

酶联免疫吸附试验检测乙型肝炎病毒血清学标志物的性能评价^{*}

卢 婷, 李发科, 罗 杰, 杨邵俊, 潘 锋, 章明徐, 陈 鸣[△] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所检验科, 重庆 400042)

【摘要】 目的 通过检测乙型肝炎病毒(HBV)血清学标志物,对 ADDCAER1100 全自动酶免工作站进行定性试验的性能评价。**方法** 根据美国临床实验室标准化协会(NCCLS)颁布的 EP12-A 文件,以 Architect I2000 全自动化学发光免疫分析仪(简称 Architect I2000)为参考方法,对 ADDCAER1100 全自动酶免工作站(简称 ADDCAER1100)进行 HBV 血清学标志物检测的方法学对比及重复性试验,完成其定性试验的性能评价。**结果** 方法学比较显示,HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb 的总符合率分别为 99.0%、99.5%、99.5%、98.0%、100.0%;阳性符合率分别为 98.0%、100.0%、99.0%、97.0%、100.0%,阴性符合率分别为 100.0%、99.0%、100.0%、99.0%、100.0%,Kappa 系数分别为 0.98、0.99、0.99、0.96、1.00。重复性试验显示,HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb $\pm 20\%$ 浓度的临界值样本阳(阴)性率均不小于 95%,95%置信区间分别为:96.6%~99.5%、97.6%~99.5%、97.6%~99.5%、94.7%~99.5%、98.6%~99.5%。**结论** ADDCAER1100 与 Architect I2000 检测 HBV 血清学标志物的结果一致性较强,ADDCAER1100 检测 HBV 血清学标志物在临界值 $\pm 20\%$ 的浓度内能得到稳定结果。该仪器的性能可靠,可用于标本的检测。

【关键词】 酶联免疫吸附试验; 定性试验; 性能评价; 乙型肝炎病毒; 血清学标志物

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.05.003 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)05-0582-03

Performance evaluation of ELISA for detecting HBV serological markers^{*} LU Ting, LI Fa-ke, LUO Jie, YANG Shao-jun, PAN Feng, ZHANG Ming-xu, CHEN Ming[△] (Department of Clinical Laboratory, Daping Hospital, Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

【Abstract】 Objective To conduct the performance evaluation of the qualitative tests in the ADDCAER ELISA 1100 automated workstation by detecting the hepatitis B virus (HBV) serological markers. **Methods** According to EP12-A document promulgated by the National Committee for Clinical Laboratory (NCCLS), with the Architect I2000 automatic chemiluminescence immunoassay analyzer as the reference method, the methodological comparison and the repeatability test of the HBV serological markers detection by the ADDCAER ELISA automated workstation were performed for completing its qualitative test performance evaluation. **Results** The methodological comparison showed that of the total coincidence rate of HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb and HBcAb were 99.0%, 99.5%, 99.5%, 98.0% and 100.0%, respectively; the positive coincidence rates were 98.0%, 100.0%, 99.0%, 97.0% and 100.0%, respectively; the negative coincidence rate were 100.0%, 99.0%, 100.0%, 99.0% and 100.0%, respectively; the Kappa values were 0.98, 0.99, 0.99, 0.96 and 1.00 respectively. The repeatability tests showed that the positive(negative) rates of critical value in HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb and HBcAb within $\pm 20\%$ concentration $\geq 95\%$, the 95% confidence intervals were 96.6%—99.5%, 97.6%—99.5%, 97.6%—99.5%, 94.7%—99.5% and 98.6%—99.5%, respectively. **Conclusion** The results of the ADDCAER ELISA 1100 automated workstation and the Architect I2000 automatic chemiluminescence immunoassay analyzer for detecting the HBV serological markers have strong consistency. The ADDCAER ELISA 1100 automated workstation for detect HBV serological markers obtains the stable results within $\pm 20\%$ concentration near cutoff points and is reliable in performance, thus can be used to qualitatively detect HBV serological markers in clinical specimens.

【Key words】 enzyme-linked immunosorbent assay; qualitative test; performance evaluation; hepatitis B virus; serological markers

我国是乙型肝炎病毒(HBV)感染的高发国家,现有慢性 HBV 感染者约 9 300 万人,其中慢性乙型肝炎患者约 2 000 万人^[1]。临床实验室已开展了多种 HBV 血清学标志物的检测方法,其中化学发光法是定量检测 HBV 血清学标志物的高灵

敏度和高特异性的方法。以酶联免疫吸附试验(ELISA)为代表的定性方法因具有灵敏度和特异性高、操作简便、经济等优点,也一直是临床实验室检测 HBV 抗原、抗体的常用方法,同时是各级医院检验科的必备方法。ADDCAER1100 全自动酶

^{*} 基金项目:卫生部专项课题资助项目(28-1-5)。

作者简介:卢婷,女,在读硕士,初级检验师,主要从事乙型肝炎传染研究。 [△] 通讯作者, E-mail:chming1971@126.com。

免工作站是一种基于 ELISA 的全自动血清标志物定性检测平台,其 HBV 血清学标志物检测性能未知。本研究根据美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)文件 EP12-A,结合临床试验室实际情况,以 HBV 血清学标志物乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、乙型肝炎表面抗体(HBsAb)、乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)、乙型肝炎 e 抗体(HBeAb)、乙型肝炎核心抗体(HBcAb)测定为例,以 Architect I2000 全自动化学发光免疫分析仪为参考方法,对 ADDCAER1100 全自动酶免工作站进行性能评价,通过重复性试验和方法学对比评价该系统的检测性能^[2],以保证临床标本检测的准确性和可靠性。

1 资料与方法

1.1 标本来源 收集 2012 年 12 月至 2013 年 5 月本院门诊、病房和体检检测 HBV 血清学标志物的血清标本 1 000 例,包括 5 种 HBV 血清学标志物(HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb)的阳性和阴性标本各 100 例。

1.2 试剂和仪器 采用仪器为烟台艾德康 ADDCAER1100 全自动酶免工作站,配套试剂为北京万泰生产的 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb 的 ELISA 试剂盒;美国雅培 Architect I2000 全自动化学发光免疫分析仪及其配套试剂、定标品。质控品为卫生部临检中心提供的 0.2 IU/mL HBsAg、30 IU/mL HBsAb、2 NCU/mL HBeAg、4 NCU/mL HBeAb、4 NCU/mL HBcAb 的质控血清。

1.3 方法

1.3.1 方法学的对比 参考 EP12-A 文件设计试验方案,以 Architect I2000 为参考方法,ADDCAER1100 为对比方法。分别选取 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb 阳性和阴性标本各 100 份,用以上两台设备进行检测,方法学比较在 10 d 内完成,按照受试者血清标本进行检测。每次试验低值质控品重复检测 2 次,总共检测 20 次,任何一次低值质控品失控,立即停止试验,该批标本检测数据视为无效,应在当天或第 2 天重新测量,最后比较两套检测方法结果的一致性。

1.3.2 重复性试验 参考 EP12-A 文件设计试验方案,每次试验均设立阴阳性对照(试剂盒内自带),试验在 10 d 完成,有双份阴阳性对照,共计 20 份阴阳性对照结果。将已知浓度的 5 种 HBV 血清学标志物低值质控血清进行系列稀释,每项稀释结果在 ADDCAER1100 上检测 20 次,找到阴阳性结果各占 50%的标本,可确定该标本浓度为临界值(cut off 值)浓度。配置 5 种 HBV 血清学标志物浓度为临界值±20%的分析物,分别在 ADDCAER1100 上测定 20 次,记录结果。临界值 95%置信区间(CI)的结果判定以样本/临床值比值(S/CO 值)表示:HBsAg、HBsAb、HBeAg 的 S/CO≥1 为阳性,S/CO<1 为阴性;HBeAb、HBcAb 的 S/CO<1 为阳性,S/CO≥1 为阴性。+20%浓度临界值的分析物检测阳性率不小于 95%,同时-20%浓度临界值的分析物检测阴性率不小于 95%,说明临界值±20%的浓度位于该检测方法的 95%CI 内^[2]。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件进行数据处理与统计学分析,采用 2×2 表格计算两套检测系统的阴阳性符合率,用 Kappa 检验判断两套检测系统一致性的强弱^[3]。Kappa 系数在(-1,1)为有意义,Kappa≥0.75 两者一致性较好;0.75>Kappa≥0.4 两者的一致性一般;Kappa<0.4 两者一致性较差^[3]。95%置信区间计算公式^[2]: $[100\% (Q_1 - Q_2) / Q_3, 100\% (Q_1 + Q_2) / Q_3]$; $Q_1 = 2(a + d) + 1$, 96^2 ; $Q_3 = 2n + 7.68$ $Q_2 = 1.96 \sqrt{3.84 + 4(a + c)(b + d) / n}$ 。ELISA 批内和

批间变异:批内变异系数(CV_{批内})小于 10%,批间变异系数(CV_{批间})小于 15%满足要求。

2 结果

2.1 方法学比较 两套检测系统的一致性结果显示:HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb 的总符合率分别为 99.0%、99.5%、99.5%、98.0%、100.0%,阳性符合率分别为 98.0%、100.0%、99.0%、97.0%、100.0%,阴性符合率分别为 100.0%、99.0%、100.0%、99.0%、100.0%,Kappa 系数分别为 0.98、0.99、0.99、0.96、1.00。见表 1~5。

表 1 HBsAg 检测 的方法学对比

ADDCAER 1100	Architect I2000		合计
	阳性	阴性	
阳性	98	0	98
阴性	2	100	102
合计	100	100	200

表 2 HBsAb 检测 的方法学对比

ADDCAER 1100	Architect I2000		合计
	阳性	阴性	
阳性	100	1	101
阴性	0	99	99
合计	100	100	200

表 3 HBeAg 检测 的方法学对比

ADDCAER 1100	Architect I2000		合计
	阳性	阴性	
阳性	99	0	99
阴性	1	100	101
合计	100	100	200

表 4 HBeAb 检测 的方法学对比

ADDCAER 1100	Architect I2000		合计
	阳性	阴性	
阳性	97	1	98
阴性	3	99	102
合计	100	100	200

表 5 HBcAb 检测 的方法学对比

ADDCAER 1100	Architect I2000		合计
	阳性	阴性	
阳性	100	0	100
阴性	0	100	100
合计	100	100	200

2.2 重复性试验 ADDCAER1100 检测设备重复性试验显示:HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb 低值质控品分别稀释 4、3、3.4、1.6、1.7 倍的浓度为其临界值浓度,±20%浓度

临界值标本阳(阴)性率均不小于 95%,95%CI 分别为:96.6%~99.5%、97.6%~99.5%、97.6%~99.5%、94.7%~99.5%、98.6%~99.5%。 $CV_{\text{批内}}$ 均在 10%左右, $CV_{\text{批间}}$ 均小于 15%。见表 6。

表 6 ADDCAER1100 检测仪 HBV 血清学标志物
重复性试验结果

检测指标	临界值		-20%		+20%	
	S/CO	CV	S/CO	CV	S/CO	CV
	($\bar{x}\pm s$)	(%)	($\bar{x}\pm s$)	(%)	($\bar{x}\pm s$)	(%)
HBsAg	0.99±0.10	9.59	0.84±0.08	9.87	1.15±0.09	7.97
HBsAb	0.97±0.13	12.91	0.80±0.08	9.92	1.45±0.11	7.87
HBeAg	0.99±0.09	9.05	0.88±0.08	9.43	1.24±0.10	8.25
HBeAb	0.94±0.10	9.46	1.23±0.11	9.01	0.66±0.06	8.71
HBcAb	0.99±0.10	9.67	1.16±0.09	7.62	0.39±0.04	9.74

注:-20%为临界值-20%分析物浓度;+20%为临界值+20%分析物浓度。

3 讨 论

本研究以 HBV 血清学标志物 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb 为例,进行方法学对比和重复性试验,用于 ELISA 的方法学评价,结果显示:在方法学对比中,以化学发光法为原理的 Architect I2000 和 ELISA 为原理的 ADD-CAER1100 同时检测 HBV 血清学标志物的结果一致性较强;在重复性试验中 HBV 血清学标志物标本浓度在±20%临界值标本位于 95%CI 内,对于临界浓度不小于 20%的标本也能得到稳定的结果。

在临床试验室使用新的试剂、系统或更换试剂、系统时,为了保证标本检测结果的准确性和可靠性,在开展检测项目前需要进行性能评价。在性能评价的方法学对比中,定性试验通常运用 2 种或 2 种以上的检测方法(仪器)。由于最终的诊断结果未知,或无诊断的金标准,定性方法又分为已知诊断的定性试验和未知诊断的定性试验,未知诊断的定性试验往往对比几种检测方法的一致性,采用几种检测方法的阴性和阳性符合率表示^[2-4]。本试验以 HBV 血清学标志物检测为例,以化学发光法为原理的 Architect I2000 作为参考仪器,以新引入科室的以 ELISA 为原理的 ADDCARE1100 为试验仪器。两种方法

学对比时,需注意标本的选择应具有代表性,阳性标本应该随机选择,用 Kappa 检验判断两套检测系统一致性的强弱^[3-5]。

定性试验的重复性研究是检验测量临界值精密度的方法。检测高值的阳性标本或阴性低值是不合适的,因为它们的结果明显超出了医学决定值。而在临界值附近同一份标本常出现不一样的结果^[6],本试验根据 EP12-A 文件的重复性试验方法,评估浓度在临界值附近的标本的精确度,通过重复测量±20%临界值的标本是否在该检测方法的临界值 95%CI(重复测定临界值附近的标本,得到 95%阳性并且 95%阴性的结果的浓度范围,称为该检测方法的临界值的 95%CI)来评价该试验方法的精确度^[2]。

本研究在方法学对比中显示两套系统同时检测 HBV 的 5 项血清学标志物的结果一致性较强。在重复性试验中,±20%临界值的标本均在 95%CI 内,对于临界浓度不小于 20%的标本能够得到稳定的结果。临界值的 $CV_{\text{批内}}$ 值均在 10%左右, $CV_{\text{批间}} < 15\%$,说明 ADDCAER1100 全自动酶免工作站的稳定性和准确性符合临床标本检测要求,可运用于临床 HBV 的检测。

参考文献

[1] 中华医学会肝病分会,中华医学会感染学分会.慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J].中华肝脏病杂志,2011,19(1):13-24.

[2] NCCLS. User protocol for evaluation of qualitative test performance proposed guideline[S]. Wayne, PA, USA: NCCLS,2002.

[3] 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.

[4] 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. 2012.

[5] 黄妖娇,黄宪章,庄俊华,等. CLSI EP12-A2 文件在 HBeAb 定性检测性能评价中的应用[J]. 检验医学,2012,27(11):900-903.

[6] 陈桂三,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.

(收稿日期:2014-10-20 修回日期:2014-12-10)

(上接第 581 页)

[4] 辛友盼,田力,宋宁,等. 四川地区彝族 ABO 等 8 个血型的分子遗传学研究[J]. 中国输血杂志,2013,26(1):41-45.

[5] 周昌华. Duffy 抗原的研究进展[J]. 国际输血及血液学杂志,2011,34(5):246-248.

[6] He W, Neil S, Kulkarni H, et al. Duffy antigen receptor for chemokines mediates trans-infection of HIV-1 from red blood cells to target cells and affects HIV-AIDS susceptibility[J]. Cell Host Microbe,2008,4(1):52-62.

[7] Beck Z, Brown BK, Wieczorek L, et al. Human erythrocytes selectively bind and enrich infectious HIV-1 virions[J]. PLoS One,2009,4(12):e8297-e8300.

[8] 郑敬民,尹广. 达菲抗原——一个既老又新的多功能分子

[J]. 医学研究生学报,2010,23(5):551-556.

[9] 刘小丰,欧周罗,邵志敏. 汉族女性乳腺疾病患者的 Duffy 表型多态性与乳腺癌的关系[J]. 中国癌症杂志,2007,17(12):935-938.

[10] Woolley IJ, Hotm ire KA, Sramkoski RM, et al. Differential expressionof the Duffy antigen receptor for chemokines according to RBC age and FY genotype[J]. Transfusion,2000,40(8):949-953.

[11] Winkler CA, An P, Johnson R, et al. Expression of Duffy antigen receptor for chemokines (DARC) has no effect on HIV-1 acquisition or progression to AIDS in African Americans[J]. Cell Host Microbe,2009,5(5):411-413.

(收稿日期:2014-11-10 修回日期:2014-12-10)