

• 质控与标规 •

应用 CLSI EP12-A2 文件评价 HBsAg 酶联免疫吸附 试验试剂盒的分析性能

韩弋戟, 郭明琴, 刘 梦, 侯 爵, 王 钊

(重庆市万盛经开区中心血库检验科, 重庆 400800)

摘要:目的 应用 CLSI EP12-A2 文件评价乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)的酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒的性能, 并比较 2 个不同厂家试剂盒之间的性能差异。方法 按照 CLSI 发布的 EP12-A2 文件, 对实验室使用的 2 个不同厂家的 HBsAg ELISA 试剂盒的性能进行评价。结果 2 个厂家的试剂盒对分析物浓度为 120% 临界值的标本的检测阳性率均大于或等于 95%, 对分析物浓度为 80% 临界值浓度的标本的检测阴性率大于或等于 95%, 批内变异系数小于或等于 15%, 批间变异系数小于或等于 20%。2 个厂家试剂盒的灵敏度分别为 94.2% (95% CI: 84.3%~98.0%) 和 92.3% (95% CI: 81.8%~97.0%); 特异性分别为 98.0% (95% CI: 89.5%~99.6%) 和 100.0% (95% CI: 92.8%~100.0%)。2 个厂家试剂盒灵敏度差值 95% 区间为 -5.46%~10.19%, 特异性差值 95% 区间为 -2.00%~5.32%。结论 2 个厂家试剂盒检测 HBsAg 临界值±20% 的浓度范围之外标本, 能够得到稳定、可靠的检测结果, 并具有较高的灵敏度和特异性, 两者的检测灵敏度和特异性相近。

关键词:乙型肝炎表面抗原; 性能评价; 酶联免疫吸附测定

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.12.043

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)12-1622-02

Analytical performance evaluation of HBsAg ELISA kit using CLSI EP12-A2 document

Han Yiji, Guo Mingqin, Liu Meng, Hou Jue, Wang Zhao

(Department of Clinical Laboratory, Central Blood Bank of Wansheng Economic and
Technological Development Zone, Chongqing 400899, China)

Abstract: Objective To evaluate the performance of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) reagent kit of hepatitis B surface antigen (HBsAg) with Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) document EP12-A2, and to compare two different manufacturer kits' performance. **Methods** According to CLSI document EP12-A2, to evaluate the performance of two different manufacturers' HBsAg ELISA kits. **Results** The positive rates both were $\geq 95\%$ by using the kits of two manufacturers to detect the same sample with 120% of the critical concentration. The negative rates were both $\geq 95\%$ by using the kits of two manufacturers to detect the same sample with 80% of the critical concentration. The intra assay coefficients of variation were $\leq 15\%$, and the interassay coefficients of variation were $\leq 20\%$. The sensitivities of two manufacturers' kits were respectively 94.2% (95% CI: 84.3%–98.0%) and 92.3% (95% CI: 81.8%–97.0%), and the specificities were 98.0% (95% CI: 89.5%–99.6%) and 100.0% (95% CI: 92.8%–100.0%). The 95% interval of sensitivity of two manufacturers' kits was 5.46%–10.19%, and which of specificity of two manufacturers' kits was -2.00%–5.32%. **Conclusion** The kits of two manufacturers can provide stable results of HBsAg detection with concentrations $\pm 20\%$ outside the critical concentrations at the cutoff point with high sensitivity and specificity. Both of the kits have no significant differences in sensitivity and specificity.

Key words: hepatitis B surface antigen; performance evaluation; enzyme-linked immunosorbent assay

酶联免疫吸附测定(ELISA)是目前各级采供血机构筛查乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)的主要方法。《献血者健康检查要求》(GB18467)规定,献血者血液检测必须使用不同厂家生产的试剂进行初、复检 2 次检测^[1]。而《医学实验室质量和能力认可准则在临床免疫检验领域的指南》则明确指出,实验室同时使用 2 套检测系统检测同一项目时,必须保证两者结果具有一致性^[2]。因此,本研究参照美国临床实验室标准化协会(CLSI)发布的 EP12-A2 文件^[3]对 2 个不同厂家生产的 HBsAg ELISA 试剂盒检测 HBsAg 的分析性能进行评价,为本实验室选择合适的 ELISA 试剂盒提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 由北京康彻思坦生物技术有限公司提供的 HBsAg 定值血清,浓度为 1 IU/mL,批号为 201202004;本区人民医院住院确诊慢性乙型肝炎患者血清标本 52 例,门诊健康体检者的 HBV 阴性标本 50 例;自制阴性混合血清(由 5 例 HBV 阴性标本血清混合,分装后-20℃冰冻保存,勿反复冻融),自制阳性混合血清(由 5 例慢性乙肝患者血清标本混

合,用阴性混合血清调整至 S/CO 值与 120% 临界值浓度的 S/CO 值相当浓度,分装后-20℃冰冻保存,勿反复冻融)。

1.2 仪器与试剂 仪器:加样器(芬兰雷勃)、MK3 酶标仪(美国热电)、洗板机(深圳迈瑞),所有仪器均经过校准。试剂:国产 A、B 两个厂家生产的 HBsAg ELISA 试剂盒,批号分别是 B20110814、2011095127。

1.3 方法

1.3.1 重复性试验 (1)临界值浓度确定:用 1 IU/mL 定值血清进行倍比稀释后,用 2 种试剂盒重复检测各稀释血清直至阴性率和阳性率各占 50% 的质控血清浓度即为临界值浓度。最后计算出 120%、80% 临界值浓度的稀释倍数。(2)批内精密密度:选择临界值浓度及临界值±20% 浓度范围的 HBsAg 阴性和阳性质控血清各 1 份进行试验,用 2 种试剂盒分别测定,每份样本测 20 次,分别记录结果,计算阴阳性百分率以及 S/CO 值的均值、标准差和变异系数。(3)批间精密密度:用 2 种试剂盒分别对阴性、阳性混合标本各 1 例,连续测定 20 d,每一浓度每天测 1 次,每次测 2 例,取 S/CO 平均值。记录结果并计

算 S/CO 值的均值、标准差及变异系数(CV)。

1.3.2 方法学性能比较 收集经临床确认的急、慢性乙型肝炎患者血清标本 52 例、健康体检者 HBV 阴性标本 50 例。用 2 种试剂盒同时检测,按常规检测方法在 10 d 内完成。每次实验质控品重复检测 2 次,总共检测 20 次。如果任一质控品失控,应立即停止该次实验,患者标本的实验数据视为无效,在当天或第 2 天重新进行新一轮实验。10 d 内不超过 1 次失控。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计学软件进行 χ^2 检验

表 1 批内检测精密度结果(n=20)

S/CO 值	A 试剂盒			B 试剂盒		
	120%临界值浓度	临界值浓度	80%临界值浓度	120%临界值浓度	临界值浓度	80%临界值浓度
$\bar{x}$	1.671	1.036	0.763	1.727	0.985	0.805
s	0.154	0.110	0.083	0.194	0.098	0.081
CV(%)	9.21	10.65	10.94	11.22	9.95	10.06

2.1.2 批间精密度 A 试剂盒阴、阳性标本的 S/CO 平均值分别为 0.425 和 1.964,CV 分别为 18.25%和 16.55%;B 试剂盒阴、阳性标本的 S/CO 平均值分别为 0.507 和 1.522,CV 分别为 15.36%和 17.54%。

2.2 2 个厂家试剂盒对 102 份临床标本的检测结果 2 个厂家试剂盒的灵敏度分别为 94.2%和 92.3%;特异性分别为 98.0%和 100.0%;灵敏度 95%CI 分别为 84.3%~98.0%和 81.8%~97.0%;特异性 95%CI 分别为 89.5%~99.6%和 92.8%~100.0%。2 个厂家试剂盒灵敏度差值 95%区间为-5.46%~10.19%;特异性差值 95%区间为-2.00%~5.32%。

3 讨 论

临界值浓度是 ELISA 定性试验唯一的医学决定水平。临界值浓度标本具有多次重复检测出现阴、阳性概率各占 50%的特点,并且在临界值浓度范围 95%区间(重复测定临界值浓度上下的标本,阴性率、阳性率分别为 95%的浓度范围称为该检测方法临界值 95%区间)的标本都不易得到稳定的检测结果^[4]。而大大超过医学决定值水平的阴、阳性标本的结果却较为稳定^[5]。因此,血站对献血者血液进行 ELISA 测定时,如果检测物浓度在临界值浓度附近,则会出现相同试剂多次检测同一标本结果不一致的现象。本研究结果显示,A、B 厂家的试剂盒临界值浓度分别为 0.113 IU/mL 和 0.157 IU/mL,±20%临界值浓度的标本检测结果阳性率和阴性率均大于 95%。且 2 个厂家的试剂盒批内 CV 均小于 15%;批间 CV 小于 20%,二者精密度比较差异无统计学意义(P>0.05),符合文献对定性 ELISA 法的要求^[6-8],说明 2 个厂家的试剂盒检测±20%临界值浓度范围之外的标本都能得到稳定的检测结果。

本研究通过对已经明确诊断的 102 例临床标本进行检测,结果显示,2 个厂家的试剂盒均具有较高的灵敏度和特异性。但通常情况下要获得具有典型代表性的样品比较困难。因此,计算灵敏度和特异性就很不现实,而计算灵敏度和特异性的可信区间就显得非常有意义。此外,如果对 2 种试剂盒进行性能比较时,通过对灵敏度以及特异性差异的可信区间进行比较就更有意义,并以此来推断 2 种检测方法的灵敏度和特异性在统计学上是否具有差异^[9]。如果灵敏度或特异性差值的可信区间包括零,则不能推断出 2 种检测方法的灵敏度或特异性在统计学上有差异;但是如果灵敏度或特异性差值的可信区间不包括零,则由此可以推测出 2 种检测方法的灵敏度或特异性在统计学上有差异。研究结果显示,2 个厂家的试剂盒灵敏度差值可信区间都包括零。因此,不能推断出 2 个厂家的试剂盒的灵敏度和特异性在统计学上有差异。

和 U 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 重复性试验比较

2.1.1 批内精密度 A 试剂盒的临界值浓度为 0.113 IU/mL,120%临界值浓度标本的阳性率为 100.0%,80%临界值浓度标本的阴性率为 95.0%;B 试剂盒的临界值浓度为 0.157 IU/mL,120%临界值浓度标本的阳性率为 100.0%,80%临界值浓度标本的阴性率为 100.0%,见表 1。

在进行方法评价过程中,随机取样带来的误差会对估计性能力的测定带来影响^[10]。但是这种变异性随样本量的增加而减少,并可以通过可信限来量化。EP12-A2 文件采用了 Agrestu 等^[11]和 Altman 等^[12]提出的一种直接计算可信区间评分计算方法。它克服了多数教科书采用的近似二项分布法相对保守、可信区间范围太宽等缺点。从本研究结果看,2 个试剂盒 95%一致性评分可信区间为 93.1%~99.5%。

此外,由于 CLSI 发布的 EP12-A2 文件提供的方法能够获得试剂盒获得稳定结果的浓度范围,从而也为 ELISA 定性试验灰区的设定提供了有力的证据。

参考文献

[1] 孙连明. 献血者健康检查相关标准和规程的理解与实施要点[J]. 中国输血杂志,2012,25(7):710-714.

[2] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL39 医学实验室质量和能力认可准则在临床免疫检验领域的指南[S]. 北京:中国合格评定国家认可委员会,2012.

[3] CLSI. EP12-A User Protocol for evaluation of qualitative test performance; Approved guideline[S]. Wayne,PA:CLSI,2002.

[4] 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,2008:296-312.

[5] 陈桂山,张秀明,熊继红,等. 未知诊断定性试验分析性能评价方法探讨[J]. 检验医学,2010,25(12):978-981.

[6] 孟凡云,丁玉娟,王夕刚.《血站技术操作规程》(2012 版)研读[J]. 中国医药指南,2013,11(9):397-398.

[7] 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,2010:333-347.

[8] 周静宇. 血站用部分国产 ELISA 试剂批内和批间变异[J]. 临床输血与检验,2011,13(1):53-55.

[9] 张建平,王治国. 介绍一种诊断明确时定性检测方法的性能评估方案[J]. 检验医学,2008,23(1):76-78.

[10] Aakvaag A,Leskinen E,Lindstedt G,et al. Guidelines for description of immunoassay kits[J]. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation,1990,50(1):95-98.

[11] Agresti A,Coull BA. Approximate is better than “exact” for interval estimation of binomial proportions[J]. Am Statist,1998,52(2):119-126.

[12] Altman DG,Machin D,Bryant TN,et al. Statistics with confidence: confidence intervals and statistical guidelines [M]. London: BMJ Books,2000:210-215.