· 检验试剂评价 ·

国产 HBsAg、抗-HCV ELISA 诊断试剂盒质量的初步评估

王德付[1,2]，蔡晓波[2]，孟小敏[1]，曹向东[1]

（1. 江苏省姜堰市人民医院输血科　225500；2. 江苏省泰州市中心血站检验科　225300）

摘　要：目的　对国产 HBsAg、抗-HCV ELISA 诊断试剂盒质量进行初步评估，为试剂选用提供参考依据，以期寻求高质量适合实验室的 ELISA 诊断试剂，确保临床输血安全。**方法**　用“批批检定”合格的试剂对阳性、弱阳性和阴性血清考核盘进行检测。**结果**　各厂家试剂在灵敏度、特异性、孔间变异系数、阴性及阳性符合率各指标有差异，质量有一定差距。不同厂家试剂有差异，同一厂家不同批号的试剂也有差异。**结论**　使用单位在试剂使用前应进行抽检，综合分析抽检结果，选择最佳试剂进行血清学标志物检测，以降低 HBV、HCV 感染经输血传播的可能性。

关键词：酶联免疫吸附测定；　肝炎表面抗原，乙型；　肝炎抗体，丙型；　敏度性与特异性；　“钩状”效应；　输血

DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2011.21.048　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2011)21-2528-03

HBsAg、抗-HCV 是肝炎血清学标志物，酶联免疫吸附试验（ELISA）是目前国内血站用于筛查献血员血清学标志物最主要的检测手段，对血站来说，选择高质量合格适合本实验室 ELISA 的诊断试剂是确保输血安全的关键因素。参照参考文献[1]，对本站 2007 年 6 月至 2008 年 8 月所购进的国产 HBsAg、抗-HCV ELISA 法诊断试剂对灵敏度、特异性、精密度进行初步评估，现将结果报道如下。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　血清考核盘（panel）　（1）HBsAg 血清盘：HBsAg 国家参考品血清（已知 50 份阳性、50 份阴性），灵敏度参考品血清 8 份（0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、10 000.0 ng/mL，其中 0.5 ng/mL 包含 adw、adr、awy 各 1 份），均购自中国药品生物制品检定所；（2）抗-HCV 血清盘：抗-HCV 参考品血清（2 NCU/mL，卫生部临检中心免疫室，批号 0702），自制灵敏度参考品血清 4 份（将 2 NCU/mL 参考品血清用阴性血清稀释成 1∶2，1∶4，1∶8，1∶16 倍），阳性参考品血清 25 份，阴性参考品血清 25 份。

1.1.2　试剂　均为中国药品生物制品检定所“批批检定”合格并贴有防伪标签的国产 ELISA（HBsAg、抗-HCV）试剂盒，分别以 A、B、C 代表不同生产厂家。其中 HBsAg 试剂盒除了 A 厂家是一步法外，均为夹心两步法。

1.1.3　仪器　Microlab STAR 全自动加样器（瑞士），Microlab FAME 全自动酶免分析系统（瑞士），Anthos 340rt 酶标仪（澳大利亚）。

1.2　方法及结果判断　严格按试剂说明书操作绘制质控图。OD＞cut off 值为阳性，OD＜cut off 值为阴性。

1.3　试剂评价方法　灵敏度，特异性，符合率，约登指数。

2　结　　果

2.1　3 份不同亚型 HBsAg 灵敏度参考品血清（0.5 ng/mL）的检测结果　见表 1。

2.2　不同厂家 HBsAg 试剂（HBsAg 1 ng/mL）、抗-HCV 试剂（抗-HCV 2 NCU/mL）孔间变异系数（精密度）的检测结果　3 种厂家精密度均符合《中国生物制品规程（2000 年版）》所规定的标准，均 $CV \leqslant 15\%$，但各厂家各批号间乃存在一定差异。HBsAg 试剂：B 厂家 CV 值相对 C 厂家相差 2.59 倍（11.80/4.55）；抗-HCV 试剂：B 厂家相对 A 厂家 CV 值相差 2.15 倍（14.92/6.93），其中 A 厂家批间 CV 值相差 2.05 倍（14.92/7.27）。见表 2。

表 1　3 份不同亚型 HBsAg 国家参考品血清（0.5 ng/mL）的检测结果

试剂（批号）	adw	adr	awy
A1（2006115114）	＋	＋	－
A2（2007045105）	＋	＋	－
B1（20070303）	＋	＋	＋
B2（20070304）	＋	＋	＋
C1（B20071119）	＋	＋	＋
C2（B20080305）	＋	＋	＋

表 2　不同厂家、不同批号对参考品血清孔间变异系数（精密度）的检测结果

项目	试剂（批号）	$\bar{x}(n \geqslant 10)$	s	CV（%）
HBsAg	A1（2006115114）	1.167	0.097	8.31
	A2（2007045105）	1.213	0.087	7.17
	B1（20070303）	1.462	0.074	5.06
	B2（20070304）	1.494	0.068	4.55
	C1（B20071119）	1.245	0.134	10.76
	C2（B20080305）	1.398	0.165	11.80
抗-HCV	A1（20061202-8）	1.307	0.095	7.27
	A2（20070202-8）	1.119	0.167	14.92
	B1（2007045804）	1.327	0.092	6.93
	B2（2007015801）	1.420	0.099	6.97
	C1（20071115）	1.074	0.093	8.66
	C2（20080301）	1.141	0.105	9.20

2.3　不同厂家对 50 份阳性、阴性参考品血清符合情况　HBsAg 试剂盒：除 A1（2006115114）对 25 份阳性参考品血清检测 1 例漏检外，其余厂家阳性符合率、阴性符合率、总符合率均是 100%；抗-HCV 试剂盒：各厂家总符合率均在 95% 以上，除 B 厂家外，其余厂家试剂灵敏度、特异性均存在一定的差异，见表 3。

表 3　不同厂家 HBsAg、抗-HCV 试剂对 50 份阳性、阴性参考品血清符合情况

项目	试剂(批号)	阳性符合率 (n=25,%)	阴性符合率 (n=25,%)	总符合率 (n=50,%)	约登(Youdeu)指数
HBsAg	A1(2006115114)	96	100	98	0.96
	A2(2007045105)	100	100	100	1.00
	B1(20070303)	100	100	100	1.00
	B2(20070304)	100	100	100	1.00
	C1(B20071119)	100	100	100	1.00
	C2(B20080305)	100	100	100	1.00
抗-HCV	A1(20061202-8)	96	100	98	0.96
	A2(20070202-8)	96	100	98	0.96
	B1(2007045804)	100	100	100	1.00
	B2(2007015801)	100	100	100	1.00
	C1(20071115)	92	100	96	0.92
	C2(20080301)	96	96	96	0.92

2.4　不同厂家、不同批号的 HBsAg 试剂对灵敏度参考品血清 S/CO 结果　3 个厂家试剂在 HBsAg 浓度 1.0～10.0 ng/mL 范围内成一定线性关系,但 A 厂家 HBsAg 试剂在强阳性血清盘(10 000 ng/mL)出现了假阴性结果。见表 4。

表 4　不同厂家不同批号的 HBsAg 试剂对灵敏度参考品血清 S/CO 结果

试剂(批号)	0.5 ng/mL	1.0 ng/mL	2.0 ng/mL	5.0 ng/mL	10.0 ng/mL	10 000.0 ng/mL
A1(2006115114)	0.99	1.16	1.62	4.30	8.90	0.82*
A2(2007045105)	1.02	1.20	1.78	4.45	8.54	0.79*
B1(20070303)	1.07	1.48	2.36	6.35	11.76	28.71
B2(20070304)	1.10	1.51	2.45	6.52	12.19	31.64
C1(B20071119)	0.99	1.27	1.84	4.13	7.92	13.60
C2(B20080305)	1.01	1.32	1.90	4.09	7.02	18.04

*:HD-Hookeffect 导致出现假阴性结果。

2.5　不同厂家各批号抗-HCV 试剂对同一稀释度参考品血清的结果　各厂家试剂对于 2 NCU/mL 参考品血清的 S/CO 值相差较大,最高比值与最低比值相差 2.75 倍(9.6/3.49),相比 A、C 厂家,B 厂家试剂灵敏度最高,能检出 1∶8 稀释度(0.25 NCU/mL)的参考品血清,其抗-HCV 的 A 值与稀释的抗体浓度成一定的线性关系。见表 5。

表 5　不同厂家各批号抗-HCV 试剂对同一稀释度参考品血清的结果

试剂(批号)	2.000 NCU/mL			1.000 NCU/mL		0.500 NCU/mL		0.250 NCU/mL		0.125 NCU/mL	
	CO	A	S/CO	A	S/CO	A	S/CO	A	S/CO	A	S/CO
A1(20061202-8)	0.250	1.352	5.41(+)	0.821	3.24(+)	0.286	1.14(+)	0.097	0.38(−)	0.026	0.10(−)
A2(20070202-8)	0.234	1.287	5.50(+)	0.702	3.00(+)	0.259	1.11(+)	0.105	0.44(−)	0.018	0.07(−)
B1(2007045804)	0.154	1.320	8.57(+)	0.701	4.56(+)	0.291	1.89(+)	0.162	1.05(+)	0.060	0.38(−)
B2(2007015801)	0.149	1.431	9.60(+)	0.757	5.08(+)	0.278	1.86(+)	0.153	1.02(+)	0.054	0.36(−)
C1(20071115)	0.312	1.089	3.49(+)	0.571	1.83(+)	0.250	0.80(−)	0.117	0.37(−)	0.047	0.15(−)
C2(20080301)	0.308	1.125	3.65(+)	0.584	1.89(+)	0.263	0.85(−)	0.101	0.33(−)	0.032	0.10(−)

3　讨　论

目前,国产 ELISA HBsAg、抗-HCV 已由第 1 代产品发展到第 3 代产品,试剂盒的质量有了较大提高,使临床输血后 HBV 和 HCV 感染率得到了有效控制,但由于 ELISA 方法本身的设计局限性,如只能检测到 ng 水平,批间 *CV* 较大,线性范围窄(一个数量级),存在“钩状”效应。因此,要提高对 HBV 和 HCV 的检测能力需要高质量(灵敏度高、特异性强、重复性好)的 ELISA 诊断试剂盒。

HBsAg 有 4 种亚型(adw、adr、ayw、ayr),有明确的地理和民族分布特征,具有流行病学意义。2000 年《中国生物制品规程》对国产 HBsAg 试剂盒(ELISA)最低检出量提出了更高的要求,要求 HBsAg adr 亚型的最低检出量不高于 0.5 ng/mL,adw 和 awy 亚型的最低检出量不高于 1.0 ng/mL,对判断试剂盒的质量及其稳定性具有重要的参考价值[2],如使用 HBsAg 1ng/mL 的临界值血清考核盘可以直接显示试剂盒灵敏度,用 HBsAg 2ng/mL 参考品血清检测时 S/CO>1.5,可判为试剂盒合格。本研究中各厂家对 HBsAg 2 ng/mL 参考品血清的 S/CO>1.5,只是 A 厂家 HBsAg 试剂盒对 HBsAg ayw 亚型有漏检,究其原因,可能与 A 厂家 HBsAg 试剂盒的包被成分有关,或者因 0.5 ng/mL ayw 亚型灵敏度不高所致。此外,A 厂家的 HBsAg 一步法试剂盒对 10 000.0 ng/mL 的考核盘出现假阴性结果表明,A 厂家的 HBsAg 试剂盒存在着严重的高值“钩状”效应。有文献表明,选用一步法试剂盒容易造成“钩状”效应而漏检,一年的漏检率为 0.12%[3]。也有研究者使用两步法克服“钩状”效应取得了很好的效果[4]。陶洪群和叶剑彪[5]用两步法将测定的灵敏度由一步法的 1.0 ng/mL 提高到两步法的 0.2 ng/mL。B 厂家 HBsAg 抗-HCV ELISA 试剂盒在同一临界值血清考核盘(HBsAg 1 ng/mL、抗-HCV 2 NCU/mL)的浓度下,S/CO 值越大,试剂的灵敏度越高。

目前,HCV 的检测已经使用第 3 代抗-HCV ELISA 试剂,其包被抗原多,包括 HCV-core、NS3、NS4 和 NS5 抗原,大部分为基因工程生产的抗原,特异性和灵敏度均达 99%。但由于厂家使用 HCV 基因重组抗原的质量和各抗原片段包被比例不同,使各厂家试剂的灵敏度和特异性存在一定差异,从而导致抗-HCV 检测结果的不一致,产生漏检、假阳性等情况[6]。本研究 B 厂家试剂盒测的 cut off 值分别为:0.154、0.149,与分布交叉法确定的截断点 0.140 接近,A、C 厂家试剂盒所规定的 cut off 值都高于其分布交叉法确定的截断点,所以灵敏

度比 B 厂家低。由于 ELISA 测定通常的批间 *CV* 约为 20%，有研究发现的抗-HCV 阴性，但 RIBA 单片段阳性和 HCV RNA 阳性的血液标本其 S/CO 值均在 0.8～0.9 之间，为了减少输血后 HCV 感染的发生，有必要将抗-HCV ELISA 测定的 cut off 值下移 20%，因为 S/CO 比值接近 cut off 值的血液有很大可能为 HCV 感染者[7-8]，实际上所有感染的个体均经过了灰带区。C 厂家两批号抗-HCV 试剂(20071115、20080301)对 2 NCU/mL 参考品血清的 Cut off 值分别为：0.312 和0.308 下移 20%，对于 1∶4 稀释度(0.5 NCU/mL)的 OD 值0.250和 0.263，将会出现阳性结果。因此，建议血站在筛检献血者血液时，可将抗-HCV ELISA 的 cut off 值下移 20%，这对于灵敏度相对较差但批批检定合格的试剂来说，可一定程度减少 HCV 经输血的传播。

批批检定只是试剂进入市场的“过关评价”，是试剂质量的最低要求。免疫诊断试剂是一种生物制品，具有生物活性，影响质量的因素，如选用包被成分不同、生产工艺各异、试剂储藏和运输，有效期等较多，从试剂生产者到操作者，中间任何环节出现问题都会影响试剂质量。有研究表明，利用不同厂家试剂两两组合后灵敏度均能提高 98.6%，甚至达到 100%[9]。2006 年颁布的《血站质量管理规范》明确规定血站必须对试剂进行评审、质量控制，利用血清考核盘对试剂灵敏度、特异性进行评估，从中选出最佳的初、复检试剂组合尽可能降低经输血感染 HBV、HCV 的概率。

参考文献

[1] 季阳. 免疫诊断试剂的评价//王培华. 输血技术学[M]. 2 版. 北京：人民卫生出版社，2002：99-100.

[2] 中国生物制品标准委员会. 中国生物制品规程 2000 年版[M]. 北京：化学工业出版社，2006：572-574.

[3] 李金明. 临床 ELISA 试剂盒的选用和质检[J]. 临床检验信息，1998，5(2)：58

[4] 单桂秋，李秋生，肖韶英，等. 检测乙型肝炎表面抗原的一步法试剂的钩状效应分析[J]. 中华检验医学杂志，2002，25(2)：107-108.

[5] 陶洪群，叶剑彪. RIBA 与 ELISA 检测血清 HBsAg 的结果比较[J]. 江西医学检验，2002，20(6)：323.

[6] 姚仁南，陈复兴，黄晓静，等. 两种试剂检测抗-HCV 在丙型肝炎诊断中的意义[J]. 临床输血与检验，2009，11(1)：21.

[7] 穆士杰，张献清，孙文利，等. 三种抗-HCV 检测试剂盒对无偿献血者筛检价值评价[J]. 第四军医大学学报，2004，25(12)：1123.

[8] 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检中的意义[J]. 中华检验医学杂志，2004，27(10)：663.

[9] 高艳，陈志强，麦永平，等. 3 组国产 ELISA 抗-HCV 初复检试剂的检测效果评价[J]. 国际检验医学杂志，2010，7(31)：743.

(收稿日期：2010-10-09)

·检验试剂评价·

三家单克隆抗 A(B)血型试剂的质量分析

杨　夏[1]，王晓岚[2]

(1. 新疆乌鲁木齐兵团中心血站质管科　830002；2. 新疆医科大学第一附属医院检验科，乌鲁木齐 830002)

摘　要：目的　检测 3 家国产单克隆抗 A(B)试剂质量，观察其对 ABO 血型检测的影响。**方法**　测定 3 家单克隆抗 A(B)试剂效价、亲和力、特异性、冷凝素、不规则抗体、溶血活性、试剂容量及细菌监测情况。**结果**　Ⅰ公司试剂各项检测结果都优于其他公司，其产品效价最高，亲和力好，Ⅱ公司和Ⅲ公司效价相同，均高于国家标准要求，Ⅱ公司亲和力未达标，Ⅲ公司亲和力处于标准的边缘。3 家公司试剂的特异性、冷凝素、不规则抗体、溶血活性、试剂容量和细菌监测检测情况均合格。**结论**　目前市场销售的单克隆抗 A(B)血型定型试剂总体质量尚可，但存有差异。购买单克隆抗 A(B)试剂前应进行性能评估；已使用的试剂宜及早补做亲和力测定；使用期间应定期测定其效价和亲和力；血型鉴定必须用 ABO 反定型试验复核。

关键词：ABO 血型系统；　质量控制；　单克隆试剂；　抗 A(B)

DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2011.21.049　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2011)21-2530-03

随着现代生物科技的发展，多克隆抗 A(B)由于种种原因已少有使用，单克隆抗 A(B)试剂替代多克隆抗 A(B)的角色成为 ABO 血型鉴定的常规试剂。献血者及患者血型鉴定的准确性与试剂的质量密切相关。国外文献及国内文献均有报道，单抗 A(B)试剂由于质量问题可引起 ABO 血型鉴定假阳性和假阴性的误判[1-4]。因此，单克隆抗 A(B)的检测性能及质量必须加以关注，为了解不同公司生产的试剂对 ABO 血型鉴定的影响，笔者对 3 家公司生产的单克隆抗 A(B)试剂的效价、亲和力、特异性、冷凝集素、不规则抗体、溶血活性及其他质量指标进行了检测，现总结报道如下。

1　材料与方法

1.1　材料　取 A_1、A_2、A_2B、B 型各 3 名献血者红细胞，同型混合，O 型 10 名献血者红细胞，用生理盐水洗涤 3 遍，并以生理盐水配成 2%和 10%的红细胞悬液，4 ℃中可保存 3 d。2%和 10%分别用于玻璃试管法和玻片法。试剂谱细胞、抗球蛋白、抗-A_1、受检标准血清Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ3 家公司生产的单克隆抗 A(B)血型定型试剂都在有效期内，具有国家生产批准文号及“批批检定”合格。以 4 ℃为贮存条件。

1.2　方法及判定标准

1.2.1　效价测定　将试管排成 2 行(平行测定)，每行 10 支，每管加 1 mL 生理盐水，将待检血清以 2 倍系列稀释，将稀释后抗 A、抗 B 试剂从 1∶32 稀释度起，各稀释度分别取 2 管每管 0.1 mL，加入相应红细胞 0.1 mL，置 18～22 ℃中 15 min，150 g 离心 1 min，肉眼观察，效价滴度以产生“1＋”凝集的待检