

低效价红细胞抗体检测方法 ROC 曲线分析

李君^{1,2} 裴银辉^{1△} 侯金友² (1. 河北联合大学基础医学院,河北 唐山 063000;2. 开滦总医院)

摘要:目的 应用 ROC 评价 4 种低效价抗体的检测方法,通过正交设计优化低效价抗体检测条件。方法 分别用盐水法、聚凝胺法、木瓜酶法、微柱凝胶法对 216 例标本抗体筛查,绘制 ROC 曲线比较 4 种检测方法;设计正交试验,优化低效价抗体的检测条件,利用极差分析法寻找最佳检测条件组合。结果 盐水法、聚凝胺法、木瓜酶法、微柱凝胶法 ROC 曲线下面积分别为 0.56、0.93、0.90、0.96;正交试验显示,处理筛选细胞的试剂极差最大,为 8.0,微柱凝胶法检测低效价抗体评分最高水平分别为反应时间 30 min,筛查细胞浓度 2%,木瓜酶处理筛选细胞和筛选细胞所含抗原为纯合子。结论 微柱凝胶法诊断效率最高,优于其它 3 种检测方法;该法检测低效价抗体最佳检测条件组合为:反应时间 30 min,筛查细胞浓度 2%,木瓜酶处理筛选细胞和筛选细胞所含抗原为纯合子。

关键词:低效价抗体;ROC 曲线;正交试验

中图分类号:R457.1⁺1 文献标识码:A 文章编号:1004-549X(2015)12-1467-03

Evaluation of four methods on the detection of low titer antibody and optimization of testing conditions LI Jun^{*}, PEI Yinhui¹, HOU Jinyou². 1. School of Basic Medicine, 2. Tangshan 063000, China. Hebei United University. Corresponding author; PEI Yinhui

Abstract: Objective To evaluate the four methods on the detection of low titer antibody using ROC, and to optimize the testing conditions using orthogonal design. **Methods** Saline method, Polybrene method, Papaya enzyme method and micro-column gel method were performed respectively to detect 108 specimens with low titer antibody whose titer was less than or equal to 2 and also to detect another 108 negative cases. ROC curve was drawn to compare the four methods. Thereafter, an orthogonal experiment was designed to optimize the testing conditions, so as to obtain the best combination of testing conditions by range analysis. **Results** The areas under ROC curve of Saline method, Polybrene method, Papaya enzyme method, and micro-column gel method were 0.56, 0.93, 0.90, and 0.96, respectively. The scores under 15min, 30min, and 60min by orthogonal experiment with micro-column gel method were 18.0, 20.0, and 16.0, respectively. The scores under cell concentrations of 2%, 1%, and 0.5% were 22.0, 20.0, and 12.0, respectively. The scores of saline, low ionic strength salt solution, and papaya enzyme were 6.0, 18.0, and 30.0, respectively. The scores of antigens found on manufactured cell, homozygous cell, and heterozygous cell were 14.0, 22.0, and 18.0, respectively. The largest discrepancy was found in the reagents used to process cells for screening, which ranged up to a maximum of 8.0. **Conclusion** Micro-column gel method was the most efficient method and better than the other three methods. The best combination of testing conditions of micro-column gel method was the following: 30 min of reacting time, 2% cell concentration for screening, treatment with papaya enzyme, and selection of cells with homozygous antigens.

Key words: low titer antibody; ROC; orthogonal experiment

临床工作中,由于检测方法敏感度较低,导致低效价抗体漏检,而输入含相应抗原的红细胞可能引起迟发性溶血反应。因此,提高低效价抗体的检出率,对于输血安全非常重要。本研究利用 ROC 曲线比较不同检测方法对低效价抗体的诊断效率,并应用正交设计,优化低效价抗体的检测条件,为提高低效价抗体的检出率,预防输血反应和无效输血的发生,提供试验依据。

1 材料与方 法

1.1 标本 216 例标本取自开滦总医院住院患者,其中效价 ≤ 2 低效价抗体 IgG 类 95 例、IgM 类 13 例和阴性 EDTA-K₂

抗凝血液标本 108 例,上述标本均采用低效价抗体测定的标准方法抗球蛋白法检测。

1.2 试剂 聚凝胺试剂盒(珠海贝索生物技术有限公司);微柱凝胶卡、低离子强度盐溶液(长春博迅生物技术有限责任公司);抗体筛选细胞(长春博德生物技术有限责任公司);谱细胞(上海血液生物医药有限责任公司和荷兰 Sanquin);木瓜酶粉剂、PH5.5PBS 浓缩液 30 mL(10×)(上海血液生物医药有限责任公司)。

1.3 盐水法 取被检者 EDTA 抗凝血样,1 000 g 离心 3 min,分离被检者血清;取 3 支试管,标记为 1、2、3 号;分别向每支试管加入 2 滴血清和 1 滴 5% 筛检细胞,1 000 g 离心 10 s,对照筛选细胞反应格局判读结果,判定标准(表 1)。

1.4 聚凝胺法 取被检者 EDTA 抗凝血样,1 000 g 离心 3 min,分离被检者血清;取 3 支试管,标记为 1、2、3 号;分别向

每支试管加入 2 滴血清和 1 滴 5% 筛检细胞, 各加 LIM0. 65 mL, 混合均匀后, 再各加 Polybrene 溶液 2 滴, 并混合均匀; 用离心机 1 000 g 离心 10 s, 把上清液倒掉, 并使管底残留 0. 1 mL 液体; 加入 Resuspending 液 2 滴, 轻轻摇动试管混合并同时观察结果。判定标准(表 1)。

1.5 微柱凝胶卡式法 将试剂卡做好标记; 取被检者 EDTA 抗凝血样, 1 000 g 离心 3 min, 分离被检者血清; 用 Liss 溶液将筛检红细胞配成 0. 5% - 0. 8% 浓度, 分别加入标记好的微管中, 各 50 μ L; 分别立即加入被检者血清 50 μ L; 加样后的试剂卡, 置 37 $^{\circ}$ C 孵育器中孵育 15 min; 微柱凝胶卡专用离心机离心 5 min, 取出, 结果判读(表 1)。

1.6 木瓜酶法 用生理盐水将 pH5. 5 的 PBS 浓缩液稀释 10 倍后, 加入 1. 5 g 木瓜酶粉剂充分混合, 置 37 $^{\circ}$ C 1 h, 其中摇匀数次, 1 000 g 离心 5 min。取上清液分装, 冰冻保存; 在 1 份洗涤过的压积红细胞中加入 1 份木瓜酶溶液; 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 - 30 min; 用大量生理盐水将处理过的红细胞洗 3 次, 配成 2% - 5% 浓度盐水红细胞悬液; 取被检者 EDTA 抗凝血样, 1 000 g 离心 3 min, 分离被检者血清; 在标记好的试管内加入 2 滴血清; 混合, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min; 1 000 g 离心 10 s, 轻轻悬浮红细胞, 观察凝集反应, 判定标准(表 1)。

表 1 红细胞凝集反应的判定标准^[1]

评分	判定标准
4 +	12 一个大凝集块, 背景清晰, 无游离红细胞, 判定为强阳性
3 +	10 数个较大凝集块, 背景清晰, 几乎无游离红细胞, 判定为强阳性
2 +	8 很多中等大凝集块, 背景清晰, 游离红细胞少于 1/2, 判定为阳性
1 +	5 很多小凝集块, 背景不清晰, 游离红细胞占 1/2 以上, 判定为阳性
w +	2 肉眼观察呈“粗颗粒”样, 镜下可见细小凝集团, 判定为弱阳性
0	0 肉眼观察无凝集, 镜下红细胞呈游离状态, 判定为阴性

1.7 ROC 曲线对 4 种检测方法进行评价 将评分结果录入 excel 表格中, 应用 MedCalc 软件制作 ROC 工作曲线, 评价 4 种检测方法的检测效率。

1.8 正交设计选择最佳试验组合 根据上述结果, 选择微柱凝胶法对低效价抗体进行检测, 按照 $L_9(3^4)$ 表进行正交试验, 因素水平(表 2), 利用极差分析法分析试验结果。

表 2 低效价抗体检测条件因素水平

因素	反应时间 (min)	筛检细胞 浓度 (%)	筛检细胞 试剂	筛选细胞与 不规则抗体对应抗原
因素 1	15	2	生理盐水 (NS)	自制筛选细胞
因素 2	30	1	低离子强度盐溶液 (Liss)	纯合子
因素 3	60	0. 5	木瓜酶	杂合子

2 结果

2.1 ROC 曲线对 4 种检测方法比较 ROC 曲线显示, 微柱凝胶法 ROC 曲线最靠近左上角, 曲线下面积为 0. 96, 诊断效率最高, 优于其它 3 种方法。4 种检测方法敏感度和特异度结果(表 3), ROC 曲线对 4 种检测方法比较(图 1), 微柱凝胶法联合盐水法 ROC 分析(图 2)。

2.2 正交试验结果 处理筛选细胞试剂对检测结果影响最

大(极差最大); 微柱凝胶法最佳检测条件组合为反应时间 30 min、筛检细胞浓度为 2%、用木瓜酶处理筛检细胞、筛选细胞所含抗原为纯合子(表 4)。

表 3 4 种检测方法敏感度和特异度结果

	AUC 曲线下面积	敏感度 (%)	特异度 (%)
木瓜酶法	0. 90	87. 96	86. 11
聚凝胺法	0. 93	87. 96	99. 07
微柱凝胶法	0. 96	93. 50	100
盐水法	0. 56	12. 04	100
微柱凝胶法联合盐水法	0. 98	96. 30	100

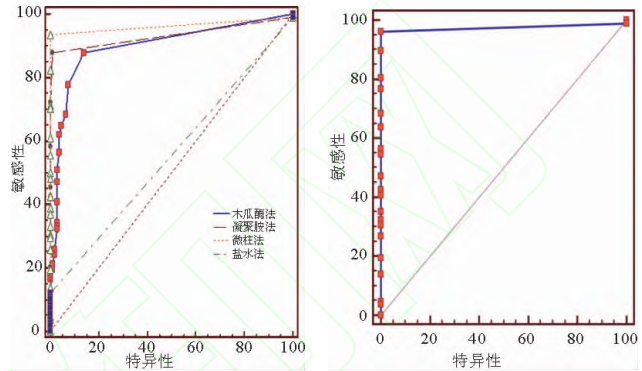


图 1 ROC 曲线对 4 种检测方法比较

图 2 微柱凝胶法联合盐水法 ROC 分析

表 4 $L_9(3^4)$ 正交试验

因素水平	反应时间 (min)	筛检细胞 浓度 (%)	处理筛检 细胞的试剂	筛选细胞与不规则 抗体对应抗原	效价 评分
1	15	2	NS	自制筛选细胞	2
2	15	1	Liss	纯合子	8
3	15	0. 5	酶	杂合子	8
4	30	2	Liss	杂合子	8
5	30	1	酶	自制筛选细胞	10
6	30	0. 5	NS	纯合子	2
7	60	2	酶	纯合子	12
8	60	1	NS	杂合子	2
9	60	0. 5	Liss	自制筛选细胞	2
T1	18. 0	22. 0	6. 0	14. 0	
T2	20. 0	20. 0	18. 0	22. 0	
T3	16. 0	12. 0	30. 0	18. 0	
极差 Rx	1. 4	3. 3	8. 0	2. 6	

3 讨论

自 1900 年 Landsteiner 发现了人类的 ABO 血型以来, 至今已经发现人类 35 个血型系统, 300 余种血型抗原。每种血型抗原都可作为免疫原, 致使受血者产生相应抗体, 引起同种免疫性输血反应。低效价抗体不易检出或交叉配血时不凝集, 但输血 2 - 21 d 后会发延迟性溶血反应。有报道, 由于低效价抗体在输血前试验中漏检而导致的输血无效占输血无效病例的 16. 57% [2]。随着临床用血量的逐年递增, 输血引起的潜在危险性不容忽视。

检测低效价抗体方法目前常用方法包括抗球蛋白法、盐水法、聚凝胺法、微柱凝胶法、酶法等。抗球蛋白法尽管为目前应用的标准方法, 但操作步骤繁琐, 费时费力。盐水法检出率低, 聚凝胺法受冷凝集素影响较大 [3], 酶法应用有一定的局限性 [4]。因此迫切需要一种检测效率高、操作简单的低效价抗体筛选方法应用于临床实际工作中, 提高低效价抗体

的检出率,降低输血反应和无效输血的发生。本研究首先利用 ROC 曲线对 4 种抗体检测方法进行评价。ROC 可将灵敏度和特异度联系起来,总体评价诊断的准确性,越靠近左上角的 ROC 曲线所代表的受试者工作越准确,亦可通过计算各个试验的 ROC 曲线下的面积(AUC)进行比较,检测方法的 AUC 越大,则其诊断价值越高。ROC 结果显示,盐水法、聚凝胺法、木瓜酶法、微柱凝胶法曲线下面积分别为 0.56、0.93、0.90、0.96,其中微柱凝胶法曲线下面积最大,因此,其诊断效率最高,优于其它 3 种方法。微柱凝胶法联合盐水法敏感度 96.3%,特异度 100%,能有效防止低效价抗体的漏检。

本研究利用 ROC 曲线得到低效价抗体检测的最佳方法—微柱凝胶法,然后应用正交设计,进一步优化微柱凝胶法的试验条件。影响微柱凝胶法的试验因素主要包括 4 个方面,因此,按照四因素三水平进行正交试验。正交试验结果表明:在各因素不同水平的结果中,反应时间 30 min 时试验结果之和最大,为 20.0;筛查细胞浓度 2% 试验结果之和最大,为 22.0;用木瓜酶处理筛查试验结果之和最大,为 30.0;筛选细胞所含抗原为纯合子试验结果之和最大,为 22.0。15 分钟的反应对于低效价抗体而言较短,抗原抗体还没有完全反应,导致所观察到的反应可能非常弱。孵育时间延长至 30 min,可使抗原抗体反应充分。微柱凝胶法推荐筛查细胞浓度为 0.5% - 0.8%,但抗原抗体反应出现的前带后带现象使凝集反应可能被抑制,合适的抗原抗体比例能够增强反应,结果表明筛查细胞浓度为 2% 抗原抗体反应最强。本研究采用的木瓜酶处理细胞的微柱凝胶法,操作需要的时间虽与经典的抗人球蛋白法相差不大,但反应效果好,而且结果易于判读。因此,低效价抗体筛查的最佳检测条件组合为反应时

间 30 min,筛查细胞浓度为 2%,木瓜酶处理筛选细胞和筛选细胞所含抗原为纯合子。此外,利用极差分析结果表明,微柱凝胶法四种因素中试剂处理筛查细胞是影响试验的主要因素。

美国《AABB 技术手册》指出,抗筛结果与方法的敏感性有关^[5],因此如何防止低效价抗体的漏检是一个需要我们攻克的难题。本研究将 ROC 曲线和正交试验设计联合应用于低效价抗体的检测。利用 ROC 曲线得到低效价抗体检测的最佳方法,应用正交试验设计进一步优化微柱凝胶法的检测条件,得到最佳检测条件组合。这将为提高临床实际工作中低效价抗体的检测率,降低输血风险提供有力试验依据。

参 考 文 献

- [1] 兰炯采, 负中桥, 陈静娴. 输血免疫血液学技术. 北京: 人民卫生出版社. 2011: 26-27.
- [2] 马红丽, 负中桥, 吕运来. 低效价低亲和力不规则抗体与红细胞输血无效关系探讨. 临床血液学杂志, 2012, 25(2): 101-102.
- [3] 毛娟, 吴大洲, 王满妮, 等. 凝聚胺漏检抗 Le^a 致溶血性输血反应 1 例. 中国输血杂志, 2013, 26(2): 178-179.
- [4] 孟庆宝, 张德梅, 负中桥. 红细胞凝集试验//兰炯采, 负中桥, 陈静娴. 输血免疫血液学技术. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 70-72.
- [5] 孟庆宝, 张德梅, 负中桥. 酶试验技术//兰炯采, 刘景汉, 马红丽. 输血前试验中值得研讨的若干问题. 中国输血杂志, 2013, 26(1): 1-2.

(2015-04-07 收稿, 10-15 修回)

本文编辑: 刘晓明

· 论 著 ·

B(A) 血型分子生物学鉴定及家系调查

——附 6 例报告

武文^{1#} 张业翠^{1#} 姜志坚² 张志波^{1△} 叶明亮^{1△} (1. 济南军区总医院 输血科, 山东 济南 250031; 2. 解放军 71761 部队)

摘要:目的 探讨稀有 B(A) 血型的遗传特性、鉴定方法及输血策略。方法 对 6 例 ABO 定型正反不符的标本, 采用试管法做血清学鉴定、流式细胞分析仪做表型鉴定、DNA 序列测定方法等做分子生物学鉴定及相关家系分析, 研究 B(A) 血型的遗传学特点, 并讨论 B(A) 血型献血者与受血者临床安全和合理用血。结果 血清学表现为 ABO 血型正反定型不一致, 正定型为 AB 型, 且 H 抗原明显增强, 反定型血清中存在抗-A1, 初定为 A_wB 型。测序表明: 第 7 外显子在 B101 序列的基础上, 出现了 B(A)O2 型 nt700C/G 的典型等位基因突变。结论 通过血清学及分子生物学方面的分析, 确定 6 例标本的基因型皆为 B(A)O2 型与 O01 型杂合, B(A) 血型患者应尽量配合性输注 O 型或 B 型洗涤红细胞及 AB 型血浆。

关键词: B(A) 血型; 基因突变; 流式细胞分析术

中图分类号: R457.1⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2015)12-1469-04

Molecular biological and genetic analysis of B(A) alleles

WU Wen¹, ZHANG Yecui¹, JIANG Zhijian², ZHANG Zhibol¹,

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2015.12.013

#并列第一作者, △共同通信作者: 张志波(1963.03-), 男, 副主任技师, 主要从事血液招募及血型参比研究, 电话: 0531-5166246, Email: zzb9063@sina.com; △共同通信作者: 叶明亮(1962.08-), 男, 主任医师, 主要从事血液管理学研究, 电话: 0531-51666968, E-mail: yml90yy@sina.com