

喙部刃面,更容易观察有关。有研究显示,当工作端尺寸减少20%,工作端的强度将显著降低^[5]。报废的原因可能是此时刮治器的喙部宽度变薄,强度减弱,工作时有折断风险,也影响工作效果。本研究选取的274个工作端报废时宽度略偏低,有19个折断。本文选取的刮治器分别来自3男3女工作年限3~25年的6名医生,总体上年资高比年资低磨锐保形效果好,其余未发现明显规律。

总之,本研究中反复多次磨锐后的 Gracey 刮治器锋利程度下降,大部分产生变形,可能影响器械贴合进而影响刮治效果,或容易损伤牙龈引起疼痛出血,提示临床工作时需要认真学习打磨技术和更仔细地打磨。

参考文献

- 1 Marcenés W, Kassebaum NJ, Bernabe E, et al. Global burden of oral conditions in 1990–2010: a systematic analysis[J]. J Dent Res, 2013(92): 592–597.
- 2 利春风,万晓曼,杨小英. 大学新生口腔健康状况调查分析[J]. 中国临床新医学,2014,7(4):325–327.
- 3 Graziani F, Karapetsa D, Alonso B, et al. Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease[J]. Periodontol 2000,2017,75(1):152–188.
- 4 李少兰,周 军. 口腔专科诊疗器械的保养—牙周锐器的磨利[A]. 全国口腔护理新进展研讨会论文集汇编,2012:343–345.
- 5 Jill s. Nield-Gehrig. Fundamentals of periodontal instrumentation and advanced root instrumentation[M]. 6th edition. Wolters Kluwer;413–433.

[收稿日期 2017-09-22][本文编辑 杨光 and]

课题研究·论著

时间分辨荧光免疫分析法和酶联免疫吸附实验法测定乙型肝炎病毒大蛋白的方法学比较

李 梅, 刘 洁, 叶 燕, 俞 蕾, 王婷婷

基金项目: 无锡市医管中心科研项目(编号: YGZXMI4013)

作者单位: 214023 江苏,南京医科大学附属无锡市人民医院医学检验科

作者简介: 李 梅(1982-),女,医学硕士,主管技师,研究方向:免疫学。E-mail:lm1234_82@163.com

通讯作者: 王婷婷(1977-),女,医学硕士,副主任技师,研究方向:医学检验。E-mail:wangtt@wuxiph.com

[摘要] **目的** 对时间分辨荧光免疫分析(time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)和酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测乙型肝炎患者血清中病毒大蛋白(hepatitis B virus large surface protein, HBV-LP)进行方法学比较。**方法** 收集30例正常体检血清标本作为阴性对照和150例慢性乙型肝炎患者血清标本,利用ELISA法检测HBV-LP,将其中70例阳性标本作为阳性样本,70例阴性标本作为阴性样本,再分别采用TRFIA法检测HBV-LP,对二者的灵敏度、特异度、一致性、检测线性范围、精密度、相关性及两种试剂盒的稳定性进行比较。其中TRFIA与ELISA结果不一致的12例标本采用PCR法进行验证。**结果** TRFIA检测HBV-LP的最小测定值为0.1 ng/ml,ELISA检测HBV-LP的最小测定值为2.5 ng/ml,二者的特异度均为100%。TRFIA和ELISA检测HBV-LP的Kappa值为0.83。12例ELISA和TRFIA检测不一致的标本,经PCR验证后有10例HBV DNA > 10³ 拷贝数。TRFIA试剂检测的线性范围在0.625~10 252 ng/ml之间,ELISA试剂盒检测的线性范围在5~1 281.6 ng/ml。TRFIA法检测高、中、低3个浓度水平的批内CV平均为6.10%,ELISA法的批内CV平均为8.98%。TRFIA批间CV平均为6.91%,ELISA的批间CV平均为10.45%。TRFIA试剂盒的结合下降率为6.61%,ELISA试剂盒的结合下降率为23.59%。**结论** TRFIA与ELISA具有高度的一致性,但是两者相比,前者有更高的灵敏度和精密度,且TRFIA试剂盒的稳定性更好。

[关键词] 乙型肝炎病毒; 时间分辨荧光免疫分析; 大蛋白

[中图分类号] R 446.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2018)02-0118-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2018.02.04

Methodological comparison of detecting HBV-LP by time-resolved fluoroimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay LI Mei, LIU Jie, YE Yan, et al. Department of Clinical Laboratory, Wuxi People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Jiangsu 214023, China

[Abstract] **Objective** To compare the measure results of serum HBV-LP between using time-resolved fluoroimmunoassay (TRFIA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the patients with hepatitis B. **Methods** A total of 150 serum specimens of hepatitis B patients were collected. 30 serum specimens of healthy people were taken as the negative controls. HBV-LP of 150 serum specimens was measured by ELISA to distinguish 70 negative from 70 positive samples. Then, these samples were measured by TRFIA. The sensitivity, specificity, consistency, detection range, precision, relativity and the stability of kits were evaluated. 12 inconsistent samples between using ELISA and TRFIA were tested by polymerase chain reaction (PCR). **Results** The sensitivity of TRFIA and ELISA was 0.1 ng/ml and 2.5 ng/ml respectively. The specificity of TRFIA and ELISA was 100%. The Kappa was 0.83. The HBV DNA copies of 10 inconsistent samples were $> 10^3$. The detection range of TRFIA was between 0.625 ng/ml and 10 252 ng/ml. The positive rate of ELISA was between 5 ng/ml and 1 281.6 ng/ml. The intra-assay average CVs of TRFIA and ELISA were 6.10% and 8.98% respectively for 3 different concentrations. The inter-assay average CVs of TRFIA and ELISA were 6.91% and 10.45% respectively. The stability of the established assay kit was better than that of the commercially ELISA kit. **Conclusion** TRFIA and ELISA come with a high degree of consistency in detecting HBV-LP. However, the sensitivity, precision and stability of TRFIA are better than those of ELISA.

[Key words] Hepatitis B virus; Time-resolved fluoroimmunoassay; Large surface protein

慢性乙型肝炎患者发病的主要原因是乙肝病毒的复制^[1],目前主要通过检测血清学标志物、HBV-DNA 及 PreS1 等指标来确诊乙型肝炎,并监测病毒复制及判断预后等,但都有一定的局限性^[2]。HBV-LP 是 HBV 的包膜蛋白,作为反映 HBV 感染者体内病毒复制的新的血清学监测指标,与 HBV 病毒的复制程度密切相关,目前检测 HBV-LP 的方法主要为酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法^[3,4],随着荧光免疫自动化分析技术发展的日新月异,以抗原抗体反应与荧光物质发光和时间分辨技术相结合的时间分辨荧光免疫分析 (time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA) 已被逐渐应用于临床。笔者对 TRFIA 与 ELISA 两种方法的检出阳性率、检测线性范围、精密度、相关性及两种试剂盒的稳定性进行比较,评价 TRFIA 用于 HBV-LP 检测的价值。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料 HBV-LP 的 TRFIA 试剂盒 (苏州新波公司产品); HBV-LP ELISA 试剂盒 (北京热景生物技术有限公司产品); HBV DNA 聚合酶链反应试剂盒 (上海复星长征医学科学有限公司产品)。

1.2 标本来源 150 例慢性乙型肝炎患者血清标本来自无锡市人民医院住院及门诊患者血清,所有乙肝患者均符合 2010 年《中国慢性乙型肝炎防治指南诊断标准》,乙型肝炎病毒表面抗原均为阳性,无甲、丙、丁、戊肝的合并感染,以及人类免疫缺陷病毒

感染、自身免疫性疾病、原发性胆汁淤积性肝硬化、重度酗酒者等疾病。30 份正常体检者血清标本 (HBV 血清标志物均阴性)。

1.3 TRFIA 检测 HBV-LP 采用双抗夹心法,在 AutoDELFI-1235 仪上检测荧光信号,从标准曲线计算样品中的 HBV-LP 的含量 (软件程序机器自带)。

1.4 ELISA 检测 HBV-LP 采用双抗夹心法,利用 ALISEI QUALITY SYSTEM 全自动酶免分析仪检测。

1.5 PCR 检测 HBV DNA 采用商品化的聚合酶链式反应试剂盒进行检测,验证 TRFIA 与 ELISA 不一致的标本。

1.6 统计学方法 应用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析,对 TRFIA 和 ELISA 两种方法进行一致性检验,计算 Kappa 值。

2 结果

2.1 TRFIA 和 ELISA 的灵敏度比较 利用 TRFIA 法测定 20 孔零点标准品的荧光强度,零标准点荧光强度均值加 2 倍标准差 (s) 后的荧光强度在标准曲线上得到的相应值为其最小测定值,为 0.1 ng/ml。利用 ELISA 法测定 20 孔零点标准品的吸光度,零标准点吸光度均值加 2 倍标准差 (s) 后的吸光度在标准曲线上得到的相应值为其最小测定值,为 2.5 ng/ml。

2.2 TRFIA 和 ELISA 的特异度比较 利用 TRFIA 和 ELISA 两种方法分别检测 30 例正常体检者血清 (HBV 血清标志物均阴性) 的 HBV-LP 的含量,结果均为阴性,二者 HBV-LP 检测的特异度均为 100% (30/30)。

2.3 TRFIA 和 ELISA 测定 HBV-LP 的一致性 对 ELISA 阴性组和阳性组的标本进行 TRFIA 方法的检测,结果见表 1, Kappa = 0. 83。在 ELISA 阳性组有 1 例 TRFIA 阴性,在 ELISA 阴性组有 11 例 TRFIA 阳性,利用 PCR 进行验证得出,在 ELISA 阴性组有 10 例 HBV DNA >10³ 拷贝数,其他阴性。

表 1 TRFIA 和 ELISA 测定 HBV-LP 的一致性

ELISA	TRFIA		总计
	+	-	
+	69	1	70
-	11	59	70
总计	80	60	140

注:Kappa = 0. 83

2.4 TRFIA 和 ELISA 检测 HBV-LP 的线性范围 在 90 例乙型肝炎患者血清中选择 HBV-LP 浓度 (10 252 ng/ml) 较高的 1 例乙型肝炎患者血清标本倍比稀释至 0. 625 ng/ml,用 TRFIA 试剂与 ELISA 试剂盒同时进行 HBV-LP 的检测,结果见图 1。TRFIA 试剂检测 HBV-LP 的线性范围在 0. 625 ~ 10 252 ng/ml 之间, ELISA 试剂检测的线性范围在 5 ~ 1 281. 6 ng/ml, TRFIA 在高值和低值分别比 ELISA 高出 8 倍的检测范围。

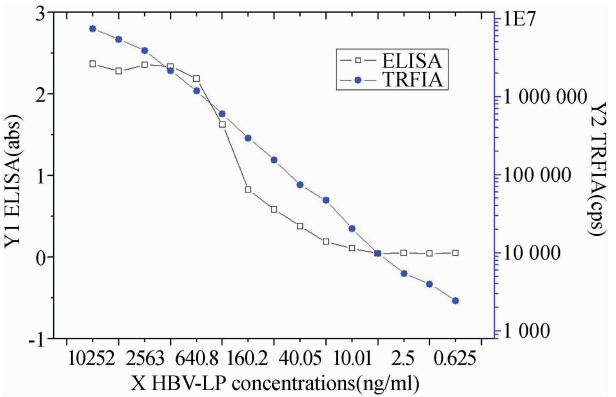


图 1 TRFIA 和 ELISA 检测 HBV-LP 的线性范围

2.5 TRFIA 和 ELISA 批内和批间精密度比较 TRFIA 检测 HBV-LP 高、中、低 3 个不同浓度水平的批内 CV (n = 20) 分别为 4. 30%、6. 41%、7. 58% ($\bar{x}$ = 6. 10%), ELISA 检测的批内 CV (n = 20) 分别为 8. 29%、8. 58%、10. 06% ($\bar{x}$ = 8. 98%), 见表 2。TRFIA 检测 HBV-LP 高、中、低 3 个浓度的批间 CV (n = 8) 分别为 5. 06%、7. 15%、8. 53% ($\bar{x}$ = 6. 91%), ELISA 检测的批间 CV (n = 8) 分别为 9. 38%、10. 04%、11. 93%

($\bar{x}$ = 10. 45%)。见表 3。

表 2 TRFIA 和 ELISA 批内精密度比较 (n = 20)

组 别	TRFIA			ELISA		
	浓度 (ng/ml)	SD	CV (%)	浓度 (ng/ml)	SD	CV (%)
高浓度组	363. 3	15. 63	4. 30	358. 1	29. 68	8. 29
中浓度组	55. 7	3. 57	6. 41	54. 2	4. 65	8. 58
低浓度组	16. 5	1. 25	7. 58	16. 7	1. 68	10. 06

表 3 TRFIA 和 ELISA 批间精密度比较 (n = 8)

组 别	TRFIA			ELISA		
	浓度 (ng/ml)	SD	CV (%)	浓度 (ng/ml)	SD	CV (%)
高浓度组	363. 9	18. 41	5. 06	360. 2	33. 78	9. 38
中浓度组	55. 1	3. 94	7. 15	54. 9	5. 51	10. 04
低浓度组	16. 3	1. 39	8. 53	16. 1	1. 92	11. 93

2.6 TRFIA 和 ELISA 的相关性 以 TRFIA 和 ELISA 两种方法分别检测 90 例乙型肝炎患者血清中 HBV-LP 浓度,以 ELISA 法测得浓度为 x 轴,以 TRFIA 法测得浓度为 y 轴进行比较,相关系数 r = 0. 916,回归方程为 $y = 1. 6742x - 15. 394$ 。见图 2。

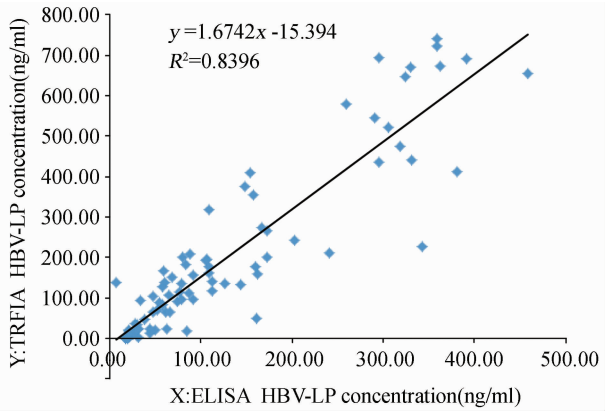


图 2 TRFIA 和 ELISA 的相关性

2.7 TRFIA 和 ELISA 试剂盒的稳定性比较 取 3 组 TRFIA 试剂盒置 4 ℃ 保存 7 d 后,测得平均荧光强度为 360 689 计数/s,37 ℃ 水浴 7 d 后,测得平均荧光强度为 335 996 计数/s,37 ℃ 与 4 ℃ 相比,抗原抗体结合的平均下降率为 6. 61%;取 3 组 ELISA 试剂盒置 4 ℃ 保存 7 d 后,测得平均的吸光度值为 2. 70,37 ℃ 水浴 7 d 后,测得平均吸光度值为 2. 06, 37 ℃ 与 4 ℃ 相比,抗原抗体结合的平均下降率为 23. 59%。见表 4。

表 4 TRFIA 和 ELISA 试剂盒的稳定性比较

组 别	TRFIA			ELISA		
	4 ℃ 保存 7 d (荧光强度)	37 ℃ 水浴 7 d (荧光强度)	抗原抗体结合的下降率 (%)	4 ℃ 保存 7 d (吸光度)	37 ℃ 水浴 7 d (吸光度)	抗原抗体结合的下降率 (%)
1 组	265423	251324	5.31	2.58	1.84	28.68
2 组	365123	341521	6.46	2.67	2.12	20.60
3 组	451521	415142	8.06	2.84	2.23	21.48
平均值	360689	335996	6.61	2.70	2.06	23.59

3 讨论

3.1 HBV-LP 由 PreS1、PreS2 和 S 结构域组成的双重跨膜拓扑结构,是 HBV-LP 发挥多种生物学功能作用的依赖性结构^[5]。HBV-LP 在肝细胞内作为受体蛋白对 HBV 复制过程具有反式激活的作用,由肝细胞内释放参与构成病毒外膜,与血清 HBV DNA 拷贝数具有良好的相关性,能反映患者机体内乙肝病毒复制情况^[3,5]。本研究用 TRFIA 分别检测 ELISA 阴性组和 ELISA 阳性组标本中的 HBV-LP 的浓度,并进行比较分析。二者具有高度的相关性($r=0.916$),Kappa 值为 0.83,表明两种方法具有高度的一致性。对不一致的 12 例标本利用 PCR 方法进行验证,其中 ELISA 阳性组,TRFIA 阴性的 1 例标本进行 PCR 检测,结果 HBV DNA $<10^3$ 拷贝数;在 ELISA 阴性组,11 例 TRFIA 阳性标本进行 PCR 检测 HBV DNA,有 10 例 $>10^3$ 拷贝数,说明 PCR 结果与 TRFIA 的结果更接近,从而证明 TRFIA 的结果更可靠,具有更高的特异度和灵敏度。

3.2 从 TRFIA 和 ELISA 的检测线性范围可以看出,5 ng/ml 和 1 281.6 ng/ml 两个浓度值分别是 ELISA 最低和最高的检测限。而 TRFIA 有更宽的检测范围,其最低和最高的检测限为 0.625 ng/ml 和 10 252 ng/ml,分别比 ELISA 高出 8 倍的检测浓度,累计高达 16 倍,也说明了 TRFIA 比 ELISA 有更高的灵敏度。利用 TRFIA 检测 HBV-LP 可以提高阳性率,降低假阴性率。对于一些极低浓度的 HBV-LP,ELISA 无法检测,而低浓度的 HBV-LP 也是反映乙肝病毒复制的指标^[6]。利用 TRFIA 即可检测到 HBV-LP,从而为临床医生判断病情及指导用药提供依据。

3.3 此外,TRFIA 的精密度更高于 ELISA,这与巢浩界等^[7]利用 TRFIA 和 ELISA 对乙肝病毒标志物的研究是一致的。对二者的试剂盒稳定性比较中,

TRFIA 试剂盒 37 ℃ 与 4 ℃ 相比,抗原抗体结合的平均下降率为 6.61%,而 ELISA 试剂盒 7 ℃ 与 4 ℃ 相比,抗原抗体结合的平均下降率为 23.59%,可见 TRFIA 试剂盒的稳定性更好,说明 TRFIA 凭借其更高的精密度和更好的稳定性测定的结果准确度更高,更可靠。

3.4 HBV-LP 检测反映病毒复制情况,对于临床判断慢性乙肝患者的感染、病毒复制和预后有重要意义,对于低浓度的 HBV-LP,一般 ELISA 检测为阴性,而高灵敏度的 TRFIA 则能精确定量 HBV-LP 的浓度,为临床及时有效的诊断治疗疾病提供了可靠的依据。此外,TRFIA 自动化程度较 ELISA 更高,减少了工作中存在的系统误差和随机误差,提高了结果的准确度。因此,TRFIA 定量检测 HBV-LP 正逐步成为现代检测乙型肝炎免疫学指标新的发展方向。

参考文献

1 王 贺,邢智远,孙风波,等.替诺福韦与恩替卡韦对高病毒载量 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者的疗效比较[J].中国临床新医学,2016,9(10):882-884.

2 谢服役,孙 琦,陈 巍.乙型肝炎病毒大蛋白在乙肝患者诊疗中的临床意义[J].中华实验和临床病毒学杂志,2013,27(4):280-282.

3 贺超奇,覃江凤,梁友芳,等.血清乙型肝炎病毒包膜大蛋白检测与病毒复制的相关性研究[J].中华实验和临床病毒学杂志,2015,29(1):23-25.

4 樊 燕,王永忠,郑国军,等.乙型肝炎病毒 E 抗原、大蛋白与乙肝病毒 DNA 的关系[J].山东医药,2015,55(1):41-42.

5 陈翔宇.乙肝血清学检测研究进展[J].医学理论与实践,2015,28:2450-2452.

6 Bruss V. Hepatitis B virus morphogenesis[J]. World J Gastroenterol,2007,13(1):65-73.

7 巢浩界,张 铭.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[J].实用检验医师杂志,2016,8(4):209-211.

[收稿日期 2017-10-11][本文编辑 吕文娟]