

· 论 著 ·

i2000 化学发光仪检测 HBsAg 适用稀释液及最适稀释倍数的选择

夏吉荣, 邹 麟, 周春燕, 向 渝, 张莉萍[△]

(重庆医科大学附属第一医院检验科 400016)

摘要:目的 探讨 i2000 化学发光仪检测 HBsAg 的适用稀释液及最适稀释倍数, 为乙型肝炎感染患者的临床诊断和治疗提供准确的检测结果。方法 (1) 稀释倍数的选择: 按厂家建议的方法将稀释后的 1 192 例检测结果进行不同稀释倍数的频数统计分析, 以确定最适稀释倍数。(2) 适用稀释液选择: 使用仪器厂家的稀释液、全阴性混合血清、生理盐水、10% 小牛血清分别对 HBsAg > 250 IU/mL 的 30 例不同水平的患者血清进行 50、100、500 倍稀释后进行检测; 将全阴性混合血清、生理盐水、10% 小牛血清稀释液的检测结果与厂家提供的稀释液的检测结果作相关性统计分析, 选出合适的稀释液及稀释倍数。结果 (1) 已稀释检测的 1 192 例标本中, 95% 的检测结果在 50 倍稀释范围内; 98% 的检测结果在 100 倍稀释范围内; 99% 的检测结果在 500 倍稀释范围内。(2) 全阴性混合血清、生理盐水、10% 小牛血清稀释的检测结果与厂家稀释液检测结果比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。结论 当 HBsAg > 250 IU/mL 时应首选 100 倍稀释后检测; 如 100 倍稀释后 HBsAg 检测结果仍大于 250 IU/mL 时再作 500 倍稀释后检测; 稀释液除了用厂家稀释液外, 全阴性混合血清、生理盐水、10% 小牛血清都可作为适用稀释液。

关键词: 雅培 i2000 发光仪; HBsAg; 稀释液; 稀释倍数

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2010.23.016

中图分类号: R446.61; R512.62

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)24-3340-02

The choice of HBsAg applicable diluent and optimization dilution multiple with i2000 Chemoluminescence Analyzer

XIA Ji-rong, ZOU Lin, ZHOU Chun-yan, et al.

(Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To discuss the HBsAg applicable diluent and optimization dilution multiple with i2000 Chemoluminescence Analyzer and provide evidence for diagnosis and therapy of HBV infection. **Methods** (1) The choice of dilution multiple: The optimization dilution multiple was determined by analyzing statistically frequency of different dilution multiple from 1 192 results which were detected with dilution method suggested by manufacturer in our Clinical Laboratory. (2) The choice of applicable diluent: 30 distinct patient serum (HBsAg > 250 IU/mL) were detected after 50, 100, 500 fold dilution with manufacturer diluent, mixture negative serum, normal sodium and 10% calf serum. The suitable diluent and dilution multiple were determined by analyzing statistically test results of manufacturer diluent, mixture negative serum, normal sodium and 10% calf serum. **Results** (1) In 1 192 diluted samples, 95% of the test results were within 50 fold dilution range; 98% of the test results were in 100 fold dilution range; 99% of the test results were in the range of 500 fold dilution range. (2) There were no significantly different between the detection results of manufacturer diluent and those of mixture negative serum, normal sodium and 10% calf serum. ($P > 0.05$) **Conclusion** When HBsAg > 250 IU/mL, 100 fold dilution is selected firstly. As HBsAg > 250 IU/mL after 100 fold dilution, 500 fold dilution is selected and detected. The manufacturer diluent, mixture negative serum, normal sodium and 10% calf serum are as applicable diluent.

Key words: ABBOTT i2000 Chemoluminescence Analyzer; HBsAg; diluent; dilution multiple

雅培 i2000 免疫分析仪采用化学发光微粒子免疫分析法定量检测 HBsAg, 具有高灵敏度、高特异性、定量跟踪分析及检测快速等优点, 被誉为“HBsAg 定量检测的金标准”, 能为临床提供实时、动态的检测结果, 有效地指导临床诊断及治疗^[1]。但其不足之处是 HBsAg 检测线性范围相对较窄 (≤ 250 IU/mL), 而临床上乙型肝炎感染患者的 HBsAg 通常又远远大于 250 IU/mL, 为满足临床对乙型肝炎感染患者的动态监测和疗效评估需要, 对 HBsAg > 250 IU/mL 的标本需作进一步稀释后才能检测出最终结果, 因此要保证检测结果的准确性, 关键是选择合适的稀释液和稀释倍数, 而目前厂家提供的稀释液有限, 寻找替代的稀释液已成为现实需求; 同时厂家建议的稀释倍数是否适合各实验室的具体情况也应进行验证。本文经选用乙型肝炎血清标志物全阴性混合血清、生理盐水、10% 小牛血清作为替代稀释液进行筛选试验, 最后选出了较满意的替代稀释液和最佳稀释倍数, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 血清标本 (1) HBsAg > 250 IU/mL 的阳性血清。实验标本均来自本院 HBsAg 检测的新鲜血清, 如标本不能当天检测时置 -20 °C 保存备用。(2) 全阴性混合血清。收集本实验室已检测过的乙型肝炎血清标志物全阴性血清 50 mL 混匀置 -20 °C 保存备用。

1.2 仪器与试剂 美国雅培 i2000 化学发光分析仪及其 HBsAg 配套检测试剂。

1.3 方法

1.3.1 最佳稀释倍数选择 对 2009 年 5 月至 2010 年 4 月本实验室 HBsAg 检测大于 250 IU/mL 的 1 192 例检测结果进行统计分析, 50 倍稀释时 95% 的置信区间为 (9 478.8, 12 108.5) IU/mL, 即 95% 的标本经 50 倍稀释可得到最终检测结果; 100 倍稀释时 98% 的置信区间为 (9 232.4, 12 354.8) IU/mL, 即 98% 的标本稀释 100 倍即可满足要求; 500 倍稀释时 99% 的置

[△] 通讯作者, E-mail: liuzhangcq@yahoo.com。

信区间为(9 064.6,125 222.6)IU/mL,即经 500 倍稀释后只有 1% 的阳性标本还需作进一步稀释才能得到最终结果。

1.3.2 最大稀释倍数线性试验 对接近最高检测限的 HBsAg 血清标本进行 3 次平行重复测定,取均值作为实验的理论值,同时用厂家提供的稀释液对上述标本进行 1:10、1:50、1:100、1:500、1:990 稀释后重复测定 2 次,取均值作为实验的实测值;以理论值为 X 值,实测值为 Y 值进行相关性线性分析。当 $a=1.00 \pm 0.05, R^2 \geq 0.975$ 时判断线性可接受。

1.3.3 适用稀释液选择 使用厂家稀释液、全阴性混合血清、生理盐水、10% 小牛血清对 30 例 HBsAg > 250 IU/mL 的不同浓度标本分别按 1:50、1:100、1:500 进行稀释,以厂家稀释液的测定均值为实验理论值,其他稀释液的测定均值为实测值,将两组资料进行统计分析。

1.4 统计学处理 用 SPSS13.0 软件进行统计分析,资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 最佳稀释倍数 对 2009 年 5 月至 2010 年 4 月本实验室 HBsAg > 250 IU/mL 的 1 192 例检测结果进行统计分析,其最适稀释倍数依次为 100 和 500 倍。

2.2 最大稀释倍数线性试验 以接近最高检测限的 HBsAg 均值为理论值 X,实测值为 Y 作相关性线性分析。结果为: $Y = 0.9988X - 0.3542, R^2 = 0.9989$,见图 1。

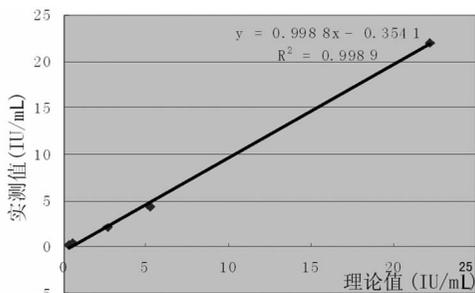


图 1 最大稀释倍数线性相关性分析

2.3 适用稀释液 用本次试验所选的全阴性混合血清、生理盐水和 10% 小牛血清作为备用稀释液,分别按 1:50、1:100 和 1:500 对 30 例实验标本进行稀释后检测,其检测结果与厂家稀释液相同稀释倍数的结果比较差异均无统计学意义,见表 1。

表 1 3 种稀释液对 30 例标本作不同稀释倍数的检测结果与厂家稀释液结果比较

稀释液	1:50		1:100		1:500	
	t	P	t	P	t	P
全阴性混合血清	0.154	0.878	0.298	0.767	0.212	0.833
生理盐水	0.048	0.962	0.029	0.977	0.059	0.953
10% 小牛血清	0.237	0.814	0.208	0.837	1.639	0.109

3 讨 论

机体感染 HBV 后,HBsAg 是其最主要的血清标志物,其在感染患者体内的含量可用来观察病毒的复制状态、病变发展及抗病毒治疗效果。近年随着化学发光技术的发展^[2-4],使快速定量检测 HBsAg 含量成为发展方向,其中 i2000 化学发光仪不仅可动态检测患者血清中 HBsAg 含量,而且能对 HBsAg 的变异进行检测^[5];但 i2000 化学发光仪检测 HBsAg 的线性

相对较窄(0~250 IU/mL),临床上许多患者血清 HBsAg 常超出其线性范围需进行稀释,当样本稀释后由于基质效应和稀释因子的引入可能会导致较大的结果误差^[6]。因此稀释液及稀释倍数的选择极为重要。

3.1 最适稀释倍数的选择 通过统计分析近 1 年本实验室 HBsAg > 250 IU/mL 的 1 192 例检测结果表明:临床患者标本中 HBsAg 高值远远超过 i2000 的检测范围,其 95% 的标本需稀释 50 倍才能检测出最终结果;98% 的标本只要稀释 100 倍就能检测出最终结果;还有约 2% 的标本需作 500 倍以上稀释才能检测出最终结果。但通常稀释倍数越大其最终检测结果受稀释因子影响也越大,在能报告最终检测结果的前提下,应尽量降低稀释倍数,减少稀释因子的影响,同时也应尽量减少第 2 次稀释增加检测成本和延误检测时间;因此,当患者标本 HBsAg > 250 IU/mL 时可首选稀释 100 倍,如稀释后 HBsAg 检测结果仍大于 250 IU/mL 时再进行 500 倍稀释后检测即可。如果 500 倍稀释后还不能得到最终检测结果时,是否还要进一步稀释应与临床医师沟通后决定。

3.2 最适稀释液的选择 在最适稀释液的选取实验过程中,使用厂家提供的稀释液作为参比稀释液,对其最大稀释倍数进行线性验证试验,结果满足分析测量范围(AMR)评价,即线性评价($a=1.00 \pm 0.05, R^2 \geq 0.975$)要求^[7],表明厂家稀释液稀释后的实测值与理论值相关性良好,能满足临床需要(图 1)。

对其他 3 种稀释液分别按 1:50、1:100、1:500 稀释后的检测结果与厂家稀释液检测结果统计分析表明:全阴性混合血清、生理盐水、10% 小牛血清稀释的检测结果与厂家稀释液检测结果差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。因此当厂家稀释液缺乏时全阴性混合血清、生理盐水、10% 小牛血清都可作为 HBsAg 的代替稀释液。

由于本研究旨在解决 HBsAg 稀释液的替代方案,整个实验结果是以厂家稀释液作为对比,因此,只有当厂家稀释液不足时才启用全阴性混合血清或生理盐水或 10% 小牛血清作为替代稀释液;当 HBsAg 检测需稀释时,首选稀释倍数为 100,如稀释后结果仍大于 250 IU/mL 时再进行 500 倍稀释。

参考文献:

[1] 王跃国,王惠民,毛丽萍. MEIA 法测定乙型肝炎病毒表面抗原的评价及临床应用[J]. 现代检验医学杂志,2004,19(2):21.
 [2] 任丽民,邓芬,余明杰,等. 化学发光法对 ELISA 检测 HBsAg“灰区”标本再分析探讨[J]. 检验医学与临床,2010,7(5):434.
 [3] 刘海波,常虹,鲜尽红,等. 磁微粒化学发光检测 HBsAg 试剂盒研制及临床应用[J]. 重庆医学,2008,37(9):981.
 [4] 李欣,王维,李多孚. 时间分辨荧光免疫分析法测定 HBsAg 的方法学评价[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(4):408.
 [5] 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2006:345.
 [6] 姚少羽,孙艳虹,高玲,等. Vitros950 生化检测系统最大稀释度测定[J]. 中国实用医药,2008,3(34):31.
 [7] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础[M]. 上海:上海科学技术文献出版社,2007:138.