

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.18.021

血站实验室溶血、脂血比色卡的建立及探讨

韩晓燕,冯旭,许苗苗,张麦利,李敏

陕西省渭南市市中心血站检验科,陕西渭南 714000

摘要:目的 探讨血站实验室溶血、脂血目测比色卡的建立过程,保证实验室检测标本质量,确保基于 PCR 方法的核酸检测结果准确。方法 用 Roche Cobas s201 全自动核酸检测系统以 Pools of 1 模式检测血红蛋白水平分别为 0、50、150、250、500 mg/dL 5 个梯度的溶血标本及三酰甘油水平分别为 0、800、1 700、2 500、3 300 mg/dL 5 个梯度的脂血标本对 3 倍最低检出限(LOD)HBV DNA、HCV RNA 和 HIV RNA 检出率的影响情况;对不同水平溶血、脂血标本拍照、制作比色卡。结果 0、50、150、250、500 mg/dL 5 个水平梯度的溶血标本对 HBV DNA、HCV RNA 和 HIV RNA 3 个项目的核酸检测检出率均无影响($P>0.05$);0、800、1 700、2 500 mg/dL 4 个水平梯度的脂血标本对 HBV DNA、HCV RNA 和 HIV RNA 3 个项目的核酸检测检出率无影响($P>0.05$),3 300 mg/dL 的脂血标本对 HBV DNA、HCV RNA 两个项目的检出率无影响($P>0.05$),但对 HIV RNA 的检出率有影响($P<0.05$)。结论 该实验室的无偿献血者人群标本,血红蛋白水平 ≤ 500 mg/dL 所对应的比色卡溶血标本、三酰甘油水平 $\leq 2 500$ mg/dL 所对应的比色卡脂血标本对核酸检测结果无影响,可接收。

关键词:溶血标本; 脂血标本; 核酸检测; 检出率

中图分类号:R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)18-2665-04

Establishment and discussion of hemolysis and lipemia colorimetric card in blood station laboratory

HAN Xiaoyan, FENG Xu, XU Miaomiao, ZHANG Maili, LI Min

Department of Clinical Laboratory, Weinan Municipal Blood Center, Weinan, Shaanxi 714000, China

Abstract: Objective To investigate the establishment process of hemolytic and lipemia visual colorimetric cards in the blood station laboratory to ensure the quality of laboratory test specimens and the accuracy of PCR-based nucleic acid test results. **Methods** The influence situation of hemolytic samples with 5 gradients of hemoglobin(Hb) levels of 0, 50, 150, 250, 500 mg/dL and the lipemia samples with 5 gradients of triglyceride(TG) levels of 0, 800, 1 700, 2 500, 3 300 mg/dL on the detection rates of 3 times LOD HBV DNA, HCV RNA and HIV RNA was detected by using the Pool of 1 mode in the Roche Cobas s201 automatic nucleic acid detection system. The different levels of hemolytic samples and lipemia samples were taken photos for making the colorimetric cards. **Results** The hemolytic samples with 5 gradients of Hb levels of 0, 50, 150, 250, 500 mg/dL had no influence on the nucleic acid detection rate of 3 items of HBV DNA, HCV RNA and HIV RNA ($P>0.05$); the lipemia samples with 4 gradients of 0, 800, 1 700, 2 500 mg/dL had no influence on the nucleic acid detection rates of HBV DNA, HCV RNA and HIV RNA ($P>0.05$). The 3 300 mg/dL lipemia sample had no influence on the detection rate of HBV DNA and HCV RNA ($P>0.05$), but had the influence on the detection rate of HIV RNA ($P<0.05$). **Conclusion** For the samples of unpaid blood donors in this the laboratory, the Hb ≤ 500 mg/dL corresponding colorimetric cards hemolytic sample, TG $\leq 2 500$ mg/dL corresponding colorimetric cards lipemia sample have no influence on the nucleic acid detection results, which is acceptable.

Key words: hemolytic samples; lipemia samples; nucleic acid detection; detection rates

溶血、脂血是血站实验室最常见的标本状态,有文献报道轻中度溶血、脂血标本对 ALT^[1]、乙型肝炎病毒表面抗原^[2-3]、丙型肝炎病毒抗体^[4]、人类免疫缺陷病毒抗原抗体^[5]、核酸检测^[6]等项目的检测结果均无影响,重度溶血、脂血标本可导致人类免疫缺陷病毒抗体^[5]、梅毒螺旋体抗体^[7]的检测出现假阳性;但不同水平梯度溶血、脂血标本影响血站实验室开展项

目的系统性研究鲜见报道。本实验室基于:(1)核酸检测具有灵敏度高、抗干扰能力弱等特点^[8-9];(2)核酸标本接收时已离心,目测检查的可操作性强;(3)ELISA 检测至少有一次洗板过程,溶血、脂血标本已被洗去,不会影响结果读取^[2,10]等原因,选择核酸检测项目来验证溶血、脂血标本对血站实验室检测项目的影响情况,并依据该情况制作溶血、脂血目测比色卡,

作为标本接收时的依据,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材料 50 IU/mL HBV DNA(批号:201909008)、200 IU/mL HCV RNA(批号:201907007)、1 000 IU/mL HIV-1 RNA(批号:201908007)和阴性质控品(批号:201907006)均购于北京康彻思坦生物技术有限公司;中链三酰甘油(批号:16308LNLCL,原产国:印度尼西亚);溶血标本(自制),核酸检测阴性的无偿献血者血浆。

1.2 试剂、仪器与耗材

1.2.1 核酸检测试剂 Roche TaqScreen MPX Test version 2.0 试剂(批号:E31914),所用试剂严格按照试剂说明书要求进行操作。

1.2.2 仪器与耗材 瑞士 Roche Cobas s201 全自动核酸检测系统,包括 Hamilton Microlab Star 全自动混样仪,Cobas Amplipre 核酸提取仪及 Cobas Taqman 核酸扩增仪;旋涡混合器(江苏康健医疗用品,型号:XH-B 型);血球计数仪(希森美康,型号:KX-21);生物安全柜(苏净安泰,BHC-1300);可调式移液器(北京大龙,型号:100~1 000 μ L);核酸负压管(碧迪医疗器械,批号:9184731)。

1.3 方 法

1.3.1 溶血、脂血及阳性项目浓度的选择 依据《临床实验室标本溶血检测与应用专家共识(征求意见稿)》、Cobas TaqScreen MPX V2.0 试剂说明书及《血站技术操作规程》(2019 版)中溶血、脂血程度对核酸检测结果的影响情况,选择验证的溶血标本中血红蛋白水平分别为 0、50、150、250、500 mg/dL,脂血标本中三酰甘油水平分别为 0、800、1 700、2 500、3 300 mg/dL;选择验证的 HBV DNA、HCV RNA 和 HIV RNA 的水平均为 3 倍最低检出限(LOD)水平,分别为 6.9、20.4 IU/mL 和 150.9 IU/mL。溶血标本选择 16 例,脂血标本选择 15 例。

1.3.2 6 000 mg/dL 三酰甘油溶液的配制 96 000 mg/dL 的三酰甘油原液加核酸检测阴性的无偿献血者混合血浆分两次做 4 倍稀释,阴性混合血浆旋涡震荡 3 min,稀释后的三酰甘油溶液旋涡震荡至少 10 min(0、800、1 700、2 500、3 300 mg/dL 5 个水平梯度的脂血标本均用 6 000 mg/dL 三酰甘油溶液配置)。

1.3.3 溶血标本原液的准备 核酸检测阴性的无偿献血者混合血浆加 ELISA 检测阴性的红细胞于一 20 $^{\circ}$ C 冰箱反复冻融后,3 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,用血球计数仪测 2 次血红蛋白,取均值,实验中所 得溶血标本原液血红蛋白水平为 900 mg/dL。

1.3.4 不同水平溶血、脂血及 3 倍 LOD HBV DNA、HCV RNA 和 HIV RNA 混合标本的配制 用阴性血浆分别将 6 000 mg/dL 三酰甘油溶液(900 mg/dL 溶血标本原液)和 50 IU/mL 的 HBV DNA、200 IU/mL 的 HCV RNA、1 000 IU/mL 的 HIV RNA 稀释成三酰甘油水平分别为 0、800、1 700、2 500、3 300

mg/dL(游离血红蛋白水平分别为 0、50、150、250、500 mg/dL)及 3 倍 LOD HBV DNA、HCV RNA 和 HIV RNA 混合标本。

1.3.5 检测方法 采用 Pools of 1 模式单检,每个标本单检加样量为 1 000 μ L。

1.4 结果判读标准

1.4.1 试验结果的判读规则 试剂盒阴阳对照、IC 均有效,该批试验结果方可接受。

1.4.2 溶血、脂血目测比色卡对检测结果的判读要求 不同游离血红蛋白水平的溶血标本、不同三酰甘油水平的脂血标本中 3 倍 LOD HBV DNA、HCV RNA 和 HIV RNA 3 个项目均能检出,该水平的溶血、脂血标本方可接受。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料以例数和百分率表示,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 溶血标本对核酸检测项目检出率的影响情况 游离血红蛋白水平分别为 0、50、150、250、500 mg/dL 的溶血标本对 3 倍 LOD HBV DNA、HCV RNA 和 HIV RNA 项目的检出率均没有影响($P > 0.05$),见表 1。

表 1 不同水平梯度溶血对 3 倍 LOD HBV DNA、HCV RNA 和 HIV RNA 检出率的影响

不同水平梯度	<i>n</i>	HBV DNA		HCV RNA		HIV RNA	
		阳性数	检出率 (%)	阳性数	检出率 (%)	阳性数	检出率 (%)
0 mg/dL 组	16	16	100	16	100	16	100
50 mg/dL 组	16	16	100*	16	100*	16	100*
150 mg/dL 组	16	16	100*	16	100*	16	100*
250 mg/dL 组	16	16	100*	16	100*	16	100*
500 mg/dL 组	16	16	100*	16	100*	16	100*

注:与 0 mg/dL 组比较,* $P > 0.05$ 。

2.2 不同水平梯度溶血标本中 3 倍 LOD HBV DNA、HCV RNA 和 HIV RNA Ct 值的比较情况 不同水平溶血标本中 3 倍 LOD HBV DNA、HCV RNA 和 HIV RNA 项目的 Ct 值与正常组(0 mg/dL 组)标本中的 Ct 值比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

表 2 不同水平梯度溶血标本中 3 倍 LOD HBV DNA、HCV RNA 和 HIV RNA Ct 值的比较($\bar{x} \pm s$)

不同水平梯度	<i>n</i>	HBV DNA	HCV RNA	HIV RNA
0 mg/dL 组	16	34.54 \pm 0.62	35.33 \pm 0.27	36.80 \pm 0.65
50 mg/dL 组	16	34.69 \pm 0.75*	35.48 \pm 0.41*	36.52 \pm 0.70*
150 mg/dL 组	16	34.61 \pm 0.53*	35.32 \pm 0.39*	36.93 \pm 1.34*
250 mg/dL 组	16	34.47 \pm 0.60*	35.34 \pm 0.33*	36.78 \pm 0.92*
500 mg/dL 组	16	34.59 \pm 0.70*	35.29 \pm 0.36*	36.95 \pm 0.80*

注:与 0 mg/dL 组比较,* $P > 0.05$ 。

2.3 脂血标本对核酸检测项目检出率的影响情况 三酰甘油水平为 0、800、1 700、2 500 mg/dL 时对 3 倍 LOD HBV DNA、HCV RNA 和 HIV RNA 的检出率均没有影响 ($P > 0.05$); 3 300 mg/dL 脂血标

本对 HBV DNA、HCV RNA 两个项目的检出率无影响 ($P > 0.05$), 但对 HIV RNA 的检出率有影响 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 不同水平梯度脂血对 3 倍 LOD HBV DNA、HCV RNA 和 HIV RNA 检出率的影响

不同水平梯度	n	HBV DNA		HCV RNA		HIV RNA	
		阳性数	检出率(%)	阳性数	检出率(%)	阳性数	检出率(%)
0 mg/dL 组	15	15	100	15	100	15	100
800 mg/dL 组	15	15	100*	15	100*	15	100*
1 700 mg/dL 组	15	15	100*	15	100*	15	100*
2 500 mg/dL 组	15	15	100*	15	100*	15	100*
3 300 mg/dL 组	15	15	100*	15	100*	14	93.33 [#]

注: 与 0 mg/dL 组比较, * $P > 0.05$, [#] $P < 0.05$ 。

2.4 不同水平梯度脂血标本中 3 倍 LOD HBV DNA、HCV RNA 和 HIV RNA 的 Ct 值比较情况 除 3 300 mg/dL 水平脂血标本中 3 倍 LOD HIV RNA 的 Ct 值外, 其他不同水平三酰甘油的脂血标本组中 3 倍 LOD HBV DNA、HCV RNA 和 HIV RNA 的 Ct 值与正常标本(0 mg/dL 组)中的 Ct 值比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 4。

表 4 不同水平梯度脂血标本中 3 倍 LOD HBV DNA、HCV RNA 和 HIV RNA 的 Ct 值比较($\bar{x} \pm s$)

不同水平梯度	n	HBV DNA	HCV RNA	HIV RNA
0 mg/dL 组	15	34.81±0.47	35.36±0.29	36.70±0.90
800 mg/dL 组	15	34.27±1.17*	35.19±0.41*	36.58±0.73*
1 700 mg/dL 组	15	34.67±0.96*	35.19±0.27*	36.43±1.03*
2 500 mg/dL 组	15	34.61±0.71*	35.40±0.47*	36.30±0.88*
3 300 mg/dL 组	14	35.75±2.88*	35.29±0.69*	36.69±0.63

注: 与 0 mg/dL 组比较, * $P > 0.05$ 。

RNA 质控品稀释成三酰甘油水平为 3 300 mg/dL 的 3 倍 LOD HIV RNA 混合标本。采用 Pools of 1 模式单检, 10 例 3 300 mg/dL 水平脂血标本中 3 倍 LOD HIV RNA 的检出率为 80% (8/10), Ct 值为 36.85±1.14。

2.6 目测比色卡 溶血标本目测比色卡见图 1; 脂血标本目测比色卡见图 2。

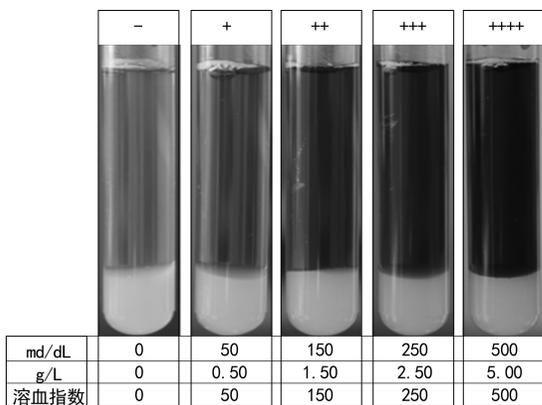


图 1 溶血标本目测比色卡

2.5 3 300mg/dL 水平脂血对 3 倍 LOD HIV RNA 检出率影响的补充试验 针对结果 2.3 中, 15 例 3 300 mg/dL 脂血标本中有 1 例 HIV RNA 未检出的情况, 继续补充 10 例标本, 以验证 3 300 mg/dL 脂血对 HIV RNA 项目的影响。配制方法: 用阴性血浆将 6 000 mg/dL 三酰甘油溶液和 1 000 IU/mL 的 HIV

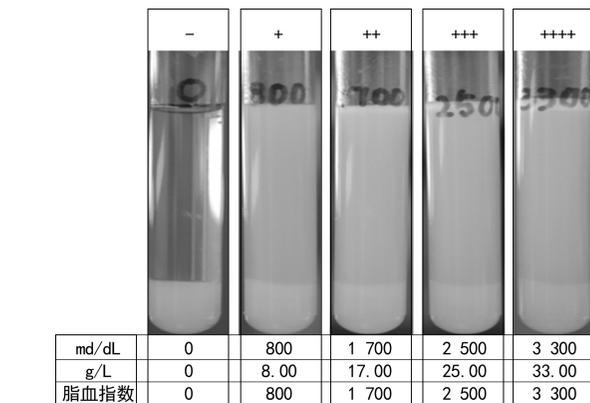


图 2 脂血标本目测比色卡

3 讨 论

标本采集作为血站实验室检测前的重要环节, 是血液检测质量保证的第一道关卡, 标本的状态及质量直接决定后续检测结果的准确性, 故血站实验室应建立适宜本实验室的溶血、脂血目测比色卡, 以避免不合格溶血、脂血标本进入血液检测过程, 进而确保血液核酸检测结果准确, 保障临床输血安全。

表 1 显示当标本中血红蛋白水平分别为 0、50、150、250、500 mg/dL 时对 3 倍 LOD HBV DNA、HCV RNA 和 HIV RNA 项目的检出率均没有影响; 表 2 中血红蛋白为 50、150、250、500 mg/dL 的溶血标本组中 3 倍 LOD HBV DNA、HCV RNA 和 HIV RNA 项目的 Ct 值与正常标本(0 mg/dL 组)中的 Ct 值比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。Cobas TaqScreen MPX V2.0 试剂盒说明书中显示血红蛋白最高达 500 mg/dL 时对检测结果无影响, 本次实验设

定的不同水平血红蛋白的溶血标本对 3 倍 LOD HBV DNA、HCV RNA 和 HIV RNA 的检测结果显示符合 Cobas TaqScreen MPX V2.0 试剂盒说明书要求。

表 3 显示标本中三酰甘油水平分别为 0、800、1 700、2 500 mg/dL 时对 3 倍 LOD HBV DNA、HCV RNA 和 HIV RNA 项目的检出率均没有影响；3 300 mg/dL 水平脂血标本对 HBV DNA、HCV RNA 两个项目的检出率无影响，但对 HIV RNA 的检出率有影响。表 4 中除 3 300 mg/dL 水平脂血标本中 3 倍 LOD HIV RNA 的 Ct 值组外，其他不同水平三酰甘油的脂血标本组中 3 倍 LOD HBV DNA、HCV RNA 和 HIV RNA 项目的 Ct 值与正常标本(0 mg/dL 组)中的 Ct 值比较，差异均无统计学意义($P>0.05$)。表 3 和 3 300 mg/dL 水平脂血标本对 3 倍 LOD HIV RNA 检出率影响的补充试验中，3 300 mg/dL 水平脂血且 3 倍 LOD HIV RNA 阳性标本的测试数共 25 例，其中检出 HIV RNA 阳性 22 例，总检出率为 88% (22/25)，小于 95% 的置信区间，并结合本研究 1.4.2 的要求，判定三酰甘油水平为 3 300 mg/dL 的脂血标本对 HIV RNA 的检出率有影响，该情况与 Cobas TaqScreen MPX V2.0 试剂盒说明书中三酰甘油水平最高达 3 300 mg/dL 时对检测结果无影响的内容不符合，分析原因可能有：(1)商品化的三酰甘油溶液不能百分百模拟人源性的脂血，导致检测结果有差异；(2)本试验方案测试数较少，不能代表试剂盒测试过程的实际状态；(3)3 300 mg/dL 三酰甘油的脂血标本在本实验室环境中用 Cobas TaqScreen MPX V2.0 试剂盒检测时，对 HIV RNA 的检出率确实有影响。

陈雪等^[11]研究中血红蛋白水平为 682 mg/L (68.2 mg/dL)、三酰甘油水平为 15 009.6 mg/L (1 500.96 mg/dL)不会影响 HBV DNA、HCV RNA 和 HIV RNA 的检测结果；张龙穆等^[12]报道中度、重度脂血不会导致核酸检测结果出现假阳性或假阴性；张翠莉等^[13]研究中溶血和脂血对实时荧光定量 PCR 检测 HBV DNA 结果无影响。本研究的结论与上述研究结果并不完全一致，可能与不同研究中血红蛋白、三酰甘油设定的水平梯度、检测分析方法及检测系统不同等因素有关，所以需建立适合本实验室环境、检测系统、分析方法的溶血、脂血比色卡。

溶血标本目测比色卡(图 1)中不同溶血程度目测观察较明显，易于操作；脂血标本目测比色卡(图 2)中 800、1 700、2 500、3 300 mg/dL 脂血程度目测观察区别不显著，可能与使用商品化三酰甘油原液配制所得相关，所以实际操作中，标本接收人员应仔细甄别，对于明显高于或与 3 300 mg/dL 水平相当的脂血标本，在保证标本和献血者溯源性的前提下，可重新采样，若两次采样标本均为同等脂血标本，则拒绝接收；对于接近 2 500~3 300 mg/dL 水平的脂血标本，可做特殊标识，试验前采取高速离心后去除上层脂浆的措

施^[14]保证检测结果的准确性。

笔者在本次溶血、脂血比色卡建立过程中有以下几方面的建议和思考：(1)以核酸检测结果建立的溶血、脂血比色卡是否适合于血型检测，还有待进一步确认；(2)溶血标本的制备尽量在实验前 2~3 d 开始，不宜过早准备，避免冻融的过程中滋生细菌，影响结果的准确性；(3)溶血标本反复冻融后，离心吸取上清时避免晃动，减少细胞碎片对检测结果的影响；(4)有条件的实验室可收集临床脂血标本做比色卡验证，若必须要用商品化三酰甘油，则配制过程中旋涡震荡混匀环节必须超过 10 min，使配制溶液充分混匀，且混匀后立即上机检测；(5)脂血比色卡实验全过程中实验室温度应保持 25 ℃左右，不得低于 20 ℃，防止脂肪层析出影响检测结果；(6)标本管的贴签应不占满管体，方便接收人员查看标本采集量及标本状态。

参考文献

- [1] 高艳,车火娇,麦永平,等.影响献血者 ALT 初筛结果的原因分析[J].国际检验医学杂志,2015,36(13):1872-1873.
- [2] 邓晓琴,杨茂,周翼,等.脂血标本对 HBsAg 检测结果的影响[J].中国输血杂志,2011,24(9):798-799.
- [3] 何星,黄小明.溶血标本在 ELISA 二步法中对 HBsAg 测定结果的影响[J].中国输血杂志,2013,26(9):900-902.
- [4] 张玲,张蓉.溶血,脂血在 ELISA 法检测抗-HCV 中对 OD 值影响探讨[J].中国输血杂志,1996,9(2):77-78.
- [5] 何君,吴学春,邢艳.探讨溶血,乳糜血,自身抗体对 HIV 抗体初筛结果的影响[J].东南大学学报(医学版),2016,35(1):54-57.
- [6] 庄养林.溶血,脂肪血及保存条件对血液病毒核酸筛查影响的研究[D].南昌:南昌大学,2017.
- [7] 王欣.溶血标本对 ELISA 法检测梅毒抗体的影响[J].临床输血与检验,2015,17(6):559-561.
- [8] 邹峥嵘,谢云峥,林俊杰.采供血机构开展病毒核酸检测关键控制点初探[J].中国输血杂志,2011,24(3):177-179.
- [9] 汪德海,王瑞,葛红卫.血站核酸检测实验室质量监控指标应用[J].中国输血杂志,2012,25(6):524-527.
- [10] 杨茂,邓晓琴,周翼,等.脂血样本对梅毒检测的影响[J].临床输血与检验,2011,13(1):78-79.
- [11] 陈雪,王欢,李萌,等.脂血,溶血标本对血液核酸检测的影响评价[J].云南医药,2017,38(4):397-398.
- [12] 张龙穆,杨忠思,袁欣,等.脂血对血液核酸检测结果的影响评价[J].中国输血杂志,2016,29(1):55-57.
- [13] 张翠莉,刘萍,魏文波.脂血和溶血对 HBV DNA 实时荧光定量 PCR 检测的影响[J].武警医学,2012,23(2):150-152.
- [14] 黄秀琳,阳禄平,陈敏,等.重度脂血标本对 ALT 及 ELISA 检测的影响及处理[J].中国输血杂志,2018,31(11):1298-1300.