

• 临床检验研究论著 •

核酸扩增技术在献血者血液筛查中的应用分析

巫贡晓, 赖福春, 施冬梅, 张伟芳, 吴蓉, 旷洁平

(珠海市中心血站血液检测部, 广东珠海 519000)

摘要:目的 探讨核酸扩增技术在献血者血液筛查中的应用价值。方法 采用 HBV/HCV/HIV 核酸检测试剂对血站常规 ELISA 筛查阴性的献血者标本进行 HBV DNA、HCV RNA 和 HIV-1 RNA 3 个项目的 8 人份汇集检测, 阳性汇集池再拆分检测。结果 33 714 份 ELISA 筛查阴性标本中, 检出 HBV DNA 阳性标本 5 例, 阳性检出率为 0.015%, 未检出 HCV RNA 阳性标本和 HIV-1 RNA 阳性标本。结论 核酸扩增技术应用于无偿献血者血液筛查, 有助于提高献血者的血液质量, 保证输血安全。

关键词:核酸扩增技术; 献血; 血液筛查; 窗口期; 输血安全

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.19.015

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)19-2530-02

Analysis of the nucleic acid amplification technique applied in the screening of donated blood

Wu Gongxiao, Lai Fuchun, Shi Dongmei, Zhang Weifang, Wu Rong, Kuang Jieping

(The Blood Testing Department of Zhuhai Centre Blood Bank, Zhuhai, Guangdong 519000, China)

Abstract: Objective To evaluate the practical application of the nucleic acid amplification techniques (NAT) to the screening of donated blood. **Methods** Negative samples by ELISA test were detected with HBV/HCV/HIV NAT reagent. Pools of 8 samples were used for NAT testing and those samples in initial positive reactive pools were further detected. **Results** Out of 33 714 ELISA negative samples, 5 HBV DNA positive and the positive rate was 0.015%; neither HCV RNA nor HIV-1 RNA positive samples was detected. **Conclusion** It is necessary to apply NAT to blood screening for blood safety.

Key words: nucleic acid amplification techniques; blood donation; blood screening; window period; blood transfusion safety

确保血液及血液制品的安全, 最大限度地降低输血相关传染病经血传播的危险, 是国内外采供血系统不断追求的目标。目前国内采供血机构对献血者的主要筛查模式仍是双试剂酶联免疫吸附试验(ELISA)检测经血传播传染病病毒的抗原或抗体, 虽然一定程度上控制了输血传播疾病的风险, 但由于 ELISA 方法的“窗口期”较长, 以及病毒变异、免疫静默感染等因素, 仍不可避免地存在漏检而威胁着临床输血的安全。核酸扩增技术(NAT)直接检测病毒核酸, 可大大缩短 ELISA 检测病毒的“窗口期”, 并能检出因病毒变异、免疫静默感染等因素造成漏检的血液, 其在方法学、生理病理意义上与 ELISA 有很大的不同, 几乎不受 ELISA 制约因素的影响, 与 ELISA 有很强的互补性^[1]。国外欧、美、日等发达国家和部分发展中国家已将 NAT 普遍应用于献血者常规血液筛查中, 国内近几年也越来越多采供血机构将 NAT 初步应用于献血者筛查并陆续作了报导。为了进一步保证输血安全, 提高血液质量, 我站于 2011 年 7 月开始在常规 ELISA 筛查无偿献血者标本 HBsAg、抗-HCV、抗-HIV 和梅毒螺旋体抗体之后, 应用 NAT 技术对 ELISA 筛查合格的标本进行 HBV DNA、HCV RNA、HIV-1 RNA 检测, 2011 年 7 月 1 日至 2012 年 12 月 31 日共检测 33 714 人份, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本站 2011 年 7 月 1 日至 2012 年 12 月 31 日采集的无偿献血者全血标本。ELISA 筛查标本和 NAT 筛查标本都用 5 mL EDTA 抗凝真空试管(广州阳普)留样, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清血浆用于实验。

1.2 试剂 乙型肝炎病毒表面抗原 ELISA 诊断试剂盒(上海科华, 批号 201101031 等; 珠海丽珠, 批号 2011010108 等)。丙

型肝炎病毒抗体 ELISA 诊断试剂盒(上海科华, 批号 201104011 等; 珠海丽珠, 批号 2011020208 等)。人类免疫缺陷病毒抗体 ELISA 诊断试剂盒(上海科华, 批号 201012021 等; 珠海丽珠, 批号 2010120908 等)。梅毒螺旋体抗体 ELISA 诊断试剂盒(上海科华, 批号 201101021 等; 珠海丽珠, 批号 2011010108 等)。乙型肝炎“两对半”检测试剂盒(美国雅培 i2000 化学发光免疫分析仪配套试剂)。HBV/HCV/HIV 荧光 PCR 核酸检测试剂盒(上海科华, 批号 20101210 等)。试剂均在有效期内使用。

1.3 仪器 Uranus AE 200 全自动酶免分析仪、Hamilton star 全自动核酸提取仪及 ABI7500 核酸扩增检测仪、美国雅培 i2000 化学发光免疫分析仪。

1.4 方法

1.4.1 ELISA 检测 用上海科华和珠海丽珠两个厂家试剂对无偿献血者标本进行抗-HIV、抗-HCV、HBsAg、梅毒螺旋体抗体 4 个项目的 ELISA 检测, 检出合格标本 33 714 份。

1.4.2 NAT 检测 对 ELISA 检测合格标本启动全自动汇集程序进行 8 人份(每份 180 μ L)血浆标本汇集, 再对汇集池(pool)标本按试剂说明书进行全自动核酸提取(磁珠分离技术原理), 然后分别进行 HBV DNA、HCV RNA 和 HIV-1 RNA 3 个项目的全自动核酸扩增, 结果自动判读。若汇集池某项目的检测结果为阴性, 则对应的 8 份标本结果判定为该 NAT 阴性; 若汇集池检测结果为某项目阳性, 则要将对应的 8 份标本拆分进行该项目单标本检测(单检), 单检结果阴性则判定该标本该项目 NAT 结果为阴性, 单检结果阳性则判定该标本该项目 NAT 结果为阳性。

1.4.3 质量控制 依靠试剂盒提供的阴、阳性对照和内标对

检测过程进行监控,只有在阴、阳性对照和内标的检测结果符合要求的情况下才认同检测结果的有效性。

1.4.4 追踪检测 将 HBV DNA 检测阳性的样本用化学发光法检测乙型肝炎“两对半”(HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、抗-HBc)。

2 结果

2.1 NAT 检测情况 33 714 份 ELISA 筛查阴性献血者标本检测出 HBV DNA 阳性标本 5 份,阳性检出率 0.015%;未检出 HCV-RNA、HIV-1 RNA 阳性标本。

2.2 HBV DNA 阳性标本的乙肝两对半检测结果 见表 1。

表 1 HBV DNA 阳性标本的血清学模式

序号	HBsAg	抗-HBs	HBeAg	抗-HBe	抗-HBc
1	-	-	-	-	+
2	-	+	+	-	+
3	-	+	-	-	-
4	-	-	-	+	+
5	-	-	-	+	+

3 讨论

33 714 份 ELISA 筛查阴性献血者标本中检测出 HBV DNA 阳性标本 5 份,阳性检出率为 0.015%,与深圳血液中心 1:5 009 的报道相近^[2]。5 例 HBsAg 阴性、HBV DNA 阳性的样本表现为 4 种血清学模式(见表 1),其中抗-HBc 阳性有 4 例,占 80%。1 号和 3 号献血员由于无法联系而没有进行追踪,对另外 3 例献血员于 3 个月后进行不定期追踪,追踪结果与原结果一致。追踪的 3 例献血员均未出现 HBsAg 阳转现象,因而推断都不是“窗口期”感染,而是隐匿型感染。本次研究未检出 HCV RNA 或 HIV-1 RNA 阳性标本,可能与标本数量不够大有关,且我国健康献血人群中,HCV 及 HIV 感染率远低于 HBV 感染率,相应地 NAT 单独阳性标本检出率也会相对较低。我国开展核酸检测的血站近两年的报道中,天津^[3]、大连^[4]等市未检出 HCV RNA、HIV-1 RNA 单独阳性标本,与本站的检测结果一致;江苏省血液中心在 115 373 份 ELISA 阴性标本中分别检出 HCV RNA、HIV-1 RNA 阳性标本各 1 例^[5];常州市在 51 991 份 ELISA 阴性标本中检出 HIV-1 RNA 阳性标本 1 例^[6];我国各地区检测情况不太一致,与标本检测数量、人群感染率和检测试剂等都有一定关系。而国外有文献报道在中欧国家 NAT 单独阳性标本中 HCV 的检出率为 1/60 万,HIV 为 1/180 万^[7];美国的检出率则是 HCV 1/26 万,HIV 为 1/329 万^[8]。HBV、HCV 和 HIV 窗口期分别是 56 d、70 d 和 22 d,窗口期感染的病毒倍增时间分别为 2.8 d、0.74 d 和 0.90 d^[9-10]。HCV 窗口期持续时间最长,期间 RNA 倍增时间短,拷贝数较高,在 HCV 感染后 2 周左右,病毒载量快速增加到一个非常高的水平,此后一直维持到血清抗-HCV 转阳,所以对于 HCV 感染实施核酸检测的效益最大;HIV 窗口期持续较短,献血人群中的感染率最低,检出率最低,但一旦因输血感染危害性最大,其核酸检测效益不可低估;HBV 在欧美国家流行率较低,感染窗口期 DNA 倍增时间相对较长,含量也低(30~300 IU/mL),核酸检测对缩短窗口期的效果不太明显,最初被认为采用核酸检测的检出效益不高,因此,欧美国家最初研发和开展血液核酸检测主要引入 HCV NAT 和 HIV NAT。但近几年来,HBV 隐匿型感染越来越受到各国输血工作者的关注,不同于“窗口期”漏检,HBV 隐匿型感染是一种 HBsAg 阴性、HBV DNA 低水平复制的慢

性无症状乙型肝炎病毒感染,广泛存在于普通人群当中,NAT 检测可以避免漏检,HBV 的 NAT 检测在发达国家开始受到重视^[11]。在 HBV 高流行国家(HBsAg>8%),HBsAg 阴性献血者中 HBV NAT 的检出率较高,如泰国 HBV NAT 检出 1/800(6/4 798,采用 Procleix Ultrio,单检)^[12],因此在 HBV 高流行国家,HBV NAT 可极大地降低输血传播 HBV 风险。目前,输血安全面临的主要风险之一就是被筛查病毒的“窗口期”,研究表明,NAT 能将 HBV、HCV、HIV 感染的平均窗口期缩短 25d(缩短 50%)、59 d(89%)和 11d(50%)^[13],虽然不能完全消除病毒感染窗口期,但病毒核酸转阳之前的血液传染性极低,所以还是可以有效预防经血传播的病毒性疾病^[14]。

在 HBV 暴露率高达 70%~90%的地区,献血员中有 7%~19%为隐匿型感染,而在 HBV 暴露率为 5%的西方国家,献血员的感染率为 0%~9%^[15]。我国是肝炎的高发区,人群中 HBsAg 携带率达 10.12%^[16],这种长期反复暴露是我国 HBV 隐匿型感染形成的基础,给临床用血安全带来极大的威胁。NAT 技术的引入可大大降低 HBV 隐匿型感染的漏检,从而进一步降低输血传播 HBV 的残余风险。

因此,为了提高血液的安全性,有必要在我国目前常规的 ELISA 法血液筛检体系中引进 NAT 检测来保障输血安全。2010 年我国在十几个省市的血液中心或血站启动了血液 NAT 筛查试点工作,在此基础上,2012 年新版《血站技术操作规程》对血液筛查的检测方法的应用有了新的要求,允许采供血机构采用 ELISA 和 NAT 各一遍的检测模式对血液进行检测。NAT 检测在我国的血液筛查中逐步推广开来,这将成为我国血液安全控制领域一次具有标志性意义的重大进步。

参考文献

[1] 曾劲峰,叶贤林,马兰,等.血筛用酶联免疫吸附试验与核酸检测互补性探讨和研究[J].国际检验医学杂志,2008,29(8):683-684.
 [2] 叶贤林,孙淑君,容莹,等.国产全自动血液病毒核酸筛查系统的建立和应用研究[J].中国感染控制杂志,2010,9(5):327-330.
 [3] 王霞,潘彤,李娜,等.天津市无偿献血者 HBV、HIV 和 HCV 核酸检测分析[J].中国输血杂志,2012,25(10):1008-1009.
 [4] 邓雪莲,安万新,梁晓华,等.大连市血液中心血清学检测与核酸检测并行的效果观察[J].中国输血杂志,2012,25(1):38-40.
 [5] 黄成垠,蒋呢真,朱绍汶,等.1 种血液核酸筛查系统的应用评价[J].中国输血杂志,2012,25(10):1010-1011.
 [6] 何亚琴,张建伟,杨爱龙,等.核酸检测技术在常州地区献血筛查中的应用[J].中国输血杂志,2011,24(7):560-562.
 [7] Roth WK,Weber M,Buhr S et al. Yield of HCV and HIV-1 NAT after screening of 3.6 million blood donations in central Europe [J]. Transfusion,2002,42 (7):862-868.
 [8] Stramer SL. US NAT Yield; where are we after 2 years[J]. Transfus Med,2002,12 (4):243-253.
 [9] Weusten JJ, van Drimmelen HA, Lelie PN. Mathematic modeling of the risk of HBV, HCV, and HIV transmission by window-phase donations not detected by NAT[J]. Transfusion, 2002, 42 (5):537-548.
 [10] Kleinman SH, Busch MP. Assessing the impact of HBV NAT on window period reduction and residual risk[J]. J Clin Virol,2006, 36(Suppl 1):S23-29.
 [11] Weber B, Muhlbacher A, Melchior W. Detection of an acute asymptomatic HBsAg negative hepatitis B virus infection in a blood donor by HBV DNA testing[J]. J Clin Virol,2005,32(1):67-70.
 [12] Nantachit N, Thaikruea L, Thongsawat S, et al. (下转第 2533 页)

表 2 PLT 计数与肿瘤转移的关系

组别	n	PLT ($\times 10^9/L$)	t	P	PLT 增多 [n(%)]	χ^2	P
未转移组	65	218.80 \pm 91.66	3.039	<0.05	12(18.5)	4.699	<0.05
转移组	40	280.15 \pm 113.41			15(37.5)		

2.5 FIB 水平和 PLT 计数单独及同时升高对肿瘤转移预测效率评价 见表 3。

表 3 FIB 水平和 PLT 计数单独及联合检测对肿瘤转移预测效率评价(%)

检测项目	敏感性	特异性	阳性预测者	阴性预测值	准确度
FIB	62.2	70.0	37.5	73.8	72.4
PLT	55.6	67.9	37.5	81.5	64.8
PLT+FIB	72.2	69.0	32.5	92.3	95.2

3 讨 论

本研究通过 105 例肺癌患者的回顾性研究发现肺癌患者 FIB 水平和 PLT 计数均高于健康对照组,肺癌组中有 42.9% (45/105) 的患者为高纤维蛋白原血症,25.7% (27/105) 的患者为血小板增多症。而且两指标在转移组显著高于未转移组,提示 FIB 水平和 PLT 计数的升高可能有利于肿瘤转移。

恶性肿瘤血小板增多的发生率为 30%~60%,尤其在肿瘤晚期此现象相当普遍^[8-9]。目前认为可能主要原因是恶性肿瘤细胞产生促血小板生成因子,类似促血小板生成素,刺激多能干细胞,促使巨核细胞集落刺激因子生成,形成巨核细胞集落,造成血小板生成增多。血小板增多程度与恶性肿瘤分期、转移存在一定的相关性。血小板增多在恶性肿瘤浸润转移中的作用机制主要有:(1)血小板与肿瘤细胞相互作用形成血小板-肿瘤细胞聚集体,血小板形成包膜将肿瘤细胞掩蔽起来后,肿瘤细胞就能逃避机体免疫系统的攻击;(2)血小板聚集导致内皮细胞收缩,有利于肿瘤向血管外移行;(3)血小板-肿瘤细胞聚集体在转移部位形成癌栓,分泌各种因子刺激肿瘤细胞分化、增殖、浸润生长^[10-11]。

纤维蛋白原是肝脏合成的一种大相对分子质量蛋白质。肿瘤患者纤维蛋白原增高的可能机制是肿瘤细胞进入血循环,与血管内皮细胞和血小板相互作用,激活血小板或释放细胞因子,诱导肝细胞合成并释放纤维蛋白原。纤维蛋白原可能通过以下的机制促进肿瘤转移,首先,纤维蛋白原的分子是一个二聚体,由二硫键连接,这一结构使 Fib 成为肿瘤细胞和宿主细胞之间的分子桥梁,肿瘤细胞高表达纤维蛋白原受体,如 $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ 整合素或 ICAM-1 分子,纤维蛋白原与内皮细胞上的受体结合,可以促进肿瘤细胞与靶器官内皮细胞的黏附。另外,由于血小板糖蛋白 II b 和 III a 形成的复合物是纤维蛋白原的受体,所以肿瘤细胞可以通过纤维蛋白原与血小板形成大的聚集体,肿瘤细胞被血小板和纤维蛋白原所包裹,逃脱人体免

疫系统的杀灭作用^[12]。

另外,本研究还发现在肺癌转移组 FIB 水平和 PLT 计数具有相关性,FIB 水平和 PLT 计数同时升高可以提高预测肿瘤转移的敏感性和准确度,提示了血小板和纤维蛋白原对肿瘤转移有协同作用。

随着对肿瘤细胞发生、发展、转移,以及血小板、纤维蛋白原与肿瘤相互作用机制研究的深入,抗血小板药物可能成为肿瘤综合治疗的手段之一,而功能性阻断纤维蛋白原也可能是控制转移的新的治疗策略。

参考文献

- [1] Aoe K, Hiraki A, Ueoka H, et al. Trombocytosis as a useful prognosis indicator in patients with lung cancer[J]. Respiration, 2004, 71(2):170-173.
- [2] 刘秀巧,王淑娟,吴振茹,等. 恶性肿瘤与高纤维蛋白原血症[J]. 中华肿瘤杂志, 2002, 24(1):51-52.
- [3] 闫雳. 血小板参数及血浆纤维蛋白原检测在恶性肿瘤疾病中的临床价值[J]. 安徽医学, 2012, 33(3):330-331.
- [4] Cakar B, karaoglanoglu M, Sayici Y, et al. The prognostic value of thrombocytosis in newly diagnosed lung cancer patients: a retrospective analysis [J]. J BUON, 2011, 16(4):677-681.
- [5] Lin MS, Huang JX, Zhu J, et al. Elevation of platelet count in patients with colorectal cancer predicts tendency to metastases and poor prognosis[J]. Hepatogastroenterology, 2012, 59(118):1687-1690.
- [6] Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, et al. Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells[J]. Blood, 2005, 105(1):178-185.
- [7] Camerer E, Qazi AA, Duong DN, et al. Platelets, protease-activated receptors and fibrinogen in hematogenous metastasis [J]. Blood, 2004, 104(3):397-401.
- [8] Qiu J, Yu Y, Fu Y, et al. Preoperative plasma fibrinogen, platelet count and prognosis in epithelial ovarian cancer [J]. J Obstet Gynaecol Res, 2012, 38(4):651-657.
- [9] Heras P, Hatzopoulos A, Kritikos N, et al. Platelet count and tumor progression in gastric cancer patients[J]. Scand J Gastroenterol, 2010, 45(7/8):1005-1006.
- [10] 张丽娟,胡长路. 恶性实体肿瘤与血小板增多的关系[J]. 临床输血与检验, 2010, 12(4):189-192.
- [11] 赵宝有,苏薇薇. 恶性肿瘤继发血小板增多症的探讨[J]. 吉林医学, 2011, 32(25):5279.
- [12] Lee JH, Ryu KW, Kim S, et al. Preoperative plasma fibrinogen level in gastric cancer patients correlate with extent of tumor [J]. Hepatogastroenterology, 2004, 51:1860-1863.

(收稿日期:2013-02-10)

(上接第 2531 页)

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.

- [13] 王迅,郑岚,张晰,等. 核酸扩增技术(NAT)在上海血液筛查中的初步应用[J]. 中国输血杂志, 2003, 16(3):157.
- [14] Mitsunaga S, Fujimura K, Matsumoto C, et al. High-throughput HBV DNA and HCV RNA detection system using a nucleic acid purification robot and real-time detection PCR: its application to

analysis of posttransfusion hepatitis [J]. Transfusion, 2002, 42(1):100-106.

- [15] Marrero JA, Lok AS. Occult hepatitis B virus infection in Patients with hepatocellular carcinoma: innocent bystander, cofactor, or culprit[J]. Gastroenterology, 2004, 126(1):347-350.
- [16] 胡兆平. 荧光定量 PCR 技术在血液筛查中的应用及可行性分析[J]. 临床输血与检验, 2002, 4(1):7-10.

(收稿日期:2013-02-20)