

定性酶免疫试验中灰区的建立方法及合理性探讨

胡慧梅

(山西医科大学第一医院医学检验科 山西 太原 030001)

【摘要】在定性酶免疫试验中,对于处在临界值附近的标本很难判定其结果是真阳性还是假阳性,所以实验室一般根据需要设置一灰区范围。灰区范围决定了检测系统的灵敏度和特异性;如果灰区范围设置过宽,会造成增加不必要的额外工作量,如果灰区范围设置过窄,会有对检验结果误判的风险。通过文献查阅,归纳总结了6种灰区的设置方法;所设置的灰区范围是否合理,还应对其适用性进行验证;对于处在灰区范围内的样本要建立确认方法和程序,以便给出一个准确无误的结果。

【关键词】灰区;临界值;酶免疫试验

【中图分类号】R392

【文献标识码】A

【文章编号】2095-1752(2022)08-0130-03

在定性酶免疫试验中,临界值或CUT OFF值(CO)是界定检测结果阳性或阴性的标准,CUT OFF值真的那么神奇吗?对于处在CUT OFF值附近的检测结果有没有误判呢?研究者通过检测大量阴性样本与阳性样本之后发现,在CUT OFF值附近会有少量样本检测值有重叠现象。这一部分样本的检测结果,如果按照CUT OFF值直接进行判断的话,很容易造成假阳性或假阴性结果。在临床上如果出现假阴性结果,将导致漏检现象;如果出现假阳性结果,则导致误判,给临床造成不可挽回的错误。为了避免假阳性或假阴性结果的出现,对处在CUT OFF值附近的检测结果要慎重对待,设置一个合理的判断范围,达到对检验结果的判断既准确又减少误判率,这个判断范围称为“灰区”^[1]。“灰区”应该怎样科学合理的设置呢?如果灰区范围设置过宽,会造成增加不必要的额外工作量,如果灰区范围设置过窄,会有对检验结果误判的风险。通过文献查阅,现将灰区的设置方法归纳总结如下。首先了解定性酶免疫试验的临界值或CUT OFF值的设置方法。

1. ELISA 试验类型及 CUT OFF 值设置方法

ELISA(酶联免疫吸附试验)有多种试验类型,常用的试验类型有:夹心法、间接法、竞争法、捕获法;不同的试验类型其CUT OFF(CO)值的计算方法各有不同。

(1) $CO = 2.1 \times N$ (N为阴性对照吸光度值)。当 $(N < 0.05)$ 时按 0.05 计算, $(N > 0.05)$ 时按实际值计算;一般情况下 $(N < 0.05)$, 此时 N 按 0.05 计算, 则 CUT OFF 为定值。适用于夹心法、间接法和捕获法。结果判断: $S/CO \geq 1$, 结果为阳性; $S/CO < 1$, 结果为阴性(S为样本的吸光度值)。(2) $CO = N + C$ (C为常数), 要求阴性对照吸光度值 ≤ 0.080 或 ≤ 0.100 ; 适用于夹心法和间接法。结果判断: $S/CO \geq 1$, 结果为阳性; $S/CO < 1$, 结果为阴性。(3) $CO = N \times 0.5$, 一般要求 $N \geq 1.000$; 常

用于竞争法。结果判断: $S/CO \geq 1$, 结果为阴性; $S/CO < 1$, 结果为阳性。(4) $CO = (N + P) / 2$, 常用于竞争法。结果判断: $S/CO \geq 1$, 结果为阴性; $S/CO < 1$, 结果为阳性。

2. 灰区的设置方法

对于处在CUT OFF值附近的标本也即弱反应性标本,如果我们按照结果判断标准依然决然把本次检验结果判为阳性或阴性,都存在误判的风险。为了避免误判风险,我们应科学合理的设置一个灰区范围。

2.1 $C_5 \sim C_{95}$ 区间设置为灰区

根据行业标准将 $C_5 \sim C_{95}$ 区间为设置为检测系统或试剂的“灰区”^[2]。 C_5 的定义:检测浓度为 C_5 的分析物时将产生 5% 的阳性结果。也就是,对一样本进行多次重复检测,其结果有 5% 是阳性,那么这一样本的检测浓度就是 C_5 ;如果用浓度小于 C_5 的样本进行重复性检测时,将持续得到阴性结果; C_{95} 定义:检测浓度为 C_{95} 的分析物时将产生 95% 的阳性结果。也即是对同一样本进行多次重复检测,其结果有 95% 是阳性,这一样本的检测浓度就是 C_{95} ;如果用浓度大于 C_{95} 的样本进行重复性检测时,将持续得到阳性结果;如果某一样本浓度处在 $C_5 \sim C_{95}$ 范围时,重复检测这一样本可能会获得不完全一致的结果,而在 $C_5 \sim C_{95}$ 区间之外的样本经多次检测应得到相同一致的结果。 $C_5 \sim C_{95}$ 区间反映了重复检测可能获得不完全一致结果的浓度范围,因此可把 $C_5 \sim C_{95}$ 区间设置为灰区。

2.2 $C_{50} \pm 20\%$ 设置为灰区

C_{50} 的定义:检测浓度为 C_{50} 的分析物时将产生 50% 的阳性结果。也就是对一样本进行多次重复检测,其结果有 50% 是阳性,那么这一样本的检测浓度就是 C_{50} 。 C_{50} 即临界值或CUT OFF值。将 C_{50} 的上下 20% 范围设置成灰区^[3-4],因为处在这一区间的样本经多次检测会得到

不一致的结果。郭宏^[5]对ELISA法检测抗-HIV设置灰区进行探讨,首先制备 C_{50} 浓度标本,进行40次验证试验,确认此标本基本符合 C_{50} 的定义,然后使用 C_{50} 稀释度标本进行后续试验,配制 $C_{50} \pm 20\%$ 浓度标本,分别检测20次,其检测结果为100%阳性和100%阴性,统计试验结果 $S/C0$ 值,确定灰区为0.74~1.22。

2.3 采用逆向检测流程法设置灰区

对梅毒螺旋体抗体的检测,灰区的设置常用这种方法。首先对梅毒螺旋体抗体进行初筛,对处在临界值附近的标本再用非梅毒螺旋体血清学试验和TPPA方法进行确认,再对RPR与TPPA检测结果不一致的样本用蛋白免疫印迹试验WB进行确认。最后根据确认结果来确定其灰区范围。赵静等^[6]利用这种方法设置化学发光法检测梅毒螺旋体特异性抗体,灰区范围设定为 $S/C0$ 值1~7;作者又对 $S/C0$ 值处在1~9之间的462例患者结果,通过分组比较 $S/C0$ 值,结合快速血浆反应素环状卡片试验RPR、梅毒螺旋体颗粒凝集试验TPPA及免疫印迹试WB结果确定了合理的灰区范围。

2.4 应用回归方程设置灰区

对于确认为阳性的标本,先进行检测得到其 $S/C0$ 值,使用SPSS软件对 $S/C0$ 值与检测阳性预测值的相关性进行分析,建立曲线拟合模型,当阳性预测值 $Y=0.95$ 时, $S/C0$ 所对应的值即为灰区的上线。张志远等^[7]对878例化学发光法(CLIA)检测血清梅毒抗体阳性的标本用TPPA法进行确认,对779例确认阳性的标本按 $S/C0$ 的大小,分成六组,计算每组的阳性预测值,使用SPSS软件对 $S/C0$ 值与阳性预测值的相关性进行分析,最后设置检验体系的灰区为 $1 \leq S/C0 \leq 7.52$ 。

2.5 应用线型内插法设置灰区

采用SPSS统计软件,以确认的阳性结果为状态变量,以 $S/C0$ 值为统计变量,绘制ROC曲线,使用线型内插法公式^[8]: $(R1-R2) / [R1 - (R/x)] = (P1-P2) / [P1 - P(R=x)]$ 计算灰区上、下限值。 $(R=x)$ 为设定的假阳性率或假阴性率, $P(R=x)$ 为对应的统计变量($S/C0$ 值), $R1$ 为大于 $(R=x)$ 的值, $R2$ 为小于 $(R=x)$ 的值, $P1$ 和 $P2$ 分别为 $R1$ 和 $R2$ 对应的统计变量($S/C0$ 值)。舒丰等^[9]使用线型内插法公式计算灰区上、下限值。取假阴性率和假阳性率 $R=5\%$ (即取 $R=0.05$)为诊断点,设置本实验室梅毒抗体检测灰区范围。并对纳入研究的144例标本进行再分析,灰区之外的样本假阳性率和假阴性率均为0,由此证明用这种方法所建立的灰区是科学的合理的。

2.6 $C0 \pm 2CV$ 设置为灰区

将阳性标本进行一系列稀释后,对每一个稀释度的标本做多次重复检测,计算每一个稀释度标本的 $S/C0$ 均值(X)及变异系数(CV),即得到一系列 X 与 CV 的对应值。以 X 为自变量、 CV 为应变量,将 X 与 CV 做统计分析,用SPSS软件拟合一最优回归方程。取 $X=1$ 时 CV 的对应值,再计算 $(1 \pm 2)CV$,即为灰区范围。在理想条件下, $S/C0=1$ 的标本进行多次检测其结果应在 $X \pm 2SD$ 范围内,因 $SD=X \times CV$,则换算成 $(1 \pm 2)CV$;在实际情况下中很难获得 $S/C0=1$ 的标本,所以灰区的设置常为 $C0 \pm 2CV$ ^[10]。冯晓丹等^[11]在人类免疫缺陷病毒抗体检测“灰区”设置的探讨研究中,将处于 $0.8 < S/C0 < 1.2$ 的30例标本进行分析,利用回归方程计算出 $S/C0$ 的平均值为1时的 CV 值。根据公式 $C0 \pm 2CV$ 计算出灰区为0.796~1.204;作者又验证了所设置的灰区范围的合理性,将46例灰区标本进行免疫印迹确证,结果阳性3例,不确定1例。

以上设置灰区的方法中,有些试验是化学发光法,但对在酶免疫定性试验中灰区的设置提供了很好的思路,具有临床应用价值。

3. 对设置灰区的合理性进行验证

定性酶免疫试验中,最常见的检测项目是感染因子如:HBsAg、抗-HCV、抗-TP、抗-HIV。这些项目的检测结果对临床及患者有着非常重要的意义,尤其在血站对无偿献血者及需要输血者都具有非常重要的意义。在检测中对于弱反应性标本也就是灰区标本要慎重对待。实验室要科学合理的设置灰区范围,既不能把灰区范围设置过窄也不能设置过宽;灰区范围过窄会有误判结果的风险,灰区范围过宽会增加不必要的工作量。

3.1 HBsAg 检测灰区的验证

李丽平等^[12]对无偿献血者血液标本HBsAg结果 $S/C0$ 值在0.5~4范围内的195例标本进行研究,通过对 $S/C0$ 值分段分析,结合核酸检测结果,证实设置灰区的必要性及合理性;国内多位学者对献血者HBsAg ELISA灰区样本进行研究,结果提示,用ELISA法检测HBsAg应合理设置一定范围的灰区,以减少低浓度标本的漏检,最大限度降低输血风险,提高输血安全。

3.2 抗-HCV 检测灰区的验证

陈善华等^[13]对用ELISA法检测抗-HCV结果处于 $0.6 \leq S/C0 < 1.0$ 范围内的167例灰区标本进行研究,

发现有2例标本RIBA确证试验和核酸HCV RNA检测结果同时阳性,后经追踪检测确认,这2例标本正处于“窗口期”;研究表明设立灰区的必要性及灰区设置的合理性。同样王瑞等^[14]使用相同ELISA试剂,由6家血站实验室对同一组标本($n=1053$)进行抗-HCV检测,通过计算6家血站实验室抗-HCV真阳性检出率、灰区标本确证阳性率以及通过绘制ROC曲线,确定6家血站实验室抗-HCV ELISA试验的最佳临界值,论证了用ELISA法检测抗-HCV灰区设定的必要性。

3.3 抗-TP检测灰区的验证

王桂喜等^[15]采用2种ELISA试剂对21874份无偿献血者标本分别进行抗-TP检测,检测结果 $S/CO \geq 0.5$ 的标本做梅毒螺旋体颗粒凝集试验(TPPA),绘制ROC曲线,比较不同 S/CO 情况下灵敏度和特异性的变化。结论试剂厂商提供的 CO 值具有较高灵敏度,满足血液筛查要求,对抗-TP应不设灰区不会造成漏检。同样王玲玲等^[16],也采用ELISA法双试剂检测抗-TP,设置 $0.5 \leq S/CO < 1$ 为检测“灰区”,结论采用ELISA法测定抗-TP,无需设置“灰区”。但谭艳等^[17]将ELISA法测定抗-TP S/CO 值在 $0.5 \sim 7.0$ 范围内的样本进行TPPA检测,以95%的符合率为标准,得出结论用ELISA检测抗-TP S/CO 值的灰区范围应设置为 $1.0 \sim 4.0$ 。

3.4 抗-HIV检测灰区的验证

献血者抗-HIV筛查最常用的方法是ELISA法,为防止“弱阳性标本”漏检,许多血站实验室都设置“灰区”;胡文佳等^[18]应用ROC曲线对抗-HIV ELISA筛查有反应性的献血者标本作了统计分析,结合NAT数据和WB确证结果,验证该实验室开展抗-HIV ELISA筛查时设置“灰区”的必要性。

以上说明每个实验室都应根据实际情况科学合理的设置灰区,并对所设置的灰区加以验证,达到合理化使用。

4. 灰区样本的确认

对于处在灰区范围内的样本要建立确认方法和程序,以便给出一个准确无误的结果;常见的认方法和程序有:对样本进行复测、用另外一种厂家试剂复检、用方法学上特异性比较高的试剂进行确认,核酸检测或者随访等。

5. 结语

综上所述,以上提供6种设置灰区的思路,每个实验室要根据实际情况合理的设置灰区,并制定灰区标本

的确认对策,这样才能得出真实结果,降低结果误判的风险。

【参考文献】

- [1] 李金明. 临床免疫学检验技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010:100-101.
- [2] 国家卫生和计划生育委员会. 临床定性免疫检验重要常规项目分析质量要求: WS/T 494—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017:1.
- [3] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-GL038: 临床免疫学定性检验程序性能验证指南[S]. 北京: 中国合格评定国家认可委员会, 2019:2.
- [4] 国家卫生和计划生育委员会. 定性测定性能评价指南: WS/T 505—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017:1.
- [5] 郭宏. 抗-HIV ELISA检测结果分析及灰区设置研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(6): 691-693.
- [6] 赵静, 卞成蓉, 李伯安, 等. 梅毒螺旋体特异性抗体检测灰区范围分析[J]. 中国医药导报, 2019, 16(16): 151-154.
- [7] 张志远, 罗夏菲, 刘荣静. 应用回归方程设置CLIA法检测梅毒抗体的灰区范围[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(1): 48-51.
- [8] 刘润幸. 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.
- [9] 舒丰, 钟志宏, 许红丽, 等. 应用ROC曲线设置梅毒抗体检测灰区的探讨[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2019, 16(3): 7-10.
- [10] 伍伟健, 郭如华. ELISA试验灰区设置方法的探讨[J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 21(10): 911-912.
- [11] 冯晓丹, 叶莉莉, 高玲娟, 等. 人类免疫缺陷病毒抗体检测“灰区”设置的探讨[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(22): 3332-3333.
- [12] 李丽平, 杨莹, 彭小华, 等. ELISA法检测血液HBsAg灰区区间问题的探讨[J]. 实验与检验医学, 2018, 36(6): 1024-1026.
- [13] 陈善华, 朱丽莉, 吕素梅. 血液筛查ELISA方法检测抗-HCV设置灰区的必要性探讨[J]. 临床血液学杂志, 2019, 32(10): 807-809.
- [14] 王瑞, 葛红卫, 黄力勤, 等. 使用相同抗-HCV ELISA试剂的6家血站实验室灰区设定分析[J]. 中国输血杂志, 2018, 31(2): 105-109.
- [15] 王桂喜, 刘丽, 高尚峰. ELISA方法检测梅毒抗体灰区设置的探讨[J]. 中国输血杂志, 2019, 32(3): 254-256.
- [16] 王玲玲, 朱传凤, 陆荣, 等. 献血者ELISA法检测梅毒抗体灰区设置的合理性探讨[J]. 大医生, 2019, 4(19): 160-161.
- [17] 谭艳, 李媛, 韩晓芳. ELISA检测TP抗体灰区设置的探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(5): 613-615.
- [18] 胡文佳, 王亚武, 冯晨晨, 等. 献血者HIV ELISA反应性标本的结果分析及其灰区设置的探讨[J]. 中国输血杂志, 2018, 31(12): 1337-1340.