

• 论 著 •

献血者 HBsAg ELISA 检测屏蔽界限值研究

黄力勤¹, 常 乐², 王 瑞¹, 王露楠², 葛红卫^{1△}

(1. 北京市红十字血液中心检验科 100088; 2. 国家卫计委临床检验中心, 北京 100730)

摘要:目的 建立酶联免疫吸附法(ELISA)对献血者进行乙肝表面抗原(HBsAg)检测的高特异性 S/CO 屏蔽界限值。方法 对 783 份 HBsAg ELISA 反应性标本和 588 份非反应标本,采用 HBsAg 化学发光法和中和实验确认检测。根据确认检测结果和 ELISA 检测 S/CO 值建立受试者工作特征曲线(ROC 曲线),确定 95%和 99%特异度对应的 S/CO 界限值。另选择 124 份 HBsAg ELISA 反应性标本对设定的屏蔽界限值进行验证,同时以乙肝五项化学发光检测结果作为补充,判断屏蔽界限值的实用性。比较不同实验室采用相同试剂设定的 99%特异度对应的 HBsAg ELISA 检测 S/CO 界限值。结果 该实验室采用的 2 种 ELISA 试剂 95%特异度对应的 S/CO 界限值分别为 0.24 和 0.65,99%特异度对应的 S/CO 界限值分别为 3.89 和 3.62,将 99%特异度对应的 S/CO 界限值设定为该实验室献血者屏蔽界限值。验证实验证实,大于或等于试剂 1 和试剂 2 屏蔽界限值的标本均为 HBV 感染标本。与该实验室采用相同 HBsAg ELISA 检测试剂的 3 家实验室,试剂 1 的 99%特异度对应 S/CO 界限值分别为 3.77、3.60、13.42,试剂 2 分别为 27.73、31.75、1.17。结论 该研究建立的献血者 HBsAg ELISA 检测屏蔽界限值可在该实验室有效甄选出真阳性献血者,有助于减少进入归队流程的献血者数量。即使采用相同的 ELISA 检测试剂,不同实验室也不适用统一的献血者屏蔽界限值。

关键词:受试者工作特征曲线; 酶联免疫吸附试验; 乙型肝炎表面抗原; 献血者屏蔽

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.11.028

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)11-1520-03

Establish and confirm of blood donor deferral criterion in HBsAg ELISA test

HUANG Liqin¹, CHANG Le², WANG Rui¹, WANG Lu'nan², GE Hongwei^{1△}

(1. Department of Blood Screening Laboratory, Beijing Red Cross Blood Centre, Beijing 100088, China;

2. National Center for Clinical Laboratories, Beijing 100730, China)

Abstract: Objective To establish and confirm the hepatitis B surface antigen(HBsAg) enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) high specificity S/CO limit as blood donor deferral criterion. **Methods** A total of 783 HBsAg ELISA reactive and 588 non-reactive samples were collected, and confirmed by HBsAg electrochemiluminescence detection and neutralization test. Receiver operating characteristic curve (ROC curve) was used to evaluate the S/CO limit under 95% and 99% specificity. Another 124 HBsAg ELISA reactive samples were tested for five kinds of hepatitis B virus(HBV) markers by using electrochemiluminescence detection to verify the blood donor deferral limit. The blood donor deferral limits of 3 laboratories, using the same reagents, were compared. **Results** The 95% specificity S/CO limit of two reagents were 0.24 and 0.65, the 99% specificity S/CO limit of two reagents were 3.89 and 3.62. The 99% specificity S/CO limit was set as the blood donor deferral criterion. Verify test indicated that the samples, with S/CO higher than the blood donor reentry limit of reagent 1 and 2, were all from HBV infected donor. The 99% specificity S/CO limits of reagent 1 in the other three laboratories were 3.77, 3.60 and 13.42 respectively. And the 99% specificity S/CO limits of reagent 2 in the other three laboratories were 27.73, 31.75 and 1.17. **Conclusion** The blood donor deferral limit of HBsAg ELISA could identify the true positive blood donor, and reduce the number of blood donor, entering the reentry process. It might not suit to adopt a unified donor deferral limit in different laboratories, even using the same reagents.

Key words: ROC curve; ELISA; HBsAg; blood donor deferral

为保证临床用血安全性,血液筛查实验室通常选择高灵敏度的酶联免疫吸附法(ELISA)试剂用于乙型肝炎表面抗原(HBsAg)筛查,存在检出假阳性结果的可能。然而,国内相关法律、法规尚没有对 ELISA 反应性献血者的后续检测和随访进行要求,因此采供血机构通常永久屏蔽此类献血者,同时对相应的血液制品进行报废处理。为了保护献血者队伍,越来越多的采供血机构开展了假阳性献血者甄别及归队研究。根据 HBsAg ELISA 筛查结果,确定具有高特异性的屏蔽界限值,并以此屏蔽真阳性献血者,从而减少进入后续检测的献血者数量,是提高血液检测结果利用效率、细化反应性献血者管理的有效途径。本研究 HBsAg ELISA 反应性和非反应性标本进行了确认检测,采用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)比较了 95%和 99%特异度下,灵敏度最大点对应的 S/CO 值,并确定了相应的献血者屏蔽界限值。现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 标本来源 (1)建立 HBsAg ELISA 献血者屏蔽界限值

所用标本:收集笔者所在实验室(以下简称本实验室)2016 年 2—12 月常规检测标本中,HBsAg ELISA 反应性血浆标本 783 份,以及抗人类免疫缺陷病毒抗体(抗-HIV)、抗丙型肝炎病毒抗体(抗-HCV)、HBsAg、抗梅毒螺旋体抗体(抗-TP)ELISA 检测均为非反应性的标本 588 份。上述 1 371 份标本用于献血者屏蔽界限值的建立。所收集的标本在检测前-80℃保存,并低温运送至与其他 5 家与本实验室采用相同 HBsAg ELISA 检测试剂的实验室。(2)验证 HBsAg ELISA 献血者屏蔽界限值所用标本:收集本实验室 2017 年 1—2 月常规检测样本中,HBsAg ELISA 反应性血浆标本 124,用于献血者屏蔽界限值的验证。标本检测前-80℃保存。

1.2 仪器与试剂 Microlab STAR 自动化液体处理工作站、FAME 24/20、24/30 全自动微板检测系统购自瑞士 Hamilton 公司。cobas e411 电化学发光免疫分析系统及配套 HBsAg 检测试剂购自瑞士罗氏公司。Architect i2000 化学发光免疫分析仪、乙肝五项[HBsAg、抗乙型肝炎表面抗体(anti-HBs)、乙

型肝炎 e 抗原(HBeAg)、抗乙型肝炎 e 抗体(anti-HBe)、抗乙型肝炎核心抗体(anti-HBc)]配套检测试剂,以及乙型肝炎病毒(HBV)中和抗体检测试剂购自美国雅培公司。HBsAg ELISA 检测试剂(北京万泰公司、意大利索灵公司)。上述试剂均通过批批检,且均在有效期内使用。严格按照说明书进行检测操作和结果判断。

1.3 方法

1.3.1 本实验室献血者屏蔽界限值的建立 同时采用罗氏和雅培公司化学发光检测试剂对 1 371 份标本进行 HBsAg 检测。确认检测结果判定方式见表 1。以 HBsAg ELISA 检测结果的 S/CO 值作为统计变量,以确认检测结果作为状态变量,采用 SPSS19.0 软件进行 ROC 曲线分析,并计算 95%和 99%特异度条件下,HBsAg ELISA 检测最大灵敏度对应的 S/CO 值,并确定屏蔽界限值。

表 1 确认检测结果判定方式

2 次化学发光检测结果	中和实验	结果判定
双阳性	不检测	反应性阳性
单阳性	阳性	反应性阳性
单阳性	阴性	非反应性阴性
双阴性	不检测	非反应性阴性

注:中和实验结果为不确定的标本,不纳入后续统计分析。

1.3.2 本实验室献血者屏蔽界限值验证 对 124 份验证标本中,S/CO 大于或等于屏蔽界限值的标本进行乙肝五项检测,判读检测结果,并确认献血者 HBV 感染状态^[1-3]。

1.3.3 屏蔽界限值适用性分析 由另外 3 家实验室,同时采用万泰和索灵公司 HBsAg ELISA 检测试剂盒,对上述 1 371 份标本进行检测,采用相同的方法和判定规则对结果进行确认,采用 ROC 曲线计算 99%特异度条件下的 S/CO 界限值,并与本实验室确定的界限值进行比较。

表 3 本实验室 HBsAg ELISA 屏蔽界限值验证结果(n)

试剂	反应性标本	HBsAg+、抗-HBs-、HBeAg-、 抗-HBe-、抗-HBc+	HBsAg+、抗-HBs-、HBeAg +、抗-HBe+、抗-HBc+	HBsAg+、抗-HBs-、HBeAg +、抗-HBe+、抗-HBc-	HBsAg+、抗-HBs-、HBeAg-、 抗-HBe+、抗-HBc+
试剂 1	74	67	1	1	1
试剂 2	75	69	1	1	1

续表 3 本实验室 HBsAg ELISA 屏蔽界限值验证结果(n)

试剂	反应性 标本	HBsAg+、抗-HBs+、 HBeAg-、抗-HBe-、抗-HBc+	HBsAg+、抗-HBs+、HBeAg-、 抗-HBe+、抗-HBc+	HBsAg-、抗-HBs-、HBeAg-、 抗-HBe+、抗-HBc-	HBsAg-、抗-HBs+、HBeAg-、 抗-HBe-、抗-HBc+
试剂 1	74	1	1	1	1
试剂 2	75	1	1	1	0

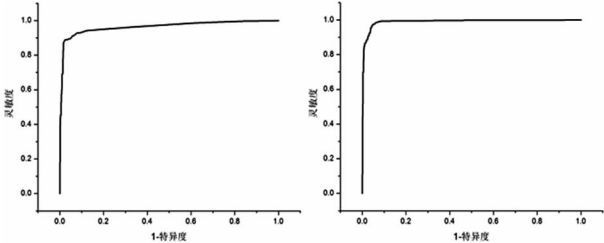
2.3 HBsAg ELISA 屏蔽界限值适用性 由 ROC 曲线计算获得的不同实验室相同检测试剂 99%特异度对应的 S/CO 界限值见表 4,不同实验室在相同特异度条件下的屏蔽界限值差异较大。

表 4 不同实验室相同检测试剂 99%特异度对应的屏蔽界限值

试剂	实验室	S/CO 界限值
试剂 1	A	3.77
	B	3.60
	C	13.42
	本实验室	3.89
试剂 2	A	27.73
	D	31.75
	E	1.17
	本实验室	3.62

2 结 果

2.1 本实验室 HBsAg ELISA 屏蔽界限值建立 计算获得的 ROC 曲线图见图 1,根据 ROC 曲线获得的 2 种 HBsAg ELISA 检测试剂在 95%和 99%特异度对应的 S/CO 界限值见表 2。95%特异度对应的 S/CO 界限值小于 1,因此无需设定 95%特异性度对应的屏蔽界限值,采用 99%特异度对应的 S/CO 值,即 3.89 和 3.62 作为本实验室试剂 1 和试剂 2 的献血者屏蔽界限值。



注:左图为试剂 1 的 ROC 曲线,右图为试剂 2 的 ROC 曲线。

图 1 本实验室 HBsAg ELISA 检测结果 ROC 曲线

2.2 本实验室屏蔽界限值验证 124 份验证标本中,大于或等于试剂 1 和试剂 2 屏蔽界限值的标本各有 74、75 份,判为反应性标本,乙肝五项检测结果见表 3。设定的试剂 1 和试剂 2 的屏蔽界限值正确率均为 100%。

表 2 本实验室 2 种 HBsAg ELISA 检测试剂屏蔽界限值

试剂	95%特异度		99%特异度	
	S/CO 界限值	灵敏度(%)	S/CO 界限值	灵敏度(%)
试剂 1	0.24	89.9	3.89	68.8
试剂 2	0.65	97.4	3.62	83.0

3 讨 论

中国是 HBV 感染高流行地区,1~59 岁人群 HBV 携带率约为 5.84%^[4]。为屏蔽携带 HBV 的献血者,采供血机构通常采用高灵敏度的 HBsAg ELISA 检测试剂对献血者进行筛查,以降低漏检风险。但 ELISA 检测试剂的灵敏度和特异度呈反向变化趋势,提高灵敏度势必增加假阳性结果。对 HBsAg ELISA 检测结果的分析显示,不同实验室在应用不同试剂时,其检测假阳性率从 18.24%到 47.91%不等^[5-7]。HBsAg ELISA 假阳性献血者被永久屏蔽,不仅导致献血者流失,也给假阳性献血者造成一定的心理负担,引发不必要的社会问题。因此,有专家建议应对疑似假阳性结果标本进行确认检测,使一部分献血者重新获得献血资格,即开展献血者归队业务^[8-9]。

对于献血者归队工作,国内相关法律、法规仅有原则上的要求,缺乏相应的献血者屏蔽与归队标准^[10]。受人力因素与资源因素的限制,多数采供血机构无法对全部阳性标本进行确

认检测,因此有研究者建议综合考虑 ELISA 和核酸检测结果,屏蔽 ELISA 与核酸检测均为反应性结果的献血者,ELISA 单独反应性献血者则进入归队流程^[11-13]。但目前一些血液筛查实验室基于检测成本和血液安全综合考虑,未对 ELISA 反应性标本进行核酸检测。也有专家建议屏蔽 2 次 ELISA 检测结果均为反应性的献血者,对仅 1 种试剂检测结果为反应性的献血者进行追踪检测^[14-17],然而在核酸检测试剂实施批批检定签发后,开展核酸检测的血液筛查实验室可采用 1 次 ELISA 检测^[18],说明该方法也有其局限性。因此,本研究采用 ROC 曲线分析 HBsAg ELISA 检测试剂在高特异度下的 S/CO 界限值,并验证该界限值作为献血者屏蔽标准的应用价值,力求找到一种可以将 HBsAg ELISA 献血者屏蔽判断界限数值化的方法,以代替现有的屏蔽与归队定性判断标准,使其具有更广泛的适用性。

ROC 曲线常用于评价检测试剂性能和确定临界值,其原理是将连续变量设定为多个不同的临界值,计算每个临界值对应的灵敏度和特异度,再以灵敏度为纵坐标,以(1-特异度)为横坐标,绘制曲线^[19]。本研究设定献血者 ELISA 检测屏蔽判断临界值,目的在于最大程度地增加被判断为反应性结果的阳性预测值,减少需进一步实施确证检测的献血者数量。因此,本研究通过设定可接受特异度的最低限值,确定不低于该限值的最大灵敏度对应的临界值,并以此作为献血者屏蔽的最佳界限值。在 ROC 曲线分析中,检测特异度越高,相应的检测界限值的 S/CO 值也越高。本研究首先比较了 95%和 99%特异度条件下,确定献血者 HBsAg ELISA 检测屏蔽界限值的可行性。ROC 曲线分析结果显示,本实验室 2 种 ELISA 试剂的 95%特性度对应 S/CO 值均小于 1,因此 2 种试剂均无需设置 95%特性度下的献血者归队界限值,日常检测即可超过 95%特异度;以 99%特异度确定 HBsAg ELISA 献血者屏蔽界限值,则试剂 1 和试剂 2 的 S/CO 界限值分别为 3.89 和 3.62。该界限值可以保证检测的高特异度,避免阳性献血者进入归队流程造成的资源浪费。此外,所设定的 S/CO 界限值处于整个 S/CO 值范围的较低水平,可避免 S/CO 界限值设定过高导致的献血者屏蔽减少,因此有一定的实际应用效果。

HBsAg ELISA 屏蔽界限值验证结果显示,在 124 份验证样本中,大于或等于试剂 1 和试剂 2 S/CO 屏蔽界限值的标本分别占 59.7%(74/124)和 60.5%(75/124),且大于屏蔽界限值的标本乙肝五项检测结果可分为 8 种不同的组合,其中 6 种组合可确认为 HBV 感染,另有 2 种组合仅抗-HBe 阳性和仅抗-HBs/抗-HBc 阳性,可能为 HBV 既往感染并已恢复的献血者^[1-3]。但从最大程度保护受血者的角度考虑,其血液制品不能应用于临床,因此仍将该两类结果归为阳性,即确认 HBV 感染。由此可见,大于或等于试剂 1 和试剂 2 屏蔽界限值的样本,均可确认为 HBV 感染标本,所设定的屏蔽界限值具有较大的实用性。

此外,本研究比较了不同实验室采用相同检测试剂确定的献血者屏蔽 S/CO 界限值。同样以 99%特异度对应的 S/CO 值作为界限值,另 1 家实验室确定的试剂 1 和试剂 2 的 S/CO 界限值虽然大于 1,但差距较大,试剂 1 的最大界限值是最小界限值的 3.73 倍,试剂 2 的最大界限值是最小界限值的 27.14 倍。因此,使用相同试剂的不同实验室,无法采用相同的 S/CO 屏蔽界限值,可能是因为不同实验室工作人员检测能力和试剂稳定性存在差异。但参与本研究的实验室较少,难以确定具体原因,这也是后续研究的重点。目前,只有强生公司第三代抗-HCV ELISA 检测试剂提供了相应的屏蔽界限参考值, S/CO $\geq$ 3.8 时,阳性预测值大于 95%^[20]。但其他 ELISA 检测试剂尚未建立屏蔽界限值。

综上所述,本研究分析了如何设定 HBsAg ELISA 献血者

屏蔽界限值的方法,并证明以该方法制定的 HBsAg ELISA 屏蔽界限值在献血者分类方面具有一定的可行性。不同实验室即使采用相同的试剂,其 S/CO 屏蔽界限值的差异也较大,如何科学设定统一的献血者屏蔽界限值,需进一步深入研究。

参考文献

- [1] 李红春,郭洪君,孙化,等.病毒学检验在乙型肝炎患者中的实施结果分析[J]. 航空航天医学杂志,2015,26(3):292-293.
- [2] 白素萍.乙型肝炎患者的临床乙肝五项检验结果分析与研究[J]. 中国处方药,2014,12(5):18-19.
- [3] Song JE, Kim DY. Diagnosis of hepatitis B[J]. Ann Transl Med,2016,4(18):338.
- [4] Wang FS, Fan JG, Zhang Z, et al. The global burden of liver disease; the major impact of China[J]. Hepatology, 2014,60(6):2099-2108.
- [5] 刘宇宁,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.
- [6] 宋美兰,任芙蓉,龚晓燕,等.献血者 HBsAg 及抗-HCV ELISA 筛查不合格标本的假阳性分析[J]. 北京医学,2013,35(5):391-395.
- [7] 王艳彬,韩卫,李莉华,等.无偿献血者 HBsAg 筛查不合格结果的确证分析[J]. 临床血液学杂志,2016,29(8):616-618.
- [8] 周国平,谢云峥,王迅,等.做好假反应性献血者归队是血站的责任[J]. 中国输血杂志,2014,27(10):1079-1082.
- [9] 滕平,汪桂荣,袁红.血液酶免四项检测假阳性对无偿献血工作的影响[J]. 中国医药指南,2013,11(36):155-156.
- [10] 中华人民共和国卫生部.卫医发[2006]167 号 血站质量管理规范[Z]. 北京:中华人民共和国卫生部,2006.
- [11] 中国输血协会.血液质量管理工作委员会.反应性献血者屏蔽与归队指南(第 2 版)[Z]. 北京:中国输血协会,2015.
- [12] 武丽娟.反应性献血者屏蔽与归队的探讨[J]. 临床输血与检验,2015,17(2):153-155.
- [13] 谢云峥,祝宏,朱绍文. HBsAg、Anti-HCV、抗-HIV 酶联免疫吸附法筛查反应性献血者屏蔽与归队程序建议[J]. 临床输血与检验,2013,15(4):398-402.
- [14] 庞栋,申卫东,张翔,等. ELISA 筛查单试剂反应献血者追踪检测[J]. 中国输血杂志,2014,27(4):381-383.
- [15] 庞栋,张翔,申卫东,等.南宁市无偿献血者归队策略及影响因素[J]. 中国输血杂志,2015,28(5):571-573.
- [16] 郭崇健,李天君,李美霖,等.献血者归队流程设计研究[J]. 中国卫生质量管理,2015,22(2):99-102.
- [17] 曾劲峰,陈云龙,郑欣,等. HBsAg、抗-HCV 反应性无偿献血者归队检测模式探讨[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(23):3207-3209.
- [18] 国家卫生计生委.国卫医发[2015]95 号血站操作技术规范(2015 版)[Z]. 北京:国家卫生计生委,2015.
- [19] Alemayehu D, Zou KH. Applications of ROC analysis in medical research; recent developments and future directions[J]. Acad Radiol,2012,19(12):1457-1464.
- [20] Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus[J]. MMWR,2003,52(3):5-6.