

# 应用 ROC 曲线分析确定 ELISA 检测抗-HBe 灰区

黄文彩, 李柳燕, 张少丰, 方海畴 (广东省东莞市厚街医院检验科 523945)

**【摘要】** 目的 应用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析方法确定酶联免疫吸附试验(ELISA)检测乙型肝炎 e 抗体(抗-HBe)的灰区,为临床判读提供合理的指导。**方法** ELISA 检测血清抗-HBe,留取 S/CO 介于 0.5~1.7 的标本,用美国雅培 AxSYM 化学发光仪对其复检,结合临床症状及乙型肝炎病毒标志物定量结果,筛选结果可靠的标本,进行 ROC 曲线分析,根据 ROC 曲线分别确定其灰区的上、下限。**结果** 根据 ROC 曲线分析法计算得出检测灰区为 0.827~1.576。**结论** ROC 曲线法是设定 ELISA 检测灰区的较理想方法,非灰区部分具备较低的假阳性率及假阴性率,能增加不同医院间结果的可比性,减少不必要的医疗纠纷。

**【关键词】** ROC 曲线; 酶联免疫吸附试验; 乙型肝炎 e 抗体; 灰区

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.19.014 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)19-2426-02

**Determination of grey zone of HBeAb tested by ELISA using ROC curve analysis** HUANG Wen-cai, LI Liu-yang, ZHANG Shao-feng, FANG Hai-chou (Department of Clinical Laboratory, Houjie Hospital, Dongguan, Guangdong 523945, China)

**【Abstract】** **Objective** To determine the grey zone of HBeAb tested by the ELISA method using receiver operating characteristic(ROC) curve analysis to provide rational guidance for clinical interpretation. **Methods** The ELISA method was adopted to test serum HBeAb. The serum samples with the S/CO range of 0.5-1.7 were collected and retested by the Abbott AxSYM chemiluminescence apparatus. Combined the clinical symptoms and the quantitative results of hepatitis B viral markers, the samples with reliable results were screened and the ROC curve analysis was performed. According to the ROC curve, the upper and lower limits of the grey zone were determined. **Results** According to the ROC curve analysis, the grey zone of ELISA method was between 0.827-1.576. **Conclusion** The ROC curve analysis is an ideal method to calculate the grey zone of ELISA method, the non-grey zone part has the lower false positive and false negative rate, which can increase the comparability among the results from different hospitals and reduce unnecessary medical disputes.

**【Key words】** ROC curve; ELISA; HBeAb; grey zone

我国乙型肝炎(乙肝)患者人数众多,使用成本相对低廉的酶联免疫吸附试验(ELISA)方法检测乙肝病毒(HBV)血清标志物对人群筛查、疾病诊断、预后判断等都有较高的经济价值<sup>[1]</sup>。然而,ELISA 检测乙肝病毒 e 抗体(抗-HBe)普遍使用中和抑制法,由于方法学限制,其检测的准确性与可重复性均较其他方法低,常出现难以解释的结果及结果判读与临床情况不一致的情况。为使该指标的检测工作有据可依,减少医疗纠纷的出现,本研究利用准确性与可重复性较佳的化学发光方法,对 ELISA 结果位于灰区附近的标本进行定量乙型肝炎病毒标志物(即 HBsAg、HBsAb、HBeAg、抗-HBe 及 HBeAb)检测[微粒子酶免分析法(MEIA),美国雅培 AxSYM 化学发光仪],并进行 ROC 曲线分析,确定灰区(Grey zone)的上、下限范围。凡 S/CO 值(Sample OD/Cut-Off Value)落入灰区的标本,均以“灰区”报告,而不报告“阳性”或“阴性”,让临床医生结合患者情况综合判读结果,对患者和医生来说都是一种保护。患者可以用更灵敏的方法进行进一步的确认,避免产生不必要的医疗纠纷,现将该方法介绍如下。

## 1 材料与方 法

**1.1 样本来源** 选择厚街医院 2007 年 12 月至 2010 年 12 月住院、门诊与健康体检者样本血清 3 860 份,其中 234 份标本 ELISA 检测抗-HBe 的 S/CO 值介于 0.5~1.7。

## 1.2 试剂与仪器

**1.2.1 仪器** Hamilton FAME 全自动酶标分析系统,美国雅培 AxSYM 化学发光仪。

**1.2.2 主要试剂** 乙型肝炎病毒诊断试剂盒抗-HBe(ELISA),由中山生物工程有限公司提供,批号为 2010032501。质控品由卫生部临检中心提供。MEIA 试剂由美国雅培公司提供,批号为 65169HN00。以上试剂均在有效期内使用。

## 1.3 方 法

**1.3.1 ELISA 检测抗-HBe**,留取 S/CO 值介于 0.5~1.7 的标本。所有标本均经检查,无任何凝集不完全、溶血、黄疸及脂血现象。

**1.3.2** 以 AxSYM 化学发光仪对留取标本进行定量 HBV 标志物测定,所有操作严格按照试剂说明书进行。

**1.3.3** 结合定量 HBV 标志物结果,并查阅患者、体检者临床资料,与其抗-HBe 结果核对,将能确定抗-HBe 结果的定量 HBV 标志物模式纳入分析,将难以解释的结果模式排除在外。

**1.3.4 数据分析** 以 SPSS12.0 分析检测到的数据,根据 ROC 曲线法分别确定灰区上限、下限,根据线型内插法公式:

$$(R1 - R2) / [R1 - (R/x)] = (P1 - P2) / [P1 - P(R = x)]^{[2]}$$
, 计算上、下限值。

## 2 结 果

**2.1 ELISA 检测结果** 234 份标本中,ELISA 阳性标本 94 份,阴性标本 140 份。

**2.2 定量 HBV 标志物结果** 234 份标本的定量 HBV 标志物结果如下:(1)HBsAg(-)、抗-HBs(-)、HBeAg(-)、抗-HBe(-)、抗-HBe(-)模式 36 例;(2)HBsAg(-)、抗-HBs(+)

HBeAg(-)、抗-HBe(-)、抗-HBc(-)模式 42 例;(3)HBsAg(+),抗-HBs(-)、HBeAg(+),抗-HBe(-)、抗-HBc(+)模式 40 例;(4)HBsAg(+),抗-HBs(-)、HBeAg(-)、抗-HBe(+),抗-HBc(+)模式 50 例;(5)HBsAg(-)、抗-HBs(+),HBeAg(-)、抗-HBe(+),抗-HBc(+)模式 24 例。以上 5 种模式纳入计算,共占总数的 82.05%。

**2.3 定量 HBV 标志物各模式与临床资料核对** 经查阅临床资料,排除自身免疫性疾病及血浆蛋白紊乱的患者标本(12 份)。根据与临床资料的核对结果,将能肯定抗-HBe 结果的标本纳入分析范围,其他难以解释的结果排除在分析结果以外。所余标本定量 HBV 标志物模式均能与患者、体检者的临床资料相符。

剩余标本数 192 份,其定量 HBV 标志物模式与临床资料完全吻合,故将化学发光检测结果作为抗-HBe 真实结果的判定标准。两方法测定结果对比如表 1 所示。

表 1 192 份标本两方法结果对比(n)

化学发光法	ELISA		合计
	阳性	阴性	
阳性	54	42	96
阴性	20	76	96
合计	74	118	192

**2.4 ROC 分析结果** 将 S/CO 值及化学发光法结果(金标准)导入 SPSS12.0,进行 ROC 曲线分析,结果见图 1。

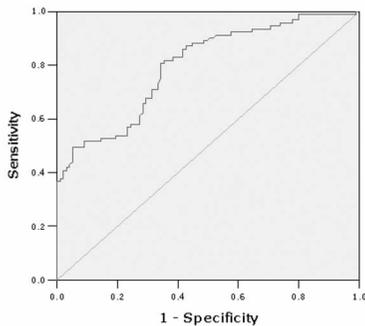


图 1 ROC 曲线

**2.4.1 灰区上限分析** 部分模拟灰区上限值及其相应灵敏度、假阳性率如表 2 所示,当灰区上限值分别为 0.817 及 0.828 时,相应的假阳性率分别为 0.040 及 0.051。若设定假阳性率为 0.05 时,则其相应的灰区上限值应介于 0.817~0.828。根据线性内插法公式计算其灰区上限值为 0.827。

表 2 模拟灰区上限值及其相应灵敏度、假阳性率、特异性及假阴性率

模拟灰区上限值	灵敏度	假阳性率	特异性	假阴性率
0.810	0.419	0.030	0.970	0.581
0.811	0.419	0.040	0.960	0.581
0.817	0.430	0.040	0.960	0.570
0.828	0.441	0.051	0.949	0.559
0.837	0.452	0.051	0.949	0.548

**2.4.2 灰区下限分析** 部分模拟灰区下限值及其相应特异性、假阴性率如表 3 所示,当灰区下限值分别为 1.571 及 1.584 时,相应的假阴性率分别为 0.054 及 0.043。若设定假阴性率为 0.05 时,则其相应的灰区上限值应介于 1.571~1.584。同

样,根据线性内插法公式,可计算出灰区下限值为 1.576。

表 3 模拟灰区下限值及其相应灵敏度、假阳性率、特异性及假阴性率

模拟灰区下限值	灵敏度	假阳性率	特异性	假阴性率
1.561	0.946	0.727	0.273	0.054
1.571	0.946	0.737	0.263	0.054
1.584	0.957	0.737	0.263	0.043
1.590	0.957	0.747	0.253	0.043
1.594	0.957	0.758	0.242	0.043

**3 讨论**

抗-HBe 对疾病诊断及预后判断均有较大意义<sup>[3]</sup>。但近年来的研究表明,在 HBV 感染的人群中,有相当比例的患者其血清中抗-HBe 的含量呈低水平状态,ELISA 难以判断其阴阳性<sup>[3-4]</sup>。而本研究最后确定的灰区较大(0.827~1.576),与文献报道相符<sup>[5]</sup>,这与 ELISA 方法学缺陷有很大关系。

ELISA 中对标记、包被的抗原要求纯度高,抗原性完整。而 HBeAg 和 HBcAg 均由病毒的 C 基因编码。HBeAg 和 HBcAg 在一级结构上有很大的相似性,只是由于二级结构的差异分别诱导了抗-HBe 和抗-HBc,这样就给分离 HBeAg 带来很高的难度。如在固相直接包被 HBeAg,则会因为 HBeAg 向 HBcAg 的易转变性,易导致测定误差。所以在试剂生产中,当抗原材料中的干扰物质不易除去,或不易得到足够的纯化抗原时,一般采用竞争法检测。

抗体的竞争法测定不同于只有单个抗原决定簇的小分子抗原的竞争法测定,其测定的可靠性在很大程度上受竞争抗体的特异性和亲和力大小的影响,竞争抗体与待测抗体在结合的特异性及亲和力越接近一致,则测定的可靠性越强,但竞争用抗体均为相应抗原免疫动物所得,与机体感染病毒后所产生的抗体肯定会有所差异。因而,在目前抗-HBe 的临床检测中,常有难以解释的测定结果出现,这与其在方法学上的固有缺陷是分不开的。

而另一方面,ELISA 结果的影响因素有很多。由于 ELISA 常用手工操作,其加样、温浴温度及反应时间等试验步骤难以标准化,导致其可重复性差;标本性质和试验条件对试验结果也有很大的影响。本研究在各试验步骤中均考虑到相关的影响因素,予以排除。

抗-HBe 弱阳性有两种可能:一种是患者处于急性乙肝恢复期,血清中抗-HBe 开始上升,而尚未达到阳性,另一种可能是已从阳性回落到低水平。目前对于这样的情况一种建议是间隔采样,检测再确定。另外一种是采用灵敏与特异性高的检测方法。MEIA 具备高的灵敏度和特异性,在国外其已经取代 ELISA 成为常规检测的方法。然而,MEIA 方法价格昂贵,不适合大批量的筛查工作。综合文献报道,结合 MEIA 的高特异性、灵敏度和 ELISA 的普遍性特点,最有效的方法是对 ELISA 检测处于灰区的标本再用发光方法予以确定<sup>[4,6]</sup>。因此,确定实验室的 ELISA 检测灰区范围,对提高 ELISA 的诊断效率有十分重要的意义。

ROC 曲线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,其关键在于必须有金指标确定检测指标的灵敏度与特异性等指标。本研究引入的 MEIA 尽管具备较好的可重复性和准确性,在国际上已被公认为乙肝血清学标志物检测的参考方法,ROC 曲线分析方法中,根据不同的需要,最佳诊断点的分析方法有好几种,包括了固定假(下转第 2429 页)

恢复期为  $(0.24 \pm 0.16) \mu\text{g/L}$ , 败血症初期 PCT 水平明显高于健康对照组健康新生儿组和败血症组治疗后恢复期水平 ( $P < 0.01$ )。

CRP 是机体处于应激状态时由肝脏大量合成的急性时相反应蛋白之一。生理状态下含量甚微, 其迅速升高与参与炎症反应和组织损伤修复过程有关<sup>[6]</sup>。在炎症或急性组织损伤后, CRP 的合成则在 4~6 h 内迅速增加, 36~50 h 达高峰, 经积极合理治疗后, 3~7 d 降至正常<sup>[7]</sup>。但 CRP 增高还常见于围生期窘迫、脑室内出血、胎粪吸入综合征等非感染性疾病, 特异性和敏感性不高<sup>[8-9]</sup>, 它可作为一个非特异性的细菌感染指标。本组研究也证实败血症组新生儿血清中 CRP 水平明显高于健康对照组, 经过治疗后恢复期 CRP 迅速下降。

IL-6 是机体受炎症刺激后由 T 细胞、B 细胞、单核-巨噬细胞及内皮细胞等分泌的细胞因子, 升高的 IL-6 可能具有双重效应: 作为一个信号调动机体防御反应, 对肿瘤坏死因子等引起的前炎症反应有分化和低调作用, 诱导中性粒细胞的细胞凋亡, 使炎症反应得以消散; 导致免疫功能失调, 引起损伤后免疫功能抑制<sup>[10]</sup>。新生儿败血症早期 (1~2 d) IL-6 即显著升高, 并且感染 1 周后基本恢复正常。IL-6 作为早期判断新生儿细菌感染的指标, 其水平的升高和疾病的严重程度有关。Kashlan 等<sup>[11]</sup>研究证明, 在临床症状出现前 2 d, 血中 IL-6 已明显升高, 特明是极低出生体质量儿败血症灵敏而可靠的指标。

总之, IL-6、PCT、CRP 3 个指标由于在败血症感染时出现的早晚不同, 3 个项目的联合检测能够避免漏检, 故 IL-6 联合 CRP、PCT 检测更有助于新生儿细菌感染的诊断。

参考文献

[1] 中华医学会儿科分会新生儿组. 新生儿败血症诊疗方案 [J]. 中华儿科杂志, 2003, 41(12): 397-398.

(上接第 2427 页)

阳性率(假阴性率)法、Youden 指数最大法、交叉图法等<sup>[7-8]</sup>。本研究的目的是划出 ELISA 检测抗-HBe 的灰区, 需要保证非灰区部分的假阳性率及假阴性率达到较低水平, 故采用固定假阳性率及固定假阴性率的方法, 并通过计算确定灰区的准确取值。

灰区上限值为 0.827 时, 相应的假阳性率为 0.05, 其意义为: 若检测 S/CO 值小于 0.827, 则将其判为阳性所需冒的假阳性风险为 5%。同理, 当检测 S/CO 值大于灰区下限值 1.576 时, 将其判为阴性所需冒的风险为 5%。尽管仍有误判可能, 但 5% 为统计学上可接受范围, 对检验人员及临床医师均具有较强的指导意义。

ROC 曲线法是设定灰区的较理想方法, 非灰区部分具有较低的假阳性率和假阴性率。该方法得出的灰区范围 0.827~1.576 符合本实验室实际工作要求, 具有较佳的参考意义。

抗-HBe 的 ELISA 检测存在的方法学的限制, 为使抗-HBe 的结果报告更加科学、准确, 增加不同医院间检测抗-HBe 结果的可比性, 各实验室均应根据实际情况对抗-HBe 的 ELISA 检测结果设定灰区。对于落入灰区的标本, 应客观报告“灰区”, 由临床医务人员根据患者实际情况综合判断, 给出相应的处理。

参考文献

[1] 李金明. 临床酶免疫测定技术 [M]. 北京: 人民军医出版

[2] 黄玉春, 边兴艳, 李茹琴, 等. 降钙素原在新生儿败血症诊断中的价值 [J]. 小儿急救医学, 2004, 11(5): 292-294.

[3] Assocot M, Gendrel D, Carsin H, et al. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection [J]. Lancet, 1993, 34(1): 515-518.

[4] Mcuruna P, Nedelnikova K, Gurlich R. Physiology and genetics of procalcitonin [J]. Physiol Res, 2000, 49(Suppl): S57-S65.

[5] Chiesa C, Panero A, Rossi N, et al. Reliability of procalcitonin concentrations for the diagnosis of sepsis in critically ill neonates [J]. Clin Infect Dis, 1998, 26(3): 664-672.

[6] 魏群德, 付红敏, 徐静, 等. 全身炎症反应综合征患儿血管性假性血友病因子、D-二聚体、C-反应蛋白的变化与病情的关系 [J]. 实用儿科临床杂志, 2002, 17(1): 71-72.

[7] 孟君. 降钙素原检测对早期诊断新生儿败血症的价值 [J] 华北煤炭医学院学报, 2007, 9(6): 797-798.

[8] 郝玲, 杨恒伟, 李艳芝, 等. 败血症新生儿血中性粒细胞 CD64 表达的意义 [J]. 实用儿科临床杂志, 2007, 22(22): 1701-1702.

[9] 彭运生, 万胜明, 吴建曾, 等. 血清降钙素原检测对新生儿败血症的临床诊断价值及分析 [J]. 中国实验诊断学杂志, 2007, 11(11): 1481-1482.

[10] 汤鸣, 梁星群. 新生儿感染性疾病血 IL-6 的测定及意义 [J]. 中国当代儿科杂志, 2003, 5(1): 43-44.

[11] Kashlan F, Smuklian J, Shen-Schwarz S, et al. Umbilical vein interleukin 6 preterm infant [J]. Pediatr Infect Dis J, 2000, 19(3): 238-243.

(收稿日期: 2012-03-11)

社, 2006: 187-188.

[2] 刘润辛. 使用 SPSS 作多变量观察值的 ROC 曲线分析 [J]. 中国公共卫生, 2003, 19(9): 1151-1152.

[3] 李红梅, 刘书香, 邱红梅. 慢性乙型肝炎病毒感染者血清标志物检测及临床分析 [J]. 南华大学学报: 医学报, 2004, 32(4): 412-413.

[4] 张定凤. 乙型肝炎抗病毒治疗研究最新进展——美国肝脏学会 2004 年年会纪要 [J]. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(12): 412-413.

[5] 梁文飏, 孙爱民. Grubbs 异常值取舍法用于研判 ELISA、HBsAg 灰区数值的初探 [J]. 南京医科大学学报, 2003, 18(4): 318.

[6] 熊彪, 陈智平, 丘晓云. 乙型肝炎病毒血清学标志物不同检测方法比较 [J]. 应用预防医学, 2008, 14(3): 180-181.

[7] 陈英茂, 田嘉禾, 耿建华, 等. ROC 曲线分析及诊断分界点确定程序 [J]. 中国医学影像技术, 2007, 20(4): 614-617.

[8] 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.

(收稿日期: 2012-02-12)