

TMA 技术检测 HCV-RNA 和 ELISA 法检测抗-HCV 的比较*

秦伟斐, 李小红, 田耘博, 黄霞, 李维, 廖红文[△]

(重庆市血液中心, 重庆 400015)

摘要:目的 通过比较 ELISA 法检测抗-HCV 和核酸检测技术(NAT)HCV-RNA 的结果,了解两种不同的检测技术在降低输血 HCV 感染风险中的作用和相关性。方法 采用 ELISA(两种不同厂家的试剂)对 47 004 份献血者血液的抗-HCV 进行检测,同时采用转录介导扩增(TMA)技术检测 HCV-RNA,统计两种方法的阳性结果并进行比较。结果 47 004 份无偿献血者标本中,ELISA 检测到的抗-HCV 阳性样本总数共 245 份,其中,试剂 1 检测结果阳性数 105 份,试剂 2 检测结果阳性数 196 份; NAT 检测 HCV-RNA 阳性结果为 12 份。结论 ELISA 和 NAT 检测结果存在不一致,二者互补能够进一步降低输血感染 HCV 的风险,保障血液安全。

关键词:转录介导扩增; 酶联免疫吸附测定; 肝炎病毒,丙型; 核酸检测; 血液安全

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.11.037

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)11-1426-03

酶联免疫吸附法(ELISA)检测抗-HCV 一直是采供血系统筛查献血者血液中丙型肝炎病毒(HCV)的主要手段,在我国广泛应用该技术进行献血者血液筛查的数十年间,输血风险得以大大降低,国外研究数据表明,HIV、HCV 的 ELISA 法漏检率均为几十万分之一^[1-3]。但 ELISA 检测抗-HCV 只是反映机体对 HCV 感染的免疫状态,只能间接提供 HCV 感染的依据,再加上抗原、抗体蛋白的变性、较长的“窗口期”等多种因素的存在,单纯抗原或抗体血清学检测已经不是最可靠的方法。而核酸检测技术(NAT)是直接检测病毒核酸,即 HCV-RNA,是反映 HCV 复制最直接、最可靠的指标。NAT 已被许多国家和地区应用于血液筛查,目前用于采供血系统 NAT 检测的主要包括两大技术,即聚合酶链反应(PCR)和转录介导扩增(TMA)技术,我国目前已将 NAT 血液筛查纳入新的输血技术操作规程^[4]。本中心对 47 004 份献血者血液样本应用 Procleix ULTRIO Assay 试剂,在 Procleix TIGRIS System 上采用 TMA 技术检测 HCV-RNA,同时进行 ELISA 检测,以评估核酸检测技术和 ELISA 技术在降低输血 HCV 感染风险、保障血液安全中的作用。

1 资料与方法

1.1 标本来源 本中心 2011 年部分无偿献血标本 47 004 份,每位献血者留取 5 mL 和 8 mL EDTA-K₂ 抗凝血各 1 管(无分离胶的用于 ELISA 检测,有分离胶的用于 NAT 检测),各样品管的离心和保存均按相应的检测试剂说明书要求进行操作。

1.2 仪器与试剂 RSP150 和 RSP200 型全自动样品处理机(瑞士帝肯);FAME24/20 和 FAME24/30 型全自动酶联免疫分析系统(瑞士哈米尔顿);PROCLEIX TIGRIS 核酸检测系统(美国诺华)。全自动蛋白印迹仪 ProfiBlot 48(瑞士帝肯)。酶联免疫试剂:抗-HCV(上海科华、美国强生)。核酸检测试剂:诺华乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒(1 型)核酸检测试剂盒(TMA-化学发光法),HCV 鉴别探针试剂。HCV 确证试剂:MP Diagnostics HCV BLOT 3.0(法国 MPD)。

1.3 检测流程 上述样本分别进行 ELISA 检测与 NAT 检测。对 ELISA 双试剂阳性且 NAT 检测阴性的样本,随机挑选

32 份样本进行 HCV 确证实验。

1.4 方法

1.4.1 血清学 ELISA 检测与判定规则 加样器自动加样后,用全自动酶免分析仪对抗-HCV 进行双试剂 2 次 ELISA 法检测,结果判定依据《中国输血技术操作规程》(血站部分,1997 版)规定的标准和试剂说明书。本实验室将 S/CO \geq 0.8 即判为有反应性,其中 1.0 $>$ S/CO \geq 0.8 之间设置为灰区。双试剂 S/CO 均大于或等于 0.8,直接判为阳性;单试剂有反应性标本采用原试剂对本管进行双孔复试,任一孔有反应性判为阳性。

1.4.2 NAT 检测与结果判断 采用转录介导扩增(TMA)检测技术进行 NAT 检测。标本于生物安全柜内开盖,置于样品架,按照全自动血液病毒核酸检测仪(Procleix ULTRIO System)的操作程序上样,进行单人份 NAT 检测。先用 ULTRIO 试剂在 TIGRIS 上做 HIV RNA、HCV RNA、HBV DNA 三联检测分析,对于 ULTRIO 有活性的标本,判为 NAT 联检阳性;再分别进行 Procleix HIV、HCV 和 HBV 鉴别试验(dHIV-1、dHCV 和 dHBV)。

1.4.3 确认实验检测与结果判断 将需要进行确证实验的样本,按 HCV 确认试剂 HCV BLOT 3.0 的操作说明书和全自动蛋白印迹仪 ProfiBlot 48 的操作程序进行实验操作。结果判断依据按试剂说明进行。

1.5 统计学处理 汇总 ELISA 阳性结果及 NAT 阳性结果,对两种技术的检测结果进行比较,采用 SPSS11.0 进行 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 47 004 份无偿献血者血液标本中 ELISA 抗-HCV 阳性结果共 245 份,不合格率为 0.52%;在这些阳性结果中,ELISA 试剂 1 检测结果阳性 105 份,不合格率为 0.22%;ELISA 试剂 2 检测结果阳性 196 份,不合格率为 0.42%;NAT 检测 HCV-RNA 阳性 12 份,HCV-RNA 不合格率 0.03%。两种 ELISA 试剂之间($\chi^2=27.600, P<0.05$),以及它们分别与 NAT 之间(ELISA 试剂 1 vs NAT, $\chi^2=74.015, P<0.05$; ELISA 试剂 2 vs NAT, $\chi^2=163.130, P<0.05$),阳性检出率差异均有统计学意义。

2.2 ELISA 检测试剂 1 与试剂 2 同时为阳性的样本数有 56 份, NAT 检测阳性的 12 份样本均包括在这 56 份样本中, 阳性率为 21.4%(12/56)。随机从 56 份中挑选了 32 份 HCV-RNA 为阴性的样本进行确认试验, 15 份抗-HCV 确认结果为阳性, 阳性率 46.9%(15/32)。

2.3 ELISA 检测与 NAT 检测的结果一致率 在所检测的 47 004 份样本中, ELISA 和 NAT 均为阴性的样本为 46 759 份, 均为阳性的为 12 份, ELISA 检测抗-HCV 与 NAT 检测 HCV-RNA 的一致率为 99.50%, 不一致率为 0.5%。

2.4 ELISA 检测阳性样本 S/CO 值与 NAT 检测结果的相关性 (1)ELISA 检测试剂 1 阳性样本 S/CO 值与 NAT 检测结果的相关性: 所有 13 份 NAT 联检阳性和 12 份鉴别为 HCV-RNA 的样本 $S/CO \geq 10$, 说明试剂 1 抗-HCV 检测的 S/CO 值越高, NAT 联检和鉴别阳性可能性越大(试剂 1 的 CO 值约为 0.170)。见表 1。(2)ELISA 检测试剂 2 阳性样本 S/CO 值与 NAT 检测结果的相关性: 13 例 NAT 联检阳性有 12 例(有 1 例 NAT 联检阳性样本 $1 \leq S/CO < 5$)和 12 例鉴别为 HCV-RNA 的样本 $5 \leq S/CO < 10$, 说明试剂 2 抗-HCV 检测的 S/CO 值越高, NAT 联检和鉴别阳性可能性越大(试剂 2 的 CO 值约为 0.330)。见表 2。

表 1 ELISA 检测试剂 1 阳性样本 S/CO 值与 NAT 检测结果的相关性(n)

S/CO	总数	联检阳性	鉴别阳性
$0.8 \leq S/CO < 1$	29	0	0
$1 \leq S/CO < 10$	62	0	0
$10 \leq S/CO$	14	13	12
合计	105	13	12

表 2 ELISA 检测试剂 2 阳性样本 S/CO 值与 NAT 检测结果的相关性(n)

S/CO	总数	联检阳性	鉴别阳性
$0.8 \leq S/CO < 1$	61	0	0
$1 \leq S/CO < 5$	113	1	0
$5 \leq S/CO < 10$	22	12	12
合计	196	13	12

3 讨论

本血液中心对献血者血液样本采取传统的 ELISA 法检测, 结果发现, 47 004 例血液样本中有 245 例抗-HCV 结果为阳性, 试剂 1 检测出 105 例阳性样本, 其中灰区 29 份, 试剂 2 检测出 196 份阳性样本, 其中灰区 61 份, 两种 ELISA 试剂结果为灰区的样本 NAT 检测均为阴性。从本实验数据中没有观察到酶免检测灰区结果与核酸检测阳性间存在明显的相关性。NAT 检测阳性的 13 例标本均处于 ELISA 试剂 1 的强阳性反应性组($S/CO \geq 10$), 13 例标本有 12 例处于 ELISA 试剂 2 的强阳性反应性组($10 > S/CO \geq 5$), 则 12 例鉴别为 HCV-RNA 阳性的样本均处于该组, 仅有 1 例处于试剂 2 的弱阳性反应组($5 > S/CO \geq 1$), 说明 NAT 检测阳性与 ELISA 检测结果强阳性有明显的相关性。

而 ELISA 检测抗-HCV 的总不合格率和核酸检测 HCV-RNA 阳性结果的符合率却较低, 提示抗-HCV 仅能部分反映

HCV 复制状态, 抗-HCV 滴度并不与 HCV RNA 平行或同步, 对于这种抗-HCV 阳性而 HCV RNA 阴性的情况, 可能有以下几种原因: (1)抗-HCV 检测假阳性。HCV 为单正链线状病毒, 基因组具有高度的多态性和变异性, 从而导致试剂盒的 HCV 基因重组抗原易发生交叉反应而产生假阳性。(2)HCV 感染后的病毒血症分为持续、一过和间隙 3 种时间模式^[5], 病毒可潜伏一段时间再复制, 从而使 HCV RNA 测定结果出现间隙阴性, 而抗-HCV 阳性则长期稳定; 或机体正处于疾病恢复期, 病毒很少复制, HCV RNA 不易检出, 而抗-HCV 持续存在。(3)HCV RNA 十分脆弱, 易被血细胞含有的 RNA 酶降解, 且 HCV RNA 易受进食的影响, 易与迅速增多的血中脂肪及脂蛋白结合, 导致检出率降低^[6]。

Procleix ULTRIO Assay/Procleix TIGRI System 能对标本进行单人份检测(ID-NAT), 灵敏度高^[7]; 与 ELISA 法筛检同时进行, 相比混样检测系统而言, 可有效缩短检测时间。本中心 47 004 例血液样本中有 245 例抗-HCV 阳性样本, 而抗-HCV 阴性样本中未发现 1 份核酸检测结果为阳性的标本, 不能据此认为 NAT 检测相对 ELISA 方法而言不能缩短“窗口期”, 这可能是由于我国 HCV 人群感染率较低, 本研究的献血者人群正好没有处于 HCV“窗口期”感染的献血者。NAT 检测不仅可检出窗口期 HCV 感染, 还能避免病毒变异、免疫沉默性感染等造成的漏检。在欧美等发达国家, NAT 已成为常规血液筛查技术^[8]。而 ELISA 检测技术作为国家规定的血液筛查方法, 在阻断输血相关传染性疾病的传播中发挥着重要作用, 尤其是两种试剂联合检测^[9-10]。本研究 ELISA 检测抗-HCV 结果为阳性的 245 份样本中, 仅有 12 份 HCV-RNA 检测为阳性, 笔者挑选了 32 份两种 ELISA 抗-HCV 均阳性且 HCV-RNA 为阴性的样本进行确认试验, 结果 15 例确认结果为阳性, 因此在献血者筛查过程中, 远不能认为 NAT 可以取代 ELISA, 作为惟一的 HCV 筛查手段。

本次研究结果显示, 抗-HCV 检测与 HCV-RNA 检测结果不一致, 在将来大规模献血者血液筛查中, ELISA 和 NAT 技术不能偏重任何一种技术而忽视另一种技术的作用, 只有将两种技术结合使用, 才能发挥各自的优势, 更好地保障血液质量。在献血者血液筛查过程中, NAT 不能替代常规的血清学 ELISA 检测, 两者在降低输血相关病毒感染风险中的作用可以互补。

参考文献

- [1] Velati C, Romano L, Fomiatti L, et al. Impact of nucleic acid testing for hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus on the safety of blood supply in Italy: a 6-year survey[J]. Transfusion, 2008, 48(10): 2205-2213.
- [2] Phikulsod S, Oota S, Tirawatnpong T, et al. One-year experience of nucleic acid technology testing for human immunodeficiency virus Type 1, hepatitis C virus And hepatitis B virus in Thai blood donations[J]. Transfusion, 2009, 49(6): 1126-1135.
- [3] Hourfar MK, Jork C, Schottstedt V, et al. Experience of German red cross blood services with nucleic acid testing: results of screening more than 30 million blood donations for human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus[J]. Transfusion, 2008, 48(8): 1558-1566.
- [4] 施欣, 孙莉, 高波, 等. 从新版血站技术操作规程看我国血站管理的发展[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(5): 508-512.
- [5] 赵继义, 刘雪梅, 郭薇媛, 等. RT 套式 PCR 检测血浆 HCV RNA

及与抗 HCV 检测的比较[J]. 微生物学杂志, 2001, 21(4): 37-38.

[6] 赵颖, 魏军, 王菊英, 丙型肝炎病毒核酸定量测定的临床价值[J]. 宁夏医学杂志, 2005, 27(4): 233-234.

[7] Assal A, Barlet V, Deschaseaux M, et al. Comparison of the analytical and operational performance of tow viral nucleic acid test blood screening systems: Procleix Tigris and cobas s201 [J]. Transfusion, 2009, 49(2): 289-300.

[8] 王迅. 核酸检测技术(NAT)及其在血液筛检中的应用[J]. 中国输血杂志, 2004, 17(6): 465-468.

[9] 熊和昇. 国产两种 HBsAg ELISA 诊断试剂在血液筛查中的应用[J]. 吉林医学, 2012, 33(7): 1398-1399.

[10] 沈萍, 黄林莎. 使用两种 ELISA 试剂检测无偿献血者抗-HCV 的结果分析[J]. 健康天地: 学术版, 2010, 4(9): 134.

(收稿日期: 2012-11-28)

• 检验仪器与试剂评价 •

UF-500i 尿液分析仪及 SE-9000i 血细胞分析仪在浆膜腔积液白细胞计数中的对比性研究*

付 强, 温旺荣, 李菊香, 陈凤平, 余广超, 刘菊珍
(暨南大学附属第一医院检验科, 广东广州 510600)

摘要:目的 研究 UF-500i 尿液分析仪及 SE-9000i 型血细胞分析仪在浆膜腔积液白细胞计数中的应用。方法 应用 UF-500i 尿液分析仪及 SE-9000i 型血细胞分析仪对浆膜腔进行白细胞计数检测, 并作统计学分析。结果 手工计数法、UF-500i 尿液分析仪及 SE-9000i 型血细胞分析仪检测法比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 Sysmex UF-500i 尿液分析仪用于浆膜腔积液标本的细胞计数, 简便、快速、重复性好, 可以替代显微镜计数法测定浆膜腔积液白细胞数、上皮细胞数和非肉眼血性标本的红细胞数, 而肉眼血性浆膜腔积液的红细胞计数不能用 UF-500i 尿沉渣分析仪检测。

关键词: 白细胞; 尿液分析仪; 血细胞分析仪; 浆膜腔积液

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.11.038

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)11-1428-02

浆膜腔积液白细胞计数是胸腹腔积液常规检查项目之一。目前, 临床通常采用手工方法, 常规的显微镜人工计数方法, 操作步骤复杂且费时, 影响因素较多, 造成结果可靠性和重复性低, 可比性较差。为了探求更简便、快捷、准确的检测方法, 本文通过对 72 例胸腹腔积液标本分析, 探讨 UF-500i 尿液分析仪及 SE-9000i 型血细胞分析仪在胸腹腔积液白细胞计数中的应用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 胸腹腔积液来自本院 2011 年 9~12 月呼吸科、胸心外科、肿瘤科、消化科、普外科 72 例首次住院患者胸腹腔积液标本, 年龄 3~90 岁, 平均 54.7 岁。标本以加盖的干燥管采集后送检, 2 h 内完成所有试验。

1.2 仪器与试剂 UF-500i 型全自动尿液分析仪及配套试剂, SE-9000i 型血细胞分析仪及配套试剂, Olympus 光学显微镜, 国产改良牛鲍氏计数板。

1.3 方法 将送检标本充分混匀, 每份标本分成 3 等份置于干燥管中, 分别进行手工法和尿沉渣、血细胞分析仪器测定, 手工法按照《全国临床检验操作规程》^[1] 显微镜下进行人工计数, 仪器法 1 份使用 UF-500i 尿液分析仪进行检测, 1 份使用 SE-9000i 型全自动血细胞分析仪进行检测。

1.4 统计学处理 对手工法和尿液分析仪测定法、手工法和血细胞分析仪测定法分别进行 *t* 检验, 应用 SPSS13.0 软件处理。

2 结 果

对于白细胞计数小于 $500 \times 10^6/L$ 的标本: UF-500i 尿液分析仪检测结果为 $(358 \pm 72.1) \times 10^6/L$, SE-9000i 型全自动血细胞分析仪检测结果为 $(370 \pm 72.5) \times 10^6/L$, 与人工计数结果

$[(368 \pm 71.9) \times 10^6/L]$ 比较, 均无统计学差异 ($P > 0.05$)。对于白细胞计数大于或等于 $500 \times 10^6/L$ 的标本: UF-500i 尿液分析仪检测结果为 $(2\ 472.00 \pm 359.45) \times 10^6/L$, 与人工计数结果 $[(2\ 728.91 \pm 836.19) \times 10^6/L]$ 比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 但 SE-9000i 型全自动血细胞分析仪检测结果为 $(4\ 818.18 \pm 788.79) \times 10^6/L$, 与人工计数结果比较有统计学差异 ($P < 0.01$)。

3 讨 论

浆膜腔积液中白细胞计数主要反映炎症反应中炎性细胞的渗出; 间皮细胞数主要反映浆膜因炎症刺激或受损使间皮细胞脱落; 细菌数主要反映有无细菌感染, 细菌数增高考虑有细菌感染的可能性。渗出性浆膜腔积液白细胞数、间皮细胞数、细菌数均明显高于漏出性浆膜腔积液。感染性浆膜腔积液是以炎性细胞的渗出为主, 间皮细胞脱落为辅, 细菌数较高与细菌感染有关^[2], 如化脓性浆膜腔积液。漏出性浆膜腔积液白细胞数、间皮细胞数、细菌数均低, 反映其炎性细胞的渗出少、组织细胞脱落少, 无细菌感染的可能, 如肝硬化腹腔积液、心源性胸腹腔积液等。

目前手工计数是胸腹腔积液白细胞计数的常规方法, 由于操作影响因素较多, 具有误差较大等缺点。因此, 应用仪器替代传统的手工计数法是临床检验工作面临的重要课题。本研究采用 UF-500i 尿液分析仪及血细胞分析仪对胸腹腔积液标本进行白细胞检测, 实验结果显示在不同白细胞总数下, 尿液分析仪对胸腹腔积液标本检测与手工计数法均无明显差异。仪器检测方法具有操作简便, 速度快, 结果可靠, 且可避免检验人员因手工操作感染疾病^[3]。自动化仪器操作取代手工计数操作是今后检验检测的发展趋势。尿沉渣分析仪对胸腹腔积

* 基金项目: 广东省医学科研基金资助项目(A2008341)。