

酶联免疫吸附法检测静注人免疫球蛋白中乙型肝炎病毒表面抗体含量的不确定度评定

雷菲菲¹, 黄邦连², 王思琪¹, 张景仪^{1*}

(1. 云南省食品药品监督检验研究院工业和信息化部产业技术基础公共服务平台, 昆明 650000;

2. 大理大学药学院, 大理 671000)

摘要: **目的** 探讨酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)定量测定乙型肝炎病毒表面抗体(hepatitis B virus surface antibody, 抗-HBs)的不确定度评定方法。**方法** 采用 ELISA 法, 根据试验过程分析不确定度的来源, 分别计算不确定度分量, 合成各分量不确定度, 得到扩展不确定度。**结果** 经分析计算, 不确定度主要来源于标准曲线拟合、样品稀释、加样及孵育过程。当取置信概率为 95%, 包含因子 $k=2$ 时, 静注人免疫球蛋白中抗-HBs 含量为 1.05 IU/mL, 扩展不确定度为 0.15 IU/mL。**结论** 本研究首次对静注人免疫球蛋白中抗-HBs 的不确定度分量展开分析与评定, 分析影响因素来源, 或可为实验室开展血液制品质量控制工作提供参考依据。

关键词: 酶联免疫吸附法; 静注人免疫球蛋白; 乙型肝炎病毒表面抗体; 不确定度

0 引言

静注人免疫球蛋白是由健康人血浆经低温乙醇蛋白分离法或经批准的其他分离法分离纯化, 去除抗补体活性并经病毒去除和灭活处理制成^[1], 临床用于治疗原发性免疫球蛋白缺乏症、自身免疫病、重症感染等。乙型肝炎病毒表面抗体(hepatitis B virus surface antibody, 抗-HBs)作为保护性抗体, 浓度 ≥ 10 mIU/mL 提示具备免疫力, 是机体对乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染产生免疫的重要指标^[2-3], 同时也是静注人免疫球蛋白安全性检测的核心项目之一。酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)是检测感染性疾病抗原/抗体最常用的方法之一, 因具备高特异性、高准确度而被广泛应用于抗-HBs 的定量检测^[4]。然而, 该方法操作步骤多, 标准曲线拟合、加样、孵育等操作均可能引入不确定度, 影响结果的可靠性。目前, 不确定度评定已广泛应用于药品、食品、化妆品、兽药、生物制品等多领域, 并适配于高效液相色谱法、气相色谱法、原子吸收分光光度法、电感耦合等离子体质谱法等主流分析技术^[5-10], 但血液制品中 ELISA 法检测抗-HBs 的研究仍较匮乏。本研究依据 JJF 1059.1—2012《测

量不确定度评定与表示》及 CNAS-GL006: 2019《化学分析中不确定度的评估指南》, 建立适用于该检测项目的不确定度评定程序, 系统分析关键影响因素并提出控制措施, 为血液制品实验室标准化质量控制提供理论依据, 助力检测方法优化与临床风险降低。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

抗-HBs 测定试剂盒(批号 RQ20240301B, 北京万泰生物药业股份有限公司); 静注人免疫球蛋白(批号 202310806B, 国药集团昆明血液制品有限公司)。

1.2 仪器与设备

SpectraMax M5 型多功能酶免分析仪(美国 MOLECULAR DEVICES 公司); IN812C 型生化培养箱(日本雅马拓公司)。

1.3 方法

按试剂盒说明书操作, 每块板设校准品 10、20、40、80、160 IU/L 5 个质量浓度并设复孔及空白对照孔。待测

基金项目: 云南省食品药品监督检验研究院青年科研课题项目(2024-KYYJ-006)

第一作者: 雷菲菲, 硕士, 主管药师, 主要研究方向为生物制品检验检测与质量控制。E-mail: 1748623818@qq.com

*通信作者: 张景仪, 硕士, 主管药师, 主要研究方向为质量控制。E-mail: 1030615994@qq.com

样品应稀释至校准曲线范围内, 分别在相应孔中加入待测样品及校准品各 50 μL 。每孔加入酶标试剂 50 μL , (37 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min。取出酶标板后, 弃掉孔中液体, 向每孔中加入 300 μL 洗涤液, 轻微晃动 30 s 后弃掉, 重复上述洗涤过程 5 次。每孔加入显色剂 100 μL , (37 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min。每孔加 50 μL 终止液终止反应。10 min 内于 450 nm/630 nm 波长下测量光密度(optical density, OD)值并记录结果。

1.4 数据处理

以校准品的抗体含量对其相应的吸光度做双对数曲线, 求出线性回归方程, 将待测样品吸光度的对数值代入回归方程, 求得相应抗体含量。

样品中抗-HBs 的含量计算见公式(1):

$$E = \text{EXP} \left\{ \left(\frac{\text{INA} - B_0}{B_1} \right) \right\} \times d \times \frac{1}{1000} \quad (1)$$

式中: E 为抗-HBs 含量, IU/mL; A 为酶标仪测定吸光度; INA 表示酶标仪测定吸光度的自然对数值; B_0 为标准曲线的截距; B_1 为标准曲线的斜率; d 为待测样品的稀释系数。

2 结果与分析

2.1 不确定度的来源分析

本研究中, 标准曲线拟合、加样、孵育、显色、洗板及仪器读数等操作均可能引入不确定度, 由试验过程分析 ELISA 法测定抗-HBs 的不确定度的主要来源有: (1)校准曲线拟合引入的不确定度; (2)样品测量重复性引入的不确定度; (3)样品稀释及加样过程引入的不确定度; (4)酶标仪测量引入的不确定度; (5)孵育时间引入的不确定度; (6)孵育温度引入的不确定度。

表 1 系列校准溶液吸光度值

校准品抗体含量 (IU/L)	校准品抗体含量 LN	校准曲线吸光度 1	校准曲线吸光度 1 LN	校准曲线吸光度 2	校准曲线吸光度 2 LN
10	2.303	0.1473	-1.9152840	0.1584	-1.8426318
20	2.996	0.3504	-1.0486799	0.3747	-0.9816296
40	3.689	0.7903	-0.2353427	0.7624	-0.2712839
80	4.382	1.4200	0.3506569	1.4276	0.3559947
160	5.075	2.6811	0.9862272	2.7211	1.0010362

2.2.2 样品测量重复性引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(R)$

对样品进行 6 次检测, 计算样品的 OD 值均值自然对数, 分别代入标准曲线方程中, 按数学模型计算相应浓度, 即为样品中抗-HBs 含量。样品含量分别为 1.0146、1.0702、1.0835、1.0380、1.0597、1.0345 IU/mL, 平均值为 1.0501 IU/mL。

2.2 不确定度分量评定

2.2.1 校准曲线拟合引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(\text{st})$

抗-HBs 系列校准溶液有 10、20、40、80、160 IU/L 5 个质量浓度, 每个浓度测定 2 次, 以校准品抗体含量自然对数(logarithm value, LN)值为横坐标(X), 以其对应的 OD 值 LN 值为纵坐标(Y), 建立线性回归方程, 得到线性回归方程 $Y=1.0260X-4.1447$, 相关系数为 0.9972, 计算结果见表 1。样品检验结果均为独立 6 次测量的均值, 按公式(1)计算静注人免疫蛋白抗-HBs 含量为 $E_0=1.0501$ IU/mL。则由校准曲线拟合引入的标准不确定度 $u(\text{st})$ 为公式(2)。

$$u(\text{st}) = \frac{S}{B_1} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{S_{xx}}} = 4.7586 \times 10^{-2} \quad (2)$$

式中, 残差标准偏差 S 为公式(3):

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [y_i - \hat{y}]^2}{n-2}} = 8.8613 \times 10^{-2} \quad (3)$$

校准曲线浓度差的平方和 S_{xx} 为公式(4):

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 = 4.8045 \quad (4)$$

式中: x_0 为指被测量的浓度; \bar{x} 为不同工作曲线溶液浓度的平均值(n 次测试); i 为下标, 指获得工作曲线的测量次数; n 为工作曲线的校准点测量次数, 工作曲线有 5 个校准点, 每点测 2 次, 则 $n=10$; P 为被测样品的测量次数, 样品重复测量 6 次, $P=6$ 。

由校准曲线拟合引入的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(\text{st})$ 为公式(5):

$$u_{\text{rel}}(\text{st}) = \frac{u(\text{st})}{E_0} = 4.5316 \times 10^{-2} \quad (5)$$

单次测量的标准偏差为公式(6):

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (E_i - \bar{E})^2}{n-1}} = 2.5541 \times 10^{-2} \quad (6)$$

式中: n 为样品测量次数, $n=6$; E_i 为每次测得的抗-HBs 含量, IU/mL; \bar{E} 为 6 次测量抗-HBs 含量的平均值, IU/mL。

由测量重复性引入的标准不确定度 $u(R)$ 为公式(7):

$$u(R) = \frac{S}{\sqrt{n}} = 1.4746 \times 10^{-2} \quad (7)$$

则由测量重复性引入的相对标准不确定度为公式(8):

$$u_{\text{rel}}(R) = \frac{u(R)}{E_0} = 1.4042 \times 10^{-2} \quad (8)$$

2.2.3 样品稀释及加样过程引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(V)$

配制过程使用计量检定合格的移液器, 其不确定度主要来源于容量允许误差和环境温度, 移液器使用的次数见表 2, 可调移液器的容量允差查 JJG 646—2006《移液器检定规程》可得到, 100 μL 移液器检定点在 50 μL 时, 引入的不确定度为 $u_{\text{rel}}(V_1)$; 容量为 100 μL 时, 引入的不确定度为 $u_{\text{rel}}(V_2)$; 200 μL 移液器检定点在 200 μL 时, 引入的不确定度为 $u_{\text{rel}}(V_3)$; 1000 μL 移液器在检定点 1000 μL 时引入的不确定度为 $u_{\text{rel}}(V_4)$; 按均匀分布 $k = \sqrt{3}$, 可调移液器容量允差引入的相对标准不确定度按公式(9)计算:

$$u_{\text{rel}}(V) \sqrt{u_{\text{rel}}(V_1)^2 + u_{\text{rel}}(V_2)^2 + u_{\text{rel}}(V_3)^2 + 3 \times u_{\text{rel}}(V_4)^2} = 3.4642 \times 10^{-2} \quad (12)$$

表 2 移液器的相对标准不确定度

编号	移液器/ μL	使用次数	使用容量/ μL	容量允差/%	体积膨胀系数/ $^{\circ}\text{C}^{-1}$	$u_{\text{rel}}(V_m)$	$u_{\text{rel}}(V_T)$	$u_{\text{rel}}(V_i)$
1	100	4	50	± 3.0	2.08×10^{-4}	1.7321×10^{-2}	2.4018×10^{-4}	3.464×10^{-2}
2		1	100	± 2.0	2.08×10^{-4}	1.1547×10^{-2}	2.4018×10^{-4}	1.155×10^{-2}
3	200	1	200	± 1.5	2.08×10^{-4}	8.6600×10^{-3}	2.4018×10^{-4}	8.664×10^{-3}
4	1000	3	900/600/400	± 1.0	2.08×10^{-4}	5.7740×10^{-3}	2.4018×10^{-4}	5.779×10^{-3}

2.2.4 酶标仪测定吸光度引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(M)$

由省计量测试技术研究院检定 SpectraMax M5 型多功能酶免分析仪并提供吸光度示值误差的测量结果相对扩展不确定度 $U = 3 \times 10^{-3}$, $k = 2$ 。则酶免分析仪引入的相对标准不确定度为公式(13):

$$u_{\text{rel}}(M) = \frac{U}{k} = 1.5000 \times 10^{-3} \quad (13)$$

2.2.5 孵育时间引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(t)$

ELISA 试验中, 孵育时间分别为 (60 \pm 1) min 和 (15 \pm 1) min, 按均匀分布 $k = \sqrt{3}$, 孵育一次时, 由孵育时间引入的相对标准不确定度按公式(14)计算:

$$u_{\text{rel}}(t) = \frac{a_t}{k \times t} \quad (14)$$

式中: a_t 为孵育时间引起的时间偏差。

则由孵育时间引入的相对标准不确定度为公式(15):

$$u_{\text{rel}}(E) = \sqrt{u_{\text{rel}}(\text{st})^2 + u_{\text{rel}}(R)^2 + u_{\text{rel}}(V)^2 + u_{\text{rel}}(M)^2 + u_{\text{rel}}(t)^2 + u_{\text{rel}}(T)^2} = 7.1068 \times 10^{-2} \quad (18)$$

取置信概率为 95%, 包含因子 $k = 2$, 求得扩展不确定度为 $U = E_0 \times u_{\text{rel}} \times k = 1.0501 \times 7.1068 \times 10^{-2} \times 2 = 0.14926$, 用酶联免疫吸附法测定静注人免疫球蛋白中抗-HBs 含量, 检测结果表示为 (1.05 \pm 0.15) IU/mL, $k = 2$ 。

$$u_{\text{rel}}(V_m) = \frac{a_v}{k \times v} \quad (9)$$

式中: a_v 为量具校准引起的体积偏差。

移液器校准温度为 20 $^{\circ}\text{C}$, 水的体积膨胀系数为 $2.08 \times 10^{-4} / ^{\circ}\text{C}$ (20 $^{\circ}\text{C}$), 试验温度波动为 (20 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$, 温度波动为矩形分布 $k = \sqrt{3}$, 由环境温度引起的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(V_T)$ 按照公式(10)计算:

$$u_{\text{rel}}(V_T) = \frac{\Delta T \times \beta}{k} \quad (10)$$

式中: ΔT 为试验温度波动值; β 为水的体积膨胀系数。

则由可调移液器容量允许误差和环境温度引起的合成不确定度按公式(11)计算:

$$u_{\text{rel}}(V_i) = \sqrt{u_{\text{rel}}(V_m)^2 + u_{\text{rel}}(V_T)^2} \quad (11)$$

可调移液器的相对不确定度分量计算结果见表 2, 样品稀释过程引入的相对标准不确定度为公式(12):

$$u_{\text{rel}}(t) = \sqrt{u_{\text{rel}}(t_1)^2 + u_{\text{rel}}(t_2)^2} = 3.9675 \times 10^{-2} \quad (15)$$

2.2.6 孵育温度引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(T)$

由中检西南计量有限公司检定雅马拓生化培养箱并提供 37 $^{\circ}\text{C}$ 时温度波动为 ± 0.22 $^{\circ}\text{C}$, ELISA 试验共需孵育 2 次, 按均匀分布 $k = \sqrt{3}$, 孵育一次时, 由孵育温度引入的相对标准不确定度按公式(16)计算:

$$u_{\text{rel}}(T_1) = \frac{a_T}{k \times T} \quad (16)$$

式中: a_T 为孵育温度引起的温度偏差。

则由孵育温度引入的相对标准不确定度为公式(17):

$$u_{\text{rel}}(T) = \sqrt{2 \times u_{\text{rel}}(T_1)^2} = 4.8548 \times 10^{-3} \quad (17)$$

2.2.7 合成不确定度 $u_{\text{rel}}(E)$

将各个不确定度分量进行合成, 得到相对标准不确定度为公式(18):

3 讨论与结论

本研究发现, 标准曲线、样品稀释及移液器操作误差、孵育时间偏差与重复性是影响测定结果不确定度的主

要因素,这与同类药品检测中不确定度主要来源于样品处理、标准物质制备及测量重复性的研究结论一致^[11-14]。例如,活化部分凝血活酶时间法测定注射用重组人凝血因子VIII含量的不确定度主要源于供试品溶液配制与标准曲线制备,测定静注人免疫球蛋白中免疫球蛋白A残留量时样品测定体积与标准曲线稀释为主要贡献因素,提示样品处理与标准曲线相关环节是不确定度控制的共性重点。针对本研究识别的关键因素,实际检测中可通过选用计量检定合格的移液器、严格执行标准化操作流程减少移液误差;借助高精度定时装置精准控制孵育时间,保障试验条件一致性;适当增加平行试验次数,以统计方法降低随机误差。尽管本研究取得一定进展,但血液制品检测领域的不确定度评定在多方法联用的不确定度评定、评定方法标准化等方面仍存在不足。国际上已出现同位素稀释液相色谱-串联质谱法等新技术的不确定度研究^[15],为该领域的技术升级提供了方向。未来可聚焦多方法联用的不确定度评定、评定方法优化及标准统一,进一步完善血液制品质量评价体系。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(三部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2025.
- [2] 中华医学会学与实验诊断协作组. 乙型肝炎病毒标志物临床应用专家共识[J]. 中华肝脏病杂志, 2023, 31(4): 389-400.
- [3] 郝晓甜, 周海卫. 乙型肝炎病毒标志物的临床意义及研究进展[J]. 中国药事, 2024, 38(9): 1086-1092.
- [4] 丁福霖. 放射免疫法和酶联免疫法检测人血浆乙肝表面抗体含量比较[J]. 饮食科学, 2017(6): 56.
- [5] MILDE D, PLUHÁČEK T, KUBA M, *et al.* Measurement uncertainty evaluation from correlated validation data: Determination of elemental impurities in pharmaceutical products by ICP-MS [J]. *Talanta*, 2020(220): 121386.
- [6] 卢寿康, 胡凤霞, 叶惠仪, 等. 酶联免疫法测量动物尿液中莱克多巴胺含量的不确定度分析[J]. 畜牧业环境, 2021(10): 34-36.
- [7] 李莉, 王继双, 王海燕. 高效液相色谱法测定化妆品中补骨脂酚的不确定度评定[J]. 化学分析计量, 2024, 33(10): 114.
- [8] 梁瑞强, 刘彤彤, 罗娇依, 等. UPLC-MS 法测定肉制品中虾过敏原含量的不确定度评定[J]. 生物加工过程, 2024, 22(1): 89-98.
- [9] 刘炬, 张文华, 李洋, 等. 重组新型冠状病毒蛋白疫苗(CHO 细胞)效力检测的不确定度分析[J]. 解放军药学学报, 2025, 38(1): 62-68.
- [10] 陈承贵, 王晓冲, 江坤, 等. 气相色谱法测定人血白蛋白中辛酸钠含量的不确定度分析[J]. 中国药物评价, 2024, 41(6): 470-476.
- [11] 陈承贵, 庞赛, 江坤, 等. 静注人免疫球蛋白(pH 4)中 IgA 残留量的不确定度分析[J]. 中国药物评价, 2024, 41(4): 280-285.
- [12] 郑美玲, 李智明, 李丹凤. “自上而下”法评定人血白蛋白中铝残留量不确定度[J]. 中国输血杂志, 2023, 36(5): 420-423.
- [13] 张婷, 周长明, 沈琮, 等. 血浆源性人凝血因子VIII制品中钙含量原子吸收分光光度检测方法的建立及不确定度评价[J]. 中国生物制品学杂志, 2025, 38(5): 581-587.
- [14] 李爽, 肖婷婷, 曹春然. APTT 法测定注射用重组人凝血因子VIII中人凝血因子VIII含量的不确定度评定[J]. 中国医药导刊, 2025, 27(5): 528-532.
- [15] BEASLEY-GREEN A, HECKERT NA. Estimation of measurement uncertainty for the quantification of protein by ID-LC-MS/MS [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2023, 415(16): 3265-3274.