

• 检验技术与方法 •

时间分辨荧光免疫技术在检测 HBV 血清学标志物中的应用

张立营, 陈 朴, 彭宇生, 王 鹏

(宜宾市第一人民医院检验科, 四川宜宾 644000)

摘要:目的 比较时间分辨荧光免疫分析技术(TRFIA)和 ELISA 法在检测 HBV 血清学标志物的价值。方法 分别采用 TRFIA 和 ELISA 法检测 359 例低浓度乙肝表面抗原(HBsAg)标本的 HBV 血清学标志物,比较两种方法的检测结果的差异。结果 TRFIA 法检测 HBV 血清学标志物的各项结果阳性率均高于 ELISA 法,HBsAg、乙肝 e 抗原(HBeAg)和乙肝核心抗体(HBcAb)阳性率结果差异有统计学意义($P < 0.05$),而乙肝表面抗体(HBsAb)、乙肝 e 抗体(HBeAb)阳性率差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 与 ELISA 法相比,TRFIA 在检测含有低浓度 HBsAg 标本时具有更高的灵敏度,具有良好的临床应用价值。

关键词:时间分辨荧光免疫分析技术; 酶联免疫吸附试验; 乙肝表面抗原; 血清学标志物

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.21.033

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)21-2939-02

Application of time-resolved fluoroimmunoassay for the detection of HBV serological markers

Zhang Liying, Chen Pu, Peng Yusheng, Wang Peng

(Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Yibin, Yibin, Sichuan 644000, China)

Abstract: Objective To compare the value of time-resolved fluorescence immunoassay (TRFIA) and ELISA for the detection of HBV serological markers. **Methods** To detect the HBV serological markers in 359 samples with low concentrations of HBsAg by TRFIA and ELISA respectively, and to compare the results of the two methods. **Results** The levels of HBV serological markers detected by TRFIA were higher than those detected by ELISA. The positive rates of HBsAg, HBeAg and HBcAb detected by TRFIA and ELISA were significantly different ($P < 0.05$), while those of HBsAb and HBeAb were not ($P > 0.05$). **Conclusion** Compared with ELISA, TRFIA has higher sensitivity in the detection of low HBsAg concentration samples, and it is valuable to be applied in clinical.

Key words: time-resolved fluorescence immunoassay; enzyme-linked immunosorbent assay; hepatitis B surface antigen; serological markers

乙肝表面抗原(HBsAg)是临床诊断和治疗乙型肝炎的重要依据。当患者感染 HBV 后,由于病毒在体内感染阶段和机体对病毒免疫反应的不同,患者体内 HBsAg 浓度也有所差异,有一部分患者血清 HBsAg 浓度很低^[1],这容易引起 HBV 的隐性感染,HBV 隐性感染是输血、母婴传播 HBV 的潜在危险,应当引起人们的重视。因此寻求一种有效的检测方法,能准确检测低浓度 HBsAg 对临床诊断和治疗具有重要意义^[2-3]。ELISA 法是传统检测 HBV 血清学标志物的定性方法,但是由于其方法学上的限制,使其灵敏性、特异性受到不同程度的影响,ELISA 不能定量检测 HBV 血清学标志物 这必将给临床诊断和治疗带来困难。随着医学的发展,检验技术的进步,时间分辨荧光免疫分析技术(TRFIA)逐渐应用于临床上定量检测 HBV 血清标志物。本研究旨在通过 TRFIA 法和 ELISA 法分别检测含有低浓度 HBsAg 标本的 HBV 血清学标志物,比较其结果差异,来评价 TRFIA 法检测 HBV 血清标志物的临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2013 年 5 月至 2014 年 3 月通过 TRFIA 法进行 HBV 血清学标志物定量检测的 12 034 例血清中低浓度 HBsAg(0.2~5.0 ng/mL)标本 359 例,其中男 192 例,女 167 例,患者平均 38.5 岁,所有结果均经过复检,多次检测者

只取首次资料,待测标本保存于一 20 ℃ 冰箱。卫生部临检中心 HBsAg 低值质控血清浓度分别为 0.50、1.00、3.00、5.00 ng/mL,故将 5.00 ng/mL 确定为低浓度 HBsAg 的上限;上海新波试剂检测 HBsAg 的阳性结果判断阈值为 0.20 ng/mL,故以 0.20 ng/mL 作为低浓度 HBsAg 的下限。

1.2 仪器与试剂 TRFIA 与 ELISA 试剂分别由上海新波生物科技有限公司和上海科华生物工程公司提供,仪器分别为新波 SYM.B10 型时间分辨测定仪和芬兰产 MK3 型酶标仪。

1.3 方法及判定标准 首先通过 TRFIA 从 12034 例血清中筛选出低浓度 HBsAg 标本 359 例,检测值为(2.18±0.36)ng/mL,然后用 ELISA 法检测上述患者 HBV 血清标志物浓度,严格按照标准操作程序进行。TRFIA 法判定标准:严格按照说明书进行,HBsAg、乙肝表面抗体(HBsAb)、乙肝 e 抗原(HBeAg)、乙肝 e 抗体(HBeAb)和乙肝核心抗体(HBcAb)的参考值分别为 0.0~0.2 ng/mL、0~10 mU/mL、0.0~0.5 PEIU/mL、0.0~0.2 PEIU/mL、0.0~0.9 PEIU/mL。超出以上范围结果为阳性,反之结果为阴性。ELISA 法判断标准:实验操作严格按照说明书进行,同时加入相应的质控物,用酶标仪读取各孔光密度(OD)值,HBsAg、HBsAb 和 HBeAg 样品 OD≥1 为阳性,OD<1 为阴性;HBeAb 与 HBcAb 样品 OD<1 为阳性,OD≥1 为阴性。

1.4 统计学处理 采用统计学软件 SPSS12.0 对实验数据进行分析,计数资料组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TRFIA 法和 ELISA 法检测结果比较 TRFIA 法检测 359 例患者 HBV 血清学标志物的各项结果阳性率均高于 ELISA 法,其检测 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb 和 HBcAb 的灵敏度高于 ELISA 法,HBsAg、HBeAg 和 HBcAb 阳性率差异有统计学意义($P < 0.05$),而 HBsAb、HBeAb 阳性率差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 TRFIA 法与 ELISA 法检测 HBV 血清学标志物阳性结果[n(%)]

方法	HBsAg	HBsAb	HBeAg	HBeAb	HBcAb
ELISA	281(78.27)	55(15.32)	102(28.41)	86(23.96)	118(32.87)
TRFIA	359(100.00)▲	68(18.93)	134(37.32)▲	105(29.45)	153(42.62)▲
χ^2	87.506	1.658	6.463	2.575	7.261
P	0.000	0.198	0.011	0.109	0.007

▲: $P < 0.05$,与 ELISA 比较。

2.2 359 例低浓度 HBsAg 患者的 HBV 血清学标志物少见组合模式 随着检测灵敏度的提高,TRFIA 法能准确检测出 HBV 血清学标志物不同的组合模式,在 359 例乙型肝炎血清检测标本中,共发现乙型肝炎标志物模式 19 种,其中常见模式 9 种,占 88.58% (318/359),少见模式 10 种,占 11.42% (41/359),见表 2。

表 2 TRFIA 法检测出 HBV 血清标志物少见模式结果

编号	HBV 标志物组合模式					n	阳性率 (%)
	HBsAg	HBsAb	HBeAg	HBeAb	HBcAb		
1	+	-	-	-	-	6	1.67
2	+	-	-	+	-	8	2.23
3	+	-	+	-	-	5	1.39
4	+	-	+	+	-	3	0.84
5	+	-	+	+	+	1	0.28
6	+	+	-	-	-	3	0.84
7	+	+	+	-	-	3	0.84
8	+	+	+	-	+	7	1.95
9	+	+	-	-	+	4	1.11
10	+	+	+	+	+	1	0.28

3 讨 论

人体是否被 HBV 感染的最直接证据是人体内是否存在 HBsAg,通过监测 HBsAg 浓度变化还可进一步观测乙型肝炎病情的变化。由于 ELISA 法具有操作简便、价格低廉等优点,一直沿用到现在,但其灵敏度较低、特异性较差、还无法定量分析,只能对检测结果进行定性分析^[4]。ELISA 法对于低浓度的 HBV 感染,检出率更低,容易造成漏诊。

TRFIA 法是一种灵敏度高、特异性强、可定量的荧光免疫分析技术,它采用镧系元素作为标记物,通过排除非特异性荧光信号的干扰,延迟检测寿命较长的特异性激发荧光,提高了

其检测灵敏度和特异性,能准确分析 HBV 血清学标志物的浓度^[5]。

部分乙型肝炎患者血清 HBsAg 浓度低可能有多种原因^[6]:患者处于病毒感染的“窗口期”;非典型病毒感染早期或亚临床型;HBV 不同亚型二次感染;急性 HBV 感染趋向恢复期;急性 HBV 感染潜伏期;以及慢性 HBV 携带者。乙型肝炎患者随着药物的治疗,机体免疫等因素的改变,可能存在血清学模式的转换,不同血清学模式具有不同的临床意义。本研究共发现 HBV 血清学模式 19 种,其中常见模式 9 种,占 88.58% (318/359),少见模式 10 种,占 11.42% (41/359)。通过 TRFIA 法和 ELISA 法检测结果比较发现,TRFIA 法可以检出 ELISA 法无法检出和一些漏检的少见组合模式。患者感染 HBV 后,由于病毒在体内处于不同感染阶段和机体对病毒免疫反应的差异,使得患者血清中可能出现一些 HBV 标志物少见组合模式,这些组合模式不稳定,是暂时处于常见模式转换中的一种现象,但其具有重要的临床意义^[7]。本研究发现 HBsAg 和 HBsAb 同时存在的少见模式占有一部分比例,二者同时存在可能是因为存在 HBV 急性感染后的恢复期和不同亚型 HBV 感染^[8]。

本研究通过 TRFIA 法和 ELISA 法对 359 例低浓度 HBsAg 血清标本进行 HBV 血清学标志物的检测结果发现,TRFIA 法的各项检测结果阳性率均高于 ELISA 法,且 HBsAg、HBeAg 和 HBcAb 阳性率差异有统计学意义($P < 0.05$),而 HBsAb、HBeAb 阳性率差异无统计学意义($P > 0.05$)。在 359 例标本中,ELISA 法无法检出其中 78 例标本的 HBsAg,它们的浓度均在 0.27~0.48 ng/mL,说明 TRFIA 法对于 HBV 血清学标志物 HBsAg 的检测限要低于 ELISA 法,本研究还证实 TRFIA 法能检出一些 ELISA 法无法检出的低浓度 HBV 血清学标志物,它的检测灵敏度高于 ELISA 法,TRFIA 法能为临床乙型肝炎疾病的诊断、治疗和预防提供更准确的信息。

参考文献

- [1] 吴欢雪,张晓涛.测定低水平血清乙肝病毒表面抗原及其临床意义[J].临床合理用药杂志,2009,2(21):10-11.
- [2] 顾晓东,俞碧霞,黄海龙.低浓度 HBsAg 人群乙肝标志物检测及其临床意义[J].中国卫生检验杂志,2007,16(12):1515-1516.
- [3] 王蕾,刘华,王雯静,等.低水平乙型肝炎表面抗原的检测及其临床价值评估[J].微生物与感染,2009,4(1):9-10.
- [4] 祝继华,严立,陈瀑,等.ELISA 法在检测乙肝标志物中的应用和评价[J].重庆医科大学学报,2009,34(10):1397-1399.
- [5] 沈超,张永生,王建俊.时间分辨荧光免疫法测定乙型肝炎病毒标志物[J].河北医药,2012,34(2):281-282.
- [6] 骆抗先.乙型肝炎的基础与临床[M].4 版.北京:人民卫生出版社,2012:228-231.
- [7] 胡晓燕,吴明辉.重视血清乙肝标志物少见模式的临床意义[J].临床和医药实践杂志,2009,8(8):127-128.
- [8] Jacob JR,Ascenzi MA,Roneker CA,et al. Hepatic expression of the woodchuck hepatitis virus X-antigen during acute and chronic infection and detection of a woodchuck hepatitis virus X-antigen antibody response[J].Hepatology,1997,26(6):1607-1615.