

不同实验室 ELISA 检测系统对 HCV 抗体测定的可比性研究*

曾艳华¹, 卢香云^{2#}, 张丽¹, 张朝霞^{1△}, 程江^{2▲}

(1. 新疆医科大学第一附属医院医学检验中心, 乌鲁木齐 830054; 2. 石河子大学第一附属医院检验科, 新疆石河子 832000)

[摘要] **目的** 探讨不同实验室酶联免疫吸附试验(ELISA)对丙型肝炎病毒抗体(HCV 抗体)测定结果的可比性,为不同实验室之间检验结果的互认提供实验依据。**方法** 参照美国临床实验室标准化协会(CLSI) EP12-A2 文件,收集 100 例新鲜血清标本,其中 50 例 HCV 抗体初筛阳性,50 例 HCV 抗体初筛阴性,两家医院均采用国产 addcare ELISA 1100 全自动酶免分析系统(简称 addcare ELISA 1100)随机盲法检测 HCV 抗体,同时用重组免疫印迹试验(RIBA)和聚合酶链反应(PCR)进行确认,通过比较两家医院的符合率,判断测定结果的可比性。**结果** 两家医院实验室间检测临床标本 HCV 抗体的敏感度和特异度均相同,分别为 100%和 96%;阳性符合率 100%,阴性符合率 100%,总符合率 100%,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 不同医院实验室采用不同检测系统检测 HCV 抗体,在仪器性能良好的情况下,根据自建 Cut-off 值判断检测结果,其测定结果具有可比性,达到检验结果的互认。

[关键词] 丙型肝炎抗体;酶联免疫吸附测定;重组免疫印迹法;聚合酶链反应;符合率**[中图分类号]** R392**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)22-3104-03

The comparative study of the determination of hepatitis C antibody by ELISA detection system in different laboratories*

Zeng Yanhua¹, Lu Xiangyun^{2#}, Zhang Li¹, Zhang Zhaoxia^{1△}, Cheng Jiang^{2▲}

(1. Laboratory Medicine Center, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830054, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the comparability of the determination of hepatitis C antibody(anti-HCV) by ELISA detection system in different laboratories, in order to provide the experimental basis for the mutual recognition of test results between different laboratories. **Methods** In accordance with EP12-A2 files from the American association of Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), a total of 100 patients were recruited, including 50 cases of anti-HCV screening positive and 50 negative. The domestic addcare ELISA 1100 full autokinetic enzyme analysis system(addcare ELISA 1100) was used to test HCV antibody under randomized blind method in different labs, and recombinant immunoblot assay (RIBA) and polymerase chain reaction (PCR) were also carried out to provide a evidence of true positive for HCV antibody tests. Further, we compared the coincidence rate of HCV antibody tests, estimated the comparability of test results. **Results** The sensitivity and specificity of the two laboratories were 100% and 96% respectively. The positive coincidence rate was 100%, negative coincidence rate was 100% and total coincidence rate was 100%, the difference was not statistically significant($P>0.05$). **Conclusion** The test results has a better comparability and recognition between the two laboratories when use the self-built cut-off value under the good condition of the instruments, the determination results are comparable.

[Key words] hepatitis C antibody; enzyme linked immunosorbent assay; recombinant immunoblotting; polymerase chain reaction; coincidence rate

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染被认为是全球公共卫生安全的主要威胁之一,并可以导致急、慢性肝脏疾病^[1]。前瞻性研究结果显示,80%的急性丙型肝炎患者将发展为慢性感染,10%~20%的感染者将出现慢性肝脏疾病并发症,且在 20~30 年内出现临床症状如肝硬化,1%~5%的患者将发展为肝细胞癌^[2]。HCV 感染所致的病死率将在未来 20 年呈持续上升趋势^[3]。因此,准确、及时地对丙型肝炎患者进行早期诊断、治疗,是防止疾病慢性化,从而控制并治愈疾病的关键。

随着检验医学的发展,检测系统逐渐多样化、规模化,不同

实验室拥有多种品牌或同一品牌多台仪器的情况十分普遍。由于不同检测系统的检测结果可能存在不可比性,因此,医学实验室认可的两个国际标准 ISO/IEC 17025(检测和校准实验室能力的通用要求)和 ISO/15189(医学实验室质量和能力的专用要求)都对检验结果的溯源性和可比性提出了明确要求,强调方法学比较试验(比对试验)是实现准确度溯源和患者标本检验结果可比性的重要途径^[4]。本研究参考美国临床实验室标准化协会(CLSI)的 EP12-A2 文件,对不同医院实验室 HCV 抗体测定结果进行分析,通过比较符合率,判断结果的可比性。

1 材料与方 法

1.1 标本 收集 2014 年 6 月至 2014 年 7 月新疆医科大学第一附属医院医学检验中心门诊和住院患者血清标本共 100 例,其中酶联免疫吸附试验(ELISA)初筛 HCV 抗体 50 例阳性,50 例阴性,各分离两份血清置于一80℃冰箱保存待测。

1.2 仪器与试剂 医院 1(新疆医科大学第一附属医院)使用仪器:国产 addcare ELISA 1100 全自动酶免分析系统(简称 addcare ELISA 1100,烟台生物科技有限公司);BIO-RAD iCycler 扩增仪;使用试剂:抗 HCV 诊断试剂盒 ELISA,由北京万泰生物药业股份有限公司提供(批号 C20140408);HCV 抗体确证试剂盒重组免疫印迹法(recombinant immunoblot assay, RIBA)由北京万泰生物药业股份有限公司提供(批号 RC20130101);HCV-RNA 检测采用中山大学达安基因股份有限公司生产的 HCV 基因分型检测试剂盒(批号 2014003)。医院 2(石河子大学第一附属医院)所用酶免仪及型号与医院 1 相同,试剂由上海科华生物工程股份有限公司提供(批号 201404011)。所有试剂均在有效期内使用,并严格按照试剂盒说明书进行实验操作。

1.3 方 法

1.3.1 仪器准备 2 台仪器在实验前均进行日常维护保养,确定其处于良好状态。

1.3.2 精密度验证 批内精密度:分别取高、中、低 3 个浓度的样本,在一批检测内,重复检测 20 次(孔),计算所得吸光度(A)值的均值和标准差,计算批内变异系数(CV)。批间精密度:在 10 d 以上时间内单次(孔或管)重复进行 20 批检测,计算所得 A 值的均值和标准差,计算批间 CV。批内精密度可接受范围为 CV≤10%,批间精密度可接受范围为 CV≤15%。

1.3.3 临界值(Cut-off 值)验证 准备具有 Cut-off 值浓度和浓度在 Cut-off 值±20%的样本,重复测定每个样本 20 次,计算出样本的阴性和阳性百分比。Cut-off 值浓度的样本重复测定应有 50%阳性和 50%阴性结果,Cut-off 值+20%浓度的标本检测阳性率大于或等于 95%,且 Cut-off 值-20%浓度的标本检测阴性率大于或等于 95%,此时,标本浓度在 Cut-off 值±20%浓度范围之外就能得到稳定的检测结果。

1.3.4 灰区的确定 方法:CO±2S,其中 CO 是检测仪器的 Cut-off 值,S 为实验室做室内质控 ROC 的 S。

1.3.5 标本检测 对-80℃保存待测的 100 份(初筛 50 例阳性,50 例阴性)血清标本根据随机数字表进行随机编号,用 HCV 抗体诊断试剂 ELISA 盲法分 10 d 进行检测,同时用 RIBA 进行确认,RIBA 检测不确定的标本用聚合酶链反应(PCR)检测,记录 A 值及确认结果。

1.3.6 PCR 及 RIBA 结果判断标准 PCR 判断标准:当样本的 HCV-RNA 浓度小于 1×10³ IU/mL 为阴性,≥1×10³ IU/mL 为阳性。对于 RIBA 检测为阳性及阴性的样本,直接报告为 HCV 抗体阳性或阴性;对于 RIBA 检测不确定的标本,用 PCR 进行检测,当 PCR 检测为阳性时,报告为阳性,当 PCR 检测为阴性时,报告为不确定。

1.3.7 质量控制 HCV 抗体诊断试剂盒每一批分别设定 1 个空白对照、2 个阴性对照、2 个阳性对照和一个质控孔,其中阴性对照孔 A≤0.08,阳性对照孔 A≥0.50,否则实验无效;质控孔 S/CO 值为 2.39~4.96。HCV 抗体确证试剂盒每一批分别设定 1 个阴性对照和 1 个阳性对照,其中阴性对照出现对照线-1 和对照线-2,阳性对照出现 Core、NS3、NS4-1、NS4-2、

NS5、对照线-1 和对照线-2,且每条试验结果中对照线-1 和对照线-2 均必须出现,如果对照线-1 和对照线-2 均不出现或仅出现 1 条,则此条的检测结果无效。该试验的整个过程均有良好的质量控制。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行统计分析,用配对四格表 χ² 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 精密度验证结果 见表 1。

表 1 两家医院精密度验证结果

项目	批内精密度(%)			批间精密度(%)		
	高浓度	中浓度	低浓度	高浓度	中浓度	低浓度
医院 1	5.0	8.1	9.5	8.3	12.0	14.1
医院 2	5.4	8.7	9.8	8.5	12.7	14.5

2.2 Cut-off 值验证 医院 1 的自建 Cut-off 值为 0.448,该浓度与其上下 20%浓度的标本经验证后与唐婧等^[5]研究结果相符,医院 2 的自建 Cut-off 值为 0.550,经验证后与之相符。

2.3 灰区范围及结果 医院 1 的灰区范围是 0.317~0.579,医院 2 的灰区范围是 0.406~0.694。研究 100 例标本中共收集 10 例初筛浓度在 0.361~0.683 的灰区标本,结果显示,两家医院 ELISA 对 10 例灰区标本均检测出阳性 7 例,阴性 3 例,RIBA 及 PCR 联合检出阳性 5 例,阴性 5 例。

2.4 ELISA 检测结果 两家医院实验室各自按照验证后的 Cut-off 值判断 HCV 抗体检测结果,医院 1 及医院 2 均检测出阳性 47 例,阴性 53 例。

2.5 RIBA 及 PCR 确证结果 RIBA 及 PCR 联合检出阳性 45 例,阴性 55 例。其中 RIBA 检测不确定的标本 HCV 抗体特异条带的分布情况分别是:Core 蛋白强度为 2+ 的有 5 例(5/9),强度为 1+ 的有 2 例(2/9);NS3 蛋白强度为 1+ 的有 2 例(2/9)。

2.6 灵敏度和特异度 根据 ELISA 检测 HCV 抗体结果及 RIBA 和 PCR 确证结果分析,医院 1 及医院 2 的灵敏度和特异度相同,分别为 100%、96%。见表 2。

表 2 两家医院检测 HCV 抗体的结果

ELISA	金标准 RIBA 及 PCR		合计
	+	-	
+	45	2	47
-	0	53	53
合计	45	55	100

2.7 符合率 两家医院实验室间检测临床标本 HCV 抗体的阳性符合率 100%,阴性符合率 100%,总符合率 100%,差异无统计学意义(P=1.000),见表 3。

表 3 两家医院实验室间检测 HCV 抗体的符合率结果

医院 2	医院 1		合计
	+	-	
+	47	0	47
-	0	53	53
合计	47	53	100

3 讨 论

本研究中两家医院实验室所用仪器型号相同,均为国产 addcare ELISA 1100 全自动酶免分析系统,但试剂不同。研究目的在于分析不同国产仪器和试剂在不同环境下检测 HCV 抗体结果的可比性,从而为不同实验室之间检验结果的互认提供实验依据。

精密度是检验方法评估中最基本的评价指标,主要评价测定结果的重复性,一般采用 CV 来反映精密度的好坏,本研究精密度结果显示,两家医院的批内 CV<10%,批间 CV<15%,符合比对实验的要求,说明这两家医院的检测系统均稳定可靠且重复性较好。

对定性试验来讲,Cut-off 值是惟一的医学决定水平,而 Cut-off 值的确定缺乏统一的标准,使得在测定中对同一份标本的检测结果有可能出现很大的差异,尤其是对弱阳性标本及仅出现针对 HCV 单个蛋白成分抗体的标本^[6],因此定性试验 Cut-off 值的高低,直接关系到试验结果的正确与否,而验证 Cut-off 值是否正确对试验结果的确定显得尤为重要。本研究经验证后结果显示与医院 1 和医院 2 的自建 Cut-off 值相符,但彼此略有不同,分别是 0.448 和 0.550,经分析后可能存在的原因是两家医院使用的试剂不同,不同的试剂盒其抗原的来源及包被量有所差异,因此可能出现检测结果的差异而导致 Cut-off 值设定结果不同。

此外,ELISA 测定技术本身在 Cut-off 值的设置上具有一定模糊性,即所谓的灰区,也就是说在 Cut-off 值周围一定区域内,测定结果难以明确判断是阴性还是阳性,但是目前国内所应用的传染性病原体抗原或抗体检测的 ELISA 试剂盒基本上都没有涉及灰区问题,而仅仅是以 Cut-off 值来判断阴阳性结果,这就造成处于 Cut-off 值附近的样品易检测为假阳性或假阴性^[7],而检测系统对灰区标本的检出能力更能反映其性能。因此,灰区的设置对提高 HCV 抗体的检出率,最大限度地降低误检,防止漏检同样具有重要的意义。本研究中灰区标本的 HCV 抗体检测结果显示两家医院均有两份血清标本 ELISA 检测为 HCV 抗体阳性,但金标准确认结果为 HCV 抗体阴性,即出现假阳性结果。在排除标本溶血、脂血及黄疸的情况下,分析其可能的原因有:(1)高免疫球蛋白 G 血症、类风湿因子、超氧化物歧化酶、异嗜性抗体及某些自身抗体等^[8];(2)用于试剂固相包被的基因工程抗原不纯^[9];(3)操作过程中洗板不彻底而导致结果偏高。由于灰区标本易出现假阳性和假阴性结果,建议对灰区标本经金标准确认后发检验报告。

由于定性试验的结果不同于生化试验的比对,需要用临床资料或确诊试验所证实,所以通常用灵敏度和特异度来评价定性试验的性能^[10]。若根据试剂说明书给定的 Cut-off 值(医院 1 为 0.14,医院 2 为 0.25)判断检测结果,医院 1 的灵敏度和特异度分别为 100%和 80%,医院 2 的灵敏度和特异度分别为 100%和 89%,虽然灵敏度都很高,但其特异度均较低,更容易出现假阳性结果而导致误诊率较高。本研究中两家实验室根据各自建立的 Cut-off 值判断检测结果,研究显示两台仪器的灵敏度和特异度相同且均较高,分别为 100%和 96%,表明不

同实验室以自建 Cut-off 值为判断标准,可以在不降低灵敏度的情况下显著提高其特异度,不仅对 HCV 敏感且检出率高、漏检率低,为实现丙型肝炎患者的早发现、早诊断、早治疗从而控制并治愈疾病发挥重要作用,同时也减少了因误诊而带来的不便和血液资源的浪费。

对于定性试验,在诊断未知的情况下,比较不同医院间检测结果的准确性及可比性,可以选用阴性、阳性符合率指标。本研究结果显示,两家医院的阳性符合率 100%,阴性符合率 100%,总符合率 100%,差异无统计学意义($P=1.000$),表明两家医院实验室的检测结果互认可比。

综上所述,定期对实验室同一项目不同检测系统进行比对分析,是保证测定结果准确可比的重要手段,也是实验室内质量控制的一个良好补充,为实现实验室间检测结果的互认打下基础。

参考文献

- [1] Williams R. Global challenges in liver disease[J]. *Hepatology*, 2006, 44(3): 521-526.
- [2] Global burden of Hepatitis C working Group. Global burden of disease (GBD) for hepatitis C[J]. *J Clin Pharmacol*, 2004, 44(1): 20-29.
- [3] Deuffic-Burban S, Poynard T, Sulkowski MS, et al. Estimating the future health burden of chronic hepatitis C and human immunodeficiency virus infections in the United States[J]. *J Viral Hepat*, 2007, 14(2): 107-115.
- [4] 魏昊,丛玉隆. 医学实验室质量管理与认可指南[M]. 北京:中国计量出版社,2004:72-74.
- [5] 唐婧,包建玲,孟存仁,等. ROC 曲线对 ELISA 检测丙型肝炎抗体阳性判断值的确定和分析[J]. *检验医学*, 2014, 29(8): 826-830.
- [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] 邓巍,王露楠,李金明. 丙型肝炎病毒抗体酶联免疫吸附试验阳性判断值在献血员血液筛查中的意义[J]. *中华检验医学杂志*, 2004, 27(10): 39-41.
- [8] Mimms L, Vallari D, Ducharme L, et al. Specificity of anti-HCV ELISA assessed by reactivity to three immunodominant HCV regions[J]. *Lancet*, 1991, 336(8730): 1590-1591.
- [9] 黄秀琳,李维,程颖,等. HIV 酶免试剂在献血标本中检测效果评价[J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(10): 1297-1298.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典-三部[M]. 北京:化学工业出版社,2005:335.

(收稿日期:2016-03-18 修回日期:2016-05-06)