技术与方法 文章编号:0253-3626(2009)10-1397-03

ELISA 法在检测乙肝标志物中的应用和评价

祝继华,严 立,陈 瀑,周爱娥,陈宏础,张莉萍
(重庆医科大学附属第一医院检验科 重庆 400016)

【摘 要】目的:对我院乙肝标志物定性试验试剂的精密度、准确度、最低检出限进行方法学评价,为实验室选用合格方法和试剂提供依据。方法:试验中乙肝标志物检测均采用酶联免疫吸附法(Enzyme linked immnosorbent assay, ELISA)。对试剂的方法学性能评价为:批内精密度评价用 40 例(包括阴、阳性)乙肝标志物标本进行重复性检测;批间精密度评价用 120 例(包括阴、阳性)室内质控结果进行统计;并用阳性一致率和阴性一致率作为精密度评价指标。准确度评价用近 3 年 165 例室间质评(卫生部临床检验中心质控和重庆市临床检验中心质控)的返馈数据进行统计,以阳性符合率和阴性符合率表示试验的准确度。试剂最低检出限的评估,将已知浓度的乙肝标志物作梯度稀释后进行检测,以能发生反应的最低浓度为最低检出限。结果:实验方法的批内和批间精密度、准确度其阴阳性符合率均≥95%;其一致性检验 Kappa≥0.75。HBSAg、HBSAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb 最低检出限分别为:0.6 IU/ml、20 MIU/ml、2 NCU/ml、3 NCU/ml、0.5 NCU/ml。结论:本实验室乙肝标志物检测方法的精密度、准确度,最低检出限均符合检测性能要求,检测质量可满足临床要求。

【关键词】乙肝标志物;ELISA;评价
【中国图书分类法分类号】R446.61 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-02-16

Application and evaluation of ELISA measurement for HBV markers

ZHU Ji-hua, et al
(*Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate the precision, accuracy, and lower limit of detection of the qualitative test of HBV markers to provide a basis for the selection of acceptable method and reagents. *Methods*: ELISA was used in our laboratary for HBV markers. The within-run precision of 40 samples were evaluated. The between-run precision of 120 samples of IQC were evaluated. The concordance rates of positive and negative of 120 samples of IQC were counted. The coincidence rate of positive and negative of 165 samples of EQC in three years were counted. The experiment to evaluate the lower limit of detection of reagent used gradient dilution method to dilute valued serum. And the lower limit of detection is the lowest concentration at which maker could be examined qualitatively. *Results*: The within-run precision, the between-run precision, and the coincidence rates of positive ≥ 95%, and negative of 160 cases were all ≥ 95%; The coincidence rates of positive and negative of 165 cases were both 95%, and Kappa was ≥ 0.75. The lower limit of detection of HBSAg, HBSAb, HBeAg, HBeAb, HBcAb were 0.6 IU/ml, 20 MIU/ml, 2 NCU/ml, 3 NCU/ml and 0.5 NCU/ml respectively. *Conclusion*: The precision, accuracy and lower limit of detection of the test of HBV markers in our lab all can meet the requirements of the detection performance and the need of clinical purpose.

【Key words】HBV markers; ELISA; Evaluation

乙肝标志物酶联免疫吸附法(Enzyme linked immnosorbent assay,ELISA)仍是目前临床实验室检测乙肝标志物定性的常规方法,其检测结果常作为临床诊断和治疗乙肝的依据之一。乙肝标志物的检测的准确性和灵敏度直接影响乙肝病人的诊断和治疗。但由于乙肝标志物的检测生产试剂的厂家较多,其方法学性能是否能满足实验室要求,如何选择试剂是实验室首先面临的问题,为保证检测质量,我们对乙肝标志物检测试剂进行了方法学性能评价和分析,为本实验室检测试剂和方法的选择提供了依据,为乙肝标志物检测质量提供了保证。

作者介绍:祝继华(1955-),女,副主任技师,研究方向:免疫学。
通讯作者:张莉萍,女,教授,E-mail: liuzhangcq@yahoo.com。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 加样器(MICRO PLUS);酶标仪(KHBST-360);洗板机(KH ST-360)所有的仪器均经过校准。

1.1.2 样本及资料 由卫生部临检中心提供的质控血清(批号:0703;0803,有效期:2008-08-12),自制阴性血清;试剂盒内阴、阳性质控物。卫生部临床检验中心和重庆市临床检验中心 2006、2007 及 2008 年 9 月以前的室间质评数据。

1.1.3 检测试剂 上海科华技术生物公司（批号:20080520;有效期:2008-02-03）

1.2 方法

1.2.1 精密度的评价 批内精密度检测:用卫生部临床检验中心同批号(批号 0803)阳性质控血清 20 例,自制阴性血清 20 例,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。用阳性符合率和阴性符合率表示试验的精密度。

批间精密度检测:将连续 60 d（每天 1 次)乙肝标志物室内质控(卫生部临床检验中心质控品(批号 0803)检测结果(阳性质控血清);60 d（每天 1 次)阴性血清检测结果进行阳性一致率和阴性一致率统计。

1.2.2 准确度评价 将 2006~2008 年本实验室连续 3 年参加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阴、阳性符合率的统计。

1.2.3 最低检出限试验 用乙肝阴性血清（健康人血清)对卫生部临检中心提供的乙肝定值血清进行梯度稀释,将稀释后的标本进行常规检测,以能检出的最低浓度为最低检出限。

2 结 果

对 40 例阴、阳性乙肝标志物标本进行重复性检测,其批内精密度评价指标见表 1。批内精密度以一致率≥95%为本方法临床应用接受标准。

对 120 例(自制阴性标本 60 例、卫生部阳性质控血清 60 例)标本的批间的精密度检测见表 2。批间精密度以一致率≥95%为本方法临床应用接受标准。

对 2006~2008 年本实验室连续 3 年参加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,结果见表 3。准确度可接受的标准为:阴阳性符合率≥95%;或 Kappa≥0.75[1]。

用乙肝检测为阴性的血清(健康人血清)对卫生部临检中心提供的乙肝定值血清进行梯度稀释,将稀释后的标本进行常规检测,以能检出的最低浓度为最低检出限[2]。结果见表 4。

3 讨 论

文献[3]报道对乙肝标志物检测方法的灵敏度、特异性和符合率的评价,可以反应出实验室选用检测试剂方法的正确性和临床应用价值。本实验室通过对乙肝标志物检测方法性能的评价,验证和评估了本实验室乙肝标志物检测的性能方法。从表 1~4 可说明,本实验室除抗 HBe 抗 HBc 抗体准确度未达 100%外,其它指标的阴阳性符合率均达到 100%,说明本实验室选用的乙肝标志物检测方法的精密度、准确度和灵敏度均可满足临床要求。

对抗 HBe 准确度评价中其阳性符合率约低于其他乙肝标志物(表 3),这可能导致在常规检测中,有较低的抗 HBe 阳性标本检测不出来;同时抗 HBc 的阴性符合率也约低于其他几项,通过对室间质评

表 1 批内精密度评价

乙肝标志物	阳性标本(例)	阳性一致率	阴性血清(例)	阴性一致率
HbsAg	20	100%	20	100%
HbsAb	20	100%	20	100%
HbeAg	20	100%	20	100%
HbeAb	20	100%	20	100%
HbcAb	20	100%	20	100%

表 2 批间精密度评价

乙肝标志物	阳性标本(例)	阳性一致率	阴性血清(例)	阴性一致率
HbsAg	60	100%	60	100%
HbsAb	60	100%	60	100%
HbeAg	60	100%	60	100%
HbeAb	60	100%	60	100%
HbcAb	60	100%	60	100%

表 3 准确率评价

乙肝标志物	总符合率	阳性符合率	阴性符合率	Kappa 值
HbsAg	100%	100%	100%	1.0
HbsAb	97%	93%	95%	0.94
HbeAb	100%	100%	100%	1.0
HbeAb	95%	88%	93%	0.89
HbcAb	99%	98%	88%	0.93

表 4 乙肝标志物的最低检测限评价结果

项 目	最低检出限
HBsAg	0.6 IU/ml
HBsAb	20 mIU/ml
HBeAg	2 NCU/ml
HBeAb	3 NCU/ml
HBcAb	0.5 NCU/ml

结果分析,目前国内几个厂家试剂都存在这种现象。有文献报道,乙肝抗 HBc 平均最佳变异系数为 24.6%。抗 HBe 与抗 HBc 普遍存在着非特异性交叉反应,假阳性可高达 35.1%,这可能是由于乙肝抗 HBe 和抗 HBc 采用竞争法有关。因此,我们常规检测中更应注意加强质控制,注意因乙肝抗 HBe 和抗 HBc 检测的不稳定性对其造成的质量影响。

定性 ELISA 试验的精密度评价一般采用检测的阳性一致率和阴性一致率来表达;而定性实验的准确度评价目前国内还存在争议,常采用公认较为准确的方法作为参照标准[4],因此我们将检测结果与其它多个实验室进行比较,目前卫生部临床检验中心的室间质评就是一个方法比对的较好平台。所以我们对乙肝定性实验准确度评价采用与卫生部室间质评比较方法,并用阳性符合率和阴性符合率来表达。尽管如此,有些专家也不赞同此种方法作为准确度判断依据。定性实验的准确度还可采用临床吻合率来评价,即将定性试验的检测结果与临床诊断进行比较,评价检测结果是否与临床吻合,但这种方法也需临床诊断的金标准。而乙肝的临床诊断又常依靠乙肝标志物检测作为依据,因此临床吻合率方法对本定性试验准确度评价不是最佳选择。故用临床的吻合率来评价准确率也只能用在 HBV cccDNA 的定量检测[5]。

在 ELISA 方法性能评价中发现,除方法和试剂本身对检测结果性能的影响外,检测过程中也存在影响检测性能的因素,如:加样和加试剂重复性、孵育温度的均衡性、孵育时间的长短、标本的溶血、RF 的增高等都可能影响检测结果。因此,日常检测中尽管使用的是符合实验性能要求的方法和试剂,也应注意检测过程中的其它影响因素对检测结果的影响。

参 考 文 献

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

[2] 吴泰相,刘关健,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):148.

[3] 何敦雄,符生苗.海南省临床实验室检测乙肝标志物 5 项水平评价[J].中国热带医学,2008,8(2):227.

[4] 郑怀竞,王彩育,师学江,等.全国乙型肝炎病毒标志物免疫学检验室间质量评价[J].中国医学检验杂志,1992,15(2):80-81

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

(责任编辑:冉明会)

读者·编者·作者

本刊对论文著录"通讯作者"的要求

本刊对论文中著录通讯作者的要求如下:①通讯作者应是论文的指导者,并且有高级技术职称;②一篇论文只可有一位通讯作者,应注明其姓名、性别、学历、职称;③通讯作者简介应放在稿首页左下脚部,并标出 E-mail 地址。

本刊编辑部

2009 年 10 月