

DOI:10.3969/j.issn.1671-9638.2017.03.018

· 论 著 ·

化学发光免疫分析法和时间分辨免疫荧光法定量检测不同浓度 HBsAg 的对比分析

符小玉¹, 鄢飞源², 陈 钢², 谢艳玲², 邓国华², 甘绍军², 谭德明¹

(1 中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008; 2 萍乡市赣西医院, 江西 萍乡 337000)

[摘要] **目的** 以雅培全自动化学发光免疫分析法(CMIA法)为标准,探讨时间分辨免疫荧光法(TRIFA)检测血清乙型肝炎表面抗原(HBsAg)的准确性和可行性,以便基层医院普遍开展此项目,为抗病毒个体化的策略及疗效的预测提供依据。**方法** 分别用CMIA法和TRIFA法对157份乙型肝炎病毒(HBV)感染患者的血清进行检测,对于HBsAg滴度超过检测上限的样本,采用稀释液手动稀释后,再进行定量分析。将HBsAg水平分为4组:≤100 IU/mL、101~1 000 IU/mL、1 001~20 000 IU/mL、>20 000 IU/mL,分析两种方法阳性标本定量相关性。**结果** 两种方法的直线回归方程为:Y=2.323X-896.3,相关系数r=0.943,P<0.001。以CMIA法检测值为参考,分为4组进行分析,结果显示在检测低浓度HBsAg样本时,TRIFA数值较CMIA法偏低,而高浓度样本以CMIA法检测值偏高。两种试剂在检测不同浓度的HBsAg均有较好的一致性(均P<0.05),其中以浓度在1 001~20 000 IU/mL时相关性最好。**结论** 两种试剂在HBsAg定量检测上的准确性基本相当,定量相关性以检测值在1 001~20 000 IU/mL之间最佳。TRIFA成本低廉、易操作,更适于基层医院使用,具有广泛的应用前景。

[关键词] 乙型肝炎表面抗原; HBsAg; 肝炎病毒,乙型; 雅培全自动化学发光免疫分析法; 时间分辨免疫荧光法; 相关性

[中图分类号] R446.61 R512.6⁺2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2017)03-0258-05

Quantitative detection on different HBsAg levels by chemiluminescence immunoassay and time-resolved immunofluorescence assay

FU Xiao-yu¹, WU Fei-yuan², CHEN Gang², XIE Yan-ling², DENG Guo-hua², GAN Shao-jun², TAN De-ming¹ (1 Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 2 Pingxiang Ganxi Hospital, Ganxi 337000, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the accuracy and feasibility of time-resolved immunofluorometric assay (TRIFA) for detection of HBsAg based on Abbott automated chemiluminescence immunoassay (CMIA), so as to carry out this project in primary hospitals, and provide reference for individual antiviral strategy and prediction of therapeutic effect. **Methods** Serum of 157 patients infected with hepatitis B virus were detected with CMIA and TRIFA, specimens with HBsAg titers exceeding the detection limit were firstly diluted, then performed quantitative analysis. HBsAg levels were divided into 4 groups: ≤100 IU/mL, 101-1 000 IU/mL, 1 001-20 000 IU/mL, and >20 000 IU/mL, quantitative correlation between two methods was analyzed. **Results** The linear regression equation of two methods was Y=2.323X-896.3, correlation coefficient r=0.943, P<0.001. CMIA was as a reference, 4 groups were divided for analysis, results showed that when detected specimens was at low concentration of HBsAg, TRIFA value was low compared with CMIA method, while detected specimens was at high concentration of HBsAg, CMIA value was high, two reagents had good consistency in the detection of different concentrations of HBsAg (both P<0.05), when concentration was at 1 001-20 000 IU/mL, consistency was the best. **Conclusion** The

[收稿日期] 2016-08-15

[作者简介] 符小玉(1982-),女(汉族),海南省文昌市人,助理研究员,主要从事病毒性肝炎研究。

[通信作者] 谭德明 E-mail:dmt3008@163.com

accuracy of two reagents in the quantitative detection of HBsAg is similar, and the best correlation of detection value is 1 000 - 20 000 IU/mL. TRIFA assay has wide application for its low-cost and easy to be operated, which is especially suitable for primary hospitals.

[Key words] hepatitis B; HBsAg; hepatitis B virus; Abbott automatic chemiluminescence immunoassay; time-resolved immunofluorescence assay; correlation

[Chin J Infect Control, 2017, 16(3): 258 - 262]

血清乙型肝炎表面抗原(HBsAg)是乙型肝炎病毒(HBV)感染的主要标志物,广泛应用于乙型肝炎的初筛和诊断。定量分析 HBsAg 的浓度变化,可预见急性乙型肝炎是否处于恢复期,也可作为慢性乙型肝炎抗病毒疗效的观察和治疗终点的预测^[1-2],对乙型肝炎的病情变化、动态观测和指导治疗具有积极意义。目前国内外报道常用的检测血清 HBsAg 的方法有:化学发光微粒子免疫分析法(CMIA 法)、时间分辨免疫荧光法(TRIFA)、酶联免疫吸附法(ELISA)、微粒子酶免检测法(MEIA)和电化学发光免疫分析法(ECLIA)等^[3-6]。其中,CMIA 法是将化学发光或生物发光体系与免疫反应相结合,直接测定发光底物自身的发光强度,具有高灵敏度和宽线性范围的特点,用于 HBsAg 的定量检测,对低表达的 HBsAg 也能较好的检测,但其价格昂贵。TRIFA 法是以镧系元素“铕”作为标志物的免疫技术,通过时间延迟,去除非特异性荧光干扰,在固定时间检测特异性荧光,具有灵敏度高、标准曲线稳定性好等优点,可对 HBsAg 进行定量检测。然而,由于铕标记物易受空气中粉尘的污染,导致检测结果出现假阳性,而且操作尚未完全自动化。ELISA 法是将已知的抗原或抗体吸附在固相载体表面,使用酶进行检测,操作简单、方便、快速,但只能对 HBsAg 进行定性分析,且其灵敏度、重复性欠佳,易造成漏检和假阳性的结果。MEIA 是以玻璃纤维为载体,微粒子作为抗体或抗原的附着表面,极大增加了反应面积,该方法的检测灵敏度高,可对 HBsAg 进行定量检测。ECLIA 是一种在电极表面由电化学引发的特异性化学发光反应,使用电化学发光剂三联吡啶钌标记,根据电极上发出的光线强度对 HBsAg 定量检测,检测速度快,灵敏度高。本研究以雅培 CMIA 法为标准,探讨 TRIFA 法定量检测 HBsAg 的可行性。现将检测结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 来自于 2014 年 10—12 月中南大

学湘雅医院感染病科门诊就诊的 157 例 HBV 感染者,其中慢性乙型肝炎患者 132 例,慢性 HBV 携带者 25 例,其中男性 102 例,女性 55 例,年龄 16~65 岁。所有患者清晨空腹采集静脉血标本。

1.2 仪器与试剂 CMIA 法使用试剂由美国雅培公司提供,试剂名称及批号:Architect HBsAg Reagent Kit,31587LIF00,仪器为美国雅培全自动化学发光免疫分析仪 ARCHITECT i2000。TRIFA 法使用试剂由苏州新波生物技术公司提供,试剂名称及批号:乙型肝炎病毒表面抗原定量检测试剂盒(时间分辨荧光分析法),802086;仪器为苏州新波生物技术公司的 ANYTEST 时间分辨荧光分析仪,Anytest-2000。

1.3 方法 每例患者提取血清 2 mL,均分为 2 份,每份 1 mL,分别采用 TRIFA 法和 CMIA 法对标本进行检测。TRIFA 法步骤:手工吸取标本至样本杯,仪器自动从样本杯加样至反应板、配试剂、孵育、洗板,再上机比色测定荧光值。CMIA 法:只需设定标本位置、检测项目,在相应的位置上放好标本、试剂、对照品,即可开始全自动加样反应系统。其中 TRIFA 的检测上限为 225 ng/mL,CMIA 法的检测上限为 250 IU/mL。对于 HBsAg 滴度超过检测上限的样本,采用稀释液手动稀释后,再进行定量分析。以 CMIA 法检测值为参考分为 4 组:(1) ≤ 100 IU/mL,(2) $101 \sim 1\,000$ IU/mL (3) $1\,001 \sim 20\,000$ IU/mL,(4) $> 20\,000$ IU/mL,比较两种检测方法检测不同浓度的 HBsAg 的相关性。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 18.0 统计软件对两种方法的检测结果进行相关性检验,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CMIA 法与 TRIFA 法检测结果的相关性 以雅培公司的 CMIA 法检测结果(IU/mL)为横坐标,苏州新波公司的 TRIFA 检测结果(ng/mL)为纵坐标,进行相关性分析,结果见图 1。两种方法测

定患者 HBsAg 浓度结果的线性回归方程为: $Y = 2.323X - 896.3$, 相关系数 $r = 0.943, P < 0.001$ 。

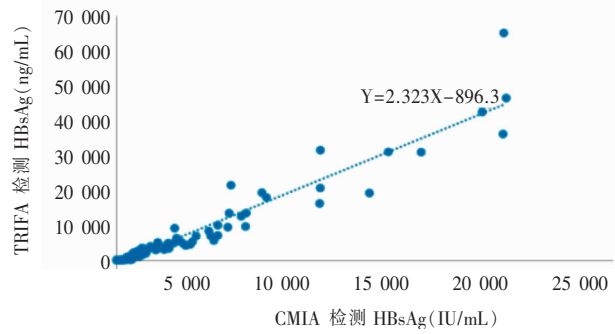


图 1 CMIA 法与 TRIFA 法的相关性
Figure 1 Correlation between CMIA method and TRIFA method

2.2 CMIA 法与 TRIFA 法检测结果的一致性

对于 HBsAg 滴度超过检测上限的样本, 采用稀释

液手动稀释后, 再进行定量分析。以 CMIA 法检测结果作为参考, 将 157 例样本分为 4 组, 其中 23 例 ≤ 100 IU/mL 组, 31 例在 101~1 000 IU/mL 组之间, 59 例在 1 001~20 000 IU/mL 组范围, 44 例 $> 20 000$ IU/mL 组。散点图分析两种检测方法的一致性, 结果显示, 在 CMIA 法检测值 ≤ 100 IU/mL 组的标本中, TRIFA 检测值也 ≤ 100 ng/mL 组, 且均在 60 ng/mL 以下。而 CMIA 法检测值在 101~1 000 IU/mL 组和 1 001~20 000 IU/mL 组的样本中, TRIFA 检测各有 9 个样本 $> 1 000$ ng/mL 和 $> 20 000$ ng/mL (差异率分别为 29%、15.8%); 在 CMIA 法 $> 20 000$ IU/mL 组的样本中, TRIFA 有 11 个样本 $< 20 000$ ng/mL 组 (差异率 25%)。说明在检测低浓度 HBsAg 的样本时, TRIFA 数值较 CMIA 法偏低, 而高浓度样本以 CMIA 法检测值偏高。见图 2。

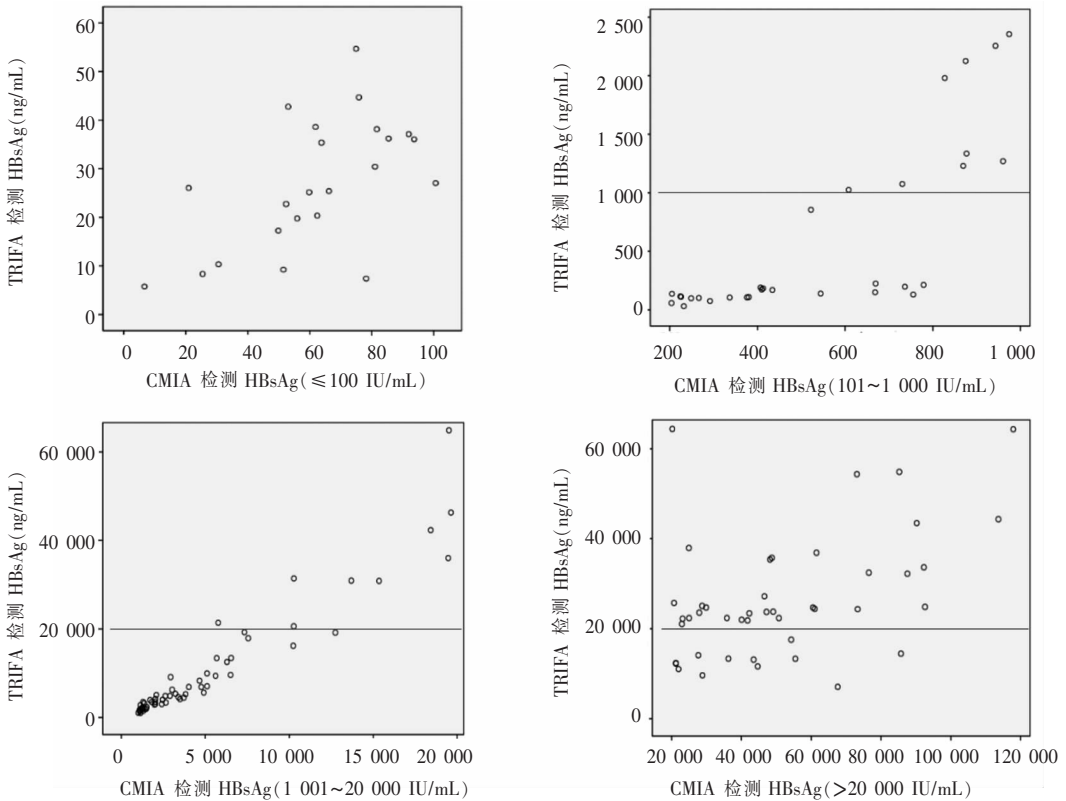


图 2 散点图分析两种检测方法在 4 个定量区段的检测分布
Figure 2 Scatter plot for analyzing the distribution of two detection methods at 4 quantitative sections

2.3 以 CMIA 法检测值为参考分为 4 组进行相关性分析 比较以 CMIA 法检测结果作为参考的 4 组样本与所对应的 TRIFA 检测结果的相关性。结果显示, 两种试剂在检测不同浓度的 HBsAg 均有较

好的一致性 (均 $P < 0.05$), 其中以浓度在 1 001~20 000 IU/mL 组时相关性最好。见表 1。
2.4 两种检测方法的时间与成本 检测一个样本 HBsAg 的时间, TRIFA 法为 42~50 min, CMIA 法为

30~35 min, 从操作时间和步骤来说, CMIA 法更简单、快速, 然而其成本较 TRIFA 高出约 40% 的费用。

表 1 两种监测方法不同检测浓度 HBsAg 的相关性($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Correlation of two detection methods for detecting different concentrations of HBsAg($\bar{x} \pm s$)

分组	CMIA 法(IU/mL)	TRIFA 法(ng/mL)	<i>r</i>	<i>P</i>
≤100	61.91 ± 24.18	26.91 ± 13.37	0.57	0.005
101~1 000	548.16 ± 261.60	691.26 ± 342.78	0.774	<0.001
1 001~20 000	8 076.24 ± 2 084.39	10 479.27 ± 986.83	0.95	<0.001
>20 000	61 525.67 ± 2 649.21	19 518.51 ± 3 920.00	0.521	0.009

3 讨论

准确地了解乙型肝炎患者血清 HBsAg 的表达, 可以更清楚地掌握 HBV 感染的发生、发展和转归。HBsAg 的定量检测可以预测慢性乙型肝炎抗病毒的疗效、血清学转换等^[2, 7-8]。在过去的慢性乙型肝炎治疗指南中, 一直以 HBV DNA 和 HBeAg 定量来评价抗病毒治疗效果, 然而随着对 HBsAg 研究的不断深入, 血清 HBsAg 水平定量在预测抗病毒疗效中的作用得到越来越多的重视。国内外许多研究^[9-10]报道, 血清 HBsAg 定量与肝内 cccDNA 存在显著正相关, HBsAg 水平的下降幅度可作为预测干扰素应答的较好指标, 为个体化治疗提供依据^[11]。尤其是对于 HBeAg 阴性的慢性乙型肝炎患者, 由于此类患者缺乏 HBeAg 定量这个观测指标, 临床上难以确定此类患者的治疗终点, 然而血清 HBsAg 水平能有效预测抗病毒疗效及预后, 因此监测血清 HBsAg 水平对于 HBeAg 阴性的慢性乙型肝炎患者在调整个体化治疗和预测远期疗效方面更有价值^[12]。

研究^[13]指出, 在 PEG-IFN 治疗中, 如果患者在 12 周时 HBsAg < 1 500 IU/mL, 则治疗结束半年后随访发现, 有 57% 的患者出现 HBeAg 血清学转换。而如果 12 周时 HBsAg > 20 000 IU/mL, 持久病毒学应答发生率仅为 16%。因此, 本研究根据 2013 年《应答指导治疗(RGT)策略》^[14]将 HBsAg 水平分为 4 组: ≤100 IU/mL、101~1 000 IU/mL、1 001~20 000 IU/mL、>20 000 IU/mL, 以雅培试剂为标准, 观察两种检测方法在检测不同水平的 HBsAg 的相关性。

雅培 CMIA 法是以吡啶酯作为标记发光剂, 具有灵敏度高、重复性好、特异性强、无放射性危害等优点, 能对 HBsAg 准确、快速的定量, 目前被国内

外广泛应用^[3], 是国际公认的检测乙型肝炎标志物的金标准, 其灵敏度和稳定性均能达到临床和科研要求^[15]。但其仪器昂贵, 试剂成本高, 难以在基层医院普遍开展。而 TRIFA 成本低廉, 它是以镧系元素铕等作为荧光标记物, 采用双抗体夹心时间分辨免疫荧光法进行检测, 具有测量灵敏度高、示踪物稳定、无放射污染和应用范围广等优点^[4]。本研究采用可对 HBsAg 进行定量检测的 CMIA 法和 TRIFA 两种方法, 分析两种方法阳性定量结果的一致性。结果显示, 两种方法的直线回归方程为 $Y = 2.323X - 896.3$, 相关系数 $r = 0.943$, 呈高度相关; 同时, 散点图显示在检测低浓度 HBsAg 的样本时, TRIFA 数值较 CMIA 法偏低, 而高浓度样本以 CMIA 法检测值偏高。两种试剂在检测浓度为 1 001~20 000 IU/mL 组时相关性最好, 而检测较低及高浓度的 HBsAg 时, 相关性分析虽有统计学意义, 但 r 值略低, 分析产生这种差异的主要原因可能与标本的处理方式、操作步骤不一样有关, 同时两种试剂对血清的稀释比例不一致也是影响高浓度 HBsAg 检测结果不一致的重要原因。

总体来说, 两种方法检测的阳性标本在定量关系上呈高度相关。TRIFA 法在临床检测上具有一定的应用价值, 且其成本低廉、易操作, 尤其对于基层医院。根据 RGT 策略^[14], 对于 24 周 HBsAg > 20 000 IU/mL 的患者, 应调整治疗方案。而本研究中 TRIFA 检测高浓度 HBsAg 的数值与 CMIA 法有一定的差异, 在临床应用时, 如 TRIFA 法检测数值较高的患者, 可采用 CMIA 法进行复测, 看其定量是否大于 20 000 IU/mL, 以更好指导临床治疗。应用 TRIFA 检测 HBsAg 定量是否和雅培 CMIA 法一样, 也具有预测抗病毒治疗效果, 实施慢性乙型肝炎患者的个体化抗病毒治疗策略, 和预测评估慢性乙型肝炎患者的远期预后, 仍有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection[J]. J Hepatol, 2012, 57(1): 167-185.
- [2] Liaw YF, Kao JH, Piratvisuth T, et al. Asian-pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B; a 2012 update[J]. Hepatol Int, 2012, 6(3): 531-561.
- [3] Sonneveld MJ, Rijckborst V, Boucher CA, et al. A comparison of two assays for quantification of hepatitis B surface antigen in patients with chronic hepatitis B[J]. J Clin Virol,

2011, 51(3): 175 - 178.

- [4] 莫凤明, 伍德荣, 张群先. 时间分辨免疫荧光法测定乙肝病毒血清标志物的结果分析[J]. 现代预防医学, 2012, 39(1): 130 - 132.
- [5] 王蓓, 童华诚, 张松, 等. 电化学发光免疫法定量测定乙肝表面抗原的性能评价[J]. 现代医学, 2013, 41(12): 899 - 902.
- [6] Tuailleon E, Mondain AM, Nagot N, et al. Comparison of serum HBsAg quantitation by four immunoassays, and relationships of HBsAg level with HBV replication and HBV genotypes[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e32143.
- [7] Ma Q, Qin B, Gong X, et al. Prediction of response to interferon α -1b in HBeAg-positive chronic hepatitis B: a clue from HBsAg levels[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2013, 25(7): 820 - 824.
- [8] Gheorghita VI, Caruntu FA, Curescu M, et al. Use of quantitative serum HBsAg for optimization of therapy in chronic hepatitis B patients treated with pegylated interferon alfa-2a: a romanian cohort study[J]. J Gastrointest in Liver Dis, 2013, 22(1): 27 - 32.
- [9] 李韦杰, 李伯安, 赵景民, 等. 54 例慢性乙型肝炎患者肝组织乙型肝炎病毒共价闭合环状 DNA 与血清 HBsAg 定量检测结果分析[J]. 中华肝脏病杂志, 2011, 19(11): 815 - 817.
- [10] Wong DK, Seto WK, Fung J, et al. Reduction of hepatitis B surface antigen and covalently closed circular DNA by nucleos(t)ide analogues of different potency[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2013, 11(8): 1004 - 1010.
- [11] Malmstrom S, Larsson SB, Hannoun C. Hepatitis B viral DNA decline at loss of HBeAg is mainly explained by reduced cccDNA load-down-regulated transcription of PgRNA has limited impact[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e36349.
- [12] Lee JM, Ahn SH. Quantification of HBsAg: Basic virology for clinical practice[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(3): 283 - 289.
- [13] Piratvisuth T, Marcellin P. Further analysis is required to identify an early stopping rule for peginterferon therapy that is valid for all hepatitis B e antigen-positive patients[J]. Hepatology, 2011, 53(3): 1054 - 1055.
- [14] 窦晓光, 侯金林. 应答指导治疗策略在聚乙二醇干扰素治疗乙型肝炎病毒 e 抗原阳性慢性乙型肝炎患者中的应用[J]. 中华传染病杂志, 2013, 31(10): 623 - 625.
- [15] Wursthorn K, Jaroszewicz J, Zacher BJ, et al. Correlation between the Elecsys HBsAg II assay and the Architect assay for the quantification of hepatitis B surface antigen(HBsAg) in the serum[J]. J Clin Virol, 2011, 50(4): 292 - 296.

(本文编辑:熊辛睿)