

• 短篇论著 •

第三代和第四代丙型肝炎病毒抗体 ELISA 检测试剂 在血站血液检测中的应用分析^{*}

袁 婷¹, 张 利^{1△}, 彭 涛¹, 杨俊龙¹, 林 琴², 叶森林³, 周 霞⁴

(1. 西部战区总医院输血科, 四川成都 610083; 2. 四川省遂宁市中心血站, 四川遂宁 629000;

3. 四川省眉山市中心血站, 四川眉山 620010; 4. 成都医学院医学检验系, 四川成都 610083)

摘 要:目的 通过分析两个国内厂家的第三代和第四代丙型肝炎病毒抗体(抗-HCV)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂检测献血者抗-HCV 结果的差异,为血站血液检验工作选择抗-HCV ELISA 试剂提供参考依据。方法 回顾性分析使用厂家 1 第三代和厂家 2 第四代抗-HCV ELISA 试剂检测某血站的 37 826 例无偿献血者血液标本抗-HCV 结果。对 37 826 例标本中 ELISA 阳性的 137 例标本,使用厂家 1 第四代和厂家 2 第三代 ELISA 试剂检测抗-HCV,并采用聚合酶链反应(PCR)法定性检测 HCV-RNA,分别比较两个厂家第三代和第四代抗-HCV ELISA 试剂的灵敏度和假阳性率。结果 37 826 例献血者抗-HCV 检测结果:厂家 1 第三代试剂阳性率为 0.32%,厂家 2 第四代试剂阳性率为 0.16%,二者比较差异有统计学意义($P < 0.05$);厂家 1 第三代试剂单阳性率为 0.21%,厂家 2 第四代试剂单阳性率为 0.04%,二者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。厂家 1 第三代试剂灵敏度为 86.54%,厂家 1 第四代试剂灵敏度为 98.08%,二者比较差异有统计学意义($P < 0.05$);厂家 1 第三代试剂假阳性率为 90.59%,厂家 1 第四代试剂假阳性率为 5.88%,二者比较差异有统计学意义($P < 0.05$);厂家 2 第三代试剂灵敏度为 92.31%,厂家 2 第四代试剂灵敏度为 98.08%,二者比较差异无统计学意义($P > 0.05$);厂家 2 第三代试剂假阳性率为 35.29%,厂家 2 第四代试剂假阳性率为 9.41%,二者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 两个厂家的第四代抗-HCV ELISA 试剂均较其第三代试剂有更高的灵敏度和更低的假阳性率;在先血清学再核酸的检测策略下,使用第四代抗-HCV ELISA 检测试剂,既能保障血液安全,减少不必要的血液浪费,也能有效降低血清学阳性标本污染核酸实验室的风险。

关键词:丙型肝炎病毒抗体; 酶联免疫吸附试验; 献血; 血液检测

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.14.025

中图法分类号:R446.6

文章编号:1673-4130(2020)14-1759-04

文献标识码:B

世界卫生组织统计,全球丙型肝炎病毒(HCV)的感染率约为 3%,感染者约有 2 亿人,每年新发丙型肝炎病例约 3.5 万例,其中 50%~80%的感染者无明显症状并可进展为慢性感染,20%的感染者最终可进展为肝硬化甚至肝癌^[1]。我国 1~59 岁人群 HCV 感染率为 0.43%,输血存在较高的感染风险^[2],阻断 HCV 传播对保障血液安全至关重要。目前国内大多采用第三代酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂检测丙型肝炎病毒抗体(抗-HCV),虽然第三代试剂较第四代试剂价格低廉,但可能存在更高的假阳性率^[3]或漏检率。本研究就两个不同厂家各自生产的第三代和第四代抗-HCV ELISA 检测试剂在血站检测的阳性率、单试剂阳性率、灵敏度和假阳性率进行对比,为血站选择适合的抗-HCV ELISA 试剂提供参考,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择某血站 2016 年 3 月至 2019 年 3 月采集的 37 826 例无偿献血者血液标本,将 37 826 例标本中采用厂家 1 第三代和厂家 2 第四代抗-HCV ELISA 试剂检测结果为阳性的 137 例血浆标本于-40℃冻存。

1.2 仪器与试剂 厂家 1 和厂家 2 提供的抗-HCV ELISA 检测试剂(分别为厂家 1 第三代、厂家 1 第四代、厂家 2 第三代、厂家 2 第四代),康彻斯坦标准物质,罗氏乙型肝炎病毒-丙型肝炎病毒-人类免疫缺陷病毒(1+2 型)核酸检测试剂盒(PCR-荧光法, cobas TaqScreen MPX Test, version 2.0)。试剂均通过中国药品生物制品批批检验合格,并在有效期内。第三代抗-HCV ELISA 检测试剂原理为间接 ELISA 法,第四代抗-HCV ELISA 检测试剂原理为双抗原夹心

^{*} 基金项目:四川省重点研发科技计划项目(2019YFS0273)。

[△] 通信作者, E-mail:1062747632@qq.com。

ELISA 法。主要仪器包括艾德康 ELISA1100 全自动酶免系统,罗氏 cobas s201 核酸检测系统,仪器均定期校准合格。

1.3 方法 回顾性分析 37 826 例无偿献血者血样采用厂家 1 第三代和厂家 2 第四代抗-HCV ELISA 试剂筛查抗-HCV 的结果。将冻存的 137 例检测阳性的血浆标本,采用厂家 1 第四代和厂家 2 第三代抗-HCV ELISA 试剂进行检测,并采用聚合酶链反应(PCR)定性检测 HCV-RNA 以进行确证,分别比较两个厂家第三代和第四代试剂的灵敏度和假阳性率。检测步骤均严格按试剂说明书进行。

1.4 结果判定 ELISA:S 代表标本的吸光度(A 值),cut off 值=阴性对照孔平均 A 值+0.12,二者之比即为 S/CO 值,S/CO≥0.5 为阳性,S/CO<0.5 为阴性。双试剂阳性:两种试剂检测结果均为阳性;单试剂阳性:仅其中一种试剂检测结果为阳性,且用该试剂双孔复查结果仍为阳性。

1.5 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计软件进行统计处理和分析。计数资料以例数或率表示,组间结果的比较采用 χ^2 检验。灵敏度=真阳性例数/(真阳性例数+假阴性例数)×100%;假阳性率=假阳性例数/(真阴性例数+假阳性例数)×100%。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 37 826 例献血者抗-HCV 检测结果 厂家 1 第三代和厂家 2 第四代试剂双阳性率为 0.12%(44/37 826);总阳性数 137 例,总阳性率为 0.36%(137/37 826)。其中厂家 1 第三代试剂阳性率为 0.32%(122/37 826),厂家 2 第四代试剂阳性率为 0.16%(59/37 826),二者比较差异有统计学意义($\chi^2=21.981, P<0.05$)。厂家 1 第三代试剂单阳性率为 0.21%(78/37 826),厂家 2 第四代试剂单阳性率为 0.04%(15/37 826),二者比较差异有统计学意义($\chi^2=42.730, P<0.05$)。见表 1。

表 1 37 826 例无偿献血者抗-HCV ELISA 检测结果(n)			
厂家 1 第三代试剂	厂家 2 第四代试剂		合计
	阳性	阴性	
阳性	44	78	122
阴性	15	37 689	37 704
合计	59	37 767	37 826

2.2 137 例冻存标本抗-HCV 检测结果以及灵敏度、假阳性率比较 厂家 1 第三代试剂灵敏度为 86.54%(45/52),厂家 1 第四代试剂灵敏度为 98.08%(51/52),二者比较差异有统计学意义($\chi^2=4.875, P=0.027$)。厂家 1 第三代试剂假阳性率为 90.59%(77/85),厂家 1 第四代试剂假阳性率为 5.88%

(5/85),二者比较差异有统计学意义($\chi^2=122.129, P<0.05$)。厂家 2 第三代试剂灵敏度为 92.31%(48/52),厂家 2 第四代试剂灵敏度为 98.08%(51/52),二者比较差异无统计学意义($\chi^2=1.891, P=0.169$)。厂家 2 第三代试剂假阳性率为 35.29%(30/85),厂家 2 第四代试剂假阳性率为 9.41%(8/85),二者比较差异有统计学意义($\chi^2=16.404, P<0.05$)。见表 2~5。

表 2 厂家 1 第三代试剂检测结果(n)			
厂家 1 第三代试剂	PCR 确证		合计
	阳性	阴性	
阳性	45	77	122
阴性	7	8	15
合计	52	85	137

表 3 厂家 1 第四代试剂检测结果(n)			
厂家 1 第四代试剂	PCR 确证		合计
	阳性	阴性	
阳性	51	5	56
阴性	1	80	81
合计	52	85	137

表 4 厂家 2 第三代试剂检测结果(n)			
厂家 2 第三代试剂	PCR 确证		合计
	阳性	阴性	
阳性	48	30	78
阴性	4	55	59
合计	52	85	137

表 5 厂家 2 第四代试剂检测结果(n)			
厂家 2 第四代试剂	PCR 确证		合计
	阳性	阴性	
阳性	51	8	59
阴性	1	77	78
合计	52	85	137

3 讨 论

从 2.1 结果可以看出:厂家 1 第三代试剂阳性率为 0.32%,厂家 2 第四代试剂阳性率为 0.16%;厂家 1 第三代试剂单阳性率为 0.21%,厂家 2 第四代试剂单阳性率为 0.04%。厂家 1 第三代和厂家 2 第四代试剂的阳性率、试剂单阳性率比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),因此怀疑第三代试剂假阳性率过高。从表 2~5 可以发现,与同一厂家的第三代试剂比较,两个厂家第四代试剂的灵敏度更高、假阳性率更低。137 例 ELISA 试剂检测阳性的献血者标本经 PCR 确

认 52 例 HCV-RNA 阳性, 85 例为阴性。厂家 1 第三代试剂阳性 122 例, 经过 PCR 确认 45 例 HCV-RNA 阳性, 灵敏度为 86.54%, 假阳性率为 90.59%。厂家 1 第四代试剂阳性 56 例, 经过 PCR 确认 51 例 HCV-RNA 阳性, 灵敏度为 98.08%, 假阳性率为 5.88%。厂家 1 第三、四代试剂的灵敏度和假阳性率比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。厂家 2 第三代试剂阳性 78 例, 经过 PCR 确认, 48 例 HCV-RNA 阳性, 灵敏度为 92.31%, 假阳性率为 35.29%。厂家 2 第四代试剂阳性 59 例, 经过 PCR 确认, 51 例 HCV-RNA 阳性, 灵敏度为 98.08%, 假阳性率为 9.41%。厂家 2 第三、四代试剂灵敏度比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 二者假阳性率差异有统计学意义($P < 0.05$)。137 例标本经 HCV-RNA 确认, 两个厂家第三、四代试剂均存在漏检情况: 厂家 1 第三代试剂漏检 7 例, 厂家 2 第三代试剂漏检 4 例, 厂家 1 和厂家 2 第四代试剂均漏检 1 例。

血液为珍稀资源, 抗-HCV 阳性是成品血报废的主要原因之一^[4], 相关标准要求献血者血液检验既要有一定的灵敏度保证血液安全, 又要有一定的假阳性率以减少不必要的血液浪费。《血站操作技术规范》(2019 版)规定: 无偿献血者血液抗-HCV 血清学检测方法包括 ELISA 法、化学发光免疫分析试验(CLIA)^[5]。ELISA 法是目前抗-HCV 检测的主要方法, 具有灵敏度高、特异性强、自动化程度高、可定量和半定量测定、检测成本低等优点^[6], 缺点是容易产生假阳性结果, 可能与下列因素有关: 标本溶血、被细菌污染、贮存时间过长和标本凝固不全等标本处理问题; 试剂盒的抗原不纯、采用多克隆抗体和酶结合物纯度低等试剂盒方面的问题; 加样时间过长造成加样后放恒温箱前等待时间过长, 加样后孔壁上贴有微小血块等问题; 洗板针堵塞, 抽吸不完全, 洗液量不足, 洗板次数少等问题^[6-7]。

本研究中选用的两个厂家第三代抗-HCV ELISA 检测试剂应用间接 ELISA 法检测免疫球蛋白 G(IgG)类抗-HCV, 第四代试剂应用双抗原夹心 ELISA 法检测 IgG 类和免疫球蛋白 M(IgM)类 HCV 总抗体。两个厂家第四代试剂较其第三代试剂有更高的灵敏度和更低的假阳性率的原因: (1)间接 ELISA 法虽是临床应用率较高的一种血清学抗-HCV 检测方法, 但第三代试剂只能检测血清中的 IgG 类抗体, 对早期 HCV 感染存在一定漏检^[8], 第四代试剂因其在第三代试剂检测 IgG 类抗体基础上增加了 IgM 类抗体的检测, 能提高处于感染早期标本的检出率, 缩短病毒感染检出的“窗口期”^[9-10]; (2)间接法以酶标记的抗人 IgG 为二抗, 血清中含量较高的 IgG 及类风湿因子等非特异性吸附易引起假阳性反

应^[8]; (3)双抗原夹心 ELISA 法用酶标记抗原, 形成包被抗原-检测抗体-生物素抗原结构, 对被检抗-HCV 给予二次特异性反应, 可有效避免间接法导致的假阳性现象^[10]; (4)双抗原夹心 ELISA 法在试验的第一步加入生物素化的 HCV 抗原, 对 ELISA 反应结果有放大效果, 有利于提高试剂的最低检出限^[9]; (5)加样的精确性直接影响后续的试验结果, 从第三代试剂的加样量 10 μL 变为第四代试剂的 50 μL , 在相同的加样精密度条件下, 10 μL 的加样误差相比 50 μL 的加样误差更大^[11-13]。

本研究显示, 所使用的两个不同厂家第三代检测试剂灵敏度均低于第四代试剂, 第三代试剂漏检风险更高, 假阳性率也更高。血站采用两个不同厂家的抗-HCV ELISA 试剂检测献血者抗-HCV, 任意一种试剂呈阳性, 血液便不能用于临床, 导致血液报废, 献血者也因此被列入献血黑名单, 不能再次参与献血, 这种策略虽有利于确保血液安全, 但势必也会造成血液资源的浪费^[14]和献血者流失^[15]。《血站技术操作规程》(2019 版)提出开展核酸检测同时只要求进行 1 次血清学检测, 采用先血清学检测再对阴性标本进行核酸检测的检测策略。在该检测策略下, 选择第四代抗-HCV ELISA 试剂相较于第三代试剂, 不仅灵敏度高, 能更好地保障血液安全, 而且假阳性少, 可在一定程度上提高检出率, 同时减少不必要的血液浪费, 避免对献血者造成不必要的心理负担, 减少献血者流失^[15]。该检测策略亦能有效降低血清学阳性标本污染核酸实验室的风险, 更好地促进血站血液检验及无偿献血工作的开展。

参考文献

- [1] 葛藤, 李云峰, 马旭. miRNA 在丙型肝炎病毒感染中的机制研究进展[J]. 口岸卫生控制, 2019, 24(3): 38-44.
- [2] 李新芳, 张晓飞, 陈燕明, 等. 从我国 HCV 感染暴发事件探讨 HCV 经血传播感染的风险[J]. 中国感染控制杂志, 2017, 16(10): 969-970.
- [3] 张秀慧, 钟政荣, 余加宏. 献血者抗-HCV 检测及确认结果研究进展[J]. 安徽医学, 2015, 36(1): 122-126.
- [4] 蔡晶波. 输血科成品血报废原因的剖析及对策[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(79): 155-156.
- [5] 刘学文. 丙肝抗体假阳性检测中 ELISA 法应用[J]. 中国药物经济学, 2012, 7(4): 191-192.
- [6] 杨志栋, 和殿峰. ELISA 法测丙肝抗体假阳性分析[J]. 中国中医药现代远程教育, 2010, 8(17): 269.
- [7] 陈冬. 丙肝患者血清抗-HCV 和 HCV RNA 检测效果分析[J]. 临床输血与检验, 2016, 18(4): 374-375.
- [8] 韩振格, 孟继鸿, 周镇先. 双抗原夹心 ELISA 检测抗 HCV 总抗体[J]. 临床检验杂志, 2008, 26(4): 246-248.
- [9] 周齐洋, 张娜娜. 丙型肝炎病毒抗体双抗原夹心法化学发光检测的应用[J]. 标记免疫分析与临床, 2016, 23(3):

324-326.

[10] 张艳梅, 孟毓, 姜燕娟, 等. 抗-HCV ELISA 间接法与双抗原夹心法试剂的应用对比评价[J]. 临床血液学杂志(输血与检验), 2016, 29(4): 628-630.

[11] 刘保林, 林海玉, 黄国永, 等. 双抗原夹心 ELISA 法检测 HCV 抗体在无偿献血中的应用讨论[J]. 北京医学, 2013, 35(11): 968-971.

[12] 朱阳泉, 徐长根, 戴瑞娣, 等. 影响 FAME 全自动酶免分析系统检测因素探讨[J]. 临床输血与检验, 2004, 6(4): 254-256.

[13] 张军, 刘玉强. STAR 超细加样尖在抗-HCV ELISA 检测中的应用[J]. 临床输血与检验, 2013, 15(1): 56-57.

[14] 周学勇, 程卫芳, 张浩, 等. 不同试剂对献血者 HCV 感染性标志物的检测情况比较[J]. 临床输血与检验, 2015, 17(4): 317-319.

[15] 郭燕, 叶世辉, 蔡斌, 等. 无偿献血者 HCV RNA 与抗-HCV 及 ALT 检测结果的相关性[J]. 临床输血与检验, 2016, 18(5): 461-464.

(收稿日期: 2019-08-18 修回日期: 2020-02-25)

• 短篇论著 •

深圳地区血红蛋白 E 的血液学特征调查^{*}

阚丽娟, 蔡钦泉, 覃俊龙, 陈亚琼, 张丽军, 莫云均, 李悦, 张秀明, 李育敏[△]
(广东省深圳市罗湖区人民医院医学检验科, 广东深圳 518001)

摘要:目的 研究血红蛋白 E(HbE)的血液学表型与基因型的关系。方法 收集该院 2016 年 6 月至 2019 年 5 月的 72 397 例毛细血管电泳筛查样本, 对筛查出 HbE 的样本采用跨越断裂点聚合酶链反应(Gap-PCR)法及 PCR 结合反向点杂交(PCR-RDB)法进行珠蛋白生成障碍性贫血(以下简称地贫)基因分型鉴定, 并分析其红细胞参数。结果 检出 HbE 共 76 例, 发生率为 0.105%。成年男性单纯 HbE 杂合子的血红蛋白含量(Hb)、平均红细胞体积(MCV)、平均红细胞血红蛋白含量(MCH)、HbE 和血红蛋白 A₂(HbA₂)分别为(148.0±10.0)g/L、(76.3±3.6)fL、(25.5±1.2)pg、(24.7±0.9)%和(3.5±0.3)%, 成年女性分别为(118.0±10.0)g/L、(76.3±4.3)fL、(25.4±1.7)pg、(24.8±1.4)%和(3.5±0.3)%, 儿童分别为(117.0±5.8)g/L、(69.3±2.3)fL、(23.0±0.6)pg、(23.4±0.8)%和(3.7±0.2)%。有 2 例 HbE 复合 α 地贫, 其中 HbE 复合 α^{ws} 杂合子 1 例(上述血液学参数分别为 152 g/L、74.9 fL、23.7 pg、23.1%和 3.6%), HbE 复合-α^{3.7} 纯合子 1 例(上述血液学参数分别为 111 g/L、66.5 fL、21.4 pg、15.8%和 4.1%)。检出 HbE 复合 G^γγ⁺(A^γδβ)⁰ 1 例(上述血液学参数分别为 120 g/L、57.0 fL、19.4 pg、43.4%、2.5%), 其血红蛋白 F(HbF)为 54.1%。新生儿 HbE 杂合子毛细血管电泳分析表现为血红蛋白 A(HbA)(7.5±1.5)%、HbF(90.2±2.0)%和 HbE(2.6±0.7)%。结论 深圳地区 HbE 以杂合子常见, 临床需重视其表型与基因型的规律, 以进行产前筛查和遗传咨询。

关键词: 血红蛋白 E; 珠蛋白生成障碍性贫血; 表型; 基因型
DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.14.026 **中图法分类号:** R556.7
文章编号: 1673-4130(2020)14-1762-03 **文献标识码:** B

血红蛋白疾病分为异常血红蛋白病和珠蛋白生成障碍性贫血(以下简称地贫)两大类, 前者是由于珠蛋白基因缺陷导致血红蛋白结构改变所致, 后者则是由血红蛋白含量(Hb)改变引起^[1]。血红蛋白 E(HbE)是我国南方地区最常见的异常血红蛋白之一^[2-4], 其分子基础为 β 珠蛋白基因第 26 位密码子发生点突变(GAG→AAG), 导致 β 珠蛋白链该位点赖氨酸取代谷氨酸, 从而产生结构变异的 HbE。由于该密码子靠近外显子与内含子的拼接部位, 发生碱基替换后激活了邻近的隐蔽切接点, 造成 mRNA 前体加工障碍, 导致 β 珠蛋白基因表达减少, 因此在功能上属于 β⁺ 地贫。不同性别及年龄段血液学指标参数存

在差异, 本研究按年龄段分别分析成人、儿童及新生儿 HbE 的血液学特征, 并按性别分类统计成人 HbE 的血液学参数, 为 HbE 病和 β 地贫的筛查提供系统、详细的临床血液学表型参考资料。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2016 年 6 月至 2019 年 5 月本院门诊和住院进行血红蛋白检测的受试者为调查对象。本研究受试者共 72 397 例。采集 EDTA-K₂ 抗凝外周静脉全血 2 mL, 2~8℃ 保存, 用于红细胞参数和血红蛋白电泳分析, 以及地贫基因检测。

1.2 仪器与试剂 红细胞参数分析采用 XN-1000 血细胞分析仪(日本 Sysmex 公司), 血红蛋白分析采用

^{*} 基金项目: 广东省深圳市医疗卫生三名工程(SZSM201601062)。
[△] 通信作者, E-mail: eliyumin@126.com。
本文引用格式: 阚丽娟, 蔡钦泉, 覃俊龙, 等. 深圳地区血红蛋白 E 的血液学特征调查[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(14): 1762-1764.