

• 临床检验研究论著 •

病毒核酸检测在献血者保留中的应用

李新建

(河南省安阳市中心血站,河南安阳 455000)

摘要:目的 了解安阳地区献血人群中,乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)用酶联免疫吸附法(ELISA)检测的假阳性情况,对无偿献血人群的血标本进行 HBV 和 HCV 核酸检测(NAT)的可行性评估。方法 对无偿献血者血液样本 50 267 份开展 ELISA 检测,对乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)和抗丙型肝炎病毒抗体(抗-HCV)阳性标本开展实时荧光定量 PCR 检测,并对 ELISA 单试剂(+)NAT(-)献血者 6 个月后进行追踪检测。结果 两个项目两种 ELISA 试剂检测结果不相符率达 46.7%,ELISA 检测方法单试剂阳性者 PCR 呈阴性者 249 份,ELISA 检测方法双试剂阳性者 PCR 呈阴性者 103 份。HBV 项目单试剂阳性组与双试剂阳性组比较,差异有统计学意义($\chi^2=114.154, P<0.01$);HCV 项目单试剂阳性组与双试剂阳性组比较,差异有统计学意义($\chi^2=61.109, P<0.01$)。ELISA 单试剂(+)NAT(-)献血者有 91 名被追踪检测成功,其中 83 人检测结果为 ELISA(-)NAT(-)。结论 NAT 可有效的检测出无偿献血人群中 ELISA 检测方法呈阳性的阴性标本,应考虑在该地区无偿献血人群中进行 NAT,以便更好地保留献血者,提高固定献血者比例。

关键词:输血; 核酸类; 聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.10.013

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)10-1230-02

The application of nucleic acid testing in keeping blood donor

Li Xinjian

(Anyang Central Blood Station, Anyang, Henan 455000, China)

Abstract: **Objective** To find out the situation of Hepatitis B virus and Hepatitis C virus in Anyang city by analyzing false positive on ELISA method, and to assess blood samples of voluntary blood donors using detecting nucleic acid of HBV and HCV. **Methods** ELISA makes blood samples of 50 267 voluntary blood donors, and Real Time PCR tests positive specimens on HBsAg and antibody to HCV, and then blood donors whose results were single positive ELISA and negative NAT would be tracked after 6 months. **Results** The unmatched rate between two ELISA products in HBV and HCV tests was 46.7%. There were 249 specimens which showed positive in either of two ELISA tests but negative in PCR, and 103 samples that perform positive data in both ELISA products but negative PCR results. The χ^2 was 114.154 ($P<0.01$) between single and both positive HBV results, and this statistical item was 61.109 ($P<0.01$) in HCV comparison, 83 of 91 tracked men had ELISA(-)NAT(-) results. **Conclusion** Real Time PCR could distinguish effectively false positive ELISA results of voluntary blood donors. We should apply Real Time PCR to our volunteers for keeping current blood donors and improving regular ones.

Key words: blood transfusion; nucleic acids; polymerase chain reaction

核酸检测(NAT)是一种新兴的血液传染病检测方法,可检测因“窗口期”感染、免疫静默感染、病毒变异等原因而漏检的污染血液。因此,在许多发达国家和地区已普遍应用于献血者血液筛查^[1-2],我国也有多个血液中心进行了血液 NAT 的评估性研究工作^[3]。固定献血者是最安全的血液来源,也是稳定的血液供应的保障。在输血相关传染病的预防和控制日益受到重视,采供血机构质量保证工作已成为关注焦点的同时,血液供应紧张也已逐渐成为人们关注的话题,特别是近几年来,血液供应紧张呈现了从个别省市到多个省市的蔓延的态势,多个地市的供血紧张由季节性、阶段性向常态化发展。结合本站应用核酸检测技术情况,探讨如何保留献血者,提高固定献血者比例的方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本站于 2011 年 1~12 月 50 267 例自愿无偿献血者,体检合格,快速初筛合格后采血,从血袋中留取两管血液标本各约 5 mL 置试管 2~8 ℃ 保存,24 h 内分离血浆。

1.2 仪器与试剂 Microlab STAR & FAME(瑞士 Hamilton), Mx3000P 荧光定量 PCR 仪(美国 Agilent Stratagene);

酶联免疫吸附法(ELISA)方法乙型肝炎病毒(HBV)检测试剂购自珠海丽珠、上海科华;丙型肝炎病毒(HCV)检测试剂购自北京万泰、上海科华;NAT 检测试剂购自深圳达安,所有试剂均经批批检合格,且在有效期内使用。

1.3 方法

1.3.1 使用全自动加样仪和酶免分析仪对献血者进行乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)和抗丙型肝炎病毒抗体(抗-HCV)
ELISA 检测,初检及复检均严格按照规定及试剂说明书由不同人员采用双试剂同时进行检测,根据试剂使用说明书和室内质控规则判定结果。ELISA 检测阳性者则单独进行 NAT,按照 NAT 检测的要求分别在试剂制备区、标本制备区和扩增及产物分析区进行试验,严格执行各种防污染措施。每份标本均于制备后 24 h 内完成 HBV 或 HCV PCR 的荧光定量检测,严格按照试剂说明书完成样品制备、试剂准备、加样和 PCR 扩增等。PCR 反应程序:保温:50 ℃, 2 min;94 ℃, 3 min;变性:94 ℃, 10 s;退火:50 ℃, 10 s;延伸:65 ℃, 35 s。循环扩增 45 次。荧光检测设定在该程序后 40 个循环的 65 ℃ 进行,检测通道为 530 nm(FAM,检测对象应用)和 550 nm(HEX,内对照应用)。

1.3.2 ELISA 单试剂(+)NAT(-)献血者 6 个月后至血站抽取血液进行追踪检测,采集全血血样并分离血浆,分别进行 ELISA 双试剂检测和 NAT 检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 无偿献血者 ELISA 试剂检测结果 无偿献血者 50 267 份标本中,使用两个不同厂家 ELISA 试剂检测的 HBsAg 项目和抗-HCV 项目中均出现一阴一阳样本,即单试剂阳性标本,其中 HBsAg 项目两种试剂检测结果不相符率达 50.9%,抗-HCV 项目两种试剂检测结果不相符率达 41.3%,两个项目两种试剂检测结果不相符率达 46.7%,结果见表 1。

表 1 无偿献血者 ELISA 检测结果($n=50\ 267$)

指标	单试剂阳性	双试剂阳性	合计
HBsAg	182	175	357
抗-HCV	119	169	288
合计	301	344	645

2.2 ELISA 方法呈阳性的无偿献血者标本 NAT 检测结果比较 645 份 ELISA 方法呈阳性的标本,病毒 NAT 均有呈阴性者,出现 ELISA 检测结果与 NAT 检测结果不相符率 54.4%。其中,HBV 在 ELISA 单试剂呈阳性标本中有 84.1%的标本 NAT 检测呈阴性,HCV 在 ELISA 单试剂呈阴性标本中有 79.8%的标本 NAT 检测呈阴性,结果见表 2。

表 2 无偿献血者 ELISA 与 NAT 检测结果比较($n=645$)

指标	HBV		HCV	
	NAT-	NAT+	NAT-	NAT+
ELISA 单试剂阳性	153	29	95	24
ELISA 双试剂阳性	49	126*	54	115#
合计	248	53	103	241

*:HBV 项目观察组比较, $\chi^2=114.154,P<0.01$;#:HCV 项目观察组比较, $\chi^2=61.109,P<0.01$ 。

2.3 ELISA 单试剂(+)NAT(-)献血者的追踪检测情况 6 个月后,153 名 HBV 项目 ELISA 单试剂(+)NAT(-)献血者有 54 名被追踪检测成功,检测结果 ELISA(-)NAT(-)者 49 人;95 名 HCV 项目 ELISA 单试剂(+)NAT(-)献血者有 37 名被追踪检测成功,检测结果 ELISA(-)NAT(-)者 34 人。

3 讨 论

中华人民共和国国家标准 GB 18469-2001《全血及成分血质量要求》中规定,合格的血液必须 HBsAg 阴性、丙型肝炎病毒抗体(HCV-Ab)阴性,故检测同一项目的两种不同厂家 ELISA 试剂任意一种出现阳性结果都会导致血液的报废。由表 1 可见,使用两个不同厂家 ELISA 试剂检测的 HBsAg 项目和抗-HCV 项目中均出现一阴一阳样本,两个项目两种试剂检测结果不相符率达 46.7%,此种现象是由于 ELISA 试剂的假阳性问题造成,与国产试剂有较高假阳性率的报道一致^[4]。NAT 检测的灵敏度和特异度均高于 ELISA 检测,不仅可降低 HBV 和 HCV 的漏检率,提前检出时限,还可以检出 ELISA 试剂假阳性标本。从表 2 中可以看出,HBV 项目中 84.1%的 ELISA 单试剂阳性样本 NAT 检测呈阴性,HCV 项目中 79.8%的 ELISA 单试剂阳性样本 NAT 检测呈阴性;HBV 项

目中 28.0%的 ELISA 双试剂阳性样本 NAT 检测呈阴性,HCV 项目中 32.0%的 ELISA 双试剂阳性样本 NAT 检测呈阴性。NAT 检测从 ELISA 单试剂阳性样本中检出的阴性标本的比例明显高于 ELISA 双试剂阳性样本。

对于 HBsAg、抗-HCV、抗-TP、抗 HIV 呈阳性或可疑的献血者,国内采供血机构通常从保证血液制品质量角度出发,普遍采用永久屏蔽或淘汰的方式,很少对其进行随访和确证检测,即使抗-HIV 经疾病预防与控制中心(CDC)确证试验判为阴性也是永久屏蔽。从血液检测技术角度看,各项传染病标志物检测必然存在一定比例的假阳性结果。有报道称,在单一试剂呈阳性反应的标本中,抗-HCV、抗-TP、抗 HIV 确认试验多为阴性^[5],与本研究结果相一致。本研究结果显示,HBV 和 HCV 两项传染性指标均有两种 ELISA 试剂检测结果不符的情况,可能导致约 0.6%(301/50267)的献血者因假阳性被淘汰,目前国内采供血机构对于血液筛查呈阳性或可疑的献血者,基本上没有开展确证试验,假阳性(非特异度)不但导致血液制品报废率升高,对献血者造成一定的心理压力^[6-7],使采供血机构在按规定履行告知义务时感到十分困惑,使献血者对血站检测水平甚至对血站整体产生不信任感,更给献血者保留带来十分棘手的问题,更甚者导致固定献血者的流失,严重影响无偿献血事业的可持续发展。

固定献血者的比例已成为衡量一个国家和地区血液安全的指标之一,世界卫生组织 2004 年的资料显示,固定献血者的传染病指标流行率低于新献血者,我国的数据也说明了这一点^[8]。固定献血者是稳定的血液供应的保障,以往的调查显示,献过血的人对于相关法律法规和献血知识的知晓率明显高过未献过血的人,反复献血行为积极^[9],固定献血者对献血满意度和忠诚度都较高,与重复献血行为呈正相关^[10]。随着临床用量日益增多,我国采供血机构采血压力越来越大,提高献血者保留率和固定献血者比例是提高血液供应能力的有效路径之一。仅凭 ELISA 筛查实验呈阳性或可疑就采取永久屏蔽或淘汰献血者的弊端越发突显,确认假阳性献血者并保留其献血资格,关键是在现有的 HBV、HCV 标准检测方法的基础上,联合对献血者的血标本进行 NAT 检测,并在行业标准或相关规范中明确献血者血液筛查呈阳性的确认条件和所采取的确认方法。对于已经开展 NAT 检测的血站,应以 NAT 检测结果阳性作为淘汰献血者的标准,具体可参照《HIV-1 和 HCVNAT、血液处置和献血者屏蔽与归队指引》^[11-12],这样就可以最大限度地保留献血者。在尚未开展 NAT 检测的血站,要创造条件积极开展 NAT 检测,并按照以下原则来保留献血者:ELISA 检测单试剂阳性结果者可以只报废献血者此次捐献的血液,而保留献血者再次献血的资格;ELISA 检测双试剂阳性结果者不仅要报废献血者此次捐献的血液,也要淘汰该献血者并防止其以后再次献血。

参考文献

[1] Soldan K, Davison K, Dow B. Estimates of the frequency of HBV, HCV, and HIV infectious donations entering the blood supply in the United Kingdom, 1996 to 2003 [J]. Euro Surveill, 2005, 10 (2):17-19.

[2] Velati C, Fomiatti L, Baruffi L, et al. Impact of nucleic acid amplification technology (NAT) in Italy in the three years following implementation (2001-2003) [J]. Euro Surveill, 2005, 10 (2): 12-14.

[3] 任芙蓉. 核酸检测技术在国内外血液筛检中的(下转第 1233 页)

液组、中量腹腔积液组及大量腹腔积液组患者 CA125 水平进行统计分析,显示少量腹腔积液组 17 例患者血清 CA125 水平为(81. 21±68. 34) U/mL,中量腹腔积液组 16 例患者血清 CA125 水平为(152. 69±75. 86) U/mL,大量腹腔积液组 19 例患者血清 CA125 水平为(214. 57±121. 63) U/mL。将中量腹腔积液患者与少量腹腔积液患者血清 CA125 水平比较,二者比较差异有统计学意义($P<0. 01$);大量腹腔积液患者与中量腹腔积液患者血清 CA125 水平比较,二者比较差异有统计学意义($P<0. 01$)。血清 CA125 水平随着腹腔积液量的增大而增高,见表 3。

表 3 腹腔积液量与血清 CA125 水平的关系($\bar{x}\pm s$)		
腹腔积液量	<i>n</i>	血清 CA125(U/mL)
少量腹腔积液	17	81. 21±68. 34
中量腹腔积液	20	152. 69±75. 86*
大量腹腔积液	19	214. 57±121. 63△

* : $P<0. 01$,与少量腹腔积液比较;△ : $P<0. 01$,与中量腹腔积液比较。

3 讨 论

近年来,由于饮食不良习惯以及环境污染,我国消化道恶性肿瘤发病率呈上升趋势,目前是病死率较高的病种之一。提高消化道恶性肿瘤诊治水平,最大的延长消化道恶性肿瘤患者的存活时间,是临床努力的方向。因此对于病情的及时了解,采取更好的治疗方案,才能达到最佳的疗效。

CA125 是一种大分子糖蛋白,是糖类相关肿瘤抗原,其来源目前并不清楚,不仅可在卵巢上皮测出,还可在心包、胸膜及腹膜的间皮细胞中测出。CA125 作为卵巢癌的肿瘤标志物被临床广泛用于卵巢癌的诊断和预后,其诊治作用已经得到公认^[2]。但 CA125 并不是卵巢癌的特异度标志物,在其他一些恶性肿瘤疾病中也有可能增高。

据大量文献报道,多数消化道恶性肿瘤患者血清中 CA125 水平有不同程度升高^[3-6]。研究发现在肝癌、肠癌、胃癌及胰腺癌 4 种疾病中,血清 CA125 均明显增高。究其原因,可能是由于癌细胞的浸润,破坏了腹膜细胞间的连接和基底膜的阻挡作用,腹膜间皮细胞中的 CA125 大量进入到血液循环中,从而导致血清 CA125 水平明显上升。通过比较还发现,胰腺癌和肝癌 CA125 水平明显高于其他消化道恶性肿瘤,且有腹腔积液的患者比无腹腔积液的患者升高更加显著,表明随着肝功能损害的加重,腹腔积液的产生,特别是当门脉高压时,腹膜间皮组织淤血缺氧受损产生和释放的 CA125 增加,从而导

致腹腔积液及血清中 CA125 水平升高。同时,肝癌时肝功损害导致 CA125 的清除能力下降,也是血清 CA125 升高的可能原因。因此认为血清 CA125 水平能够反映肝癌患者肝功能损害程度,并且可能是提示腹腔积液产生、存在的一项敏感指标。

通过比较研究,发现消化道恶性肿瘤有腹腔积液患者 CA125 水平均明显高于无腹腔积液患者,且随着腹腔积液量越大,CA125 水平也越高。这可能是因为腹腔积液产生的压力使腹膜的间皮细胞增殖,间皮细胞合成的 CA125 呈高表达并通过腹膜进入血清,使血清中 CA125 随之增高^[2]。而腹腔积液量越大,产生的压力也越大,也可能如王英^[7]所报道与由于消化道肿瘤导致雌激素灭活障碍致使 CA125 增高。本研究显示 CA125 水平的变化与消化道恶性肿瘤患者腹腔积液量的变化呈正相关,其可以作为一项良好的腹腔积液标志物,在一定程度上通过监测 CA125 水平了解消化道恶性肿瘤患者腹腔积液量的多少。

综上所述,血清 CA125 水平可以作为提示消化道恶性肿瘤患者有无腹腔积液及腹腔积液消涨的指标。在患者治疗期间可通过检测血清 CA125 观察治疗效果。测定血清 CA125 有助于提示消化道恶性肿瘤腹腔积液的早期及定量诊断,监测 CA125 水平也可作为临床动态观察腹腔积液消长、疗效判断及复发监测的参考依据。

参考文献

[1] 何芳,王明友,杨少奇,等. 血清 CA125 浓度与腹水复发关系的探讨[J]. 宁夏医学杂志,2008,30(5):433-434.
[2] 黄俊娟,张法灿,张国,等. 血清 CA125 水平与肝硬化 Child-pugh 分级及腹水量的关系[J]. 中国临床新医学,2010,3(11):1068-1070.
[3] 杨忠明,丁显平. 多种肿瘤标志物联合检测在消化道恶性肿瘤诊断中的研究[J]. 现代预防医学,2009,36(11):2165-2167.
[4] 孙慧. TGF-α、CEA、CA199、CA125 联合检测消化道恶性肿瘤临床应用[J]. 中国现代药物应用,2010,4(14):43-45.
[5] 刘玲霞. 联合检测 CA125、CA19-9、CA72-4 对消化道肿瘤的诊断价值[J]. 实用医院临床杂志,2006,3(2):41-42.
[6] 郭德明. 联检消化道肿瘤患者血清及腹腔积液中 CEA、CA125、CA15-3 和 CA19-9 的诊断评价[J]. 放射免疫学杂志,2009,22(2):192.
[7] 王英. CA125 升高在肝硬化患者中的临床价值[J]. 四川医学,2012,33(2):322-323.

(收稿日期:2013-01-11)

(上接第 1231 页)

应用[J]. 北京医学,2008,30(8):561-564.
[4] 王迅,郑岚,张晰,等. 核酸扩增技术在上海血液筛选中的初步应用[J]. 中国输血杂志,2003,16(3):157- 160.
[5] 王伦善,吕蓉,盛琪琪,等. 梅毒抗体酶联免疫吸附试验 S/CO 比值与 TPPA 结果的相关性研究[J]. 中国输血杂志,2011,24(2):126-127.
[6] Gallarda JL,Dragon E. Blood screening by nucleic acid amplification technology: current issues, future challenges[J]. Mol Diag, 2000,5(1):11-12.
[7] Busch MP,Kleinman SH,J ackson B,et al. Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion2t ransmit ted infectious diseases[J]. Transfusion,2000,40(2):143.
[8] 刘彬伢,张春荣. 招募固定献血者降低输血风险[J]. 中国医药指

南,2012,10(10):373-374.
[9] 陈云光,刘西娥. 2 713 名重复献血者献血情况分析[J]. 柳州医学,2012,25(1):9-10.
[10] 熊恺轩,卢亮,鲍自谦,等. 深圳市固定献血者铁营养状况的调查[J]. 中国输血杂志,2008,21(11):883.
[11] 郭永健,姚凤兰,林授,等译. HIV-1 和 HCV 核酸检测、血液处置和献血者屏蔽与归队指引(上)[J]. 中国输血杂志,2011,24(1):79-84.
[12] 葛红卫,林授,汪德海,等译. HIV-1 和 HCV 核酸检测、血液处置和献血者屏蔽与归队指引(下)[J]. 中国输血杂志,2011,24(2):172-176.

(收稿日期:2013-01-18)