

• 基础实验研究论著 •

单人份核酸检测在血液乙型肝炎病毒筛查中的应用

王 东, 于 原, 藏 亮, 邓雪莲

(辽宁省大连市血液中心检验科 116001)

摘要:目的 通过对血液标本的核酸和血清学的检测(NAT)结果进行比较分析,从而探讨核酸检测在血液病毒筛查中的作用。**方法** 对血液标本进行血清学和核酸检测。使用诺华诊断血液筛查系统对标本进行单人份核酸检测。如标本核酸检测为阳性,则需要对标本进行鉴别;鉴别结果为 HBV DNA 标本,采用电化学发光法进一步检测乙型肝炎血清标志物五项。**结果** 10 127 例血液标本中检测出 NAT(+) 标本 30 例,其中 NAT(+)、ELISA(−) 的标本 12 例,ELISA 漏检率为 1.18%,鉴别后有 6 例标本为 HBV DNA(+)、ELISA(−),乙型肝炎血清标志物五项为全阴性或抗-HBc(+),未检出 HIV RNA 或 HCV RNA;另有 7 例标本为 NAT(−)、ELISA 双试剂(+),其中 3 例为 HBsAg(+),4 例为抗-HCV(+). **结论** 核酸检测可以有效降低酶联免疫法漏检造成的输血风险,但其也存在漏检的情况,因此核酸检测和血清学检测相结合可作为血液筛查检测中的重要手段。

关键词:肝炎病毒,乙型; 核酸检测; 酶联免疫吸附测定; 电化学发光

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.07.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)07-0780-02

Application of identification nucleic acid testing for screening of hepatitis B virus in blood samples

Wang Dong, Yu Yuan, Zang Liang, Deng Xuelian

(Department of Clinical Laboratory, Blood Center of Dalian City, Dalian Liaoning 116001, China)

Abstract: Objective To discuss the application value of nucleic acid testing (NAT) for virus screening in blood samples. **Methods** Blood samples were detected by serology method and NAT. Novartis Procleix TIGRIS system was used for NAT. Positive samples were identified, hepatitis B virus(HBV) DNA positive samples were detected for five serum markers by using electrochemical luminescence test. **Results** A total of 10 127 blood samples were screened, among which 30 cases were NAT(+). 12 cases of samples were NAT(+), enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)(−), and the omission rate of ELISA was 1.18%. After identifying, 6 in 12 samples were HBV DNA(+) and ELISA(−), negative with the five serum markers or anti-HBc(+), without human immunodeficiency virus(HIV) RNA or hepatitis C virus(HCV) RNA. 7 in all of blood samples were NAT(−) and ELISA(+), including 3 samples of HBsAg(+) and 4 of anti-HCV(+). **Conclusion** NAT could effectively decrease the risk of blood transfusion caused by omission of ELISA, while with omission too. Therefore, combined application of NAT and serology detection could be essential for screening of transfusion-transmitted virus.

Key words: hepatitis B virus; nucleic acid testing; enzyme-linked immunosorbent assay; electrochemiluminescence

核酸检测(nucleic acid testing, NAT)是一种新的血液病毒筛查检测技术,它可以直接检测到病原体的核酸,其检测灵敏度高从而大大缩短检测“窗口期”,能够有效地降低经输血途径传播病毒的风险^[1-2]。很多发达国家和地区都在血清学检测基础上增加了核酸检测,进行血液筛查^[3]。我国现在已有多家采供血机构采用了核酸检测。

核酸检测的发展十分迅速,起初应用在单采血浆的检测,检验模式为多样本汇集核酸检测(MP-NAT),之后应用到血站的采供血机构,并且混样数量逐渐变小^[3]。目前诺华诊断的 Procleix TIGRIS System 已经实现了自动化的单人份核酸检测(ID-NAT)^[4]。该中心从 2011 年 5 月起,引进了诺华诊断的 Procleix TIGRIS System 血液筛查系统,对大连地区无偿献血者的血液标本进行核酸检测。本研究目的是通过对血液标本 NAT 和 ELISA 的检测结果进行比较分析,从而探讨 NAT 在血液病毒筛查中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2011 年 5 月 16 日至 8 月 24 日,采集了大连地区无偿献血者的血液标本 10 127 例,献血者均符合《献血者健康检查要求》。采用分别为 5 mL 的 EDTA-K₂ 真空采血管(上海科华)和 5 mL 的 EDTA-K₂ 分离胶真空采血管(美国 BD),其中不含分离胶的采血管用于 ELISA,而含有分离胶的用于 NAT。NAT 管采集后应在 4 h 内离心,各检测在标本采

集后 48 h 内完成,不能完成的-20 ℃密闭保存,7 d 内检测。

1.2 仪器与试剂 AT plus2&FAME24/20(瑞士);诺华 Procleix TIGRIS 核酸检测系统(美国 Novartis);罗氏 Cobas e411 电化学发光系统(美国 Roche);HBsAg ELISA(厦门新创和瑞士雅培);抗-HCV ELISA(厦门新创和美国雅培);抗-HIV ELISA(厦门新创);HIV Ag/Ab ELISA(法国伯乐);HIV-1 RNA、HCV RNA、HBV DNA 三联检试剂(Procleix Ultrio Assay);HIV-1 RNA 鉴别试剂(Procleix HIV-1 Discriminatory Probe Reagents);HCV RNA 鉴别试剂(Procleix HCV Discriminatory Probe Reagents);HBV DNA 鉴别试剂(Procleix HBV Discriminatory Probe Reagents);罗氏诊断电化学发光试剂;HBsAg 检测试剂(Elecys HBsAg);抗-HBs 检测试剂(Elecys Anti-HBs);抗-HBc 检测试剂(Elecys Anti-HBc);HBeAg 检测试剂(Elecys HBeAg);抗-HBe 检测试剂(Elecys Anti-HBe)。

1.3 方法 (1)ELISA 检测:将不含分离胶的采血管离心,使用 AT 加样仪自动加样,采用 FAME 进行全自动 ELISA 检测,两种试剂两次检测,按仪器和试剂盒的要求进行操作,计算机判定结果。(2)NAT 检测:诺华诊断检测系统采用 ID-NAT 模式。初次检测无反应性的标本为阴性;初次检测有反应性的标本进行两次复检,若两次检测均无反应性判为阴性,出现 1 个以上反应性判为阳性。初检和复检均使用三联检试剂(Pro-

cleix Ultrio Assay), 确定为阳性的标本还需要用鉴别试剂确定反应性的项目。(3)电化学发光检测: 对 HBV DNA(+) 标本采用电化学发光法测定乙型肝炎血清标志物五项(HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、抗-HBc)。

2 结 果

2.1 NAT 与 ELISA 同时检测的结果比较 10 127 例中共检测出 NAT 阳性标本 30 例, 其中 ELISA 阴性的标本 12 例, ELISA 漏检率为 1.18%。另外, 还发现有 7 例标本为 NAT 阴性, 但 ELISA 双试剂呈阳性, 其中 3 例为 HBsAg 阳性, 4 例为 HCV 阳性。见表 1。

表 1 NAT 与 ELISA 同时检测标本的结果比较

NAT 法	ELISA 法	标本数(%)
+	+/+ *	17(1.68)
+	+/— **	1(0.10)
+	—/—	12(1.18)
—	+/+	7(0.69)

*: 双试剂阳性; **: 单试剂阳性。

2.2 NAT 鉴别的结果 对 12 例 NAT(+)、ELISA(—) 标本进行鉴别, 其中 6 例标本鉴别为 HBV DNA(+), 3 例标本鉴别结果呈阴性, 还有 3 例标本量不足而无法鉴别。

2.3 HBV 五项检测结果 6 例鉴别为 HBV DNA(+)、HBsAg-ELISA(—) 标本, 采用电化学发光法检测结果, 见表 2。

表 2 6 例 HBV DNA 阳性、HBsAg-ELISA 阴性标本的乙型肝炎五项检测结果比较(IV/L)

标本条码	HBsAg	抗-HBs	HBeAg	抗-HBe	抗-HBc
* * 853	—	<2	—	+	+
* * 448	—	<2	—	—	+
* * 606	—	<2	—	—	—
* * 418	—	<2	—	—	—
* * 539	—	<2	—	—	—
* * 489	—	<2	—	—	—

3 讨 论

从 10 127 例标本的检测结果中发现 12 例 NAT(+)、ELISA(—) 的标本, 并鉴别出 6 例 HBV DNA(+) 标本, 未检出 HIV RNA 和 HCV RNA, 而剩余 6 例标本的鉴别, 仍需要以后对献血者追踪调查多次采样后才能得出具体的结论。本组未发现 ELISA 漏检 HIV RNA 或 HCV RNA 阳性的情况, 与其他的报道类似^[5-7]。本研究中出现的原因可能为: (1) 研究周期较短, 标本量不大, 不能够很准确的体现大连地区无偿献血者的病毒感染和风险评估情况。(2) 我国是一个乙型肝炎感染率较高的国家, HBV 的感染率明显高于 HIV 和 HCV。(3) HIV 和 HCV 为 RNA 病毒, 在标本采集与处理的过程中, RNA 相对于 DNA 更不稳定(尤其是 HCV RNA), 因此实验结果存在假阴性的可能。

6 例 HBV DNA(+) 标本中, 电化学发光结果中有 2 例标本仅抗-HBc 为阳性其余四项阴性, 应为隐匿性 HBV 感染(oc-

cult hepatitis B infection, OBI); 余下的 4 例标本 HBV 五项均阴性, 可能为血清学“窗口期”或 OBI, 应在今后定期对这 4 例献血者进行随访, 多次跟踪采样以确定 HBV 的感染状态。我国的 HBV 感染率和 OBI 人群比例都较高^[8]。OBI 在血清学表现为全阴或者只有抗-HBc 阳性, 这就会造成 HBsAg-ELISA 的漏检, 而 NAT 却能够及时地检出这些 OBI。

本研究数据显示, NAT 和 ELISA 都能够有效地检测出不合格标本, 检出率分别为 2.96% 和 2.37%。但它们各自也都在漏检的情况下: (1) 对于 NAT(+)、ELISA(—) 的情况, 上述已作阐述。(2) 对于 NAT(—)、ELISA(+) 的 7 例标本, 可能由于献血者血液中病毒载量很低, 且低于 NAT 的检出水平, 而机体的长期病毒感染导致血液中抗体或抗原滴度很高, 不影响 ELISA 的检出; 同时病毒的变异也是导致 NAT 检测漏检的重要原因^[9-10]。

本研究表明, NAT 能够有效缩短“窗口期”, 降低经输血途径传播病毒的风险, 但也存在漏检的情况。NAT 检测的是病毒核酸, ELISA 检测的是抗原或抗体, 两者在检测原理及方法上都存在差异, 因此这两个方法对血液标本的检测不是重复而是互补的, 这两者都应作为血液筛查检测中的重要环节^[11]。

参 考 文 献

- [1] Busch MP, Kleinman SH, Jackson B, et al. Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion transmitted infectious diseases[J]. Transfusion, 2000, 40(2): 143-159.
- [2] 刘强, 钱榕, 彭继红, 等. 病毒核酸检测在采供血机构血液筛查中的应用[J]. 实验与检验医学, 2010, 28(4): 375-382.
- [3] 王迅. 核酸检测技术(NAT)及其在血液筛查中的应用[J]. 中国输血杂志, 2004, 17(6): 465-468.
- [4] Angelo R, Margaritis A, Stewart M, et al. Comparison of two automated nucleic acid testing systems for simultaneous detection of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus RNA and hepatitis B virus DNA[J]. Transfusion, 2007, 47(10): 1783-1793.
- [5] 车嘉琳, 黄志森, 王德文, 等. COBAS S201 核酸检测系统在献血者血液筛查中的应用[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2010, 24(4): 311-313.
- [6] 刘尚林. 核酸检测方法在献血者肝炎筛查中的初步应用[J]. 中国热带医学, 2005, 5(5): 983-984.
- [7] Niwes N, Lakkana T, Satawat T, et al. Evaluation of a multiplex human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus and hepatitis B virus nucleic acid testing assay to detect viremic blood donors in northern Thailand[J]. Transfusion, 2007, 47(10): 1803-1808.
- [8] 陈长荣, 袁权, 葛胜祥, 等. 无偿献血者中隐匿性乙型肝炎病毒感染及表面抗原突变分析[J]. 病毒学报, 2009, 25(3): 178-184.
- [9] 李云, 夏正武, 瞿良. 乙型肝炎血清学标志物与 HBV DNA 的相关性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(4): 442-443.
- [10] 党民芳, 刑方. 149 例抗-HCV 和 HCV 核酸检测结果比较分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(7): 799-800.
- [11] 吴剑媚, 张庆武. 核酸检测技术在血液病毒筛查中的应用及风险评估[J]. 临床输血与检验, 2008, 10(1): 86-91.

(收稿日期: 2011-12-10)