

# 时间分辨荧光免疫分析技术检测 乙肝病毒标志物优越性的探讨

巢浩界 张铭

作者单位: 213000 江苏常州, 常州市妇幼保健院

通讯作者: 张铭, Email: zmw0701@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2016.04.006

**【摘要】** 目的 建立时间分辨荧光免疫分析法 (TRFIA) 检测乙肝病毒标志物 5 项指标的方法, 并与酶联免疫吸附试验 (ELISA) 进行比较分析。评价 TRFIA 的性能, 以期提高乙肝病毒标志物定量检测的诊断价值。方法 收集 329 份血清标本, 用 TRFIA 检测乙肝病毒标志物, 并与 ELISA 检测的结果进行比较分析。结果 两种方法检测乙肝病毒标志物的结果一致率较好 [ 乙肝表面抗原 (HBsAg) 为 99.4%, 乙肝表面抗体 (HBsAb) 为 98.8%, 乙肝 E 抗原 (HBeAg) 为 99.1%, 乙肝 E 抗体 (HBeAb) 为 98.2%, 乙肝核心抗体 (HBcAb) 为 97.6% ]; TRFIA 阳性检出率大于 ELISA (HBsAg: 90 比 88, HBsAb: 115 比 111, HBeAg: 45 比 42, HBeAb: 211 比 205, HBcAb: 246 比 238,  $P$  均  $< 0.05$ )。TRFIA 的敏感度和特异度均优于 ELISA (敏感度: 97.80% 比 91.21%, 特异度: 99.58% 比 97.89%,  $P$  均  $< 0.05$ ); TRFIA 的批内和批间变异系数 (CV) 均优于 ELISA (批内 CV: 3.19% 比 5.99%, 批间 CV: 4.68% 比 7.55%,  $P$  均  $< 0.05$ )。结论 TRFIA 作为一项具有巨大发展潜力的新兴生物技术, 对乙肝病毒标志物的检测效能高于 ELISA。

**【关键词】** 时间分辨荧光免疫分析法; 乙肝病毒标志物; 酶联免疫吸附试验

## Study on the superiority of hepatitis B virus markers detected by time resolved fluorescence immunoassay

CHAO Hao-jie, ZHANG Ming. Maternal and Child Care Service Centre in Changzhou, Changzhou 213000, Jiangsu, China

**【Abstract】** **Objective** To establish a method for the determination of 5 markers of hepatitis B virus by time-resolved fluorescence immunoassay (TRFIA) and compare the results with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). To evaluate the performance of TRFIA in order to improve the diagnostic value of quantitative detection of HBV markers. **Methods** 329 serum samples were collected and TRFIA was used to detect HBV markers, and the results were compared with those of ELISA. **Results** The results of the two methods for detection of HBV markers were in good agreement [ Hepatitis B surface antigen (HBsAg) was 99.4%, Hepatitis B surface antibody (HBsAb) was 98.8%, Hepatitis B virus E antigen (HBeAg) was 99.1%, Hepatitis B virus E antibody (HBeAb) was 98.2%, Hepatitis B virus core antibody (HBcAb) was 97.6% ]. The positive detection rate of TRFIA was higher than that of ELISA (HBsAg: 90 vs. 88, HBsAb: 115 vs. 111, HBeAg: 45 vs. 42, HBeAb: 211 vs. 205, HBcAb: 246 vs. 238,  $P$  all  $< 0.05$ ). The sensitivity and specificity of TRFIA were better than ELISA (sensitivity: 97.80% vs. 91.21%, specificity: 99.58% vs. 97.89%,  $P$  all  $< 0.05$ ). TRFIA was better than ELISA in batch and batch coefficient of variation (CV) in batch CV: 3.19% vs. 5.99%, batch CV: 4.68% vs. 7.55%,  $P$  all  $< 0.05$ . **Conclusion** TRFIA as a new biotechnology with great development potential, is more effective than ELISA in detecting HBV markers.

**【Key words】** Time-resolved fluorescence immunoassay. Hepatitis B virus markers. enzyme-linked immunosorbent assay

20 世纪 70 年代芬兰科学家 Soini 和 Hemmia 首先引入了“时间分辨荧光免疫分析”的概念。基于

放射性免疫分析技术具有放射性污染的缺点, 20 世纪 80 年代 Soini 和 Kojola 发明了时间分辨荧光免疫

分析技术<sup>[1-2]</sup>,有别于传统的荧光免疫分析技术,这是一种将荧光物质和时间分辨技术相结合的技术,其基本原理是用铕(Eu<sup>3+</sup>)、铽(Te<sup>3+</sup>)及钐(Sm<sup>3+</sup>)、镝(De<sup>3+</sup>)等示踪物来标记抗原抗体、多肽、激素、核酸探针等微量物质,形成镧系元素标记的抗原抗体结合物,最后待背景上的短寿命荧光完全淬灭后,再测量产物上的长寿命荧光强度和相对荧光强度的比值得出最终的结果<sup>[3]</sup>。时间分辨荧光免疫分析技术分别以不同的波长且分时间段测量标记物上的荧光强度,利用发射光和激发光之间的 Stokes 位移可以有效地消除标本中的非特异荧光物质的干扰,最常用的示踪物为镧系元素,以此来标记抗原、抗体,具有制备简单、储存时间长、线形范围宽、高敏感度、特异度、对多种被检物质同时测定的优点。现对本院采用该方法检测乙肝病毒标志物的优越性进行探讨,报告如下。

**1 材料和方法**

**1.1 仪器** Anytest2000 型时间分辨仪由新波公司生产;运用伯乐洗板机洗板及伯乐酶标仪,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂由珠海丽珠试剂有限公司提供。

**1.2 标本来源** 随即选取 2015 年 1 月至 5 月常州市妇幼保健院妇科和产科住院患者共 329 例,静脉采血,分离血清,-20℃保存。乙肝病毒血清标志物质控品购自卫生部临床检验中心,批号 090040。

**1.3 实验方法** 采用 ELISA 定性检测和时间分辨免疫荧光法(TRFIA)定量检测 329 份血清标本和质控样品的乙肝两对半。

**1.4 结果判断** TRFIA 的阳性判断标准为乙肝表面抗原(HBsAg)≥0.2 μg/L、乙肝表面抗体(HBsAb)≥10 U/L、乙肝 E 抗原(HBeAg)≥0.5 PEIU/mL、乙肝 E 抗体(HBeAb)≥0.2 PEIU/mL、乙肝核心抗体(HBeAb)≥0.9 PEIU/mL。

**1.5 统计学处理** 实验所得的数据全部采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,计量资料的结果以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示;采用  $\chi^2$  检验对计数资料分析; $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 TRFIA 和 ELISA 检测 329 份血清标本的结果** 两种方法测定标本 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBeAb 的结果符合率经配对  $\chi^2$  检验差异均有统计学意义( $P$  均  $< 0.05$ )。见表 1。

**表 1 TRFIA 和 ELISA 检测 329 份血清标本乙肝两对半的比较**

血清标志物	例数(例)	TRFIA		ELISA		二者结果一致率(%)
		阳性(例)	阴性(例)	阳性(例)	阴性(例)	
HBsAg	329	90	239	88	241	99.4
HBsAb	329	115	214	111	218	98.8
HBeAg	329	45	284	42	287	99.1
HBeAb	329	211	118	205	124	98.2
HBeAb	329	246	83	238	91	97.6

TRFIA 对乙肝病毒的检出敏感度和特异度明显优于 ELISA ( $P$  均  $< 0.05$ )。见表 2。

**表 2 TRFIA 和 ELISA 检测乙肝病毒的敏感度和特异度比较**

组别	例数(例)	真阳性(例)	假阳性(例)	真阴性(例)	假阴性(例)	敏感度(%)	特异度(%)
TRFIA	329	89	1	237	2	97.80	99.58
ELISA	329	83	5	233	8	91.21	97.89

**2.2 准确度** 将浓度为 126.8 μg/L 的 HBsAg 血清样本分别加入到 50、200、400 μg/L 标准参考品中进行回收试验。回收率分别为 97.2%、96.5%、98.6%,平均 97.4%。

**2.3 精密度** 随机选取高、中、低值 3 份混合血清样品 HBsAg 浓度分别为 35.5、264.3、659.7 μg/L,按操作步骤操作,20 孔平行测定,TRFIA 批内和批间变异系数(CV)分别平均为 3.19% 和 4.68%,均优于 ELISA ( $P$  均  $< 0.05$ )。见表 3~4。

**表 3 HBsAg 批内精密度测试( $n = 20$ )**

浓度	TRFIA		ELISA	
	浓度(μg/L)	CV(%)	A 值	CV(%)
高	668.9	3.17	2.672	4.37
中	270.3	2.79	1.737	6.18
低	33.6	3.60	0.881	7.44

**表 4 HBsAg 批间精密度测试( $n = 20$ )**

浓度	TRFIA		ELISA	
	浓度(μg/L)	CV(%)	A 值	CV(%)
高	701.3	5.61	2.683	6.17
中	250.8	3.89	1.744	7.33
低	39.4	4.54	0.913	9.16

**2.5 灵敏度** 重复测定阴性标本 20 次,计算检测结果的均值+2 倍标准差,也就是所能检测的最低抗原浓度。ELISA 的最低检出浓度为 5 μg/L,TRFIA 为 0.5 μg/L。

### 3 讨论

试验结果明显可以看出,两种方法检测乙肝病毒两对半的结果一致率较好,但 TRFIA 阳性检出率和敏感度均大于 ELISA,可以减少一些极低浓度 HBsAg、HBeAg 患者的假阴性率。

TRFIA 具有很高的稳定性和灵敏度,近年来在国内外得到广泛的认可,同时国内多家公司在时间分辨技术基础上开发的乙肝两对半试剂,填补了我国检验界在乙肝微量检测方面的空白,是对乙肝标志物微量检测方面革命性的突破。有文献表明,在很多乙肝病毒(HBV)感染的患者中,HBsAg 呈低水平存在<sup>[4]</sup>,在血清中含量很低,不易检出,很容易造成漏检。目前,对 HBsAg 的检测方法仍然普遍采用传统的 ELISA,这在一定程度上造成了相当一部分 HBsAg 低水平的人群被大量漏检。吴宗华等<sup>[5]</sup>针对大样本非肝炎患者的检测结果表明,HBsAg 小于 5 ng/mL 以下者在检测总人群和阳性患者中的比例分别为 2.34% 和 23.16%。通过 TRFIA 定量检测“乙肝两对半”发现,部分 ELISA 单项抗-HBc 阳性标本用 TRFIA 能够检测出 HBsAg。

TRFIA 的优越性体现在以下几个方面。首先,急性乙肝早期,HBsAg 含量极微,采用传统酶法通常检测不出;而 TRFIA 能及早检出 HBsAg,可以印证是否感染于 HBV,减少窗口期时间。其二,在有些慢性乙肝患者中,分泌到血清中的 HBsAg 量极少,产生的 HBsAb 亦量少,采用一般的酶法检测通常也为阴性;而 TRFIA 的高敏感性可以避免这种情况的发生,为临床及时有效的诊断治疗疾病提供了可靠的依据。其三,为其他肝病的鉴别诊断提供依据,如病毒性肝炎、酒精性肝炎等临床症状、体征及肝功能极其相似,唯一的方法是找到病原体,才能有效的诊断疾病。因此,TRFIA 定量检测乙肝两对半正逐步成为现代检测乙型肝炎血清学标志物新的发展方向。

TRFIA 极大地提高检测分析的敏感性,因此在很多急性乙肝感染的早期或慢性乙肝患者中 HBsAg 往往小于 2 μg/L,采用高灵敏度的 TRFIA 可以及时检出 HBsAg,佐证了 HBV 感染,且能够同时检测出乙肝病毒前 S1 抗原(perS1),两者相互印证<sup>[6]</sup>。在病程观察中 TRFIA 能及早检出 HBsAg,印证 HBV 感染,减少窗口期时间;在病毒变异或低水平的二次感染时可以采用 TRFIA 检测出血清中极微量的 HBsAg 和 HBsAb。TRFIA 定量检测乙肝两对半,可

以动态观察病情并为临床及时有效的诊断治疗疾病提供可靠的依据。定量检测 HBsAg 和 HBsAb 的浓度变化,可以诊断急性乙肝是否处于恢复期;定量检测 HBsAg 和 HBeAb 的浓度变化,可以为病情变化和治疗效果提供依据;定量检测 HBcAb 浓度的变化可以反映病毒感染的状态及是否感染后处于恢复期。

判断机体是否具有中和 HBV 感染的免疫力要看 HBsAb 的含量,ELISA 可以检测出来含量在 10 U/L 以上的样本,呈现阳性结果,且 ELISA 只能作出阴阳性的定性判断;而 TRFIA 能够精确检测出 HBsAb 的含量<sup>[7]</sup>。定量检测 HBV 表面抗原 HbsAg 浓度的最佳诊断临界点是  $5.03 \times 10^6$  U/L,超过临界点的患者需要监测并治疗<sup>[8]</sup>。机体对 HBV 入侵的抵抗能力和保护时间与 HBsAb 含量呈正相关。对于 HBsAb 含量较低的人群,应该加强注射一次乙肝疫苗,使 HBsAb 的浓度提高起到预防作用。

TRFIA 动态、定量检测乙肝两对半的抗原抗体阳性模式能帮助临床分析机体免疫反应的机制,判断临床转归,及时预测耐药病毒株的出现和监测停药反弹,对指导临床治疗能起到积极的指导作用。因此,TRFIA 作为一项具有巨大发展潜力的新兴的生物技术,将会对临床和科研产生更大的促进作用。

### 4 参考文献

- 1 Hemmilä I, Dakubu S, Mikkala VM, et al. Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assays. *Anal Biochem*, 1984, 137: 335-343.
- 2 Kristjánsson S, Strannegård IL, Wennergren G. Inflammatory markers in childhood asthma. *Ann Med*, 1996, 28: 395-399.
- 3 Kim HY, DeKruyff RH, Umetsu DT. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*, 2010, 11: 577-584.
- 4 潘继文. 时间分辨荧光免疫分析技术检测乙型肝炎病毒血清学标志物评价. *检验医学与临床*, 2011, 8: 3030-3031.
- 5 吴宗华. TRFIA 与 ELISA 法检测乙肝病毒血清学标志物的分析与比较. *临床医学工程*, 2012, 19: 1967-1968.
- 6 刘荣静, 刁浩, 林列坤. 乙型肝炎病毒表面抗原弱反应性标本的检测及临床意义. *检验医学与临床*, 2010, 7: 404-405.
- 7 蔡军, 刘晓丽. 时间分辨荧光免疫分析法测定乙肝 HBsAg 的临床意义. *山西医科大学学报*, 2011, 42: 406-408.
- 8 覃彦平, 柯柳华, 蒋义生, 等. 回顾性分析慢性乙型肝炎患者血清 HBsAg 与 HBV DNA 水平的关联性. *实用检验医师杂志*, 2014, 6: 164-167.

(收稿日期: 2016-10-20)

(本文编辑: 李银平)