文章编号:1000-5404(2007)09-0851-02

技术方法

人血清乙型肝炎表面抗体定量测定化学发光免疫分析方法的建立及应用

董 辉[1],贺金云[1],张云杰[1],赵乔妹[1],秦 莉[2],孙旭东[2] ([1]解放军总医院第一附属医院检验科,北京 100037;[2]北京源德生物医学工程有限公司,北京 100176)

提 要: 目的 建立人血清抗-HBs化学发光免疫分析方法并在临床检测中应用。**方法** 使用自行研制的化学发光免疫定量分析方法检测530例临床血清标本中的抗-HBs,并与抗-HBs电化学发光全自动免疫分析方法进行对比,探讨其临床应用价值。**结果** 本方法对国家抗-HBs参考品,20份阴性参考品均检定为阴性;精密性参考品变异系数小于15%;定量参考品检测结果均在规定范围内;灵敏度参考品能检测出10 mIU/ml血清,完全达到国家参考品对定量方法的要求。与甲肝、丙肝、HIV、梅毒等患者血清无交叉反应;样本中抗凝剂量的柠檬酸钠、肝素、$EDTANa_2$对测定结果没有影响。该方法正常参考值为10 mIU/ml。ECLIA测定结果与本方法相比,临床总符合率为95.09%。**结论** 该方法灵敏度高,特异性好,稳定性强,检测范围宽,有良好的准确性和重复性,完全可以替代进口化学发光试剂用于临床样本的检测。

乙型肝炎病毒(HBV)是一种DNA病毒,属嗜肝DNA病毒科(hepadnaviridae)[1,2]。乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)能刺激机体产生抗-HBs[3]。血清学检测抗-HBs的方法有放射免疫分析法(RIA)、酶联免疫吸附分析法(ELISA)、化学发光免疫分析法(CLIA)及电化学发光免疫分析法(ECLIA)等[4,5]。其中,CLIA和ECLIA因其操作的智能化程度高、灵敏度高、特异性强、检测范围宽,特别是无放射性危害及半衰期短等优势,目前已趋替代RIA和ELISA而成为免疫检测广泛采用的分析技术。目前国内医疗机构检测抗-HBs大多采用ELISA定性分析;而抗-HBs定量分析多为CLIA和ECLIA检测,且主要在一些大中型医院应用,所用仪器、试剂均为进口,价格昂贵,无法满足定量检测抗-HBs的需要。

本研究应用自行研制的化学发光定量分析方法测定人血清抗-HBs,并试验其在临床检测中的应用。

1 材料与方法

1.1 标本来源

血清标本共计530份,年龄17~65岁。其中抗-HBs阴性标本386例,男性153例,女性233例,来自本院成年健康体检者。抗-HBs阳性标本144例,男性75例,女性69例。另取158例各种病毒感染血清、抗核抗体阳性血清、多发性骨髓瘤血清及孕妇血清,经ELISA方法测定均为抗-HBs阴性血清标本。上述标本均来自本院及北京佑安医院。

1.2 主要试剂与仪器

乙型肝炎病毒表面抗原由北京源德生物医学工程有限公司表达及纯化。MPC-1型微孔板单光子计数仪为北京源德生物医学工程有限公司生产。Roche公司电化学发光全自动免疫分析仪Elecsys2010及配套抗-HBs测定试剂盒。ELISA试剂盒为北京万泰生物药业有限公司生产。其他所用化学试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 方法

1.3.1 包被发光微孔板的制备 包被乙肝表面抗原用pH 7.4,0.02 mol/L的PB配制为2.5 μg/ml的包被液,每孔100 μl包被微孔板,2~8 ℃过夜后,弃包被液。按每孔200 μl加入含1% BSA的PBS封闭液,37 ℃封闭2 h;洗涤干燥后放入密封袋内真空保存。

1.3.2 酶标记表面抗原的制备 采用常规的过碘酸氧化法制备。0.1%的Proclin-300为防腐剂的新生牛血清做为酶稀释液,采用方阵滴定法确定酶结合物工作浓度。

1.3.3 校准品的制备 用0.1%的Proclin-300为防腐剂的新生牛血清做为校准品稀释液。系列稀释抗-HBs阳性血清,并用国家参考品校定浓度。

1.3.4 发光液的制备 按照专利(专利号91110621.9)配方由北京源德生物制备。

1.3.5 样本的获取 取不同浓度的抗-HBs人血清5 ml,分别加入不同浓度的肝素钠、15%的EDTA溶液、23.6%的(0.914 mol/L)枸橼酸钠溶液、100 mg/L胆红素溶液和160 g/L血红蛋白溶液,得到含系列浓度的上述物质的血清样本;称量不同量的胆固醇及甘油三酯于上述血清中,得到系列样本。

1.3.6 抗-HBs测定过程 取包被微孔板,每孔加入校准品或待测样本50 μl,加入酶结合物50 μl,37 ℃水浴,30 min。洗涤后加入发光液,在单光子计数仪上测定相对发光强度。

1.4 统计学分析

采用SPSS统计软件进行t检验及相关性分析。

2 结果

2.1 方法学评价

2.1.1 抗-HBs国家参考品测定 抗-HBs国家参考品包括阴性参考品、定量参考品、灵敏度参考品、精密性参考品。结果表明,20份抗-HBs阴性参考品均检定为阴性;精密性参考品的相对发光强度变异系数$CV=3.16\%$(要求≤15%);定量参考品标示浓度值与测定值做线性回归,相关系数为0.999 93(要求≥

作者简介:董 辉(1968-),女,吉林省吉林市人,硕士,主治医师,主要从事免疫诊断学方面的研究,发表论文10余篇。电话:(010)66867134,E-mail:dong200401@126.com

收稿日期:2006-12-01;修回日期:2007-02-02

0.990 0)；灵敏度参考品灵敏度2.0、5.0、10.0 mIU/ml测定浓度分别为2.38、5.07、10.46 mIU/ml，符合检测标准。

2.1.2 方法特异性测定 与其他病毒感染血清反应的特异性研究结果表明，本方法测定抗-HBs与上述各种病毒感染血清、抗核抗体阳性血清、多发性骨髓瘤血清及孕妇血清无交叉反应。见表1。

表1 方法特异性测定结果

样本类型	样本数	测定结果	
		阳性反应数	阴性反应数
巨细胞病毒(CMV)	14	0	14
弓形体(Toxo)	10	0	10
风疹病毒(Rubella)	10	0	10
单纯疱疹病毒(HSV)	10	0	10
EB病毒(EBV)	4	0	4
甲型肝炎病毒(HAV)	5	0	5
丙型肝炎病毒(HCV)	14	0	14
梅毒(TP)	5	0	5
抗核抗体	22	0	22
多发性骨髓瘤(MM)	1	0	1
酒精性肝病	1	0	1
孕妇样本	62	0	62
总 计	158	0	158

2.1.3 抗凝剂及其他干扰因素的影响 结果表明，样本中含有的抗凝剂量的柠檬酸钠、肝素、EDTA-Na_2对测定结果未见影响。并且当血清样本中胆红素浓度不大于100 mg/L、胆固醇浓度不大于10 g/L、甘油三酯浓度不大于35 mmol/L时对测定结果没有影响。溶血样本对测定结果有影响。

2.1.4 高值血清系列稀释 将系列稀释的阳性血清值根据阳性血清原液浓度回算出浓度值，与其平均相对发光强度做Log-Log线性回归，曲线方程为 $y = 3.92 + 0.96x$，相关系数为0.994 14。表明本方法线性范围达到3 000 mIU/ml，也即在3 000 mIU/ml内的临床高值样本均能得到强阳性结果，不会出现HOOK效应。而临床样本绝大多数低于3 000 mIU/ml，所以，本方法检测临床高值血清结果是可靠的。见表2。

表2 高值血清系列稀释

样本	相对发光强度平均值	计算浓度(mIU/ml)	计算原血清浓度(mIU/ml)	样本理论浓度(mIU/ml)
阴性血清	75	overflow		
阳性血清1∶100	1 241	30.18	3 018	30.89
阳性血清1∶50	2 554	61.12	3 056	61.78
阳性血清1∶20	7 012	159.66	3 193.2	154.45
阳性血清1∶10	13 567	296.80	2 968	308.9
阳性血清1∶5	25 961	544.62	2 723.1	617.8
阳性血清1∶3	44 698	904.42	2 713.26	1 029.7
阳性血清1∶2	64 872	1 280.10	2 560.2	1 544.5
阳性血清原液	79 754	1 551.91	1 551.91	3 089

2.2 临床应用

同ECLIA的测定结果相比较，ECLIA方法测定的阴性样本共386例，其中本方法测定为阴性的为374例，阳性的为12例，符合率为96.89%；ECLIA方法测定的阳性样本共144例，其中本方法测定为阳性的为130例，阴性的为14例，符合率为90.28%。本方法的总符合率为95.09%。

本方法为定量分析方法，将同一份样本ECLIA的测定数值为横坐标，以本方法的测定数值为纵坐标，进行线性回归相关分析。直线方程为 $y = 1.04x + 22.94$ ($r = 0.89$)，线性回归系数为1.04，相关系数0.89。相关系数进行 t 检验，$tr = 29.88$，$t_{0.001,\infty} = 3.291$，$tr > t_{0.001,\infty}$，故 $P < 0.001$，相关系数的可信度很高。相关系数为0.89，表明两种方法的测定值密切相关。线性回归系数为1.04，表明两种方法的测定值之间单位计量比约为1。

3 讨论

乙型肝炎通过血液与体液传播，具有慢性携带状态，流行病学评估目前世界上有4亿多慢性感染者[6]，我国广泛流行，人群感染率大于15%[7]。血清抗-HBs检测不仅能用于乙型肝炎患者的诊断，而且它是HBV的中和抗体，WHO推荐，当抗-HBs浓度达到10 mIU/ml以上时，才对机体具有保护作用。

我国于2002年正式将HBV疫苗纳入计划免疫，目前已进行了4年，因此定量测定抗-HBs的浓度对于个体对乙肝病毒的免疫能力以及人群中抗-HBs的状况，特别是评价全面免疫的接种效果有重要意义。

目前国内检测抗-HBs有RIA法和ELISA法，多为定性分析，没有办法定量判断抗-HBs浓度达到10 mIU/ml以上，因而失去了对于临床的指导作用。本方法可以定量测定抗-HBs浓度，方法灵敏度高，检测范围宽，无放射性污染，并且操作简单，抗干扰能力强，测定结果可靠，价格较进口试剂低廉，可广泛应用于临床。

关键词：化学发光免疫分析；抗-HBs

中图法分类号：R446.62 **文献标识码**：B

参考文献：

[1] Shepard C W, Simard E P, Finelli L, *et al*. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination[J]. Epidemiol Rev, 2006, 28: 112-125.

[2] Enomoto M, Tamori A, Nishiguchi S. Hepatitis B virus genotypes and response to antiviral therapy[J]. Clin Lab, 2006, 52(1-2): 43-47.

[3] Gish R G, Locarnini S A. Chronic hepatitis B: current testing strategies[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2006, 4(6): 666-676.

[4] 洪国强，吴宗华，胡 波，等. 乙型肝炎病毒S基因在毕赤酵母中的表达及在乙型肝炎病毒表面抗体检测中的应用[J]. 中华检验医学杂志，2004，27(6)：371-374.

[5] Motte A, Colson P, Tamalet C. Evaluation of the clinical performance of the Beckman Coulter Access AbHBsII immunoassay for the detection of hepatitis B surface antibodies[J]. J Clin Virol, 2006, 37(3): 213-217.

[6] Lai C L, Ratziu V, Yuen M F, *et al*. Viral Hepatitis B[J]. Lancet, 2003, 362(9401): 2089-2094.

[7] 杨 劲，蔡 挺，徐 岱，等. 乙型肝炎病毒DNA等温扩增体系的建立[J]. 中华检验医学杂志，2006，29(11)：1021-1023.

（编辑 汪勤俭）