

化学发光法测定 anti-HBs 的检出限和临床可报告范围的建立及临床应用*

李前进¹, 戴玉柱²

(1. 浙江绿城心血管病医院检验科, 杭州 310012;

2. 解放军第117医院检验科, 杭州 310013)

摘要:目的 建立化学发光法测定 anti-HBs 的检出限和临床可报告范围, 并进行临床应用评价。方法 依据相关文件, 设计化学发光法测定 anti-HBs 的空白限(LoB)、检出限(LoD)、定量检出限(LoQ)、分析测量范围(AMR)、临床可报告范围(CRR)的方案, 并进行测量; 应用建立的临床可报告范围和最大稀释度对急性乙肝患者恢复期进行预测及2016年1~6月期间出生的51例新生儿不同疫苗接种效果的评价。结果 化学发光法测定 anti-HBs 的 LoB, LoD, LoQ, AMR 和 CRR 分别为 0.87, 1.89, 3.0, 0~970.50, 3.0~48 525 mIU/ml, 且最大稀释度为 1:50; 急性乙肝患者在就诊后第4周 anti-HBs 就出现升高(临床可报告范围), 三种疫苗接种后的 anti-HBs 均值以 B 疫苗最高。结论 化学发光法测定 anti-HBs 的检出限和临床可报告范围的建立能满足临床实验室的要求, 为临床提供可靠的检验结果。

关键词:乙型肝炎表面抗体; 化学发光法; 检出限; 临床可报告范围

中图分类号: R446 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2017)05-122-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.05.033

Establishment of Detection Limit and Clinical Reportable Range for Detection of Anti-HBs by Chemiluminescence Method

LI Qian-jin¹, DAI Yu-zhu² (1. Department of Clinical Laboratory,

Zhejiang Greentown Cardiovascular Hospital, Hangzhou 310012, China; 2. Department of

Clinical Laboratory, the 117th Hospital of PLA, Hangzhou 310013, China)

Abstract: **Objective** To establish detection limit and clinical reportable range for detection of anti-HBs by chemiluminescence method and evaluate by clinical application. **Methods** Referring to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) relevant documents, the programme of blank limit (LoB), detection limit (LoD), quantitative detection limit (LoQ), analytical range of measurement (AMR), clinical reportable range (CRR) for detection of anti-HBs by chemiluminescence method, were designed and measured. The established clinical reportable range and maximum dilution were used to predict the recovery stage of acute hepatitis B patients and to evaluate the effectiveness of different vaccines. **Results** LoB, LoD, LoQ, AMR and CRR for detection of anti-HBs by chemiluminescence method were 0.87, 1.89, 3.0, 0~970.50 and 3.0~48 525 mIU/ml respectively, and the maximum dilution was 1:50. The patient with acute hepatitis B showed elevated anti-HBs at fourth weeks after treatment (CRR). The anti-HBs mean was the highest in the B vaccine of the three vaccines. **Conclusion** The establishment of detection limit and clinical reportable range for detection of anti-HBs by chemiluminescence method was better meet the requirements of clinical laboratories, provide reliable results for clinical laboratories.

Keywords: hepatitis B surface antibody; chemiluminescence method; limit of detection; clinical reportable range

乙型肝炎病毒表面抗体(anti-HBs)是乙肝病毒感染清除、肝炎恢复和疫苗接种效果判断的重要指标之一^[1,2]。因此定量测定 anti-HBs 水平已经成为临床诊断、治疗和流行病学调查的基本要求^[3], 本文依据美国临床实验室标准委员会(CLSI)发布的 EP 文件和 ISO15189 实验室质量认可要求^[4,5], 建立和验证美国雅培 i2000 化学发光分析仪测定 anti-HBs 的空白限(limit of blank,

LoB)、检出限(limit of detection, LoD)、定量检出限(limit of quantitation, LoQ)、分析测量范围(analytical measurement range, AMR)和临床可报告范围(clinical reportable range, CRR), 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2016年1~6月收集在浙江绿城心血管医院就诊, 临床典型的首诊急性乙肝

* 作者简介: 李前进(1981—), 男, 大学本科, 从事临床免疫学检验及质量控制研究, 主管技师, E-mail: 15669025@qq.com。

通讯作者: 戴玉柱(1985—), 男, 医学硕士, 副主任技师, 从事临床免疫学方法应用研究, E-mail: dyz5895@qq.com。

(AHB)和慢性乙肝(CHB)患者各1例,2例患者均为男性,年龄分别为38岁和26岁;另收集 anti-HBs 定量检测结果为低值、高值样本各20份,每份标本收集至少3 ml血清,用于 LoB, LoD, LoQ, AMR, CRR 指标的评价,同时收集在此期间出生的51例新生儿(父母均无乙肝感染史),男婴22例,女婴29例。血清样本-70℃保存。

1.2 试剂与仪器 anti-HBs 定量测定试剂盒、稀释液、校准品及化学发光分析仪均为美国雅培公司产品,疫苗分别购自国内三个生产厂家(以 A, B, C 表示)。

1.3 方法 参考文献[6~10]进行实验设计

1.3.1 空白限(LoB)测定:以 anti-HBs 浓度为0 mIU/ml的校准品重复测定20次,以最大值作为 anti-HBs 初始参照 LoB(1.0 mIU/ml),然后选择 anti-HBs 低于初始参照 LoB 的乙肝病毒标志物(HBV-M)阴性的血清标本5份作为空白样本,每天测2次,连续测定6天,采用非参数分析法计算 LoB。

1.3.2 检出限(LoD)测定:选择期望浓度为1~5倍 anti-HBs 初始参照 LoB 的血清标本5份作为低浓度样本,每天检测2次,连续测定6天,采用非参数分析法计算 LoD。

1.3.3 定量检出限(LoQ)测定:计算5份低浓度样本结果的均值、标准差、变异系数,按照 ISO 15189 的要求,批间变异系数(CV)应小于厂商声明的总允许误差(低浓度均值 $\pm 2s$, 26.25%)三分之一的样本浓度为 LoQ^[11]。

1.3.4 分析测量范围(AMR):取低浓度(0.00 IU/ml)和高浓度(970.50 mIU/ml)血清,按照 5L, 4L+1H, 3L+2H, 2L+3H, 1L+4H, 5H 的比例配制6份样本,每份标本检测2次取均值,以预期值和测定均值为横坐标和纵坐标作回归分析,得到回归方程 $Y=a+bX$, b 在 0.97~1.03 之间,相关系数 $r \geq 0.975$ ($r^2 \geq 0.95$),则两浓度范围即为分析测量范围。

1.3.5 临床可报告范围(CRR):对 anti-HBs 含量为 970.50 mIU/ml 的高值样本以 1:1, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100 进行稀释,每个样本测定2次,计算稀释回收率=(实测值/预期值)×100%,回收率在 80%~120%之间的结果为可接受,确定最大稀释度。分析测量范围上限乘以最大稀释倍数即为临床可报告范围的上限,临床可报告范围下限即定量检出限。

1.3.6 临床应用评价:①急性乙型肝炎患者恢复期预测;临床典型的首诊急性乙肝(AHB)和慢性乙肝(CHB)患者各1例,在就诊后每2周测定一次

anti-HBs,观察其 anti-HBs 的动态变化,应用临床可报告范围预测急性乙肝患者恢复期的出现时间。

②不同疫苗免疫效果的比较:对51例新生儿(父母均无乙肝感染),根据男女性别出生次序分别采用三种疫苗(A, B, C)以“0, 1, 6 方案”进行接种^[12],到第12个月采集被接种者静脉血进行 anti-HBs 定量测定(anti-HBs > 1 000 mIU/ml,采用本文确定的最大稀释度),观察三种疫苗的免疫效果。

1.4 统计学分析 用 SSPS 11.02 软件对实验数据进行频数统计分析。

2 结果

2.1 空白限(LoB) 采用非参数分析法计算5份空白样本60个测定结果的 LoB 为 0.87 mIU/ml。

2.2 检出限(LoD) 采用非参数分析法检测5份低浓度样本60个测定结果的 LoD 为 1.89 mIU/ml。

2.3 定量检出限(LoQ) 见表1。厂商声明的化学发光法检测 anti-HBs 的总误差为 26.25%, anti-HBs 批间变异系数(CV)应小于总误差的三分之一(即 8.75%)。anti-HBs 浓度在 3.0 mIU/ml 时的批间 CV 为 8.57%, 小于 8.75%, 故化学发光法检测 anti-HBs 的 LoQ=3.0 mIU/ml。

表1 不同 anti-HBs 低浓度样本的批间 CV($n=12$)

样本浓度(mIU/ml)	$\bar{x} \pm s$ (mIU/ml)	CV(%)
1.0	1.001 7 \pm 0.160 8	16.05
2.0	1.985 8 \pm 0.237 8	11.98
3.0	2.995 8 \pm 0.256 6	8.57
4.0	4.000 8 \pm 0.294 4	7.36
5.0	5.008 3 \pm 0.007	7.05

2.4 分析测量范围(AMR) 低值和高值样本按比例混合后的6份样本进行检测,结果见表2。预期值为 X, 测量均值为 Y, 得到方程 $Y=4.425+0.984X$, $r^2=0.998 > 0.95$, $B=0.984$, 在 0.97~1.03 之间。方法分析测量范围为 0~970.50 mIU/ml。

表2 anti-HBs 的分析测量范围数据(mIU/ml)

项 目	标本号					
	1	2	3	4	5	6
样本配制	1L	0.8L+0.2H	0.6L+0.4H	0.4L+0.6H	0.2L+0.8H	1H
测量均值	0.00	198.15	383.73	588.22	774.92	979.20
预期值	0.00	194.10	388.20	582.30	776.40	970.50

2.5 临床可报告范围(CRR) 见表3。对高值 anti-HBs 作 1:1~1:100 倍稀释,当稀释度为 1

: 100 时,该样本的回收率为 121.96%,超出可接受范围(80%~120%);当稀释度在 1:1~1:50 时,均在可接受范围,因此,最大稀释度为 1:50, $CRR \text{ 上限} = 970.50 \times 50 = 48\,525 \text{ mIU/ml}$,故 anti-HBs 的临床可报告范围为 3.0~48 525 mIU/ml。

表 3 anti-HBs 不同稀释度的回收率
(anti-HBs=970.50mIU/ml)

稀释度	实测值(mIU/ml)	理论值(mIU/ml)	回收率(%)
1:1	492.17	485.25	101.43
1:5	175.77	161.75	108.67
1:10	98.85	88.23	112.04
1:20	52.92	46.21	114.52
1:50	22.65	19.03	119.02
1:100	11.72	9.61	121.96

注:回收率为 $100 \times (\text{实测值}/\text{理论值})$ 。

2.6 临床应用评价

2.6.1 急性乙型肝炎患者恢复期预测:急性乙肝(AHB)患者入院后的第4周 anti-HBs 结果就进入到临床可报告范围(3.0~48 525 mIU/ml),而慢性乙肝(CHB)患者的 anti-HBs 在 12 周内均在 0~1.22 mIU/ml 之间波动,见图 1。

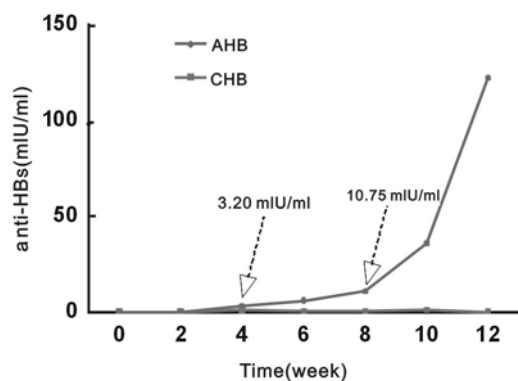


图 1 急性乙肝和慢性乙肝病人 anti-HBs 的动态变化图

2.6.2 不同疫苗免疫效果的比较:三种疫苗的免疫结果分别为:1 190.24 ± 531.32 mIU/ml, 1 663.28 ± 771.61 mIU/ml, 1 182.20 ± 470.73 mIU/ml;以 B 疫苗免疫后产生的 anti-HBs 均值最高,高于 A 和 C 疫苗的免疫结果($P < 0.05$)。

3 讨论 在 CLSIEP-17 文件中,空白限 LoB 是指空白样本被观察到的最大检测结果。本文的 anti-HBs 空白限为 0.87 mIU/ml。检出限 LoD 是指样本中可被检测到的最低分析物浓度,也称检测下限。本文建立的 LoD 为 1.89 mIU/ml。定量检出

限 LoQ 是指在实验条件下能够得到可靠的样本中分析物的最低浓度。生产厂商声明 anti-HBs 在 4.67mIU/ml 时的总允许误差为 26.25%,遵照 ISO 15189 认可说明,批间变异系数要小于总允许误差的三分之一,检测结果才具有可靠性,本文 anti-HBs 批间变异系数小于 8.75%时的样本浓度为 3.0mIU/ml,即 anti-HBs 的 LoQ 为 3.0mIU/ml。

实验室应尽可能规范检验报告方式。LoB, LoD 和 LoQ 三者的关系是 $LoB < LoD \leq LoQ$ 。本实验中,LoB 为 0.87 mIU/ml,LoD 为 1.89 mIU/ml,LoQ 为 3.0 mIU/ml,使用本系统报告结果时,若 anti-HBs 检测结果低于 3.0mIU/ml,应报告“小于 3.0 mIU/ml”或阴性;若 anti-HBs 检测结果高于 3.0 mIU/ml,则直接报告检测结果,但 anti-HBs 大于 10.0 mIU/ml 才有临床意义。

根据 CLSIEP6-A 要求,实验室验证分析测量范围,采用高低两个浓度标本按照 5L,4L+1H,3L+2H,2L+3H,1L+4H,5H 的比例配制 6 个样本,经直线回归分析,该方法分析测量范围为 0~970.50 mIU/ml,与厂商说明书所给的 0~1 000 mIU/ml 基本一致。当超出此分析测量范围时,常需要稀释样本检测,才能满足临床的需要。为了避免稀释效应引起误差,需要对最大稀释度进行验证,进而保证检验结果的准确性。本实验验证,稀释度为 1:1~1:50 时,anti-HBs 的稀释回收率在 100%~120%之间。为了保证检验结果的准确性,应确保稀释度在 1:1~1:50 之间为宜。临床可报告范围上限为分析测量范围上限乘以最大稀释度,下限为定量检出限,所以本方法临床可报告范围为 3.0~48 525 mIU/ml。本文建立的可报告范围可以提前预测到急性乙肝患者进入恢复期的时间点(本文观察的急性乙肝患者为就诊后的第 4 周),比文献报道恢复的要早;最大稀释度为疫苗接种效果提供了准确的评价体系及可信度^[13]。

综上所述,雅培 i2000 分析系统定量检测 anti-HBs 的定量检出限为 3.0 mIU/ml,分析测量范围与厂商提供的一致。但最大稀释度为 1:50,不能无限地增加稀释度,各实验室应建立自己的性能参数^[14],保证检验结果的准确性,进而满足临床诊断和治疗的需要。临床实验室应验证检测系统厂家提供的检测下限性能声明,根据检测系统和研究数据的分布特性,选择合适的方法设计 LoB,LoD 和 LoQ 的研究方案。研究方案的设计可根据实际情况适当调节,但必须满足最低的重复检测数要求^[6]。

参考文献:

- [1] Ciupe SM, Ribeiro RM, Perelson AS. Antibody responses during hepatitis B viral infection[J]. PLoS Comput Biol, 2014, 10(7): e1003730.
- [2] Kim YJ, Li P, Hong JM, et al. A single center analysis of the positivity of hepatitis B antibody after neonatal vaccination program in Korea[J]. J Korean Med Sci, 2017, 32(5): 810-816.
- [3] He F, Ma YJ, Zhou TY, et al. The serum anti-HBs level among children who received routine hepatitis B vaccination during infancy in Mianyang city, China: A cross-sectional study[J]. Viral Immunol, 2016, 29(1): 40-48.
- [4] Clinical Laboratory Standards Institute. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline[S]. Wayne: PA, CLSI EP6-A, 2003.
- [5] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL02:2012 医学实验室质量和能力认可准则[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- China National Accreditation Service for Conformity Assessment. CNAS-CL02:2012 Accreditation criteria for the quality and competence of medical laboratories[S]. Beijing: Standards Press of China, 2012.
- [6] 康凤凤, 王 薇, 王治国. 临床实验室检测方法空白限、检出限和定量限评价新方法[J]. 中国卫生统计, 2014, 31(5): 901-904.
- Kang FF, Wang W, Wang ZG. New methods for clinical laboratory test methods including limit of blank, limit of detection and limit of quantitation[J]. Chinese Journal of Health Statistics, 2014, 31(5): 901-904.
- [7] 张诗诗, 王 薇, 王治国. 临床检验质量控制程序的性能验证[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(6): 150-153, 157.
- Zhang SS, Wang W, Wang ZG. Performance verification of quality control procedures in clinical laboratory medicine[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(6): 150-153, 157.
- [8] 郭绪晓, 柏淑美, 张春来, 等. 基于 EP-17 A2 的胶体金法检测粪便隐血的空白限、检出限及定量限的建立及评价[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(1): 78-81.
- Guo XX, Bai SM, Zhang CL, et al. Establishment and evaluation of blank limit, detection limit and quantitation limit of fecal occult blood tests with colloidal gold method based on the document of EP-17 A2[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(1): 78-81.
- [9] 周双艳, 胡 敏, 杨泽华, 等. 全自动酶联免疫吸附法检测血清乙型肝炎表面抗原检测限的建立与评价[J]. 临床检验杂志(电子版), 2014, 3(4): 746-749.
- Zhou SY, Hu M, Yang ZH, et al. The establishment and evaluation of limit of detection for detection of serum hepatitis B surface antigens by Automated enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Clinical Laboratory Journal (Electronic Edition), 2014, 3(4): 746-749.
- [10] 杨有业, 张秀明. 临床检验方法学评价[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 142-193.
- Yang YY, Zhang XM. The methodology evaluation in clinical laboratory[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008: 142-193.
- [11] 中国合格评审国家认可委员会. CNAS-CL38:2016 医学实验室质量和能力认可准则在临床化学检验领域的应用说明[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- China National Accreditation Service for Conformity Assessment. CNAS-CL38: 2016 Guidance on the Application of Accreditation Criteria for the Medical Laboratory Quality and Competence in the Field of Clinical Chemistry[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.
- [12] 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2015 更新版)[J]. 中华肝脏病杂志, 2015, 23(12): 888-905.
- Chinese Society of Hepatology and Chinese Society of Infectious Diseases, China Medical Association. The guideline of prevention and treatment for chronic hepatitis B: a 2015 update[J]. Chinese Journal of Hepatology, 2015, 23(12): 888-905.
- [13] 刘重程, 唐雅清, 王瑞琴, 等. 不同剂量国产重组酵母乙肝疫苗成人免疫效果评价[J]. 中国预防医学杂志, 2012, 13(9): 701-703.
- Liu ZC, Tang YQ, Wang RQ, et al. Evaluation of the immune effect of Chinese hamster ovary cell derived hepatitis B vaccine among adults [J]. Chin Prev Med, 2012, 13(9): 701-703.
- [14] 张秀明. 浅析定量检验程序分析性能验证实验方案设计[J]. 中华检验医学杂志, 2015, 38(6): 428-430.
- Zhang XM. Suggestions for analytical performance verification and experimental designs for clinical laboratory tests [J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2015, 38(6): 428-430.

收稿日期: 2017-08-06

修回日期: 2017-08-31