

ELISA 检测抗 - HCV 阴性高值样品的实验报告

马晓康,王 军,冯建平

(贵州省血液中心,贵州 贵阳 550002)

文章编号:1009 - 5519(2004)15 - 1527 - 01

中图分类号:R445

文献标识码:B

目前测定抗 - HCV 大多用 ELISA 试剂盒,笔者在工作中发现,用 ELISA 测定抗 - HCV 时遇到部份阴性高值样品而难于判断结果。虽按试剂盒说明书低于 CO 值(临界值)的可判为阴性样品,但就目前国产试剂在某些方面存在的不足,常造成测定结果不稳定,均一性不好等诸多问题,作为供血单位,对传染性标志物的检测结果更要慎重,特别是对阴性高值样品的结果判读,切不可一概而论,要谨防弱阳性样品的漏检,以免给他人造成危害。因此我们选用经两厂家试剂测得的阴性高值和弱阳性样品作了重复性试验,同时用低值质控血清对照,观察在阈值附近样品的变动情况,以便对阴性高值样品的判读取舍范围寻找参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料:(1)阴性高值样品和弱阳性样品(实验室自制,经两厂家试剂测定结果相同);(2)抗 - HCV 质控血清(2NCU/ml,卫生部临检中心,批号 0304,经 1:6 倍稀释成弱阳性);(3)抗 - HCV 诊断试剂盒(华美生物,批号 20031010);(4)TECAN 酶标仪(瑞士);(5)DEM - II 洗板机(北京拓普)。

1.2 方法:取 A、B、C 三块反应板,分别向 A 板内加入阴性高质样品 90 孔,B 板内加入弱阳性样品 90 孔,C 板板内加入 1:6 倍稀释的质控血清 62 孔,按试剂盒说明书操作及判读结果。

2 结果

从 A 板中找出 $\geq CO$ 的测定值个数,B 板、C 板中找出 $< CO$ 的测定值个数,列于表内,结果见表 1。

3 讨论

在实际工作中用 EITSA 测定抗 - HCV 常遇到一些肉眼观察明显阳性的样品,通过酶标仪读板后,测定值虽很高,甚至接近临界值(被称之为阴性高质样品)。但通常可判读为阴性,针对这类样品的定性(阴性或阳性)问题,业内也一直在探讨中。

笔者选定在阈值附近的阳性和阴性样品作了重复性试验,结果 C 板(1:6 倍稀释的质控血清)有 24.5%(15/62)的样品的测定值 $< CO$,A 板、B 板也分别有 17.8%(16/90)和 20.0%(18/90)的样品测定值 $> CO$ 或 $< CO$,由此可见,阈值附近的阳性样品很可能漏检。在实际工作中,若出现测定值 $< CO$ 的高值阴性样品,很可能就是一份阳性样品漏检造成的,造成漏检的因素很多,但与试剂盒的质量好坏更为直接。国产 ELISA 抗 - HCV 试剂盒虽经国家有关部门批批合格,但仍存在有批间差异、板间差异以及孔间差异,而孔间变异系数大可能造成板孔均一性不好,进而导致检测结果不稳定,重复性不好,使阈值附近的样品界于阴阳性之间^[1],表 1 中 B 板和 C 板漏检样品的 OD 值都接近阈值(似阴性高值或灰带区样品)。

日常工作中通常以 $< CO$ 或 $\geq CO$ 的样品测定值作为阴阳性结果的判断标准,很少考虑 S/CO 值的大小问题。实际上每个感染者抗体滴度都会由低到高这样一个发展过程,对于早期感染者,体内抗体含量尚低,OD 值可轻微升高,仅处在灰带区,S/CO 可小于 1,我们在对这类样品的判读时一定要多加注意。

表 1 A、B、C 三反应板测定结果小于或大于临界值的样品例数

A 板($\geq CO$ 值)			B 板($< CO$ 值)			C 板($\geq CO$ 值)		
序号	OD	S/CO	序号	OD	S/CO	序号	OD	S/CO
1	0.154	1.00	1	0.125	0.75	1	0.159	0.95
2	0.160	1.04	2	0.145	0.87	2	0.160	0.96
3	1.60	1.04	3	0.133	0.80	3	0.162	0.97
4	0.161	1.05	4	0.140	0.84	4	0.158	0.95
5	0.159	1.03	5	0.123	0.74	5	0.159	0.95
6	0.173	1.12	6	0.146	0.88	6	0.166	0.99
7	0.170	1.10	7	0.153	0.81	7	0.164	0.98
8	0.156	1.01	8	0.122	0.73	8	0.135	0.81
9	0.156	1.01	9	0.130	0.78	9	0.149	0.89
10	0.155	1.01	10	0.153	0.92	10	0.163	0.98
11	0.168	1.09	11	0.112	0.67	11	0.163	0.98
12	0.157	1.02	12	0.144	0.87	12	0.160	0.96
13	0.167	1.08	13	0.115	0.69	13	0.124	0.74
14	0.159	1.03	14	0.146	0.88	14	0.158	0.95
15	0.156	1.01	15	0.138	0.83	15	0.148	0.89
16	0.159	1.03	16	0.145	0.87	-	-	-
-	-	-	17	0.140	0.84	-	-	-
-	-	-	18	0.163	0.98	-	-	-
CO	0.154			0.166			0.167	
\bar{x}	0.130			0.171			0.177	
S	0.019			0.023			0.018	
CV%	14.7			13.5			10.3	
总例数	90			90			62	
百分率(%)	17.8(16/19)			20.0(18/90)			24.2(15/62)	

注: \bar{x} 、s 分别是总例数的平均数和标准差。

经实践得知,笔者认为对于阴性高值样品的结果判读要低于 CO 值的 20% - 25% 为恰当,这相当于 S/CO 值在 0.75 或 0.8,当样品的 S/CO 达到这个水平的时候,反应板孔内的显色反应是相当深的,我们不可就轻易判读为阴性,经实验统计,或低于平均 CO 值以下 3S($\bar{x} - 3S$) 的测定值样品,均可考虑做双孔重复试验,以防止实验产生的假阴性。实验室要做好室内质量控制,尽量减少各种因素引起的实验误差,并找到适当的临界值质控血清,随时了解和发现实验过程中所发生的变异和误差。我室用华美试剂测定 2NCU/ml 质控血清的平均 S/CO 值约在 9.3 左右,笔者认为不宜作为临界值血清使用。

对血源样品的检测虽要求用双试剂,但更需用质量较好的,批批合格的试剂盒,使用单位还需做试剂盒特异性、灵敏度以及精密度的测试,掌握这批剂的指标特征,提高测定结果的准确性,以杜绝假阴性血液给他人带来的健康危害,减少假阳性结果造成的血源浪费。

参考文献:

[1] 胡继彦,余妙娥.9 种抗 - HCV ELISA 试剂质量比较[J].中国输血杂志,2003,16(4)263.