

• 论 著 •

酶联免疫吸附试验检测乙型肝炎 5 项性能评价的改进与优化^{*}

史 静,张 亚,邹 麟,陈 瀑,张莉萍
(重庆医科大学第一附属医院检验科,重庆 400016)

摘 要:**目的** 验证乙型肝炎(简称乙肝)5 项酶联免疫吸附试验(ELISA)定性检测的分析性能,改进和优化试验方案,为实验室选用合适的方法和试剂提供依据。**方法** 通过梯度稀释定值样品测定检出限;依据美国临床实验室标准化协会(CLSI)EP12-A2 文件进行临界值验证;选取临界值样品评价分析精密度(包括重复性和中间精密度);通过与室间质评检测结果及雅培 i4000SR 化学发光仪比对评估符合率。**结果** 乙肝表面抗原(HBsAg)、乙肝表面抗体(HBsAb)、乙肝 e 抗原(HBeAg)、乙肝 e 抗体(HBeAb)及乙肝核心抗体(HBcAb)的最低检出限分别为:0.2 IU/mL、20 mIU /mL、1 NCU/mL、0.75 NCU/mL、0.05 NCU/mL。临界值(C_{50})±20% 的浓度范围包含了多次重复试验阳性率 5%~95% 的浓度点区间。批内变异系数(CV)≤15%,夹心法批间 CV≤25%,竞争法批间 CV≤35%。准确度及与雅培 i4000SR 比对的阴、阳性符合率均大于或等于 95%,其一致性检验 $\kappa \geq 0.75$ 。**结论** 本实验室乙肝 5 项 ELISA 检测方法性能符合检测分析要求,检测质量可满足临床需求。

关键词:乙型肝炎标志物; 酶联免疫吸附试验; 性能验证
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.23.003 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2015)23-3369-03

Improvement and optimization of performance verification on enzyme linked immunosorbent assay for determination of hepatitis B markers^{*}
Shi Jing, Zhang Ya, Zou Lin, Chen Pu, Zhang Liping
(Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract:**Objective** To evaluate the performance of enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) kit in detection of Hepatitis B virus(HBV) markers by using improved and optimized method,so as to provide a practical and feasible method and reagents for clinical laboratory.**Methods** ELISA test was used for the detection of HBV markers. The gradient dilution method was used to evaluate the lower limit. The verification of cut off value was carried out based on clinical and laboratory standards institute(CLSI)EP12-A2 document. Samples with cut off values were collected to evaluate the precision,including repeatability and intermediate precision. The coincidence rates were counted through comparing the results of ELISA with those of external quality assessment and those detected by using Abbott i4000SR chemiluminescence instrument.**Results** The lower detection limit of HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb and HBcAb were 0.2 IU/mL, 20 mIU/mL, 1 NCU/mL, 0.75 NCU/mL and 0.05 NCU/mL respectively. The cut-off value(C_{50})±20% concentration included the concentration range between C_5 and C_{95} . The within-run coefficient of variation (CV)≤15%,in sandwich method the between-run CV≤25%,in competition method the between-run CV≤35%. The positive and negative coincidence rates in accuracy and comparing with i4000SR all were more than 95% and all $\kappa > 0.75$.**Conclusion** ELISA tests for HBV markers in our laboratory could meet the requirements of the detection performance and clinical needs.

Key words:hepatitis B markers; enzyme linked immunosorbent assay; performance verification

乙型肝炎(以下简称乙肝)是一种严重危害人类健康的疾病,乙肝标志物酶联免疫吸附试验(ELISA)常用于鉴别人体是否感染乙肝病毒,以及对乙肝治疗效果进行判定,具有快速简便、成本低等优点,目前仍是各级医院检验科免疫学检测的主要技术手段^[1]。但市场上乙肝标志物检测试剂种类繁多,如何根据实验室的条件选择合适的试剂以满足临床检验的需要,如何评价现有试剂性能是否满足需求成为实验室的重要问题^[2]。本试验根据最新发布的国际标准化组织(ISO)15189:2012 准则要求和美国病理学家协会(CAP)文件要求对实验室原有的定性检测性能评价方法进行了改进和优化^[3-4],针对现用的乙肝病毒标志物检测试剂做如下验证。

1 材料与方 法
1.1 一般资料 收集 2013 年 3~5 月乙肝 5 项室内质量控制

检测数据;2011~2013 年原卫生部临床检验中心和重庆市临床检验中心检测的室间质评结果数据。

1.2 仪器与试剂 FAME 全自动酶联免疫分析仪(瑞士汉密尔顿公司),Tecan 酶标仪(瑞士帝肯公司),PW-960 洗板机(深圳汇松),KT-100 脱水仪(重庆雅信),Architect i4000SR 化学发光仪(美国雅培公司,以下简称雅培 i4000SR)。仪器设备均按 ISO 15189:2012 准则要求进行检定校准。乙肝 5 项 ELISA 检测试剂盒(上海科华),雅培配套检测试剂,质控品(美国伯乐)。乙肝 5 项标准物质(北京康恒思坦):乙肝表面抗原(HBsAg,1 IU/mL),乙肝表面抗体(HBsAb,30 mIU/mL),乙肝 e 抗原(HBeAg,2 NCU/mL),乙肝 e 抗体(HBeAb,4 NCU/mL),乙肝核心抗体(HBcAb,0.5 NCU/mL)。
1.3 方 法

^{*} 基金项目:国家临床重点专科建设项目经费资助项目[财社(2010)305 号];重庆市渝中区科技计划项目(20140120)。 作者简介:史静,女,检验师,主要从事临床免疫检验研究。

1.3.1 最低检出限评价 用乙肝血清标志物全阴性健康人血清对 1 IU/mL 的 HBsAg 定值血清进行梯度稀释,形成系列浓度为 1.00、0.50、0.40、0.30、0.25、0.20、0.15、0.10、0.05 IU/mL 的检测样品,以能检测出阳性结果的最低浓度作为最低检出限^[5-6]。同理,用乙肝血清标志物全阴性健康人血清对 HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb 定值血清进行梯度稀释,形成系列梯度浓度的样品进行常规检测,以能检测出阳性结果的最低浓度作为其最低检出限。

1.3.2 临界值(C₅₀)及其重复性试验 参照美国临床实验室标准化协会(CLSI)EP12-A2 文件,用乙肝血清标志物全阴性健康人血清对临床检验中心 HBsAg 定值血清进行系列稀释,然后进行 20 次重复检测,并记录每一份样品的阴性和阳性百分比,确定 C₅₀、C₅、C₉₅,其中 1 份样品,在多次重复试验中各有 50% 的概率获得阳性或阴性的结果时该分析物的浓度为 C₅₀; 1 份样品,在多次重复试验中获得阳性率为 95% 和 5% 的浓度点分别为 C₉₅ 和 C₅^[7-8]。并评价 C₅₀±20% 浓度范围是否包含于、位于或者超出这种方法的 95% 区间^[9]。

1.3.3 批内精密度检测 将乙肝 5 项定值血清,在所有条件一致的情况下严格按乙肝标志物检测试剂说明书进行操作,同一批次内均重复测定 20 次,记录原始吸光度(A)值及阴阳性结果,并用样品 A 值/临界值(S/CO)统计,计算批内精密度^[9-10]。S/CO<1 为阴性,S/CO≥1 为阳性,批内精密度以变异系数(CV)表示,CV≤15% 为本方法临床应用接受标准。

1.3.4 批间精密度检测 将 2013 年 3~5 月乙肝标志物室内质量控制检测结果进行统计,并用 S/CO 值计算批间 CV。夹心法批间 CV≤25%,竞争法批间 CV≤35% 为本方法临床应用接受标准。

1.3.5 准确度评价 统计本实验室 2011~2013 年参加原卫生部临床检验中心和重庆市临床检验中心乙肝标志物定性检测室间质评回报结果,计算阴、阳性符合率。准确度可接受的标准为:阴阳性符合率大于或等于 95%,Kappa 值(κ)≥0.75^[11-12]。

1.3.6 不同检测系统间比对 选取 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb 5 个项目的阴性标本各 25 份,阳性标本各 25 份(包括低、中、高浓度)与雅培 i4000SR 比对,分别计算每项指标的阴、阳性符合率^[13]。可接受的标准为:阴阳性符合率大于或等于 95%,κ≥0.75。

1.3.7 人员比对 分别选取乙肝血清标志物 5 项阳性标本 12 份,阴性标本 8 份,6 人进行人员比对,统计每人结果与参考结果的阴阳符合率,阴阳性符合率以大于或等于 85% 为可接受的标准。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理与统计分析,以 2×2 表格计算评价方法测得结果的符合率,用 Kappa 检验判断一致性强弱,κ≥0.75 表示两检测系统间具有较高的一致性。

2 结 果

2.1 乙肝标志物最低检测限评价结果 HBsAg 为 0.2 IU/mL、HBsAb 为 20 mIU/mL、HBeAg 为 1 NCU/mL、HBeAb 为 0.75 NCU/mL、HBcAb 为 0.05 NCU/mL。

2.2 C₅₀ 及其重复性试验 本实验室检测出 HBsAg 的 C₅₀、C₅ 和 C₉₅ 分别为为 0.24、0.20、0.28 IU/mL,计算后可得出 C₅₀-20% 浓度为 0.192 IU/mL,C₅₀+20% 浓度为 0.288 IU/mL,C₅₀±20% 浓度区间包含了 C₅~C₉₅ 区间,C₅~C₉₅ 浓度区间(灰区)小于 C₅₀±20%,用本实验方法检测,浓度 C₅₀±20% 的样

品检测结果一致。

2.3 批内精密度评价结果 对 20 例阳性乙肝标志物质控标本进行重复性检测,5 项标志物均 CV≤15%,且阴阳性符合率均为 100%,检测性能能满足临床要求。见表 1。

表 1 批内精密度评价

乙肝标志物	均数($\bar{x}$)	标准差(s)	CV(%)	阳性一致率(%)
HbsAg(IU/mL)	7.135	1.035	14.51	100.0
HBsAb(mIU/mL)	2.536	0.219	8.64	100.0
HBeAg(NCU/mL)	4.511	0.529	11.75	100.0
HBeAb(NCU/mL)	0.552	0.078	14.31	100.0
HBcAb(NCU/mL)	0.450	0.061	13.67	100.0

2.4 批间精密度评价结果 统计 2013 年 3~5 月室内质控数据,实验结果表明,采用夹心法检测的 HBsAg、HBsAb、HBeAg 其 CV 分别为 24.31%、20.15% 和 22.86%,CV 均小于 25%;采用竞争法检测的 HBeAb、HBcAb 其 CV 分别为 26.85%、33.25%,CV 均小于 35%,均能满足性能评价的要求。5 项乙肝标志物的阳性一致率均为 100.0%。

2.5 准确度评价结果 对 2011~2013 年本实验室参加原卫生部临床检验中心和重庆市临床检验中心的室间质评回报结果进行准确度统计分析,除了 HBeAg,其他 4 个项目的阴、阳性符合率均达到 100%,κ>0.75,检测结果的质量能满足临床要求。见表 2。

表 2 准确度评价结果

乙肝标志物	总符合率(%)	阳性符合率(%)	阴性符合率(%)	κ
HBsAg	100.0	100.0	100.0	1.00
HBsAb	100.0	100.0	100.0	1.00
HBeAg	97.5	95.8	100.0	0.95
HBeAb	100.0	100.0	100.0	1.00
HBcAb	100.0	100.0	100.0	1.00

2.6 不同检测系统间比对结果 与雅培 i4000SR 进行比对,乙肝标志物 5 项阴、阳性符合率均大于 95%,κ>0.75,说明两检测系统一致性较高。见表 3。

表 3 与雅培 i4000SR 比对检测结果

乙肝标志物	总符合率(%)	阳性符合率(%)	阴性符合率(%)	κ
HBsAg	100.0	100.0	100.0	1.00
HBsAb	100.0	100.0	100.0	1.00
HBeAg	98.0	96.0	100.0	0.96
HBeAb	98.0	96.0	100.0	0.96
HBcAb	100.0	100.0	100.0	1.00

2.7 人员比对结果 5 项乙肝标志物 6 人比对的符合率均达到 100.0%。

3 讨 论

乙肝 5 项是国内医院最常用的乙肝病毒感染检测血清标志物,目前乙肝病毒筛查检测的主要方法为 ELISA,为确保检测结果的可靠性,对其进行性能评价显得十分必要。对乙肝标志物检测方法的精密度、准确度的评价可以反映出实验室选用检测试剂方法的正确性和临床应用价值^[9-10]。本研究显示,5 项指标阴阳性符合率均大于或等于 95%,批内 CV≤15%,夹心法批间 CV≤25%,竞争法批间 CV≤35%,一致性检验 κ>0.75,表明本实验室选用的乙肝标志物检测方法符合检测性能要求,检测质量可满足临床要求。

对定性试验而言,C₅₀ 是唯一的医学决定水平,当标本中被

测物浓度处于临界水平时,重复检查同一标本,将产生 50% 的阳性结果和 50% 的阴性结果。定性试验临界值的高低直接关系到试验的成败,每个实验室应按照各自的检测系统和实验条件进行验证评价或建立方法学性能参数^[7]。本实验室测得 HBsAg 的 C_{50} 、 C_5 、 C_{95} 分别为 0.24、0.20、0.28 IU/mL, $C_{50} \pm 20\%$ 浓度区间包含了 $C_5 \sim C_{95}$ 区间, $C_{50} - 20\%$ 浓度的样品大于或等于 95% 结果是阴性, $C_{50} + 20\%$ 浓度的样品大于或等于 95% 结果是阳性,说明重复测定临界点附近 95% 区间标本能得到一致结果。 C_{50} 和 $C_5 \sim C_{95}$ 区间还可用于评价两试剂的不精密度。两试剂 C_{50} 一致, $C_5 \sim C_{95}$ 区间越窄,代表该试剂的不精密度越小;两试剂 C_{50} 浓度不同,可以分为两种情况:如果 $C_5 \sim C_{95}$ 区间不等宽,越窄则该试验的不精密度越小;如果两试剂 $C_5 \sim C_{95}$ 区间等宽可以比较 C_{50} 与 C_5 、 C_{95} 的离散度。不精密度曲线可应用于定性分析的性能评价,并有较好的推广价值^[4,7]。

精密度是定性试验性能评价的常用指标,在临床实际应用中,定量试验研究较多。由于乙肝标志物检测的 ELISA 方法大多是手工操作,影响因素较多,精密度 CV 变化较大。各项批内 CV 均小于或等于 15%,说明本实验室检测系统比较稳定、可靠,在临床应用的可接受范围之内。HBeAb、HBcAb 两项批间 CV>25%,相对于其他 3 项偏高,这可能与这两项指标采用竞争法有关,在检测过程中更应该加强质量控制,应注意 HBeAb、HBcAb 检测的不稳定性对检验结果造成的影响。但批间 CV 仍然在可接受范围之内,符合临床质量要求。

对于定性试验的准确度评价常常采用公认的较为准确的阴阳性符合率来表示。目前,原卫生部临床检验质控中心室间质评就是比较好的平台。定性试验的准确度还可以用与临床的吻合率来表达,通过与临床诊断进行比较,评价检测结果是否与临床诊断相吻合。但是这种方法需要临床诊断的金标准,而临床诊断通常需要乙肝标志物的检测结果作为依据,因此,用临床吻合率来评价定性试验的准确度不是最佳方案。用临床的吻合率来评价准确度只能用在 HBV 共价闭合环状(cccDNA)的定量检测^[14]。

ELISA 与本实验室乙肝定量雅培 i4000SR 的结果比对可以较好的评价两检测系统的一致性。本次试验除了 HBeAg、HBeAb 符合率未达到 100% 以外,其他 3 项均达到 100%。ELISA 未检出的阳性标本均是目标物雅培 i4000 定量检测浓度较低的样品,这可能导致在日常检测中,较低浓度的 HBeAg、HBeAb 不易检出。

乙肝标志物的检测,除了方法学本身和检测试剂对检测性能的影响外,检测前与检测中均有较多的影响因素。检测过程中加样和加试剂的重复性、孵育温度、孵育时间、洗板等都可

会影响检测结果,所以在实验过程中应将这些因素考虑在内并将其一致化^[15]。日常检测也应注意检测过程中其他影响因素对检测结果的影响,做到全程质量控制,这样才能为临床提供正确、可靠的检验结果。

参考文献

[1] Kao JH. Diagnosis of hepatitis B virus infection through serological and virological markers[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2008, 2(4): 553-562.

[2] 刘磊, 刘新启. HBsAg 携带者乙肝血清学标志物模式分析[J]. 当代医学, 2011, 17(6): 28-29.

[3] 尚红, 王毓三, 申子瑜, 等. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版, 北京: 人民卫生出版社, 2015: 1016-1018.

[4] 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.

[5] 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学定性检验领域的应用说明[S]. 北京: 中国合格评定国家认可委员会, 2014.

[6] 江涛, 李军, 王昌富, 等. 基于 ISO15189 要求的免疫学定性试验性能验证方法的探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(3): 332-333.

[7] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP-12A2 User protocol for evaluation of qualitative test performance; approved Guideline[S]. 2nd ed. Wayne, PA, USA: CLSI, 2008.

[8] 黄惠, 黄宪章, 李强, 等. 应用 EP12-A2 评价 HBsAg 定性分析不精密度[J]. 临床检验杂志, 2011, 29(4): 314-316.

[9] Liu C, Chen T, Lin J, et al. Evaluation of the performance of four methods for detection of hepatitis B surface antigen and their application for testing 116, 455 specimens[J]. J Virol Methods, 2014, 196(1): 174-178.

[10] 何敦雄, 符生苗. 海南省临床实验室检测乙肝标志物五项水平评价[J]. 中国热带医学, 2008, 8(2): 227-228.

[11] 张保平, 董莉, 冯新平, 等. 乙肝病毒表面抗原方法学性能验证的评价和分析[J]. 职业与健康, 2010, 26(1): 36-37.

[12] 夏邦世, 吴金华. Kappa 一致性检验在检验医学研究中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(1): 83-84.

[13] 吴泰相, 刘关键, 王家良, 等. 医学检验不同方法之间一致性比较研究的正确设计和指标的正确表示方法[J]. 华西医学, 2000, 15(2): 147-149.

[14] 杨培, 秦波, 单幼兰, 等. 人工肝支持系统对重型乙型肝炎患者血清中 HBV cccDNA 影响的初步研究[J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(12): 1463-1466.

[15] 饶月丽, 张伟强, 郭丽娜. 酶联免疫吸附试验室内质控影响因素的分析[J]. 临床血液学杂志: 输血与检验版, 2009, 22(6): 685.

(收稿日期: 2015-08-20)

(上接第 3368 页)

of antimicrobial consumption and development of resistance in non-fermenters in a tertiary care hospital in Delhi, India[J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(7): 1625-1630.

[7] Fishman N. Antimicrobial stewardship[J]. Am J Med, 2006, 119(6 Suppl 1): S62-70.

[8] Singh A, Goering RV, Simjee S, et al. Application of molecular techniques to the study of hospital infection[J]. Clin Microbiol Rev, 2006, 19(3): 512-530.

[9] 俞云松. 多药耐药鲍曼不动杆菌——21 世纪革兰阴性菌的“MR-SA”[J]. 中华临床感染病杂志, 2009, 2(2): 65-68.

(收稿日期: 2015-08-18)

