

## · 论 著 ·

## 时间分辨荧光免疫分析法检测乙型肝炎血清标志物的分析方法性能验证

黄永富<sup>1</sup>, 黄介飞<sup>2</sup>, 丛 辉<sup>3</sup>, 鞠少卿<sup>3</sup>

(1. 扬州大学第四临床医学院, 南通瑞慈医院检验医学中心, 江苏 226010;

2. 南通瑞慈医院消化内科, 江苏 226010; 3. 南通大学附属医院检验医学中心, 江苏 226001)

**摘要:** 目的 建立时间分辨荧光免疫检测法的方法学性能验证方案和试验方法。方法 采用新波 ANYTEST2000 时间分辨荧光免疫分析仪和雅培 AxSYM 免疫发光分析仪测定乙型肝炎病毒血清标志物(HBV-M)各项目, 分析前者的检测精密度、准确度、交叉污染率、灵敏度、测量范围、临床可报告范围、生物参考区间及抗干扰性能, 分析两者检测结果的相关性。结果 ANYTEST2000 时间分辨荧光免疫分析仪检测 HBV-M 各项目的精密度、准确度、交叉污染率、灵敏度、测量范围、临床可报告范围、生物参考区间均符合国际公认质量要求。血清中一定浓度的三酰甘油、总胆红素或血红蛋白对部分 HBV-M 项目产生不同程度的干扰。ANYTEST2000 与 AxSYM 检测 HBV-M 各项目结果间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 且具有良好的相关性。结论 ANYTEST2000 分析仪测定 HBV-M 的主要分析性能验证结果与厂商规定的分析性能基本一致。本研究所建立的分析仪性能验证方案和方法有助于提高仪器的检测质量。

**关键词:** 肝炎病毒, 乙型; 生物学标记; 时间分辨荧光免疫分析法**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.05.007**文献标识码:**A**文章编号:** 1673-4130(2011)05-0543-05**Analytical method s performance verification of hepatitis B virus serum markers by the Time-resolved Fluorescence Immunoassay**Huang Yongfu<sup>1</sup>, Huang Jiefei<sup>2</sup>, Cong hui<sup>3</sup>, Ju Shaoqing<sup>3</sup>

(1. Laboratory Medicine Centre, The 4th Clinical Medical College Affiliated to Yangzhou University,

Department of Laboratory Medicine, Nantong Rich Hospital, 2, Gastroenterology Department, Jiangsu Nantong 226010, China; 2, Laboratory Medicine Center, Affiliated Hospital to Nantong University, Nantong 226001, China)

**Abstract: Objective** To establish the program and methods for the performance verification of time-resolved fluorimmunoassay(TRFIA). **Methods** Hepatitis B virus serum markers(HBV-M) were detected by ANYTEST2000 TRFIA analyzer and Abbott AxSYM immunoluminescence analyzer. The precision, accuracy, cross-contamination, sensitivity, measurement range, clinical reportable range, biological reference intervals and interference immunity of the former were analyzed. The relativity of the detected results between the two analyzers was also analyzed. **Results** The precision, accuracy, cross-contamination, sensitivity, measurement range, clinical reportable range and biological reference intervals of ANYTEST2000 were all consistent with internationally generally accepted quality requirements. The detection of some indexes of HBV-M was interfered to various degrees by triacylglycerol, total bilirubin and haemoglobin, when the serum concentration of the interferents increased to certain degree. There were no statistical differences( $P > 0.05$ ), but fine correlation, of the detected results between the two analyzers. **Conclusion** The performance verification results of ANYTEST2000 are consistent with the analytical performance defined by manufacturer. The performance verification program and methods established in this research might be helpful for the enhancement of the performance quality of different analyzers.

**Key words:** Hepatitis B virus; biological markers ;time-resolved fluorescence immunoassay

《医疗机构临床实验室管理办法》和《医学实验室质量和能力认可准则》(ISO15189:2007)<sup>[1]</sup> 规定, 为保证质量, 任何新的检验设备和检测方法都需要进行精密度、正确度、分析测量范围、参考区间、功能灵敏度及样本携带污染率等指标的系统评价, 达到要求后才能应用于临床常规检测。美国病理家学会(College of American Pathologists, CAP)也要求参加 CAP 认可的实验室, 在开展某检测项目前需提供并保留相关的方法学验证试验数据。按照此规定, 笔者对乙型肝炎病毒血清标志物(Hepatitis B virus serum markers, HBV-M)的时间分辨荧光免疫分析法(time-resolved fluorimmunoassay, TRFIA)测定进行了方法学评价, 结果报告如下。

**1 材料与方法****1.1 仪器** ANYTEST2000 时间分辨荧光免疫分析仪, EFF-ICUTA 2710 全自动样本前处理系统, Egate 2310 全自动微孔

洗板机, J-2520 恒温变频振荡器, 均由上海新波生物技术有限公司提供。AxSYM 化学发光分析仪由美国雅培公司提供。

**1.2 试剂** 9.40 和 21.10 ng/mL HBsAg 标准物质, 批号均为 20090605; 21.0 和 180.0 mIU/mL HBsAb 标准物质, 批号均为 20090318; 2.22 和 25.0 PEIU/mL HBeAg 标准物质, 批号分别为 200907001 和 200907002; 1.10 和 3.50 PEIU/mL HBeAb 标准物质, 批号分别为 200907001 和 200907002, 1.11 PEIU/mL 和 2.50 PEIU/mL HBcAb 标准物质, 批号分别为 200908001 和 200908002, 均由康彻思坦生物公司提供。1.0 和 25.0 ng/mL HBsAg 校准品, 批号均为 20090910; 10.0 和 160.0 mIU/mL HBsAb 校准品, 批号均为 20091130; 2.45 和 27.0 PEIU/mL HBeAg 校准品, 批号均为 20091120; 0.20 和 0.82 PEIU/mL HBeAb 校准品, 批号均为 20091120; 0.96 和 1.84 PEIU/mL HBcAb 校准品, 批号均为 20091230, 均由苏州

新波生物技术有限公司提供。HBsAg 定量测定试剂盒(批号 20090910), HBsAb 定量测定试剂盒(批号 20091130), HBeAg 定量测定试剂盒(批号 20091120), HBeAb 定量测定试剂盒(批号 20091120), HBcAb 定量测定试剂盒(批号 20091230), HBV-M(HbsAg、HbsAb、HbeAg、HbeAb、HBcAb)线性参比品(批号分别为 20090910、20091130、20091010、20091020、20090930)均由苏州新波生物技术有限公司提供。各种 HBV-M 的血清 Panel 参考品盘:HBsAg 和 HBsAb 国家标准品,批号均为 20090701,分别可溯源至 HBsAg WHO(80/549)和 HBsAb WHO(1977)参考物质,由国家药品生物制品检定所提供;HBeAg、HBeAb 和 HBcAb PEI 标准品,批号均为 20090506,分别可溯源至 HBeAg PEI(82)参考抗原、HBeAb PEI(81)和 HBcAb PEI(82)参考血清,由德国国家疫苗及血清研究所提供。HBV-M 微粒子酶免分析法(microparticle enzyme immunoassay, MEIA)检测试剂盒,采用美国 Abbott 公司提供的 AxSYM 免疫分析仪的配套试剂、定标品及质控品,批号分别为 82336LF03、71373LF02、69358HN00、69367HN00、41558LU00。

**1.3 样本** 来自本院门诊和住院患者以及健康体检者的血清样本。

#### 1.4 方法

**1.4.1 精密度验证试验** 按标准操作规程(Standard Operating Procedure, SOP)对仪器进行维护保养、校准和质量控制,选择低值和高值 2 个水平的标准物质,按 CLSI EP5-A2 文件要求进行测定,每天分 2 批重复测定 4 次,连续 20 d,计算( $\bar{x} \pm s$ )和批内(CVW)、批间(CVB)、天间(CVD)和总变异系数(CVT)。

**1.4.2 准确度验证试验** (1)用校准品校准检测系统后,再对同一批号和不同批号的校准品进行检测,检测结果与各自的标示值(靶值)进行比对(2 个批号校准品均为仪器配套校准品,其校准值可溯源至 WHO HBV 参考品);(2)血清 Panel 国家参考品的检定:3 批 HBV-M 定量检测试剂盒分别测定各种 HBV-M 血清 Panel 国家参考品,计算国家线性参考品的检测值与标示值的相对偏倚(%)、线性比对、相关系数(r)和不精密度(CV%);(3)对卫生部检验中心 2009 年 10 月发放的 5 个不同批号的室间质控品进行检测,计算检测值与靶值的相对偏倚(%),与可接受限进行比对<sup>[2]</sup>。

**1.4.3 交叉污染率验证试验** 先各取 1 份 HBV-M 的高值标本,重复测定 3 次,结果分别为 H1、H2、H3;再分别取 1 份 HBV-M 的低值标本,重复测定 3 次,结果分别为 L1、L2、L3。按公式  $(L1-L2)/(H1-L3) \times 100\%$  计算各 HBV-M 的交叉污染率。

**1.4.4 分析灵敏度验证试验** 分析灵敏度或检测限系指检测系统可检测的最低分析物浓度,包括检测低限(lower limit of detection, LLD)、生物检测限(biologic limit of detection, BLD)和功能灵敏度(functional sensitivity, FS)<sup>[3]</sup>。按参考文献[3-4]介绍的方法进行验证。

**1.4.5 分析测量范围验证试验** 分析测量范围(analytical measurement range, AMR)是指患者标本未经任何处理(稀释、浓缩或其他处理),由检测系统直接检测得到的可靠检测范围。按参考文献[4]和 CLSI EP6-A2 文件选择低浓度(L)和高浓度(H)患者标本各 1 份,浓度覆盖仪器说明书给出的线性范围,H 和 L 按 20 L、19 L+1 H、18 L+2 H、14 L+6 H、10 L+10 H、8 L+12 H、6 L+14 H、4 L+16 H、2 L+18 H、20 H 的

关系配制,形成系列浓度血清。每个血清在检测系统上重复测定 4 次,记录结果。将实测值与预期值作比较,确定 HBV-M 的 AMR。

**1.4.6 临床可报告范围验证试验** 临床可报告范围(clinical reportable range, CRR)为患者标本经稀释、浓缩或其他处理后,向临床所能报告的结果范围。先进行稀释后回收试验,确定标本稀释后可靠检测浓度的低限(lower limits of dependable detectable concentration after diluent, LLDD)。选择各 HBV-M 的浓度在 AMR 内的高值标本 3 份,用生理盐水稀释液分别作 2、5、10、20、50、100、200、400、800 倍稀释,检测各稀释度的 HBV-M 含量的实际结果(Yi)与稀释后的预期值(理论值)(Xi)相比较,计算各 HBV-M 项目的稀释回收率(Ri%), $Ri\% = (Yi/Xi) \times 100\%$ 。按仪器说明书要求,稀释回收率在(100.0 ± 20.0)% 范围内的结果视为可接受。然后,选择初检超过 AMR 上限的高值乙肝患者或疫苗强化接种后的正常人血清标本,仪器分别作 1:10、1:20、1:100、1:200、1:400 和 1:800 等稀释,检测结果与稀释后的预期值比较,确定各 HBV-M 的最大稀释度(maximum diluent folds, MDF),结合功能灵敏度和临床决定水平确定 CRR<sup>[2]</sup>。

**1.4.7 生物参考区间(biological reference interval, BRI)验证试验** 参考 CLSI C28-A3 文件,选择 40 例体检合格的健康人标本,在检测系统上进行测定,检测结果用“1/3”规则进行离群值检验。发现离群值均弃去,并用新的参考个体代替,确保 40 例测试结果不含离群值。对结果进行统计并与仪器说明书提供的参考区间进行比较,若 40 例标本的检测结果均在仪器说明书提供的参考区间内或仅有 4 个标本超出,则验证通过。否则,进行参考区间确立试验。

**1.4.8 干扰试验的验证** 根据 CLSI 7A 文件的要求,收集 HBV-M 各项目的高、中、低 3 个浓度的血清样品各 1 例,分别加入不同量的生物性干扰物胆红素(bilirubin, BIL)、血红蛋白(haemoglobin, Hb)和三酰甘油(triacylglycerol, TG),记录加入前后测定值的变化,并计算出相对偏差(%)的均值来衡量相同干扰物质对各 HBV-M 的 3 个不同浓度标本的影响度。相对偏差(%)均值的绝对值大于 30% 为强干扰,20%~30% 为中度干扰,10%~20% 为弱干扰,小于 10% 认为无干扰。

**1.4.9 检测系统间的对比性验证** 根据 CLSI 9A 文件,选择高、中、低不同浓度的各种标本各 30 例,用新波 ANYTEST2000 和雅培 AxSYM HBV-M 检测系统分别测定 HBV-M 的各项目,把 ANYTEST2000 的 HBV-M 检测结果设为 X 值,AxSYM 的 HBV-M 检测结果设为 Y 值,并对两结果采用配对资料的 t 检验比较和相关回归分析。

## 2 结 果

**2.1 精密度验证结果** HBsAg 总 CV 在 9.05%~9.84% 之间、HBsAb 总 CV 在 8.32%~11.72% 之间、HBeAg 总 CV 在 8.75%~12.77% 之间、HBeAb 总 CV 在 7.19%~9.60% 之间、HBcAb 总 CV 在 10.06%~10.31% 之间。

**2.2 准确度验证结果** 相同批号 2 个水平校准品的验证值与靶值的相对偏倚,HBsAg 在 -12.00%~-12.12% 之间、HBsAb 在 -2.38%~12.40% 之间、HBeAg 在 -5.93%~-6.94% 之间、HBeAb 在 9.76%~15.00% 之间、HBcAb 在 3.80%~7.29% 之间;5 个不同批号室间控制品 HBV-M 的检测结果与其靶值的相对偏倚,HBsAg 在 -11.11%~3.45% 之间、HBsAb 在 -20.0%~6.67% 之间、HBeAg 在 -16.67%~

4.0%之间、HBeAb 在 -12.50%~10.0% 之间、HBcAb 在 -4.80%~1.87% 之间。3 批 HBV-M 定量检测试剂盒分别测定各种 HBV-M 的血清 Panel 国家参考品,结果显示线性参考品的测定均值与标示值的相关系数( $r$ )均大于 0.980,测定值与标示值的相对偏倚(%)均小于 15%,各 HBV-M 参考品的不精密度 CV% 均小于 15%。

**2.3 交叉污染率** 各 HBV-M 的交叉污染率在 0.013~0.030 之间。

**2.4 分析灵敏度验证结果** 空白样品和不同浓度试验样品 RFs 测定结果见表 1~3。计算得出,空白样品 RFs 值的( $\bar{x}_0 \pm s_0$ )详见表 1,系列试验样品的 RFs 值的( $\bar{x} \pm 3s$ )计算结果、RFs 值的日间不精密度及其与空白样品 RFs 均值的 3 倍标准差  $3s_0$ (夹心法)或空白样品 RFs 均值和其 3 倍标准差的差值( $\bar{x}_0 - 3s_0$ (竞争抑制法))的比较,详见表 2~3。以天间重复 CV 为 20% 时对应系列检测限样品具有的平均浓度,确定检测系统可定量报告分析物的最低浓度。各 HBV-M 系列浓度天间重复测定的荧光强度的 CV 值为 20% 或最接近 20% 的各 HBV-M 系列检测限样品所对应的浓度确定为其相应的 FS。各 HBV-M 的 FS 的确定详见表 2~4 所示。

**2.5 AMR 验证结果** 采取平均斜率来确定系列样品应含有的待测物的预期值( $X$ ),所有样品重复测定的均值为实测值( $Y$ ),将所有结果点在  $X \sim Y$  坐标图上,计算回归方程: $Y = bX + a$ 。若相关系数  $r \geq 0.975$ , $b$  在  $(1.0 \pm 0.03)$  范围内, $a$  与 0 无显著性差异,则可判断 AMR 在实验已涉及浓度。以 HBsAg 为例说明 HBV-M 检测方法的 AMR 的确定过程。在剔除相关系列浓度样品的有关试验点后,HBsAg 的预期值( $X$ )和实测值( $Y$ )均值间的直线回归方程为  $Y = 0.9631X + 1.1435$ , $r = 0.9997$ , $P < 0.001$ ,结合 HBsAg 检测法的 LLD,其 AMR 为  $0.06 \sim 144.44 \text{ ng/mL}$ ;同样,HBsAb、HBeAg、HBeAb 和 HBcAb 的预期值和实测值均值间的直线回归方程分别为  $Y = X - 1.2809$ ( $r = 1.000$ , $P < 0.001$ )、 $Y = 0.9979X - 0.0479$ ( $r = 0.9999$ , $P < 0.001$ )、 $Y = 0.9739X - 0.0181$ ( $r = 0.9977$ , $P < 0.001$ ) 和  $Y = 0.9882X - 0.0404$ ( $r = 0.9998$ , $P < 0.001$ ),它们的 AMR 分别为  $2.12 \sim 678.03 \text{ mIU/mL}$ 、 $0.20 \sim$

52.43 PEIU/mL、 $0.07 \sim 1.84 \text{ PEIU/mL}$ 、 $0.12 \sim 2.80 \text{ PEIU/mL}$ 。

**2.6 CRR 的试验结果** 取 3 份各 HBV-M 的浓度在 AMR 内的高值样本,用生理盐水分别作 1:2 到 1:400 倍稀释,计算各 HBV-M 项目的稀释回收率( $R\%$ ), $R\% = \text{实测值}(Y_i)/\text{预测值}(X_i) \times 100\%$ 。以  $R\%$  在  $(100.0 \pm 20.0)\%$  范围内的最高稀释倍数为 MDF,稀释后 LLDD 的估算等于预测值( $X_i$ )均值除以 MDF。3 份预测值分别为 214.038、178.520、169.812 ng/mL 的 HBsAg 的样本,其 R% 在 89.237%~118.016% 之间,标本稀释后可靠检测浓度的低限 LLDD 为  $0.469 \text{ ng/mL}$ ,最大稀释度 MDF 为 1:400;3 份预测值分别为 324.455、358.789、489.621 mIU/mL 的 HBsAb 的样本,其 R% 在 97.342%~114.905% 之间,LLDD 为  $7.819 \text{ mIU/mL}$ ,MDF 为 1:50;3 份预测值分别为 70.520、52.374、58.721 ng/mL 的 HBeAg 的样本,其 R% 在 89.237%~118.016% 之间,LLDD 为  $1.211 \text{ PEIU/mL}$ ,MDF 为 1:50;3 份预测值分别为 1.925、1.823、1.759 PEIU/mL 的 HBeAb 的样本,其 R% 在 94.805%~110.895% 之间,LLDD 为  $0.092 \text{ PEIU/mL}$ ,最大稀释度 MDF 为 1:20;3 份预测值分别为 2.962、2.459、2.726 PEIU/mL 的 HBcAb 的样本,其 R% 在 94.682%~109.835% 之间,LLDD 为  $0.272 \text{ ng/mL}$ ,MDF 为 1:10。

1 份初检超过 AMR 上限的高值乙肝患者或疫苗强化接种后的健康人血清标本的各 HBV-M 的 4 次测定的稀释试验的结果、稀释后  $R\%$  和 MDF 结果表明:1 份预测值分别为  $29.517 \text{ ng/mL}$ 、 $1.510.9 \text{ mIU/mL}$ 、 $5.076.2 \text{ PEIU/mL}$ 、 $88.0 \text{ PEIU/mL}$  和  $1.350.3 \text{ PEIU/mL}$  的 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb 和 HBcAb 的样本在稀释后经 4 次测定,其回收率 R% 分别在  $100.02\% \sim 101.59\%$ 、 $96.96\% \sim 114.22\%$ 、 $100.0\% \sim 117.40\%$ 、 $100.0\% \sim 107.39\%$ 、 $96.71\% \sim 100.0\%$  之间,MDF 分别为 1:400、1:100、1:200、1:200 和 1:3200。AMR 的上限乘以 MDF 即为 CRR 的上限。并在此基础上,再结合各 HBV-M 项目分析方法的 FS 确定各 HBV-M 项目的 TRIFA 检测的 CRR 范围,详见表 4。

表 1 检测 HBV-M 的方法的 LLD

项目	HBsAg	HBsAb	HBeAg	HBeAb	HBcAb
空白荧光强度 RF 均值( $\bar{x}_0$ )	2 755	3017	2 438	189 248	316 866
空白荧光强度 RF 标准差( $s_0$ )	540	896	704	20 050	15 652
批内不精密度 CV(%)	19.60	29.70	28.88	10.59	4.94
$3s_0$	1 619	2 688	2 112	60 151	46 955
$\bar{x}_0 \pm 3s_0$	4 374	5 705	4 550	129 097	269 911
LLD(浓度)	0.06	2.12	0.20	0.07	0.12
厂商说明的 LLD(浓度)	0.20	<10.0	<0.50	<0.10	<0.40

表 2 夹心法检测 HBV-M 的 BLD 及其 CV% 结果

项目	HBsAg						HBsAb						HBeAg					
系列标准浓度	0.20	0.50	1.00	2.00	5.00	5.00	10.00	20.00	30.00	40.00	0.50	1.20	2.40	3.60	5.20			
荧光强度 RF 均值( $\bar{x}$ )	5.274	10.720	16.653	42.656	70.895	6.330	9.488	12.380	20.136	25.816	5.530	7.487	14.458	23.489	3.1260			
荧光强度 RF 标准差( $s$ )	1.189	1.680	2.330	5.748	7.940	1.211	1.594	1.930	2.664	2.716	1.164	1.285	2.259	3.109	3.285			
$\bar{x} - 3s$	1.707	5.680	9.663	25.412	47.075	2.697	4.706	6.590	12.144	17.668	2.038	3.632	7.681	14.162	21.405			
日间不精密度 CV(%)	22.54	15.67	13.99	13.48	11.20	19.13	16.80	15.59	13.23	10.52	21.05	17.16	15.62	13.24	10.51			
$(\bar{x} - 3s)$ 与 $3s_0$ (夹心法)的比较	>1.619						>2.688						>2.112					

表 3 竞争抑制法检测 HBV-M 的 BLD 及其 CV% 结果

项目	HBeAb						HBcAb			
	系列标准浓度	0.10	0.20	0.30	0.42	0.62	0.21	0.42	0.96	1.30
荧光强度 RF 均值( $\bar{x}$ )	70 475	45 680	31 280	16 682	12 062	244 532	162 153	102 330	62 105	27 158
荧光强度 RF 标准差(s)	15 758	9 085	4 724	2 290	1 189	70 668	35 786	16 962	8 560	2 355
$\bar{x}+3s$	117 749*	72 935*	45 452*	23 552*	15 629*	456 536 $\Delta$	269 511 $\blacktriangle$	153 216 $\blacktriangle$	87 785 $\blacktriangle$	34 223 $\blacktriangle$
日间不精密度 CV(%)	22.36	19.89	15.10	13.73	9.86	28.90	22.07	16.58	13.78	8.67

\* :与( $\bar{x}+3s$ )比较,小于 129 097;  $\Delta$ :与( $\bar{x}_0-3s_0$ )比较,大于 247 556;  $\blacktriangle$ :与竞争抑制法比较,小于 269 911。

表 4 检测 HBV-M 的分析方法的主要性能验证结果

项目	单位	方法	LLD	BLD	FS	AMR		CCR	BRI	
						实测	厂商		实测	厂商
HBsAg	ng/mL	双抗体夹心法	0.06	0.20	0.35	0.06~144.44	0.20~150.0	0.35~57776	0.10±0.07	0~0.2
HBsAb	mIU/mL	双抗原夹心法	2.12	5.00	5.00	2.12~678.03	5.00~640.0	5.00~67803	4.89±4.41	0~10.0
HBeAg	PEIU/mL	双抗体夹心法	0.20	0.50	0.80	0.20~52.43	0.50~25.0	0.80~10486	0.29±0.12	0~0.50
HBeAb	PEIU/mL	抗原竞争抑制法	0.07	0.10	0.20	0.07~1.84	0.10~1.60	0.20~368	0.12±0.05	0~0.20
HBcAb	PEIU/mL	抗原竞争抑制法	0.12	0.42	0.64	0.12~2.80	0.40~2.50	0.64~8960	0.48±0.25	0~0.90

**2.7 生物参考区间验证结果** 40 份健康人标本血清 HBV-M 各项目的浓度分别为 HBsAg  $0.10 \pm 0.07$  ng/mL、HBsAb  $4.89 \pm 4.41$  mIU/mL、HBeAg  $0.29 \pm 0.12$  PEIU/mL、HBeAb  $0.12 \pm 0.05$  PEIU/mL、HBcAb  $0.48 \pm 0.25$  PEIU/mL, 均在仪器说明书给出的参考区间(分别小于  $0.2$  ng/mL、 $10.0$  mIU/mL、 $0.50$  PEIU/mL、 $0.20$  PEIU/mL、 $0.90$  PEIU/mL)的范围内, 详见表 4 所示。

**2.8 干扰试验的验证** 除各种浓度( $8.0$ 、 $4.0$ 、 $2.0$  mmol/L)的 TG 对 HBeAb 的结果和低浓度总胆红素(Total BIL, TBIL) ( $<45$   $\mu$ mol/L)、TG ( $<2.0$  mmol/L)、Hb ( $<20$  g/L) 对各 HBV-M 的结果均无明显影响外, 其余高、中浓度的 TBIL ( $180$ 、 $90$   $\mu$ mol/L)、TG( $8.0$ 、 $4.0$  mmol/L)、Hb( $80$ 、 $40$  g/L) 对各 HBV-M 的结果均有一定影响。TBIL、TG、Hb 除对 HBcAb 产生正干扰作用外, 对其他 HBV-M 的检测结果均产生负干扰作用, 其确切机制尚不清楚, 有待进一步探讨。各浓度干扰物对 HBV-M 检测影响的干扰试验结果表明:  $80$  g/L 的 Hb 对 HBeAg 和 HBeAb、 $90$  和  $180$   $\mu$ mol/L 的 TBIL、 $4.0$  和  $8.0$  mmol/L 的 TG、 $40$  和  $80$  g/L 的 Hb 对 HBcAb 均有强干扰作用;  $180$   $\mu$ mol/L 的 TBIL、 $80$  g/L 的 Hb 对 HBsAg、 $180$   $\mu$ mol/L 的 TBIL、 $8.0$  mmol/L 的 TG 和  $80$  g/L 的 Hb 对 HBsAb、 $180$   $\mu$ mol/L 的 TBIL 和  $8.0$  mmol/L 的 TG 对 HBeAg、 $180$   $\mu$ mol/L 的 TBIL、 $40$  g/L 的 Hb 对 HBcAb 均有中度干扰;  $90$   $\mu$ mol/L 的 TBIL、 $8.0$  mmol/L 的 TG、 $40$  g/L 的 Hb 对 HBsAg、 $90$   $\mu$ mol/L 的 TBIL、 $4.0$  mmol/L 的 TG、 $40$  g/L 的 Hb 对 HBsAb 和 HBeAg、 $90$   $\mu$ mol/L 的 TBIL 对 HBeAb 均有弱的干扰;  $45$   $\mu$ mol/L 的 TBIL、 $2.0$  和  $4.0$  mmol/L 的 TG、 $20$  g/L 的 Hb 对 HBsAg、 $45$   $\mu$ mol/L 的 TBIL、 $2.0$  mmol/L 的 TG、 $20$  g/L 的 Hb 对 HBsAb、HBeAg 和 HBcAb、 $45$   $\mu$ mol/L 的 TBIL、 $2.0$ 、 $4.0$  及  $8.0$  mmol/L 的 TG、 $20$  g/L 的 Hb 对 HBeAb 均无干扰作用。

**2.9 对比性验证的结果** 比较 ANYTEST2000(X) 和 Ax-SYM(Y) 检测系统分别检测 30 例 HBV-M 的结果显示: ANYTEST2000 检测系统检测 30 例 HBsAg、HBsAb、HBeAg、

HBeAb 和 HBcAb 的结果分别是  $21.85 \pm 40.17$  ng/mL、 $136.37 \pm 217.98$  mIU/mL、 $10.95 \pm 14.72$  PEIU/mL、 $0.73 \pm 0.63$  PEIU/mL 和  $1.54 \pm 0.79$  PEIU/mL; 而其 Ax-SYM 检测系统的检测结果分别是  $22.58 \pm 42.47$  ng/mL、 $133.66 \pm 217.98$  mIU/mL、 $10.87 \pm 14.67$  PEIU/mL、 $0.73 \pm 0.64$  PEIU/mL 和  $1.52 \pm 0.75$  PEIU/mL。其  $t$  值在  $0.022\ 014 \sim 0.098\ 867$  之间, 而  $P$  值在  $0.921\ 585 \sim 2.001\ 717$  之间。因其  $t$  值均小于  $2.00$  且  $P$  值均大于  $0.05$ , 说明 ANYTEST2000 和 Ax-SYM 检测系统 HBV-M 的检测结果间差异无统计学意义。两检测系统检测 HBV-M 的对比性分析显示,  $F$  值均大于  $13.498$ ,  $P$  均小于  $0.001$ , 相关系数在  $0.983\ 06 \sim 0.996\ 14$  之间, 相对偏倚(%)在  $0.087 \sim 72.727$  之间, 说明两检测系统检测 HBV-M 的结果虽有一定差异, 但差异无统计学意义, 且两者的检测结果间具有很好的相关性。

### 3 讨 论

检测系统的分析性能能够满足临床要求是医学实验室认可和“检验结果互认”的根本保证<sup>[5-6]</sup>。本研究对 ANYTEST2000 时间分辨荧光免疫分析仪测定 HBV-M 的分析性能进行验证, 旨在为 TRFIA 的方法学性能验证提供一套简便易行的验证方案和实验方法, 也可供其他定量检验方法学性能验证时参考。

本实验结果显示, HBsAg 浓度在  $9.40$  和  $21.10$  ng/mL 时, 其总不精密度为  $9.05\%$  和  $9.84\%$ , HBsAb 浓度在  $21.0$  和  $180.0$  mIU/mL 时, 其总不精密度为  $11.72\%$  和  $8.32\%$ , HBeAg 浓度在  $2.22$  和  $25.00$  PEIU/mL 时, 其总不精密度为  $12.77\%$  和  $8.75\%$ , HBeAb 浓度在  $1.10$  PEIU/mL 和  $3.50$  PEIU/mL 时, 其总不精密度为  $7.19\%$  和  $9.60\%$  HBcAb 浓度在  $1.11$  PEIU/mL 和  $2.50$  PEIU/mL 时, 其总不精密度为  $10.06\%$  和  $10.31\%$ 。均与试剂质检报告的精密度基本一致, 达到国际公认的质量要求(允许不精密度小于  $15.0\%$ )<sup>[7-8]</sup>。准确度验证通常采用 CLSI EP9-A2 文件, 与参考系统或其他标准方法进行方法比对和偏倚评估。因不同的 TRFIA 检测系统所用设备、标记物、分析原理等均不相同, 且缺乏参考方法。

因此,该法不适用于 TRFIA 准确度的评价。本研究参考 CLSI EP-15A 文件,对卫生部检验中心发放的室间控制品和仪器配套的校准品(HBsAg、HBsAb 可溯源至国家标准品,HBeAg、HBeAb 和 HBcAb 可溯源至 PEI 标准品)进行检测,检测结果与“靶值”进行比对,结果表明,5 个不同批号室间控制品的检测结果与靶值的相对偏倚均在 CLIA 88 规定的允许误差范围内;相同批号 2 个水平校准品的验证值与靶值的相对偏倚达到国际公认的质量要求(允许偏差小于 15.0%)<sup>[7-8]</sup>。

交叉污染率试验表明:ANYTEST2000 检测各 HBV-M 的交叉污染率均很低,波动在 0.013%~0.030% 范围之间。HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb 和 HBcAb 各自的交叉污染率分别为 0.014%、0.013%、0.021%、0.030% 和 0.028%。

对检测系统的 LLD、AMR 和 BRI 验证结果表明:该检测系统测定 HBV-M 的 LLD 均分别优于生产商给出的其各自的分析灵敏度 0.20 ng/mL、10.0 mIU/mL、0.50 PEIU/mL、0.10 PEIU/mL 和 0.40 PEIU/mL。HBsAg 的 LLD 测定此次仅考虑了 HBsAg 的 adr 亚型,adw 和 ayr 亚型未进行试验,但厂商提供了其分析灵敏度均为 1.0 ng/mL,这有待日后验证。黄祖瑚等<sup>[9]</sup>报道江苏慢性 HBV 感染患者 adr 亚型占 61%、adw 占 33%、ayr 占 2%、adwr 占 4%,且 adr 亚型随年龄增长而比例增高,adr 和 adwr 亚型感染者 HBsAg 浓度较 adw 组显著增高,且 e 抗原阳性率亦较高,说明 adr 和 adwr 亚型的 HBV 株可能具有较强的复制活性,故其不易被清除,从而导致受感染者病程迁延。除 HBsAg 的 AMR 实测为 0.06~144.44 ng/mL,稍低于厂商给出的 0.20~150.0 ng/mL 外,其余 HBV-M 的 AMR(HBsAb 的 AMR 为 2.12~678.03 mIU/mL、HBeAg 为 0.20~52.43 PEIU/mL、HBeAb 为 0.07~1.84 PEIU/mL、HBcAb 为 0.12~2.80 PEIU/mL)均宽于厂商提供的其各自的 AMR 的范围(分别为 5.0~640 mIU/mL、0.5~25.0 PEIU/mL、0.10~1.60 PEIU/mL 和 0.40~2.50 PEIU/mL)。

40 份健康人标本血清 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb 浓度均在仪器说明书给出的其各自的参考区间(分别小于 0.2 ng/mL、10.0 mIU/mL、0.50 PEIU/mL、0.20 PEIU/mL、0.90 PEIU/mL)的范围内,按照 CLSI C28-A3 的要求,可直接使用厂商提供的参考区间。

此外,本研究还建立了该检测系统测定 HBV-M 的 BLD、FS 和 CCR。BLD 和 FS 更能准确反映检测系统的分析灵敏度性能。建议临床实验室对传染病标志物等低值检测特别有意义的项目,除验证厂商规定的 LLD 外,还应建立 BLD 和 FS,以便为临床出具准确可靠的检验报告,提高传染性标志物检测结果的可靠性和医疗机构间同一项目检验结果的可比性,并及时发现 HBV 的“窗口期”或早期感染患者。

CCR 试验结果表明:HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb 和 HBcAb 的标本稀释后可靠检测浓度的低限大约分别为 0.469 ng/mL、7.819 mIU/mL、1.211 PEIU/mL、0.092 PEIU/mL 和 0.272 PEIU/mL,其各自的 MDF 分别为 1:400、1:100、1:200、1:200、1:3 200,明显大于仪器自动稀释的 MDF,必要时要进行手工稀释。结合 AMR 上限、MDF、FS 和临床决定水平,本检测系统测定 HBsAg 的 CCR 为 0.35~5 776 ng/mL,HBsAb 的 CCR 为 5.0~67 803 mIU/mL、HBeAg 的 CCR 为

0.80~10 486 PEIU/mL、HBeAb 的 CCR 为 0.20~368 PEIU/mL、HBcAb 的 CCR 为 0.64~8 960 PEIU/mL。当患者标本 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb 和 HBcAb 的检验结果高于其各自的 AMR 时,必须稀释重做,但 MDF 不宜超过上述其各自的 MDF(如 HBsAg 小于 400 倍),同时 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb 和 HBcAb 的标本稀释后的测定值必须分别大于 0.469 ng/mL、7.819 mIU/mL、1.211 PEIU/mL、0.092 PEIU/mL 和 0.272 PEIU/mL,否则其检测结果就不可靠。

干扰试验验证结果表明:除各种浓度(8.0、4.0、2.0 mmol/L)的 TG 对 HBeAb 的结果和低浓度 TBIL(<45 μmol/L)、TG(<2.0 mmol/L)、Hb(<20 g/L)对各 HBV-M 的结果均无明显影响外,其余高、中浓度的 TBIL(180、90 μmol/L)、TG(8.0、4.0 mmol/L)、Hb(80、40 g/L)对各 HBV-M 的结果均有一定的影响。除 TBIL、TG、Hb 对 HBcAb 产生正干扰作用外,对其他 HBV-M 的检测结果均产生负干扰作用,其确切机制尚不清楚,有待进一步研究。

ANYTEST2000 和 AxSYM 检测系统对比性验证的结果表明:两检测系统检测 HBV-M 的结果虽有一定差异,但差异无统计学意义( $P>0.05$ ),且二者的检测结果具有很好的相关性( $r$  波动在 0.983 06~0.996 14 之间, $P<0.001$ )。

总之,本研究对 ANYTEST2000 时间分辨荧光免疫分析仪测定 HBV-M 的主要分析性能验证结果与厂商规定的分析性能基本一致。同时为 TRFIA 定量检验项目的方法学性能验证提供了 1 套简便实用的验证方案和实验方法,对规范 TRFIA 检验,提高 TRFIA 检验质量具有重要意义,也可为医学实验室认可提供帮助。

## 参考文献

- [1] 魏昊,丛玉隆.医学实验室质量管理与认可指南[M].北京:中国计量出版社,2004:59-75.
- [2] 毕波,吕元.定量检测方法学性能验证的系统设计[J].中华检验医学杂志,2007,30(2):143-145.
- [3] Davenport JM, Schlain B. Testing claimed minimal detectable concentration in vitro medical diagnostic devices[J], Clin Chem, 2000, 46(2):1669-1680.
- [4] 丛玉隆,冯仁丰,陈晓东.临床实验室管理学[M].北京:中国医药科技出版社,2004:96-108.
- [5] 陶华林,汪碧琼.医疗机构临床实验室间检验结果互认的探讨[J].现代检验医学杂志,2009,24(1):23-24.
- [6] 李金明,申子瑜.正确认识临床实验室认可与提高检验质量之间的关系[J].中华检验医学杂志,2007,30(2):132-135.
- [7] Luraschi P, Brambilla S, Pagani A, et al. Updating biological variation databases and selecting reasonably correct published values [J], Scand J Clin Lab Invest, 2000, 60(8):733-735.
- [8] Ricos C, Alvarez V, Cava F, et al. Current databases on biological variation: pros and cons and progress[J]. Scand J Clin Lab Invest, 1999, 59(7):733-735.
- [9] 黄祖瑚,韩亚萍,刘婷,等.慢性 HBV 感染患者 HBsAg 亚型分析[J].南京医科大学学报(自然科学版),1997,17(2):115-118.

(收稿日期:2010-08-13)