

酶联免疫分析检测乙型肝炎 e 抗原的空白限、检出限及定量限的建立与评价^{*}

胡 敏, 杨泽华, 赵克斌[△] (山西医科大学第一医院医学检验科, 太原 030001)

【摘要】 目的 建立并评价酶联免疫分析手工操作检测 HBeAg 的空白限(LoB)、检出限(LoD)及定量限(LoQ)。**方法** 参照美国临床实验室标准化协会 EP-17A 文件和有关文献,结合工作实际,将 HBeAg 的空白样品及系列低浓度样品进行酶联免疫分析手工操作的检测,根据数据的分布规律,采用相应的统计学方法,建立酶联免疫分析手工操作检测 HBeAg 的 LoB、LoD 及 LoQ 并进行评价。**结果** HBeAg 的 LoB 为 0.131 PEI U/mL, LoD 为 0.350 PEI U/mL, LoQ 为 0.450 PEI U/mL。**结论** 厂商声明的 LoB 得到验证,同时建立了实验室检测 HBeAg 的 LoB、LoD 和 LoQ,为临床诊断和治疗提供更有价值的信息。

【关键词】 乙型肝炎 e 抗原; 酶联免疫吸附试验; 空白限; 检出限; 定量限

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.18.004 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)18-2656-03

Establishment and evaluation of limit of blank, limit of detection and limit of quantitation for detection of HBeAg by enzyme-linked immunosorbent assay^{*} HU Min, YANG Ze-hua, ZHAO Ke-bin[△] (Department of Clinical Laboratory, First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

【Abstract】 Objective To establish the limit of blank(LoB), limit of detection(LoD) and limit of quantitation(LoQ) for the detection of HBeAg by the enzyme-linked immunosorbent assay. **Methods** Referring to CLSI EP-17A protocol and related literature, and by combining with our actual works, the blank sample and a series of low concentration samples were performed the ELISA detection by the manual operation. According to the distribution law of the data, the corresponding statistical method was adopted to establish the ELISA detection of LoB, LoD and LoQ of HBeAg by the manual operation. **Results** LoB of HBeAg measured by the manual operation was 0.131 PEI U/mL, LoD was 0.350 PEI U/mL and LoQ was 0.450 PEI U/mL. **Conclusion** The LoB of HBeAg stated by the manufacturer is verified. At the same time, LoB, LoD and LoQ of HBeAg detected by our laboratory are established, which provide more valuable information for the clinical diagnosis and therapy.

【Key words】 HBeAg; enzyme-linked immunosorbent assay; limit of blank; limit of detection; limit of quantitation

乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)是乙型肝炎病毒(HBV)C 基因转录生成的循环蛋白,与乙型肝炎表面抗原一样,是乙型肝炎(简称乙肝)的直接指征,它的持续阳性提示疾病慢性化,可能会进展为慢性活动性肝炎、肝硬化^[1]。慢性乙肝患者接受干扰素或核苷酸类药物治时,血清 HBeAg 水平的高低直接反映患者的预后情况,因此 HBeAg 常用于评估乙肝抗病毒疗效及传染性强弱^[2-3]。当今国内 HBeAg 检测方法和仪器种类繁多,如何确保检测系统间结果的可靠性成为当务之急^[4]。本研究主要参照美国临床实验室标准化协会发布的《确定检出限值和定量限值方案》,对酶联免疫分析检测 HBeAg 的空白限(LoB)、检出限(LoD)和定量限(LoQ)进行建立和评价,旨在为临床提供更可靠的诊断信息^[5]。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 酶联免疫分析手工操作,试剂(批号 201406101)由上海科华生物工程股份有限公司提供;美国 PerkinElmer Wallac 1235 全自动时间分辨荧光免疫分析仪,试剂(批号 8600021769)由苏州新波生物技术有限公司提供;美国雷勃 Wellscan MK3 酶标仪。

1.2 样品制备 收集 PE 公司 1235 全自动时间分辨荧光免疫分析仪检测 HBeAg 水平为 0 PEI U/mL 的健康人新鲜血清 50 例混匀作为空白样品,并检测证实此混合血清 HBeAg 水平为 0 PEI U/mL;用空白样品对原始 HBeAg 样品作系列稀释,配置成系列低浓度 HBeAg 样品,其理论水平分别为 0.15、0.25、0.35、0.45、0.55 PEI U/mL,介于 LoB 水平的 1~4 倍。所有样品均无溶血、无黄疸、无脂浊,分装于 EP 管中置 -20℃ 冰箱保存。

1.3 方法

1.3.1 试验基本要求 试验前严格按照厂商操作规程对仪器进行维护、校准和质量控制,确认质量控制结果在控的前提下方可检测样品。

1.3.2 LoB 的确定^[6] 对空白样品进行 60 次测定,每日 1 批,每批重复检测 12 次,共 5 d,记录吸光度值 A。按国际标准化组织,设定 I 类错误与 II 类错误水平均为 5%,即 $\alpha = \beta = 5\%$,5% 的 α 值相当于使用空白值分布的 95% 百分位数,作为显著高于空白的检测值的限值。若空白值呈正态分布,按以下公式计算 LoB: $LoB = \mu_B + 1.645\sigma_B$,其中 μ_B 和 σ_B 分别是空白

^{*} 基金项目:卫生部医药卫生科技发展研究中心资助项目(28-1-45)。

作者简介:胡敏,女,硕士,初级检验师,主要从事检验方法学方面的研究。 [△] 通讯作者, E-mail: syyyjyjkzb@sina.com。

检测的均值和标准差。若空白值呈非正态分布,则用非参数方法估计第 95%百分位数。将检测值依据大小排列,求相应的百分位数 $\rho=(100-\alpha)=95$, $LoB=[n_B(95/100)+0.5]$ 位置的结果,式中 n_B 为空白样品的重复检测次数,即 $n_B=60$ 。

1.3.3 LoD 的确定^[6] 5 个水平的低浓度样品作日间重复测定,每日上、下午各检测 1 批,连续检测 6 d,共获得 60 个测量结果,记录吸光度值 A。若检测结果呈正态分布,计算多个低浓度样品的综合标准差, $s_{综合}^2=[(n_1-1)s_1^2+(n_2-2)s_2^2+\cdots+(n_m-1)s_m^2]/n_1+n_2+\cdots+n_m-m$, 式中 $n_1, n_2 \cdots n_m$ 为各个样品的重复检测数, m 为样品数。 $LoD=LoB+c_{\beta}s_{综合}$, 其中 c_{β} 是标准正态分布的第 95 百分位数值, $c_{\beta}=1.645/(1-1/4f)$, f 是 $s_{综合}$ 的自由度。若低浓度样品不呈正态分布,则使用非参数估计 $LoD=LoB+D_{s,\beta}$, 其中 $D_{s,\beta}$ 是低浓度样品测定值中位数的值和第 5 个百分位数值间的距。

1.3.4 LoQ 的确定^[6] 依据临床要求和室间质量评价的允许误差,设定本实验室 HBeAg 的总误差目标为 20%,在不考虑分析偏差的条件下,总误差 $=2CV$,若低浓度样本的 $CV\leq 1/2TEa$,则 $LoQ=LoD$;若 TEa 大于实验室制订的质量目标 20%,则需要选择更高浓度的定值样品重复检测。

2 结 果

2.1 标准曲线的建立 浓度为 0、0.970、2.260、6.590、7.490、14.980 PEI U/mL 的各样品其吸光度值分别为:0.005、0.169、0.643、1.512、1.899、2.552。将以上数据通过 Curve-Expert1.4 进行曲线拟合,结果显示二次多项式拟合法的拟合程度最高,标准曲线见图 1。

2.2 LoB 的建立 空白样品的检测结果经正态性检验,呈非正态分布,因此用非参数方法估计 LoB,即估计第 95%百分位数,将 60 个空白值由小到大排序后第 51~60 位数值见表 1, LoB 在 $[60\times(95/100)+0.5]=57.5$ 位置的值,即 $LoB=(57$

号结果 + 58 号结果)/2,第 57.5 位结果为 (0.131 + 0.131)/2=0.131 PEI U/mL,即 LoB 为 0.131 PEI U/mL。

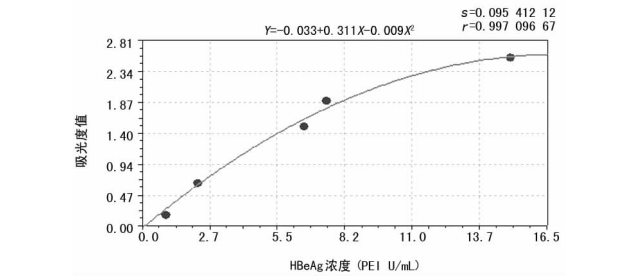


图 1 HBeAg 浓度-吸光度曲线

表 1 空白样品第 51~60 位数值(PEI U/mL)

秩号	空白值	秩号	空白值
51	0.128	56	0.128
52	0.128	57	0.131
53	0.128	58	0.131
54	0.128	59	0.131
55	0.128	60	0.138

2.3 LoD 的建立 系列低浓度样品测定结果见表 2。60 个低浓度样品检测结果呈非正态分布,使用非参数程序估计 LoD,即 $LoD=LoB+D_{s,\beta}$, 其中 $D_{s,\beta}$ 是低浓度样品测定值中位数的值和第 5 个百分位数值间的距。运用 SPSS19.0 计算,中位数为 0.392 PEI U/mL,第 5 百分位数的值为 0.173 PEI U/mL, $D_{s,\beta}=0.392-0.173=0.219$ PEI U/mL。 $LoD=LoB+D_{s,\beta}=0.131+0.219=0.350$ PEI U/mL。

表 2 系列低浓度样品测定结果

时间(d)	0.150 PEI U/mL		0.250 PEI U/mL		0.350 PEI U/mL		0.450 PEI U/mL		0.550 PEI U/mL	
	x_{i1}	x_{i2}	x_{i1}	x_{i2}	x_{i1}	x_{i2}	x_{i1}	x_{i2}	x_{i1}	x_{i2}
1	0.144	0.128	0.251	0.242	0.304	0.300	0.399	0.369	0.498	0.507
2	0.131	0.131	0.206	0.235	0.386	0.405	0.422	0.465	0.528	0.547
3	0.128	0.125	0.232	0.212	0.307	0.333	0.415	0.461	0.534	0.531
4	0.190	0.201	0.323	0.330	0.392	0.432	0.498	0.504	0.590	0.594
5	0.151	0.144	0.268	0.258	0.402	0.369	0.435	0.468	0.590	0.538
6	0.170	0.164	0.242	0.209	0.380	0.362	0.455	0.471	0.564	0.607

注: x_{i1} 和 x_{i2} 为同一天内的 2 批测定结果。

表 3 酶联免疫分析手工操作检测 HBeAg 低浓度样品的日间 CV

项目	0.150 PEI U/mL	0.250 PEI U/mL	0.350 PEI U/mL	0.450 PEI U/mL	0.550 PEI U/mL
$\bar{x}$ (PEI U/mL)	0.151	0.249	0.364	0.447	0.552
s (PEI U/mL)	0.025	0.040	0.044	0.040	0.036
CV(%)	16.56	16.13	12.09	8.95	6.52

2.4 LoQ 的建立 本实验室依据临床需求及权威机构规定的分析质量要求设定酶联免疫分析手工操作检测 HBeAg 的总误差目标为 20%,在不考虑分析偏差的情况下, $TEa=2CV$,即 $CV=1/2TEa$ 。HBeAg 浓度在 0.450 PEI U/mL 时检测的日间变异为 8.95%,接近 10.00%,符合质量目标要求,因此

$LoQ=0.450$ PEI U/mL。见表 3。

3 讨 论

HBeAg/HBeAb 血清学转换是 HBV 复制下降的可靠标志,HBeAg 阳性与否使慢性乙肝患者的临床经过和治疗应答效果有很大差别。但是任何定量试验均存在可接受的偏差,定

性试验也必然存在一定的漏检率^[7]。为了防止弱阳性标本的漏检,有效地提高检出率,各临床实验室可以科学地建立满足各实验室自己质量要求的检测限,将更准确的检测结果反馈给临床^[8]。

LoB、LoD 和 LoQ 是评价检测方法或检测系统灵敏性的重要参数,因此 LoD 与 LoQ 的设定是至关重要的,因为确定极微量的待测物质对于疾病的确定,尤其是传染性疾病的确诊具有很大意义^[9]。EP17-A 文件就如何确定临床检验方法的检测低限,如何基于实验室在低水平浓度处的性能目标确定定量检测限提出了建议。本研究严格按照 EP17-A 方案,建立了酶联免疫分析手工操作检测 HBeAg 的 LoB 为 0.131 PEI U/mL,低于厂商说明书声明的灵敏度 0.154 PEI U/mL,LoD 为 0.350 PEI U/mL,LoQ 为 0.450 PEI U/mL。使用酶联免疫分析手工操作检测 HBeAg 结果报告时,若 HBeAg 结果低于 0.131 PEI U/mL,则报告“分析物未检出,浓度低于 0.131 PEI U/mL”;若 HBeAg 结果高于 0.131 PEI U/mL,低于 0.350 PEI U/mL,则报告“有分析物检出,但不能准确定量,浓度小于 0.350 PEI U/mL”;若 HBeAg 结果高于 0.450 PEI U/mL,则直接报告检测结果。

已有研究证实,全自动酶免检测设备在过程处理的速度、灵敏度和精密度方面均优于手工操作,因其试验的全过程加样、加试剂、孵育、洗板、结果判读等均由电脑控制,消除了手工操作的人为误差,使得加样、加试剂准确,孵育时间严格控制,检测的灵敏度相应提高^[10]。本科室已引入 Addcare ELISA 1100 全自动酶免疫分析系统及 Beckman Coulter 公司 Power Express 自动化流水线,全自动酶联免疫分析仪将成为酶联免疫实验室的主导设备,酶联免疫实验室的自动化与标准化是实现全实验室自动化的一部分。根据 CNAS-CL02:2012《医学实验室质量与能力认可准则》的要求,设备在安装时及常规使用中应显示出能够达到规定的性能标准。以后作者将对 Addcare ELISA 1100 全自动酶免仪的分析性能进行系统、全面的评价^[11]。

参考文献

[1] Lang T, Lo C, Skinner N, et al. The hepatitis Be antigen

(HBeAg) targets and suppresses activation of the toll-like receptor signaling pathway[J]. *Hepatology*, 2011, 55(4): 762-769.

[2] 郝迎迎,夏娟,刘勇,等.血清 HBeAg 定量检测对慢性乙型肝炎患者核苷(酸)类似物治疗后 e 抗原血清转化的预测作用[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2012, 6(11): 2915-2920.

[3] 万漠彬,翁心华.干扰素治疗慢性乙型肝炎专家建议[J]. *中华传染病杂志*, 2010, 28(4): 193-200.

[4] 苏荣,叶桂祥,罗娜,等.乙型肝炎病毒 E 抗原检测方法性状的初步评价[J]. *实验与检验医学*, 2013, 2(31): 21-23.

[5] NCCLS. EP-17A Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation; Approved guideline [S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2004: 1-39.

[6] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2003: 135-136.

[7] 张瑞,李金明.如何发挥检验医师在 HBV、HCV 检测结果临床应用中的作用[J]. *临床检验杂志*, 2012, 30(11): 865-867.

[8] Andersson M, Ronnmark J, Arestrom I, et al. Inclusion of a non-immunoglobulin binding protein in two-site ELISA for quantification of human serum proteins without interference by heterophilic serum antibodies [J]. *Immunol Methods*, 2003, 283(1/2): 225-234.

[9] Iamail AA. A radical approach is needed to eliminate interference from endogenous antibodies in immunoassays [J]. *Clin Chem*, 2005, 51(1): 25-26.

[10] 李玉笑,郑优荣,肖韶英,等. FAME 酶标分析系统在安全输血中的应用[J]. *广东医学*, 2002, 23(5): 461-463.

[11] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL02 2012 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, 2012.

(收稿日期: 2015-04-10 修回日期: 2015-05-10)

(上接第 2655 页)

肺疾病伴 II 型呼吸衰竭的临床疗效[J]. *医学临床研究*, 2013, 30(11): 2179-2180.

[4] Deher M, Ekkernkamp E, Waltersbacher S, et al. Noninvasive ventilation in COPD; inspiratory pressure levels on sleep quality[J]. *Chest*, 2011, 140(4): 939-945.

[5] 周小烈. 无创呼吸机治疗慢性阻塞性肺疾病并发 II 型呼吸衰竭 76 例临床分析[J]. *检验医学与临床*, 2011, 9(8): 1035-1036.

[6] Mcpherson C. Sedation and analgesia in mechanically ventilated preterm neonates; continue standard of care or experiment [J]. *Pediatr Pharmacol Ther*, 2012, 17(4): 351-364.

[7] Barr J, Fraser GL, Puntillo K, et al. Clinical practice guidelines for the management of pain, agitation, and delirium in adult patients in the intensive care unit[J]. *Crit Care Med*, 2013, 41(1): 263-306.

[8] Patel SB, Kress JP. Sedation and analgesia in the mechanically ventilated patient[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 185(5): 486-497.

[9] Riker RR, Fraser GL. Altering intensive care sedation paradigms to improve patient outcomes [J]. *Anesthesiol Clin*, 2011, 29(4): 663-674.

[10] 张洋,潘到波. 盐酸右美托咪定的药理作用及其在全身麻醉中的应用[J]. *医学临床研究*, 2011, 28(3): 535-537.

[11] Takasaki Y, Kido T, Semba K. Dexmedetomidine facilitates induction of noninvasive positive pressure ventilation for acute respiratory failure in patients with severe asthma[J]. *Anesth*, 2009, 23(1): 147-150.

[12] 陈启江,施宗驱,薛其骏,等. 右美托咪定在慢性阻塞性肺疾病急性加重合并呼吸衰竭患者无创通气中的应用[J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2013, 19(1): 29-31.

(收稿日期: 2015-04-18 修回日期: 2015-04-25)