

献血者血袋辫血样本使用国产 ELISA 试剂检测 HBsAg, 抗-HCV, HIV Ag/Ab 和抗-TP 项目的可靠性研究*

陈少彬, 何子毅, 刘泽民, 陈庆恺, 魏润葵, 王 庆, 邓妙玲 (东莞市中心血站, 广东东莞 523930)

摘要:目的 比较血袋辫血与试管样本在国产 ELISA 初筛反应性献血者复试结果的差异及漏检情况, 评价辫血复试的可靠性。方法 收集血站 2014 年 7 月 1 日~2018 年 11 月 30 日 HBsAg, 抗-HCV, HIV Ag/Ab 和抗-TP 项目初筛反应性样本的复试结果, 按不同试剂厂家进行分组, 分析辫血与试管样本检测结果(S/CO 值)的差异和漏检情况。结果 不同试剂间辫血与试管检测结果的总体差值范围是-0.144~0.514(中位数), 其中辫血在抗-HCV 万泰组的 S/CO 值大于试管样本($Z=4.806, P=0.000$), 在其余试剂组的 S/CO 值均小于试管样本($Z=2.215\sim13.332$, 均 $P<0.05$); S/CO 值为 0.9~2.0 的弱阳性样本中, 辫血的检测值低于试管的范围是 0.016~0.651(中位数), 相对于试管的漏检率为 7.41%~60.67%, 其中偏差最大的是 HIV Ag/Ab 万泰组, 检测值偏差的四分位数和漏检率分别为 0.651(0.206, 0.886)和 60.67%; 辫血在抗-TP 新创试剂检测中, 设置灰区(90% cutoff)后的漏检率 33.71% 低于不设灰区漏检率 48.31% ($\chi^2=3.925, P=0.048$), 但其它 9 种试剂组设置灰区不能降低辫血的漏检率($\chi^2=0.000\sim3.065$, 均 $P>0.05$)。结论 血袋辫血进行 ELISA 的检测值普遍低于试管样本, 在不同试剂或项目的检测结果偏差和漏检程度不同; 血站实验室对弱阳性样本使用辫血复试需谨慎对待, 应根据实际情况调整血液复试流程或灰区设置。

关键词: 献血者; 血袋辫血; 血液复试; 酶联免疫吸附法; 漏检

中图分类号: R457.12 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2019)05-119-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2019.05.029

Study on the Reliability of Detecting HBsAg, Anti-HCV, HIV Ag/Ab and Anti-TP in Blood Braided Samples from Blood Donors with Domestic ELISA Reagents

CHEN Shao-bin, HE Zi-yi, LIU Ze-min, CHEN Qing-kai, WEI Run-kui, WANG Qing, DENG Miao-ling (Dongguan Blood Center, Guangdong Dongguan 523930, China)

Abstract: **Objective** To compare the differences and leak detection between the retest results of the blood braided samples and the test-tube samples for reactive blood donors screened by domestic ELISA, and evaluate the reliability of the blood braided samples for retests. **Methods** The retest results of HBsAg, anti-HCV, HIV Ag/Ab and anti-TP items screening samples which were reactive in first screening were collected from July 1, 2016 to November 30, 2014, and were grouped by different reagent manufacturers. The difference and leak detection between the blood braided and the test-tube samples retest results (S/CO value) were analyzed. **Results** The range of overall difference between the blood braided and the test-tube samples results was between -0.144 and 0.514 (median). The S/CO value of blood braided samples in anti-HCV Wantai group was greater than that of test-tube samples ($Z=4.806, P=0.000$). In the other reagent groups, the S/CO value was smaller than the test-tube sample ($Z=2.215\sim13.332$, all $P<0.05$). In the weak positive sample with S/CO value of 0.9~2.0, the result values of blood braided samples were lower than the test-tube, and the range was 0.016 to 0.651 (median position). The leak detection rate relative to the test tube was 7.41% to 60.67%, and the maximum deviation was HIV Ag/Ab Wantai group. The quartile and leak detection rate of the result value deviation was 0.651 (0.206, 0.886) and 60.67%. For the blood braided samples, in the detection of anti-TP Xinchuang reagent, the leak detection rate after setting the gray area (90% cutoff) was 33.71% lower than that of the no setting gray area 48.31% ($\chi^2=3.925, P=0.048$), but for the other 9 reagents, the gray area could not reduce the leak detection rate of the blood braided samples ($\chi^2=0.000\sim3.065$, all $P>0.05$). **Conclusion** The result values of ELISA in the blood braided samples were generally lower than that in test-tube samples. The deviation of test results and the degree of leak detection in different reagents or items were different. The blood center laboratory should be cautious when using blood braided samples for retest weakly positive samples. Blood retest process or gray area setting should be adjusted according to the actual situation.

Keywords: blood donor; blood bag blood braided samples; blood retest; ELISA; leak detection

* 基金项目: 东莞市社会科技发展(一般)项目(201750715026368), 东莞市社会科技发展重点项目(201750715026436)。

作者简介: 陈少彬(1982-), 男, 本科, 副主任技师, 主要从事输血相关传染病标志物血流检测, E-mail: chenshaol63@163.com。

2019版《血站技术操作规程》在“血清学检测流程及结果判定”中提出了可选择血袋导管样本进行血清学初次试验为反应性的复试^[1]。由于不同血站选择的血液检测策略不同,有报道指出了试管样本(以下简称“试管”)和血袋辫血(以下简称“辫血”)复查的必要性^[2],也有的指出部分辫血复查结果偏低^[3-5]。但对于辫血在不同检测项目或试剂的具体偏差尚未明确,特别是弱阳性辫血样本复查的漏检率鲜有报道。在新规程执行二遍酶联免疫吸附法(enzymelinked immunosorbent aasay, ELISA)检测改为一遍ELISA检测前,有必要对血液样本与试剂的检测效果重新进行分析,以评价辫血在检测中的可靠性。笔者回顾性分析血液检测结果,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2014年7月1日~2018年11月30日ELISA初筛反应性的无偿献血者血液样本。试管样本采用乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝无分离胶真空采血管,辫血是剪取血袋辫子的血浆(含有血液保养液Ⅲ,主要抗凝剂是枸橼酸钠)。

1.2 试剂与仪器 ELISA试剂盒及主要仪器:HBsAg诊断试剂盒(珠海丽珠和北京万泰)、抗-HCV诊断试剂盒(珠海丽珠和北京万泰)、HIV Ag/Ab诊断试剂盒(珠海丽珠、北京万泰和厦门新创)以及梅毒抗体诊断试剂盒(珠海丽珠、北京万泰和厦门新创),全自动加样仪(Tecan公司, Freedom evo),全自动酶免分析系统(Siemens公司, BEP Ⅲ),酶标仪(Tecan公司, Sunrise);一次性使用滤除白细胞血袋(费森尤斯卡比医疗用品有限公司)。所用试剂均在有效期内使用,仪器都经过校准并在正常状态下使用,血液检测操作按试剂说明书或血站制定的相关质量体系文件执行。

1.3 方法

1.3.1 血液检测:血液样本进行两遍不同厂家ELISA的HBsAg,抗-HCV, HIV Ag/Ab和抗-TP同步检测,检测结果以“样本吸光度比临界值”(sample optical density to cut off, S/CO)表示, S/CO<0.9判定为无反应性, S/CO≥0.9判为可疑阳性样本,需对相应项目原试管和辫血进行双孔复试,收集复试的S/CO值。以试管复试结果0.9≤S/CO≤2.0定义为弱阳性样本,其对应的辫血在设置灰区时的临界值为0.9, S/CO<0.9判为无反应性, S/CO≥0.9判为有反应性;在不设灰区时的临界值为1.0, S/CO<1.0判为无反应性, S/CO≥1.0判为有反应性。

1.3.2 分组及数据处理:以不同项目的试剂分组:A, B分别代表HBsAg的丽珠和万泰试剂, C, D分别代表抗-HCV的丽珠和万泰试剂, E, F, G分别代表HIV Ag/Ab的丽珠、万泰和新创试剂, H, I, J分别代表抗-TP的丽珠、万泰和新创试剂;复试结果的差异计算:差值=“试管S/CO值”-“辫血S/CO值”;辫血的相对漏检率(%)=辫血复试检测值小于临界值的样本数/总样本数×100%。

1.4 统计学分析 采用SPSS19.0软件进行分析。非正态分布数据采用中位数(P25, P75)表示, S/CO值偏差分析采用配对Wilcoxon秩和检验, 组间率的比较采用 χ^2 检验, P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 辫血与试管的检测值偏差分布情况 见表1。各组的差值经正态性检验均为非正态分布, 集中程度用中位数表示, 误差线以四分位数表示, 作散点图见图1, 除抗-HCV的D组辫血S/CO值大于试管结果(P<0.05)外, 其它9组辫血结果均小于试管结果(P<0.05)。

表1

辫血与试管在不同组间的S/CO值结果比较

项 目	试剂组别	n	M(P25, P75)	Z值	P值	S/CO值大小关系
HBsAg	A	1 031	0.165(0.000, 0.854)	11.799	0.000	辫血<试管
	B	1 896	0.000(-0.057, 0.914)	10.831	0.000	辫血<试管
抗 HCV	C	375	0.018(-0.204, 0.456)	2.976	0.003	辫血<试管
	D	138	-0.144(-2.648, 0.000)	4.806	0.000	辫血>试管
HIV Ag/Ab	E	142	0.000(0.000, 0.480)	2.215	0.027	辫血<试管
	F	228	0.260(0.000, 0.988)	8.581	0.000	辫血<试管
	G	150	0.000(0.000, 0.585)	4.062	0.000	辫血<试管
抗-TP	H	686	0.090(-0.220, 0.525)	5.077	0.000	辫血<试管
	I	828	0.388(0.000, 1.318)	13.332	0.000	辫血<试管
	J	267	0.514(0.047, 1.240)	10.573	0.000	辫血<试管

注:M为试管与辫血S/CO值之差的中位数。

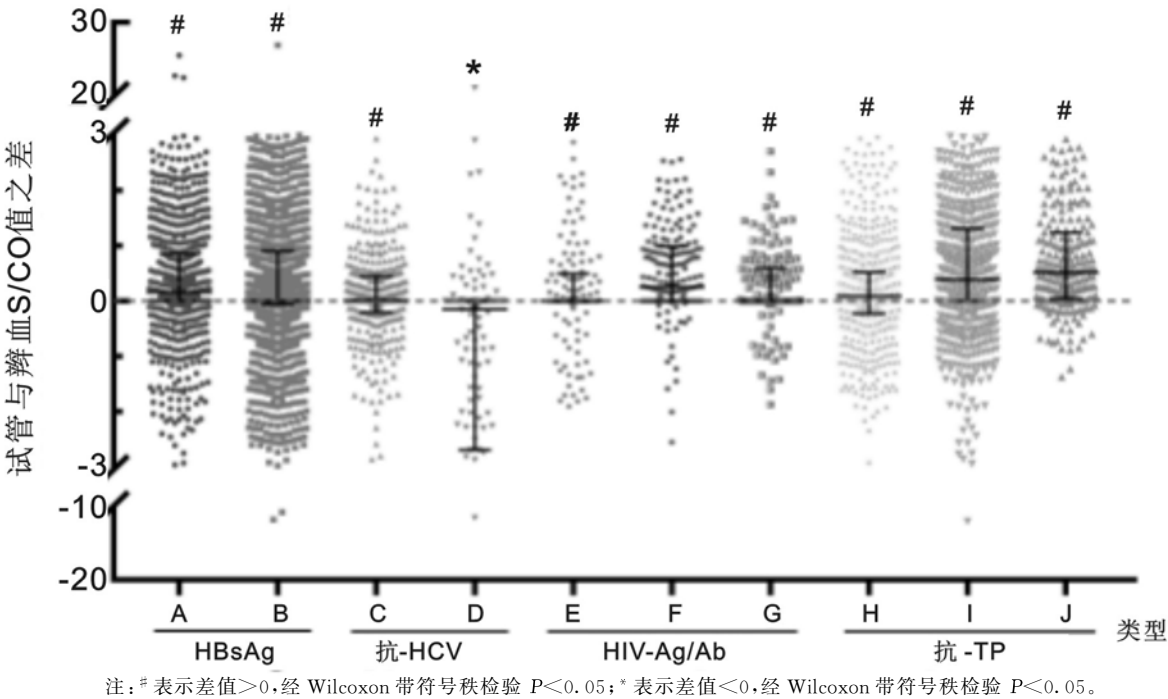


图1 试管与辨血在不同检测项目 S/CO 差值的散点图

2.2 弱阳性辨血样本的检测情况 见表2。辨血复试值偏低,最大的是F组0.651(0.206,0.886),最小的是D组0.016(-0.168,0.232)。各组设置灰区前、后,辨血的漏检率除了J组差异有统计学意义外($P<0.05$),其他9组试剂虽在数量上有所下降,但差异均无统计学意义;设置灰区后,实际的漏检率最大的是F组为60.67%,最小的是E组7.41%。

表2 弱阳性辨血样本的检测值偏差和设置灰区前、后的漏检情况									
项目	组别	n	M	灰区范围	M与灰区比较	设置灰区后漏检数(%)	设置灰区前漏检数(%)	χ^2	P值
HBsAg	A	159	0.205	0.100	>灰区	50(31.45)	65(40.88)	3.065	0.080
	B	160	0.433	0.100	>灰区	75(46.88)	81(50.63)	0.450	0.502
抗-HCV	C	36	0.274	0.100	>灰区	12(33.33)	14(38.89)	0.000	1.000
	D	16	0.016	0.100	>灰区	4(25.00)	4(25.00)	0.000	1.000
HIV Ag/Ab	E	27	0.195	0.100	>灰区	2(7.41)	2(7.41)	0.000	1.000
	F	89	0.651	0.100	>灰区	54(60.67)	56(62.92)	0.095	0.758
	G	42	0.453	0.100	>灰区	19(45.24)	25(59.52)	1.718	0.190
抗-TP	H	205	0.120	0.100	>灰区	24(11.71)	29(14.15)	0.542	0.462
	I	208	0.328	0.100	>灰区	72(34.62)	80(38.46)	0.663	0.415
	J	89	0.257	0.100	>灰区	30(33.71)	43(48.31)	3.925	0.048

注:M为试管与辨血 S/CO 值之差的中位数。

3 讨论 血站实验室处于某种需要,对初次反应性献血者复试的实际操作可能不同。“双孔复试”的做法可能衍生出三种模式,即对试管血双孔复检、对血袋辨血进行双孔复检以及试管血和辨血同时复检^[6]。本站采用上述第三种,同一献血者来源的2份样本的试验过程均保持一致性,即在同1操作者、试剂和仪器检测,排除了检测中的差异因素,为比较和量化辨血与试管的差异提供必要基础。从总体的检测结果分析,分析各组的辨血与试管的S/CO值之差,其分布并非正态性分布,说明样本

的成分存在差异,同时也反映样本中所含标志物的浓度不同,在同一种试剂的信号值也存在差异。研究发现,只有抗-HCV万泰组辨血的S/CO值是大于试管的($P<0.05$),其他9组均为辨血低于试管($P<0.05$)。原因可能与不同检测项目试剂的实验原理、试剂原材料及各原料成分配置比例不同有关。抗-HCV万泰试剂采用双抗原夹心法,同时使用生物素-亲和素,其信号放大作用较强,试管终止后颜色太浓稳定性反而差,或者可能与样本的抗凝剂干扰有关^[6]。对于辨血检测值偏低的现象,是否

导致血液检测的漏检,这是实验室关心的重点。

由于实验误差的存在,标志物浓度在临界值附近的样本的漏检几率较大。因此选取试管复试值在 $0.9 \leq S/CO \leq 2.0$ 的弱阳性样本为研究对象,而强阳性样本,即使辨血信号值低于试管,但仍能被检出,符合预期反应性的结论,故无漏检影响。通过分析发现,弱阳性辨血样本的检测值差异程度越大,如表2的F组,其差值的中位数达到0.651(0.206, 0.886),远大于表1的总体差值0.260(0.000, 0.988)。即使是差值 <0 的D组,差值也由总体的一0.144变为0.016。而本实验室设置的灰区范围仅为0.10,说明用弱阳性辨血样本进行复试,有可能导致更高几率的漏检,因此评估灰区设置与漏检率的关系尤为重要。

通过对弱阳性辨血的漏检率分析,结果显示各组的漏检率7.41%~60.67%,与文献报道的26.27%(31/118)^[3]和14.9%(39/262)^[7]不同。其中HBsAg项目A组和B组的漏检率分别是31.45%和46.88%,与王新梅^[8]报道的HBsAg新创试剂漏检率46.15%接近,但低于其科华试剂漏检率67.50%。这可能与所用试剂的检测性能不同有关。在灰区设置前、后辨血的漏检率比较发现,只有抗-TP的J组漏检率差异有统计学意义($P < 0.05$),其他9组在设置灰区前后的漏检率无差异($P > 0.05$)(表2),说明现用灰区设置范围对辨血信号值低,起不到拦截作用,或者说弱阳性辨血不适用于复试。

造成辨血结果偏低的主要原因是样本被血液保养液稀释。以本站为例,辨血并非最初采血结束时的血液状态,而是经过去白细胞过滤后与保养液充分混匀的血液。如400 ml血袋中有保养液56 ml,按血细胞比容的正常值(男性:0.4~0.5,女性:0.35~0.45)估算,血浆约200~260 ml,除去细胞等有形成分,血浆被稀释到原来的78.13%~82.28%,潜在的标志物浓度理论上平均降低了20%。由于ELISA受试剂本身性能、样本内源性或外源性干扰物质、抗凝剂等影响^[6,9-10],稀释后的血浆检测值与稀释倍数并非线性关系^[11-12],实际检测值可能更低于理论值。个别血站出于质量管理方面的需要,仍然采用辨血复试,目的是为了防止采血部门在留取样本时“张冠李戴”^[6]以及验证二遍ELISA检测结果不符等。这种“弥补式”的管理方式与实验室追求检测结果准确性的质量方针不符,应从差错的源头加大过程管理,强化特定环节的质量控制。本研究不足之处是对灰区设置和漏检率的估算是基于日常检测数据,弱阳性样本未得到确证,仅以潜在感染性标本对待。因此,若血站

实验室执行“原血样不符合要求,再从血袋导管重新取样”^[1]的操作,须根据实际情况评估辨血的可靠性。

综上,辨血的复试结果普遍低于试管,用于血液检测可能存在漏检风险。在新的血液检测形势下,血站实验室可根据实际情况适当调整血液复试流程或灰区设置,联合更高灵敏度和特异性的核酸检测试剂,提高血液安全性。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 血站技术操作规程(2019版)[B/OL]. [2019-4-28][2019-05-08]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7658/201905/bdd4f4ccd15c4201bfb6d9e7492d7fab.shtml>. National Health Commission of the People's Republic of China. Blood station technical operation procedures (2019 version) [B/OL]. [2019-4-28][2019-05-08]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7658/201905/bdd4f4ccd15c4201bfb6d9e7492d7fab.shtml>.
- [2] 姚勇,袁兵. 建立试管标本与血辨标本中阳性平行再检程序的必要性[J]. 中国输血杂志, 2009, 22(12): 1028-1029.
YAO Yong, YUAN Bing. The necessity of establishing a parallel retest procedure for test tube specimens and blood braided stasis specimens[J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2009, 22(12): 1028-1029.
- [3] 金一鸣,俞彦,曹谊,等. 血液筛查中阳性样本与其血辨的符合性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(15): 1907-1908.
JIN Yiming, YU Yan, CAO Yi, et al. Study on the consistency of positive samples and braided blood in blood screening[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2012, 33(15): 1907-1908.
- [4] 刘芳,尹建平,吴玲. ELISA法检测试管标本与血辨标本结果分析[J]. 中国输血杂志, 2010, 23(8): 632-633.
LIU Fang, YIN Jianping, WU Ling. Analysis of results of test tube specimens and blood braided specimens by ELISA[J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2010, 23(8): 632-633.
- [5] 徐倩. ACD血液保养液与肝素抗凝剂对梅毒螺旋体抗体ELISA检测结果的影响[J]. 宁夏医科大学学报, 2016, 38(6): 694-695.
XU Qian. Effect of ACD blood maintenance solution and heparin anticoagulant on ELISA test results of Treponema pallidum antibody[J]. Journal of Ningxia Medical University, 2016, 38(6): 694-695.
- [6] 孙立平. 两种抗凝剂对血液4项指标ELISA检测结果干扰的分析[J]. 中国输血杂志, 2006, 19(4): 290-292.
SUN Liping. Analysis of interference between two

- anticoagulants on ELISA results of four blood indicators[J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2006, 19(4): 290-292.
- [7] 张霞,周宝琴,张志杰.初次反应性血液标本应用血癖及原试管标本做双孔复检结果分析[J].中国乡村医药,2016,23(10):76-77.
ZHANG Xia, ZHOU Baoqin, ZHANG Zhijie. Analysis of the results of two-hole retests of blood braided samples and original test samples in primary reactive blood samples[J]. Chinese Journal of Rural Medicine and Pharmacy, 2016, 23(10): 76-77.
- [8] 王新梅.乙肝表面抗原初复检阳性标本再检情况分析[J].国际检验医学杂志,2012,33(3):366-367.
WANG Xinmei. Analysis of positive sample re-detection for initial tests and retests for hepatitis B surface antigen[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2012, 33(3): 366-367.
- [9] 陈善华,朱丽莉,李浩,等.ELISA方法检测HBsAg设置灰区的必要性探讨[J].中国输血杂志,2013,26(10):1013-1014.
CHEN Shanhua, ZHU Lili, LI Hao, et al. Discussion on the necessity of gray area for HBsAg by ELISA[J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2013, 26(10): 1013-1014.
- [10] 王利杰,许东亚.电化学发光法和酶联免疫法检测低水平HBsAg[J].中国输血杂志,2011,24(9):767-768.
WANG Lijie, XU Dongya. Detection of low level HBsAg by electrochemiluminescence immunoassay and enzymelinked immunosorbent assay[J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2011, 24(9): 767-768.
- [11] 耿聪,李寅,王艳梅,等.HIV抗体ELISA检测室内质控品的制备及应用[J].中国国境卫生检疫杂志,2018,41(4):241-243.
GENG Cong, LI Yan, WANG Yanmei, et al. Development and application of internal quality control substance for HIV antibody ELISA detection[J]. Chinese Frontier Health and Quarantine, 2018, 41(4): 241-243.
- [12] 黎艳华,郭如华,温丽玲,等.CPD血液保养液对抗HIV ELISA实验结果的影响[J].实用医学杂志,2008,24(19):3415-3416.
LI Yanhua, GUO Ruhua, WEN Lilin, et al. Effect of CPD blood maintenance solution on anti-HIV ELISA results[J]. The Journal of Practical Medicine, 2008, 24(19): 3415-3416.

收稿日期:2019-06-04

修回日期:2019-07-01

(上接 118 页)

- PANG Yao, ZHU Zijiang, YUAN Jibao, et al. Coagulation function test in esophageal carcinoma and its clinical significance[J]. Chinese Journal of Clinical Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2016, 23(6): 542-545.
- [11] 叶昱坪,王艳.乳腺癌患者血栓弹力图与常规凝血试验相关性分析[J].中国输血杂志,2017,30(4):368-371.
YE Yuping, WANG Yan. Analysis of correlation between TEG and conventional coagulation methods in patients with breast cancer[J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2017, 30(4): 368-371.
- [12] PEKELHARING J, FURCK A, BANYA W, et al. Comparison between thromboelastography and conventional coagulation tests after cardiopulmonary bypass surgery in the paediatric intensive care unit[J]. International Journal of Laboratory Hematology, 2014, 36(4): 465-471.
- [13] YOON J U, CHEON J H, CHOI Y J, et al. The correlation between conventional coagulation tests and thromboelastography in each phase of liver transplantation[J]. Clinical Transplantation, 2019, 33(3): e13478.
- [14] HOFFMAN M, MONROE D M. A cell-based model of hemostasis[J]. Thrombosis and Haemostasis, 2001, 85(6): 958-965.
- [15] POMMERENING M J, GOODMAN M D, FARLEY D L, et al. Early diagnosis of clinically significant hyperfibrinolysis using thromboelastography velocity curves[J]. Journal of the American College of Surgeons, 2014, 219(6): 1157-1166.
- [16] MACAFEE B, CAMPBELL J P, ASHPOLE K, et al. Reference ranges for thromboelastography (TEG®) and traditional coagulation tests in term parturients undergoing caesarean section under spinal anaesthesia[J]. Anaesthesia, 2012, 67(7): 741-747.

收稿日期:2019-06-25

修回日期:2019-07-06

更正:本刊2019年第34卷第4期88页倒数第6行24.0%,36.05%,28.8%,25.7%更正为20.9%,31.7%,25.0%,22.3%。

2019年第34卷第3期86页余莉等作者的文稿单位由广州医学院附属广东省妇女儿童医院更正为广东省妇幼保健院(Guangdong maternal and child health care hospital)。