

· 论 著 ·

ELISA 法检测丙型肝炎病毒抗体最佳临界值的探讨*

卢香云, 程 江[△]

(石河子大学医学院, 新疆石河子 832000)

摘 要:目的 探讨酶联免疫吸附试验(ELISA)检测丙型肝炎病毒(HCV)抗体诊断阳性的最佳临界值(cut-off)。方法 选取住院患者或体检者的 130 份经 ELISA 法初筛为阳性的血清标本和 45 份接近 cut-off 的阴性标本, 吸光度(OD)值为 0.15~2.0, 采用重组免疫印记法(RIBA)检测确认其阴、阳性。利用 SPSS17.0 绘制受试者工作特征曲线(ROC 曲线), 确定最佳临界值(cut-off 值)。结果 以该院检验科现用试剂说明书给定的 cut-off 值计算, ELISA 法与 RIBA 法定性结果的一致性 Kappa 值为 0.676。以 ROC 曲线确定的 cut-off 值 0.251 3 计算, ELISA 法与 RIBA 法定性结果的一致性 Kappa 为 0.829。结论 应用 ROC 曲线对临床实验室进行分析, 可以更科学地找出适合该实验室临床诊断的最佳 cut-off 值, 为临床提供可靠的结果。

关键词:丙型肝炎病毒抗体; 受试者工作特征曲线; 临界值

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.09.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)09-1171-03

Investigation on best cut-off values of hepatitis C virus antibody detected by ELISA*

Lu Xiangyun, Cheng Jiang[△]

(Medical College of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China)

Abstract:Objective To investigate the best cut-off value of hepatitis C virus (HCV) antibody positive detected by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). **Methods** 130 serum samples of HCV antibody positive preliminarily screened by ELISA and 45 negative serum samples of close to cut-off value (OD = 0.15-2.0) from the inpatients or individuals undergoing the physical examination in our hospital were chosen and the recombinant immune blot assay (RIBA) was used to confirm their positive or negative. The receiver operating characteristic(ROC curve) was drawn by SPSS17.0 for determining the best cut-off value. **Results** The Kappa value of the qualitative method coincidence by ELISA and RIBA was 0.676 according to the cut-off value by the current reagent instructions. While the Kappa value was 0.829 with the cut-off value of 0.251 3 determined by the ROC curve. **Conclusion** Analyzing the clinical laboratory by means of the ROC curve can more scientifically find out the best cut-off value which is suitable for the clinical laboratory.

Key words: hepatitis C virus antibody; receiver operating characteristic; cut-off value

在中国普遍采用灵敏度高的酶联免疫吸附试验(ELISA)检测丙型肝炎病毒(HCV)抗体。ELISA 法检测 HCV 抗体的结果通常用阳性或阴性报告, 在阳性与阴性之间的分界线, 即为临界值(cut-off)。由于各厂家所生产试剂的灵敏度和特异度不同, 使用参考人群不同, 因此各商家试剂产品说明书提供的 cut-off 值存在一定的差别^[1]。cut-off 值的高低易导致假阳性或假阴性结果的出现, 因此, cut-off 值的设置很重要^[2]。通过确定合适的 cut-off 值, 尽可能地降低假阳性率或假阴性率^[3]。因此本实验从标准化体系的性能验证进行研究, 确定本实验室 ELISA 法检测 HCV 抗体临床诊断的最佳 cut-off 值, 为临床提供更可靠实用的结果。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 11 月至 2014 年 6 月来本院住院的患者或体检者的血清或血浆, 经 ELISA 法初筛 HCV 抗体阳性的标本 130 份和接近 cut-off 的阴性标本 45 份, 其中吸光度(OD)值在 0.15~0.5 的 67 份, 0.5~1 的 48 份, 1~1.5 的 37 份, 1.5~2 的 23 份。男 95 例, 年龄 24~68 岁。女 80 例, 年龄 27~75 岁。所有标本均无任何凝集不完全、溶血、黄疸及脂血现象。

1.2 仪器与试剂 HCV 抗体诊断试剂盒(上海科华), 重组免

疫印迹(RIBA)诊断试剂盒(北京万泰), 山东埃斯梅康全自动酶联免疫分析仪。两种质控品的浓度分别是 0.5 NCU/L 和 1.0 NCU/L(北京康彻斯坦公司生产), 批号均是 201305001。

1.3 方法

1.3.1 精密度的评价

1.3.1.1 批内精密度 用 ELISA 法对高、低浓度的质控品在同一批次内平行、复孔检测 20 次, 酶标仪读数, 计算 S/CO 值(S 为样品 OD 值, CO 为临界值), 然后计算均值、标准差(SD)和变异系数(CV), CV 标准为不大于 15%^[4]。

1.3.1.2 批间精密度 在批内精密度符合要求的基础上, 用 ELISA 对高、低浓度的质控品连续检测 20 d, 每天平行检测双孔, 然后计算均值、SD 和 CV, CV 标准为不大于 15%^[4]。

1.3.2 ELISA 法检测 HCV 抗体按照检验科操作规程和试剂盒说明书进行操作。cut-off 值: 阳性对照均值×0.1+阴性对照均值(阳性对照均值大于 2.5 按 2.5 计算, 阴性对照均值小于 0 时, 按 0 计算。同时满足阳性对照均值大于 0.6, 阴性对照均值小于 0.05 时, 试验有效)。

1.3.3 HCV 抗体确证 试剂盒采用的是 RIBA 法。RIBA 法的检测严格按照试剂盒说明书进行相关操作。结果按照说明书判读。每个检测条包含两条对照线, 对照线-2 必须出现, 若

* 基金项目: 卫生部医药卫生科技发展研究中心专项课题(28-1-13)。 作者简介: 卢香云, 女, 在读硕士, 从事临床分子生物学的诊断研究。

[△] 通讯作者, E-mail: susuan20110918@163.com。

对照线-2 不出现,则此检测条结果无效。根据条带强度赋分,空白条带为阴性(一),条带强度小于对照线-1,分值+/-,条带等于对照线-1 的强度,赋分1+,条带大于对照线-1 的强度,赋分 2+。未出现或仅出现一种 HCV 抗体特异条带强度 1+及以上判断为阴性,至少出现两种 HCV 抗体特异条带强度 1+及以上判断为阳性。

1.4 统计学处理 利用 SPSS17.0 软件进行相应统计分析,绘制受试者工作特征曲线(ROC 曲线),并以约登指数(Youden 指数)最大的切点为最佳 cut-off 值。ELISA 法与 RIBA 法定性结果一致性的比较用 Kappa 值表示, $Kappa = \{n(a+d) - [(a+b)(a+c) + (c+d)(b+d)]\} / \{n2 - [(a+b)(a+c) + (c+d)(b+d)]\}$ [5],其中 a 是真阳性数,b 是假阳性数,c 是假阴性数,d 是真阴性数,n 是总数。

2 结 果

2.1 批内、批间精密度的性能评价 高、低浓度的质控品,平行检测 20 次的批内精密度分别为 9.57% 和 10.08%。高、低浓度的质控品,每天检测复孔,连续检测 20 d 的批间精密度分别为 12.80% 和 13.78%,均满足 CV 不大于 15% 的标准。结果见表 1。

表 1 批内、批间精密度评价结果

项目	低浓度		高浓度	
	均值	CV(%)	均值	CV(%)
批内精密度	0.124	10.08	0.282	9.58
批间精密度	0.164	13.78	0.383	12.08

2.2 ELISA 法与 RIBA 法定性结果的比较 利用文中 Kappa 公式计算,ELISA 法与 RIBA 法定性结果一致性的 Kappa 值为 0.676,检测的灵敏度为 98.17%,特异度为 65.16%。结果见表 2。

表 2 两种方法法定性结果的比较(n=175)

ELISA 法	RIBA 法		合计(n)
	阳性(n)	阴性(n)	
阳性	107	23	130
阴性	2	43	45
合计	109	66	175

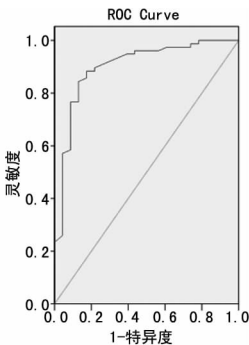


图 1 不同 cut-off 时 ROC 曲线下面积

2.3 最佳 cut-off 值的确定 把 130 份 ELISA 法检测阳性的标本 OD 值、S/CO 值输入 SPSS17.0 换算不同的 cut-off,把 RIBA 法定性结果相对应的 OD 值、S/CO 值输入,利用 SPSS17.0 软件分析,绘制 ROC 曲线[实质为取不同 cut-off 时对应的灵敏度为纵坐标,(1-特异度)为横坐标所绘制的曲线],见图 1,该曲线下面积为 0.919,曲线下面积与 Az=0.5 比较,

差异均有统计学意义($P<0.05$)。根据统计结果中各个可能切点的灵敏度和特异度,计算 Youden 指数=灵敏度+特异度-1),并选择 Youden 指数最大的切点为 cut-off。即 cut-off 为 0.251 3 时,Youden 指数最大为 0.731。

2.4 最佳 cut-off 时 ELISA 法与 RIBA 法定性结果的比较 利用文中 Kappa 公式计算,两种检测方法定性结果的一致性 Kappa 值为 0.829,此时 ELISA 法检测的灵敏度为 94.50%,特异度为 89.39%。结果见表 3。

表 3 最佳 cut-off 时两种方法法定性结果的比较(n=175)

ELISA 法	RIBA 法		合计(n)
	阳性(n)	阴性(n)	
阳性	103	7	110
阴性	6	59	65
合计	109	66	175

3 讨 论

ROC 曲线法能较准确地确定方法学的临界点,是十分实用、便捷的统计方法[6]。RIBA 是唯一经美国食品和药物管理局注册的检测 HCV 抗体的旁证试验,这种高特异度的试验运用于检测筛检阳性标本,检测结果解释为阳性、阴性和不确定[7]。第 3 代 RIBA 法有较佳的可重复性和准确性,已被公认为丙型肝炎血清学标志物检测的参考方法[8]。陈俊梅等[9]比较了北京万泰 RIBA 法 HCV 抗体检测试剂和 CHIRON RIBA HCV 3.0 Strip Immunoblot Assay 试剂,结果显示两种试剂对 HCV 抗体的检测结果具有高度一致性。因此本试验使用北京万泰生产的第 3 代 RIBA 法确证试剂。

ELISA 法是检测 HCV 感染的常规方法,其检测的准确性具有重要的临床意义。由于检测系统受操作环境、温度及操作人员等因素的影响,因此试验前首先评价检测系统最基本的性能精密度能否满足试验的要求。Kappa 系数用于两组定性结果一致性的评价, $Kappa \geq 0.75$ 时表示两者一致性较好; $0.75 > Kappa \geq 0.4$ 时表示两者一致性一般; $Kappa < 0.4$ 表示两者一致性很差[10]。本试验的 RIBA 法与 ELISA 法定性结果一致性的 Kappa 系数为 0.676,说明两种检测方法定性结果的一致性一般。此时 ELISA 法检测的灵敏度为 98.17%,特异度为 65.16%,因而需进行 cut-off 的调整。Youden 指数是评价筛查试验真实性的方法,指数越大说明筛查试验的效果越好,真实性越大[5]。本试验通过 Youden 指数最大法,确定最佳 cut-off 值为 0.251 3,其 ROC 曲线下面积为 0.919。Az 在 0.5 和 1 之间, $Az > 0.5$ 时才有诊断价值, Az 在 0.5~0.7 时诊断价值较低, Az 在 0.7~0.9 诊断价值中等,在 0.9~1 时诊断价值较高[11]。本试验 ROC 曲线下面积在 0.9~1,与 $Az=0.5$ 比较,差异有统计学意义($P<0.05$),说明该试剂盒有较高的诊断价值。确定最佳 cut-off 值后,ELISA 法与 RIBA 法定性结果的一致性 Kappa 值为 0.829,说明两种方法定性结果的一致性较好,也表明新的 cut-off 值有一定的临床价值。

由于 ELISA 法检测 HCV 抗体受多种因素影响,如试剂灵敏度、操作环境、操作人员等,使本实验室的假阳性率较高。本试验样本量不够大,有可能会影响检验结果。ELISA 法检测 HCV 抗体存在方法学的局限,为了增加不同医院间检测 HCV 抗体结果的可比性,各实验室应根据实际情况对 ELISA 法检测 HCV 抗体的 cut-off 值进行设定。(下转第 1175 页)

- [5] Li Y, Buckley D, Wang S, et al. Genetic polymorphisms in the TA-TA box and upstream phenobarbital-responsive enhancer module of the UGT1A1 promoter have combined effects on UDP-glucuronosyltransferase 1A1 transcription mediated by constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, or glucocorticoid receptor in human liver[J]. *Drug Metab Dispos*, 2009, 37(9):1978-1986.
- [6] Sugiyama T, Hirose T, Kusumoto S, et al. The UGT1A1 * 28 genotype and the toxicity of low-dose irinotecan in patients with advanced lung Cancer[J]. *Oncol Res*, 2010, 18(7):337-342.
- [7] Schulz C, Heinemann V, Schalhorn A, et al. UGT1A1 gene polymorphism: impact on toxicity and efficacy of irinotecan-based regimens in metastatic colorectal Cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(40):5058-5066.
- [8] Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(14):8170-8174.
- [9] Hu ZY, Yu Q, Pei Q, et al. Dose-dependent association between UGT1A1 * 28 genotype and irinotecan-induced neutropenia; low doses also increase risk[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(15):3832-3842.
- [10] Teh LK, Hashim H, Zakaria ZA, et al. Polymorphisms of UGT1A1 * 6, UGT1A1 * 27 & UGT1A1 * 28 in three major ethnic groups from Malaysia[J]. *Indian J Med Res*, 2012, 136(2):249-259.
- [11] Fertrin KY, Goncalves MS, Saad ST, et al. Frequencies of UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) gene promoter polymorphisms among distinct ethnic groups from Brazil[J]. *Am J Med Genet*, 2002, 108(2):117-119.
- [12] Innocenti F, Grimsley C, Das S, et al. Haplotype structure of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 promoter in different ethnic groups[J]. *Pharmacogenetics*, 2002, 12(9):725-733.
- [13] Sugatani J, Yamakawa K, Yoshinari K, et al. Identification of a defect in the UGT1A1 gene promoter and its association with hyperbilirubinemia[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 292(2):492-497.
- [14] Ki CS, Lee KA, Lee SY, et al. Haplotype structure of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) gene and its relationship to serum total bilirubin concentration in a male Korean population[J]. *Clin Chem*, 2003, 49(12):2078-2081.
- [15] Premawardhena A, Fisher CA, Liu YT, et al. The global distribution of length polymorphisms of the promoters of the glucuronosyltransferase 1 gene (UGT1A1): hematologic and evolutionary implications[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2003, 31(1):98-101.
- [16] Sai K, Saeki M, Saito Y, et al. UGT1A1 haplotypes associated with reduced glucuronidation and increased serum bilirubin in irinotecan-administered Japanese patients with Cancer [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2004, 75(6):501-515.
- [17] Font A, Sánchez JM, Tarón M, et al. Weekly regimen of irinotecan/docetaxel in previously treated non-small cell lung Cancer patients and correlation with uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) polymorphism[J]. *Invest New Drugs*, 2003, 21(4):435-443.
- [18] Alkharfy KM, Alghamdi AM, Bagulb KM, et al. Distribution of selected gene polymorphisms of UGT1A1 in a Saudi population [J]. *Arch Med Sci*, 2013, 9(4):731-738.
- [19] 王岩, 徐建明, 沈琳, 等. 中国人尿苷二磷酸葡萄糖苷酸转移酶 1A 基因多态性与伊立替康毒性的相关性[J]. *中华肿瘤杂志*, 2007, 29(12):913-916.
- [20] 马冬, 张绪超, 杨冬阳, 等. 中国人 UGT1A1 冰 28 的基因多态性以及伊立替康毒性和疗效的关系[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2011, 32(4):495-499.
- [21] Zhang A, Xing Q, Qin S, et al. Intra-ethnic differences in genetic variants of the UGT-glucuronosyltransferase 1A1 gene in Chinese populations[J]. *Pharmacogenomics J*, 2007, 7(5):333-338.
- [22] Garcia-Carbonero R, Supko JG. Current perspectives on the clinical experience, pharmacology, and continued development of the camptothecins[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(3):641-661.
- [23] Ulukan H, Swaan PW. Camptothecins: a review of their chemotherapeutic potential[J]. *Drugs*, 2002, 62(14):2039-2057.
- [24] Shulman K, Cohen I, Barnett-Griness O, et al. Clinical implications of UGT1A1 * 28 genotype testing in colorectal Cancer patients [J]. *Cancer*, 2011, 117(14):3156-3162.
- [25] Liu X, Cheng D, Kuang Q, et al. Association between UGT1A1 * 28 polymorphisms and clinical outcomes of irinotecan-based chemotherapies in colorectal Cancer: a meta-analysis in Caucasians[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3):58489.

(收稿日期: 2015-01-12)

(上接第 1172 页)

参考文献

- [1] 颜永乾. 时间分辨荧光免疫分析测定乙型肝炎病毒表面抗原 cut-off 值的确定[J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(10):1276-1278.
- [2] 甘新宇, 杨洋, 于丽君, 等. ELISA 检测抗-HCV 抗体灰区设置的探讨[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(11):1405-1406.
- [3] 容莹, 孙秀双, 郑望春, 等. 乙型肝炎表面抗原检测结果分析及灰区设置探讨[J]. *检验医学与临床*, 2010(15):1593-1595.
- [4] Clinical Laboratory Standards Institute. EP6-A2 evaluation of the linearity of quantitative analytical methods[S]. 2003:1-47.
- [5] 黄悦勤, 李立明. 临床流行病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010:118-123.
- [6] Kapucu A, Macmillan NA, Rotello CM. Positive and negative remember judgments and ROCs in the plurals paradigm: evidence for

alternative decision strategies[J]. *Mem Cognit*, 2010, 38(5):541-554.

- [7] 舒玲, 李露瑶, 张春莹, 等. 丙肝病毒抗体检测结果的分析与解读[J]. *现代预防医学*, 2014, 41(2):300-303.
- [8] 李育芬, 楚承霞, 杨颖. HCV 检测方法研究进展及其临床意义[J]. *中国卫生检验杂志*, 2013(5):1342-1344.
- [9] 陈俊梅, 严艳, 孔宁, 等. 二种丙型肝炎病毒抗体确证试剂盒检测性能的比较[J]. *中华检验医学杂志*, 2011, 34(3):206-209.
- [10] 陈卫中, 潘晓平, 宋兴勃, 等. ROC 曲线中最佳工作点的选择[J]. *中国卫生统计*, 2006, 23(2):157-158.
- [11] 张强, 何升, 阙婷, 等. ROC 曲线确立血液学各指标在地贫筛查中的 CUT-OFF 值[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2013, 21(1):27.

(收稿日期: 2015-01-10)