

• 临床研究 •

新一代核酸检测试剂 Procleix Ultrio Plus Assay 的使用情况分析

刘旭映,王 涔,梁浩坚,芦 曦,林诗雅
(广州血液中心检验部 510095)

摘要:目的 了解新一代核酸检测试剂 Procleix Ultrio Plus Assay(简称 Ultrio Plus)应用于献血者血液筛查的效果和必要性。方法 采用 Procleix TIGRIS System 检测系统对来自广州血液中心的 447 017 人份献血者标本分别使用 Procleix Ultrio Assay(简称 Ultrio)与 Ultrio Plus 试剂进行人类免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)、丙型肝炎病毒(HCV)、乙型肝炎病毒(HBV) 3 项联检,对 ELISA 检测阴性而核酸检测(NAT)阳性的标本进行病毒类型鉴别检测,比较分析新旧两代核酸试剂灵敏度。结果 在单人份核酸检测(IDT-NAT)的模式下,Ultrio Plus 在血清学阴性标本中 HBV DNA 的检出率为 0.131%(168/127 456),对比使用 Ultrio 时的检出率 0.047%(150/316 847)提高了近 3 倍,差异有统计学意义($\chi^2=88.164, P<0.05$);但随检测灵敏度的增加,检测假阳性率也显著上升,因初检阳性鉴别阴性而产生的血液报废率从原来使用 Ultrio 时的 0.169%(536/316 847)上升到使用 Ultrio Plus 后的 0.315%(401/127 456),差异有统计学意义($\chi^2=91.63, P<0.05$)。结论 新一代的核酸检测试剂 Ultrio Plus 在其对血液中 HBV 病毒的检出能力上有了大大的提高,有利于筛查出潜在的 HBV 窗口期感染及隐匿性乙型肝炎(OBI),但由此产生的高血液报废率要求在实际工作中要持续改进检测方案,以降低血液资源的浪费和献血者的流失。

关键词:血液筛查; 血液报废; 窗口期; 隐匿性感染

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.03.056

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)03-0419-03

本中心自 2010 年 10 月起正式将核酸检测技术应用于献血者血液筛查,作为血清学检验的一项必不可少的补充性方法,自使用以来已取得显著的临床检验效果,在血清学检测阴性的广州地区献血人群中乙型肝炎病毒(HBV)核酸的检出率持续在 0.052%~0.069%^[1-3],为血液安全提供了强大保障。为了进一步提高检测试剂对低拷贝数 HBV DNA 病毒的检出率,由 Hologic 与 Grifols 公司共同研发出了新一代核酸检测试剂 Procleix Ultrio Plus Assay(简称 Ultrio Plus)联检试剂及 Ultrio Plus 人类免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)、丙型肝炎病毒(HCV)、HBV 鉴别试剂。现比较近两年试剂更新前后的使用情况,将检测结果具体报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 检测 2015 年 1 月 1 日至 2016 年 6 月 30 日期间来自广州血液中心无偿献血者全血标本共 447 017 人份,所有献血者均符合《献血者健康检查要求》(GB18467-2011)的相关要求。每位献血者共采集 2 管全血标本,其中 1 管(EDTA-K₂ 抗凝管)用于 ELISA 等常规检测,另一管用无菌带分离胶(EDTA-K₂ 抗凝剂)真空试管采集 5~6 mL 全血用于单人份核酸检测(IDT-NAT)。

1.2 仪器与试剂 Procleix TIGRIS System 检测系统(美国 Hologic Gen-Probe 公司),核酸检测(NAT)试剂孵育器(Procleix RPD),全自动酶免加样仪 STAR-CH8 和全自动酶免分析仪 FAME 24/30(瑞士 HAMILTON 公司),多功能酶标仪(瑞士 TECAN 公司),白洋台式离心机 600A,三洋低温冰箱 MDF-U443。Procleix Ultrio Assay(简称 Ultrio)联检试剂及 Procleix HIV-1、HCV、HBV Discriminatory 鉴别试剂由美国 Novartis 公司提供,Ultrio Plus 联检试剂及 Ultrio Plus HIV-1、HCV、HBV Discriminatory 鉴别试剂由意大利 Grifols 公司提供。

1.3 方法

1.3.1 NAT 标本检测前处理 当天采集的标本于 12 h 内在 2 000×g 离心 10 min 分离同出血浆,保存在 4℃ 冰箱内并于是 48 h 内检测完毕。

1.3.2 检测流程 2015 年 1 月至 2016 年 1 月采集的标本(A

组)采用 2 种 ELISA 试剂与单人份 NAT 做平行检测,NAT 检测使用第一代 Ultrio 联检试剂。凡 ELISA 双试剂或单试剂双孔反应性合并 NAT 阴性或阳性的标本,其血液即进入报废流程,不作进一步检测。ELISA 阴性及 NAT 阳性标本,即留取其原血袋,使用 Procleix HIV-1、HCV、HBV Discriminatory 鉴别试剂于 1 周内对其进行鉴别检测。自 2016 年 2 月起(B 组,2016 年 2 月至 2016 年 6 月),逐步实行部分标本先进行 ELISA 检测,筛查出酶免双试剂阳性标本后,再对酶免阴性标本进行 NAT 检测,使用第二代 Ultrio Plus 联检试剂,NAT 单阳性标本留取其血浆使用 Ultrio Plus HIV-1、HCV、HBV Discriminatory 鉴别试剂进行鉴别检测。以上所有操作方法和结果的判定均按照试剂说明书严格执行。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件,计数资料组间比较采用 χ^2 检验,相关性采用 Pearson 相关分析计算, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ultrio 与 Ultrio Plus 联检及鉴别结果 两组 NAT 初检阳性且成功留样的标本数分别为 688 和 569。两种试剂的 NAT 单阳性率、总鉴别率比较差异有统计学意义($\chi^2=169.384, P<0.05$; $\chi^2=88.164, P<0.05$),见表 1, NAT 单阳性率=NAT 初检单阳性/ELISA 阴性×100%;鉴别阳性率=NAT 鉴别阳性/NAT 初检单阳性×100%;总鉴别率=NAT 鉴别阳性/ELISA 阴性×100%。其中 2015 年 1 月至 2016 年 1 月期间鉴别出阳性的 152 例标本中,只有 1 例 HIV 和 1 例 HCV 阳性,其余 150 例均为 HBV 阳性,而 2016 年 2 月至 2016 年 6 月期间鉴别出阳性的 168 例标本均为 HBV 阳性。

2.2 NAT 初检单阳性/鉴别阴性致血液报废分析 本中心采取“NAT 初检(联检)阳性即报废”方案,不需等待鉴别结果。若定义 NAT 鉴别阳性为真阳性,NAT 初检单阳性/鉴别阴性的标本则为假阳性标本,由此会产生部分血液无效报废。鉴别阴性报废率=(NAT 初检单阳性/鉴别阴性)/ELISA 阴性×100%。表 2 显示了两种检测试剂的假阳性报废率,差异有统计学意义($\chi^2=91.63, P<0.05$)。

表 1 Ultrio 与 Ultrio Plus 联检及鉴别结果

组别	检测总数 (<i>n</i>)	ELISA 阴性 (<i>n</i>)	NAT 初检单阳性 (<i>n</i>)	NAT 鉴别阳性 (<i>n</i>)	NAT 单阳性率 (%)	鉴别阳性率 (%)	总鉴别率 (%)
A 组	319 156	316 847	688	152	0. 217	22. 1	0. 048
B 组	127 861	127 456	569	168	0. 446 *	29. 6	0. 131 *

注:与 A 组比较, * *P*<0. 05。

表 2 NAT 初检单阳性/鉴别阴性致血液报废分析

组别	ELISA 阴性 (<i>n</i>)	NAT 初检单阳性/鉴别阴性 (<i>n</i>)	鉴别阴性 报废率(%)
A 组	316 847	536	0. 169
B 组	127 456	401	0. 315 *

注:与 A 组比较, * *P*<0. 05。

2.3 2016 年 2—6 月 Ultrio Plus 试剂使用情况分析 自 2016

表 3 2016 年 2—6 月 Procleix Ultrio Plus 试剂使用情况分析

日期	ELISA 阴性 (<i>n</i>)	NAT 初检单 阳性(<i>n</i>)	NAT 鉴别阳性 (<i>n</i>)	NAT 初检单阳性/ 鉴别阴性(<i>n</i>)	NAT 单阳性率 (%)	鉴别阳性率 (%)	总鉴别率 (%)	鉴别阴性 报废率(%)
2016 年 2 月	15 744	91	23	68	0. 578	25. 27	0. 146	0. 431
2016 年 3 月	30 315	184	40	144	0. 607	21. 74	0. 133	0. 473
2016 年 4 月	21 868	74	36	38	0. 338	48. 65	0. 165	0. 173
2016 年 5 月	30 397	107	42	65	0. 358	39. 25	0. 138	0. 213
2016 年 6 月	29 132	113	28	85	0. 388	24. 78	0. 096	0. 291

3 讨 论

新一代核酸检测试剂 Ultrio Plus 试剂比起 Ultrio 试剂,在设计上增加了目标增强试剂(氢氧化锂浓缩液),从而增强了对 HBV 病毒颗粒的破坏,增加 HBV DNA 的释放,有利于提高低病毒拷贝数 HBV“窗口期”及隐匿性乙型肝炎(OBI)的检出率^[4]。从美国临床研究所得出的数据显示,Ultrio Plus 联检试剂检测对 HBV DNA 的 95%检出限由 10. 4 IU/mL(9. 2~12. 2 IU/mL)提升到 3. 4 IU/mL(3. 1~4. 0 IU/mL)。从本中心的实验数据显示,Ultrio Plus 比起 Ultrio 对血清学阴性标本中 HBV DNA 的检出率由 0. 047%提高到 0. 131% ($\chi^2=88. 164, P<0. 05$),观察 2016 年 2 月以来 5 个月的总鉴别率保持较稳定的检出率。与王长青等^[5]实验评估数据相一致。同时 Ultrio Plus 对 HIV-1, HCV 的检测性能具有同等的临床灵敏度^[4,6]。

随着试剂对低拷贝数 HBV DNA 的检出能力的大幅提高, NAT 单阳性率及鉴别阳率也随之上升。从本实验数据可比较 NAT 单阳性率由原来的 0. 217%提升到 0. 446% ($\chi^2=169. 384, P<0. 05$),但鉴别率提高的幅度并不如单阳检出率。分析其中原因:(1)所有围绕着提高检出率而制定的政策措施和技术改进均是以提高检测灵敏度作为减少漏检的重要手段,方法越灵敏、叠加检测次数越多,就会出现越多的假阳性^[7]。(2)标本检测过程更易受到外源性污染而产生更多的假阳性。联检阳性标本鉴别阳性率反映了 NAT 联检和鉴别试验的符合程度,同时也反映了 NAT 联检的准确程度^[8]。结合本中心的检测数据,自 2016 年 2 月使用新一代 Ultrio Plus 核酸检测试剂后,开始运行的前两个月 NAT 单阳率由之前的 0. 217%

年 2 月使用新一代 Ultrio Plus 核酸检测试剂,本中心基于核酸实验室防污染措施及检测成本-效益方面考虑,对 NAT 标本检测流程作相应调整,除机采及手工分离血小板标本外,其余全血标本先进行 ELISA 检测,双试剂反应性标本则不进入 NAT 检测流程。每月具体检测情况见表 3, NAT 单阳性率与鉴别阴性报废率 Pearson 相关性分析结果为 *r*=0. 978, *P*<0. 05。

大大上升到 0. 578%和 0. 607%,而鉴别阳性却变化不大,表明了这两个月的假阳性有大幅度的增加。客观原因上分析存在升级后的仪器不稳定性增加,由试剂灵敏度增加所带来的假阳性率增加等因素,而笔者认为更大的可能性在于人为操作而增加的外源性污染的原因更为重要。鉴此中心随之加强了防污染措施的实施,要求检测人员严格按照操作规程处理标本及阳性质控,操作过程中及时更换手套;加强实验室环境消毒(使用紫外灯照射)和设备消毒(10%的巴氏消毒液擦拭),对实验数据进行实时监控,以便及时发现问题;(3)加强对 NAT 检测标本的筛选,尽最大程度地剔除 HBsAg 酶免双试剂阳的标本进入 NAT 检测程序,以降低标本之间的交叉污染。由表 3 的实验数据可见,随后的 3 个月 NAT 单阳性率降至平均为 0. 361%,4 月份的鉴别阳性率高达 48. 65%,证明以上的措施确实有效。

新试剂假阳性率的增加带来的另一个问题是增加了血液资源的浪费和献血者的流失。从本实验数据可见,使用 Ultrio Plus 期间,由于初检阳性鉴别阴性而报废的血液由之前的 0. 169%(536/316 847)提高到 0. 315%(401/127 456),同时 NAT 单阳性率与鉴别阴性报废率 Pearson 相关性分析显示两者存在显著正相关(*r*=0. 978, *P*<0. 05)。从血液是否合格的角度来说,如果 NAT 联检筛查阳性,该血液即可报不合格,没有必要做进一步的鉴别,但从研究残余风险度以及为献血者服务的角度来考虑,应该进一步鉴别出该血液的病毒种类^[9]。但在实际工作中,经常会出现联检阳性鉴别阴性的情况,其中一个重要的原因是由于病毒载量过低,如果 OBI,会产生无法重复的反应性(NRR)的现象^[10]。为了解决这个问题,姚凤兰

等^[9]提出了通过超速离心浓缩病毒后对献血标本做 NAT 联检复检或鉴别,可解决大部分无法鉴别标本的病毒鉴别问题。但其缺点是操作比较繁琐,不适用常规检测。鉴于上述情况,有必要建立一套科学的标本 NAT 筛查鉴定方案及献血者归队方案,以提高实验的准确性和降低献血者的流失。

综上所述,新一代核酸检测 Ultrio Plus 试剂确实在实际工作中发挥着它超高的检测灵敏度,为血液的安全使用提供了强大的保障。但它同时也是一把双刃剑,要求工作者有对操作的熟练掌握与严谨的实验态度,并从中不断地总结与思考,以尽可能提高结果的准确性为不变的目标。

参考文献

[1] 郑优荣,梁浩坚. 核酸检测技术在广州地区献血者血液筛查中的应用[J]. 中国输血杂志,2013,26(12):1211-1214.
[2] 李玉笑,周才. 献血人群隐性乙型肝炎病毒感染的流行病学和血清学研究[J]. 热带医学杂志,2012,12(7):888-890.
[3] 李仲平,王湜. 广州地区 HBsAg 阴性无偿献血血液输血传播 HBV 残余风险评估[J]. 广东医学,2014,35(3):442-445.
[4] Lin CK, Margaritis AR, Heaton WA, et al. 2008. Evaluation of the Procleix Ultrio Plus Assay, a second generation multiplexed NAT assay for HIV-1, HCV, HBV[J]. Vox Sanguinis, 2008, 95(1):324-326.

[5] 王长青,李浩浚,林授,等. 基于转录介导扩增技术的新一代核酸检测试剂的多中心评估[J]. 临床输血与检验, 2016,18(2):175-179.
[6] Sramer 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(2):760-768.
[7] 邓雪莲,张丽. 输血相关 HBV 风险评估的研究进展[J]. 中国输血杂志,2012,25(6):601-605.
[8] 汪德海,王瑞,等. 血站核酸检测实验室质量监控指标应用[J]. 中国输血杂志,2012,25(6):524-527.
[9] 姚凤兰,任芙蓉. 超速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(11):687-690.
[10] 任芙蓉. 实施血液病毒核酸检测策略的相关问题探讨[J]. 中国输血杂志,2010,23(1):1-3.

(收稿日期:2016-09-28 修回日期:2016-12-01)

• 临床研究 •

自贡地区女性 15 种高危型人乳头瘤病毒感染情况分析

邱顺华¹, 金李芬²

(四川省自贡市第三人民医院:1. 检验科;2 药剂科 643020)

摘要:目的 了解自贡地区 15 种高危型人乳头瘤病毒(HR-HPV)基因型感染的分布情况,为自贡地区 HR-HPV 分子流行病学研究提供科学依据。**方法** 对 371 例宫颈分泌物标本采用多通道实时荧光定量 PCR 技术检测 15 种 HR-HPV 基因亚型,分析不同年龄段女性 HR-HPV 感染情况。**结果** 371 例临床标本中共检出阳性 56 例,检出率 15.09%;单一 HR-HPV 基因亚型感染 41 例(11.05%),复合感染 15 例(4.04%);其中 HPV16、52、58、18 是最常见的高危型,检出率分别为 5.93%、3.23%、2.96%、2.43%。HR-HPV 感染自贡女性人群的年龄分布以 18~<50 岁年龄段为主,其中 18~<30 岁年龄段的女性人群检出率最高(19.30%),高于其余年龄段,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 自贡地区 15 种 HR-HPV 感染有年轻化趋势,HR-HPV 基因型检测对于自贡地区 HR-HPV 感染的诊疗、预防性疫苗的使用及宫颈癌的早期干预和预防具有重要意义。

关键词:高危型人乳头瘤病毒; 基因型; 聚合酶链反应
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.03.057 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2017)03-0421-03

宫颈癌严重危害女性的健康,是全球女性的常见恶性肿瘤之一,发病率仅次于乳腺癌^[1]。据统计,宫颈癌每年的新发患者和死亡患者 85%发生在发展中国家^[1]。中国女性每年新发的宫颈癌患者超过 13 万,并明显趋向年轻化^[2]。目前,已有研究表明高危型人乳头瘤病毒(HR-HPV)的持续感染是造成宫颈癌以及癌前病变的最关键发病因素,而 16、18 型是女性宫颈癌中最常见的高危基因型,70%左右的浸润性宫颈癌与其有关^[3-6]。在发达国家人乳头瘤状病毒(HPV)疫苗已经应用于临床,但研究表明不同的地区、不同的人群感染 HPV 的型别存在一定差异,因此,临床使用 HPV 预防疫苗应考虑这些差异^[7]。宫颈癌发生相关的 HR-HPV 基因型有 15 种,疑似高危基因型 3 种^[8]。因此,本研究基于 15 种 HR-HPV 感染的现状以及不同年龄段进行分析,采用多通道实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测 HR-HPV 基因型。旨在为四川省自贡地区人群中 HPV 疫苗的临床应用提供流行病学研究依据,对宫颈癌的早期筛查、早期预防和早期干预提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2015 年 8 月至 2016 年 9 月四川省自贡市第三人民医院门诊及住院患者 371 例,年龄 18~75 岁,平均(37.72±9.93)岁,其中 18~<30 岁 114 例,30~<40 岁 83 例,40~<50 岁 132 例,50~≤75 岁 42 例。
1.2 仪器与试剂 荧光 PCR 分析仪(上海宏石 SLAN-96P),高危型人乳头瘤病毒(HPV)分型核酸检测试剂盒(上海之江生物科技股份有限公司)。
1.3 标本采集 使用一次性宫颈取样器刷取宫颈病灶处脱落细胞,用宫颈刷子深入受检者宫颈口内 2~3 cm,顺时针转动 3~5 圈,取出宫颈刷片放入装有专用细胞保存液的样本管中,应将样本置于 2~8℃ 条件下可存放 7 d,≤-20℃ 条件下可以长期保存,避免反复冻融。
1.4 方法
1.4.1 HPV-DNA 提取 使用上海之江的 HPV 分型核酸检测试剂盒提取 HPV-DNA,严格按照试剂说明书操作,充分震