

论著·临床研究

TRFIA 法检测 HBV 表面抗原最佳临界值及灰区探讨

叶 莎¹, 魏 娜²

(1. 巴音郭楞蒙古自治州人民医院检验科, 新疆库尔勒 841000;
2. 北京市中西医结合医院检验科, 北京 100089)

摘要:**目的** 探讨时间分辨荧光免疫试验(TRFIA)检测乙型肝炎病毒(HBV)表面抗原诊断阳性的最佳临界值及其灰区。**方法** 选取某三甲医院住院或体检的 150 例经 TRFIA 法定量检测阳性的血清或血浆标本和 30 例接近临界值(阴性)标本(0.03~0.05 IU/mL),采用化学发光微粒子免疫分析法确认其阴、阳性。绘制 ROC 曲线,判断最佳临界值,进一步探讨其灰区。**结果** 在试剂说明给定的临界值下,TRFIA 法检测结果与确证试验结果比较,差异有统计学意义($P<0.05$),两试验结果一致性的 Kappa 值为 0.690。TRFIA 法检测 HBV 表面抗原诊断阳性的最佳临界值为 0.074 IU/mL,此时,TRFIA 法检测结果与确证试验结果一致性的 Kappa 值为 0.814,其灰区范围为 0.05~0.274 IU/mL。**结论** 不同实验室应根据自身实验室的情况,制定适合本实验室最佳临界值和灰区,为临床诊断提供可靠的依据。

关键词:时间分辨荧光免疫试验; 乙肝表面抗原; 临界值; 灰区
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.18.022 **中图法分类号:**R446.11
文章编号:1673-4130(2019)18-2264-04 **文献标识码:**A

Exploring the optimum critical value and grey zone of HBV surface antigen detected by TRFIA YE Sha¹, WEI Na²

(1. Department of Clinical Laboratory, Bayinguoleng Mongolia Autonomous Prefecture People's Hospital, Korla, Xinjiang 841000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the Hospital of Traditional Chinese and Western Medicine in Beijing, Beijing 100089, China)

Abstract: Objective To explore the optimum critical value and grey zone of time resolved fluorescence immunoassay(TRFIA) for detection of hepatitis B virus (HBV) surface antigen. **Methods** 150 serum or plasma samples detected positive of HBV surface antigen by TRFIA and 30 negative specimens but close to the critical value (0.03—0.05 IU/mL) from patients or people who did physical examination in a top-grade hospital were chosen and chemiluminescence particle immunoassay was used to confirm them positive or negative. Drawing the ROC curve through SPSS19.0 to determine the optimum critical value and compute grey zone. **Results** Under the given critical value specified by the reagent, There was statistical difference between the results of TRFIA and the results of confirmation($P<0.05$). While two test results of consistency of the Kappa value was 0.690. However, The optimum critical value of TRFIA for detection of HBV surface antigen positive diagnosis was 0.074 IU/mL. At this time, the Kappa value of consistency between the results of TRFIA and the results of confirmation is 0.814. And The grey zone ranges from 0.05 to 0.274 IU/mL. **Conclusion** According to their own laboratory conditions, different laboratories should establish the optimum threshold and grey zone suitable for the laboratory. In order to provide reliable basis for clinical diagnosis.

Key words: time resolved fluorescence immunoassay; hepatitis B virus surface antigen; critical value; grey zone

乙型肝炎是由乙型肝炎病毒(HBV)引起的一种全球性的流行病,而其是我国感染人数最多、流行最广泛、危害最严重的病毒性肝炎之一。HBV 感染最先出现的标志物是 HBV 表面抗原^[1],因此,HBV 表

面抗原的检出有利于乙型肝炎的早期诊断、治疗及预防传播。HBV 表面抗原常用的检测方法是 ELISA 方法,但由于 ELISA 法检测影响因素较多,近几年实验室逐渐开展时间分辨荧光免疫试验(TRFIA)检测

作者简介:叶莎,女,主管技师,主要从事临床免疫学及微生物学的研究。
本文引用格式:叶莎,魏娜. TRFIA 法检测 HBV 表面抗原最佳临界值及灰区探讨[J]. 国际检验医学杂志,2019,40(18):2264-2267.

HBV 表面抗原,其原理是采用双抗体夹心时间分辨荧光分析法,以单克隆抗体包被反应板,镧系元素 Eu^{3+} 标记抗体,并与时间分辨测定技术相结合建立起来的一种新型非放射性微量分析技术^[2]。该方法具体灵敏度高、发光稳定、寿命延长、自然荧光干扰少等优点^[3]。HBV 表面抗原定量试剂已由最初的一代试剂发展为二代试剂,其检测的敏感性显著提高,同时假阳性率是否会增高?各厂家试剂产品说明书提供的临界值不尽相同,同时试剂厂家所使用的定值参考人群也不同^[4],因此,需要对临界值进行设定。此外,在临床工作中发现,根据厂家给定的临界值(0.05 IU/mL)判断检验结果,易出现假阳性,导致部分患者的误诊,会引起患者及家属的恐慌,造成巨大的负面影响。由于 TRFIA 法灵敏度高,从而有一部标本呈现弱阳性,即灰区。研究报告^[5-6]指出灰区的标本容易漏诊或误诊。目前,关于 TRFIA 检测乙肝表面抗原临界值及灰区鲜见报道,因此,本研究根据本实验条件,探讨 TRFIA 法检测乙肝表面抗原的最佳临界值及灰区,制定适合本实验室最佳临界值和灰区,为临床乙型肝炎病毒感染的诊断提供可靠依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 1 月至 2018 年 6 月来某三甲医院住院患者或体检者血清或血浆经 TRFIA 检测乙肝表面抗原阳性的标本 150 例和接近临界值(阴性)标本 30 例,其中定量值在 0.03~<0.05 IU/mL 有 30 例,0.05~<0.10 IU/mL 有 50 例,0.1~<0.2 IU/mL 有 40 例,0.2~<0.5 IU/mL 有 30 例,0.5~1.0 IU/mL 有 30 例。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 苏州新波 EasyCuta 全自动时间分辨荧光免疫分析仪及配套 HBV 表面抗原诊断试剂盒,雅培 Architect i2000 化学发光微粒子免疫分析系统及配套 HBV 表面抗原诊断试剂,所有试剂均在有效期内。每日使用两个水平的质控品监测质控情况,两质控品的浓度分别是 0.5 IU/mL 和 1 IU/mL(北京康彻思坦公司生产),批号均是 201803001。

1.3 方法

1.3.1 精密度的评价 批内精密度用 TRFIA 检测法对两浓度水平的质控品在同一批次内平行检测 20 次,记录定量值,然后计算均值、*s* 和 CV(标准为 CV 不大于 10%^[7])。批间精密度在批内精密度符合要求的基础上,用 TRFIA 检测法对两浓度水平的质控品连续检测 20 天,每天平行检测复孔,记录其定量值,然后计算均值、标准差(*s*)和变异系数(CV,标准为 CV 不大于 10%^[7])。

1.3.2 TRFIA 检测 HBV 表面抗原 专业人员严格遵守 Easycuta 全自动时间分辨荧光分析仪操作规程进行操作。有校准品从 A 至 F,依次为校准品 A:空白;校准品 B:0.05 IU/mL;校准品 C:0.20 IU/mL;校准品 D:2.00 IU/mL 校准品 E:20.00 IU/mL;校准品 F:150.00 IU/mL。试剂说明书临界值建议浓度为 0.05 IU/mL。

1.3.3 HBV 表面抗原确证试验 采用化学发光微粒子免疫分析法(CMIA)进行确认,专业人员严格按照 Architect i2000 化学发光微粒子免疫分析仪操作规程进行操作。所有标本均检测两次,两次检测结果均≥0.05 IU/mL 时为阳性;两次结果不一致时,重复检测一次,三次均值≥0.05 IU/mL 为阳性,反之为阴性。

1.4 统计学处理

1.4.1 利用统计学软件 SPSS19.0 录入数据,TRFIA 法检测结果与确认试验结果比较采用四格表 Fisher 确切概率法。绘制 ROC 曲线,判定最佳临界值。利用公式临界值±2CV^[8],计算其灰区,这里的 CV 为批间精密度变异系数。

1.4.2 TRFIA 法检测结果与确认试验一致性比较采用 Kappa 值来表示,Kappa 的计算参考文献^[9]。

2 结果

2.1 批内、批间精密度评价 两浓度水平的质控品,按照 1.3.1 方法检测,批内精密度分别为 6.82%和 5.26%,批间精密度分别为 8.29%和 7.31%,见表 1。

表 1 批内、批间精密度评价

项目	水平 1			水平 2		
	均值(IU/mL)	<i>s</i> (IU/mL)	CV(%)	均值(IU/mL)	<i>s</i> (IU/mL)	CV(%)
批内精密度	0.46	0.03	6.82	0.95	0.05	5.26
批间精密度	0.48	0.055	8.29	0.98	0.11	7.31

2.2 TRFIA 法检测 HBV 抗原结果与确证试验比较 TRFIA 检测 HBV 抗原浓度在 0.03~0.05 IU/mL 的 30 阴性标本,经确证 1 例阳性(占 3.3%),29 例阴

性(占 96.7%);浓度在 0.05~1.00 IU/mL 的 150 例阳性标本,经确证 132 例阳性(占 88.0%),18 例阴性(占 12.0%),见表 2。

表 2 TRFIA 法检测 HBV 抗原结果与确证试验比较			
TRFIA 法浓度(IU/mL)	n	确证试验[n(%)]	
		阳性	阴性
0.03~<0.04	10	0(0.00)	10(100.00)
0.04~<0.05	20	1(5.00)	19(95.00)
0.05~<0.10	50	36(72.00)	14(28.00)
0.10~<0.20	40	37(92.50)	3(7.50)
0.20~<0.50	30	29(96.67)	1(3.33)
0.50~1.00	30	30(100.00)	0(0.00)

2.3 TRFIA 法检测结果与确证试验一致性的比较
根据 1.4.2 中的公式计算,TRFIA 法检测结果与确证试验结果一致性的 Kappa 值为 0.690,TRFIA 法检测结果与确证试验比较,差异有统计学意义($\chi^2=4.774,P=0.039$),见表 3。

表 3 两种方法结果比较(n)			
TRFIA 法	确证试验		合计
	阴性	阳性	
阴性	29	1	30
阳性	18	132	150
计	47	133	180

2.4 最佳临界值判定 利用 SPSS19.0 软件绘制 ROC 曲线见图 1,该曲线下面积为 0.924,其与 ROC 曲线下面积 0.5 比较,差异有统计学意义($P<0.001$)。计算约登指数,并以约登指数最大时,即 0.794,其对应的切点为临界值,此时临界值为 0.074 IU/mL。

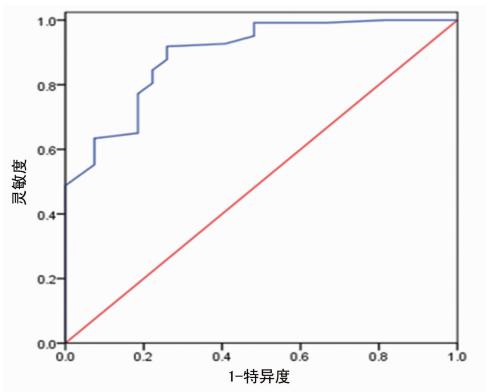


图 1 ROC 曲线
2.5 新临界值下 TRFIA 法检测结果与确证试验一致性的比较 根据 1.4.2 中的方法计算,此时的一致性 Kappa 值为 0.814,见表 4。

2.6 灰区的判定 根据 1.4.1 中的计算公式得出,灰区(CV 值取最大为 10%),灰区为范围-0.126~0.274 IU/mL。试剂说明书给定的灰区范围为 0.04~0.06,给定的临界值为 0.05 IU/mL,两灰

区上限或下限时灵敏度、特异度、假阳性率和假阴性率见表 5。灰区下限的设定是为了减少漏诊率,减少假阴性的发生,而上限设定是为了减少误诊率,减少假阳性的发生。统计学认为小于或等于 5%为统计学可接受范围,因此,灰区的下限设定应满足假阴性率 $\leq 5\%$,而上限是设定应满足假阳性率 $\leq 5\%$,从而确定灰区为 0.05~0.274 IU/mL,见表 5。

表 4 新临界值下两种方法结果比较(n)			
TRFIA 法	确证试验		合计
	阴性	阳性	
阴性	41	7	48
阳性	6	126	132
合计	47	133	180

表 5 灰区上限/下限时的敏感性、特异性、假阳性率和假阴性率(%)				
取值范围	灵敏度(%)	特异度(%)	假阳性[n(%)]	假阴性[n(%)]
≤ -0.126	—	—	—	—
≤ 0.04	100	—	—	0(0)
≤ 0.05	98.5	—	—	2(1.50)
≥ 0.06	—	85.11	7(14.89)	—
≥ 0.274	—	97.87	1(2.13)	—

注:—表示下限时无法计算假阳性数或上限时无法计算假阴性数

3 讨 论
ELISA 法是检测 HBV 表面抗原的常规方法,但由于整个检测过程受外部环境、温度、检测人员等多种因素的影响,因此,近几年 TRFIA 方法逐渐走进实验室,替代 ELISA 方法。TRFIA 是一种新型非放射性微量分析技术,目前已在临床检测中广泛使用。本研究首先评估全自动时间分辨荧光仪的检测系统的精密度能否满足定量实验精密度的要求。采用浓度为 0.5 IU/mL 和 1 IU/mL 的质控品进行检测,监测两浓度水平的批内精密度 CV 分别为 6.82%和 5.26%,批间精密度 CV 分别为 8.29 和 7.31%,均能满足 CV 不大于 10%的标准。

CMIA 定量检测 HBV 表面抗原是利用生物素标记抗-HBs 技术、亲和素标记磁性微珠包被技术及电化学发光技术相结合而建立的微量分析技术。该方法具有高度的灵敏度与特异性,解决低浓度的问题,检测准确率高^[10-11]。本研究利用 CMIA 法对 TRFIA 方法检测定量浓度在 0.03~1.00 IU/mL 的 180 例标本进行确认,经确证 133 例阳性,47 例阴性,TRFIA 法检测结果与确证试验结果比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。利用 Kappa 系数评估 TRFIA 与确证试

验结果一致性,当 Kappa 值大于等于 0.75 时表明两种方法的一致性较好;当 Kappa 值大于等于 0.4,而小于 0.75 时,表明两种方法的一致性一般;当 Kappa 值小于 0.4 时表明两种方法一致性很差^[12]。本实验室 TRFIA 方法与确证试验检测结果一致性的 Kappa 值为 0.690,表明两种方法定性结果的一致性一般,因此,需要对临界值进行调整。

ROC 曲线法是较为实用、较为便捷的统计学方法,其能较准确的确定方法学的临界点^[13]。而常用约登指数来评价筛查试验的真实性,其指数越大,说明该筛查试验的真实性越好,准确性越高^[7]。本实验利用 ROC 曲线,取约登指数最大时的拐点,确定最佳临界值为 0.074 IU/mL,此时,ROC 曲线下面积为 0.924。ROC 曲线下面积在 0.5~1.0,而当 ROC 曲线下面积在 0.9~1.0 时,才具有较高的诊断价值^[14]。本实验 ROC 曲线下面积为 0.924,因此说明定量试验有较高的诊断价值。在新的临界值下,TRFIA 方法与确证试验一致性的 Kappa 值为 0.814,大于 0.75,表明此时,两种方法的一致性较好,也提示新的临界值有一定的临床应用价值。

TRFIA 方法相对于传统的 ELISA 方法检测的灵敏度有显著的提高,但是同时也出现一定的弱阳性标本,即灰区,灰区范围的设定非常重要,范围设置过窄容易漏检,过宽容易造成资源浪费。本研究根据临界值 $\pm 2CV$ 法确定的灰区范围为 $-0.126 \sim 0.274$ IU/mL,灰区的下限 -0.126 IU/mL,显然不合理(所有阴性均可疑),大于灰区上限的标本中有 2.13%的假阳性率,小于 5%统计学上可接受的误差范围。试剂说明书给定的灰区范围为 0.04~0.06 IU/mL,在小于灰区下限的标本中假阴性率为 0%,小于 5%统计学上可接受的误差范围。而大于灰区上限的标本中假阳性率为 14.89%,大于 5%统计学上可接受的误差范围,因此设置不合理。试剂说明书给定的临界值为 0.05 IU/mL,而以 0.05 IU/mL 作为灰区的下限时,小于灰区下限的标本中有 1.50%假阴性率,小于 5%统计学上可接受的误差范围。相比较于灰区下限 0.04 IU/mL,0.05 IU/mL 作为灰区的下限既能满足统计学可接受的误差范围,又不至于灰区范围过宽,导致资源的浪费。因此,综合考虑,本研究得出本实验室的灰区范围为 0.05~0.274 IU/mL,对本实验室有较佳的参考意义。

4 结 论

通过本研究发现本实验室 TRFIA 法检测 HBV 表面抗原的最佳临界值 0.074 IU/mL,灰区为 0.05~

0.274 IU/mL,与试剂说明给定临界值的 0.05 IU/mL,灰区 0.04~0.06 IU/mL 有一定的差别。因此,各实验室应根据本实验室的实际情况,对 TRFIA 法检测 HBV 表面抗原的临界值及灰区进行重新设定。对于定量值在灰区的标本,工作人员应与患者或其医师沟通,了解情况后,综合判断,客观报告“结果可疑,定期复查”。

参考文献

- [1] SARIN S K. Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update[J]. Hepatol Inter, 2016, 10(1): 96-98.
- [2] 李金明,刘辉,等.临床免疫学检验技术[M].北京:人民卫生出版社,2015:88-89.
- [3] 岳建云,谢富佳,朱平,等.时间分辨免疫分析检测乙型肝炎病毒的临床评价[J].国际检验医学杂志,2018,39(16):2066-2068.
- [4] 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.
- [5] 卢香云,程江,包建玲,等.ELISA 法检测丙型肝炎病毒抗体最佳临界值及其可疑区间[J].现代预防医学,2015,42(10):1841-1844.
- [6] 杜玮璐.献血者 ELISA 法检测 HBsAg 灰区标本的确认结果分析[J].中国实用医药,2016,11(11):278-279.
- [7] 黄睿,贾海英,王昌敏.全自动时间分辨荧光免疫分析系统 EASYCUTA 分析方法性能验证[J].标记免疫分析与临床,2018,25(11):1740-1746.
- [8] 王振财.ELISA 检测无偿献血者 HBsAg 设置灰区的意义[J].中国医药指南,2016,14(5):150.
- [9] 黄悦勤,李立明,等.临床流行病学[M].北京:人民卫生出版社,2010:118-123.
- [10] VILLAR L M, CRUZ H M, BARBOSA J R, et al. Update on hepatitis B and C virus diagnosis[J]. World J Virol, 2015, 4(4): 323-342.
- [11] 刘秀琴,傅杭州,张晓俐.化学发光微粒子免疫分析法与酶联免疫法测定乙肝表面抗原的比较[J].海南医学,2010,21(8):104-105.
- [12] 陈卫中,潘晓平,宋兴勃.ROC 曲线中最佳工作点的选择[J].中国卫生统计,2006,23(2):157-158.
- [13] GERTA R, SCHUMACHER M. Summary ROC curve based on a weighted Youden index for selecting an optimal cutpoint in meta-analysis of diagnostic accuracy[J]. Stat Med, 2010, 29(30): 3937-3947.
- [14] 李太顺,刘沛.ROC 曲线绘制和曲线下面积比较的 SAS 宏包[J].中国卫生统计,2018,35(2):144-146.