

• 检验仪器与试剂评价 •

时间分辨荧光免疫法风疹病毒 IgG 抗体定量测定 试剂盒的研制与性能评价*

谭玉华^{1#}, 于 婷^{2#}, 李奕辉^{1#}, 董 梅³, 杨伟国⁴, 岑千红⁵, 陈建起¹, 孙 勇¹, 范主桥¹

(1. 广州市丰华生物工程有限公司体外诊断试剂研发中心, 广东广州 510730; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 3. 中国人民解放军第三〇九医院检验科, 北京 100091; 4. 甘肃省人民医院检验科, 甘肃兰州 730000; 5. 湖北省中山医院检验科, 湖北武汉 430033)

摘要:目的 建立风疹病毒(RV)IgG 抗体时间分辨荧光免疫法(TrFIA)并研制其试剂盒。方法 采用 RV 抗原作为包被抗原, 锕标记羊抗人 IgG 作为示踪物, 配制以 β-萘甲酰三氟丙酮为主要成分的增强液, 应用 TrFIA 法测定 RV IgG, 并对自研试剂盒的最低检测限、准确度、线性、重复性、阴性参考品符合率、阳性参考品符合率、热稳定性进行评价, 与同类试剂盒进行方法学比对试验, 比对试验定量结果的等效性采用线性回归分析。结果 自研试剂盒的最低检测限、重复性、阴性参考品符合率、阳性参考品符合率均能达到国家检定标准; 检测国际参考品(10 IU/mL)或企业校准品, 其实测值与理论值相对偏差均在正负 20.0% 以内; 在 2.0~256.0 IU/mL 范围内, 线性相关系数不低于 0.990 0; 于 37 ℃ 恒温箱放置 6 d 后, 检测性能无明显改变; 临床研究评价一致程度百分比可达 100%。结论 自研试剂盒灵敏度高、特异性强、精密度好、准确度高、线性范围宽, 与同类产品检测结果相关性好, 能满足临床需要。

关键词: 时间分辨荧光免疫法; 风疹病毒; IgG 抗体

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.04.038

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)04-0472-03

Development and performance evaluation of time-resolved fluorescence immunoassay quantitative kit on determination of rubella virus IgG antibody*

Tan Yuhua^{1#△}, Yu Ting^{2#}, Li Yihui^{1#}, Dong Mei³, Yang Weiguo⁴, Cen Qianhong⁵, Chen Jianqi¹, Sun Yong¹, Fan Zhuqiao¹

(1. Development Center of in vitro Diagnostic Reagents of Fenghua Biological Engineering Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong 510730, China; 2. Chinese Academy of Food and Drug Testing, Beijing 100050; 3. Department of Clinical Laboratory, the 309th Hospital of PLA, Beijing 100091; 4. People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou, Gansu 730000, China; 5. Zhongshan Hospital of Hubei Province, Wuhan, Hubei 430033, China)

Abstract: **Objective** To establish the rubella virus (RV) IgG antibody time-resolved fluorescence immunoassay (TrFIA) and the development of test kit. **Methods** RV antigen was taken as coating antigen, europium-labeled goat anti-human IgG was taken as a tracer, we constructed a TrFIA kit and the self-developed kit was evaluated by testing the lowest limit of detection, accuracy, linearity, and repeatability. **Results** The kit's detection limit, repeatability are in line with the rate of negative reference materials. The measured value is highly proportioned to the theoretical value; within 2.0—256.0 IU / mL range, the linear correlation coefficient of higher than 0.990 0. **Conclusion** The self-developed detection kits provide satisfactory sensitivity, specificity, precision, and accuracy, and it can be of help in clinical detection.

Key words: time-resolved fluorescence immunoassay; rubella virus; IgG antibodies

风疹病毒(RV)被称为德国麻疹病毒,具单股正链 RNA,是仅限于人类感染的病毒。风疹是一种由 RV 引起的通过空气传播的急性传染病,传染性与麻疹一样强,为我国法定的丙类传染病之一。研究发现,孕妇风疹发病率比普通人群高 5 倍,孕妇患病后可通过胎盘感染胎儿,使细胞的有丝分裂受到抑制,染色体断裂增多,从而影响 DNA 复制和细胞繁殖。该病毒在相邻的细胞间传播,不被母体风疹抗体所消灭,而得以广泛传播,引起多系统、多组织畸形,称为先天性风疹综合征(CRS)。现在认为 CRS 是一个严重的公共卫生问题,在 2002 年 9 月第 26 届泛美卫生组织(PAHO)大会上,PAHO 通过一项决议,要求所有成员国都要开展加速风疹控制和 CRS 预防的活动,并继续开展风疹和 CRS 的流行病学监测,同时进行实验室诊断及调查^[1]。25%~50% 的 RV 感染患者为隐性感染,无任何临床症状;而显性感染患者的临床症状又与许多出疹性疾病(如麻疹、猩红热、幼儿急疹、药物疹等)相似,极易被误

诊^[2]。因此,风疹的临床诊断需用实验室检测技术进行确诊。由于现已分离出 RV 且已研制成疫苗,RV IgG 抗体水平的检测作为易感人群或孕前 RV IgG 阴性者进行预防接种的依据是非常重要的,并可用于注射疫苗后免疫性的评估。RV IgG 抗体的水平的检测也可以评估孕早期的免疫状态,用来监测围产期抗体水平的血清学变化情况,检测 2 份新近感染的样本,一份取自发病时,一份取自发病后 2~3 周,RV IgG 抗体的水平如升高 2~4 倍,提示新近感染。因此作者利用时间分辨荧光免疫分析法(TrFIA)研制了一种高灵敏、高特异的 RV IgG 抗体定量测定试剂盒,并进行了分析性能评价,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集育龄妇女及孕妇、具有 RV 感染症状/体征、相似症状或与传染源有密切接触史等人群的血清标本。均按照《全国临床检验操作规程》进行血液标本采集与处理,样本需无严重干扰性,如抗凝剂、溶血、脂血、黄疸等样本其干扰限

* 基金项目:广东省科技计划项目(2010B050300002);国家高技术研究发展(“863”计划)项目(2011AA02A112)。 作者简介:谭玉华,男,临床医学检验技术师,主要研究方向为体外诊断试剂的研发、应用。 # 共同第一作者。

超过试剂盒说明书给定范围或样本污染等样本均予以剔除。样本较长时间保存需临床检测后立即放于在至少 -20 ℃ 及以下温度保存,且避免反复冻融。样本中应包含阳性、阴性和接近临界值的样本,且尽可能均匀分布。样本数量按文献[3]和《体外诊断试剂临床研究技术指导原则》的方法或要求选择。血样在中国人民解放军第三〇九医院、甘肃省人民医院、湖北省中山医院 3 家临床试验研究单位按《体外诊断试剂临床研究技术指导原则》的要求收集,共 1 020 例(用于“已有同品种批准上市”产品的临床研究实验)。按《麻疹和风疹病毒感染的实验室诊断手册》^[4] 诊断无 RV 感染的人群血清或血浆样本 402 例(用于自研试剂盒参考值的建立)及 RV IgG 抗体阳性混合血清(用于校准品的配制)均由南方医科大学第三附属医院提供。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 主要试剂 RV 天然抗原(含有 Core、E1、E2 等优势表位的片段)、羊抗人 IgG (美国 Sigma 公司); Sepharose CL-6B 凝胶(瑞典 Pharmacia 公司); 96 孔微孔板(深圳市金灿华实业有限公司); 镧(Eu³⁺) 标记试剂盒(Wallac 公司); 截留分子量为 50 000 的超滤离心管(美国 Millipore 公司); 其余试剂为国产分析纯试剂; 自制以 β-萘甲酰三氟丙酮为主要成分的增强液; 自制含 0.4% (V/V) 的 Tween20 为主要成分的 pH 7.8、200 mmol/L Tris-HCl 溶液为浓缩洗涤液、含 10% (V/V) 的小牛血清和 0.01 g/L 乙二胺四乙酸二钠为主要成分的 pH 7.8、50 mmol/L 的 Tris-HCl 溶液为实验缓冲液; WHO 标准品(NIBSC 编码: 67/182, 80 IU/瓶), RV IgG 抗体参考品(中国食品药品检定研究院); 对照试剂为抗 RV 抗体 IgG 检测试剂盒(德国 EUROIMMUN 公司); 第三方验证试剂为 RV IgG 抗体测定试剂盒(郑州安图绿科生物工程有限公司)。

1.2.2 主要仪器 泰莱 TrFIA 仪、恒温振荡仪、全自动洗板机(广州市丰华生物工程有限公司); 酶标仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 校准品的制备 将收集的 RV IgG 抗体阳性混合血清按 2000 版《中国生物制品规程》的要求对血清进行灭活处理。以 80 IU/瓶的 WHO 标准品为对照, RV IgG 抗体阳性用含 50 g/L BSA 的 50 mmol/L, pH 7.8 的 Tris-HCl 稀释液定量稀释成 0.2、0.8、0.32、0.128、0.256、0 IU/mL。

1.3.2 方法学的建立 本方法原理采用间接 TrFIA 法。在固相包被 RV 抗原微孔反应板中依次加入 100 μL 的校准品或预先用稀释液按 1:100 稀释好的样本, 在室温条件下振荡反应 45 min, 洗板 5 次拍干, 加入 100 μL 预先准备好的羊抗人 IgG-Eu³⁺ 工作液, 在室温条件下振荡反应 45 min, 洗板 5 次拍干, 加入 100 μL 增强液, 在室温条件下振荡 5 min, 将反应板放入泰莱 TrFIA 仪内进行荧光计数。

1.3.3 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。

1.3.4 方法学评价 按照试剂盒说明书及国家参考品说明书的要求, 对试剂盒的最低检测限、准确度、线性、重复性、阴性参考品符合率、阳性参考品符合率、热稳定性进行评价。参照《体外诊断试剂临床研究技术指导原则》进行临床研究比对试验。临床研究比对试验中, 自研试剂与对照试剂结果不符的样本, 自研试剂与对照试剂均需采用双孔重复检测 1 次, 如结果仍然不符, 需采用第三方验证试剂进行检测。

1.4 统计学处理 采用仪器配套的软件进行数据处理, 参考值的建立结果经统计学分析呈偏态分布, 采用百分位数表示。临床研究比对试验定量结果的等效性采用线性回归分析。

2 结果

2.1 方法学反应体系的确定

2.1.1 RV 抗原包被浓度 RV 抗原采用 1、2、3、4、5、6、7 μg/mL 包被的反应板, 检测阴性对照和阳性对照, 以 3 μg/mL RV 抗原包被检测校准品 256.0 IU/mL 的荧光值趋于“饱和”且校准品 256.0 IU/mL 检测荧光值与校准品 0 IU/mL 检测荧光比值趋于最大, 因此 3 μg/mL RV 抗原为最适包被浓度。

2.1.2 羊抗人 IgG-Eu³⁺ 最适工作浓度 标记用缓冲液为 pH 9.0、50 mmol/L 的碳酸盐缓冲液, 羊抗人 IgG 和 Eu³⁺ 标记试剂按质量比 2:1 混合标记最佳。羊抗人 IgG-Eu³⁺ 用实验缓冲液按体积比 1:500, 1:1 000, 1:1 500, 1:2 000, 1:2 500, 1:3 000 稀释, 羊抗人 IgG-Eu³⁺ 以 1:2 000 稀释时检测校准品 0 IU/mL 本底良好(小于 2 000), 校准品 256.0 IU/mL 检测荧光值与校准品 0 IU/mL 检测荧光比值趋于最大, 羊抗人 IgG-Eu³⁺ 以 1:2 000 稀释为最适工作浓度。

2.1.3 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, Spline 三样条平滑拟合。试剂盒在泰莱 TrFIA 仪上检测的典型剂量-反应曲线见附图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.2 自研试剂盒参考值的建立 自研试剂检测 402 例 RV IgG 抗体阴性样本的浓度值, 进行统计学分析, 结果呈正偏态分布, 中位数 3.02 IU/mL, 采用百分位数法计算 80.0%、90.0%、95.0%、99.0%、99.9% 的百分位数分别为 5.37、6.36、6.58、10.49、13.20 IU/mL。采用 99.0% 的百分位数 10.49 IU/mL, 自研试剂的参考值建议定为 10 IU/mL。见表 1。

表 1 402 例 RV IgG 抗体阴性样本检测的浓度分布

组距(IU/mL)	频数(n)	频率(%)	累计频数(n)	累计频率(%)
0.1~<1.5	58	14.43	58	14.43
1.5~<3.0	142	35.32	200	49.75
3.0~<4.5	78	19.40	278	69.15
4.5~<6.0	75	18.66	353	87.81
6.0~<7.5	37	9.20	390	97.01
7.5~<9.0	6	1.49	396	98.51
9.0~<10.5	2	0.50	398	99.00
10.5~<12.0	2	0.50	400	99.50
12.0~13.5	2	0.50	402	100.00

2.3 自研试剂盒的性能评价

2.3.1 最低检测限 连续 3 批自研试剂检测国家最低检测限参考品, 最低检测限均不高于 10.0 IU/mL。

2.3.2 准确度 连续 3 批自研试剂检测国际参考品(10 IU/mL)或经标定的企业校准品, 其实测值与理论值相对偏差均在正负 20.0% 以内。

2.3.3 线性 连续 3 批自研试剂在 2.0~256.0 IU/mL 范围内, 线性相关系数分别为 0.998 9、0.997 7、0.999 1。

2.3.4 重复性 平行检测国家精密性参考品 10 孔, 连续 3 批自研试剂批内变异系数(CV)分别为 7.0%、7.6%、6.5%。

2.3.5 阴性参考品符合率 连续 3 批自研试剂检测 5 份国家阴性参考品, 结果应均为阴性。

2.3.6 阳性参考品符合率 连续 3 批自研试剂检测 10 份国家阳性参考品, 结果应均为阳性。

2.3.7 稳定性试验 连续 3 批自研试剂于 37 ℃ 恒温箱放置 6 d 后, 对最低检测限、准确度、线性、重复性、阴性参考品符合率、阳性参考品符合率等分析性能指标进行评价, 试剂盒检测性能无明显改变。

2.4 临床研究比对试验 通过预实验选择德国 EUROIM-

MUN 的抗 RV 抗体 IgG 检测试剂盒(酶联免疫吸附法)作为对照试剂。1 020 例临床研究样本采用自研试剂与对照试剂进行平行比对试验,以对照试剂结果为参考标准,待验证试剂盒与对照试剂盒检测临床样本结果阳性符合率达 100% (529/529);阴性符合率达 100% (491/491); $Kappa$ 指数为 1,为高度一致,认为两系统等效。定量结果在 6.4 IU/mL 之间的样本共 116 例。同时在待验证试剂和对照试剂线性范围内的定量检测结果(0~124.44 IU/mL),进行线性回归分析,线性回归方程为 $Y=0.9778X+0.1063$, $r=0.9973$ 。

3 讨论

我国每年出生的新生儿中 2.5% 有先天缺陷,除遗传因素外,其中孕妇感染 RV 是引起先天缺陷的主要病因之一^[5]。RV 感染所导致的危害度与孕龄相关,孕妇在妊娠 2 个月之内感染,婴儿先天性畸形的发生率为 11%~58%,在妊娠 2~3 个月感染发生率 7%~15%,在妊娠 3~4 个月内感染发生率小于 7%^[6]。血清 RV IgG 抗体水平提示是否曾经感染过 RV,或者是否注射过 RV 疫苗。对婚前育龄妇女进行 RV IgG 抗体筛查,抗体阴性,属易感染者,应予以 RV 活疫苗接种,3 个月或半年后抗体转为阳性后怀孕,这是预防 RV 感染孕妇,进而避免婴儿因母亲感染 RV 而发生 CRS 的一个重要手段^[7]。在一些发达国家已将 TORCH 感染的检测作为婚前、孕前和孕期的常规检测项目,而 CRS 在许多发展中国家是一个未被重视的公共卫生问题。风疹在我国存在暴发流行,对孕早期妇女的威胁普遍存在,同时也关系到 CRS 的发病率。制定有针对性、成功的免疫策略必须以监测数据为依据^[8]。我国已将 CRS 列入国家出生缺陷干预工程^[9]。本研究采用了 TrFIA 技术研制了 RV IgG 定量测定试剂盒,其具有灵敏度高、特异性强、线性范围宽、本底噪音低等优点,试剂盒溯源至 WHO 标准品(NIBSC code: 67/182, 80 IU/瓶)。近年黄杰等^[7]研制了 RV IgG 抗体国家参考品,为 RV IgG 检测试剂盒

评价和临床实验室质量评价提供了质量控制品。连续三批自研试剂盒检测此国家参考品,能达到国家检定标准的要求。通过临床研究比对试验,自研试剂盒与对照试剂盒的检测结果具有等效性。TrFIA 法 RV IgG 定量测定试剂盒的研制,将为临床 RV 的检测提供一个科学的、可靠的诊断依据。

参考文献

- [1] WHO. Accelerated control of rubella and prevention of congenital rubella syndrome, WHO Region of the Americas[J]. Wkly Epidemiol Rec, 2003, 78(8): 50-54.
- [2] 彭杰雄,林连成,黄涛. 风疹病毒实验室检测技术研究进展[J]. 职业与健康, 2010, 26(17): 2016-2019.
- [3] 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.
- [4] WHO. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection [M]. 2nd ed. Geneva, Switzerland; WHO Document Production Services, 2007: 1-10.
- [5] 邓文,姜敏,张璇,等. 风疹病毒 IgG 抗体 ELISA 诊断试剂的研制[J]. 中华腹部疾病杂志, 2004, 4(6): 403-405.
- [6] Leuridan E, Van Damme P. Passive transmission and persistence of naturally acquired or vaccine-induced maternal antibodies against measles in newborns [J]. Vaccine, 2007, 25(34): 6296-6304.
- [7] 黄杰,刘志远,孙彬裕,等. 风疹病毒 IgG 抗体参考品的建立[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(3): 493-497.
- [8] 张颖. 先天性风疹综合征发病与监测研究现状及进展[J]. 医学综述, 2007, 13(5): 394-395.
- [9] 封玥,姜海燕,高锦声. 先天性风疹综合征分子生物学研究新进展[J]. 国外医学:遗传学分册, 2004, 27(4): 224-227.

(收稿日期:2013-11-20)

(上接第 471 页)

生产厂家对产品的质量水平,因此在选择检验程序和使用前性能评价时,应选择测量不确定度较小的检测程序,且其性能应满足实验室预先设定的不确定度要求,确保检验程序准确性。医学实验室开展测量不确定度评估有助于临床正确解释和应用实验室检验结果。在分析检验结果时,引入不确定度的概念,可判定当次检验结果与规定量值或生物参考区间差异的合理分布范围,并分析两者差异是否有统计学意义,帮助临床做出准确的实验室诊断^[13]。另外,利用不确定度有助于血站检验结果告知人员更好地解释两次献血 ALT 检验结果之间的差异和血站实验室与临床实验室 ALT 检验结果之间差异,帮助献血者消除疑虑,使其继续献血。

测量不确定度作为医学实验室新生事物,目前尚未得到普遍和足够的重视,但随着我国医学实验室 ISO15189 认可工作的推广和临床对检验结果解释和应用更深层次的需求,以及医学实验室之间检验结果互认的需求,测量不确定度必将越来越受到医学实验室的广泛关注和重视。

参考文献

- [1] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL01 检测和校准实验室能力认可准则[S]. 北京:中国合格评定国家认可委员会, 2006.
- [2] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL02 医学实验室质量和能力认可准则[S]. 北京:中国合格评定国家认可委员会, 2008.
- [3] 王治国,王薇,李小鹏. 测量不确定度及其在临床检验中应用[J]. 中国卫生统计, 2005, 22(2): 85-86.

- [4] 王治国. 临床检验质量控制技术[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2008: 432-433.
- [5] 陈孝红,杨红英,邵文琳,等. 利用室内质控和室间质评资料计算测量不确定度[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(2): 194-195.
- [6] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-GL06 化学分析中不确定度的评估指南[S]. 北京:中国合格评定国家认可委员会, 2006.
- [7] Noble JE, Wang L, Cerasoli E, et al. An international comparability study to determine the sources of uncertainty associated with a non-competitive sandwich fluorescent ELISA[J]. Clin Chem Lab Med, 2008, 46(7): 1033-1045.
- [8] 吉建民. 医学实验室测量不确定度的评价[J]. 实用医技杂志, 2011, 18(9): 901-902.
- [9] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL07 测量不确定度的要求[S]. 北京:中国合格评定国家认可委员会, 2011.
- [10] 陈文祥,申子瑜,杨振华. 临床检验中的测量不确定度[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(9): 967-971.
- [11] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-GL05 测量不确定度要求的实施指南[S]. 北京:中国合格评定国家认可委员会, 2011.
- [12] 谢华斌,盛楠,林永志,等. 医学实验室电化学发光分析系统测量不确定度评价[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(1): 85-87.
- [13] Panteghini M. Traceability as a unique tool to improve standardization in laboratory medicine[J]. Clin Biochem, 2009, 42(4/5): 236-240.

(收稿日期:2013-11-15)