

• 论 著 •

酶联免疫吸附法检测抗-HCV 结果不确定度的评估

黄永富¹, 尹静波¹, 曹兴建²

(1. 江苏省南通市瑞慈医院检验医学中心 226010; 2. 江苏省南通市临床检验中心 226000)

摘要:目的 利用单边检测原理,对丙型肝炎病毒抗体(抗-HCV)的结果不确定度进行评定,降低假阴性或假阳性结果判定的风险。**方法** 应用抗-HCV 酶联免疫吸附法诊断试剂盒,对样本中抗-HCV 检测结果的不确定度进行评定。**结果** 1 号样本检测结果有 62.70% 的可能性为阴性,37.30% 可能性为假阳性。而 3 号样本有 86.41% 的可能性为阳性,13.59% 的可能性为假阴性。**结论** 用包含有检测不确定度的结果对检测结果进行完整表述,可评价出现假阴性或假阳性检测判定结果的风险大小,值得临床推广应用。

关键词: 肝炎抗体, 丙型; 危险性评估; 测量不确定度

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.06.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)06-0629-02

Evaluation on the estimation of the uncertainty in the detection results of the anti-HCV antibody by ELISA

Huang Yongfu¹, Yin Jiangbo¹, Cao Xingjian²

(1. Department of Laboratory Medicine, Nantong Rich Hospital, Jiangsu Nantong 226010, China;

2. Laboratory Medicine Center of Nantong City, Jiangsu Nantong 226000, China)

Abstract: **Objective** With the theory of unilateral detection, the uncertainty of the determination of Anti-HCV antibody detected by ELISA method was evaluated to reduce the risks of false negative or positive result in serum HCV screening tests. **Methods**

According to the rule JJF1059-1999《The evaluation and expression of uncertainty in measurements》, we evaluated the uncertainty of the determination of HCV detected by ELISA kits made by Beijing Wantai Biological Pharmacy Enterprise Co., Ltd. **Results**

There was 62.70% possibility that the sample 1 test result was negative, 37.30% chance it was false positive. Whereas the result of the sample 3 with 86.41% potential chance was positive, with 13.59% chance was false negative. **Conclusion** The complete description of the outcomes, which is worth applying and generalizing in the clinical laboratories, of the detection with a finding of uncertainty measurement would provide the basis of scientific theory for avoiding false negative or positive results and evaluate the risks of false negative or positive results demonstrated.

Key words: hepatitis C antibodies; risk assessment; uncertainty measurement

《检测和校准实验室能力的通用要求》和《医学实验室质量和能力的特殊要求》等国际化标准体系中均提出了对测量结果不确定度的评定要求^[1]。目前,有关临床检验不确定度评定的应用报道很少,尤其是关于酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测抗-HCV 结果不确定度的评定。而 ELISA 法在现代临床检验中的应用具有一定代表性,因此,现通过对典型例子不确定度的分析和量化,建立 ELISA 法检测抗-HCV 结果不确定度的评定程序;通过对检测结果不确定度的评估进行完整的表达,避免或降低出现假阴性或假阳性结果的风险。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2007 年 1 月至 2010 年 4 月在瑞慈医院感染科门诊及住院部就诊的患者 80 例,男 45 例,女 35 例,年龄 0.75~94 岁。其中抗-HCV 阳性患者(S/CO>1.00)40 例,可疑患者(S/CO 0.85~1.00)10 例,阴性患者 30 例(S/CO<0.85),按 WS213-2001 和 AASLD 标准诊断^[2-3]。抗-HCV 标准物质液(GBW090074,2 NCU/mL)由康彻思坦生物公司提供,批号:200905002。

1.2 试剂 ELISA 法抗-HCV 检验诊断试剂盒,批号:C20091218,由北京万泰生物药业股份有限公司提供。微粒子酶免疫(MEIA)法抗-HCV 检测试剂盒和定标液,批号:84338SN03,美国雅培公司提供的 AxSYM™ System 免疫分

析仪的配套试剂。HCV RNA 荧光定量 PCR 检测试剂盒,批号:0900512019,上海科华生物工程股份有限公司提供。

1.3 仪器 Egate 2310 全自动微孔洗板机,2510 微孔振荡仪器,均由上海新波生物技术有限公司提供。AT-858 自动酶标分析仪由上海安泰分析仪器有限公司提供。Abbott AxSYM™ System 免疫分析仪由美国雅培公司提供。Lightcycler 实时荧光定量 PCR 仪由德国 Roche 公司提供。

1.4 方法 严格按 ELISA 法检测抗-HCV 标准化规程(SOP)操作。在 450 nm 和 630 nm(双波长)处,用空白孔调零后测定各孔 OD 值,并打印检测结果。

1.5 统计学处理 Microsoft Excel 2003 电子表格统计软件。

2 结果

2.1 被测量的数学模型 $CA = S/CO$ 式中:CA 为结论判定, S 为待测样本 OD 值,CO 为临界限值。cut off 值 = $NC_x + 0.2$,其中 OD 为吸光度,NC 为阴性质控对照 OD 值,NC_x 为阴性质控对照平均 OD 值,0.2 为修正系数。

2.2 结果判定 阴性对照 $OD \leq 0.02$,则以 0.02 计算;阴性对照 $0.02 < OD < 0.08$ 时,则计算阴性对照 OD 均值(NC_x),样本临界值等于 $NC_x + 0.12$ 。实验以阴性对照 $OD \leq 0.08$,阳性对照 $OD \geq 0.50$ 且临界值质控品检测结果为阳性,判定为此次检测有效。样本 OD 值 $S/CO \geq 1.00$ 者为抗-HCV 阳性,样本

OD 值 $S/CO < 1.00$ 者为抗-HCV 阴性。

2.3 不确定度来源 待测样本的 OD 值(S)和 CO 值是不确定度的主要来源。

3 讨论

用每个分量的标准不确定度除以检测结果的标准不确定度,得到每个分量不确定度的相对贡献率^[5-6]。由此可知,阴性质控对照与待测样本不确定度对检测结果不确定度的贡献都是不可忽视的。

抗-HCV 检测结果的报告:(1)当 $NC_1 = 0.019, 0.015, 0.017$ 时,小于 0.02 时以 0.02 计算, $NC_{1i} = NC_{1i} = 0.02, S_{nc1} = 0, CO_1 = 0.14, S_1 = 0.089$,重复性影响可以忽略。当 $P = 95.50\%$ 时,取扩展因子 $k = 2.0$,则有 $U = 2u(CA)$ 。所以 $U_1 = 2 \times u(CA_1) = 2 \times 0.024\ 407 = 0.048\ 813, U_2 = 2 \times u(CA_2) = 2 \times 0.054\ 197 = 0.108\ 394, U_3 = 2 \times u(CA_3) = 2 \times 0.477\ 329 = 0.954\ 658, U_4 = 2 \times u(CA_4) = 2 \times 0.059\ 093 = 0.118\ 185, U_5 = 2 \times u(CA_5) = 2 \times 0.022\ 989 = 0.045\ 979$ 。所以本组 5 例抗-HCV 检测结果在 95.50% 的可信区间内,1 号样本 S/CO 比值波动在 0.860 952~1.053 334 范围内 [$CA_{1i} (CA_1 \text{ range}) = CA_1 \pm U_1 = 0.957\ 143 \pm 0.096\ 191$],2 号样本波动在 9.431 923~11.539 51 范围内 ($10.485\ 714 \pm 1.053\ 791$),3 号样本波动在 0.972 154~1.191 256 范围内 ($1.081\ 705 \pm 0.109\ 551$),4 号样本波动在 1.537 249~1.883 710 范围内 ($1.710\ 480 \pm 0.173\ 231$),5 号样本波动在 0.408 103~0.500 061 范围内 ($0.454\ 082 \pm 0.045\ 979$)。若 $CA \geq 1$,判定为阳性反应;若 $CA < 1$,判定为阴性反应。1998 年美国疾病控制中心 (Centres for Disease Control and Prevention, CDC) 建议抗-HCV 筛检阳性需进一步采用补充实验 (如重组免疫印迹试验、免疫印迹试验或核酸试验、核酸检测) 验证后方可报告阳性^[7]。2003 年 CDC 修改了抗-HCV 检测报告程序,提出基于初筛实验 S/CO 值的补充实验方案^[8],这就明显降低了实验成本。CDC 指出 HCV 3.0 ELISA 试剂 95% 阳性预测值为 $S/CO \geq 3.8$ 。只有在重复检测结果 $S/CO > 3.8$ 的情况下才能报告抗-HCV 阳性,当 $S/CO < 3.8$ 时则有较高的假阳性率,需要免疫印迹试验、核酸检测法验证,尤其是处于灰区或 (和) 临界区附近的样本,以防假阳性和假阴性的发生。国产 ELISA 试剂由于包被抗原量不当、纯度低、酶标二抗体浓度过大等原因使其假阳性的 S/CO 值波动范围远比国外同类试剂大^[9]。所以建议国内试剂厂商在改善试剂质量的同时,在实验操作规程上应增设灰区 ($S/CO: 0.85 \sim 1.0$) 或 (和) 临界区 ($S/CO: 1.0 \sim 1.2$) 并在试剂盒内提供临界对照血清,以观察试剂的稳定性和灵敏度。本研究表明,1 号样本 S/CO 值 62.70% 的可能波动在 0.860 9521~1.0 之间,检测结果为阴性,37.30% 可能波动在 1.0~1.053 333 604 之间,检测结果为阳性;2、4 号样本 S/CO 值 100% 的大于 1.0,检测结果均为阳性;3 号样本 S/CO 值有 86.41% 的可能波动在 1.0~1.186 965 479 之间,检测结果为阳性,13.59% 的可能波动在 0.970 177 4~1.0 之间,检测结果为阴性;5 号样本 S/CO 值 100% 的小于 1.0,检测结果均为阴性。1~5 号样本在雅培 AxSYM 全自动化学发光免疫分析仪上用灵敏度和特异性更高的 MEIA 法验证,结果 S/CO 值分别

为 0.839、8.76、1.14、1.62、0.38,再在 Roche Lightcycler 实时荧光定量 PCR 仪上用 HCV RNA 定量检测试剂验证,结果分别为小于 10^3 、 8.92×10^7 、 3.81×10^4 、 2.63×10^5 、小于 10^3 copy/mL,它们的检测结果均与 ELISA 法一致。

ELISA 法检测抗-HCV 结果的不确定度分量及其相对贡献率的评估,通过对 80 例临床样本的分析发现临界值 (CO_1) 对 ELISA 法抗-HCV 的检测结果的 不确定度的分量为 ($0.001\ 013 \pm 0.000\ 600$),相对贡献率为 ($3.027\ 229 \pm 2.785$)%,待测样本吸光度值 (S_1) 对检测结果的不确定度的分量为 ($0.023\ 347 \pm 0.320\ 020$),相对贡献率为 ($17.766\ 431 \pm 2.972$)%,加酶标记物量 (E_1) 对检测结果的不确定度的分量为 ($0.005\ 393 \pm 0.007\ 393$)%,相对贡献率为 ($4.104\ 148 \pm 0.687$)%,底物 A、B 和终止液量 (b_1) 对检测结果的不确定度的分量为 ($0.004\ 660 \pm 0.006\ 388$)%,相对贡献率为 ($3.546\ 190 \pm 0.593$)%,样本加样量 (C_1) 对检测结果的不确定度的分量为 ($0.021\ 490 \pm 0.029\ 457$)%,相对贡献率为 ($16.353\ 362 \pm 2.736$)%,酶标仪准确性 (R_1) 对检测结果的不确定度的分量为 ($0.005\ 697 \pm 0.007\ 809$)%,相对贡献率为 ($4.335\ 220 \pm 0.725$)%。因此,ELISA 法测定抗-HCV 的不确定度分量的构成及其相对贡献率的评估可作为 ELISA 法检测抗-HCV 的过程能力分析和控制的影响该法质量因素的依据。

参考文献

- [1] ISO and CEN. Quality Management In The Medical Laboratory [S]. Clin Chim Acta, 2001, 309(2): 121-125.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 丙型肝炎病毒性肝炎诊断及处理原则 (WS213-2001) [S]. 北京: 中国标准出版社, 2002: 1-4.
- [3] Strader DB, Wright T, Thomas DL, et al. Diagnosis, management and treatment of hepatitis C. AASLD (American Association for the Study of Liver Diseases) PRACTICE GUIDELINE [J]. Hepatology, 2004, 39(4): 1147-1170.
- [4] 国家质量监督检验检疫总局. 中华人民共和国国家计量检定规程—移液器 [S]. 北京: 中国计量出版社, 2007: 1-13.
- [5] Dimech W, Francis B, Kox J, et al. Calculating Uncertainty of measurement for serology assays by use of precision and bias [J]. Clinical Chemistry, 2006, 52(4): 526-529.
- [6] White GH, Farrance I. Uncertainty of Measurement in Quantitative Medical Testing—A Laboratory Implementation Guide [J]. Clin Biochem Rev, 2004, 25(4): 1-24.
- [7] Center for Disease Control and Prevention. Recommendation for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease [J]. MMWR, 1998, 47(6): 1-33.
- [8] Alter MJ, Kuhnert WL, Finelli L. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus [J]. MMWR Recomm Rep, 2003, 52(3): 1-13.
- [9] 谷金莲, 祁自柏, 王尊文, 等. 丙型肝炎病毒抗体试剂检测结果的可信度分析 [J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(6): 580-583.

(收稿日期: 2010-05-10)