

• 检验技术与方法 •

3 种酶联免疫吸附试验试剂检测丙型肝炎抗体结果分析

武丽娟

(安阳市中心血站,河南安阳 455000)

摘要:目的 通过对国产 3 种丙型肝炎病毒(HCV)抗体检测试剂盒间接法和夹心法检测的结果比较,分析评价双抗原夹心法试剂的性能。**方法** 设计不同的试验方法,用 3 种试剂对收集的阳性和阴性标本进行丙型肝炎病毒抗体检测,对单试剂和双试剂呈阳性反应的标本同时进行第三组重组免疫印迹试验(RIBA)和核酸检测;另外,用已知浓度的质控物倍比稀释后,用 3 种试剂平行检测。对得到的所有检测结果进行比对,综合分析。**结果** 与确证试剂相比,2 种间接法试剂和 1 种夹心法试剂的假阳率分别为 42.2%、57.8% 和 1.6%,阳性检出率均为 100%,但夹心法的分析灵敏度比间接法高 1~4 倍。**结论** 夹心法 ELISA 检测试剂在灵敏度、特异性方面优于间接法 ELISA 检测试剂。

关键词:丙型肝炎病毒; 双抗原夹心法; 间接法; 酶联免疫吸附试验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.23.041

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)23-3246-03

Analysis on results of hepatitis C antibody detection by three kinds of ELISA reagents

Wu Lijuan

(Anyang Municipal Central Blood Station, Anyang, Henan 455000, China)

Abstract; Objective To analyze and evaluate the performance of the double antigen sandwich method reagents by comparing the detection results of three kinds of domestic hepatitis C virus(HCV)antibody detection kits with indirect method and sandwich method. **Methods** The different test methods were designed. The HCV antibody detection by using three kinds of reagents was performed on the collected positive and negative specimens and those specimens with positive reaction by the single and dual reagents were simultaneously performed the recombinant immunoblot assay(RIBA)and the nucleic acid detection;in addition, after the multiple proportion dilution, the quality control material with known content was parallelly detected with three kinds of reagents. All the detection results were conducted the comparison and the comprehensive analysis. **Results** Compared with the confirmation reagent, the false positive rates of two kinds of indirect method reagent and one kind of sandwich method reagent were 40.9%, 59.1% and 2.2% respectively. Their positive rates were 100%, but the analytical sensitivity of the sandwich method was higher than that of the indirect method by 1~4 times. **Conclusion** The sandwich ELISA reagent is significantly superior to the indirect ELISA reagent in the aspects of sensitivity and specificity.

Key words: hepatitis C virus; double antigen sandwich method; indirect method; enzyme linked immunosorbent assay

丙型肝炎病毒(HCV)为单股正链 RNA 病毒,属于黄病毒科。自 1989 年美国专家从受感染的黑猩猩血液中首次分离出 HCV^[1],到现在全球已报道有 1.7 亿 HCV 感染者,每年有 300~400 万新发感染病例^[2]。丙型肝炎病毒所致的丙型肝炎(丙肝)是一种危害严重的传染病,急性 HCV 感染者约 75%~85% 将发展为慢性感染,20~25 年以后 20% 的患者可能进展为肝纤维化、终末期肝病和肝癌^[3~5]。为了解检测 HCV 抗体的酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂的性能特点,本次研究采用 2 个不同试剂厂家生产的间接法 HCV 抗体诊断试剂和另一个试剂厂家生产的双抗原夹心法 HCV 抗体诊断试剂对同样的标本进行检测,同时与第三组重组免疫印迹试验(RIBA)检测结果和核酸检测结果比对,从统计学角度对 3 种试剂的检测效果进行综合比较。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本 对安阳市中心血站 2013 年 4~6 月接收的 15 819 分标本采用 2 种间接法 HCV 抗体诊断试剂进行抗-HCV 检测后,从阴性标本随机抽取 1 600 份收集其血清,同时收集 80 份阳性的标本血清,备用。

1.2 试剂 ELISA 试剂:3 个厂家生产的抗-HCV ELISA 试剂分别用 A、B、C 表示,A 试剂反应原理为间接法,批号:201209004、201212005;B 试剂反应原理为间接法,批号:2012050708、2012071008、2012081208、2012101408;C 试剂反

应原理夹心法,批号 CS20130101。确证试剂:聚合酶链反应(PCR)试剂采用深圳达安丙肝病毒核酸试剂盒,批号:2012005、2012006、2013003;免疫印迹法检测试剂采用美国强生 RIBA 试剂,批号:EXEL95,EXE203。

1.3 设备 全自动加样仪(STAR 8CH,瑞士哈美顿公司);全自动酶联免疫后处理系统(FAME24/20,瑞士哈美顿公司);全自动酶免一体机(深圳爱康公司);美国 XP3000 扩增仪。

1.4 方法

1.4.1 献血者标本分别用试剂 A 和试剂 B 进行常规抗-HCV 抗体的 ELISA 初复检检测,严格按照试剂盒说明书操作,灰区设置范围 $\text{cut off} \times 0.7 \leq \text{标本 OD 值} < \text{cut off}$ 。任一试剂检测标本的 OD 值处于灰区范围,判为待复查,用试剂 A、B 同时进行双孔复查,双试剂 4 孔 OD 值均 $< \text{cut off}$ 判为阴性,双试剂所有孔 OD 值 $\geq \text{cut off}$ 判为阳性,其他情况判为弱阳。

1.4.2 将收集的弱阳和阳性的标本 80 份和阴性标本 1 600 份,共 1 680 份,分装后用试剂 C 采用夹心法进行平行检测,严格按照试剂盒说明书操作,灰区设置范围同间接法试验设置。所有标本中任意一份标本 OD 值处于灰区范围,用该试剂双孔复查。得到的结果与试剂 A、B 的检测结果进行比对。

1.4.3 由试剂 A、B 检测结果判为弱阳和阳性的 80 份标本进行 PCR 和 RIBA 检测,以确定该标本中是否含有 HCV 病毒。同时用 3 种 ELISA 试剂检测结果和确证结果进行比对。

1.4.4 把浓度为 1 Ncu/mL 的质控血清倍比稀释到 512 倍, 得到 9 份自制标本, 连同质控血清原管共 10 份。分别用 3 种试剂 A、B、C 对这一组标本平行检测, 把得到的检测结果进行比对。

1.4.5 把 RIBA 试验结果为阳性的标本用 3 种 ELISA 试剂检测, 得到的 S/CO 值进行比较。

1.5 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件, 数据采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 或 < 0.01 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 间接法 ELISA 检测和夹心法 ELISA 检测情况对比 间接法 ELISA 试剂 A、试剂 B 和夹心法 ELISA 试剂 C 对 1 680 份标本检测情况比较来看, 2 种间接法试剂检测为阴性的 1 600 份标本进行夹心法检测, 结果均为阴性, 特异性 100%。但是计算每种试剂的检测阳性率, 夹心法 ELISA 试剂 C (0.8%) 明显低于间接法 ELISA 试剂 A 和试剂 B (2.3% 和 3.2%), 见表 1。

表 1 夹心法试剂 C 与间接法试剂 A、B 的结果比较(n)

| 试剂 A 和试剂 B | 标本数量 | 试剂 C 检测结果 | | HCV-RNA |
|------------|-------|-----------|-------|---------|
| | | 阳性 | 阴性 | |
| 单试剂 A 阳性样本 | 27 | 0 | 27 | |
| 单试剂 B 阳性样本 | 41 | 1 | 40 | |
| 双试剂阳性样本 | 12 | 12 | 0 | |
| 双试剂阴性样本 | 1 600 | 0 | 1 600 | |
| 合计 | 1 680 | 13 | 1 667 | |

2.2 80 份 ELISA 间接法阳性标本的 ELISA 夹心法及核酸检测情况 80 份 ELISA 间接法试剂检测为阳性或弱阳的标本进行 ELISA 夹心法试剂检测、RIBA 试剂检测和 HCV-RNA 检测。80 份标本用 RIBA 检测, 阴性 64 份, 阳性 12 份, 可疑 4 份, 经核酸检测 12 份阳性也为阳性, 4 份可疑结果为阴性。RIBA 检测结果阳性的 12 份标本, 3 种酶免试剂均能检出, 但是 ELISA 间接法试剂 A 和 B 的假阳性率 (分别 42.2% 和 57.8%) 明显高于 ELISA 夹心法试剂 C (1.6%); 并且, 3 种试剂检测结果分别和确证结果比较, 其夹心法试剂符合率明显高于另外两种间接法试剂, 见表 2。

表 4 3 个厂家 A、B、C 试剂质控血清检测的灵敏度比较(%)

| 试剂 | 定值质控品倍比稀释后结果(S/CO) | | | | | | | | | |
|--------|--------------------|-------|-------|-------|-------|------|------|-------|-------|-------|
| | 原管 | 2 倍 | 4 倍 | 8 倍 | 16 倍 | 32 倍 | 64 倍 | 128 倍 | 256 倍 | 512 倍 |
| A(间接法) | 1.48 | 0.49 | 0.07 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| B(间接法) | 4.65 | 2.98 | 1.44 | 0.95 | 0.57 | 0.12 | 0.05 | 0.04 | 0.02 | 0.02 |
| C(夹心法) | 29.40 | 29.50 | 25.00 | 16.90 | 10.10 | 5.22 | 2.89 | 1.10 | 0.57 | 0.13 |

试剂 C 与试剂 A 和试剂 B 比较: $\chi^2 = 16.584, P < 0.01$ 。

表 5 3 个厂家 A、B、C 试剂阳性标本检测灵敏度比较(%)

| 标本号 | 试剂 A(间接法) | 试剂 B(间接法) | 试剂 C(夹心法) |
|-----|-----------|-----------|-----------|
| P1 | 4.8 | 6.1 | 12.3 |
| P2 | 3.9 | 4.6 | 14.1 |
| P3 | 5.5 | 5.0 | 12.4 |
| P4 | 11.2 | 12.6 | 15.4 |
| P5 | 3.1 | 5.6 | 10.6 |
| P6 | 4.6 | 5.0 | 12.8 |
| P7 | 2.3 | 4.8 | 9.7 |
| P8 | 4.2 | 6.4 | 14.9 |
| P9 | 4.0 | 5.9 | 11.3 |
| P10 | 3.8 | 7.2 | 13.5 |
| P11 | 4.5 | 3.8 | 10.1 |
| P12 | 8.9 | 6.6 | 8.9 |

试剂 C 与试剂 A 和试剂 B 比较: $\chi^2 = 21.924, P < 0.01$ 。

表 2 80 份间接法抗-HCV 阳性和弱阳性标本
几种试剂检测结果比较

| RIBA 结果 | 标本 数量 | 试剂 A (间接法) | 试剂 B (间接法) | 试剂 C (夹心法) | HCV-RNA |
|------------|----------|---------------|---------------|---------------|---------|
| 阴性 | 64 | 27(42.2%) | 37(57.8%) | 1(1.6%) | 0 |
| 阳性 | 12 | 12(100%) | 12(100%) | 12(100%) | 12 |
| 可疑 | 4 | 1(25%) | 3(75%) | 0(0%) | 0 |
| 与确证结果符合率 | | 65.0% | 48.8% | 98.8% | 100% |

试剂 C 与试剂 A 和试剂 B 比较: $\chi^2 = 21.258, P < 0.01$ 。

2.3 3 个厂家 A、B、C 试剂检测出阳性标本的准确度比较 试剂 A 用间接法检出的 39 份阳性标本中, 有 12 份确证为真阳性, 占阳性标本检出量的 30.8%; 试剂 B 同样采用间接法检出的 52 份阳性标本中, 也只有 12 份确证为真阳性, 占阳性标本检出量的 23.1%; 而试剂 C 用夹心法检出的 13 份阳性标本中, 有 12 份确证为真阳性, 占阳性标本检出量的 92.3%。数据表明试剂 C 用夹心法对阳性标本检测的准确度远高于另外两种间接法试剂, 见表 3。

2.4 间接法和夹心法灵敏度的比较情况 利用质控血清比较 3 种试剂, 试剂 A 间接法检测只有原管能检测出, S/CO 值为 1.48; 试剂 B 间接法检测到 4 倍稀释, S/CO 值为 1.44, 8 倍稀释管结果处于灰区范围; 试剂 C 夹心法检测到 128 倍稀释, S/CO 值为 1.10, 见表 4。把 RIBA 实验结果为阳性的 12 份标本用 3 种试剂检测得到的 S/CO 值进一步进行比较, 夹心法试剂 C 检测数据值明显高于间接法试剂 A 和 B 的检测数据, 表现出更高的灵敏度, 见表 5。

表 3 3 个厂家 A、B、C 试剂检测出阳性标本的准确度比较

| 酶免试剂种类 | 检出阳性 | | 真阳性 标本比例(%) |
|-----------|------|------|----------------|
| | 标本数量 | 标本数量 | |
| 试剂 A(间接法) | 39 | 12 | 30.8 |
| 试剂 B(间接法) | 52 | 12 | 23.1 |
| 试剂 C(夹心法) | 13 | 12 | 92.3 |

试剂 C 与试剂 A 和试剂 B 比较: $\chi^2 = 8.252, P < 0.05$ 。

3 讨 论

国内一般人群 HCV 抗体流行率为 3.2%^[6], 约有 4 000 万例 HCV 感染者。HCV 已经成为全世界范围内的公共卫生问题之一, HCV 的一个重要的传播途径是经输血或血液制品传播^[7]。由于还没有 HCV 疫苗, 目前对相关人员进行筛查及早期诊断成为控制丙型肝炎发生和传播重要手段, 而在发展比较成熟的抗体检测、抗原检测和核酸检测等方法中, 基于丙肝抗体在血液中能长期稳定存在的特性, 采用 ELISA 法对丙肝抗体进行检测成为目前主要筛查手段。因此, 现在应用的 ELISA 检测试剂的质量是否可靠显得至关重要。

夹心法试剂 C 是一种检测丙型肝炎抗体的 ELISA 试剂, 可作为抗 HCV 的筛查试剂对相关人员进行筛查及患者的早期诊断。本次研究设计了多项试验, 通过对有关标本的平行检测, 旨在与间接法 ELISA 试剂的检测结果进行比较和分析, 对夹心法试剂 C 进行综合评价。在间接法 ELISA 试验中, 由于

间接法 ELISA 用酶标记抗人 IgG 作为第二抗体来检测血清中是否存在 HCV IgG 抗体,而 IgG 抗体出现在体内出现时间晚于 IgM 抗体,献血者在感染早期采集的血液容易被漏检。同时,为了避免血清中其他非特异性抗体和类风湿因子的干扰,试验的第一步需要通过降低检测样本量和稀释样本的方法来降低反应的板底值,而这种方法也会导致一定程度上降低试剂的检测灵敏度。另一方面,在间接法 ELISA 试验过程中,容易受到非特异性抗体的影响,比如非特异性 IgG 抗体的吸附、类风湿因子的结果干扰,导致易产生假阳性反应。所以间接法 ELISA 试剂在检测灵敏度不高的情况下,仍然存在特异性差的问题。

近年来,国内外丙肝抗体诊断试剂也正在从间接法向夹心法过渡。由于丙肝重组抗原的活性依赖于空间构象,因此,抗原结构的稳定性以及酶标记过程对构象的影响成为了夹心法试剂研究的重点和难点^[8]。当前,影响抗-HCV 试剂盒质量的主要因素是其包被的丙型肝炎病毒抗原^[9]。现在国内血站一般采用 2 个不同厂家的间接法 ELISA 试剂对献血者进行 HCV 抗体的初筛,目的就是降低不同厂家由于包被的抗原片段不同而造成的漏检。间接法 ELISA 检测试剂,虽然增加了 NS5 区作为包被抗原,一定程度上提高了试剂盒的灵敏度。但是,从本次的实验数据来看,2 个厂家的间接法 ELISA 检测试剂的使用会导致假阳性率的增加,增加血液筛查工作的负担和成本。有报道称,在血液筛查中采用夹心法试剂可以有效地提高抗-HCV 阳性标本的检出率,并降低假阳率,为血液筛查工作提供更高的准确度^[10],这与本次研究结果一致。

《血站技术操作规程(2012 版)》及《全血及成分血质量要求(GB18469-2012)》中规定关于 HCV 感染标志物及其检测方法可有 2 种选择:一种是采用 2 个不同生产厂家的 ELISA 试剂检测 HCV 抗体;另一种是采用一种 ELISA 试剂检测 HCV 抗体,采用一种试剂检测 HCV 核酸。核酸检测(NAT)在许多发达国家和地区已普遍应用于献血者血液筛查^[11],国内也有多家采供血机构进行了血液 NAT 的评估性研究^[12],国内采供血机构在选用 HCV 感染标志物检测试剂和方法时,应对夹心法 ELISA 试剂、间接法 ELISA 试剂和 HCV 核酸试剂进行合理选择配伍,从而有效地提高 HCV 感染标志物阳性标本的检出率,并降低假阳率,减少假阳性血液的报废,同时增强血液筛

(上接第 3245 页)

临床实际操作中,为避免假阳性、漏检给患者造成的不良后果,也为了能高效准确地检测,建议 4 种方法的检测顺序为:ELISA 试验进行初筛,阳性标本用 TP-AD 比对,根据需要再进一步做 TPPA 与 RPR 进行确诊和病程监测。

参考文献

- [1] 陈灵敏,李长如,周海星,等.梅毒血清学检测方法的分析[J].检验医学与临床,2010,7(8):1996-1997.
- [2] 唐明,丁建平,等.中国大陆 2001~2006 年 MSM 的性行为为特征与 HIV/现症梅毒感染现状的 Meta 分析[J].中国艾滋病性病,2008,14(5):471-474.
- [3] 郑颖,丁文杰,单晓洁,等.5 种梅毒血清学方法检测方法的临床应用评价[J].现代实用医学,2009,21(8):825.
- [4] 纪建平,钟贵才,钟岚.三种梅毒血清学检测方法的比较[J].中国现代医生,2009,47(1):126-127.
- [5] 王素娟,徐萍.3 种梅毒方法的比较[J].现代预防医学,2008,35

查工作的准确率,避免了献血者的非正常淘汰,促进无偿献血工作的可持续发展。

参考文献

- [1] Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome[J]. Science, 1989, 244(2):359-362.
- [2] Sy T, Jama MM. Epidemiology of hepatitis C virus(HCV) infection[J]. Int J Med Sci, 2006, 3(1):41-46.
- [3] Lavanchy. The global burden of hepatitis C[J]. Liver Int, 2009, 29(1):74-81.
- [4] Rustgi VK. The epidemiology of hepatitis C infection in the United States[J]. J Gastroenterol, 2007, 42(5):513-521.
- [5] 王晓峰,程勇前,张文瑾,等.丙型肝炎病毒感染至临床诊断肝癌的病程经过[J].肝脏,2004,20(1):8-10.
- [6] Xia GL, Liu CB, Cao HL, et al. Prevalence of hepatitis B and C virus infections in the general Chinese population: results from a nationwide cross-sectional seroepidemiologic study of hepatitis A, B, C, D, and E virus infections in China, 1992[J]. Int Hepatol Commun, 1996, 5(1):62-73.
- [7] 梁华钦,王敏,黎世杰,等.广州市无偿献血者中抗-HCV 阳性人群的比较分析[J].中国输血杂志,2012,25(5):449-451.
- [8] 谢立,吴晓东.丙型肝炎病毒检测方法的研究进展及其临床意义[J].世界华人消化杂志,2005,13(8):884-886.
- [9] 王远忠,邢少军,侯秀丽.6 家 ELISA 丙型肝炎诊断试剂盒的比较[J].旅行医学科学,2007,13(4):45-47.
- [10] 赵龙友,纪勇平,王德镔,等.两种酶联免疫法检测丙型肝炎病毒抗体结果分析[J].中华实验和临床病毒学杂志,2013,8(4):304-306.
- [11] Soldan K, Davison K, Dow B. Estimates of the frequency of HBV, HCV, and HIV infectious donations entering the blood supply in the United Kingdom, 1996-2003[J]. Euro Surveil, 2005, 10(2):17-19.
- [12] 李新建.病毒核酸检测在献血者保留中的应用[J].国际检验医学杂志,2013,34(10):1230-1233.

(收稿日期:2014-05-17)

(3):555.

- [6] 陈刚.梅毒血清学试验特异性抗体与非特异性抗体检测的临床应用[J].临床和实验医学杂志,2008,7(1):59.
- [7] 徐树良,赵源源,王宁武,等.26 名梅毒抗体 ELISA 阳性 TPPA 阴性鲜血者随访调查[J].中国输血杂志,2002,15(2):265-266.
- [8] 邱月燕,李玉闻,杜雪莉.梅毒螺旋体抗体特异性与非特异性试验的评价[J].医技与临床,2009,13(10):915-916.
- [9] 彭明喜.酶联免疫吸附试验检测梅毒阳性的原因分析[J].现代实用医学,2006,18(2):127-128.
- [10] 部片,王进.ELISA 法检测梅毒抗体假阳性原因分析及探索[J].江苏预防医学,2010,21(1):56-57.
- [11] 董桂香.老年人梅毒阳性的分析[J].中国实用医学,2010,5(2):118.
- [12] 武建国.梅毒的实验室诊断与临床相关问题[J].临床检验杂志,2006,24(4):316-320.

(收稿日期:2014-05-23)