

时间分辨荧光免疫法乙型肝炎病毒 e 抗原定量测定试剂盒的研制与性能评价*

谭玉华^{1△}, 曾 华^{2#}, 魏绍静^{3#}, 董 梅^{4#}, 陈建起¹, 袁国悦¹, 李水珍¹, 王佳佳¹, 吴道贫¹

(1. 广州市丰华生物工程有限公司, 广州 501730; 2. 中山大学孙逸仙纪念医院检验科, 广州 510120;

3. 广州市第八人民医院检验科, 广州 510060; 4. 中国人民解放军第三〇九医院检验科, 北京 100091)

摘要:目的 对自研时间分辨荧光免疫法(TRFIA)乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)定量测定试剂盒进行性能评价。方法 2 株单克隆抗体分别用于固相包被和锚标记, 固相双抗体夹心二步分析法检测人血清 HBeAg, 并对自研试剂盒线性范围、精密度、分析灵敏度、特异度等进行评价, 与对照试剂盒平行检测 1 020 例样本, 检验结果采用线性回归分析, 一致性采用 Kappa 检验。结果 自研试剂盒线性范围为 0.60~160 NCU/mL, 相关系数达 0.99, 批内和批间变异系数均小于 10%, 灵敏度达 0.05 NCU/mL, 检测国家标准物质或自制参考品的效价比为 0.90~1.10, 检测国家参考品符合国家的质量检定标准, 37℃ 恒温箱烘烤 6 d 后检测性能无明显改变, 与同类试剂检测结果线性相关系数达 0.95, 临床研究试验总符合率达 100%, Kappa 指数为 1。结论 自研试剂盒精密度高、灵敏度高、准确性好、线性范围宽、符合率高, 可取代对照试剂盒, 值得推广应用。

关键词:时间分辨荧光免疫法; 乙型肝炎病毒 e 抗原; 试剂盒, 诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.18.034

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)18-2242-03

乙型肝炎病毒(HBV)感染是发病率极高的传染性疾病, 且每年约有 100 万人死于 HBV 感染所致肝衰竭、肝硬化和原发性肝癌^[1]。HBV 血清标志物(HBV-M)检测是 HBV 感染辅助诊断的重要依据, 特别是 HBV DNA、乙型肝炎表面抗原(HBsAg)和乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)检测为临床抗病毒治疗提供了有效依据^[2]。HBeAg 检测是预测抗病毒疗效的有效指标, 可间接反映机体免疫状态和对抗病毒治疗的应答情况^[1-7]。美国、欧洲以及亚太地区慢性乙型肝炎指南或者共识都将 HBeAg 血清学转换作为 HBeAg 阳性患者抗病毒治疗的治疗终点。明确 HBeAg 定量检测的意义, 逐步实现 HBeAg 定量检测的标准化和临床推广极为重要^[2]。HBeAg 定量测定试剂的研发和商品化是进一步临床研究的先决条件^[7]。卫生部临床检验中心于 2008 年研制了 HBeAg 血清标准物质, 为中国 HBeAg 检测规范化和标准化奠定了基础。因此, 以 HBeAg 血清标准物质为试剂量值溯源, 笔者利用时间分辨荧光免疫法(TRFIA)研制了 HBeAg 定量测定试剂盒, 并对试剂盒性能进行了评价, 现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 按《体外诊断试剂临床研究技术指导原则》^[8]的要求, 在中山大学孙逸仙纪念医院、广州市第八人民医院、中国人民解放军第三〇九医院采集临床标本共 1 020 例。

1.2 试剂与仪器 HBeAg 基因重组抗原、针对不同位点的抗-HBe 单克隆抗体(MCea-1# 和 MCea-2#)购于北京中检维康技术有限公司; 牛血清清蛋白(BSA)购于美国 Sigma 公司; Sepharose CL-6B 购于瑞典 Pharmacia 公司; 96 孔微孔板购于深圳市金灿华实业有限公司。锚(Eu³⁺)标记试剂盒由 Wallac 公司提供; 增强液、洗涤液、实验缓冲液和样本稀释液均为自制; HBeAg 诊断试剂盒(TRFIA)、泰莱 TRFIA 仪、恒温振荡仪、全自动洗板机由广州市丰华生物工程有限公司提供; HBeAg 血清液体标准物质由卫生部临床检验中心提供;

100 U/mL HBeAg 校准物质为德国 Paul-Ehrlich 研究所提供; HBeAg 检测血清 panel 国家参考品由中国药品生物制品检定研究院提供; HBeAg 检测试剂盒(免疫荧光法)购于苏州新波生物技术有限公司; VictorTM2D1420 型 TRFIA 仪购于美国 Perkin Elmer 公司。

1.3 固相反应板的制备 用 50 mmol/L、pH7.8 Tris-HCl 缓冲液将 MCea-1# 稀释至最佳包被浓度, 每孔加入 100 μL, 4℃ 孵育过夜, 洗涤 1 次, 再每孔中加入含有 10 g/L BSA 的上述缓冲液 250 μL, 37℃ 孵育 2 h, 甩干后晾干, 真空封膜, 4℃ 保存。

1.4 锚标记物的制备 将 1 mg MCea-2# 加入带有滤膜的离心管中, 10 000 r/min 离心 9~10 min, 再用标记缓冲液重复洗涤 3~5 次; 将 200 μL MCea-2# 和 0.3 mg 锚标记试剂充分混匀, 4℃ 振荡(22±2)h; 反应液经用 50 mmol/L、pH7.8 Tris-HCl 缓冲液平衡的 Sepharose CL-6B 柱(1cm×40cm)层析, A₂₈₀ 监测收集第一洗脱峰。

1.5 试剂盒校准品的制备 将收集的 HBeAg 阳性血清按《中国生物制品规程(2000 版)》的要求进行处理。以 HBeAg 血清液体标准物质[GBW(E)090099]为参照, HBeAg 阳性血清或 HBeAg 基因重组抗原用含 50g/L BSA 的 50 mmol/L、pH7.8 Tris-HCl 稀释液定量稀释成 0、0.6、2.5、10、40、160 卫生部临床检验中心单位(NCU/mL)。以德国 Paul-Ehrlich 研究所提供的 HBeAg 校准物质为对照, 1.2 NCU/mL 约等于 1.0 Paul-Ehrlich Institute Unit/mL(PEI U/mL)。

1.6 方法学的建立 采用固相双抗体夹心 TRFIA。在固相抗体微孔反应板中依次加入 100 μL 校准品或样本, 室温振荡 60 min, 洗板 4 次拍干, 加入 100 μL 锚标记物工作液, 室温振荡 60 min, 洗板 6 次拍干, 加入 100 μL 增强液, 室温振荡 5 min, 将反应板放入泰莱 TRFIA 仪内进行荧光计数, 并用随机配备的分析软件进行数据分析。

* 基金项目: 广州经济技术开发区、广州高新技术产业开发区、广州出口加工区、广州保税区科技项目(重点科技攻关计划资助项目 2010Q-P174)。△ 通讯作者, E-mail: tanywhy@yahoo.com.cn。# 同为第二作者。

1.7 对照试剂与仪器操作 严格按照试剂盒说明书操作,仪器操作按其操作规程进行。

1.8 性能评价指标 参考有关文献对试剂盒的线性、精密度、灵敏度、准确度、稳定性等性能指标进行评价^[9-10]。

1.9 统计学处理 检测结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,待验证试剂盒与对照试剂盒的检测结果采用线性回归分析,并对相关系数 r 进行 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$;临床研究比对试验的一致性分析采用 Kappa 检验。

2 结 果

2.1 方法学反应体系 MCEab-1 # 抗体采用 pH 9.6、50 mmol/L 碳酸盐缓冲液稀释至 4 μ g/mL 进行包被,标记缓冲液为 pH9.0、50 mmol/L 碳酸盐缓冲液,销标记物用缓冲液按体积比 1 : 1 000 稀释后为最适工作浓度。

2.2 剂量反应曲线 通过最佳曲线拟合优化,采用 log-logB 双对数数学模式拟合。将 1 个高浓度 HBeAg 阳性血清做线性稀释,在 0.60~160 NCU/mL 内,稀释样本实测值与稀释比例的相关系数 r 可达 0.99。

2.3 精密度 检测自制低、中、高浓度质控品各 20 次,批内和批间变异系数(CV)均小于 10%,见表 1。

2.4 灵敏度 自制 0 NCU/mL 校准品 20 次检测荧光值为 $1\,281 \pm 192$,采用 95% 置信区间计算检测限, $\bar{x} + 2s$ 结果为 1 665,代入标准曲线计算浓度为 0.05 NCU/mL。

2.5 准确度 检测国家标准物质或经国家标准血清物质校准的自制参考品,标准物质或自制参考品实测效价与标示效价的比值为 0.90~1.10,见表 2。

表 3 3 批自研试剂盒检测国家参考品检测结果

国家参考品	份数	检定标准	第 1 批	第 2 批	第 3 批
阴性参考品	15 份(N1~N15)	15/15(—/—)	15/15	15/15	15/15
阳性参考品	10 份(P1~P10)	符合率 $\geq 9/10$ (+/+)	10/10	10/10	10/10
灵敏度参考品	1 # 1 : 32, 1 : 64, 1 : 128	1 # $\geq 1 : 64$	1 : 128	1 : 128	1 : 128
	2 # 1 : 64, 1 : 128, 1 : 256	2 # $\geq 1 : 128$	1 : 256	1 : 256	1 : 256
	3 # 1 : 16, 1 : 32, 1 : 64	3 # $\geq 1 : 32$	1 : 32	1 : 32	1 : 32
精密性参考品	1 份	CV $\leq 20.0\%$ ($n=10$)	5.62%	4.75%	6.54%

2.7 热稳定性 试剂盒经 37 $^{\circ}$ C 恒温箱烘烤 6 d 后,对线性、精密度、灵敏度和国家参考品进行检测,性能无明显改变。

2.8 临床研究试验 在 3 家临床研究单位,自研试剂与对照试剂进行平行比对检测 1 020 例临床样本,选择 0.05~299.31 NCU/mL 样本 1 011 例,自研试剂盒检测浓度值结果与对照试剂盒检测 S/CO 结果的线性回归方程为 $Y=1.180\,9X-3.226\,5$, $r=0.958\,4$ ($t_r=106.70$, $v=1009$, $P<0.05$),以对照试剂盒结果为标准,阳性符合率为 100%,阴性符合率为 100%,总符合率为 100%,Kappa 指数为 1。

3 讨 论

HBeAg 为 Dane 颗粒重要成分,是乙型肝炎核心抗原(HBeAg)可溶性成分,也是 HBV 感染的直接指标^[11]。HBeAg 阳性提示 HBV 的存在和复制,为传染性标志^[4],还有助于判断 HBsAg 携带者传染性强弱。HBeAg 还与肝损伤程度呈正比。如患者 HBeAg 消失,乙型肝炎病毒 e 抗体(HBeAb)出现,提示患者预后较好,如 HBeAg 持续阳性大于 8~10 周,提示有转为慢性乙型肝炎的可能,预后不佳。持续 HBeAg 阳性者易发展为肝硬化、肝癌,尤其是 HBeAg 阳性、HBV DNA 阴性者预后差,转为肝癌可能性较大。

表 1 自研试剂盒检测低、中、高浓度质控品精密度

质控品	批内		批间	
	实测值(NCU/mL)	CV(%)	实测值(NCU/mL)	CV(%)
Q1	2.47	2.08	2.47	5.15
Q2	9.93	0.68	10.26	5.32
Q3	41.80	5.64	40.02	6.28

表 2 自研试剂盒准确度分析

评价物	标示值(NCU/mL)	实测值(NCU/mL)	效价比
GBW(E)090099	3.46	3.47	1.00
GBW(E)090098	2.37	2.26	0.95
GBW(E)090097	1.12	1.14	1.02
自制参考品 1	0.6	0.59	0.98
自制参考品 2	2.5	2.5	1.00
自制参考品 3	10.0	9.86	0.99
自制参考品 4	40.0	41.76	1.04
自制参考品 5	160.0	166.41	1.04

2.6 质量检验 3 批自研试剂盒检测 HBeAg 血清 panel 国家参考品,最低检出量(稀释度)1 # $\geq 1 : 64$, 2 # $\geq 1 : 128$, 3 # $\geq 1 : 32$ 。15 份阴性参考品检测符合率为 15/15(—/—),10 份阳性参考品检测符合率为 10/10(+/+). 批内变异系数(CV)不超过 10.0%($n=10$)。符合国家检定标准要求,结果见表 3。

罗氏 Elecsys HBeAg 和雅培 AxsYM HBe2.0 等根据 HBeAg S/CO 或 COI 值在一定范围内与 HBeAg 含量呈线性相关的原理,以德国 Paul-Ehrlich 研究所 HBeAg 参考物质制定标准曲线,实现 HBeAg 定量检测,结果以 PEI U/mL 表示^[2]。卫生部临床检验中心研制的 HBeAg 血清标准物质可用于 HBeAg 检测试剂生产厂家的量值溯源,临床和血站实验室 HBeAg 检测质量控制及试剂方法学评价等。自研试剂盒以 HBeAg 血清标准物质为溯源品,按 GB/T21415-2008^[12] 对试剂盒校准品进行了赋值,实现了 HBeAg 定量检测结果的可溯源性,对 HBeAg 0.60~160 NCU/mL 血清稀释样本的实测值与稀释比例呈良好线性关系(r 达 0.99)。经临床研究试验考核,自研试剂盒检测 HBeAg 浓度与 HBeAg S/CO 呈高度线性相关($r=0.958\,4$, $t_r=106.70$, $P<0.05$),自研试剂盒批内和批间 CV 均小于 10%,灵敏度达 0.05 NCU/mL,检测国家标准物质或自制参考品的效价比为 0.90~1.10,检测国家参考品符合国家质量检定标准,临床研究试验的总符合率达 100%,Kappa 指数为 1,说明自研试剂盒可取代对照试剂盒,值得推广应用。

参考文献

[1] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学会.慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J].中国医学前沿杂志(电子版),2011,3(1):66-82.

[2] 魏来.HBV 标志物定量和标准化是临床检测的方向[J].中华检验医学杂志,2009,32(9):967-970.

[3] 毛远丽.HBV 血清标志物实验室检测的临床意义[J].中华检验医学杂志,2010,33(4):382-384.

[4] 魏来,张恒辉.病毒性肝炎免疫监测研究的新趋势:量化、特异及紧密结合临床[J].中华检验医学杂志,2007,30(10):1090-1093.

[5] 王全楚,张玉龙.慢性乙型肝炎治疗指南(美国肝脏病研究协会)[J].胃肠病学和肝病杂志,2005,14(5):440-443.

[6] 徐向升,王福生.免疫评价与免疫治疗:慢性乙型病毒性肝炎临床治疗的新策略[J].中华检验医学杂志,2009,32(7):730-734.

[7] 贾继东,李海.HBsAg 和 HBVe 抗原定量检测的临床意义[J].中华检验医学杂志,2009,32(9):965-966.

[8] 中华人民共和国国家食品药品监督管理局.国食药监械[2007]240 号关于印发《体外诊断试剂临床研究技术指导原则》及《体外诊断试剂说明书编写指导原则》的通知[Z].北京:中华人民共和国食品药品监督管理局,2007.

[9] 徐伟文.体外诊断试剂研制常用技术指标之分析性能评估[J].分子诊断与治疗杂志,2010,2(2):140-144.

[10] 张括,王露楠.定性免疫测定的试剂性能评价方法[J].中华检验医学杂志,2010,33(9):893-896.

[11] 李金明.乙型肝炎病毒血清标志物测定及结果解释的若干问题[J].中华检验医学杂志,2006,29(5):385-389.

[12] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.GB/T21415-2008 体外诊断医疗器械生物样品中量的测量校准品和控制物质赋值的计量学溯源性[S].北京:中国标准出版社,2008:1-18.

(收稿日期:2012-02-18)

• 检验仪器与试剂评价 •

免疫透射比浊法检测 CRP 部分性能指标评价

易火春,颜水堤,朱建辉,陈珠菊,方佳斌,曾燕丽,章静雯
(厦门大学附属中山医院临床检验中心,福建厦门 361004)

摘要:目的 对免疫透射比浊法测定 C 反应蛋白(CRP)部分性能指标进行评价。方法 用免疫透射比浊法测定血清 CRP,依据美国临床实验室标准化协会(CLIS)文件要求进行精密度、线性范围评价,并与免疫散射比浊法进行比较。结果 CRP 在 3.14、6.70 mg/L 时,总不精密度分别为 3.45%和 2.21%,均小于 CLIA'88 规定的允许误差范围的 1/2(10%);免疫透射比浊法测定血清 CRP 在 0.12~410 mg/L 范围内线性良好,相关方程为 $Y=1.010\ 9X-0.086\ 1$;与西门子 BNII 全自动特定蛋白分析仪免疫散射比浊法比较,回归方程为 $Y=0.968\ 1X+0.600\ 6$, $r=0.993\ 3(P<0.01)$ 。结论 免疫透射比浊法检测 CRP 重复性好、线性范围宽,与免疫散射比浊法具有很好相关性,操作简单,检测速度快,完全符合急诊检测的需要。

关键词:免疫透射比浊法; 免疫散射比浊法; C 反应蛋白类

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.18.035 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2012)18-2244-02

C 反应蛋白(CRP)是一种急性时相反应蛋白,在急性和慢性感染、创伤、肿瘤、心肌梗死时血浓度急剧升高,对临床诊断有重要参考价值^[1-3]。卫生部 2011 年颁布的《三级综合医院评审标准》将 CRF 检测作为提供 24 h 急诊检验服务的要求之一^[4]。国内采用的 CRP 测定方法主要包括免疫透射比浊法和免疫散射比浊法。免疫散射比浊法需特定免疫分析仪器,而免疫透射比浊法仅需普通生化仪,适合急诊检测^[5-6]。本文对免疫透射比浊法测定 CRP 的部分性能指标进行了评价,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 本院住院和门诊患者共 60 例,所采集标本均无溶血、黄疸、脂浊。

1.2 仪器与试剂 免疫透射比浊法:德国罗氏 Cobas6000 全自动生化分析仪及日本积水公司检测试剂(批号 826RDI)。免疫散射比浊法:德国西门子 BNII 全自动特定蛋白分析仪及配套原装试剂(批号 167510A)。

1.3 方法

1.3.1 精密度试验 根据 EP-5A 文件^[7],选择低、中浓度质控品,每天上、下午分 2 批检测,每批检测双份,连续检测 20 d,共 40 对,80 个数据;计算批内不精密度标准差 $s_{批内}$ 、批间变异估计值 A、批间不精密度标准差 $s_{批间}$ 、天间变异估计值 B、天间不精密度标准差 $s_{天间}$,按照方差和的方式结合批内、批间和天

间标准差计算总不精密度($CV_{总}$)。

1.3.2 分析测量范围 根据 EP-6A 文件^[8],采用多项式回归方案进行线性评价。分别选取 CRP 高值(H)和低值(L)血清标本,按照 5:0、4:1、3:2、2:3、1:4、0:5 的比例进行梯度稀释,充分混匀后随机排列上机检测,每个标本重复检测 4 次,对数据进行可靠性分析后,利用 SPSS11.5 软件进行多项式回归分析。

1.3.3 对比试验 根据 EP9 文件^[9],每天选取 8 例新鲜血清分别采用免疫透射比浊法和免疫散射比浊法按 1、2、3、4、5、6、7、8、8、7、6、5、4、3、2、1 的顺序进行测定,连续测定 5 d,共检测 40 例样品(50%标本 CRP 含量不在参考范围内,标本浓度覆盖整个可报告范围)。以 4 倍平均差值为判断限,对所有数据进行方法内、方法间离群点检验。绘制散点图,计算相关系数(r)确定样品内 CRP 含量分布是否适当。根据临床使用要求,以回归分析统计出各个医学决定水平浓度处的系统误差(SE)。

1.4 统计学处理 以统计学软件包 SPSS11.5 对数据进行统计分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行 t 检验及回归相关分析,显著性检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 精密度试验 低、中浓度质控品 $CV_{总}$ 均小于 CLIA'88 规定的允许误差范围的 1/2(10%),在可接受范围内,见表 1。