

• 调查报告 •

合肥地区无偿献血者核酸检测的应用研究

段友红¹,程卫芳^{1△},孟海萍²,马晶璟¹

(1. 安徽省血液中心检验科, 安徽合肥 230031; 2. 安徽省蚌埠医学院附属医院检验科, 安徽蚌埠 233003)

摘要:目的 探讨核酸检测(NAT)在血液筛查中的作用,为选择血液筛查策略提供科学依据。方法 该中心在 2012 年 1 月至 2013 年 4 月对 68 662 例无偿献血标本同步进行血清学和核酸检测; 29 例血清学阴性 HBV DNA 阳性样本进行乙型肝炎血清标志物测试; 部分抗 HIV 阳性样本送疾控中心做确认实验。结果 68 662 例标本中核酸单独阳性样本 120 例,输血残余风险为 0.175%; 乙型肝炎血清标志物检测,以 HBcAb 阳性模式居多; HIV 确认阳性 11 例,全部为核酸阳性标本。结论 核酸检测能够降低输血残余风险,保证输血安全。NAT 和血清学检测相互补充,不能替代,应选择适合的筛查策略。

关键词:核酸检测; 酶联免疫吸附测定; 血液筛查

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.13.033

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)13-1742-03

Application of nucleic acid test in voluntary blood donors in Hefei area

Duan Youhong¹, Cheng Weifang^{1△}, Meng Haiping², Ma Jingjing¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Anhui Provincial Blood Center, Hefei, Anhui 230031, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui, 233003, China)

Abstract: **Objective** To discuss the role of nucleic acid test(NAT) in blood screening to provide the scientific basis for the selection of blood screening strategies. **Methods** The serological detection and NAT were simultaneously performed on 68 662 specimens of voluntary blood donation from January 2012 to April 2013; 29 samples of HBV DNA positive with serological HBsAg negative were performed the serum HBV markers detection. Partial samples of anti-HIV antibody positive were sent to CDC for conducting the confirmation test. **Results** Among 68 662 samples, 120 cases of single NAT positive were detected out, the residual risk of blood transfusion was 0.175%. In the serum HBV markers detection, the mode of HBcAb was predominant. 11 cases of HIV positive were confirmed and all were the NAT positive samples. **Conclusion** NAT can reduce the residual risk of blood transfusion, ensure the safety of blood transfusion. NAT and the serological detection are mutual complementation and not replaced by each other. The suitable screening strategy should be selected.

Key words: nucleic acid test; enzyme-linked immunosorbent assay; blood screening

保障输血安全是全社会关注的焦点。过去,我国对献血者 HBV、HCV、HIV 的检测采用 2 个不同生产厂家的 ELISA 试剂检测。但 ELISA 技术对窗口期感染、隐匿性感染、病毒亚型及变异株等还存在一定的局限性,输血残余风险时有发生^[1]。随着欧美等发达国家全面展开无偿献血的病毒核酸检测(nucleic acid test, NAT),我国自 2010 年开始进行 NAT 的试点工作,本中心自 2011 年开始 NAT 的实施,现将 2012 年 1 月 1 日至 2013 年 4 月 30 日 NAT 结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2011 年 12 月 31 日至 2013 年 4 月 29 日合肥地区采集的无偿献血标本 68 662 例。每个献血者共采集 2 管标本,1 管 EDTA-K₂ 抗凝真空采血管用于 ELISA 初、复检,1 管 EDTA-K₂ 分离胶抗凝真空采血管(BD 公司)用于核酸检测及留样。

1.2 仪器 Procleix TIGRIS 核酸检测系统(诺华),ChiTaS BSS1200 达速自动化磁珠操作平台(浩源),ABI7500 荧光定量 PCR 仪,STAR 全自动加样仪(瑞士 HAMILTON 公司),FAME 全自动酶免分析仪(瑞士 HAMILTON 公司)。

1.3 试剂 (1) ELISA 试剂(北京万泰、法国伯乐及珠海丽珠、厦门新创产品)包括 HBsAg、抗-HCV 抗体、抗-HIV 抗体、HIV 抗原/抗体(批检合格且在有效期内使用);乙肝血清标志物检测试剂盒(北京万泰,批号 20120201)。(2)核酸检测试

剂:PCR-荧光法:HBV、HCV、HIV(1 型)核酸检测试剂(上海浩源公司,批号 MF20120203);TMA 化学发光法:HBV、HCV、HIV(1 型)核酸检测试剂(美国诺华公司,批号 593226、603009 等)。以下 2 种核酸检测试剂分别简称为“诺华”和“浩源”。

1.4 检测流程 NAT 标本于采集后第二天检测,若有反应性标本则于第三天拆分(浩源)或鉴别(诺华)。ELISA 检测标本则在送检后 72 h 内完成检测,若有反应性标本,则于次日双孔复查。具体依照仪器和试剂盒说明书要求操作。

1.5 判定规则 (1)依试剂盒说明书要求酶免检测设有灰区,复查结果任意一孔 S/CO 值大于灰区则判为不合格。(2)浩源核酸检测:采用 8 个标本混检模式,对有反应的混合标本进行拆分。拆分呈反应性的标本判为阳性。拆分无反应性的标本判为阴性。(3)诺华核酸检测:采用单个标本的检测模式,有反应性的标本即判为阳性,血液淘汰。判定为阳性的标本需进一步做鉴别实验以证实何种病毒感染。鉴别无反应性标本仍判为 NAT 阳性。

1.6 乙肝血清标志物检测 对 29 例血清学阴性 HBV DNA 阳性样本采用 ELISA 法测定乙肝血清标志物:HBsAg、HBsAb、HBcAg、HBcAb 和 HBAb。

1.7 HIV 确认实验 141 例抗-HIV 抗体阳性样本送疾控中心做确认实验。

1.8 质量控制 参加澳大利亚 CITC 和卫生部临检中心室内质评。均按主办方提供的说明书操作。

2 结果

2.1 68 662 例标本血清学检测和核酸检测结果 诺华、浩源 NAT 阳性率分别为 0.380% 和 0.644%, ELISA+ NAT+ 比率分别为 0.197% 和 0.518%, ELISA- NAT+ 比率分别为 0.183% 和 0.056%, 见表 1。

表 1 68 662 例标本血清学检测和核酸检测结果 (n)

项目	NAT 阳性		NAT 阴性		总计
	诺华	浩源	诺华	浩源	
HBsAg++	88	40	80	13	221
HBsAg+	4	1	176	54	235
抗 HCV 抗体++	14	10	29	15	68
抗 HCV 抗体+	0	0	144	130	274
抗 HIV 抗体++	9	2	0	0	11
抗 HIV 抗体+	0	0	89	41	130
阴性标本	107	13	57 687	9 916	67 723
总计	222	66	58 205	10 169	68 662

++:表示血清学双试剂阳性;+:表示血清学单试剂阳性。

2.2 两套系统初(联检、混检)检阳性样本复(鉴别、拆分)检情况 诺华 222 例联检阳性样本鉴别阳性 143 例,初、复检符合率为 64.414%,浩源 79 例混检阳性的反应池拆分阳性的有 66 例,初、复检符合率 83.544%,见表 2。

表 2 诺华 222 例联检阳性标本鉴别及浩源 79 例混检阳性的反应池拆分情况 (n)

项目	诺华联检阳性				浩源混检阳性			
	鉴别阳性			鉴别 阴性	拆分阳性			拆分 阴性
	HBV	HCV	HIV		HBV	HCV	HIV	
ELISA+NAT+	88	13	9	5	41	10	2	3
ELISA-NAT+	32	1	0	74	13	0	0	10
总计	120	14	9	79	54	10	2	13

ELISA+NAT+:表示血清标志物及核酸均为阳性;ELISA-NAT+:表示血清标志物为阴性而核酸为阳性。

2.3 乙型肝炎血清标志物检测情况 检测结果有 7 种模式,抗-HBC 抗体阳性的有 27 例,5 项全阴的有 3 例,见表 3。

表 3 29 例 HBsAg 血清学阴性 HBV DNA 阳性标本乙型肝炎血清标志物检测结果

模式	HBsAg	HBsAb	HBcAg	HBcAb	抗-HBC 抗体	标本数(n)
1	—	—	—	—	—	3
2	—	—	—	—	+	4
3	—	+	—	—	+	5
4	—	—	—	+	+	6
5	—	+	—	+	—	1
6	—	+	—	—	—	2
7	—	+	—	+	+	8

2.4 HIV 确认实验结果 确认 HIV 阳性 11 例,全部为血清

学双试剂及核酸同时阳性标本,具体见表 4。

表 4 141 例抗-HIV 抗体反应阳性标本确认实验结果 (n)

项目	NAT+	NAT-	
	ELISA++	ELISA++	ELISA+
确认阳性数	11	0	0
不确定数	0	0	15
阴性数	0	0	115

ELISA++:表示血清学双试剂阳性;ELISA+:表示血清学单试剂阳性。

2.5 室内质评结果 全部通过,合格率为 100%。

3 讨论

HBV、HCV、HIV 是目前最常见的通过输血传播的病毒,传统的 ELISA 检测方法容易受到操作、试剂、样本、设备等众多因素的影响^[2]。众所周知“窗口期”是血清学检测发生“漏检”风险的主要原因,而 NAT 能明显缩短“窗口期”^[3-5]。目前国际上两种最主要的血液 NAT 方法即是转录介导的扩增(transcription mediated amplification, TMA)技术及荧光 PCR 技术,诺华和浩源 2 种系统就是分别基于 TMA、荧光 PCR 的 NAT 平台。

本中心自 2012 年 1 月 1 日正式启动核酸检测,至 2012 年 4 月 30 日已完成 68 662 例标本的核酸检测。其中 120 例 ELISA-NAT+ 的标本,输血残余风险比率是 0.175%,低于张妍等^[6]报道的 0.22%,高于方昌志等^[7]报道的 0.066%。其中 HBV DNA 检出 45 例,检出率 0.066%,略低于刘强^[8]报道的 0.17%,高于赵俊鹏等^[9]报道的 0.05%。我国是乙肝高发区,每年新发病例约 50 万,约 1.2 亿人携带 HBV,不同省市感染状况不一^[10]。29 例血清标志物阴性 HBV DNA 阳性标本的血清标志物检测结果符合献血者隐匿性 HBV 感染的界定,但模式 1(血清学指标全阴)有 3 例,不排除“窗口期”感染。因此隐匿性感染是输血残余风险的重要原因。隐匿性 HBV 感染可能与下列因素有关:HBV S 区及前 S 区变异基因变异,会影响 HBV 蛋白质表达而导致 HBsAg 阴性;HBV 低水平复制,抗原表达量低;HBV DNA 的整合导致 DNA 序列重排,进而影响 HBsAg 抗原性;受其他病毒感染^[11-13]。

核酸检测总阳性率以及 ELISA+NAT+ 比率浩源要高于诺华,但因为浩源检测标本量低,检测时间短,2 种核酸的检测不同步,因此并不能证实浩源的灵敏度要高于诺华。ELISA-NAT+ 比率诺华(0.183%)要高于浩源(0.056%),除去前述原因,可能与 2 种系统检测方法不同有关,诺华联检阳性即判为阳性,不论鉴别结果如何;而浩源混检阳性未拆分出的则判为阴性。因此,浩源初检阶段产生的假阳性标本可能在复检阶段就排除,而诺华即使鉴别为阴性而该假阳性标本也已判为阳性。

诺华初、复检符合率为 64.414%,浩源初、复检符合率为 83.544%,这种差异可能跟两套系统的检测模式不同有关。诺华的联检、鉴别试剂的灵敏度接近;而浩源的拆分因标本取样量大于混检,灵敏度远远超过混检。实际工作中笔者也多次发现 HBsAg++ 标本混检阴性,再次单独拆分却阳性,这表明混检有漏检。但也不排除诺华单检有假阳性,因为笔者也发现一些联检阳性样本无法重复,可能是因为病毒载量低^[14-15],也可能是假阳性。

此次研究在 120 例核酸单独阳性标本中检出 1 例

(0.001%)HCV RNA 阳性,没有检测到 HIV RNA 阳性。据报道,国内几大血液中心联合实验研究显示 HCV 的残余风险为0.003%^[16]。可见开展 NAT 后,HCV 的输血残余风险已经很低。本次研究结果偏低,可能与样本量不够有关。

141 例抗-HIV 抗体反应阳性样本确认实验结果显示 11 例确认结果全部是血清学双试剂阳性标本,这证明了抗-HIV 血清学双试剂检测的有效。新版《血站技术操作规程》中规定可以采用一种 ELISA+试剂一遍核酸检测的模式,单从 HIV 来看可以满足检测安全需要。而 221 例 HBsAg++核酸阳性只有 126 例(57.014%),68 例抗-HCV 抗体++核酸阳性只有 23 例(33.824%),ELISA 单试剂阳性和核酸检测符合度更低。而相当一部分 ELISA++NAT-标本的存在也说明 NAT 不能取代血清学检测。室间质评结果全部合格,显示本实验室 NAT 结果可靠。

综上所述,NAT 能缩短窗口期,检测隐匿性病毒感染,提高输血安全。ELISA 和 NAT 互为补充,不可相互替代,血液中心要从自身情况出发,选择合适的筛查策略。未来随着 NAT 的不断推广,血液安全一定会进一步提高。

参考文献

[1] Allain JP. Occult hepatitis B virus infection; implications in transfusion[J]. Vox Sanguinis, 2009, 86(2): 83-91.

[2] 曾劲峰,郑欣,许晓绚,等. ELISA 检测与 NAT 检测在血液筛查应用中的互补性研究[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(10): 1012-1014.

[3] Bush MP, Glynn SA, Stramer SL, et al. A new strategy for estimating risks of transfusion-transmitted viral infections based on rates of detection of recently infected donors[J]. Transfusion, 2005, 45(2): 254-264.

[4] Candotti D, Allain JP. Transfusion-transmitted hepatitis B virus

infection[J]. J Hepatol, 2009, 51(4): 798-809.

[5] 蒋昵真,黄成垠,肖建宇,等. 献血者 HBV、HCV、HIV 的单人份核酸检测[J]. 临床输血与检验, 2010, 12(3): 208-211.

[6] 张妍,朱海峰,孙波,等. 核酸检测技术在血液筛查中的应用及分析[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(12): 1298-1300.

[7] 方昌志,傅颖媛,钱榕,等. HBsAg 阴性献血者输血 HBV 感染残余风险分析[J]. 南昌大学学报:医学版, 2012, 52(1): 35-37.

[8] 刘强. 血液筛查中隐匿性乙型肝炎病毒的核酸检测初步研究[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(10): 1015-1016.

[9] 陈善昌,胡静云,龙丽娜,等. 1 000 例 HBsAg 阴性体检人群 HBV DNA 检测分析[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(2): 140-141.

[10] 庄辉. 乙型肝炎流行病学研究进展[J]. 中国医学前沿杂志, 2009, 2(1): 18-24.

[11] 赵俊鹏,田喜凤,贾幼珍,等. 血液病毒核酸检测与酶联免疫检测的比较研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2011, 10(6): 732-735.

[12] Vaezjalali M, Rashidpour S, Rezaee H, et al. Hepatitis B viral DNA among HBs antigen negative healthy blood donors[J]. Hepatitis Monthly, 2013, 3(13): e6590.

[13] Allain JP, Cox L. Challenges in hepatitis B detection among blood donors[J]. Cur Opin Hematol, 2011, 18(6): 461-466.

[14] 姚凤兰,任芙蓉. 超离心浓缩对提高血液 NAT 筛查不确定标本鉴别率的临床研究[J]. 北京医学, 2009, 31(2): 245-247.

[15] 曾劲峰,郑欣,许晓绚. ELISA 检测与 NAT 检测在血液筛查应用中的互补性研究[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(10): 1012-1014.

[16] Shan H, Ren FR, Zhao HY, et al. A multi-Chinese blood center study testing serologic-negative donor samples for hepatitis C virus and human immunodeficiency virus with nucleic acid testing[J]. Transfusion, 2007, 47(11): 2011-2016.

(收稿日期:2014-01-12)

(上接第 1741 页)

人群 AIDS 预防知识知晓率低。因此,在医院里宣传国家免费自愿咨询检测等“四免一关怀”政策,促使有过危险性行为的人及时主动进行检测,及时发现 HIV 感染者,避免在医院内传播。医务人员在检验中要加强职业暴露防护培训,正确掌握防护技术,遵守普遍性防护原则,严格做好个人安全防护,恪守生物安全操作规程^[15]。建立职业暴露发生后的紧急处理措施,最大程度地减少职业暴露的发生。

参考文献

[1] 区文华,苏锡康,戴伟良,等. 2006~2009 年佛山市某综合医院住院患者 HIV 抗体检测情况分析[J]. 预防医学论坛, 2011, 17(2): 152-153.

[2] 谭兵,詹廷西,李青,等. 综合医院住院患者 HIV 抗体血清学检测结果分析[J]. 中国艾滋病性病, 2011, 17(4): 416-418.

[3] 唐友芬,李俊如,李建,等. 某医院 HIV 感染检出状况分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(12): 1375-1376.

[4] 赖英映,朱建良,俞华,等. 101 532 名献血者抗-HIV 检测结果分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(11): 1534-1536.

[5] 杨景春,郁玲,袁春鸽. 新疆和田地区献血人群人类免疫缺陷病毒感染现状与对策[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(16): 2433-2435.

[6] 王芳,栾燕,刘显智. 沈阳市近 8 年来无偿献血人群 HIV 感染现状分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(8): 1996-1998.

[7] 朱丰秀,吴中发,刘素华,等. 赣州市 569 份 HIV 抗体初筛阳性标本复检与确证结果分析[J]中国皮肤性病学杂志, 2011, 25(6): 454-456.

[8] 蔡明翠,赵世能,罗传杰,等. 通过加强安全输血措施有效遏制艾滋病的传播[J]. 临床血液学杂志, 2010, 24(2): 90-92.

[9] 梁彩云,韩志刚,陈绮珊,等. 103 例检测第四代酶联免疫试验阳性而蛋白印迹试验阴性标本的分析[J]. 中国艾滋病性病, 2011, 17(1): 19-21.

[10] 白玉,梁庆香,黄宝杨. 柳州市 1999~2010 年 50 岁以上人群艾滋病流行特点分析[J]. 热带医学杂志, 2012, 12(6): 761-763.

[11] 郭占景. 1989~2009 年河北省艾滋病流行病学资料分析[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2010, 24(8): 737-738.

[12] 邓文青,姚恩龙,吴湘云,等. 772 例 50 岁及以上老年人 HIV-1 抗体阳性样本特征分析[J]. 中国艾滋病性病, 2012, 18(5): 280-282.

[13] 彭玉高,李承文,龙向东,等. 云南部分地区中老年男性艾滋病防治知识的调查[J]. 中国老年学杂志, 2010, 7(20): 2043-2044.

[14] 王福春. 我国艾滋病流行情况与防治对策[J]. 职业与健康, 2011, 27(21): 2494-2496.

[15] 黎锋,刘伟,杨秋玲. 广西 HIV 职业暴露风险性初探[J]. 应用预防医学, 2010, 16(2): 249-250.

(收稿日期:2013-12-28)