

· 实验室研究 ·

对四种国产乙型肝炎酶联免疫试剂盒的灵敏度和特异度分析

吴星 周诚 黄维金 祁自柏 梁争论 李河民 庄辉

【摘要】 目的 比较 4 种国产乙型肝炎(乙肝)ELISA 试剂盒的灵敏度和特异度。方法 取慢性乙肝患者和不合格献血员血液样本 594 份,应用 4 种国产乙肝 ELISA 试剂盒检测 HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe和抗-HBc,并与 1 种国外乙肝化学发光试剂盒(Abbott 公司 Architect)比较,对结果不一致的样本再用各试剂盒做双孔重复检测,对 HBsAg 临界值附近的样本用 Abbott HBsAg 确证试剂盒(Architect HBsAg confirm)验证;以 Abbott 试剂盒(Architect)的检测结果为标准,计算 4 种国产 ELISA 试剂盒的灵敏度、特异度、总符合率和约登指数。然后用上述试剂盒检测 HBV 5 项标志物的灵敏度参比品,比较不同试剂盒的灵敏度。结果 与 Abbott 公司 Architect 试剂盒相比,国产 HBsAg ELISA 试剂盒的灵敏度低 4~10 倍;抗-HBs、HBeAg、抗-HBe和抗-HBc ELISA 试剂盒的灵敏度低 4~16 倍;且有假阳性。HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe和抗-HBc 的总符合率分别为 96.46%~98.15%、94.28%~98.15%、98.15%~99.49%、90.07%~96.30%、92.09%~96.80%。结论 国产乙肝 ELISA 试剂盒的灵敏度和特异度有待进一步提高。

【关键词】 乙型肝炎病毒;诊断试剂;酶联免疫吸附试验

Sensitivity and specificity of 4 domestic ELISA kits for detection of hepatitis B virus markers WU Xing*, ZHOU Cheng, HUANG Wei-jin, QI Zi-bai, LIANG Zheng-lun, LI He-min, ZHUANG Hui. *National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China Corresponding author: ZHUANG Hui, Email: zhuangbmu@126.com

【Abstract】 **Objective** To compare and analyze the sensitivity, specificity of 4 domestic ELISA kits for detection of hepatitis B virus (HBV) markers (HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe, and anti-HBc). **Methods** Five hundred and ninety four serum samples collected from patients with chronic hepatitis B and abnormal blood donors were detected for HBV markers and by 4 domestic ELISA kits. Samples with conflicting results by different diagnostic kits were retested. Samples with the HBsAg values close to the cut-off point were detected by Abbott HBsAg confirmation kit (Architect HBsAg confirm). Sensitivity of the kits was determined, using the national sensitivity reference panels for HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe and anti-HBc. **Results** The rates of sensitivity on 4 domestic kits for detection of HBsAg were 4 to 10 times lower, and on the 4 domestic kits for detection of anti-HBs, HBeAg, anti-HBe and anti-HBc were 4 to 16 times lower, as compared to Abbott Architect kits. In addition, the domestic HBV ELISA kits had some false positive results. The total coincidence rates of HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe, anti-HBc were 96.46%-98.15%, 94.28%-98.15%, 98.15%-99.49%, 90.07%-96.30%, 92.09%-96.80%, respectively. **Conclusion** Both sensitivity and specificity of the domestically produced HBV ELISA kits should be improved.

【Key words】 Hepatitis B virus; Diagnostic kits; ELISA

我国为 HBV 感染高流行区,对人群 HBV 感染标志物的检测和筛查尤为重要。据统计,我国每年仅国产 HBsAg ELISA 试剂盒的使用量约 2.4 亿人次,占 HBsAg 总检测量的 99%。为保证乙型肝炎

(乙肝)临床诊断的准确性和安全输血,需要灵敏度高、特异性好的诊断试剂盒。本研究选取国内占有较大市场份额的 4 家国产 ELISA 试剂盒,对 594 份慢性乙肝患者和不合格献血员的血液样本进行检测,现将结果报道如下。

基金项目:国家“十五”科技攻关计划资助项目(2004BA718B02)

作者单位:100050 北京,中国药品生物制品检定所(吴星、周诚、黄维金、祁自柏、梁争论、李河民);北京大学医学部(庄辉)

通讯作者:庄辉, Email: zhuangbmu@126.com

材料与方法

1. 临床血液样本:从北京、湖北、山东、河南、河

北等地区收集慢性乙肝患者血清及经筛选不合格的献血员血浆样本共 594 份,置 -70℃ 冰箱备检。

2. 试剂: 4 种国产 5 项 HBV 血清学标志物 ELISA 试剂盒,生产厂家分别以 A、B、C、D 表示(表 1)。另采用 1 种国外 HBsAg EIA 试剂(Murex HBsAg)、1 种国外 5 项 HBV 血清学标志物化学发光试剂(Abbott 公司 Architect HBsAg)进行比较。HBsAg 确证试剂盒为 Abbott 公司 Architect HBsAg confirm 试剂盒,批号为 31399HN00。

表1 研究所用试剂盒编号

检测项目	国外 EIA	国外化学发光法	国产 ELISA 试剂盒			
			A	B	C	D
HBsAg	I1'	I1	A1	B1	C1	D1
抗-HBs	-	I2	A2	B2	C2	D2
HBeAg	-	I3	A3	B3	C3	D3
抗-HBe	-	I4	A4	B4	C4	D4
抗-HBc	-	I5	A5	B5	C5	D5

3. 灵敏度参比品: ① HBsAg 灵敏度参比品: 以 WHO 提供的 HBsAg 定量标准品(NIBSC Code; 00/880, 每安瓿冻干血清中 HBsAg 含量为 33 IU, 每安瓿加入 1 ml 无菌超纯水后得理论浓度为 33 IU/ml 的标准血清)为依据, 标定浓度分别为 5.56、2.78、1.39、0.70、0.35、0.18、0.09、0.04 IU/ml 的系列血清。② 抗-HBs 灵敏度参比品: 根据 WHO 标准品标定的国家参比品。③ 其余 3 项 HBV 血清学标志物的灵敏度参比品: 将国家标准品经适当系列稀释后制备。

4. 评价方法: 首先用各种试剂盒对每一份样本检测 5 项 HBV 血清学标志物, 按试剂盒使用说明书判定结果。凡各种试剂盒结果不一致的样本, 用原试剂盒分别做双孔重测。若 HBsAg 重测后仍不能得出一致结果, 则对该样本用 Abbott 确证试剂盒检测。如未中和孔 S/CO 值 ≥ 1.00, 且中和孔 ≥ 50% 时, 确证为 HBsAg 阳性; 如未中和孔 S/CO 值 < 1.00, 则确证为阴性。为便于统计, 以 Architect HBsAg 检测结果为参照, 计算各种试剂盒的灵敏度、特异度、总符合率和约登指数。抗-HBs、HBeAg、抗-HBe 重测后, 以 Architect HBsAg 检测结果为参照, 计算各种试剂盒的灵敏度、特异度、总符合率和约登指数。

由于国产抗-HBc ELISA 试剂盒说明书中, 均注明可用原倍血清和稀释后血清进行检测, 检测结果用不同方法确定临界值, 因此, 为比较两种检测结果的差异, 选取国产试剂盒 A5 检测 30 倍稀释后的

血清样本, 计算该试剂盒检测原倍血清和稀释后血清的灵敏度、特异度、总符合率和约登指数。用各种试剂盒检测灵敏度参比品, 比较不同厂家试剂盒的灵敏度。用各种试剂盒检测国家参考品中灵敏度血清, 比较不同厂家试剂盒的精密性。

5. 统计学分析: 应用统计学分析软件 SPSS 11.0 进行 χ^2 检验及分析。

结 果

1. 血清样本检测结果: ① 用 4 种国产 HBsAg ELISA 与 1 种国外 HBsAg ELISA (Abbott 公司 Murex) 试剂盒比较, 同时检测 594 份血液样本, 以 Murex HBsAg 试剂盒 (I1') 为标准, 4 种国产 HBsAg ELISA 试剂盒的灵敏度、特异度、总符合率和约登指数见表 2。② 4 种国产抗-HBs ELISA、HBeAg ELISA、抗-HBe ELISA、抗-HBc ELISA 的灵敏度、特异度、总符合率和约登指数见表 3~6。用国产 A5 试剂盒分别检测原倍血清和稀释后血清的抗-HBc, 结果检测稀释后血样的灵敏度明显低于原倍血清 ($\chi^2 = 266.5, P < 0.005$), 见表 6。

表2 594 份样本 HBsAg 检测结果比较

项目	样本数	A1		B1		C1		D1	
		-	+	-	+	-	+	-	+
I1' -	227	226	1	226	1	225	2	222	5
+	367	10	357	20	347	7	360	7	360
灵敏度 (%)		97.28		94.55		98.09		98.09	
特异度 (%)		99.56		91.87		99.12		97.80	
总符合率 (%)		98.15		96.46		98.48		97.98	
约登指数		0.97		0.94		0.97		0.96	

表3 594 份样本抗-HBs 检测结果比较

项目	样本数	A2		B2		C2		D2	
		-	+	-	+	-	+	-	+
I2 -	485	483	12	467	28	491	4	490	5
+	97	2	96	5	93	13	85	5	93
灵敏度 (%)		97.96		94.90		86.73		94.90	
特异度 (%)		97.58		94.34		99.19		98.99	
总符合率 (%)		97.47		94.28		96.97		98.15	
约登指数		0.96		0.89		0.99		0.99	

表4 594 份样本 HBeAg 检测结果的比较

项目	样本数	A3		B3		C3		D3	
		-	+	-	+	-	+	-	+
I3 -	494	494	0	485	9	494	0	494	0
+	99	2	97	5	94	10	89	10	89
灵敏度 (%)		97.98		94.95		89.90		89.90	
特异度 (%)		100.00		98.18		100.00		100.00	
总符合率 (%)		99.49		97.47		98.15		98.15	
约登指数		0.96		0.89		0.99		0.99	

表5 594 份样本抗-HBe 检测结果比较

项目	样本数	A4		B4		C4		D4	
		-	+	-	+	-	+	-	+
14	330	328	2	313	17	328	2	327	3
+	264	20	244	42	222	21	243	32	232
灵敏度 (%)		92.42		84.09		92.05		87.88	
特异度 (%)		99.39		94.85		99.39		99.09	
总符合率 (%)		96.30		90.07		96.13		94.11	
约登指数		0.92		0.79		0.91		0.87	

表6 594 份样本抗-HBc 检测结果比较

项目	样本数	A5 ^a		A5X ^a		B5		C5		D5	
		-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
15	162	153	9	160	2	127	35	161	1	156	6
+	432	10	422	97	335	12	420	34	398	20	412
灵敏度 (%)		97.69		77.55		97.22		92.13		95.37	
特异度 (%)		94.44		98.77		78.40		99.38		96.30	
总符合率 (%)		96.80		83.33		92.09		94.11		95.62	
约登指数		0.92		0.76		0.76		0.92		0.92	

注：^aA5 为血清原液检测结果，A5X 为血清经过 30 倍稀释后用试剂 A5 的检测结果；A5 与 A5X 比较 $\chi^2 = 266.5, P < 0.005$

2. 灵敏度检测结果：用 4 种国产 HBsAg ELISA 与 1 种国外 HBsAg ELISA (Abbott 公司 Murex) 试剂盒分别检测 HBsAg 灵敏度参比品，结果国外 HBsAg ELISA (Abbott 公司 Murex) 试剂盒的灵敏度较国产试剂盒高 4~10 倍。4 种国产抗-HBs、HBeAg、抗-HBc 和抗-HBc ELISA 试剂盒与 1 种国外化学发光试剂盒 (Abbott 公司 Architect) 检测 4 项 HBV 标志物的灵敏度参比品结果比较见表 7~10。4 种国产抗-HBs、HBeAg、抗-HBe 和抗-HBc ELISA 的灵敏度较国外化学发光试剂盒 (Abbott 公司 Architect) 低 4~16 倍。

表7 594 份样本抗-HBs 国家定量参比品检测结果

标准值 (mIU/ml)	I2 (mIU/ml)	A2 (S/CO)	B2 (S/CO)	C2 (S/CO)	D2 (S/CO)
160.0	178.3	19.8	8.4	10.6	13.3
106.7	116.4	13.3	6.5	6.8	8.6
71.1	73.9	8.9	4.6	4.1	5.4
47.4	53.9	6.1	3.2	2.7	3.8
31.6	36.9	4.1	2.4	1.7	2.6
21.1	19.7	2.8	1.6	1.2	1.8
14.0	11.8	2.0	1.2	1.0	1.2
9.4	10.1	1.4	0.9 ^a	0.6 ^a	0.9 ^a
r ²	0.9981	1.0000	0.9884	0.9955	0.9976

注：^a 为阴性结果；r 为线性值

3. 不同试剂精密性检测结果：用国家参考品中精密性血清检测各个试剂盒的精密性，每个样本加 10 孔，根据检测结果计算 CV (%) 值，每种试剂盒测 3 次，检测结果的均值见表 11。

虽然本次检测结果均符合“中国生物制品规程” (2000 年) 相关规定，但国外化学发光法精密性为

3.0%~9.0%，国内 4 个厂家 ELISA 试剂的精密性分别为 3.0%~17.0%、4.0%~13.0%、6.0%~16.0%、6.0%~11.0%，表明国产 ELISA 试剂的精密性较差。

表8 594 份样本 HBeAg 灵敏度参比品检测结果

稀释度 (1:)	I3 (S/CO)	A3 (S/CO)	B3 (S/CO)	C3 (S/CO)	D3 (S/CO)
4	103.858	12.9	23.7	18.2	15.4
8	53.538	7.2	13.3	8.5	8.7
16	28.317	3.9	6.3	4.1	4.5
32	13.864	1.9	3.2	1.7	2.4
64	7.011	1.0	1.5	0.8 ^a	1.4
128	3.759	0.5 ^a	0.6 ^a	0.2 ^a	0.7 ^a
256	2.179	0.3 ^a	0.3 ^a	0.1 ^a	0.4 ^a
512	1.108	0.2 ^a	0.3 ^a	0.2 ^a	0.3 ^a
r ²	0.9995	0.9953	0.9957	0.9996	0.9969

注：^a 为阴性结果

表9 594 份样本抗-HBe 灵敏度参比品检测结果

稀释度 (1:)	I4 (S/CO)	A4 (S/CO)	B4 (S/CO)	C4 (S/CO)	D4 (S/CO)
8	0.0	0.4	0.1	0.0	0.5
16	0.1	0.7	0.5	0.2	0.8
32	0.1	1.3 ^a	0.9	0.7	1.4 ^a
64	0.4	1.9 ^a	2.7 ^a	1.5 ^a	2.2 ^a
128	0.6	2.8 ^a	3.1 ^a	2.2 ^a	2.9 ^a
256	1.0	3.0 ^a	3.3 ^a	2.6 ^a	3.3 ^a
512	1.4	3.6	3.2	2.6	3.5

注：^a 为阴性结果

表10 594 份样本抗-HBc 灵敏度参比品检测结果

稀释度 (1:)	I5 (S/CO)	A5 (S/CO)	B5 (S/CO)	C5 (S/CO)	D5 (S/CO)
16	4.3	0.1	0.1	0.1	0.1
32	3.8	0.2	0.1	0.1	0.1
64	3.5	0.3	0.3	0.3	0.1
128	2.7	0.7	0.6	0.5	0.2
256	2.0	1.3 ^a	1.1 ^a	0.8	1.2 ^a
512	1.5	2.0 ^a	1.5 ^a	1.4 ^a	1.5 ^a
1024	1.0	2.8 ^a	2.0 ^a	1.7 ^a	2.6 ^a

注：^a 为阴性结果

表11 594 份样本各种试剂盒精密性检测结果

检测项目	国外 EIA (%)	国外化学发光法 (%)	国内 ELISA (%)			
			A	B	C	D
HBsAg	6.0	4.0	5.0	7.0	6.0	7.0
抗-HBs	-	5.0	3.0	4.0	8.0	8.0
HBeAg	-	5.0	8.0	12.0	8.0	6.0
抗-HBe	-	9.0	9.0	12.0	7.0	7.0
抗-HBc	-	3.0	17.0	13.0	16.0	11.0

讨 论

临床上广泛应用 HBV 血清学标志物检测，以诊断 HBV 感染状况及观察疗效等。目前国内针对 HBV 血清学标志物的检测试剂较多，本研究对 4 种国内最常用的 HBV 血清学标志物 ELISA 与 1 种国外化学发光试剂盒 (Abbott 公司 Architect HBsAg)

进行比较,其灵敏度较国外化学发光试剂盒低4~16倍,并有一定假阳性。国产抗-HBc ELISA 试剂盒检测稀释后血清样本的灵敏度较原样本明显为低(97.69%:77.55%)。因此,国内试剂盒在保证高特异度的同时,应进一步提高灵敏度,降低假阴性率。

近年的研究显示,在 HBsAg 阴性献血员中,HBV DNA 阳性率为1.44%^[1-3];二次筛查后的血清,经核酸检测,漏检率为0.49%^[3],从而造成输血隐患,所用试剂盒的灵敏度较低可能是其主要原因^[4]。因此,提高试剂盒的灵敏度十分重要。本研究所用国产试剂盒均为 ELISA,而国外 Abbott 公司 Architect 试剂盒为化学发光试剂盒,且为全自动操作;而国产试剂盒为手工操作,这是导致其灵敏度和精密性相对较低的原因之一^[5]。此外,国产 ELISA 试剂盒采用一步法,抗原抗体反应时间不够充分,可能影响试剂盒的灵敏度和特异度,导致弱阳性样本的漏检^[6-9]。国产试剂盒所用的单克隆抗体来源不

稳定,纯化工艺不够先进等因素也可能影响其灵敏度和特异度^[9]。

参 考 文 献

- [1] Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, et al. Frequent presence of HBV in the sera of HBsAg negative, anti-HBc-positive blood donors. *Transfusion*, 2001, 41(9):1093-1099.
- [2] 吴君.乙型肝炎病毒感染的综合性预防. *世界华人消化杂志*, 2006, 14(12):1135-1138.
- [3] 王良华,叶贤林,尚桂芳,等.免疫筛查阴性献血者血清病毒核酸检测的研究. *中国输血杂志*, 2005, 18(4):286-289.
- [4] 耿秀凤. HBsAg 阴性献血者乙型肝炎病毒感染调查. *中国输血杂志*, 2005, 18(5):419.
- [5] 李振甲,应希堂,马世俊.化学发光免疫分析技术的研究现状与展望. *国际检验医学杂志*, 2006, 27(1):95-97.
- [6] 陈传德. ELISA 一步检测 HBsAg 影响因素浅析. *中国卫生检验杂志*, 2003, 13(3):358.
- [7] 徐锡霞,邓巍.温育条件对 ELISA 定性测定 HBsAg 结果的影响. *实用肝脏病杂志*, 2005, 8(1):16-18.
- [8] 岳西全,石宏,李迎. ELISA 法检测 HBsAg 影响结果的重要因素的分析. *中国实验诊断学*, 2007, 11(2):213-215.
- [9] 李宁.影响酶联免疫吸附试验测定的关键环节. *检验医学与临床*, 2006, 3(7):314-315.

(收稿日期:2008-01-05)

(本文编辑:尹廉)

· 会议纪要 ·

中华医学会卫生学分会换届选举及第七届委员会工作会议纪要

2008 年 7 月 25 - 26 日,中华医学会卫生学分会换届选举及第七届委员会工作会议在北京龙爪树宾馆成功召开。中华医学会副秘书长韩晓明代表中华医学会领导出席会议并讲话,中华医学会组织管理部主任张辉主持会议。

25 日,召开第六届委员会常委会扩大会议,提出卫生学分会第七届委员会常委、主任委员、候任主任委员和副主任委员等候选名单。26 日,召开第七届委员会换届选举会议并进行选举。七届分会共有委员 61 名,其中 42 名委员参加了本次换届选举会议,超过三分之二的法定人数。经全体到会委员无记名投票,选举曾光、张建中、季成叶、李兴旺、王广发、冯子健、吴永宁、王颀秀、朱会宾、孙长瀛、朱樑、张胜年、姜庆五、从黎明、汪华、段广才、康均行、闫永平、孟蕾等 19 人为中华医学会卫生学分会第七届委员会常务委员;中国疾病预防控制中心曾光研究员当选第七届委员会主任委员,张建中研究员当选为候任主任委员;姜庆五、张胜年、李兴旺、段广才 4 人当选为副主任委员。第六届主任委员郭存三教授仍以上届主任委员的身份参与学会的领导工作。

换届选举会议结束后,第七届委员会随即召开了第一次常委会议,主任委员曾光主持会议。会议提议北京大学儿童青少年卫生研究所季成叶教授为卫生学分会第七届委员会秘书长,中国疾病预防控制中心罗会明、施国庆为副秘书长,孟媛为第七届委员会工作秘书。

全体委员认真回顾了分会的光荣历史,中华医学会公共卫生学分会 1937 年即已成立,第一任主任委员是中国公共卫生和流行病学的创始人伍连德先生,以后的主任委员包括金宝善、叶恭绍等均均为公共卫生学界的大家。会议号召全体委员要继承和发扬前辈的光荣传统,今后分会通过开展多学科合作,共同应对公共卫生事件,以推动中国公共卫生发展为己任。建议在条件成熟时将“中华医学会卫生学分会”名称恢复到之前的名称,即“中华医学会公共卫生分会”,这既有利于学科的进一步发展,又符合学会定位于大公共卫生内涵。

本次换届选举和工作会议期间,还特邀 8 位专家分别从多学科合作角度,作了关于病因研究、疾病预防控制、疾病防治模式、公共卫生安全、学科交叉与公共卫生应对等专题报告。中国疾病预防控制中心曾光研究员作了“航船驶向何方”专题报告,深刻分析了我国疾病预防控制需要医学多学科密切合作的现状,提出学会应是多学科合作的展示、交流和互相学习的学术平台。

会议决定:①授权第七届委员会常委冯子健研究员牵头筹备成立青年委员会,并尽快组织委员开展青年委员会委员的推荐摸底,并于 2008 年 10 月召开青年委员会成立大会。②2009 年举办中华医学会卫生学分会全国大会,由候任主任委员张建中研究员负责筹备,并于 2008 年内成立筹备组。③鼓励尽快组建学组,每个学组至少由 3 名委员联合筹备,成熟一个,建立一个。

本次换届选举和工作会议取得了圆满成功,受到中华医学会参会领导和委员们的充分肯定。新一届委员会的成立,掀开了中华医学会卫生学分会新的发展篇章。