

• 临床检验研究 •

某化学发光分析仪 HBsAg 手工稀释液的制备及应用研究*

余文辉¹, 周大桥², 周小梅¹, 李伟雄¹, 张春雷¹, 冯玉丽¹, 贺劲松², 邓剑玲¹, 陈雪红¹, 林卓玲¹
(广东省深圳市中医院: 1. 检验科; 2. 肝病科/国家级肝病重点专科 518033)

摘要:目的 制备雅培 i2000SR 化学发光分析仪乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)定量分析手工稀释液。方法 利用人血浆(HBsAg、HBV-DNA 和抗 HIV-1/HIV-2 呈阴性)与 Beckman Coulter DxI800 冲洗缓冲液,按 4:1 体积比配制成 80% 血浆稀释液。分别用自制 80% 血浆稀释液和原厂 HBsAg 稀释液对 100 例 HBsAg 阳性血清样本进行稀释后上机检测,并将测得结果进行统计学分析。结果 原厂 HBsAg 稀释液与自制 80% 血浆稀释液对血清样本稀释后所测得 HBsAg 值比较,前者测得结果绝大多数比后者所测得血清值高,但两者差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 自制 80% 血浆 HBsAg 稀释液替代雅培 i2000SR HBsAg 手工稀释液是可接受的。

关键词: 肝炎病毒,乙型; 抗原,表面; 发光; 稀释液

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.17.015

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)17-1946-02

Preparation and application of HBsAg manual diluent for Abbott chemiluminescence analyzer*

Yu Wenhui¹, Zhou Daqiao², Zhou Xiaomei¹, Li Weixiong¹, Zhang Chunlei¹,
Feng Yuli¹, He Jinsong², Deng Jianling¹, Chen Xuehong¹, Lin Zhuoling¹

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Hepatology Specialty/National Key Specialty of Hepatology,
Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen Guangdong 518033, China)

Abstract: **Objective** To prepare a manual diluent of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) quantitative analysis for Architect i2000SR chemiluminescence analyzer. **Methods** 80% plasma diluent was prepared by mixing human plasma (HBsAg, HBV-DNA and anti HIV-1/HIV-2 were negative) and Beckman Coulter DxI800 washing buffer according to the volume ratio of 4:1. 100 cases of serum samples positive with HBsAg were diluted with 80% self-made plasma diluent and the original HBsAg diluent respectively, and detected on Architect i2000SR system. The results were analyzed statistically. **Results** The difference of levels of HBsAg in serum samples, diluted with 80% self-made diluent or original diluent, was statistically significant ($P>0.05$). **Conclusion** It maybe acceptable to substitute Architect i2000SR HBsAg manual diluent with self-made 80% plasma HBsAg diluent.

Key words: hepatitis B virus; antigens, surface; luminescence; diluent

全球慢性乙型肝炎(CHB)病毒感染者多达 3.6 亿人,中国约占 1.2 亿人。慢性感染者中约有 50%~75% 有活跃的病毒复制和肝脏炎症改变,部分 CHB 可进展为肝硬化、肝衰竭或原发性肝癌,为主要致死因素之一^[1-2]。CHB 的诊断主要依据病史、症状、体征、血清标志物检测和肝脏影像学检查等。近年来有研究显示 HBsAg 与 HBV DNA 载量之间有良好的相关性^[3]。定量检测 HBsAg 在一定程度上可反映宿主体内 HBV 复制水平,随着检测技术的进步,HBsAg 定量分析也作为监测 HBV 复制水平的一种指标,对 CHB 的诊断、疗效评价和预后判断具有重要价值^[4]。

目前,乙型肝炎(简称“乙肝”)的诊断和筛查常用血清学指标主要是乙肝“两对半”,其中的 HBsAg 最重要。Architect i2000SR 化学发光分析仪可对乙肝“两对半”进行定量分析。本院肝病重点专科 2009 年中标国家“十一五”科技重大专项以来,乙肝“两对半”定量检测样本量大增,而 HBsAg 的检测的线性范围较窄(0~250 IU/mL),患者血清 HBsAg 含量常超过 250 IU/mL,需稀释后再测定,以获得准确可靠的结果。雅培公司提供的 HBsAg 手工稀释液价格昂贵,且有效期短。本研究旨在探讨自制 80% 血浆稀释液是否可替代原厂稀释液。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采集本院肝病专科门诊和住院患者完全样本 118 例。

1.2 仪器与试剂 采用雅培 i2000SR 化学发光分析仪,原厂

配套的 HBsAg 试剂盒(6C36),包括微粒子(6.6 毫升/瓶,100 个测试):在 EMS 缓冲液中配置的抗-HBs 鼠单克隆抗体;结合物(5.9 毫升/瓶,100 个测试):在 EMS 缓冲液中制备的吡啶酯标记抗-HBs 羊 IgG;预激发液:含 1.32%(W/V)过氧化氢;激发液:含 0.35 mol/L 氢氧化钠;冲洗缓冲液:含磷酸盐缓冲液和抗菌剂。HBsAg 稀释液(Lot:86165LF00)。

1.3 质控品 由雅培公司提供。阴性质控品:0.00~0.04 IU/mL;阳性质控品:0.16~0.34 IU/mL(低值),113.75~236.25 IU/mL(高值)。

1.4 方法

1.4.1 自制 HBsAg 稀释液 混合分离自体体检健康学生全血的血浆(HBsAg、HBV-DNA),体积比按 4:1 加入血浆悬液 80 mL 和 20 mL Beckman Coulter DxI800 冲洗缓冲液(成分:Tris 盐缓冲液,离子表面活性剂),混匀后加入 100 μ L Proc-lin300 防腐剂(上海闪晶分子生物科技有限公司),充分混匀后(pH 值为 7.5)于 4~8 $^{\circ}$ C 冷藏 48 h 待用。

1.4.2 患者血清样本提取 采集全血样本,4 000 r/min 离心 10 min,提取血清待测。当天没能完成检测的样本,分离血清后置 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.4.3 HBsAg 检测 首先选用胶体金试纸条(北京蓝十字生物技术有限公司)对血清样本 HBsAg 进行初筛。根据试纸条测试线 with 对照线显色的深浅进行比对判断,剔除显色很淡的和无显色者 18 例。余下的 100 例血清样本,分为高值(23 例),

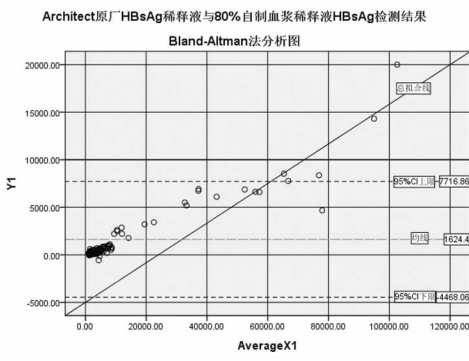
* 基金项目:深圳市科技计划项目(201003194)。

中值(65 例)和低值(12 例)3 组,分别用雅培 HBsAg 人工稀释液和自制血浆稀释液按 1 : 500(第 1 步:稀释液 475 μ L + 25 μ L 血清,震荡混匀 1 min;第 2 步:更换新吸嘴吸取第 1 次稀释血清悬液 20 μ L + 480 μ L 稀释液),1 : 200(第 1 步同上;第 2 步:第 1 次稀释血清悬液 30 μ L + 270 μ L 稀释液)和 1 : 60(第 1 步同上;第 2 步:第 1 次稀释血清悬液 100 μ L + 200 μ L 稀释液)比例进行稀释,充分混匀后上机检测 HBsAg 含量,每份稀释样本重复测定 2 次,记录原始数据后,计算每例样本的 2 次测定值的均值。操作过程严格按 SOP 文件执行,每批实验前都进行质控分析,确认检测结果在控后,再进行样本测定。每组实验在 2 h 内完成。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 进行分析;组间比较采用配对 t 检验,两种方法测量数据的相关性采用线性相关回归分析,再采用 Bland-Altman 一致性分析;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Bland-Altman 法分析 见图 1。图 1 中 95% 可信区间(95% CI)为(-4 468.06, 7 716.86)。从图中可看得出总拟合线右下方共有 4 个点,表示有 4 个样本测定值 HBsAg2 比 HBsAg1 的高。只有 4 个点落在 95% CI 外,其余各点都落在 95% CI 之内。



AverageX1 表示两种不同稀释液 HBsAg 测定值的均值, Y1 表示两种不同稀释液 HBsAg 测定值的差值

图 1 Bland-Altman 法分析

2.2 直线相关回归分析 见图 2。经直线相关回归分析得知, $r = 0.998\ 8$, $P < 0.001$ 。两者的测定结果具有良好的相关性($r^2 = 0.998$, $P < 0.001$)。

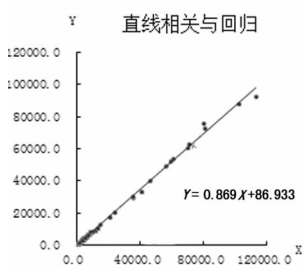


图 2 原厂稀释液(HBsAg1)与自制稀释液(HBsAg2)所得结果的直线相关图

2.3 配对 t 检验分析 经配对样本 t 检验,得知 HBsAg1 与 HBsAg2 的均值分别为 13 187.58 IU/mL 和 11 545.15 IU/mL, $t = 5.284$, $P > 0.05$,两者存在显著正相关关系。

3 讨 论

雅培 i2000SR 化学发光分析仪采用化学发光仪微粒子免疫分析法(chemiluminescent microparticle immunoassay, CMIA),可用于超微量定量或定性测定人血清/血浆及其他体液中病毒抗

原、抗体、激素、多肽、肿瘤蛋白、代谢产物等。CMIA 为目前临床乙肝“两对半”进行定量分析应用最为广泛的一种技术^[5],检测程序为 ChemiFlex™ 技术,为免疫检测程序的最优化步骤。其 HBsAg 包被的抗体是针对一些受突变影响最小且具有特异性亲和抗原决定簇的多种单克隆抗体,能有效识别多种逃逸变异株,减少漏诊。专利设计的转盘可以灵活地同时运行一步法、二步法和带预处理的分析项目。标记抗体为专利技术的吖啶酯(N-磺酰基)羧基氨基化合物,由于其分子结构特性和增加的光子量,使得其在非竞争免疫分析模式中有极好的检测灵敏性(99.52%)和特异性(99.87%)。基质液采用 H₂O₂ 作为预激发液,将吖啶酯从反应复合物中脱离下来,采用 NaOH 作为激发液,吖啶酯在过氧化物和碱性溶液中发生氧化反应,这引起化学发光反应的发生,甲基吖啶酯形成并释放能量(光反射),返回基态。测定得到的化学发光反应,以相对发光值(RLU)表示。样本中 HBsAg 与 Architect i2000SR 系统光学检测的 RLU 之间成正比。Architect HBsAg 检测通过 4 参数逻辑曲线拟合(4PLC, Y-加权)数据还原生成标准曲线,用于确定样本中 HBsAg 含量^[6]。

反应体系中的蛋白质分子种类及含量、pH 值、离子强度(电解质)和温度等对免疫反应有较大影响。待测血清稀释后,若反应体系发生明显变化,则会影响检验结果准确性。在开展此课题实验之前,课题组已先后分别做了 20 例生理盐水(normal saline, NS), 20 例蒸馏水和 20 例自制 50% 血浆稀释液的血清 HBsAg 稀释试验,发现测得结果都明显偏低,偏差较大,其中自制 50% 血浆稀释液的测定结果较好。接着又各做了 10 例 80% 和 90% 血浆稀释液的血清 HBsAg 稀释试验,其结果相当接近。从中得到启示,而转向自制 80% 血浆稀释液的实验研究。经严格比对测试,发现自制 80% 血浆稀释液与原厂稀释液 HBsAg 检测结果比较,两者存在显著正相关关系($r = 0.999$),差异无统计学意义($t = 5.284$, $P > 0.05$),提示自制 80% 血浆稀释液对 HBsAg 测定结果影响较小。

研究发现自制 80% 血浆稀释液的结果(HBsAg2)绝大多数都较原厂手工稀释液的结果(HBsAg1)偏低。4 例样本检测结果 HBsAg2 高于 HBsAg1,可能为偶然误差造成的。高云朝等^[7],利用化学发光免疫仪检测高浓度 HCG 血清样本时,结论是稀释液最好采用混合低值血清,这与本研究结果相符;而陈广福等^[8]报道,除专用稀释液外,NS 是磁分离酶联免疫法测定血清 HCG 的首选稀释液。郑军等^[9]报道,测定脂肪酶和淀粉酶的最佳稀释液分别为低值血清和 NS。提示所选用的稀释液应因检测项目和方法学的不同而异。

本研究发现,自制 80% 血浆稀释液与专用稀释液的 HBsAg 检测结果较为接近,偏差较小,可能是因其血浆蛋白质含量、pH 值、电解质强度和其他血清成分与患者血清样本最为接近,基质效应最小,因而用该稀释液稀释 HBsAg 测定结果是可接受的。NS 的离子强度、pH 值与血清相近,但缺乏蛋白质和其他血清成分;而蒸馏水不含蛋白质及其他血清成分,且 pH 值小于 7.0,与血清 pH 值相差较大,故用 NS 或蒸馏水稀释血清,测定 HBsAg 过程中会产生较强的基质效应,结果偏差较大,不宜作为反应的血清稀释液^[10]。实验注意事项:试剂盒首次上机前,必须轻轻颠倒混匀微粒子瓶 30 次,使在运输过程沉淀下来的微粒子重新悬浮。Architect i2000SR HBsAg 试剂含有可以减少 HAMA 阳性样本的成分。在 HBsAg 检测结果与临床不符时,需要通过附加测试,如中和试验,验证检测结果。

综上所述,稀释液对血清检测项目的影响较大,影响因素包括稀释液的种类和浓度以及检测方法 (下转第 1949 页)

表 2 不同季节 Hcy、VB₁₂、叶酸水平比较($\bar{x} \pm sD$)

项目	冬春季			夏秋季		
	男(<i>n</i> =78)	女(<i>n</i> =73)	总体(<i>n</i> =151)	男(<i>n</i> =78)	女(<i>n</i> =73)	总体(<i>n</i> =151)
Hcy(μmol/L)	19.06±2.36	17.78±4.10	18.05±3.37	25.11±15.65	23.93±14.05	24.82±15.94
叶酸(nmol/L)	3.98±1.66 [*]	5.18±0.69 [△]	4.59±1.27 [#]	6.31±2.11	7.11±1.77	6.98±1.90 [#]
VB ₁₂ (pmol/L)	209.15±90.39 [*]	283.22±81.23 [△]	245.60±85.51 [#]	387.01±96.66	425.32±101.44	407.00±116.36 [△]

^{*}: *P*<0.05,与男性夏秋季检测结果比较; [△]: *P*<0.05,与女性夏秋季检测结果比较; [#]: *P*<0.05,与总体夏秋季检测结果比较。

3 讨 论

叶酸代谢与人类疾病的关系是医学研究的热点之一。叶酸缺乏、血浆同型半胱氨酸升高可能是诱发心脑血管疾病的新的独立危险因素^[4]。血液叶酸营养状况存在明显的种族差异。吸烟、饮酒及膳食营养状况是血液叶酸水平重要的影响因素^[5]。欧美国家有关人群 VB₁₂ 营养状况研究数据显示,血浆 VB₁₂ 水平存在明显的种族、性别差异,并有随年龄增加而降低的趋势;吸烟可降低血浆 VB₁₂ 水平^[6]。中国研究资料资料显示,婚检女性叶酸缺乏率北方高于南方,冬春季高于夏秋季。但有关中国不同地区、不同季节成人叶酸水平的报道很少。

哈尔滨市位于北纬 45 °C 略北,属于亚寒带气候,冬夏温度差异极大,夏天可高达 30 °C,平均 20 °C 左右,而冬季低达 -20 °C 平均 -10 °C 左右。哈尔滨,四季分明其蔬菜和水果的出产种类也呈现明显的季节性特征。虽然现在生活水平提高了,但是传统的饮食习惯仍然影响着人们,到了冬天人们依然习惯储存冬菜,导致对蔬菜和水果的摄入明显低于夏季,而蔬菜和水果含有丰富的 B 族维生素。膳食叶酸摄入量是血液叶酸水平重要的影响因素。

本研究选取了代表冬春季的 2 月份和代表夏秋季的 10 月份,因为在哈尔滨,这两个月份分别是蔬菜和水果出产匮乏和丰富的时期。本研究发现这两个月份间,老年人的叶酸和 VB₁₂ 水平差异具有统计学意义,说明在北方冬春季老年人对叶酸和 VB₁₂ 摄入明显减少,而这个季节也正是老年人心脑血管疾病的高发季节^[7]。为此,笔者调查了作为心脑血管独立危险因素的 Hcy 的水平^[8],但是结果显示 Hcy 水平没有呈现出随季节改变而发生变化的趋势。这是因为叶酸和 VB₁₂ 并不是影响 Hcy 水平的主要因素,而且这与国外报道的叶酸和 Hcy 的相关性不强相符^[9-10]。

虽然老年人血浆 Hcy 水平没有发生季节性改变,但是在北方冬春季老年人应该注意对叶酸和 VB₁₂ 的摄入,因为叶酸和 VB₁₂ 缺乏与其他老年性疾病如肿瘤等相关。

参考文献

[1] 郝玲,田熠华,章斐然,等.我国部分地区成年人血浆叶酸的地区和季节差异比较[J].中华预防医学杂志,2002,36(5):308-310.

[2] 郝玲,田熠华,唐仪,等.我国部分地区成人血浆维生素 B₁₂ 水平比较研究[J].营养学报,2004,26(1):19-22.

[3] Nilsson TK,Yngve A,Böttiger AK,et al. High folate intake is related to better academic achievement in Swedish adolescents[J]. Pediatrics,2011,128(2):e358-365.

[4] 李朝辉.血清同型半胱氨酸对冠心病的诊断价值[J].国际检验医学杂志,2010,31(4):378-379.

[5] Hao L,Ma L,Zhu JH,et al. High prevalence of hyperhomocysteinemia in chinese adults is associated with low folate,vitamin B-12,and vitamin B-6 status[J].J Nutr,2007,137(2):407-413.

[6] Hao L,Ma J,Stampfer MJ,et al. Geographical,seasonal and gender differences in folate status among Chinese adults[J].J Nutr,2003,133(11):3630-3635.

[7] 张春明,牛广华,钱铸山.同型半胱氨酸、氧化低密度脂蛋白、内皮素和尿酸与老年冠心病关系探讨[J].国际检验医学杂志,2008,29(11):1043-1044.

[8] Schroecksnadel K,Grammer TB,Boehm BO,et al. Total homocysteine in patients with angiographic coronary artery disease correlates with inflammation marker[J].Thromb Haemost,2010,103(5):926-935.

[9] Borriore P,Pigozzi F,Massazza G,et al. Hyperhomocysteinemia in winter elite athletes:a longitudinal study[J].J Endocrinol Invest,2007,30(5):367-375.

[10] McKinley MC,Strain JJ,McPartlin J,et al. Plasma homocysteine is not subject to seasonal variation[J].Clin Chem,2001,47(8):1430-1436.

(收稿日期:2011-05-20)

(上接第 1947 页)

学等。应该具体问题具体分析,方能保证检验结果的准确度和可信度。自制 80% 血浆稀释液对 HBsAg 测定结果影响较小,可用作雅培 HBsAg 手工稀释液的替代品。

参考文献

[1] 任红.肝炎病毒//黄文林.分子病毒学[M].北京:人民卫生出版社,2002:334-365.

[2] 余文辉,周小梅,周大桥,等.锁核酸捕获 TaqMan 探针实时 PCR 和 PCR-RFLP 检测乙型肝炎病毒基因变异的研究[J].中华微生物学和免疫学杂志,2007,27(11):977-982.

[3] 侯远沛,宋丽.乙型肝炎标志物定量检测结果与 HBV DNA 含量相关性分析[J].实用医技杂志,2004,11(10):2112-2113.

[4] Lee JM,Ahn SH. Quantification of HBsAg; basic virology for clinical practice[J].World J Gastroenterol,2011,17(3):283-289.

[5] Deguchi M,Yamashita N,Kagita M,et al. Quantitation of hepatitisB surface antigen by an automated chemiluminescent microparticle immunoassay[J].J Virol Methods,2004,115(2):217-222.

[6] Nguyen T,Desmond P,Locarnini S. The role of quantitative hepatitis B serology in the natural history and management of chronic hepatitis B[J].Hepatol Int,2009,(suppl):5-15.

[7] 高云朝,杨亘东,陆汉.稀释介质对化学发光免疫分析检测血清 HCG 的影响[J].标记免疫分析与临床,2007,14(2):121.

[8] 陈广福,殷侠霞,任晓兵,等.不同稀释液对 HCG 测定的影响[J].航空航天医药,2009,20(1):19-21.

[9] 郑军,赵明.不同稀释液对测定血清淀粉酶和脂肪酶的影响[J].现代检验医学杂志,2002,17(2):10-11.

[10] 丁忠旗,李永培,盛强.不同稀释液对高浓度 HCG 测定值的影响[J].中华核医学杂志,2002,22(1):39.

(收稿日期:2011-05-15)