

乙型肝炎病毒表面抗原定量检测方法的改进

尚文章(河南省焦作市煤业集团中央医院 454000)

【摘要】 目的 探索当前乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)定量方法检测不准的原因并找出解决办法。**方法** 将自配的 HBsAg 定量稀释液应用于 HBsAg 稀释定量中,与原方法进行了对比,并做了线性范围、精密度、回收试验、线性相关等方法评价试验。**结果** 本研究发现了 HBsAg 管状颗粒干扰和抗原过剩是测不准的 2 个重要原因,找到了可使管状颗粒解聚的稀释液,建立了改进的定量方法。通过先行稀释测量,解决了抗原过剩的干扰,稀释线性良好。建立了血样直接测量的校正公式,从而解决了 HBsAg 管状颗粒的干扰。通过方法评价试验,测出了改进的电化学发光法方法的线性范围为 0.1~250 U/mL,平均精密密度为 1.9%,平均回收率为 97.4%。**结论** 改进法准确性达到了临床要求,可作为 HBsAg 定量方法推广应用。

【关键词】 乙型肝炎病毒表面抗原; 定量检测; 电化学发光法; 改进
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.21.038 文献标志码:B 文章编号:1672-9455(2011)21-2631-03

现在以定量形式报告结果的乙型肝炎病毒表面抗原(HB-sAg)定量检测试剂盒有多种,常用的有以北京某生物制品研究所为代表的免疫放射分析法,以上海某生物技术公司为代表的时间分辨荧光分析法,以美国 A 公司为代表的化学发光分析法,以德国 B 公司为代表的电化学发光分析法等。这些方法的检测程序是先对血样进行不稀释检测,当含量超过线性范围时,要求用实验室自己收集的 HBsAg、乙型肝炎病毒表面抗体(抗-HBs)均阴性的正常血清进行稀释测量^[1-2]。这就有 2 个问题:(1)每位检测患者稀释血清用量在 2 mL 左右,实验室难以获得这么大量的符合要求的血清。实际工作中,往往造成仅报告血样直接测定值,而不做稀释测量。(2)有很多高 HB-sAg 含量患者因钩状效应,其测定值也会落在说明书标示的线性范围以内,以致严重偏低的测定值被错误地报告出去。滕龙和傅圣勇^[3]在用电化学发光法检测 HBsAg 的工作中也发现存在着这种问题。根据本文的统计,有些方法的误报率在 80%以上。这将导致严重的误诊、误治。本文找到了引起误差的原因及解决办法,现报道如下。

1 资料与方法

- 1.1 材料** HBsAg 标准液由中国药品鉴定所提供。
- 1.2 仪器与试剂** E411 全自动电化学发光免疫分析仪; XH-6020r-计数器。电化学发光试剂由德国 B 公司提供。免疫放射分析试剂由北京 3D 公司提供。
- 1.3 方法** 采用电化学发光法和免疫放射法分别对 HBsAg 进行检测。

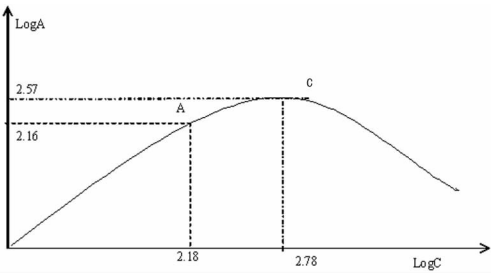
2 结 果

2.1 随机选取 HBsAg 阳性血清 30 份,进行稀释与不稀释血样的电化学发光法 HBsAg 检测,结果对比见表 1。表 1 数据经 *t* 检验,*t*=6.87,*P*<0.01,稀释测量值与不稀释测量值之间有非常大的差别。

表 1 稀释与不稀释的 HBsAg 结果		
样本号	专用稀释液 1 000 倍稀释检测值	不稀释检测值
1	<1×1 000	387.7
2	2 949.0×1 000	475.2
3	<1×1 000	8.5
4	130.1×1 000	5141.1
5	89.5×1 000	6 052.4
6	1 130.5×1 000	1 482.3

续表 1 稀释与不稀释的 HBsAg 结果		
样本号	专用稀释液 1 000 倍稀释检测值	不稀释检测值
7	795.1×1 000	1 015.9
8	36.8×1 000	6 650.2
9	141.4×1 000	5 112.6
10	77.5×1 000	6 130.4
11	530.1×1 000	1 020.7
12	105.6×1 000	4 484.2
13	251.9×1 000	2 325.1
14	66.4×1 000	4 629.7
15	145.5×1 000	4 123.5
16	31.4×1 000	6 644.3
17	38.0×1 000	7 300.8
18	1.3×1 000	616.9
19	<1×1 000	267.2
20	4 791.2×1 000	615.6
21	214.6×1 000	2 781.1
22	34.5×1 000	6 298.7
23	36.1×1 000	5 645.5
24	373.8×1 000	2 069.4
25	39.1×1 000	5 900.7
26	100.3×1 000	4 913.6
27	13.9×1 000	4 790.3
28	<1×1 000	315.1
29	346.7×1 000	2 409.9
30	120.5×1 000	5 474.7

2.2 本文选取 HBsAg 含量分别为 0.5、5.0、50.0、250.0、500.0、600.0、750.0、2 500.0、25 000.0 U/mL 的血样,采用电化学发光法对各管测定 3 次,检测值与各对应含量绘制出浓度反应曲线见图 1。据反应曲线得到以下结论:(1)直接测量患者血清的线性范围是 0.05~150 U/mL;(2)方法存在钩状效应,钩状效应曲线的拐点是 HBsAg 含量约在 600 U/mL,超过此含量,测量信号将随含量增加而降低。



注：A 为测量值，C 为期望值。

图 1 检测值与各对应含量反应曲线

2.3 以前人们把引起 HBsAg 测量发生钩状效应的原因都归结为一步法中的抗原浓度过剩^[4-5]。但在使用二步法 HBsAg 检测工作中,发现仍存在着钩状效应。本科室使用的 3D 公司 HBsAg 免疫放射定量试剂盒,线性上限标明为 160 U/mL,在本文统计所做的 100 例乙型肝炎患者检测中,86 例血清直接测量结果为(95.3±31.6)U/mL,均小于 160 U/mL,而稀释后检测值均远超过了 160 U/mL,检测值为(5 264.6±1 521.7) U/mL。经统计学检验, $t = 3.8$, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。二步法引起钩状效应的机制可能是:因 HBsAg 在血清中有 3 种存在形式:dane 形、小球形、管状形,三者均会结合到包被有抗-HBs 的管壁上,在第 1 步反应结束进行洗涤时,因管状颗粒较大,会被洗掉。于是在第 2 步加标记抗-HBs 后,结合到管壁上的标记抗-HBs 就少,使检测值偏低。随着 HBsAg 浓度的增加,小球形颗粒聚集成管状颗粒的数量也会增加,故测量值也就愈低^[6]。

2.4 通过试验发现,选用 10%小牛血清盐水稀释患者血清后,便不再出现钩状效应;在上述标本中,86 例原血清检测值小于 160 U/mL,选用 10%小牛血清盐水稀释液稀释 100 倍后检测值为(5 264.6±1 521.7)U/mL,再进一步稀释 1 000 倍后测量,检测值为(5 259.3±1 528.4)U/mL,与 100 倍稀释后检测值差异无统计学意义 ($t = 1.15, P > 0.05$),稀释线性良好。作者推想可能是 10%小牛血清盐水质可使管状颗粒解聚为小球形颗粒之故。

2.5 通过更进一步的试验观察发现,仅用盐水对患者血清稀释测量,测量反应管的管壁上会对 HBsAg 存在着严重的非特异性吸附,从而干扰测量。免疫放射法的反应管测量结束后,倒掉其中的反应珠(塑料小球),对空管进行测量计数。本文测量了 50 个反应空管,原血清测量空管测量计数为(165±82) cp,而盐水稀释管空白计数则为(862±653)cp。经统计学检验, $t = 3.1$, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.6 本文发现选用 10%小牛血清盐水稀释液(配方:取市售的 HBsAg、抗-HBs 均阴性的小牛血清 10 mL 加入到 90 mL 生理盐水中即成)可有效降低反应管壁对 HBsAg 的非特异性吸附。本文选取 30 例患者稀释测量反应空管进行计数,该值为(176±116)cp,与原血清反应空管以及仪器测量本底均较为接近。经统计学检验, $t = 1.06$ 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.7 本文发现对患者血清直接测量时,HBsAg 含量在 0.05~50.00 U/mL 之间时,虽不会出现钩状效应,但测量值却明显低于用 10%小牛血清盐水作介质的测量值。10 份低 HBsAg 含量血样不同介质中检测值对比结果见表 2。用统计软件做回归分析,二者呈直线相关,相关系数(r)=0.999,回归方程为

$Y = 0.026 + 2.03X$ 。X 为患者血清直接测量值,Y 为稀释测量值。

2.8 按非线性标准曲线检测范围确定方法^[7],测出了用 10%小牛血清盐水作为稀释液,HBsAg 稀释测量的线性范围是 0.5~250 U/mL。钩状效应曲线的拐点在 750 U/mL。

表 2 10 份 HBsAg 不同介质检测对比结果(U/mL)

人血清介质	10%小牛血清盐水质
0.15	0.36
0.69	1.58
3.78	8.07
6.77	13.47
12.71	26.18
19.83	40.02
27.89	59.52
35.29	67.07
45.26	92.52
53.04	109.37

2.9 基于以上研究,本文设计出了 HBsAg 的改进检测方法。免疫放射法的改进方法请参见“乙肝表面抗原免疫放射法改进”一文^[8]。此处介绍的是电化学发光法的改进作法:(1)对于初检者,应先直接测量受检者血清,若阴性则可报告,若阳性则应再做稀释测量。(2)稀释测量用 10%小牛血清盐水稀释液对受检者血清做 1 000 倍稀释,对于测定值在 0.13~250 U/mL 者,报告值(U/mL)=1 000×(测值-0.072),0.072 为试剂空白值。对于超出 250 U/mL 者,应再做 20 000 倍稀释测量,不过此种情况极少遇到。(3)不稀释测量对于 1 000 倍稀释测定值小于 0.13 U/mL 者,则应再对受检者血清直接检测。按以下测定值的校正经验公式计算并报告结果: $Y = 0.026 + 2.03X$ (当 $X > 0.055$ 时);当 $0.05 < X < 0.055$ 时报可疑;当 $X < 0.0$ 时,报阴性。X 为患者血清直接测量值,Y 为校正后的报告值。

2.10 改进的 HBsAg 测量方法的评价试验。

2.10.1 精密度试验 稀释检测的精密度 用 10%小牛血清盐水稀释液,稀释血样使 HBsAg 含量在分别为 5.0、50.0、250.0 U/mL。均检测 10 次,算得 CV 分别是 1.2%、1.9%、2.6%。平均 CV=1.9%。

2.10.2 回收试验 用 10%小牛血清盐水稀释液,对 HBsAg 含量在分别为 500.0、50 000.0、250 000.0 U/mL 血样稀释 1 000 倍,使 HBsAg 含量分别为 0.5、50.0、250.0 U/mL。做回收试验,得回收率分别为 97.5%、97.7%、96.9%,平均为 97.4%。

3 讨 论

3.1 用正常血清与 10%小牛血清盐水两种稀释液的检测线性范围不同,可能是用正常血清做稀释剂,稀释样品中仍存在着较多的 HBsAg 管状颗粒。由于这种颗粒体积较大,与磁珠结合不牢固,易被冲洗掉,故线性范围上限较低,仅有 150 U/mL。当用 10%小牛血清生理盐水溶液做稀释剂时,HBsAg 管状颗粒可能会解聚为小球状颗粒,不会出现结合到磁珠上 HBsAg

被冲洗掉的情况,故线性范围上限较高,可达250 U/mL。

3.2 虽然原血清测量上限可达到 150 U/mL,但因存在严重的钩状效应,高含量 HBsAg 样品检测值也会落在 150 U/mL 内。即当原血清检测值在 150 U/mL 以下时,无法判断该值是血样的真实值还是因钩状效应导致的虚假值。如果报告发出,可能会引起严重误判。改进法与原法的一个不同点是:原法检测程序是先做血样直接测量,对超出线性范围者方主张稀释测量。而改进法先行稀释测量,对于低于检测下限的血样,再做直接检测。

3.3 由试验可知,当检测稀释样品 HBsAg 浓度超过 750 U/mL 才会产生钩状效应,稀释 1 000 倍后原血清高于 750 ×1 000 U/mL 才会产生钩状效应。作者在多年的工作中从未遇到过高于此值的患者。也即 1 000 倍稀释样品不会出现因钩状效应而致虚假低值的情况。

3.4 基质效应问题:在电化学发光法中,用 10% 小牛血清生理盐水溶液或用生理盐水作为稀释剂,由于基质效应的影响,会得到约 0.072 U/mL 的空白值。

3.5 用 10% 小牛血清生理盐水作为稀释液与正常血清作为稀释液的稀释测量值有约 2 倍的差异。本文认为,是由于在低 HBsAg 含量样品中,会有小的管状颗粒的存在,在 10% 小牛血清生理盐水溶液中,解聚成小球形颗粒而致使原来被遮蔽的抗原决定簇暴露之故。

3.6 B 公司目前的电化学发光法 HBsAg 试剂盒,1 COI 相当于 0.055 U/mL,在做定量检测时应将 COI 换算成定量单位 U/mL。

参考文献

[1] 吴星,周诚,黄维金,等.乙型肝炎病毒表面抗原定量血清的标定及初步应用[J].中国自然医学杂志,2008,10(2):133-135.

[2] 朱平安,申群喜,祝玲玲,等.电化学发光免疫分析法测定 HBsAg 最适稀释度的研究[J].承德医学院学报,2004,8(1):17.

[3] 滕龙,傅圣勇.电化学发光法检测 HBsAg 的假性低值探讨[J].临床检验杂志,2007,25(2):149.

[4] 贾杰.乙型肝炎表面抗原检测的钩状效应[J].现代预防医学,2005,32(5):496-498.

[5] 单桂秋,李秋生,肖韶英.检测乙型肝炎表面抗原的一步法试剂的钩状效应分析[J].中华检验医学杂志,2002,25(2):107-108.

[6] 尚文章,石宝刚,郭斌,等.消除乙肝表面抗原管状颗粒在乙肝表面抗原定量过程中的干扰[J].医学研究杂志,2007,36(5):87-88.

[7] 徐立根.放射免疫分析试剂盒质量控制[J].放射免疫学杂志,2003,16(3):181-193.

[8] 尚文章,石宝刚,郭斌,等.乙肝表面抗原定量免疫放射分析方法的改进[J].医学研究杂志,2009,38(1):79-80.

(收稿日期:2011-06-22)

DXI 800 型化学发光仪定量检测甲胎蛋白初步性能评定

梁鑫,杨琳,吴玲(江苏省中医院,南京 210029)

【摘要】 目的 按照《中华人民共和国卫生行业标准》(WS/T 228-2002)中的《定量临床检验方法的初步评价》的要求,对 Beckman Couter Uncel DXI 800 型化学发光仪的甲胎蛋白(AFP)项目进行初步评定,了解 DXI 800 型化学发光仪在 AFP 项目上的线性、偏倚、线性漂移、样品交叉污染和精密度等性能。**方法** 选用低、中、高 3 种水平的校准品每天按照中、高、底、中、中、低、低、高、高、中的顺序连续检测 5 d(若有样品被拒绝则按照这个顺序继续做),得到结果后再分析。**结果** 低值偏倚为 1.63,中值的偏倚为 6.55,高值的偏倚为 3.81,均小于其对应的允许偏倚。低值的不精密密度为 5.90,中值的不精密密度为 5.58,高值的不精密密度为 3.62,均小于其允许不精密密度。**结论** DXI 800 型化学发光仪在定量检测 AFP 这个项目上的偏倚及不精密密度上的性能都是可接受的。

【关键词】 DXI 800 型化学发光仪; 甲胎蛋白; 偏倚; 不精密密度

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.21.039 文献标志码:B 文章编号:1672-9455(2011)21-2633-02

甲胎蛋白(AFP)是胚胎干细胞所产生的一种特殊糖原蛋白,主要在胚胎期由肝脏实质细胞和卵黄囊细胞合成,1968 年开始用于诊断原发性肝癌,目前其仍然是公认的早期诊断和筛查原发性肝癌的指标^[1]。手术后动态监测血清 AFP 含量也对判断手术效果及估计患者的生存率有指导意义^[2]。根据医学实验室认可标准对实验室质量要求,实验室必须对检测系统进行必要的性能验证^[3]。作者根据《中华人民共和国卫生行业标准》(WS/T 228-2002)中的《定量临床检验方法的初步评价》的要求,在新方法、新试剂、新仪器用作体外诊断前,常常有必要对它的可接受性作出初步的评定。本科室有一台 DXI 800 型化学发光仪的 AFP 试剂进行升级,按照这个要求对新的 AFP

的试剂的性能进行初步评定。

1 材料与方法

1.1 仪器 美国 Beckman Couter Uncel DXI 800 型化学发光仪。

1.2 试剂 美国 Beckman Couter Uncel DXI 800 型化学发光仪原装配套的 AFP 试剂盒。

1.3 标本来源 美国 Beckman Couter Uncel DXI 800 型化学发光仪原装配套的校准品。

1.4 方法

1.4.1 选用校准品中的 25、100、200 ng/mL 分别作为低、中、高浓度的待测样品。按照中、高、低、中、中、低、低、高、高、中