

• 综 述 •

ELISA 检测血清 HBsAg、抗-HCV、抗-TP、 抗-HIV 灰区设定的探讨^{*}

李 媛¹, 谭 艳²综述, 韩晓芳^{2△} 审校(1. 内蒙古医科大学 2014 级研究生, 呼和浩特 010059; 2. 内蒙古自治区
人民医院检验科, 呼和浩特 010017)**关键词:** 酶联免疫吸附测定; 乙肝表面抗原; 丙型肝炎病毒抗体; 梅毒螺旋体抗体; HIV 抗体**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.06.031**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2017)06-0810-03

酶联免疫吸附测定(ELISA)因具有特异性强、灵敏度高、操作简便、结果报告快、成本低廉等优点,现已成为临床检验科最基础、应用最广泛的检验项目之一^[1]。常用于乙型病毒性肝炎(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、梅毒螺旋体(TP)、人类免疫缺陷病毒(HIV)等感染性疾病抗原和抗体的检测。但是,由于 ELISA 是一种半定量试验,检测的过程会导致检测结果变异系数较大,进而使得灰区的范围相对较宽。因此,设置合理的灰区范围对试验结果的准确性有着重要意义^[2]。

1 灰区的定义及研究现状

ELISA 结果的判断是根据被测物的吸光度(S)同临界值(CO)的比值(S/CO 值)来决定,一般将 S/CO 值 ≥ 1 ,判断为反应阳性;S/CO 值 < 1 ,则判断为阴性。而“灰区”是指在定性 ELISA 测定中,处于阳性 S/CO 判定值附近,临床意义为可疑的一部分结果。这些结果可能会影响被检者的无偿献血以及在特殊行业的就业,也可能会影响疾病的早期诊断与治疗,甚至会引起医疗纠纷。临床检验人员在实际工作中发现,处于灰区内的检测结果重复性差,对这些结果的报告和处理,一直困扰着临床检验人员。因此应引起重视,采取相应的解决措施。但是,由于各生产厂家检测试剂存在生产原料、方法等诸多方面的差异,导致检测结果也有所差异。目前国内无一厂家对灰区范围有明确设定,各医疗及检验机构对灰区范围的设定也未达成一致。在报告模式上则只报告阳性和阴性,因此普遍存在结果不一致的现象^[3]。因此,各实验室应根据自身检测结果设置合理“灰区”,对弱反应结果应进行复检及追踪检测或采用其他检测方法以确定最终结果并慎重报告,减少假阳性标本的误诊率和假阴性标本的漏诊率^[4],向被检者及临床发布最准确可靠的检测结果。

2 灰区的设定方法

将所选取的检验指标为阳性的标本血清进行系列浓度的稀释,分别对各个浓度的血清标本进行 ELISA 重复检测 20 次,得到一组 S/CO 值和变异系数,将测得的 S/CO 值作为自变量,变异系数值作为因变量,应用 SPSS 统计学软件进行拟合曲线,获得相应的拟合回归方程式。将 S/CO 值设定为 1,计算出相应变异系数值,再带入公式 $(1 \pm 2 \times \text{变异系数})$,即可获得灰区的上下限范围^[4]。结果显示不同浓度血清标本测得的 S/CO 值随着浓度的升高而升高,变异系数值随着浓度的升高

而降低。

统计学理论认为弱反应性标本发生误判、漏检的概率约为 50%,灰区的设置正是为了减少或避免上述这种弱反应性标本结果误诊和漏检现象的发生。实际上,将 ELISA 检测结果的 S/CO 值为 1 定为临界阳性标本是一种理想状态,实际上是无法实现的,同时无限次的对标本进行 ELISA 实验也是不可能实现的,所以现实中是无法直接得到真实且准确的 ELISA 灰区的^[5]。在 ELISA 方法对乙肝表面抗原(HBsAg)、抗-HCV、抗-TP、抗-HIV 进行检测时,采用上述方法对灰区范围进行设置,得到的回归方程拟合度较高,计算出的变异系数值也比较接近真实的变异系数值,故上述方法比其他方法所得到的灰区范围更为科学、合理。多数实验室采用此方法设定所检测指标的灰区范围。

3 灰区标本的选择

采用 ELISA 检测 HBsAg、抗-HCV、抗-TP、抗-HIV,对结果为可疑的血液标本进行 ELISA 复检后,结果仍可疑的标本分别对其进行确证试验。HBsAg 采用电化学发光(ECLIA)及 HBsAg 中和试验,抗-TP 采用螺旋体颗粒凝集试验(TPPA),抗-HCV 采用 HCV-RNA 及重组免疫印迹试验(RIBA),抗-HIV 采用蛋白质印迹(WB)为确证试验,对选取的“灰区”标本,分别进行 ELISA 和确证试验的结果进行对比分析。得出 ELISA 检测结果处于阳性判定值(S/CO=1)附近(结果可疑)的标本的相应阳性和阴性的比例,进而得出合理的“灰区”范围。

4 目前研究成果

4.1 HBV 乙型肝炎是目前流行最广泛、危害最严重的病毒性肝炎之一,HBV 主要经血、母婴和性接触传播^[6]。据世界卫生组织报道全球约 20 亿人曾感染 HBV,其中 2.4 亿人为慢性 HBV 感染者^[7],每年约有 65 万人死于 HBV 感染导致的肝功能衰竭、肝硬化及肝癌。HBV 血清标志物检测一般采用 ELISA 法,但该方法普遍存在敏感性低、非特异结合较高的特点,特别是一些处于临界值附近的样本,结果很难确定。刘伟平等^[8]研究发现,ELISA 检测 HBsAg 的 S/CO 值处于 1.0~2.0 和 2.0~4.0 范围内的标本存在较高的假阳性率,分别为 64.4%和 18.8%。马晓旭等^[4]研究了 42 例 HBsAg 经双试剂检测为可疑(灰区)的献血者,采用上述方法对灰区进行设定,

^{*} 基金项目:内蒙古自治区自然科学基金项目(2015MS08138)。

[△] 通信作者, E-mail: xiaofangh717@sina.com。

计算出灰区的上下限为 0.406~1.590。随着灰区范围的逐渐提高,检测的敏感度也随之增高,特异度随之降低。S/CO 值越大,则该标本阴性的可能性就越大,假阳性的发生概率则越小^[9-10]。另外有报道发现经选取了大量的试验样本进行研究,HBsAg 灰区 S/CO 值设定在 0.684~1.314 是目前使用价值最高的灰区范围^[4]。

4.2 HCV HCV 感染引起的丙型肝炎病毒呈全球分布,WHO 的资料表明,全世界丙型肝炎病毒感染的流行率约为 2.2%~3.0%,占世界人口的 3%(1.3 亿至 1.7 亿),其中还没有包括许多没有统计数据的地地区^[11]。现在国内外对 HCV 的筛选主要通过 ELISA 方法。美国 CDC 在 2003 年修订的“抗-HCV 检测和结果报告程序”中提出:可根据 ELISA 筛查试验结果的 S/CO 比值决定是否需做确证试验。对 S/CO 比值处于可疑范围的标本进行抗-HCV 的 RIBA 实验,以确定最后结果。根据报道,对美国无偿献血者抗-HCV ELISA 检测结果的回顾性分析表明,S/CO $\geq$ 2.5 时可预测 75% 的真阳性;然而,当 ELISA 检测结果 S/CO $\geq$ 3.8 时,阳性预测值可达到 95% 以上。S/CO $<$ 3.8 时则有较高的假阳性率,国内研究也有相同的报道^[12-13]。

4.3 TP 梅毒是由 TP 引起的一种慢性性传播疾病,并可能经血液进行传播^[14]。近年来,我国大部分地区梅毒发病率均有较大幅度的增长趋势^[15]。王伦善等^[16]分别用两种不同厂家试剂进行 ELISA 方法检测抗-TP 并用 TPPA 方法进行确认试验,结果表明梅毒确证结果与 ELISA 初筛试验 S/CO 值之间呈高度正相关。其中万泰试剂可预测确证试验阳性的 S/CO 阈值是 1.61,预测率为 98.3%,丽珠试剂可预测确证试验阳性的 S/CO 阈值是 1.85,预测率为 96.5%。王艳彬等^[17]收集了 498 份梅毒螺旋体不合格标本,包括初次单试剂反应性重复仍为反应性标本、初次双试剂反应性标本及灰区(0.7 $\leq$ S/CO $<$ 1)标本。对收集的不合格标本采用 TPPA 进行确证试验。总体结果显示 S/CO 值处于 0.7~5.0 之间的标本检测结果的准确率较低,还需进一步确证。

4.4 HIV 获得性免疫缺陷综合征(AIDS)是由 HIV 引发的一种免疫缺陷性疾病。至 2010 年,我国 HIV 感染者已达 1 000 万^[18]。临床实验室针对 HIV 抗体测定时,ELISA 均需要设置一段灰区范围。但魏兰华等^[1]、毛睿等^[19]提出抗-HIV 的筛查实验中灰区的设置并不像 HBsAg、抗-HCV 检测起到防止漏检的作用。灰区的设置在一定程度上提高了检测的灵敏度,但特异性差,对于血站来说易造成血液资源的浪费,对于临床实验室来说,增加了检测成本。李玲等^[20]研究发现我国大部分血液中心或中心血站将 0.5 $\leq$ S/CO $\leq$ 1.0 定义为“灰区”,有些血站则根据自己实验室的情况制定“灰区”。冯晓丹等^[21]通过对 ELISA 检测抗-HIV S/CO 值介于 0.8~1.2 的 30 例血清进行 HIV 抗体检测,以此 S/CO 值进行统计学分析,根据公式计算得到灰区参考范围为 0.796~1.204。

5 小 结

ELISA 方法目前仍是各实验室检测血清中的 HBsAg、抗-HCV、抗-TP、抗-HIV 最为常用的检测方法。将其检测结果为可疑(灰区)的标本,分别进行相应的确证试验,二者的结果对比分析表明,处于灰区的标本均有阳性、阴性和不确定标本检出,换言之处于灰区的标本均有较高比例的假阳性率和假阴性

率。随着灰区设置范围的逐渐提高,检测结果的敏感度逐渐提高,特异度随之降低。各指标 ELISA 检测的灰区范围若在以下范围:HBsAg S/CO 为 0.684~1.314,抗-HCV S/CO 为 1.0~3.8,抗-TP S/CO 为 0.7~5.0,抗-HIV S/CO 为 0.5~1.0,经确证试验后出现假阳性、假阴性和不确定结果的比例较高,即各检测指标在上述范围内的检测结果存在较高的不准确性,在工作中,如相应指标的检测结果处在上述相应范围内,检验人员应引起重视,需复查后做确证试验验证结果,或定期复查,以协助被检者明确自身情况。

ELISA 是一种临床应用最广泛的免疫测定法,但是其灵敏度偏低,适合人群初筛^[22]。通过参阅文献得出以上灰区的参考范围,仅能作为一个参考,因为目前国内无一厂家对灰区范围有明确设定,各医疗及检验机构对灰区范围的设定也未达成一致。因此,这要求各实验室应根据自身检测结果设置合理灰区,以提高检测结果的准确性。另外,值得注意的是采用 ELISA 方法检测 HBsAg、抗-HCV、抗-TP、抗-HIV 的 S/CO 值出现灰区现象的原因还许多因素^[23]:(1)HBV、HCV、TP、HIV 病毒处于感染早期即窗口期,或处于恢复末期,体内虽有病毒复制,但病毒载量较低,(2)病毒基因变异^[24-25],(3)钩状效应,(4)试剂的因素,(5)人为因素,(6)标本不合格,都有可能对检测结果造成影响。所以,若要提高 ELISA 的检测质量,应加强实验室科学管理和实验室人员培训,提高人员素质和操作技能,加强质量控制,强化标准化流程操作,强化仪器设备的维护,减少因各种因素造成结果不准确的可能性,将误差降到最低从而保证实验结果的准确性。因此,设置科学且合理的灰区范围有助于降低弱反应性标本的漏检率和误诊率,提高检验结果的准确性,为患者及临床提供准确可靠的检验结果,减少和避免有关不良纷争事件的发生。另外,设置合理的灰区上、下限,对血液安全的保障起到至关重要的作用,这不仅是对献血者及被检患者的负责,也是对输血者及检验人员的保护,更是医护人员对被检者及社会的责任。所以,采供血机构及检验机构应根据自身实验室和所用试剂的情况设置合理的灰区,减少需要做确证试验的标本数量及费用,对防止“窗口期”患者疾病的传播、疾病感染的早期诊断和治疗以及降低输血传染病发生的风险具有重要意义。

参考文献

- [1] 魏兰华,梁俊,吴守成,等. ELISA 法检测抗-HIV 实验中灰区设置的探讨[J]. 医学信息,2014,27(38):219-219.
- [2] 陈善华,朱丽莉,李浩,等. ELISA 方法检测 HBsAg 设置灰区的必要性探讨[J]. 中国输血杂志,2013,26(10):1013-1014.
- [3] 卢振,汪海华. 酶联免疫吸附试验检测乙型肝炎病毒标志物的影响因素及存在问题[J]. 检验医学与临床,2011,8(2):255-256.
- [4] 马晓旭. ELISA 试验灰区设置对结果的影响.[J]. 中国医药指南,2015,13(29):133-134.
- [5] 赵勇. ELISA 检测无偿献血者 HBsAg 设置灰区的意义[J]. 中国医药指南,2012,10(5):81-82.
- [6] World Health Organization. Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis

- B infection[M/OL]. Geneva: WHO, 2015; 1-4 [2016-09-08]. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/154590/1/9789241549059_eng.pdf.
- [7] Ott JJ, Stevens GA, Groeger J, et al. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity[J]. Vaccine, 2012, 30(12): 2212-2219.
- [8] 刘伟平, 殷明刚, 阮艳秋, 等. ELISA 手工法检测 HBsAg 的“灰区”标本复检结果分析[J]. 西部医学, 2012, 24(2): 387-388.
- [9] 刘胡敏, 陶传敏, 黄锦江, 等. ELISA 检测丙型肝炎病毒设置灰区的必要性[J]. 现代预防医学, 2013, 4(8): 1490-1491.
- [10] 陈显, 朱绍汶, 黄成垠, 等. ELISA 法检测抗-HCV 灰区设置探讨[J]. 临床输血与检验, 2013, 15(30): 243-244.
- [11] Lavanchy D. The global burden of hepatitis C [J]. Liver Int, 2009, 29(Suppl 1): S74-81.
- [12] 谷金莲, 祁白柏, 王尊文, 等. 丙型肝炎病毒抗体试验检测结果的可信度分析[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(6): 580-583.
- [13] 杨志栋, 和殿峰. ELISA 法测丙肝抗体假阳性分析[J]. 中国中医药, 2010, 8(17): 263.
- [14] Bogdanovi S, Bujandri N, Jovanovi R. Risk factors for syphilis infection in the South Backa blood donor population[J]. SrpArhCelok Lek, 2011, 139(3): 192-196.
- [15] Liu J, Huang Y, Wang JX, et al. The increasing prevalence of serologic markers for syphilis among Chinese blood donors in 2008 through 2010 during a syphilis epidemic[J]. Transfusion, 2012, 52(8): 1741-1749.
- [16] 王伦善, 吕蓉, 盛琪琪, 等. 梅毒抗体酶联免疫吸附试验 S/CO 比值与 TPPA 结果的相关性研究[J]. 中国输血杂志, 2011, 24(2): 126-127.
- [17] 王艳彬, 韩卫, 张慧贤, 等. 无偿献血者梅毒 ELISA 不合格结果的 TPPA 确证分析[J]. 医学动物防制, 2015, 31(9): 958-960.
- [18] Chinese Medical Association. Chinese center for disease control and prevention: guidelines for diagnosis and treatment of HIV/AIDS in China(2005)[J]. Chin Med J (Engl), 2006, 119(19): 1589-1608.
- [19] 毛瑞, 李晓娟. 西藏自治区血液中心筛查实验室 ELISA 检测方法“灰区范围”的探讨与灰区结果原因的分析[J]. 医学作息, 2012, 25(12): 224-225.
- [20] 李玲, 牛丽彬, 朱邵汶, 等. 中国采供血机构抗-HIV 核酸筛查阳性献血者确证策略研究[J]. 中国输血杂志, 2015, 28(9): 1118-1121.
- [21] 冯晓丹, 叶莉莉, 高玲娟, 等. 人类免疫缺陷病毒抗体检测“灰区”设置的探讨[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(22): 3332-3333.
- [22] 白艳丽. ELISA 法与 MEIA 法测定乙肝病毒比较研究[J]. 中国医药科学, 2015, 5(3): 155-172.
- [23] 李军民, 冯陆, 胡云芝. 300 例乙肝患者乙肝五项检验结果分析[J]. 中国医药科学, 2012, 2(5): 130-131.
- [24] 李金明, 张瑞. 常用乙型病毒性肝炎血清学标志物检测结果报告解释及临床应用[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(4): 296-300.
- [25] 徐克, 池胜英, 吴丽英, 等. 电化学发光法测定 10 409 例乙型肝炎病毒标志物的结果分析[J]. 检验医学, 2011, 26(10): 700-702.

(收稿日期: 2016-10-22 修回日期: 2016-12-24)

• 综 述 •

糖尿病血管病变的综合诊断方法的研究进展*

黄艳丽¹, 毕建璐², 汤海欣¹综述, 吕 雄^{2△}审校

(1. 广州中医药大学, 广州 510405; 2. 广东省第二中医院内分泌科, 广州 510095)

关键词: 糖尿病; 血管病变; 综合诊断**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2017. 06. 032**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2017)06-0812-03

糖尿病血管病变是糖尿病主要的慢性并发症之一, 是导致糖尿病患者致死致残的主要原因, 它严重影响了糖尿病患者的预后和日常生活质量, 给家庭和社会带来巨大的经济负担。但目前对于糖尿病血管病变的诊断手段比较匮乏, 确诊的依据并不多, 部分价值较大的手段具有创伤性, 且价格相对昂贵, 使得糖尿病血管病变的早期诊断较为困难。本文总结了有助于糖尿病血管病变诊断的生化指标、超声技术、放射检查技术、经皮氧分压测定等手段, 旨在为糖尿病血管病变的早期综合诊断提

供依据, 以提高糖尿病血管病变的早期检出率。

1 糖尿病血管病变诊断的生化指标

1.1 常规生化指标 糖尿病除血糖异常外, 还能引起血脂、血压的异常, 故糖尿病血管病变的诊断需常规监测血糖、糖化血红蛋白、血脂、血压、血脂(TC、TG、HDL-C、LDL-C)、尿清蛋白/肌酐、尿清蛋白排泄率等指标, 来早期评价糖尿病综合控制目标是否达标, 是否有进一步引起慢性并发症的风险^[1]。

1.2 其他生化指标

* 基金项目: 广东省中医药局科研项目(20164001)。

△ 通信作者, E-mail: 2385637373@qq.com。