

· 论 著 ·

# 郑州市无偿献血者核酸检测的应用及分析

李俊英, 葛文超, 王艺芳, 方建华<sup>△</sup>

(河南省红十字血液中心检验科, 河南郑州 450053)

**摘要:**目的 通过对郑州地区献血者进行酶免筛查后再实施核酸检测(NAT),探讨增加 NAT 在临床输血中的必要性及可行性。方法 采用罗氏全自动核酸筛查系统和上海科华全自动核酸筛查系统检测 HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA,样本混合分别采用 6 人份×166.7 μL 及 8 人份×180 μL 汇集(称为 1 个 pool),如果混检阴性,则直接出具结果;如混检阳性,再进行二次拆分检测,以拆分结果报告最终结果。结果 罗氏系统共检测 ELISA 阴性标本 115 227 份,其中混检阳性 pool 130 个,经拆分 80 个 pool 为反应性,反应性标本 86 例,拆分率为 61.5%,标本阳性率 0.75%;科华系统共检 90 359 份 ELISA 阴性标本,混检阳性 pool 93 个,经拆分 31 个 pool 为反应性,反应性标本 31 例,pool 拆分率 33.3%,标本阳性率为 0.34%。二者总计共检标本 205 586 份,反应性标本 117 例,标本阳性率 0.57%,其中 1 例为 HIV“窗口期”感染。结论 核酸检测可以有效降低酶免漏检造成的输血风险,进一步保障输血安全。

**关键词:**核酸检测; 酶联免疫吸附法; 窗口期

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.04.032

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)04-0508-03

## The application and analysis of nucleic acid detection in Zhengzhou voluntary blood donors

Li Junying, Ge Wenchao, Wang Yifang, Fang Jianhua<sup>△</sup>

(Department of Clinical Laboratory, Henan Province Red Cross Blood center, Zhengzhou, Henan 450053, China)

**Abstract: Objective** To discuss the necessity and feasibility of nucleic acid test(NAT) in clinical blood transfusion by the implementation of the nucleic acid testing after the ELISA screening of Zhengzhou blood donors. **Methods** HBV DNA, HCV RNA, HIV RNA were detected by Roche Cobas S201 system and Shanghai kehua screening system, the samples were mixed by 6×166.7 μL and 8×180 μL(as one pool)separately. If the mix pool was negative, the result can be issued directly; if the pool was positive, than secondary single sample dectection must be taken and the secondary report was the final result. **Results** A total of 115 227 blood samples were screened by Roche Cobas S201 system and 130 mix pools were positive, among which 80 pools were reactive by secondary split testing, and the reactive samples were 86, the split ratio was 61.5%, The positive ratio of specimens was 0.75%. 90 359 samples were screened by kehua system, and the mixed pools were 93, among which 31 pools were reactive by secondary split testing, and the reactive samples were 31, the split ratio was 33.4%, The positive ratio of specimens was 0.34%. So the total number screened by the two systems was 205 586, among which 117 cases were reactive, the total positive ratio of specimens was 0.57%. And one case was HIV window phase infection. **Conclusion** NAT could effectively decrease the risk of blood transfusion caused by omission of ELISA and ensure the safety of blood transfusion.

**Key words:** nucleic acid testing; enzyme-linked immunosorbent assay; window phase

输血作为一种重要的治疗手段,可以救治无数患者的生命,但同时也会因为输血不安全而对患者造成严重的危害,因此输血安全已经成为全球关注的医学焦点问题<sup>[1]</sup>。目前国内大多数血站主要采用 2 种不同厂家的酶免试剂对献血者的血液标本进行 HBsAg、抗-HCV 和 HIV 抗原及抗体的检测,通过 ELISA 的检测,在一定程度上极大降低了输血疾病的发生率。然而由于病毒感染的窗口期、病毒变异以及免疫沉默等现象的存在,病毒阳性献血者的漏检依然存在,输血仍有一定的传播病毒的风险<sup>[2]</sup>。核酸检测作为一种新型检测方法,直接检测病原体核酸,在病毒感染后数天即能检出标本中极微量的核酸,可大大缩短“窗口期”。研究表明,开展核酸检测可将 HBV、HCV 和 HIV 的检测“窗口期”,分别由原来的 50、72、22 d 缩短到 25、59、11 d<sup>[3]</sup>。此外,核酸还可以检出因病毒变异、免疫沉默感染、乙肝隐匿性感染及人工操作错误等造成的漏检。本研究对 ELISA 检测阴性的标本进行了核酸检测,现将结果报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 2012 年 9 月至 2014 年 3 月,郑州市无偿献血

者经 2 次酶免检测均无反应性的标本 205 586 份。所有献血者均符合 GB18467《献血者健康检查要求》的规定<sup>[4]</sup>。献血者采血结束后立即用 2 支采血管留取血液标本:1 支抗凝真空管(5 mL)采集血液样本用于酶免及血型检测;1 支无污染无核酶、带有分离胶的 BD 管用于 NAT 检测。血液采集后及时离心,于 2~6 ℃冰箱保存,48 h 内完成检测。

**1.2 仪器与试剂** 德国罗氏诊断公司 cobas S201 全自动核酸提取、扩增检测平台;Hamilton Microlab Star 全自动混样仪(瑞士 Hamilton),Cobas S201 Ampilprep 核酸提取仪、Cobas S201 Taqman Analyzer 核酸扩增检测仪(德国罗氏诊断公司);核酸定性筛查试剂 Cobas TaqScreen MPX test(批号:R01528, R07643, S00983)。久保田低温离心机 8730(型号: N10237-F000),HF Safe 生物安全柜(型号: HFCAFE-1500C),自动去盖机(型号: PLUGGO)。

上海科华核酸血液筛查系统:Hamilton Microlab Star 全自动加样仪(瑞士 Hamilton,用于核酸汇集、提取与 PCR 加样),ABI7500 Real time PCR 扩增系统,电热恒温水浴槽(型号 CU-420),HBV、HCV、HIV-1 核酸检测试剂(批号:20111110,

20130610, 20131020)。

**1.3 血液的常规检测** 当日采用两种 ELISA 检测试剂对无偿献血者的血液标本进行抗-HCV、HBsAg、HIV 抗体及抗原, 以及抗-TP、ALT 的检测。两种试剂检测均为阴性的血液标本则在次日进行核酸检测。

**1.4 核酸检测** 将血清学检测合格的标本采用 Roche cobas S201 系统及配套试剂进行 6 混样混合项目 (HBV DNA、HCV RNA、HIV-1/2 RNA) 核酸检测; 科华核酸筛查系统为 8 混样 (pool) 3 项 (HBV DNA、HCV RNA、HIV-1 RNA) 核酸检测。混样阳性的 pool, 进行拆分单检, 以拆分结果为最终结果。

**1.5 确证实验** 将本实验反应性标本分批送卫生部临床检验中心做确证实验及补充乙肝两对半血清学实验。

**2 结 果**

**2.1 罗氏核酸筛查系统共检测标本 115 227 份, 混检反应性 pool 为 130 个, 拆分出反应性 pool 80 个, 反应性标本 86 例, pool 拆分率为 61.5%, 标本阳性率 0.75% (1/1 340), 见表 1。**

**2.2 将罗氏筛查系统检出的 64 例反应性标本以科华筛查系统做鉴别实验 (86 例反应性标本中, 有 22 例因标本剩余量少, 未能在科华系统进行鉴别)。其中 36 份为 HBV DNA, 1 份为 HIV RNA, 27 例为单检阴性。**

**2.3 科华筛查系统共检测标本 90 359 份, 混检反应性 pool 93**

个, 拆分出反应性 pool 31 个, 反应性标本 31 例, pool 的拆分率为 33.3%, 标本阳性率 0.34% (1/2 915), 31 例反应性标本均为 HBV DNA。两个系统共筛出 117 份核酸反应性标本, 总阳性率为 0.57% (1/1 735), 见表 1。

表 1 本中心核酸检测结果

检测系统	份数 (n)	反应性标本	HBV DNA(+)	HCV RNA(+)	HIV RNA(+)	未确定
罗氏	115 227	86	41*	0*	1△	44
科华	90 359	31	31△	0	0	0
总计	205 586	117	72	0	1	44

\*: 卫生部临检中心确证的结果; △: 科华系统鉴定的结果。

**2.4 将 73 例 (其余标本暂未送检, 其中有 1 份为 HIV RNA 阳性标本) 标本及相应的血浆制品分批送至卫生部临检中心做确证实验及补充乙肝两对半血清学实验, 结果 52 例为 HBV DNA 阳性, 21 例阴性; 乙肝两对半结果为: HBsAg 阳性 6 例, 占 0.82%, 单独抗-HBc 阳性 21 例, 占 28.8%, 抗-HBe、抗 HBc 阳性 17 例, 占 23.3%, 全阴 4 例, 占 0.56%, 其余共占 46.5%, 见表 2。**

表 2 73 例反应标本乙肝两对半血清学检测结果

统计指标	抗-HBc(+)	抗-HBe、抗-HBc(+)	抗-HBs、抗-HBc(+)	抗-HBs、抗-HBe、抗-HBc(+)	HBsAg、抗-HBe、抗-HBc(+)	抗-HBs(+)	全阴	HBsAg、抗-HBc(+)	HBeAg、抗-HBc(+)
份数 (n)	21	17	12	8	5	4	4	1	1
百分比 (%)	28.8	23.3	16.4	11.0	6.8	5.5	5.5	1.4	1.4

注: 血清学检测结果由卫生部临检中心出具。

**3 讨 论**

血液是抢救患者生命不可替代的特殊资源。向临床提供安全、有效的血液, 保障患者生命安全是采供血机构的根本职责。免疫检测技术已经广泛运用于血液筛查, 该方法的灵敏度和特异性也在不断改进和提高, 但每年仍有少数新发输血后肝炎病例报道, 主要原因在于“窗口期”献血。据统计 90% 以上 HBV 和 HIV 的传播风险及 75% 以上 HCV 的传播风险来自于“窗口期”病毒感染<sup>[3]</sup>。NAT 是一种新型检测方法, 主要优势在于灵敏度极高, 能够显著缩短病毒感染检测的“窗口期”, 自 1993 年以来已先后被欧美、日本等近 20 多个国家和地区用于献血者血液筛查。有研究报道, 美国自 1999 年开始在血液筛查中使用 NAT 以来, 每年大概可以避免 5 例 HIV-1 和 56 例 HCV 感染的传播, 并且使输血传播 HIV-1 和 HCV 的残余风险大约降至 1/2 000 000<sup>[5]</sup>; 德国红十字血液中心采用 NAT 检测技术, 使得 HCV、HIV-1、HBV 经血传播的残余风险分别降低到 1/10 800 000、1/4 300 000、1/360 000<sup>[6]</sup>; 韩国 HIV、HCV、HBV 的输血残余风险分别是 1/1 356 547、1/2 984 415、1/43 666<sup>[7]</sup>, 其中, HCV 的残余风险比开展核酸之前下降了 33.6 倍。

本研究通过对 205 586 份标本进行 NAT 检测, 筛出阳性标本 117 例, 标本阳性率为 0.57% (1/1 735), 低于江西省血液中心报道的 2.4%<sup>[8]</sup>, 这和本地区的病毒流行性及所采用的检测试剂有关, 如本地区罗氏系统的阳性检测率明显高于科华系统的阳性检测率 (0.75% vs. 0.34%), 这可能与如下原因有关: (1) 罗氏系统的灵敏度较高; (2) 罗氏系统是全自动封闭处

理模式, 科华系统检测有多个手工操作环节, 可能引起核酸的降解, 导致假阴性。科华系统检测的阳性率和江西省血液中心报道的 0.37% 相当<sup>[9]</sup>。目前, 国内 HIV 感染已从高危人群向普通人群蔓延<sup>[10]</sup>, 这对临床用血安全更是一个挑战。本中心通过 NAT 检测, 发现了 1 例 HIV RNA 阳性, 推断为“窗口期”感染, 后经再次抽血进行 HIV 酶免检测, 结果两种试剂抗-HIV 均是强阳性, 证明该例献血者是 HIV“窗口期”献血, NAT 检测有效地筛出了 1 例 HIV“窗口期”感染的献血者。

对于本次送卫生部确认的 73 例反应性标本, 经卫生部确证反应性标本 52 例, 21 例为阴性, 均为 HBV DNA。这可能是: (1) 中国是乙型肝炎高发区, HBV 携带率较高; (2) HBV 确认试剂为罗氏 HBV DNA 定量 2 代试剂, 核酸定量试剂的灵敏度低于定性试剂的灵敏度; (3) 送检的部分血浆制品标本含有细胞添加剂, 对实验有抑制作用; (4) 不排除本实验存在假阳性结果。73 例标本乙肝五项血清学实验结果显示: 6 例 HBsAg 阳性, 说明目前常规的 ELISA 试剂的灵敏度有待进一步提高, 也排除了该 6 例献血者是隐匿性 HBV 感染 OBI; 而对于 4 例全阴标本, 则需进行追踪以观察 HBsAg 是否转为阳性, 如果转为阳性, 则是“窗口期”感染, 如若未转为阳性, 则为 OBI, 其余 42 例推断为隐匿性感染。OBI 常发生在 HBV 感染的恢复后或持续低水平状态的 HBV 携带者<sup>[11-12]</sup>。OBI 供血者虽然血清无法测出 HBsAg, 但却能够通过输血向受血者传播 HBV。

本实验送卫生部鉴别的 73 例标本中, 检出抗-HBc 阳性者 65 例, 而高滴度的抗-HBc 人群体内仍可能有 HBV 复制, 具有传染性。研究表明 HBsAg 阴性、抗-HBc 阳性 (下转第 512 页)

### 3 讨 论

Stago-CT 和 Sysmex-CA1500 全自动凝血仪 PT、APTT、FIB、TT 都是使用凝固法检测, DD 都是使用乳胶增强免疫比浊法检测。本文所述的不是两种不同方法的比对分析, 而是两种不同检测系统的仪器相关性的分析和偏倚的评估。相同项目不同检测系统的检验结果受到很多因素的影响, 比如不同试剂盒、不同仪器设备、不同操作人员等等<sup>[3]</sup>, 所以本文做出本次比对分析。

通过离群值的检查发现, Stago-CT 和 Sysmex-CA1500 凝血仪 PT、APTT、INR、FIB、TT、DD 检测结果都没有超出可接受限, 在合适的范围内, 说明两台仪器同一标本的重复检测性能较好, 即具有较好的精密度。根据散点图可知, PT、APTT、INR、TT 大多数数据落在回归直线上, 只有 FIB 和 DD 少数数据稍微偏离回归直线, 但基本上沿着回归直线分布, 总体上讲两台仪器检测结果的离散程度比较均匀, 结果的一致性较好。相关性分析结果显示两台仪器的 PT、APTT、INR、FIB、TT 项目的  $r^2$  分别是 0.996 9、0.969 1、0.967 7、0.955 8、0.972 6, 两台仪器相关性好 ( $r^2 > 0.95$ ); 只有 DD 检测  $r^2$  为 0.949 6 ( $r^2 < 0.95$ ), 相关性稍差, 两台仪器检测结果基本上可以被临床可接受。PT、APTT、INR、FIB、TT 检测的预期偏倚均在美国临床实验室 CLIA'88 要求的 1/3 偏倚内, DD 的预期偏倚稍超出可接受范围。众所周知, 凝血仪检测结果受到多种因素的干扰, 常见的有受检者的状态、试剂的保存、抗凝剂的使用、血小板的聚集、试验方法、标本采集、设备仪器等, 所以仪器比对是有必要的。本次比对分析结果显示, 只有 DD 检测结果相关性和偏

倚略差, 但基本上尚可接受。经过总结和查找原因, 发现是由于 Sysmex-CA1500 的 DD 检测试剂不够稳定, 放置于室温内时间过长, 重新更换新批号试剂后做比对分析结果可接受。

综上所述, Stago-CT 和 CA1500 凝血分析仪的检测性能具有较好的相关性, 检测结果具有一定的可比性。国内研究亦报道 Stago-CT 和 Sysmex-CA1500 凝血分析仪相关性极好, 均达到 CLIA'88 的检测要求<sup>[4-6]</sup>。这些报道也证明了本文的结论: Stago-CT 和 Sysmex-CA1500 凝血分析仪具有较好的稳定性和检测结果的可靠性。

### 参考文献

- [1] 胡婷婷, 刘薇薇. 医学实验室质量和能力认可准则 (ISO 15189: 2012) 专用要求概述 [J]. 临床检验杂志, 2013, 31(11): 867-871.
- [2] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP9-A2 Method comparison and bias estimation using patient samples: Approved guideline [S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2004.
- [3] 黎瑞冰. CA6000 和 CA1500 两台全自动凝血仪实验性能对比 [J]. 实用医技杂志, 2008, 15(32): 4612-4613.
- [4] 闫慧慧, 王美珠, 廖剑, 等. CA7000 和 CA1500 全自动凝血仪实验性能评价 [J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(12): 1581-1582.
- [5] 朱小东, 谢志雄, 许永志, 等. STAGO Compact 全自动凝血分析仪性能评价 [J]. 医疗装备, 2010, 23(9): 19-20.
- [6] 张朝明, 舒洪丽. 凝血常规试验在凝血分析仪上的比对分析 [J]. 检验医学与临床, 2011, 8(16): 1946-1947.

(收稿日期: 2014-12-18)

(上接第 509 页)

的健康人群中有约 10% HBV DNA 阳性, 抗-HBe 和抗-HBc 双阳性的健康人群中有 5%~15% HBV DNA 阳性<sup>[13]</sup>, 由于国内抗-HBc 阳性者较多, 不可能也没有必要全部拒绝在外, 因为低滴度的抗-HBc 阳性人群是无感染性的。而即使 HBsAg、抗-HBc 联合检查也并不能清除“窗口期”造成的漏检, 此时进行 NAT 检测就显得尤为重要。

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。本实验室曾将酶免抗-HCV 阳性的标本进行 NAT 检测, 结果并非都是 NAT 阳性, 所以两种方法的检测结果有互补之效, 一者无法替代另一者。而由于“窗口期”本身的原因, 增加 NAT 检测也不能完全杜绝输血传播疾病的发生, 但增加 NAT 检测是对 ELISA 的有效补充, 能够使现有的献血体系更加完善, 使输血传播疾病的风险降到最低。

### 参考文献

- [1] 王迅, 郑岚, 张晰, 等. 核酸扩增技术在上海血液筛检中的初步应用 [J]. 中国输血杂志, 2003, 16(3): 157-160.
- [2] Jarvis LM, Dow BC, Cleland A, et al. Detection of HCV and HIV-1 antibody negative infections in Scottish and Northern Ireland blood donations by nucleic acid amplification testing [J]. Vox Sang, 2005, 89(3): 128-134.
- [3] Meng Q, Wong C, Rangachari A, et al. Automated multiplex assay system for simultaneous detection of hepatitis B virus DNA, hepatitis C virus RNA, and human immunodeficiency virus type 1 RNA [J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(8): 2937-2945.
- [4] 中华人民共和国卫生部. GB 18467-2011 献血者健康检查要求

[J]. 北京: 中国标准出版社, 2012.

- [5] Stramer SL, Glynn SA, Kleinman SH, et al. Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody-negative blood donors by nucleic acid-amplification testing [J]. N Engl J Med, 2004, 351(8): 760-768.
- [6] Geisen C, Schmidt M, Klarmann D, et al. Blood-a special resource [J]. Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther, 2012, 47(6): 398-407.
- [7] Kim MJ, Park Q, Min HK, et al. Residual risk of transfusion-transmitted infection with human immunodeficiency virus, hepatitis C virus, and hepatitis B virus in Korea from 2000 through 2010 [J]. BMC Infect Dis, 2012, 12(1): 160.
- [8] 钱榕, 后平钦, 方昌志, 等. 核酸检测技术在献血者血液筛查中的应用 [J]. 中国输血杂志, 2012, 25(3): 246-248.
- [9] 苗燕平, 何华庆, 后平钦. NAT 检测在血液筛查中的应用 [J]. 实验与检验医学, 2010, 28(3): 325-326.
- [10] Qian HZ, Qian ZH, Vermund SH, et al. Risk of HIV/AIDS in China: subpopulations of special importance [J]. Sex Transm Infect, 2005, 81(6): 442-447.
- [11] Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, et al. Occult hepatitis B virus infection [J]. J Hepatol, 2007, 46(1): 160-170.
- [12] Allain JP. Occult hepatitis B virus infection: implications in transfusion [J]. Vox Sang, 2004, 86(2): 83-91.
- [13] Drosten C, Weber M, Seifried E, et al. Evaluation of a new PCR assay with competitive internal control sequence for blood donor screening [J]. Transfusion, 2000, 40(6): 718-724.

(收稿日期: 2014-11-28)