

• 论 著 •

酶联免疫四项检测结果灰区与窗口期感染的关系

陈 静,李帮芬,先 秀,欧燕萍
(四川省泸州市中心血站检验科 646000)

摘 要:目的 探讨酶联免疫吸附试验检测志愿无偿献血标本酶联免疫(简称酶免)四项(乙型肝炎表面抗原、丙型肝炎病毒抗体、人类免疫缺陷病毒抗体及梅毒螺旋体抗体)检测结果灰区与窗口期感染的相关性。方法 收集 2012 年 1 月至 2013 年 9 月泸州地区志愿无偿献血者的献血标本 58 152 例,以灰区范围检测值/临界值(S/CO)在 0.6~1.0 的献血者为研究对象,该人群进一步献血的检验结果为确证试验结果。结果 2 342 例灰区研究对象半年后在血液检测管理系统中查询,有再献血记录的 597 例,其中合格 331 例,占 55.44%,不合格 266 例,占 44.56%。以合格的 331 例为对照组,不合格的 266 例为观察组,2016 年 12 月 31 日查询,对照组酶免四项检测结果 2 例阳性,观察组 9 例阳性,差异有统计学意义($\chi^2=8.83, P<0.05$)。结论 酶免四项检测结果灰区范围的血液存在窗口期感染的风险,实验室设置合适的灰区范围是保证安全输血的重要措施,也是防止发生窗口期感染的重要手段之一。

关键词:灰区; 酶免四项; 窗口期; 确证试验

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.17.022 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2017)17-2554-03

Relationship between grey area of 4-index detection results by ELISA and window period infection

CHEN Jing, LI Bangfen, XIAN Xiu, OU Yanping

(Department of Clinical Laboratory, Luzhou Municipal Central Blood Station, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To investigating the relationship between the gray area of four-index detection results(HBsAg, anti-HCV antibody, anti-HIV antibody and anti-TP antibody) by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) and the window period infection in voluntary blood donors. **Methods** A total of 58 152 blood samples from voluntary blood donors in Luzhou area from January 2012 to September 2013 were collected. The donors with the grey area of S/CO 0.6—1.0 served as the research subjects. The further donation detection results were the confirmatory test. **Results** A total of 2 342 grey area research subjects were inquired in the blood detection and management system after half a year. Among 597 cases of again blood donation, 331 cases were qualified, accounting for 55.44%, unqualified blood was in 266 cases, accounting for 44.56%; with 331 qualified cases as the control group and 266 unqualified cases as the observation group, the inquiring on December 31, 2016 showed that in ELISA 4-item detection, 2 cases in the control group were positive and 9 cases in the observation group were positive, the difference was statistically significant($\chi^2=8.83, P<0.05$). **Conclusion** The blood in the grey area of the 4-index detection results by ELISA has a risk of window period infection, and setting a appropriate gray area range in laboratory is an important measure to ensure the safety of blood transfusion, and also one of the most significant means to prevent window period infection.

Key words: gray area; ELISA 4-index; window period; confirmatory test

临床输血的重要任务是保证血液输注的安全性。近年来有诸多关于输血传染病的报道,对我国临床输血工作提出了很大的挑战。防止输血相关传染病的发生,为临床患者提供高品质的血液,是相关从业人员必须重视的关键问题^[1-2]。本站在 2016 年 3 月 31 日前,按国家标准用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测献血者标本的酶联免疫(简称酶免)四项指标,包括乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、丙型肝炎病毒抗体(抗-HCV)、人类免疫缺陷病毒抗体(抗-HIV)及梅毒螺旋体抗体(抗-TP),以淘汰采集的不合格血液。ELISA 作为一种免疫技术,由于生物学标本中存在各种干扰实验和影响结果的因素,给其应用带来了一定的局限性。有部分血液标本测定的吸光度值,达不到试剂盒规定判断阳性的临界值(CO 值)水平,特别是接近 CO 值的结果很难判断其是否携带某些病原体的抗原或抗体^[3],研究者将其定义为灰区。灰区是指在阳性判断值周围一定范围内的测定结果^[4]。处于灰区结果的血液有发生输血传染病窗口期感染的风险。当人体感染某种病原体到能检测到阳性传染性指标的这一期间定义为窗口期。因此,为了降低窗口期感染的概率,科学、合理地设置合适的血液淘汰灰区范围,是保证血液检测安全的国家战略。本文就本站近几年

志愿无偿献血者血液标本的酶免四项检测结果进行分析,探讨灰区与窗口期感染的关系,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 来自本站 2012 年 1 月 9 日至 2013 年 9 月 30 日志愿无偿献血者标本 58 152 例,献血员在献血前要进行 HBsAg 金标初筛,合格后采集血液标本^[5]。酶免四项指标均采用 ELISA 进行检测。

1.2 仪器与试剂 仪器包括 Star 全自动加样仪、Fame24/20 或 Fame24/30 全自动酶免分析处理系统、血液检测管理系统、TECAN Sunrise 酶标仪、汇松洗板机(PW-960)、恒温水浴箱(600-B)、生物安全柜(BSC-1500 II B2-X)、长沙鑫奥离心机(5K-D 或 5K)、江苏新康微量振荡器(XK96-3 型)。初检包括 HBsAg(上海科华)、抗-HCV(上海科华)、抗-HIV(上海科华)、抗-TP(北京万泰)试剂,均在有效期内使用;复检包括 HBsAg(法国伯乐)、抗-HCV(Rthro)、抗-HIV(法国伯乐)、抗-TP(上海科华)试剂,均在有效期内使用^[6]。

1.3 方法

1.3.1 初检与复检 酶免四项指标检测均采用 ELISA。初、复检试剂经中国国家药品生物制品检定所批批检定,均在有效

期内使用。

1.3.2 酶免四项检测结果灰区范围及确证试验 设定检测值/临界值(S/CO)在 0.6~1.0 为本实验室的灰区范围,灰区不计入阳性,但该批次血液为不合格,作报废处理,屏蔽半年后再次献血,进入正常献血检验流程。在血液检测管理系统查询半年后再次或多次献血检测结果作为确证试验结果。

1.3.3 结果判定 所检测标本 S/CO>1.0 判为阳性、S/CO<0.6 判为阴性,S/CO 在 0.6~1.0 判断为灰区结果。同一项目两个厂家试剂检测同一标本,其检测结果均为阳性或其中之一为阳性,判断阳性结果;同理检测结果均为灰区或其中之一为灰区,则判断灰区结果;两个厂家试剂检测结果均为阴性,则判断为阴性结果。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析,计数资料以例数表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 志愿无偿献血者标本检测结果分析 2012 年 1 月 9 日至 2013 年 9 月 30 日,共计检测志愿无偿献血者标本 58 152 例,其中酶免四项检测结果属于灰区的有 2 342 例,占献血人数的 4.03%。2014 年 6 月 30 日,在血液检测管理系统中查询,2 342 例酶免四项检测结果灰区的志愿无偿献血者,半年后进行了第 2 次献血的有 597 例,占研究灰区总人数的 25.49%,其中有 331 例检测结果合格,占 55.44%,有 266 例不合格,占 44.56%。

2.2 两组再次献血酶免四项检测结果 将再次献血确证试验合格的 331 例和不合格的 266 例分为对照组与观察组,把有进一步献血记录的志愿无偿献血者的检测结果进行对比,以观察他们在后续 2 年的时间内,其余条件同等的情况下,两组献血标本检测的不同结果。2016 年 12 月 31 日对两组人群在血液检测管理系统中查询确认试验结果,对照组和观察组分别有 311 例和 196 例有进一步献血结果记录,其中酶免四项检测结果对照组有 2 例阳性(不合格),观察组有 9 例阳性(不合格),差异有统计学意义($\chi^2=8.83, P<0.05$)。见表 1。

表 1 2016 年 12 月 31 日查询两组再次献血酶免四项检测结果(n)

组别	阳性	阴性	合计
对照组	2	309	311
观察组	9	187	196
合计	11	496	507

3 讨 论

3.1 灰区标本血液的处理及献血者的归队管理 为了保障临床用血安全,根据标准规定,ELISA 同一检测项目使用 2 个厂家试剂,由不同的人员进行检测,分别称为初检和复检。通过两种试剂检测互补,进而提高标本阳性检出率,减少漏检的可能。只有初检和复检结果均为阴性的血液,才能发往临床,否则作报废处理,阳性结果则需屏蔽该献血者^[7-8]。血液中重要传染病酶免四项检测指标初检和(或)复检均为阳性,则用原试剂进行双孔复检,仍判读为阳性者,其血液报废,献血者被永久淘汰;初检和(或)复检结果为灰区者,用原试剂进行双孔复检,仍判读为不合格结果,该批次采集血液作报废处理,献血者纳入归队管理范畴,可以再次献血。

3.2 窗口期感染是输血传染病发生的重要因素 长期以来,国内学者把焦点放在了提高试剂检测灵敏度,减少漏检上,检验工作者在临界值基础上另外设置灰区,都是为了防止窗口期感染发生。众所周知,在相同原理和技术水平条件下,试剂的

灵敏度和特异度呈负相关,灵敏度较高的试剂,难以避免假阳性问题^[9],灰区标本的比例也会上升,过高的灵敏度会造成大量的正常血液浪费。因此,每个试剂厂家的灵敏度和特异度,都是依据一定的标准进行合理设置,既要尽可能提高防止窗口期感染的灵敏度,还必须保证一定的特异度,降低过高的血液报废率。检验设置灰区,也是防止窗口期感染措施的必要补充。目前,国家对 ELISA 灰区设置没有明确的规定,但有研究显示,如果基因突变或包被的抗原不合适或互相干扰,影响某些位点的不表达或某种抗原决定簇的暴露,都会影响抗原抗体的结合,造成部分漏检^[10]。

3.3 检测结果处于灰区的血液与发生窗口期感染相关 从表 1 可知,对照组与观察组的酶免四项检测结果显示,观察组 196 例中有 9 例检测结果呈阳性,对照组 331 例中 2 例检测结果呈阳性,差异有统计学意义($P<0.05$)。这与近年研究的,对灰区标本分别用电化学发光定量分析和乙型肝炎病毒核酸检测结果是一致的^[11]。而笔者研究的是志愿无偿献血者在自然条件下数年内,检测结果处于灰区的人员再次献血时,其检测结果的阳转情况,它更客观真实,提示此类献血者的血液明显增加了发生窗口期感染的可能性。

3.4 设置灰区以提高输血安全,减少窗口期感染 本文对所选灰区不合格献血者 2 342 例,6 个月后查询有再次献血检测结果的共 597 例,对这部分群体进行了多次献血结果追踪调查,了解其感染情况,至少 6 个月的等待期足以涵盖血清阳转前的窗口期。窗口期是指人体感染病毒但未发病,处于疾病潜伏期,感染标志物血液检查难以发现或检测结果低于 CO 值,处于灰区范围,这样的血液输给患者可能发生窗口期感染。关于相关病毒窗口期到底有多长的问题,医学界众说纷纭,即使是相关规范和教科书说法也不一致。

本研究结果显示,研究对象酶免四项检测结果灰区比例为 4.03%,有再次献血群体 597 例中仍为灰区的有 266 例,占 44.56%,则灰区占总献血人群 58 152 例的 1.79%。将再次献血群体分成观察组和对照组,2 年后消除自然感染率,观察组有 9 例为阳性,依此推算,2 342 例中,可能有约 28 例的酶免四项检测结果阳性,占灰区人数(2 342 例)的 1.19%,但对总献血人群(58 152 例)来说,则仅为 0.48‰,而且实行灰区血液淘汰制后,这 0.48‰的风险都消除了,从而极大地保证了血液的安全。目前国内对灰区临界值设置并无统一标准,有文献报道设定在 0.9~1.1 倍 CO 值区域,也有学者认为可以设置在 CO 值以下 20% 的范围内。依据 ISO15189 的要求,各实验室应对检测系统的分析性能和(或)诊断性能的重要参数进行验证。CO 值是免疫学感染性标志物定性试验结果的判读标准,以此判断检测标本中是否有感染性标志物的存在。因此,灰区设定标准应有科学依据,并应经过实验室检测系统验证。从 2.1 可知,597 例再次献血检测结果中有 55.44% 为阴性结果。ELISA 由于操作、成本等方面优势,加之灵敏度较高,非常适合于大批量血液标本检测。然而,它也不可避免地存在一定缺陷,包括较易在外部环境的作用下出现假阳性,进而造成检测灰区^[12]。灰区存在的原因常包含人为、环境、标本、试剂等方面因素。若不设置灰区范围,则存在一定风险;若灰区的范围设定较大,则会造成不必要的血液报废;反之,较小的范围设定无法确保血液安全。因此,基于血液安全及合适的报废率,本实验室将 S/CO 在 0.6~1.0 设置为灰区范围^[13-15]。

3.5 采供血检验开展核酸检测(NAT)不能取消 ELISA 灰区的设置 目前采供血机构已经全面开展 NAT,相较于 ELISA,其窗口期更短,降低了血液安全风险,但 NAT 受很多因素影响,对血液标本、检测环境及操作人员技术水平的要求较高,若

检测前无法确保试剂和血液标本的质量,那么 NAT 的效果难以保证,可能出现漏检或假阳性结果^[16]。ELISA 具有技术成熟,操作时间短,操作步骤相对简单,对设备条件要求不高等优点,已广泛应用于血液筛查领域,二者的联合应用,可以提高血液病毒检测准确性。李玉泉^[17]的研究,也支持了这一观点。因此,NAT 与 ELISA 之间各具优势,存在一定互补性,在采供血检验中,不能因为开展了 NAT 而取消 ELISA 灰区设置,从而增大了用血的安全风险。

综上所述,本文通过研究特定人群多次献血结果,发现对照组与观察组在酶免四项检测结果灰区人群中出现阳性的可能性有明显差异,说明了献血者酶免四项检测结果灰区范围血液发生窗口期感染的可能性极大。因此,在采供血酶免四项检测中设置科学合理的灰区范围,可以有效防止窗口期血液用于临床,对预防发生输血传染病及窗口期感染有重要现实意义,是保证临床输血安全的重要措施之一。

参考文献

[1] 陈显,朱绍汶,黄成垠,等. ELISA 法检测抗-HCV 灰区设置探讨[J]. 临床输血与检验,2013,15(3):243-244.
[2] 吴子安,徐宁,邱智詠,等. 乙肝表面抗原 ELISA 试剂盒检测灰区的探讨[J]. 实用医学杂志,2013,29(10):1679-1682.
[3] 毛瑞,李晓娟,贾明华. 西藏自治区血液中心筛查实验室 ELISA 检测方法“灰区范围”的探讨与灰区结果原因的分析[J]. 医学信息,2012,25(12):224-225.
[4] 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.
[5] 刘运保. 1999~2006 年清远市无偿献血者血液传染病标志物感染状况分析[J]. 卫生防疫,2007,2(1):44-45.
[6] 胡婷婷,刘维薇. 医学实验室质量和能力认可准则

(ISO15189:2012) 专用要求概述[J]. 临床检验杂志,2013,31(11):867-871.
[7] Lavanchy D. The global burden of hepatitis C[J]. Liver Int,2009,29(1):74-81.
[8] Ansaldi F,Icardi GI. Simultaneous detection of anti-HCV antibody and HCV core antigen[J]. Methods Mol Biol,2009,510(1):15-23.
[9] CLSI. User protocol for evaluation of qualitative test performance[M]. 2nd ed. Wayne,PA:CLSI,2010:1-3.
[10] 陈瀑. 乙型肝炎病毒表面抗原 ELISA 实验 C50 浓度的确定及意义[J]. 现代检验医学杂志,2013,28(1):106-108.
[11] 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.
[12] 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.
[13] 赵江燕,毛焱,桑叶,等. 两步法及中和试验在 HBsAg 检测中的应用[J]. 临床输血与检验,2004,6(3):199-200.
[14] 张德志. 关于 ELISA 检测影响因素分析[J]. 中外医学研究,2010,8(4):53-54.
[15] 刘宇宇,蔡菊英,刘晓音. 血液筛查 HBsAg、抗-HCV 假阳性献血者归队的调查分析[J]. 中国输血杂志,2012,25(3):260-262.
[16] 周丽君,郭伟鹏,谭湘涛,等. 病毒核酸检测对降低输血传播疾病残余风险的分析研究[J]. 新疆医科大学学报,2014,37(2):214-217.
[17] 李玉泉. 核酸检测与酶联免疫检测血液病毒的比较分析[J]. 中国卫生产业,2016,13(31):45-47.

(收稿日期:2017-04-21 修回日期:2017-05-29)

(上接第 2553 页)
复。目前对治疗前后炎症因子变化的研究也较多,研究的炎症因子略有不同,本研究主要针对 TNF- α 、IgE、PCT 3 种炎症因子进行分析。秦蔚等^[8]观察了血清白细胞介素-8、TNF- α 及转化生长因子 β 1 的变化水平,间接说明了孟鲁司特钠与雾化吸入联合应用对气道炎症反应的改善作用。本研究是对这结果的进一步观察,选取了其他指标进行深入研究。

综上所述,孟鲁司特钠联合雾化吸入治疗可明显提高小儿咳嗽变异性哮喘的治疗效果,明显降低 PCT、IgE、TNF- α 炎症因子水平,值得临床推广。

参考文献

[1] 苗青,魏鹏草. 咳嗽变异性哮喘的研究进展[J]. 实用医学杂志,2011,27(10):1717-1718.
[2] 马红梅,刘香莲. 孟鲁司特钠联合布地奈德治疗小儿咳嗽变异性哮喘的作用分析[J]. 海南医学院学报,2015,21(3):350-352.
[3] 邹菊花,刘阳军,徐佩茹. 孟鲁司特对儿童咳嗽变异性哮喘的作用[J]. 中国妇幼保健研究,2011,22(2):208-209.
[4] 李玲,苟洪波,亚娜,等. 孟鲁司特钠联合布地奈德治疗小儿咳嗽变异性哮喘的疗效研究[J]. 重庆医学,2013,42(34):4198-4199.
[5] 谢伊玲. 孟鲁司特钠联合硫酸沙丁胺醇气雾剂(万托林)

雾化吸入在治疗小儿咳嗽变异性哮喘的临床疗效分析[J]. 中国医药科学,2016,6(1):74-77.
[6] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 咳嗽的诊断与治疗指南(草案)[J]. 诊断学理论与实践,2006,5(2):187-192.
[7] 尹秀芹. 孟鲁司特联合布地奈德治疗小儿咳嗽变异性哮喘的疗效分析[J]. 中国现代医生,2015,53(9):73-75.
[8] 秦蔚,赵宇华. 布地奈德联合孟鲁司特对小儿咳嗽变异性哮喘血清白介素-8、肿瘤坏死因子- α 及转化生长因子 β 1 水平的影响[J]. 中国医药导报,2013,10(35):95-97.
[9] 林寒梅. 孟鲁司特钠联合布地奈德治疗儿童咳嗽变异性哮喘临床疗效及对炎症因子的影响[J]. 中国妇幼保健,2015,30(5):796-797.
[10] 龚明. 孟鲁司特钠联合氨溴特罗治疗儿童咳嗽变异性哮喘 38 例[J]. 中国药业,2015,24(11):92-93.
[11] 侯伟鹏,庞丹丹,王帅,等. 大剂量氨溴索注射液辅助治疗小儿重症肺炎的临床研究[J]. 中国当代医药,2013,20(13):67-68.
[12] 彭燕,王策,黄燕,等. 孟鲁司特钠联合布地奈德对儿童咳嗽变异性哮喘的临床效果及炎症因子的影响[J]. 中国妇幼保健,2015,30(32):5688-5689.

(收稿日期:2017-03-14 修回日期:2017-04-21)