

· 实验室研究 ·

对 31 种乙型肝炎病毒表面抗原酶联免疫试剂盒的分析灵敏度评价

辜文洁 黄维金 周诚 吴星 蓝海云 姚昕 林京香 李河民 梁争论 庄辉

【摘要】 目的 评价乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)酶联免疫(EIA)试剂盒的分析灵敏度。方法 对 2007 年 6 月至 2008 年 6 月申报批批检验的 31 种 HBsAg EIA 试剂盒,应用国家参考品进行检测,并用国家参考品中的灵敏度标准品,建立浓度和吸光度(A)值双对数曲线,将各试剂盒的 Cut-off 值代入曲线方程,计算其分析灵敏度,然后进行比较。结果 对 27 个国内厂家(351 批)和 4 个国外厂家(27 批) HBsAg EIA 试剂盒进行分析,其中 2 个批次国产试剂盒的灵敏度低于国家要求的质量标准,总符合率为 99.43%(349/351)。国产试剂盒对 *adr*、*adw*、*ay* 血清型的分析灵敏度均值分别为 0.307、0.419、0.513 ng/ml,差异有统计学意义($F=97.30, P<0.01$);进口试剂盒的分析灵敏度均值分别为 0.054、0.066、0.050 ng/ml,差异无统计学意义($F=0.65, P>0.05$)。进口试剂盒各血清型分析灵敏度均高于国产试剂盒($P<0.01$)。部分国产试剂盒与进口试剂盒对相同血清型的分析灵敏度差异有统计学意义。同一厂家试剂盒加酶后孵育 30 min 和 60 min,其血清型分析灵敏度差异无统计学意义($P>0.05$);同一厂家生产的试剂盒显色 10 min 和 15 min,其血清型分析灵敏度的差异有统计学意义($P<0.01$)。结论 国产试剂盒应提高分析灵敏度,特别是对 *adw* 和 *ay* 血清型。

【关键词】 乙型肝炎病毒;酶联免疫试验;灵敏度;血清型

Evaluation on the analytical sensitivity of 31 HBsAg enzyme immunoassay kits GU Wen-jie*, HUANG Wei-jin, ZHOU Cheng, WU Xing, LAN Hai-yun, YAO Xin, LIN Jing-xiang, LI He-min, LIANG Zheng-lun, ZHUANG Hui. *National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China

Corresponding author: ZHUANG Hui, Email: zhuangbmu@126.com

【Abstract】 Objective To study the analytical sensitivity on 31 HBsAg enzyme immunoassay (EIA) test kits. Methods Thirty one HBsAg EIA kits produced by domestic or overseas manufactories and applied for approval during May 2007 to May 2008, were evaluated using the national reference panels. The hyperbolic curve of the log A value and log concentration for the national sensitivity standards was established. The cut-off value of each kit was substituted into the curvilinear equation to determine the analytical sensitivity which was compared between different HBsAg EIA kits. Results Twenty seven (351 lots) domestic and 4 (27 lots) overseas kits were compared. Among 378 lots of the 31 HBsAg EIA kits, only 2 lots of the domestic kits had a lower sensitivity when tested with the national HBsAg reference panels, with an average approval rate of 99.43% (349/351). The mean analytical sensitivity of the domestic kits for *adr*, *adw*, *ay* serotypes were 0.307, 0.419, 0.513 ng/ml, respectively. There was a significant difference between serotypes ($F=97.30, P<0.01$). The mean analytical sensitivity of the overseas kits for *adr*, *adw*, *ay* serotypes were 0.054, 0.066, 0.050 ng/ml respectively, with no significant difference between serotypes ($F=0.65, P>0.05$). The analytical sensitivity of the overseas kits for all the three serotypes was higher than that of the domestic kits ($P<0.01$). There was no significant difference found between the analytical sensitivities of the kits produced by the same manufactory using 30- or 60- minute incubation of detection ($P>0.05$). In contrast, there was significant difference noticed between the analytical sensitivities of the kits produced by the same manufactory when tested for 10 or 15- minute coloration of the results ($P<0.01$). Conclusion Analytical sensitivity of the HBsAg EIA domestic kits should be further improved, especially for detecting *adw* and *ay* serotypes.

【Key words】 Hepatitis B virus; Enzyme immunoassay; Sensitivity; Serotype

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.08.019

基金项目:国家“十五”科技攻关计划(2004BA718B02);北京市科技计划(D08050700650805)

作者单位:100050 北京,中国药品生物制品检定所(辜文洁、黄维金、周诚、吴星、蓝海云、姚昕、林京香、李河民、梁争论);北京大学医学部(庄辉)

辜文洁、黄维金同为第一作者

通信作者:庄辉, Email: zhuangbmu@126.com

乙型肝炎(乙肝)表面抗原(HBsAg)是乙肝病毒(HBV)感染的重要血清学标志之一。目前HBsAg有多种检测方法,包括酶联免疫法(EIA)、化学发光法和电化学发光法等,其中EIA试剂盒用于临床检验和血液筛查最为广泛,因此,其质量的高低直接影响我国乙肝的实验室诊断水平,而且也关系到用血安全。目前,HBsAg EIA试剂盒与抗-HCV和抗-HIV等试剂盒一起,被列入我国批批检的诊断试剂。本研究分析2007年6月至2008年6月对国内外31种HBsAg EIA试剂盒的批批检定结果。

材料与方法

1. 试剂:2007年6月至2008年6月申报批批检验和注册检验的HBsAg EIA试剂盒27个国内厂家的试剂共351批,以及4个国外厂家的进口试剂共27批。

2. HBsAg诊断试剂盒国家参考品:批号0412,其中20份阴性参考品,包括可能导致假阳性的各种样品,以考核试剂盒的阴性符合率,国家标准要求阴性符合率为20/20。3份强阳性参考品,主要考核试剂盒的前带效应,国家标准要求阳性符合率为3/3。9份灵敏度参考品,分别为 adr 血清型0.2、0.5、1.0 ng/ml; adw 血清型0.5、1.0、2.0 ng/ml; ay 血清型0.5、1.0、2.0 ng/ml;国家标准要求 adr 、 adw 、 ay 血清型的灵敏度分别不低于0.5、1.0、1.0 ng/ml。1份精密密度参考品为HBsAg阳性样品,考核试剂盒的精密密度国家标准要求不低于15%。

3. 仪器:酶标仪MK3;全自动洗板机DEM-3;Binder-KB240孵育箱。要求水浴孵育的试剂盒,则采用北京长风水浴锅。

4. 检测方法:严格按各试剂盒的说明书操作。按固定的操作规范(SOP)检测,固定每孔加样顺序。说明书中对洗板机无特别说明者,均选择自动洗板机洗涤,并采用两点吸干模式。

5. 统计学分析:利用国家参考品中不同血清型灵敏度参考品的检测吸光度(A)值和标示浓度值的双对数绘制直线方程,将各试剂盒的Cut-off值代入方程,计算每批试剂盒的分析灵敏度。按照 $P < 0.05$ 的标准剔除异常值后,计算均值作为各厂家分析灵敏度的均值。采用多因素方差分析法对不同批试剂盒或不同厂家试剂盒的分析灵敏度进行分析。采用成组 t 检验比较不同厂家的分析灵敏度,组内数据均进行方差齐性检验,方差齐者则进行 t 检验;方差不齐者则采用Welch方法 t' 检验。

结 果

1. 厂家试剂盒检测国家标准品:2007年6月至2008年6月期间,我国共有351批HBsAg酶联免疫试剂盒上市,合格率为99.43%(349/351),其中2批因灵敏度低于国家标准不合格。所有试剂盒的阴性符合率均为20/20;阳性符合率均为3/3;每批试剂盒对一份精密密度参考品平行检测10次,计算每批试剂盒的精密密度,结果均低于15%,符合国家要求(表1)。

表1 不同血清型分析HBsAg EIA试剂盒灵敏度检测结果($\bar{x} \pm s$, ng/ml)

厂家(批次)	adr	adw	ay	CV均值(%)
A加酶孵育30 min(71)	0.337±0.116	0.424±0.153	0.533±0.209	6.4
A加酶孵育60 min(14)	0.276±0.103	0.339±0.122	0.425±0.122	6.3
B加酶孵育30 min(33)	0.219±0.107	0.286±0.160	0.418±0.233	6.8
B加酶孵育60 min(17)	0.248±0.126	0.281±0.184	0.486±0.271	8.9
C(显色10 min)(6)	0.408±0.039	0.580±0.166	0.611±0.126	10.0
C(显色15 min)(29)	0.195±0.072	0.280±0.104	0.300±0.127	7.4
D(27)	0.349±0.122	0.475±0.173	0.571±0.261	7.2
E(16)	0.348±0.110	0.536±0.205	0.607±0.207	8.1
F(15)	0.490±0.285	0.700±0.325	0.807±0.605	8.5
G(14)	0.291±0.084	0.437±0.201	0.528±0.119	7.7
H(12)	0.412±0.079	0.587±0.115	0.822±0.153	5.2
I(12)	0.319±0.096	0.416±0.127	0.537±0.246	7.3
J(11)	0.273±0.076	0.367±0.159	0.366±0.116	7.0
K(10)	0.320±0.081	0.507±0.228	0.559±0.253	7.4
JK1(10)	0.133±0.095	0.181±0.122	0.168±0.112	5.4
L(8)	0.264±0.085	0.398±0.189	0.391±0.160	10.2
M(7)	0.325±0.118	0.432±0.167	0.479±0.165	8.0
N(7)	0.411±0.103	0.537±0.173	0.745±0.269	13.1
JK2(7)	0.085±0.033	0.104±0.046	0.088±0.033	4.6
JK3(6)	0.043±0.016	0.034±0.014	0.027±0.010	4.9
O(6)	0.315±0.100	0.380±0.198	0.372±0.244	9.3
P(6)	0.273±0.204	0.460±0.319	0.490±0.393	4.8
Q(5)	0.247±0.073	0.304±0.026	0.509±0.117	5.6
R(5)	0.307±0.091	0.551±0.108	0.448±0.229	7.2
JK4(4)	0.070±0.025	0.077±0.067	0.087±0.035	2.5
S(3)	0.338±0.110	0.426±0.148	0.640±0.250	10.3
T(3)	0.380±0.114	0.513±0.205	0.655±0.219	7.0
U(3)	0.333±0.015	0.679±0.092	0.745±0.121	6.0
V(3)	0.280±0.078	0.396±0.076	0.616±0.142	5.7
W(2)	0.336±0.076	0.412±0.024	0.473±0.200	5.0
X(2)	0.483±0.074	0.613±0.067	0.851±0.070	9.0
Y(2)	0.401±0.083	0.463±0.194	0.556±0.462	10.0
Z(1)	0.422 [‡]	0.419 [‡]	0.737 [‡]	7.0
Z1(1)	0.386 [‡]	0.404 [‡]	0.718 [‡]	8.0
甲试剂(1) [‡]	1.214 [‡]	1.550 [‡]	2.236 [‡]	5.0
乙试剂(1) [‡]	1.106 [‡]	1.328 [‡]	2.249 [‡]	11.0

注:[‡]灵敏度低于国家参考品灵敏度标准;[‡]一个批次,未计算标准差(s);A~Z、Z1为国产试剂盒,JK1~JK4为进口试剂盒

表 5 A 和 B 厂家试剂盒不同孵育时间的分析灵敏度比较(成组 *t* 检验, *P* 值)

血清型	试剂	均值	A		B		
			30 min	60 min	30 min	60 min	
adr	A	30 min	0.337	-	$t=1.625, P>0.05$	$t'=4.10, P<0.01^b$	$t'=6.49, P<0.01^a$
		60 min	0.276	-		$t'=2.01, P<0.01^b$	$t=2.874, P<0.01^a$
	B	30 min	0.219	-		-	$t'=0.30, P>0.05^a$
		60 min	0.248	-		-	
adw	A	30 min	0.424	-	$t=1.630, P>0.05$	$t'=4.10, P<0.01^b$	$t'=6.49, P<0.01^a$
		60 min	0.339	-		$t'=2.01, P<0.01^b$	$t=2.874, P<0.01^a$
	B	30 min	0.286	-		-	$t'=0.30, P>0.05^a$
		60 min	0.281	-		-	
ay	A	30 min	0.533	-	$t'=1.720, P>0.05^b$	$t=2.747, P<0.01$	$t=0.945, P>0.05$
		60 min	0.425	-		$t'=0.96, P>0.05^b$	$t'=0.32, P>0.05^a$
	B	30 min	0.418	-		-	$t=1.032, P>0.05$
		60 min	0.486	-		-	

注: ^a有异常值的剔除; ^b方差不齐, 计算 Welch *t'* 值

断和血液筛查, 该试剂盒是我国严格控制的诊断试剂产品, 被列入批批检定的项目之一。灵敏度指标是该类试剂的重要性能之一, 我国生物制品规程规定, HBsAg 诊断试剂的最低灵敏度检测标准 *adr*、*adw*、*ay* 血清型分别不低于 0.5、1.0、1.0 ng/ml^[1]。本研究分析了 2007 年 6 月至 2008 年 6 月间在我国 27 种共计 351 批 HBsAg EIA 试剂盒的批批检定和注册检验结果, 发现 99.43% 的该类试剂盒达到国家要求的灵敏度控制最低标准。

该 27 种 HBsAg EIA 试剂盒对不同血清型的分析灵敏度不同: 对 *adr* 高于 *adw*, 对 *adw* 高于 *ay*。进口试剂盒除 JK3 的 *adr* 和 *ay* 血清型分析灵敏度间有差异外, 总体上不存在血清型间的差别, 进口和国产试剂盒的这种不同, 可能是由于选择包被抗体不同所致。HBV *ay* 血清型在欧洲等地区的分布远高于我国, 我国大部分地区流行的为 *adr* 和 *adw* 血清型, *ay* 血清型主要分布在西部地区^[2,3], 我国的 HBsAg EIA 检测试剂盒应减少不同血清型检出率的差异。

研究表明, 进口 HBsAg EIA 试剂盒对各血清型的分析灵敏度远高于国产试剂盒, 与用 WHO 标准品 IU 单位评价的结果一致^[4]。为保证我国血液筛查的安全性和提高对 HBV 感染的实验室辅助诊断水平, 应进一步提高我国 HBsAg EIA 试剂盒的灵敏度。充分的孵育时间是提高灵敏度的重要条件之一, 进口试剂盒的孵育时间为 1 h, 国产试剂盒大多是 30 min, 只有 A 和 B 两个厂家有 1 h 孵育的试剂盒, 但该两个厂家不同孵育时间的试剂盒分析灵敏度无差异, 可能与其他因素有关。C 厂家的试剂盒有 10 min 和 15 min 两种显色时间, 15 min 显色的试剂盒分析灵敏度高于 10 min。显色时间可能也是提

高试剂盒灵敏度的因素之一。此外, 选择合适的单克隆抗体和优化包被条件、优化其他实验条件等也可提高试剂盒的灵敏度, 但必须在保障高特异度的前提下进行优化。国家参考品仅有 20 份特异度的参比品, 对各个厂家试剂盒的特异度评价尚显不足。分析灵敏度只能在一定程度上反映试剂盒的质量水平, 不能完全代表该试剂盒的临床检

测灵敏度, 各使用、生产和研究单位应该加强对各试剂盒在临床检测中的灵敏度(阳性符合率)、特异度(阴性符合率)和 HBV 变异检测能力等方面的综合评价研究^[5,6]。

HBV α 决定簇的氨基酸改变可能影响 HBsAg 的检测^[6-8], 进口试剂盒已有换代产品, 可检出多种突变株^[8,9], 而我国 HBsAg 试剂盒尚有一定差距, 今后应筛选高效广谱识别的抗-HBs, 进一步提高我国 HBsAg 试剂盒检测 HBV 突变株的能力。

参 考 文 献

- [1] 中国生物制品规程. 北京: 化学工业出版社, 2000: 572-574.
- [2] Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. J Gen Virol, 2002, 83(6): 1267-1280.
- [3] 夏同良, Omana VN, 贾志远, 等. 乙型肝炎病毒基因型和血清亚型在我国部分地区的分布及其特点. 中华流行病学杂志, 2001, 22(5): 348-351.
- [4] 周诚, 吴星, 黄维金, 等. 应用 IU 标准对 HBsAg 检测试剂的分析. 中国生物制品学杂志, 2008, 21(7): 615-617.
- [5] 吴星, 周诚, 黄维金, 等. 对四种国产乙型肝炎酶联免疫试剂盒的灵敏度和特异度分析. 中华流行病学杂志, 2008, 29(9): 915-918.
- [6] 钟熙, 王佑春, Ling R, 等. 用现行国产 HBsAg EIA 检测乙肝 S 基因突变体问题的研究. 中华微生物学和免疫学杂志, 1998, 18(2): 85-87.
- [7] Avellón A, Echevarria JM. Frequency of hepatitis B virus 'a' determinant variants in unselected Spanish chronic carriers. J Med Virol, 2006, 78(1): 24-36.
- [8] Mühlbacher A, Weber B, Bürgisser P, et al. Multicenter study of a new fully automated HBsAg screening assay with enhanced sensitivity for the detection of HBV mutants. Med Microbiol Immunol, 2008, 197(1): 55-64.
- [9] Echevarria JM, Avellón A. Improved detection of natural hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) mutants by a new version of the VITROS HBsAg assay. J Med Virol, 2008, 80(4): 598-602.

(收稿日期: 2009-02-03)

(本文编辑: 张林东)