疑似。经细菌学检验分离到布氏菌的有 22 例,经快速平板凝集反应、抗体测定和细菌学检验结果相符的有 18 例。其中,3 例抗体测定效价在 1:400++++ 的布病患者血样中分离到布氏菌,15 例抗体测定效价在 1:100++++~1:200++ 中分离到布氏菌。另外,从 2 例疑似、2 例阴性血样中同样也分离到布氏菌。这初步说明,抗体测定效价高低与细菌学检验是否能分离出布氏菌不一定存在必然的关系。快速玻片血清凝集反应,此法优点是操作简便易行,反应迅速且敏感,适合于大

面积筛查。细菌学检验准确率比较高,细菌培养的营养苛求而且时间较长,不适合临床诊断^[3]。抗体测定实用于临床诊断,应以抗体测定诊断为主。

3 讨 论

布氏病存在于我国大部分地区,而我市确诊的病例也逐渐增多。除直接接触病羊的农牧民及屠宰户发病率高外,因饮食不卫生导致患病的散在病例也有出现。这种情况应与重视^[4]。本文通过 600 例样本 3 种试验结果的对比,认为抗体测定结果与细菌学检验结果不一定存在必然的对应关系。建议对直接接触者、症状疑似而抗体测定结果为阴性的患者做一下细菌学检测,以防漏检,造成误诊。同时也提醒广大人民,除直接接触人员要切实做好个人防护外,喜欢食用牛、羊肉、奶的人们一定要熟透再食用,以防病从口入^[5]。

参考文献

- [1] 张卓然,倪语星. 临床微生物和微生物检验[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2003.
- [2] 张士义,朱岱,江森林. 中国布鲁氏病防治 50 年回顾[J]. 中国地方病防治杂志,2003,18(5):275-276.
- [3] 丁健,张静,张海燕. 2005~2006 年新疆福海县布氏菌病监测报告[J]. 地方病通报,2007,22(5):61.
- [4] 徐朝阳,刘波. 秦皇岛市 1996~2006 年人间布氏菌病流行特征及流行因素分析[J]. 医学动物防治,2007,23(9):677-678.
- [5] 宋艳文,张相萍. 布氏菌病患者抗体测定与细菌学检验结果的对比分析[J]. 检验医学与临床,2008,10(5):604.

(收稿日期:2011-10-28)

时间分辨免疫荧光技术在乙型肝炎病毒标志物测定中的应用

李先莉(四川省达州市中心医院检验科 635000)

【摘要】 目的 通过时间分辨免疫荧光技术(TRFIA)和酶联免疫吸附试验(ELISA)对乙型肝炎(简称乙肝)病毒标志物(HBV-M)测定结果的比较,探讨 TRFIA 在 HBV-M 测定中的应用。**方法** 采用 TRFIA 和 ELISA 及其配套试剂盒对 2 350 例临床标本同时测定 HBV-M,并对结果进行比较分析。**结果** 与 ELISA 相比,TRFIA 在乙肝病毒表面抗原(HBsAg)与乙肝病毒 e 抗原(HBeAg)的测定上差异均无统计学意义($P>0.05$),而在乙肝病毒表面抗体(抗-HBs)、乙肝病毒 e 抗体(抗-HBe)及乙肝病毒核心抗体(抗-HBc)的测定上差异均有统计学意义($P<0.01$)。在 HBV-M 模式的检测方面,TRFIA 与 ELISA 相比灵敏度明显提高,特别是对抗-HBs、抗-HBe、抗-HBc 模式的检出率显著增高($P<0.05$)。**结论** TRFIA 较 ELISA 特异性强、灵敏度高,是一种比较理想的定量检测方法,并能为疫苗接种提供可靠依据。选择恰当的方法才能降低实验室的不确定度,为室内质量控制建立良好的基础,更好地服务于临床。

【关键词】 时间分辨免疫荧光技术; 酶联免疫吸附试验; 乙型肝炎病毒标志物

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.05.051 文献标志码:B 文章编号:1672-9455(2012)05-0602-02

我国是乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染高发区,乙型肝炎(简称乙肝)为我国的常见病及多发病,本病病程迁延,易转变为慢性活动性肝炎、肝硬化及肝癌,对社会劳动力影响极大,有效地预防和治疗 HBV 感染是临床一项艰巨的任务。乙肝表面抗原(HBsAg)是临床实验室最为常用的检验项目之一^[1],其正确与否直接关系病情的诊断。HBV 病毒血清标志物早期、准确的检测为临床对乙型肝炎感染的预防、诊断及疗效观察提供重要的依据。临床上最常用的检测乙肝血清

标志物的方法是酶联免疫吸附试验(ELISA),该法简便快速,成本低廉,但受其方法学限制,检测灵敏度低,结果易受环境、操作等多种因素影响,并且只能提供定性的结果,给病情监测、疗效观察及预后评估等带来了不便。时间分辨免疫荧光技术(TRFIA)是近年来发展起来的乙肝血清标志物的定量检测方法,灵敏度高,稳定性好。本文总结了本院自 2008 年以来乙型肝炎病毒标志物(HBV-M)检测结果 2 350 例,通过对比上述两种方法的测定结果,初步探讨两种检测方法的关系和了解

TRFIA 的临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2008 年以来在本院就诊的检测乙肝病毒标志物的门诊、体检及住院患者 2 350 例,年龄 20~65 岁。

1.2 试剂 ELISA 检测采用厦门新创生物工程有限公司生产的 HBV 配套试剂盒(内含阴性、阳性对照血清),批批检,有效期内使用。TRFIA 检测采用苏州新波生物技术有限公司提供的配套试剂盒。

1.3 仪器 酶标仪为郑州安图公司提供的 Anthes 2010 酶标仪,ANYTEST 时间分辨荧光分析仪由苏州新波生物技术有限公司提供。

1.4 方法 同时采用 TRIFA 和 ELISA 对 2 350 例血清标本进行 HBV-M 测定,所有操作均严格按照说明书进行。ELISA 方法检测参照《全国临床检验操作规程》^[2],乙肝病毒表面抗体(抗-HBs)和乙肝病毒 e 抗原(HBeAg)采用双抗体夹心法原理;乙肝病毒核心抗体(抗-HBc)和乙肝病毒 e 抗体(抗-HBe)采用竞争法原理检测。

1.5 统计学方法 计数资料以率(%)表示,检测结果采用 χ^2 检验进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

两种方法在 HBsAg 和 HBeAg 的检出率上差异无统计学意义($P > 0.05$),其他 3 项的检出率差异均有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 两种方法检测乙肝病毒标志物的结果($n = 2\ 350$)

| 检测项目 | ELISA | TRFIA | | 符合率 (%) | 灵敏度 (%) | 特异性 (%) |
|--------|-------|-------|-------|---------|---------|---------|
| | | + | - | | | |
| HBsAg | + | 830 | 0 | 99.1 | 100.0 | 98.7 |
| | - | 20 | 1 500 | | | |
| 抗-HBsA | + | 1 200 | 10 | 92.3* | 99.2 | 85.1 |
| | - | 170 | 970 | | | |
| HBeAg | + | 280 | 0 | 99.1 | 100.0 | 99.0 |
| | - | 20 | 2 050 | | | |
| 抗-HBe | + | 810 | 0 | 92.3* | 100.0 | 88.3 |
| | - | 180 | 1 360 | | | |
| 抗-HBc | + | 1 270 | 0 | 90.2* | 100.0 | 78.7 |
| | - | 230 | 850 | | | |

注:与 ELISA 相比,* $P < 0.01$ 。

3 讨论

ELISA 法是定性方法,尽管吸光度比值批内变异系数能满足临床的需要,但批间的差异无法控制,加上其吸光度判断阴阳性,无法准确得知被测物的真正浓度,给临床诊断和治疗造成一定的困难。由于其操作简便快速,成本低廉,适于大批量样本检测,灵敏度、特异性基本满足乙肝病毒标志物定性检测的要求,临床上检测乙肝病毒血清标志物应用最多的是 ELISA 法,但该方法的影响因素较多,检测结果易受操作手法、前带现象^[3]等多种因素的影响,会出现假阳性或者假阴性,从而造成漏诊和误诊。而 TRFIA^[4]法是采用镧系稀土元素及其螯合物(如 Eu^{3+})作为示踪标记抗体或抗原来检测标本中的相应的抗原或抗体,最后在微孔板表面形成抗-HBs、HBsAg、抗-HBs、DTTA-Eu(DTTA-Eu 钕标记试剂),洗涤除去游离的钕标记抗-HBs,加入增强液将复合物上的 Eu^{3+} 解离到溶液

中,并与增强液中的有效成分形成高荧光强度的螯合物,其荧光强度与样本中的 HBsAg 浓度成正比,利用时间分辨荧光分析仪在激发后延迟测量时间,避免了非特异性荧光的干扰,提高了检测的特异性。根据镧系元素发光时 Stokes 位移大^[5],可达 290 nm,有效地避免了由于 Stokes 位移小、激发光谱和发射光谱部分重叠而造成的干扰,提高了光谱的分辨率。

本文 TRFIA 检测 HBV-M 与 ELISA 符合率在 90% 以上,灵敏度在 99% 以上,特异性也较高。上表结果提示 TRFIA 测定乙肝病毒标志物的灵敏度较 ELISA 高尤其是在抗体的测定上,可检测出低浓度的标志物,对减少 HBV 感染的漏诊及误诊有重要意义。

TRFIA 能准确检测各项乙肝病毒标志物的具体浓度,弥补了 ELISA 只能定性判断的不足,对乙肝病程、治疗及预后起到了一个全面动态监测作用,为临床指导用药提供可靠实验依据。特别是抗-HBs 浓度的定量监测,有利于对乙肝疫苗免疫力进行评价^[6],对乙型肝炎预防具有重要意义。本文两对半模式测定 TRFIA 共测出 10 种模式,而 ELISA 共测出 11 种模式。两对半模式检测上 TRFIA 明显比 ELISA 的检出率高。可能是 HBV 病毒发生变异后,表达量较低,也可能是处于血清学转换阶段,常规 ELISA 测不出低浓度的抗原或抗体。

综上所述,TRFIA 不仅是目前最具发展前途的超微量分析技术^[7],而且是一种比较理想的乙肝病毒标志物的定量测定方法。TRFIA 具有灵敏度高、特异性强、示踪物稳定、标准曲线范围宽、不受样品自然荧光干扰、无放射性污染等优点^[8],与 ELISA 相比,其操作避免人为因素所造成的干扰,结果更加客观。随着 TRFIA 仪器及试剂国产化、检测费用的降低,TRFIA 将逐步推广。

参考文献

- [1] 陈曲波,李金明,李强,等.基于日常检测结果的 HBsAg 定性检测假阳性或假阴性的室内质量控制[J].广东医学,2008,29(5):789-790.
- [2] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3 版.南京:东南大学出版社,2006.
- [3] 刘中国,徐峰,王卫,等.时间分辨荧光免疫分析检测乙肝病毒血清标志物的临床评价[J].实用医院临床杂志,2004,1(2):84.
- [4] 李振甲,陈泮藻,高平,等.时间分辨荧光分析技术与应用[M].北京:科学出版社,1996:3.
- [5] 沈健,林德球,徐杰.时间分辨荧光免疫分析技术研究现状及进展[J].生命科学,2004,16(1):55.
- [6] 杜为强,陈小桃,曾钊宇.时间分辨荧光免疫分析在抗-HBs 检测中的应用[J].检验医学与临床,2009,6(9):668-669.
- [7] 杭建峰,吴英松,李明.时间分辨荧光免疫分析的研究进展及应用[J].热带医学杂志,2004,4(3):340-343.
- [8] 袁汉尧,吕世静,黄日安,等.乙肝病毒标志物时间分辨荧光免疫测定与放射免疫测定的分析比较[J].数量医学杂志,2003,16(5):456-458.

(收稿日期:2011-10-23)