

# 核酸检测技术在献血人员血液筛查中的应用

柯苑, 赵静, 马成平, 黄敏, 姚慧兰, 张立波, 马贵明(南京红十字血液中心实验室, 南京 210003)

**【摘要】目的** 采取核酸检测(NAT)技术进行血液筛查,减少由献血者感染“窗口期”及隐匿感染献血引起的疾病传播。**方法** 采用酶联免疫吸附法(ELISA)对 54 358 份献血者标本进行乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、人类免疫缺陷病毒抗体(抗-HIV)、丙型肝炎病毒抗体(HCV-Ab)检测,同时用转录介导扩增技术(TMA)进行 HBV-DNA、HCV-RNA 检测,人类免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)RNA 核酸检测。**结果** NAT 检测阳性 ELISA 检测阴性标本共 51 份。51 份标本有鉴别试验结果的 33 份,其中 32 份 HBV-DNA 阳性,1 份 HIV-1 RNA 阳性,HIV-1 RNA 阳性的献血者经南京市疾病预防控制中心免疫印迹法确认为 HIV-1 疑似阳性(gp160 和 p24 $\pm$ )。半年后再次回访该献血者,抽取血样送南京市疾控中心经免疫印迹法确认为 HIV-1 阳性(gp160、gp120、p66、p51、gp41、p31、p24、p17 $+$ )。**结论** NAT 技术可以减少由献血者感染“窗口期”及隐匿感染献血引起的疾病传播,从而减少输血风险。

**【关键词】** 血液筛查; 核酸检测技术; “窗口期”; 转录介导扩增技术

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.20.026 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)20-2858-02

**Application of nucleic acid detection technology in blood screening of blood donors** KE Yuan, ZHAO Jing, MA Cheng-ping, HUANG Min, YAO Hui-lan, ZHANG Li-bo, MA Gui-ming (Department of Laboratory, Red Cross Blood Center of Nanjing, Nanjing, Jiangsu 210003 China)

**【Abstract】Objective** To explore the value of nucleic acid detection technology (NAT) for blood screening to decrease the infection induced by blood donors in the window period and infected insidiously. **Methods** A total of 54 358 blood samples were detected by ELISA for hepatitis B surface antigen (HBsAg), antibody of human immunodeficiency virus (HIV-Ab), antibody of hepatitis C virus (anti-HCV), and transcription-mediated amplification (TMA) method were used to detect the DNA of hepatitis B virus (HBV-DNA), the RNA of hepatitis C virus (HCV-RNA) and the RNA of type 1 human immunodeficiency virus (HIV-1 RNA). **Results** Fifty-one samples were positive by NAT, but negative by ELISA. A total of 33 samples in these 51 samples were identified. The HBV-DNA of 32 donors were positive, and the HIV-1 RNA of one donor was positive, who was identified as suspected HIV-1 positive (gp160 and p24 $\pm$ ) by western blot method in Nanjing municipal center for disease control and prevention. Six months later, this blood donor was identified as HIV-1 positive (gp160, gp120, p66, p51, gp41, p31, p24, p17 $+$ ) by western blot method in Nanjing municipal center for disease control and prevention. **Conclusion** NAT could effectively decrease the infection induced by blood donors in the window period and infected insidiously, so as to reduce the risk of blood transfusion.

**【Key words】** blood screening; nucleic acid detection technology; window period; transcription-mediated amplification

血液筛查是确保血液及血液制品安全的重要措施之一,根据国内现行法律法规的要求,目前使用的酶联免疫吸附法(ELISA)检测的是抗原抗体,但由于感染“窗口期”较长及病毒变异、隐匿性感染等因素的存在,使得临床输血存在一定的风险。核酸检测(NAT)技术可直接检测病毒核酸,缩短检测方法的“窗口期”,降低输血感染的风险,已成为发达国家血液筛查病毒的重要手段<sup>[1]</sup>。目前可用于血液筛查的 NAT 技术主要有聚合酶链反应(PCR)和转录介导扩增技术(TMA)。本中心于 2013 年 3 月正式采用 TMA 法核酸检测工作,建立并完善了血液核酸检测相关体系文件,形成了系统的检测流程。2013 年 3~10 月共检测了 54 358 份献血者血液标本,检测效果较好。现将结果报道如下。

## 1 材料与与方法

**1.1 标本** 2013 年 3~10 月本中心检测的 54 358 份献血者血标本。

**1.2 仪器与试剂** 诺华公司 Procleix TIGRIS System 检测系

统以及 Ultrio HIV-1/HCV/HBV 检测试剂和鉴别试剂,批号为 614952。

**1.3 方法** 采集静脉血 5 mL 于分离胶抗凝试管中,采集后 6 h 内 3 000 r/min 离心 15 min,放入 2~8 ℃ 冰箱内储存,48 h 内送实验室完成标本抽提、扩增和检测工作。测试包括 3 个主要步骤:(1)通过特异性目标捕获将病毒核酸从标本中分离;(2)通过 TMA 方法实现目标核酸片段的扩增;(3)杂交保护方法检测扩增产物。Procleix TIGRIS System 检测系统联检试剂检测到阳性标本后,可通过人类免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)鉴别试剂、丙型肝炎病毒(HCV)鉴别试剂、乙型肝炎病毒(HBV)鉴别试剂进行鉴别检测,以分辨引起反应的病毒。鉴别试验步骤与联检相同,联检阳性标本放于-20 ℃ 冰箱,1 周进行 1 次鉴别试验。

## 2 结果

**2.1 所有标本检测结果** 54 358 份标本 HBV/HCV/HIV-1 联检初筛结果显示 226 份阳性,NAT 阳性 ELISA 阴性标本共

51 份。联检初筛阳性标本再进行鉴别试验,结果显示 HBV-DNA、HIV-1RNA、HCV-DNA 阳性例数分别为 32 例(0.059%)、1 例(0.002%)、0 例。NAT 阳性 ELISA 阴性标本共 51 份,诺华鉴别试剂鉴别率为 50%~60%,因此有鉴别结果的标本只有 33 份。

**2.2 HIV-1 RNA 阳性患者检测过程** 显示为 HIV-1 RNA 阳性的 1 份标本,献血者于 2013 年 5 月 12 日献全血 400 mL,

5 月 13 日实验室 ELISA 方法检测此标本 HIV 抗体/抗原+抗体结果均为阴性,核酸检测 HIV-1 RNA 结果为阳性。5 月 20 日重新抽取该名献血者全血标本,核酸检查仍为阳性,ELISA 为弱阳性。该份献血者标本经南京市疾控中心 HIV 确证实验室免疫印迹法(WB)确认为 HIV-1 疑似阳性。11 月 27 日,再次抽取该名献血者血标本送市疾控中心经 WB 法确认为 HIV-1 阳性。见表 1。

表 1 HIV-1 RNA 阳性 ELISA 阴性标本初筛及随访结果

| 时间      | 第 3 代酶免试剂(HIV 抗体)<br>检测结果(S/CO) | 第 4 代酶免试剂(HIV 抗原<br>+抗体)检测结果(S/CO) | NAT 检测结果<br>(S/CO) | WB 法                                  |
|---------|---------------------------------|------------------------------------|--------------------|---------------------------------------|
| 初筛      | —                               | —                                  | +                  | 未检测                                   |
| 初筛后 8 d | +                               | +                                  | +                  | gp160 和 p24±                          |
| 初筛后半年   | 未检测                             | 未检测                                | 未检测                | gp160、gp120、p66、p51、gp41、p31、p24、p17+ |

3 讨 论

常规酶联免疫检测法可检测血液中的抗原和抗体,但当献血者在感染“窗口期”或隐匿性感染时献血,受血者将面临输血后感染 HIV 或肝炎病毒的风险。有文献表明,美国 90%以上输血传播 HIV 和 HBV 感染以及 75%以上输血传播 HCV 感染均来自“窗口期”患者血液<sup>[2-3]</sup>。我国属于肝炎的高发区,人群中 HBsAg 携带率为 9.09%,HBV 流行率大于 60%<sup>[4]</sup>。我国目前筛查献血者是否感染 HBV 的指标仍为 HBsAg,因此不能消除 HBV 感染“窗口期”以及隐匿性感染造成的漏检。本研究 54 358 份献血者标本中检出 32 例 ELISA 阴性 HBV-DNA 阳性标本,阳性率比深圳地区报道的 131 174 份血清学阴性标本检出 22 份 HBV-DNA 阳性标本结果略高<sup>[5]</sup>。没有检出 HCV 阳性而 ELISA 阴性的献血者,与国内青岛、江西等地区相关报道相似<sup>[6-7]</sup>。ELISA 检测阴性,但实际 HIV-1 RNA 为阳性的献血者检出 1 例,通过回访了解到该例患者是 1 例典型的处于 HIV 感染“窗口期”的案例,目前使用的 HIV 酶免检测试剂为第 3 代和第 4 代组合,第 4 代试剂的“窗口期”比第三代虽然缩短了 1 周左右但还是大于 NAT 的“窗口期”。如果只用 ELISA 法将会造成漏检,该献血者所献的 400 mL 全血将按常规制备成悬浮红细胞,血浆和冷沉淀等 3 种血液制品用于临床,有可能输给 3 名患者造成输血后 HIV 病毒感染。根据国内疾病预防控制中心报道,2013 年 1 月新增 HIV 感染者/AIDS 患者 7 365 例,其中输血及使用血制品传播 37 例<sup>[8]</sup>。

与 ELISA 法相比,NAT 法具有更高的敏感度和特异性,通过缩短“窗口期”可以对感染做到早期检测,进一步减少输血造成疾病传播的可能性。NAT 检测几乎不受 ELISA 检测制约因素的影响,故两种检测技术存在良好的互补性。将 NAT 作为采血血样的常规筛查技术,可为临床安全用血提供有力保障。与其他 NAT 检测方法相比,目前使用的 TMA 法优点主要有:(1)可以在 1 支试管内同时检测多个病毒,检测前不需要混样,简化了检测过程;(2)减少血液筛查步骤和缩短处理时间,省去了阳性标本进一步拆分的过程,从而更快得到结果。但是 NAT 也不能完全取代 ELISA 检测,首先 NAT 筛查血液所需试剂成本昂贵,对检测环境、基础设施等要求较高。其次 NAT 筛查血液并不能完全杜绝输血传染病的风险,其检测效果取决于检测系统的有效运转和检测灵敏度。研究表明,低病

毒载量的感染标本容易在 NAT 筛查时被漏检,因此对 NAT 试剂的灵敏度提出了更高的要求。NAT 操作步骤较复杂,在人员培训、管理模式上都与酶免检测存在较大区别,对操作人员的技能要求较高,需要严格的防污染措施以避免标本间交叉污染和扩增产物污染,同时需对整个检测流程进行质量控制。

综上所述,献血相关法律法规标准尚未涉及血液筛查假阳性献血者献血资格的保留问题,因此上级管理部门也应该在 NAT 全面应用于血液筛查之前,以保障血液安全为大前提,对单独 NAT 阳性献血者告知以及献血资格是否保留等问题做出明确规定,作为广大采供血机构执行的依据。

参考文献

[1] Engelfriet CP, Reesink HW. Implementation of donor screening for infectious agents transmitted by blood by nucleic acid technology (International Forum) [J]. Vox Sanguinis, 2002, 82(1): 87-111.

[2] 文国新, 美黑丽. 血液感染性安全问题的现状与展望 [J]. 中国输血杂志, 2006, 19(4): 332-334.

[3] 曾劲峰, 杨宝成. 血液筛查核酸检测的建立及应用 [J]. 中国输血杂志, 2008, 21(11): 827-828.

[4] 梁晓峰, 陈园生, 王晓军. 中国 3 岁以上人群乙型肝炎血清流行病学研究 [J]. 中华流行病学杂志, 2005, 26(9): 655-658.

[5] 叶贤林, 李活, 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.

[6] 吴玉清, 杨忠思, 赵林, 等. 青岛地区无偿献血者血液病毒核酸检测的研究 [J]. 中国输血杂志, 2008, 21(11): 834-836.

[7] 苗燕平, 何华庆, 后平钦, 等. 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.

[8] 中国疾病预防控制中心, 性病艾滋病预防控制中心. 2013 年 1 月全国艾滋病性病疫情及主要防治工作进展 [J]. 中国艾滋病性病, 2013, 19(3): 159-160.