

时间分辨荧光法检测乙型肝炎病毒血清标志物的检出限探讨

秦雯, 胡大春, 肖利华(昆明市第一人民医院检验科 650011)

【摘要】 目的 确立时间分辨荧光方法检测血清乙型肝炎病毒(乙肝)表面抗原(HBsAg)、乙肝表面抗体(HBsAb)、乙肝 e 抗原(HBeAg)、乙肝 e 抗体(HBeAb)以及乙肝核心抗体(HBcAb)(俗称乙肝两对半)的检出限(LOD), 以指导其检测结果的合理解释与应用。**方法** 参考美国临床检验标准化委员会(CLSI)EP17-A 文件提供的方案和相关文献, 建立实验室时间分辨荧光分析仪检测血清乙肝两对半的空白限(LOB)及 LOD。**结果** 时间分辨荧光分析仪检测血清乙肝两对半中 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb 的 LOB 分别为 0.042 5 ng/mL、0.500 5 mIU/mL、0.000 PEIU/mL、0.997 DRU/mL、0.091 DRU/mL; LOD 分别为 0.163 ng/mL、1.203 mIU/mL、0.401 PEIU/mL、1.756 DRU/mL、0.350 DRU/mL。**结论** 时间分辨荧光方法检测血清乙肝两对半, 均有较低的检出限, 可较敏感地检出血清乙肝两对半中的各项抗原及抗体, 早期指导临床对乙型肝炎病毒感染的诊断、疗效的观察及预后的判断。

【关键词】 乙型肝炎病毒; 乙型肝炎病毒标志物; 时间分辨荧光方法

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.01.013 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)01-0034-03

Study on TRFIA for detecting detection limit of hepatitis B virus serological markers QIN Wen, HU Da-chun, XIAO Li-hua (Department of Clinical Laboratory, Kunming Municipal First People's Hospital, Kunming, Yunnan 650011, China)

【Abstract】 Objective To establish the limit of detection(LOD) of hepatitis B surface antigen(HBsAg), HbsAb, HbeAg, HbeAB and HBcAB by using the time-resolved fluorescence immunoassay(TRFIA) in order to guide the reasonable interpretation and application for their detection results. **Methods** Referring to the scheme and the related literature provided by the EP17-A document of CLSI, the limit of blank(LOB) and the limit of detection(LOD) of the hepatitis B serological markers by using TRFIA were established. **Results** LOB of serum HBsAg, HbsAb, HbeAg, HbeAb and HBcAb was 0.042 5 ng/mL, 0.500 5 mIU/mL, 0.000 PEIU/mL, 0.997 DRU/mL and 0.091 DRU/mL respectively; LOD was 0.163 ng/mL, 1.203 mIU/mL, 0.401 PEIU/mL, 1.756 DRU/mL and 0.350 DRU/mL respectively. **Conclusion** TRFIA for detecting serum hepatitis B serological markers has the lower LOD, can more sensitively detect each antigen and each antibody of hepatitis B serological markers and early guide clinical diagnosis of hepatitis B virus infection, efficacy observation and prognosis judgment.

【Key words】 hepatitis B virus; hepatitis B virus markers; TRFIA

乙型肝炎(乙肝)病毒(HBV)感染是全球的公共卫生问题,估计全世界 HBV 携带者达 3.5 亿人之多,我国人口携带率约为 1.2 亿。乙肝的诊断依赖于对其标志物的检测,血清乙肝两对半[乙肝病毒表面抗原(HBsAg)、乙肝表面抗体(HBsAb)、乙肝 e 抗原(HBeAg)、乙肝 e 抗体(HBeAb)以及乙肝核心抗体(HBcAb)]传统的筛查方法是酶联免疫吸附法,该方法对血清 HBsAg 的检测灵敏度为 2 ng/mL^[1],低于 2 ng/mL 的低浓度标本检测结果表现表现为阴性。慢性乙型肝炎患者中由于抗体缺乏对 HBV 包膜蛋白的免疫应答使得 HBV 相应标志物浓度较低,HBV 感染早期等病毒含量较低,酶联免疫吸附法有可能检测不到,表现表现为乙肝两对半阴性。文献报道时间分辨荧光免疫技术检测 HBsAg 灵敏度可达 0.2 ng/mL,能提高 HBV 感染的诊断率并缩短检测窗口期^[2]。近年来美国临床检验标准化委员会(CLSI)对检测方法的灵敏度提出了新的概念^[3],分别采用空白限(LOB)、检出限(LOD)、测定限(LOQ)从不同的层面表述方法的检测灵敏度,对于定性报告

的检测方法,LOD 的确定尤其重要。本文对时间分辨荧光法检测血清乙肝两对半的检出限进行探讨,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料与设备 时间分辨荧光法乙肝两对半诊断试剂盒由中山大学达安基因股份有限公司提供,为同一批号试剂。UranusAE100 全自动酶联免疫检测仪为爱康公司产品、时间分辨荧光免疫分析仪 M6601 为达瑞公司产品。

1.2 标本处理 空白样品:用未感染乙型肝炎的患者的阴性血清(HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb 均为阴性)作为空白样品,共 6 份,用于时间分辨荧光方法检测 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb 的 LOB。低浓度样品:将时间分辨荧光方法检测出 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb 各项已知浓度的标本,用试剂盒中的分析缓冲液稀释为 6 个低浓度的标本,用于时间分辨荧光方法检测 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb 的 LOD。

1.3 方法 由于试剂生产厂商对 HBsAg、HBsAb、HBeAg、

HBsAb、HBcAb 的 LOB 未提供申明,因此本实验室选择 60 个数据建立 LOB、60 个数据建立 LOD。检测时仪器状态良好,操作人员固定,熟练掌握仪器的各项操作规程,使用自制质控品,CV 为 17%,室内质量控制 在控,按时间分辨荧光方法检测 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb 的操作说明书检测空白标本及低浓度标本,试剂批号为 20110101C。

1.3.1 LOB 的确定 对 6 个空白标本用时间分辨荧光法乙肝两对半定量检测试剂在 UranusAE100 全自动酶联免疫检测仪器上完成加样、孵育、洗板等步骤,在时间分辨荧光免疫分析仪 M6601 上测定荧光强度,通过标准曲线得到标本中 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb 的浓度。每天检测 2 次,重复 5 d 检测,共得 60 个空白标本数据。对这 60 个空白标本数据进行分布检验,并根据数据分布情况选用参数或非参数方法计算 LOB。空白值呈非正态分布则用非参数方法估计第 95 百分位数(PctB)的值^[4],即 $LOB = PctB_{100-\alpha}$,即 $LOB = [NB(\rho/100) + 0.5]$ 位置的结果(NB 是重复检测的次数, ρ 是百分位数)。

1.3.2 LOD 的确定 每天按照理论浓度稀释为 6 个低浓度的稀释标本,稀释后用与空白标本检测相同的程序对这 6 个低浓度标本进行检测,每个浓度重复 2 次检测,共检测 5 d,共得 60 个低浓度标本数据。对这 60 个数据进行分布检验,并根据分布情况选用参数或非参数方法计算 LOD。检测过程中,为使检测标本的基质相同,在对 HBsAg 低浓度标本进行稀释时使用相同的分析缓冲液,且不选用有溶血、脂血、黄疸或含有某些特定药物的标本,以便排除可能的干扰。

低浓度样品检测结果呈正态分布^[5], $LOD = LOB + C_{\beta} s_s$ 。计算多个低浓度样品的综合标准差(s_s): $s_s^2 = (n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2 + n_3 s_3^2 + \dots + n_m s_m^2) / (n_1 + n_2 + n_3 + \dots + n_m)$ 式中 $n_1 n_2 \dots$

n_m 代表不同低浓度样品的自由度。 C_{β} 是标准正态分布第 95 百分位数值 的校正因子, $C_{\beta} = 1.645 / (1 - 1/4)^{1/2}$, β 是 s_s 的自由度。

2 结 果

2.1 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb 空白标本检测结果 分别检测 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb 60 个空白标本,对检测得到的 60 个空白标本数据作升序排列,显示空白标本检测数据结果呈偏态分布,故使用公式 $LOB = PctB_{100-\alpha}$,LOB 在 $[NB(\rho/100) + 0.5]$ 位置的结果。其中 NB 为 60, ρ 为 95%, $LOB = [60(95/100) + 0.5] = 57.5$,即第 57、58 位数的中间值。故 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb 使用上述公式计算的 LOB 结果分别为 0.042 5 ng/mL、0.500 5 mIU/mL、0.000 PEIU/mL、0.997 DRU/mL、0.091 DRU/mL。

表 1 乙肝两对半的理想稀释浓度 (ng/mL)

项目	浓度 1	浓度 2	浓度 3	浓度 4	浓度 5	浓度 6
HBsAg	0.05	0.15	0.25	0.35	0.45	0.55
HBsAb	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00	6.00
HBeAg	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60
HBeAb	1.00	1.50	2.00	2.50	3.00	3.50
HBcAb	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35

2.2 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb 低浓度标本检测数据结果见表 1。HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb 乙肝两对半各组稀释浓度标本标准差及 LOD 如表 2 所示。

表 2 乙肝两对半各组稀释浓度标本标准差及 LOD (ng/mL)

项目	浓度 1 s	浓度 2 s	浓度 3 s	浓度 4 s	浓度 5 s	浓度 6 s	s_s^2	s_s	LOD
HBsAg	0.029 5	0.030 7	0.075 4	0.064 6	0.069 9	0.124 3	0.005 3	0.07 3	0.163
HBsAb	0.339 6	0.307 5	0.399 3	0.671 7	0.357 6	0.367 3	0.180 6	0.424 9	1.203
HBeAg	0.053 3	0.139 8	0.144 8	0.314 5	0.249 0	0.385 0	0.058 7	0.242 4	0.401
HBeAb	0.303 4	0.450 1	0.301 6	0.431 7	0.450 9	0.701 0	0.211 1	0.459 5	1.756
HBcAb	0.066 6	0.081 4	0.123 6	0.220 6	0.128 2	0.237 2	0.024 6	0.156 9	0.350

3 讨 论

时间分辨荧光方法采用镧系元素作为标记物,镧系元素螯合物的荧光寿命较长(10~1000 μs),背景荧光寿命较短,可有效地降低本底荧光的干扰;镧系元素的荧光 stokes 位移较大,可使激发光与发射光分开,消除激发光的散射干扰;镧系元素发射光谱较窄,多在(613 $\pm$ 10)nm,(615 $\pm$ 5)nm 的滤光片只允许此波段荧光通过,减少了来自生物样品荧光的干扰,有效降低了本底荧光,激发光谱较宽有利于增加激发能,故检测灵敏度较高^[6]。建立时间分辨荧光方法检测乙肝两对半的检测灵敏度对指导其结果的合理解释及应用有重要意义,有关文献报道时间分辨荧光方法检测乙肝两对半的灵敏度为 0.2 ng/mL,但具体的检测灵敏度方法不明确^[1]。2004 年美国临床检验标准化协会发布了 EP17-A 文件,即“检出限和定量检出限确定

方案-批准指南”^[5],该方案推荐使用 LOB、LOD 和 LOQ 来表示检测系统或方法的灵敏度性能。可直接把分析仪输出的浓度或质量单位结果用于估计限值,不以数据是否为正态分布为前提,以检验的允许误差来估计定量限值,充分保证了检测结果即使在低值条件下也能符合临床需求的质量管理要求^[6]。

参照 EP17-A 文件提供的方案及 CNAS-C130 的要求,本文对时间分辨荧光方法检测乙肝两对半的 LOB 和 LOD 进行检测。LOB 是指在规定的可能性条件下,空白样品被观察到的最大检测结果。LOB 不是检测到的实际浓度,是确保在实际浓度处的阳性信号成为检出限,是含有分析物等于 LOD 水平的样品预期得到的最低值;这和“检测下限”相同,由规定的测量程序得到,可以给出一定测量不确定度的最低检测结果,也称为“临界值”^[7]。本文参照该方案确立的 HBsAg、HBsAb、

HBeAg、HBeAb、HBcAb 的 LOB 分别为 0.042 5 ng/mL、0.500 5 mIU/mL、0.000 PEIU/mL、0.997 DRU/mL 和 0.091 DRU/mL,与黄永富等^[8]的检测结果基本一致,说明并不是所有的空白标本都没有信号输出,可能会有很少许本底荧光的干扰或其他因素的影响。

LOD 是指标本中分析物的最小量,可以在规定的可能性条件下予以检出,但也许还不能量化为一个确切的值。也被称为“检测下限”、“最小的可检测浓度”,有时也用于指示“灵敏度”。LOD 是这个样品的实际浓度,它是可靠检测到的最低实际浓度。本文参照该方案确立的 HBsAg 最低 LOD 为 0.163 ng/mL,较上述文献报道的检测灵敏度为 0.2 ng/mL 低,较试剂说明书给出的 HBsAg 最低检出量 adr 亚型为 0.2 ng/mL、adw 亚型为 0.5 ng/mL;ay 亚型为 0.5 ng/mL 均低,证实时间分辨荧光方法能较为敏感的检出血清中的 HBsAg,只要在此检出限以上的结果均说明血清中的 HBsAg 是有一定含量的,能较好地检测出灰区标本,可在一定程度上减少漏诊率,避免误诊。HBeAb 最低 LOD 为 1.203 mIU/mL,较试剂说明书给出的 HBsAb 最低检出量应不高于 5 mIU/mL 为低,HBeAg、HBeAb、HBcAb 最低 LOD 分别为 0.401 PEIU/mL、1.756 DRU/mL、0.350 DRU/mL,均较试剂说明书给出的最低检出量为低,可能因不同的 TRFIA 检测系统所用设备、标记物、分析原理等均不相同,且缺乏参考方法,以及工作人员对仪器的操作、试验标本存在差异的原因。由此可见乙肝两对半定量检测较定性检测更敏感,在 HBV 标志物处于低浓度时,定性检测可表现为阴性,而定量检测仍可检出,检测到的最低实际浓度即检测限则能较好地帮助临床诊断是否感染了乙肝,决定治疗方案,因此确定检测限就显得尤为重要。同时可提高乙肝诊断率并缩短检测窗口期,合理指导时间分辨荧光方法检测乙肝两对半结果的解释,真正指导临床对乙肝的诊断、疗效的观察

及预后的判断,对乙肝的早期诊断、预防接种方面有重要的临床意义。但如果要为临床诊断乙肝提供更为准确、完整的报告,还必须确立 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb 的定量 LOQ,这将在下一步的工作中完成。

参考文献

[1] 宋海容. 乙肝五项定量在乙型肝炎检测中的应用[J]. 中国实用医刊, 2009, 36(21): 57-58.

[2] 谭玉华, 陈鲜美, 卢顺舵, 等. 时间分辨荧光免疫分析法乙型肝炎血清学标志物分析灵敏度的建立与分析[J]. 中国医学检验杂志, 2006, 7(4): 228-230.

[3] NCCLS. EP17-A. Prolcols for derermination of delection and limits of quantitation; approved guideline[S]. Wayne, PA: NCCLS, 2004: 1-39.

[4] 温冬梅, 张秀明, 王伟佳, 等. 化学发光免疫法检测 AFP 的空白限、检出限和定量检测限的建立与评价[J]. 临床检验杂志, 2010, 28(6): 469-471.

[5] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础[M]. 2 版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2007: 119-138.

[6] 王兰兰, 吴建民. 临床免疫学与检验[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 88-89.

[7] NCCLS. Evaluation of the L in earity of quantitative analytical methcds a statistical approach. approved Guideline, EP6-A[M]. Wayne, PA: NCCLS, 2003: 1-46.

[8] 黄永富, 黄介飞, 丛飞, 等. 时间分辨荧光免疫分析法检测乙型肝炎血清标志物的分析方法性能验证[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(5): 543-547.

(收稿日期: 2014-03-22 修回日期: 2014-08-15)

(上接第 33 页)

14(4): 212-213.

[2] 陈庆良, 郭志刚, 王联群, 等. 65 岁以上患者非体外循环下冠状动脉搭桥术围术期肾损伤的危险因素及预后关系[J]. 中华医学杂志, 2010, 90(48): 3407-3410.

[3] Takagi H, Manabe H, Umemoto T. Late mortality in off-pump versus on pump coronary artery bypass grafting: a meta-analysis of propensity score adjusted studies[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2011, 142(2): 475-477.

[4] 王明岩, 高长青, 王刚, 等. 非体外循环冠状动脉旁路移植术后大隐静脉序贯桥与单支桥中期通畅率的比较[J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2011, 18(5): 399-403.

[5] 汪慧. 高危冠心病非体外循环冠状动脉旁路移植术 120 例术后护理[J]. 齐鲁护理杂志: 中旬刊, 2011, 17(7): 24-25.

[6] Puskas JD, Stringer A, Hwang SN, et al. Neurocognitive and neuroanatomic changes after off-pump versus on-

pump coronary artery bypass grafting: long-term follow-up of a randomized trial[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2011, 141(5): 1116-1127.

[7] 庄兰. 体外与非体外循环冠状动脉搭桥术临床效果及成本对比[J]. 现代预防医学, 2010, 37(20): 3961-3962, 3965.

[8] 赵岩, 潘军, 王东进. 体外与非体外循环下冠状动脉旁路移植术对照研究的 Meta 分析[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(31): 5773-5777.

[9] 朱宇翔, 王凯, 孔祥荣. 非体外循环下冠状动脉搭桥术对冠心病的临床疗效[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(18): 4077-4078.

[10] 车建波. 非体外循环冠状动脉搭桥术的临床疗效观察[J]. 中国医学工程, 2013, 21(11): 118.

(收稿日期: 2014-04-25 修回日期: 2014-09-16)