

自建检测系统定性检测乙型肝炎病毒表面抗原的重复性研究

徐全中,熊继红,张秀明(广东省中山市人民医院检验医学中心 528403)

【摘要】 目的 通过在自建检测系统上对乙型肝炎病毒表面抗原的测定,评估自建检测系统定性检测乙型肝炎病毒表面抗原的重复性,并为其标准化提供参考依据。**方法** 参照 NCCLS《EP12-A 文件》,用酶联免疫吸附试验(ELISA)在自建检测系统上对-20%临界值浓度和+20%临界值浓度的样本分别测定 20 次,然后对检测结果进行统计学分析。**结果** -20%临界值浓度的样本阴性率为 105%,+20%临界值浓度的样本阳性率为 100%。**结论** 自建检测系统对±20%临界值浓度范围以外样本的检测可以得到稳定的结果,可以满足《EP12-12A 文件》对定性试验重复性的要求。

【关键词】 乙型肝炎病毒表面抗原; 检测系统; 重复性; 酶联免疫吸附试验

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.19.020 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)19-2438-02

Repeatability study on self-constructed detection system for qualitative detection of hepatitis B surface antigen XU Quan-zhong, XIONG Ji-hong, ZHANG Xiu-ming (Laboratory Medicine Center, Zhongshan Municipal Peoples Hospital, Zhongshan, Guangdong 528403, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the repeatability of self-constructed detection system for detecting hepatitis B virus surface antigen(HBsAg) by its detection of HBsAg to provide reference for the standardization of this qualitative detection. **Methods** According to the requirement of the EP12-A file released by the NCCLS, we measured the samples of -20% critical concentration and +20% critical concentration with ELISA respectively, for twenty times, then made statistical analysis with the results. **Results** The negative rate of -20% critical concentration samples was 105%, while the positive rate of +20% critical concentration was 100%. **Conclusion** Stable results can be achieved for those samples outside of ±20% critical value through measurement by the self-constructed detection system, which also reaches the requirement of EP12-A file to the repeatability of qualitative test.

【Key words】 HBsAg; analysis system; repeatability; enzyme linked immunosorbent assay

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)标志物检测是临床判断有无 HBV 感染最常用的指标,但其测定方法却多种多样;虽然目前主要以酶联免疫吸附试验(ELISA)定性检测为主,但一直以来难以完全标准化,不同实验室间的测定难以得到理想的一致结果,即使同一实验室的测定也难以得到一致的检测结果。各个实验室有其各自不同的检测系统,而不同检测系统间的不可比性是造成不同实验室结果不可比的重要原因。同一份样本在同一检测系统上检测,理论上应该能够得到一致的测定结果,但事实上并非如此,由于检测系统不稳定性的存在,使得在同一检测系统上检测也难以得到理想的测定结果^[1-2]。如何分析和评估定性检测系统的不稳定性是否在可接受范围之内是检验工作者关心的问题。HBV 表面抗原(HBsAg)是 HBV 感染后最早出现的血清标志物之一,在 HBV 定性检测中占有重要的地位。作者选取对 HBsAg 的检测来评估本实验室检测系统定性检测 HBsAg 的重复性是否在可接受范围之内。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 检测系统的组成 仪器:瑞士产 Xiril 智能液体处理工作站,德国 Dade Behring 公司产 BEPⅢ全自动酶联分析仪;试剂:中山生物工程有限公司生产,批号为 20111126-2,临界值为 2.1N(N 为阴性对照均值, $N < 0.05$ 时,按 0.05 计算),阴阳对照采用试剂配套阴阳品;质控品:来自卫生部临床检验中心 HBsAg 质控品(批号为 201109003,浓度为 1 IU/mL)。

1.1.2 样本的选用 样本选用卫生部临床检验中心 HBsAg

质控品[批号为 GBW(E)090041,浓度为 2 IU/mL]。

1.2 方法

1.2.1 临界值浓度样本的制备 对卫生部临床检验中心 HBsAg 质控品(批号为 GBW(E)090041,浓度为 2 IU/mL)进行连续的五点倍比稀释,制成不同浓度的样本,每一稀释倍数的样本每天上午、下午各测定一批,每批测定 2 份,共检测 5 d。以每一稀释倍数样本的浓度值为横坐标,以每一稀释倍数样本 20 次测定的均值(S/CO)为纵坐标,进行曲线拟合计算出 S/CO 为 1 时的稀释倍数。对此稀释倍数的样本每天上午、下午各测定一批,每批测定 4 份,共检测 5 d。

1.2.2 ±20%临界值浓度样本的检测 对根据拟合曲线计算得到的±20%浓度的样本进行检测,每天测定 2 批,每批测定 2 份,共检测 5 d。

1.2.3 每一批同时进行检测的阴阳对照和批号为 201109003 的卫生部临床检验中心 HBsAg 质控品均要求在控。否则应弃掉此批检测结果。

1.3 性能验证标准

1.3.1 临界值样本验证标准 制备的临界值样本进行无限次测定,检测结果其中 50%为阴性,50%为阳性,说明制备的临界值血清符合要求。

1.3.2 检测系统验证标准 在临界值基础上制备的-20%浓度的样本检测结果大于或等于 95%结果为阴性,+20%浓度的样本检测结果大于或等于 95%为阳性,那么此检测系统测定±20%浓度范围以外的样本可以给出稳定的结果。

1.4 统计学分析 对进行拟合的数据进行直线相关和回归的

离群值的检验,不采用有明显人为误差的结果,要求 $r \geq 0.975$ 或 $r^2 \geq 0.95$ 。

2 结 果

2.1 进行直线相关和回归的离群值检验后的拟合曲线 见图 1。

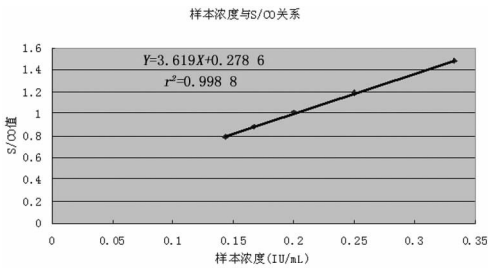


图 1 样本浓度与 20 次测定均值(S/CO)的关系

2.2 临界值浓度样本和±20%临界值浓度样本的测定结果见表 1。

表 1 临界值浓度样本和±20%临界值浓度样本的测定结果

项目	临界值浓度样本	-20%临界值 浓度样本	+20%临界值 浓度样本
阴性(次)	21	19	0
阳性(次)	19	1	20
合计	40	20	20

3 讨 论

HBsAg 作为 HBV 感染机体的重要检测指标,对诊断是否患有乙型肝炎具有重要的意义。但由于定性检测的特殊性(影响因素众多)^[2]和操作程序的难以完全标准化,致使其定性检测的实验室内、实验室内批间的可比性差。浓度为 1 ng/mL 的 HBsAg 室间质评物不同实验室检出符合率甚至不到 70%^[3],这给临床判断带来了困难。

为实现 HBV 标志物检测的标准化,厂家作出了一定的说明,各个实验室也建立了针对自己实验室的标准化操作程序,但面对定性检测的极不稳定性,如何实现同一检测系统不同测定批次间的可比性,即定性检测的良好重复性,是一个迫切的现实问题。

NCCLS 的《EP12-12A 文件》对实验室如何对定性试验进行重复性评估给出了说明,本实验室选取具有重要意义的 Hb-sAg 进行重复性试验的探讨,用以评估本实验室检测系统定性检测 HBsAg 的重复性。

临界值作为定性试验的重要判断依据,在定性试验中扮演着重要的角色。对于试剂生产商提供的临界值可以通过一定

的方法加以评估^[4],本文不再另外说明。本试验直接采用试剂生产商提供的临界值作为判断标准。在定性试验重复性的评估中,对临界值样本的验证是至关重要的。在室内质控稳定,批间变异(CV%)在 15%左右的情况下根据拟合曲线得出的临界值是可信的^[4],即此临界值样本的无限次测定应该有 50%为阴性、50%为阳性^[5];但对其验证仍是不可忽略的,测定的总次数不应少于 20 次,测定次数越多所得的结果越具代表性。考虑到试验的可操作性,本试验对临界值样本验证的次数设定为 40 次。在临界值样本测定中有 21 次被判断为阴性,而阴性结果中最大 S/CO 为 0.99,出现阴性与阳性不完全相等的情况可能与检测次数不够多有关。

表 1 表明本实验室在检测±20%临界值浓度以外的样本时,可以得到 95%的可信度^[6],满足 EP12-12A 文件^[6]对实验室定性检测重复性的要求。而±20%临界值浓度范围内的标本可以通过间隔一定时间后重新采集患者标本复查的办法或多种方法联合检测加以确认^[7]。

由于定性检测影响因素较多,如人员、试剂、样本、加样、温育、洗板、显色和比色等,这些均可影响检测的准确性。因此,实验室在加强对实验室环境、设施和设备监测的同时,还应建立针对本实验室的标准化操作程序,强化对人员的培训,摸索出不同检测系统常规室内质控的监测方法。积极参加卫生部和省临床检验中心的室间质评,以确保本实验室检测结果的可靠性,为临床判断提供更具可信度的依据。

参考文献

[1] 李国辉. 乙型肝炎病毒标志物检测存放时间的对比分析[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(24): 1534-1535.
[2] 饶月丽, 张伟强, 邹丽娜. 酶联免疫吸附试验室内质控影响因素的分析[J]. 临床血液学杂志, 2009, 22(12): 685-686.
[3] 蒋涛, 邹伟民. 广东省临床免疫学检验质量控制情况报告[J]. 广西医学, 2006, 28(5): 678-680.
[4] 李金明. 临床酶免疫测定技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2005: 100-105, 168.
[5] 杨有业, 张秀明. 临床检验方法学评价[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 300-301.
[6] CLSI. User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline, EP12-2A[S]. 2nd ed. Wayne, PA: CLSI, 2002: 1-16.
[7] 汤春园, 廖东铮, 李山, 等. HBsAg 低值弱阳性的临床探讨[J]. 广西医学, 2008, 30(4): 476-478.

(收稿日期: 2012-02-29)

(上接第 2437 页)

病患者尿蛋白成分与肾脏病理类型的关系[J]. 中华肾脏病杂志, 2006, 22(5): 271-274.
[5] 王瑞石, 刘志红, 尹茹, 等. 肾小管损伤标志物检测的临床意义及影响因素[J]. 肾脏病学与透析移植杂志, 2005, 14(2): 110-116.
[6] 刘海英, 姜林芳, 郝风珍. 慢性肾病血栓前状态的临床研究状况[J]. 中国中医药科技, 2006, 13(3): 208-209.

[7] Nakamura A, Suzuki T, Kohsaka T. Renal tubular function modulates urinary levels of interleukin-6[J]. Nephron, 1995, 70: 416-421.
[8] 梁永正, 史伟, 刘双信, 等. 肾小管功能检测在 Ig 肾病中的临床意义[J]. 黑龙江医学, 2004, 24(1): 15-17.

(收稿日期: 2012-03-06)