

## · 论 著 ·

# 核酸检测技术在献血者血液筛查中的应用

梁启忠, 程玉根

(盐城市中心血站质量管理部, 江苏盐城 224005)

**摘要:** 目的 探讨核酸检测技术应用于献血者血液筛查的必要性和可行性。方法 对 2011 年 7 月 1 日至 2014 年 12 月 31 日经 ELISA 检测均合格的献血者标本 170 316 份, 再采用核酸检测技术联合检测乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒核酸, 对筛查呈反应性的部分标本再送卫计委临床检验中心进行确证。结果 共筛查出 160 份核酸反应性标本, 总反应性率为 0.09%, 其中罗氏核酸检测系统反应性率为 0.10%, 达安核酸检测系统反应性率为 0.08%, 两者差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。在 27 份送检标本中, 有 14 份被确证为 HBV DNA 阳性, 无 HCV RNA 和 HIV RNA 的检出, 确证阳性率为 51.85%。有 2 份送检标本, 采用化学发光法检测 HBsAg, 结果呈反应性。结论 ELISA 方法筛查献血者标本存在漏检现象, 核酸检测方法可作为 ELISA 的有效补充, 能提高临床用血的安全性; 化学发光法检测灵敏度优于 ELSA。

**关键词:** 核酸检测; 酶联免疫吸附法; 化学发光

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.22.018

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2015)22-3265-04

## Nucleic acid detection technology used in blood screening of blood donors

Liang Qizhong, Cheng Yugen

(Quality Control Department, Yancheng Blood Centre, Yancheng, Jiangsu 224005, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the necessity and feasibility of nucleic acid test for donors blood screening. **Methods** From July 1, 2011 to December 31, 2014, a total of 170 316 blood samples which were negative in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and qualified in alanine aminotransferase detection, were selected in this study stochastically. All the samples were detected hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), human immunodeficiency virus (HIV) by nucleic acid amplification technology (NAT). NAT positive samples were reconfirmed in National Center for Clinical Laboratories (NCCL). **Results** A total of 160 cases of nucleic acid reactive samples were found out, the total response rate was 0.09%. The response rate of Roche nucleic acid detection system was 0.10%, response rate of David nucleic acid detection system was 0.08%, there was no significant difference between the two methods ( $P > 0.05$ ). In 27 cases of specimens, 14 cases were confirmed as HBV DNA positive, no HCV RNA and HIV RNA were detected, the confirmed positive rate was 51.85%. There were 2 samples detected by chemiluminescence HBsAg reactivity. **Conclusion** ELISA screening of blood donors has missing phenomenon, nucleic acid detection method could be used as an effective supplement of the ELISA, could improve the safety of blood for clinical use, detection sensitivity is better than ELISA.

**Key words:** nucleic acid amplification technology; enzyme-linked immunosorbent assay; chemiluminescence method

对献血者血液进行病毒标记物的检测, 对于预防经输血传播病毒, 提高输血安全性有着十分重要的作用。目前病毒标记物的检测主要检测病毒的抗体和抗原, 从病毒进入人体到可以检测到病毒的抗体或抗原前的时期为病毒感染的“窗口期”。处于“窗口期”的献血者血液病毒抗体或抗原的检测结果为阴性, 而实际上血液中含有病毒, 具有复制能力, 因此如何缩短病毒检测的“窗口期”, 是输血医学界一个永恒的研究课题。目前我国采供血机构绝大多数采用 2 种不同 ELISA 试剂检测乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg)、丙型肝炎病毒抗体 (抗-HCV)、人类免疫缺陷病毒抗体 (抗-HIV) 各一次<sup>[1-2]</sup>, 但由于存在“窗口期”较长及病毒变异、免疫沉默等原因, 虽然是 2 种不同试剂, 但检测原理相同, 甚至包被物也相同, 还是可能造成漏检。1997 年, 德国和荷兰最早开展核酸检测技术 (NAT) 筛查献血者血液, 目前 NAT 已成为发达国家和一些发展中国家献血者筛查的常规项目<sup>[3]</sup>。我国于 2010 年 6 月开始在全国 15 家采供血机构开展 NAT 检测试点工作, 本站 2011 年被纳入第二批全国试点单位, 现将几年来的运行情况总结报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本采集 2011 年 7 月 1 日至 2014 年 12 月 31 日本站

采集的, 经两遍 ELISA 和丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 检测均合格的无偿献血者标本共 170 316 份。所有采血点均配备水平离心机, 采血结束后立即由采血人员完成对每位献血者 2 管标本的留取: 1 管 5 mL 血液用乙二胺四乙酸二钾 (EDTA-K<sub>2</sub>) 抗凝的真空采血管, 用于 ELISA、ALT 和血型检测; 1 管 5 mL 血液用无菌、无 DNA 酶、无 RNA 酶、带分离胶的 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝的真空采血管, 用于 NAT 检测。所有标本均在 4 h 内离心后保存于 2~8 °C 冰箱, 当天不能检测的标本于 -20 °C 以下冰冻保存。

### 1.2 仪器与试剂

**1.2.1 检测仪器** Cobas S201 全自动核酸提取、扩增检测系统 (美国罗氏诊断产品有限公司); Chemagic STAR 全自动核酸提取仪 (瑞士哈密尔顿公司); ABI7500 荧光 PCR 扩增仪 (中山大学达安基因股份有限公司); STAR 全自动加样仪 (瑞士哈密尔顿公司); FAME 全自动酶免分析仪 (瑞士哈密尔顿公司); TBA-120R 全自动生化分析仪 (日本东芝公司) 等。

**1.2.2 检测试剂** HBsAg ELISA 检测试剂 [珠海丽珠试剂股份有限公司, 批号 2011030408、2011040508 等; 英科新创 (厦门) 科技有限公司, 批号 2010125124、2011025105 等]、抗-HCV

ELISA 检测试剂(上海科华生物工程股份有限公司,批号 201104011、201104021 等;英科新创(厦门)科技有限公司,批号 2011035807、2011055811 等)、抗-HIV ELISA 检测试剂[北京万泰生物药业股份有限公司,批号 I20101206、I20110203 等;英科新创(厦门)科技有限公司,批号 2011026603、2011046606 等]、ALT 检测试剂(上海科华生物工程股份有限公司,批号 201103021、201107021 等;上海荣盛生物药业有限公司,批号 20110315、20110618 等)。HBV、HCV 和 HIV 的 NAT 检测试剂(美国罗氏诊断产品有限公司,批号 N12813、P05237 等;中山大学达安基因股份有限公司,批号 2011001、2011002 等)。

### 1.3 方法

**1.3.1 检测模式** 所有献血者标本先用 2 种不同的 ELISA 检测试剂分别对 HBsAg、抗-HCV、抗-HIV 及 ALT 进行检测,结果均合格后方可进行 NAT 检测。两套 NAT 检测系统不对同一份标本进行同时检测。

**1.3.2 罗氏操作系统 NAT 检测模式** 采用标本混合检测,每一个一级混样池包含 6 个无偿献血者标本,每份标本取 167  $\mu\text{L}$  血浆至一级混样池,混样池标本数不足 6 份的,由加样系统自动补足至 1 000  $\mu\text{L}$ 。一级混样池标本采用 Cobas TaqSceen MPX 检测试剂,在全自动核酸提取仪中应用 MGP 磁珠分离技术提取核酸,核酸扩增检测仪扩增检测 HBV、HCV、HIV 靶序列,在 PDM 服务器(罗氏诊断 Cobas S201 系统自带的服务器)中自动判读结果。每组检测均设置质控对照(HBV/HCV/HIV-1-M/HIV2),每个一级混样池均含内对照(IC)。无反应性一级混样池中标本判定为 NAT 无反应性;有反应性一级混样池拆分为 6 个组,组成该一级混样池的原始标本做单标本检测,检测方式同混样检测(标本加样量为 1 000  $\mu\text{L}$ ),单标本检测有反应性判定为 NAT 有反应性,单标本检测无反应性判定为 NAT 无反应性。

**1.3.3 达安操作系统 NAT 检测模式** 采用标本混合检测,每一个一级混样池包含 8 个无偿献血者标本,每份标本取 300  $\mu\text{L}$  血浆至一级混样池,混样池标本数不足 8 份的,由加样系统

自动补足至 2 400  $\mu\text{L}$ 。一级混样池标本采用磁珠分离技术提取核酸,核酸扩增检测仪扩增检测 HBV、HCV、HIV 靶序列,ABI 7500 实时荧光定量 PCR 检测系统判读结果。每组检测均设置质控对照(HBV/HCV/HIV-1),每个一级混样池均含内对照(IC)。无反应性一级混样池中标本判定为 NAT 无反应性;有反应性一级混样池拆分为 8 个组,组成该一级混样池的原始标本做单标本检测,检测方式同混样检测(标本加样量为 1 000  $\mu\text{L}$ ),单标本检测有反应性判定为 NAT 有反应性,单标本检测无反应性判定为 NAT 无反应性。

**1.3.4 NAT 有反应性标本的确证** 将 NAT 检测有反应性的部分标本,严格按照卫计委临床检验中心标本送检要求,送至卫计委临床检验中心作 HBV DNA、HCV RNA 和 HIV RNA 的分项确证,并用化学发光法检测乙型肝炎“两对半”,共计 27 份。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS18.0 统计软件进行数据处理及统计分析,两套 NAT 检测系统的反应性检出率采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结 果

**2.1 NAT 检测结果** 将 ELISA 和 ALT 检测均合格的标本 170 316 份,经 NAT 检测,共检测了 24 416 个一级混样池,发现 187 个反应性一级混样池,一级混样池的反应性率为 0.77% (187/24 416);拆分单检标本,发现 160 份反应性标本,总反应性率为 0.09% (160/170 316)。

**2.2 两套 NAT 检测系统的反应性检出率** 罗氏操作系统共检测标本 88 931 份,其中 93 份标本呈反应性,反应性率为 0.10% (93/88 931);达安操作系统共检测标本 81 385 份,其中 67 份标本呈反应性,反应性率为 0.08% (67/81 385),经  $\chi^2$  检验,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**2.3 27 份 NAT 筛查有反应性标本送卫计委临检中心确证结果** 27 份 NAT 筛查有反应性的标本送卫计委临检中心确证,结果有 14 份标本被确证为 HBV DNA 阳性,无 HCV RNA 和 HIV RNA 的检出,确证阳性率为 51.85% (14/27);有 2 份标本经用化学发光法检测 HBsAg,结果为有反应性,见表 1。

表 1 27 份 NAT 筛查有反应性标本送卫计委临检中心确证结果

标本编号	本站结果		临检中心确认结果			临检中心血清学检测(化学发光法)				
	试剂	结果*	HBV(IU/mL)	HCV	HIV	HBsAg	HBsAb	HBeAg	HBcAb	HBcAb
01	罗氏	38.6	—	—	—	—	—	—	—	+
02	罗氏	38.5	<12.0	—	—	—	—	—	—	+
03	罗氏	35.7	<12.0	—	—	—	+	—	—	+
04	罗氏	34.6	<12.0	—	—	—	+	—	+	+
05	罗氏	33.4	<12.0	—	—	—	+	—	—	+
06	罗氏	37.2	<12.0	—	—	—	—	—	+	+
07	达安	40.35	—	—	—	—	+	—	—	+
08	达安	41.13	—	—	—	未测	未测	未测	未测	未测
09	达安	40.98	—	—	—	未测	未测	未测	未测	未测
10	达安	38.35	—	—	—	未测	未测	未测	未测	未测
11	罗氏	40.1	—	—	—	—	+	—	—	+
12	罗氏	31.3	<12.0	—	—	—	—	—	+	+
13	罗氏	36.1	<12.0	—	—	—	—	—	+	+

续表 1 27 份 NAT 筛查为有反应性标本送卫计委临检中心确证结果

标本编号	本站结果		临检中心确认结果			临检中心血清学检测(化学发光法)				
	试剂	结果*	HBV(IU/mL)	HCV	HIV	HBsAg	HBsAb	HBeAg	HBeAb	HBcAb
14	罗氏	35.1	<12.0	—	—	—	—	—	—	+
15	罗氏	33.3	<12.0	—	—	+ (1.05)‡	—	+	+	
16	罗氏	35.1	—	—	—	—	+	—	—	+
17	罗氏	38.7	—	—	—	—	—	—	—	—
18	罗氏	32.1	—	—	—	—	—	—	—	+
19	罗氏	36.1	<12.0	—	—	未测	未测	未测	未测	未测
20	罗氏	35.4	<12.0	—	—	未测	未测	未测	未测	未测
21	罗氏	36.2	<12.0	—	—	+ (1.81)‡	—	—	—	+
22	罗氏	36.9	—	—	—	—	—	—	—	+
23	罗氏	37.1	—	—	—	—	—	—	—	—
24	罗氏	35.6	<12.0	—	—	—	—	—	+	+
25	达安	39.9	—	—	—	—	—	—	—	+
26	达安	41.38	—	—	—	—	—	—	—	+
27	达安	34.31	27.4	—	—	—	—	—	+	+

\* : 单位为循环数; ‡ : S/CO 值; 未测: 部分标本未进行“两对半”检测, 是由于标本量不够。

### 3 讨 论

目前我国大多数血站血液筛查都是采用 ELISA 法检测 HBsAg、抗-HCV、抗-HIV 等项目, 使用 2 种不同厂家生产的试剂由不同的人员进行检测。但由于血清转化“窗口期”是血清学检测发生漏检风险的最主要原因。Busch 等<sup>[4]</sup>利用数学模型证实了核酸检测能明显缩短血清学窗口期:HIV RNA 较抗-HIV 检测提前 10 d 左右, 较 P24 抗原检测提前 6 d 左右; HCV RNA 较抗-HCV 检测提前 50 d 左右; HBV DNA 较 HBsAg 检测提前 20 d 左右。从本站检测结果看, 在 170 316 份 HBsAg、抗-HCV、抗-HIV 检测无反应性的标本中, NAT 共检出反应性标本 160 份, 反应性率为 0.09%, 与国内其他地区报告的检出率相当<sup>[5-6]</sup>, 但明显高于美国和欧洲等 HBV 流行率低的地区, 这与我国乙型肝炎流行率较高有着相一致的表现。14 份经确证为 HBV DNA 阳性的标本, 卫计委临检中心用化学发光法检测“两对半”, 除 2 份因标本量不够未检测外, 12 份乙型肝炎核心抗体(HBcAb)阳性, 7 份乙型肝炎 e 抗体(HBeAb)阳性, 符合隐匿性乙型肝炎(OBI)的界定<sup>[7]</sup>。有文献报道, HBV 血清转换前“窗口期”与 OBI 感染是导致输血传播感染 HBV 残余风险的主要原因<sup>[8]</sup>。HBV“窗口期”与 OBI 感染者均为 HBsAg 阴性, HBV DNA 阳性; HBV“窗口期”者 HBsAg 会随着时间的推移由阴性转换为阳性, 而 OBI 感染者 HBsAg 一般不会转换为阳性, 通常伴随 HBcAb 阳性, 有的伴随低滴度的乙型肝炎表面抗体(HBsAb)阳性<sup>[9-10]</sup>。由于抗病毒治疗的应用和乙型肝炎疫苗接种的普及, 病毒变异增加, 导致 HBsAg 合成降低或其结构改变, 或病毒复制和表达受抑制等<sup>[11]</sup>, 使得我国人群中 OBI 感染率较高, 通过血清学无法检出。部分欧美国家将 HBcAb 纳入血清学检测, 从而提高了 OBI 的检出率。因此, 我国对血液进行核酸检测特别是对 HBV DNA 进行检测, 对于保证患者的用血安全具有一定的必要性。卫计委临检中心从本站 ELISA 检测阴性的标本中用化学发光法检出 2 份标本 HBsAg 阳性, S/CO 值分别为 1.05 和 1.81, 说明化学发光法灵敏度高于 ELISA 法。由此说明, 发达国家献血

者血液筛查一般采用一遍化学发光法加 NAT 和 HBcAb 检测是有一定科学道理的, 血液的安全性应高于我国目前采用的两遍 ELISA 法检测。由于标本送检量较小, 目前尚无标本被确证为 HCV RNA 和 HIV RNA 阳性。有文献报道, 国外 ELISA 筛查无反应性后 HCV RNA 和 HIV RNA 的反应性率分别为 1/222 200 和 1/2 200 000<sup>[12]</sup>, 由于试剂灵敏度等原因, 国内分别为 1/26 500 和 1/53 000, 因此对 HCV 和 HIV 的评估尚需扩大标本量。

本次研究数据表明, 送卫计委临检中心确证的 27 份标本中, 有 14 份被确证为 HBV DNA 阳性, 其中罗氏操作系统 20 份, 确证 13 份, 确证阳性率为 65.00% (13/20), 达安操作系统 7 份, 确证 1 份, 确证阳性率为 14.29% (1/7)。罗氏操作系统标本定量结果 13 份低于 12 IU/mL, 达安操作系统标本定量结果为 27.4 IU/mL, 罗氏操作系统无论是灵敏度还是准确度应高于达安操作系统。

本站目前 ELISA 单试剂检测呈反应性的标本, 尚未进行 NAT 检测, 也未对献血者做跟踪随访调查, 因此不能肯定 ELISA 检测结果就是假反应性, 也有文献报道过 ELISA 单试剂检测呈反应性的标本, 最终被确证为阳性的例子<sup>[5, 13]</sup>, 说明 NAT 检测暂时还不能完全替代常规的血清学检测, 两者在降低输血相关病毒感染风险中的作用也不是简单的互补。总之, 必要的献血者追踪和更进一步的实验室确证手段及检测策略应有助于血清学检测和核酸检测不一致结果的解释和分析<sup>[14-15]</sup>。

### 参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. GB18467-2011 献血者健康检查要求 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [2] 中华人民共和国卫生部. GB18469-2012 全血及成分血质量要求 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [3] Roth WK, Busch MP, Schuller A, et al. International survey on NAT testing of blood donation [J]. Vox Sang, 2012, 102(1): 82-90.

(下转第 3270 页)

验常规项目进行不确定度评估，并提出应忽略校准品对测量不确定度的影响。刘小娟等<sup>[11]</sup>通过遵循《测量不确定度表示指南》，采用 A、B 类评定方法对该实验室的几个常规生化项目的不确定度进行评估，该方法考虑了仪器本身造成的不确定度和测量过程产生的不确定度。陈龙梅等<sup>[12]</sup>提出 11 次以上的室间质评数据评估偏倚不确定度更具代表性。但是也有学者认为室间质评数据不适合应用于评估偏倚不确定度，因为室间质评的靶值只是均值<sup>[13]</sup>。本研究是以“模式方法”对本实验室的日立 7600 和贝克曼 DXC800 两台全自动生化分析仪检测的 13 项急诊生化项目进行不确定度评估，评估偏倚不确定度采用的是应用参考物质方法，而精密度不确定度评估是采用重复性实验评估。

“模式方法”评估测量不确定度将标准品不确定度也考虑进去了，所以该方法在考虑不确定度分量时更全面，计算的测量不确定度也更准确全面。但是“模式方法”测量不确定度时工作量较大，标准品的成本较高，因此有学者通过比较不同方法检测常规生化项目测量不确定度的优劣，提出 Nordtest 准则更适用于目前国内临床实验室中测量不确定度的评估<sup>[14]</sup>。对于不确定度评定方法，目前还没有统一的规定，不同的评定方法在不同的检测系统评定结果不一致，每种方法都有其优缺点，对于不确定度的评定方法及应用还需要进一步进行研究。

临床生化检验的结果对于患者疾病的诊断、病情评估、药物疗效和预后评估等都具有重要的临床意义，因此，用不确定度评价检验结果，可以将生化检测结果的准确性和分散性充分地表现出来，不确定度大小表明该结果的准确度，一般来讲不确定度越小，测量水平越高，测量准确度也越高，结果就越可信<sup>[15]</sup>。用测量不确定度表示临床检验结果有助于临床医生对检测结果的判断。由于临床实验室的复杂性，不确定度的评定及应用还有很多问题有待阐明，随着不断的深入研究，不确定度将在临床检验领域得到广泛应用。

## 参考文献

- [1] 陈孝红, 杨红英, 郁文琳, 等. 利用室内质控和室间质评资料计算
- (上接第 3267 页)
- [4] Busch 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.
- [5] 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.
- [6] 叶贤林, 李洁, 许晓绚, 等. 核酸扩增技术在献血者血液 HBV DNA、HCV RNA 及 HIV-1 RNA 筛查中的应用研究 [J]. 中国输血杂志, 2010, 23(1): 6-10.
- [7] Raimondo G, Allain JP, Brunetto MR, et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection [J]. J Hepatol, 2008, 49(4): 652-657.
- [8] Allain JP. Occult hepatitis B virus infection: implications in transfusion [J]. Vox Sang, 2004, 86(2): 83-91.
- [9] Levicnik-Stezinar S, Rahne-Potokar U, Candotti D, et al. Anti-HBs positive occult hepatitis B virus carrier blood infectious in two transfusion recipients [J]. J Hepatol, 2008, 48(6): 1022-1025.
- [10] Dreier J, Kroger M, Diekmann J, et al. Low-level viraemia of hepatitis B virus in an anti-HBc- and anti-HBs-positive blood donor [J]. Transfus Med, 2004, 14(2): 97-103.
- [11] Coleman PF. Detecting hepatitis B surface antigen mutants [J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12(2): 198-203.
- [12] 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.
- [13] 段勇, 郭逸, 叶世辉. 病毒核酸检测技术在西安地区血液筛查中的应用分析 [J]. 中国输血杂志, 2014, 27(8): 842-844.
- [14] Hollinger EB, Dodd RY. Hepatitis B virus traceback and look-back: factors to consider [J]. Transfusion, 2009, 49(1): 176-184.
- [15] Allain JP, Candotti D. Diagnostic algorithm for HBV safe transfusion [J]. Blood Transfusion, 2009, 7(3): 174-182.

(收稿日期: 2015-05-08)

(收稿日期: 2015-07-13)