

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.19.015

核酸血筛试剂 6 混样和 48 混样检测在血液筛查中的适用性评价

孙微超¹, 崔志刚¹, 吉尚志², 马晓璇¹, 李英辉¹, 杜艳丽¹, 郑伟¹, 杨巍¹, 王涛¹

1. 哈尔滨市血液中心, 黑龙江哈尔滨 150056; 2. 北京万泰生物药业股份有限公司, 北京 102206

摘要:目的 评价核酸血筛试剂 48 份标本混合方式(以下简称 48 混样)与 6 份标本混合方式(以下简称 6 混样)在血液筛查中的适用性,为临床用血检测方案的制订提供参考。**方法** 将阳性标本编到日常检测剩余的标本组中,分别用 48 混样和 6 混样方式进行检测,并分析检测结果。两种混样检测方式结果不一致的标本分别复检,将试验中阳性结果的混样拆分单检,单检阳性标本及背景为阳性的标本采用核酸单份标本定量试剂进行检测,并分析统计结果。**结果** 共检测 11 856 份标本,符合方案的共计 10 944 份标本。6 混样和 48 混样检出的 HBV DNA、HCV RNA、HIV-1 RNA 阳性 pool 数分别为 23、15、20 和 22、14、20。两种混样方式检测的 HBV、HCV、HIV-1 阳性符合率分别为 95.65%、93.33%、100.00%,阴性符合率均为 100.00%,总符合率分别为 99.56%、99.56%、100.00%,Kappa 值分别为 0.975、0.963、1.000,两种混样方式检测结果一致性良好。**结论** 综合 6 混样和 48 混样检测的检出率、效率、成本和漏检风险,48 混样检测可以作为血站和血液制品公司血筛检测的一种参考方案。

关键词:血液核酸筛查; 混合方式; 一致性; 参考方案

中图法分类号:R457.1;R446.9

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)19-2803-04

Evaluation of applicability of nucleic acid blood screen reagent 6 mixed samples and 48 mixed samples detection in blood screening

SUN Weichao¹, CUI Zhigang¹, JI Shangzhi², MA Xiaoxuan¹,
LI Yinghui¹, DU Yanli¹, ZHENG Wei¹, YANG Wei¹, WANG Tao¹

1. Harbin Blood Center, Harbin, Heilongjiang 150056, China;

2. Beijing Wantai Biological Pharmaceutical Co. Ltd, Beijing 102206, China

Abstract: **Objective** To determine an appropriate number of pooled plasma samples in nucleic acid test for blood screening, two types of pooled plasma by 6 or 48 specimens were evaluated. **Methods** Positive controls were randomly mixed with daily plasma samples. Plasma pooled by 6 or 48 samples were then tested. If the results between two pooling method were conflict, the relative pooled plasma should be tested again. If the result of a pool of samples were positive, then the samples were tested individually to identify the actual positive sample. The samples that identified as positive as well as the samples with positive background were tested with quantitative nucleic acid test reagent. Finally, the data were collected and analyzed. **Results** A total of 11 856 samples were tested, 10 944 of them met the requirement and were included in this analysis. The numbers of HBV, HCV, HIV-1 positive samples identified through 6 and 48 sample pooling methods were 23, 15, 20 and 22, 14, 20 respectively. The positive percent agreements of HBV, HCV, HIV-1 between the two pooling method were 95.65%, 93.33%, 100.00%, the negative percent agreements were all 100.00%, the total agreements were 99.56%, 99.56%, 100.00%, the Kappa values were 0.975, 0.963, 1.000 respectively. The result indicated that there was a good agreement between the two pooling methods. **Conclusion** Considering detection rate, efficiency, cost and miss detection risk together, 48 sample pooling method is recommended to be used in blood screening by blood center and blood product companies.

Key words: blood nucleic acid screening; pooling method; consistency; reference method

血液核酸扩增技术(NAT)是一种高度灵敏的通过血液检测传染病的技术,能明显缩短病毒感染检测的窗口期,检出病毒变异及免疫静默的感染者,降低输血传播病毒的风险^[1]。近年来,国家越来越重视临

床用血安全,2010 年国家开始试点推广核酸检测,《全血及成分血质量要求 GB 18469-2012》及《血站技术操作规程(2012 版)》明确规定核酸检测可作为血液筛查的方法,还在原有的基础上增加了《核酸检测血站技

术操作规程(2015 版)》,进一步规范了 72 h 内完成检测的核酸检测时限性。为了保证输注血液制品的安全,血液制品公司的原料血浆在生产中必须使用有效的去除及灭活病毒工艺。核酸检测技术的不断提高,检测模式设置的合理性直接关系到检测工作量、时间和成本效益^[2],如何做到检测效能和检测成本间的平衡越来越引起各检测单位的重视^[3-4]。哈尔滨市血液中心对 48 份标本混合方式(以下简称 48 混样)与 6 份标本混合方式(以下简称 6 混样)进行对比考察,评价两种检测方式在血液核酸筛查中的适用性,为临床用血检测方案的制订提供参考。

1 材料与方法

1.1 标本来源 2017 年 3 月至 2018 年 3 月哈尔滨市血液中心留存的 108 份相关标志物检测为阳性的无偿献血标本,其中 HBV 阳性 37 份、HCV 阳性 36 份、HIV 阳性 23 份、TP 阳性 12 份;2017 年 12 月至 2018 年 3 月,日常检测相关标志物为阴性的剩余无偿献血标本 11 748 份。所有无偿献血者均符合现行的原卫生部发布的《献血者健康检查要求 GB 18467-2001》。采用无菌的 EDTA-K₂ 抗凝核酸检测专用真空试管留取 5~6 mL 全血标本供核酸检测。

1.2 仪器与试剂 HBV、HCV、HIV-1 型核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)及 WanTag 全自动核酸提取加样系统均为北京万泰生物药业股份有限公司产品,CFX-96 荧光定量 PCR 仪购自 Bio-Rad 公司。所有试剂均在有效期内使用,仪器经过校准后使用,标本的检测操作流程严格执行本中心制订的相关操作标准规程。

1.3 方法 本试验采用对比方法评价两种混合方式。将相关标志物为阳性的标本编入日常检测剩余的标本组中,分别用 48 混样与 6 混样进行检测。初检后对两种检测方式结果进行对比。不一致结果的标本进行复检。判断标准:一致,相同的 48 份标本两种混合方式检测结果同时阴性或同时阳性判断为结果一致;不一致,复检后对相同的 48 份标本两种混合方式最终检测结果仍为一阴一阳的判定为结果不一致。将试验中出现阳性结果的标本 pool 拆分单检,包括:(1)6 混样方式检测结果为阳性的标本 pool 拆分单检。(2)复检后最终结果为 48 混样检测方式为阳性,6 混样检测方式为阴性的,将 48 份标本直接进行单检。单检阳性标本及背景为阳性的标本采用核酸单份标本定量试剂进行检测。

1.4 统计学处理

1.4.1 数据收集 保留所有试验结果,在 Excel 2007 中建立数据库,录入全部标本信息和检测结果,核对数据,按剔除标准剔除不纳入统计的试验数据并记录原因。数据剔除标准:未按要求操作致试验数据

不可靠,仪器故障,重复加样,经核实的其他原因。

1.4.2 两种检测方式比较方法 对本试验中有效标本的试验结果进行统计,计算 48 混样与相应的 8 个 6 混样检测结果的阳性符合率、阴性符合率、总符合率及一致性等指标。采用 1.3 中判断方法对两种混样检测方式一致性进行判断,采用计算 Kappa 值的方式对两种混样检测方式的一致性进行评价,Kappa 值为 0.61~0.80 时表明一致性强度较高,Kappa 值为 0.81~1.00 时表明一致性强度最高。

2 结果

2.1 符合标准标本 共完成 11 856 份血浆标本的检测,其中最终符合标准的标本为 10 944 份,剔除标本为 912 份,包括含有 72 h 以上的标本 pool,共 288 份标本;含内质控无效的标本 pool,共 432 份标本;重复入组标本 pool,共 144 份标本;误用酶联免疫试管,共 48 份标本。纳入本次试验统计的 10 944 份标本中,HBV、HCV、HIV 和 TP 相关标志物阳性标本分别为 33 份、28 份、21 份和 12 份,共 94 份。

2.2 两种混样方式检测的 HBV DNA、HCV RNA 和 HIV-1 RNA 结果

2.2.1 两种混样方式检测的 HBV DNA 结果 10 944 份标本中,将 24 份 HBV DNA 阳性标本,分别编到 23 个 48 混样 pool 和 6 混样 pool 中进行检测。其中 1 个 48 混样 pool 和 1 个 6 混样 pool 都包含 2 份 HBV DNA 阳性标本,其余 22 个混两种样 pool 各包含 1 份 HBV DNA 阳性标本,见表 1。

表 1 两种混样方式的 HBV DNA 试验结果(pool)			
48 混样检测×1	6 混样检测×8		合计
	阳性	阴性	
阳性	22	0	22
阴性	1	205	206
合计	23	205	228

2.2.2 两种混样方式检测 HCV RNA 结果 10 944 份标本中,将 15 份 HCV RNA 阳性标本分别编到 15 个 48 混样 pool 和 6 混样 pool 中进行检测,每个混样 pool 都只包含 1 个 HCV RNA 阳性标本,见表 2。

表 2 两种混样方式的 HCV RNA 试验结果(pool)			
48 混样检测×1	6 混样检测×8		合计
	阳性	阴性	
阳性	14	0	14
阴性	1	213	214
合计	15	213	228

2.2.3 两种混样方式检测 HIV-1 RNA 结果 10 944 份标本中,将 20 份 HIV-1 RNA 阳性标本,分别编到 20 个 48 混样 pool 和 6 混样 pool 中进行检测,每个混样

pool 都只包含 1 个 HIV-1 RNA 阳性标本,见表 3。

表 3 两种混样方式的 HIV-1 RNA 试验结果(pool)

48 混样检测×1	6 混样检测×8		合计
	阳性	阴性	
阳性	20	0	20
阴性	0	208	208
合计	20	208	228

2.2.4 两种混样方式的性能评价 对两种混样检测方式,从阳性符合率、阴性符合率、总体符合率、Kappa 值及一致性等方面进行评价,见表 4。

表 4 两种混样检测方式的性能评价

项目	阳性符合率 (%)	阴性符合率 (%)	总符合率 (%)	Kappa 值	一致性 强度
HBV DNA	95.65	100.00	99.56	0.975	最强
HCV RNA	93.33	100.00	99.56	0.963	最强
HIV-1 RNA	100.00	100.00	100.00	1.000	最强

2.3 HBV DNA、HCV RNA 和 HIV-1 RNA 拆分单检阳性及背景阳性标本定量单检结果

2.3.1 HBV DNA 拆分单检阳性及背景阳性标本定量单检结果 对 38 份标本进行了 HBV 定量单检,其

中核酸背景阳性 14 份、酶联免疫背景阳性 19 份、酶联免疫背景阴性 5 份。14 份核酸背景阳性和 9 份酶联免疫背景阳性标本拆分单检为阳性,9 份入组时背景为酶联免疫阳性但拆分单检为阴性,1 个 6 混样 pool(1 份酶联免疫背景阳性、5 份酶联免疫背景阴性)标本量不足,直接进行定量单检,1 份为阳性。见表 5。

2.3.2 HCV RNA 拆分单检阳性及背景阳性标本定量单检结果 共对 33 份标本进行了 HCV 定量单检,其中核酸背景阳性 2 份、酶联免疫背景阳性 26 份、酶联免疫背景阴性 5 份。2 份背景核酸阳性和 12 份背景酶联免疫阳性标本拆分单检为阳性,13 份入组时背景为酶联免疫阳性但拆分单检为阴性,1 个 6 混样 pool(1 份酶联免疫背景阳性、5 份酶联免疫背景阴性)标本量不足,直接进行了定量单检,1 份为阳性。见表 6。

2.3.3 HIV-1 RNA 拆分单检阳性及背景阳性标本定量单检结果 对 21 份标本进行了 HIV-1 定量单检,其中核酸背景阳性 1 份、酶联免疫背景阳性 20 份。1 份背景核酸阳性和 19 份背景酶联免疫阳性标本拆分单检为阳性,1 份入组时背景为酶联免疫阳性但拆分单检为阴性。见表 7。

表 5 HBV 背景阳性标本血筛试剂及定量试剂检测结果

背景阳性数量(份)	48 混样检出数(pool)	6 混样检出数(pool)	拆分单检检出数(pool)	定量试剂检出数(pool)	定量结果范围(U/mL)
9	0	0	0	0	0
1	0	1	1	1	>0 或<144
10	10	10	10	10	>144 或<720
13	13	13	13	13	>720

表 6 HCV 背景阳性标本血筛试剂及定量试剂检测结果

背景阳性数量(份)	48 混样检出数(pool)	6 混样检出数(pool)	拆分单检检出数(pool)	定量试剂检出数(pool)	定量结果范围(U/mL)
13	0	0	0	0	0
3	2	3	3	3	>0 或<960
10	10	10	10	10	>960 或<4 800
2	2	2	2	2	>4 800

表 7 HIV-1 RNA 背景阳性标本血筛试剂及定量试剂检测结果

背景阳性数量(份)	48 混样检出数(pool)	6 混样检出数(pool)	拆分单检检出数(pool)	定量试剂检出数(pool)	定量结果范围(U/mL)
1	0	0	0	0	0
4	4	4	4	4	>0 或<1 920
10	10	10	10	10	>1 920 或<9 600
6	6	6	6	6	>9 600

2.4 血筛试剂对干扰标本的检测情况 本次试验中 掺入了 TP 抗体阳性标本 12 份,该 12 份标本分布在

12 个 48 混样 pool 检测中,其中有 3 个 48 混样 pool 检测中无 HBV DNA、HCV RNA、HIV-1 RNA 阳性标本,检测结果也均为阴性。

3 讨 论

对血液开展传染病病原体筛查,建立血液批放行的根本目的是防止不合格血液的误发放,以保证用血安全^[5-6]。为了进一步降低用血风险,开展了酶联免疫阴性血的核酸筛查,并在国内逐步实现血液核酸筛查的全覆盖,利用病毒核酸检测的高灵敏度解决核酸筛查试剂的高成本问题,目前,国内血站在时间要求较紧的机采成分血检测中采用单检方式^[7],日常无偿献血标本大多采用 6 混样检测方式,但通量相对较小^[8]。本研究评价 6 混样和 48 混样两种混样检测方式在血液核酸筛查中的适用性,以期为未来突发大量采血或时间要求很紧的血液核酸筛查提供参考方案。

本研究在综合临床核酸筛查检测的基础上,在混样时掺入不同浓度的病毒标本,考察 6 混样和 48 混样两种混样检测方式的检出率。对混样时掺入的背景阳性标本定量单检显示,HBV 核酸浓度覆盖范围为 102~104 U/mL、HCV 核酸浓度覆盖范围为 102~103 U/mL、HIV 核酸浓度覆盖范围为 102~105 U/mL,且以中低浓度标本为主,具有较好的临床标本代表意义。

两种混样方式检测的 HBV DNA、HCV RNA、HIV-1 RNA 阳性符合率分别为 95.65%、93.33%、100.00%,阴性符合率均为 100.00%,总符合率分别为 99.56%、99.56%、100.00%,Kappa 值分别为 0.975、0.963、1.000,提示两种混样检测方式结果具有高度一致性,这应该与收集的标本类型及核酸试剂检测灵敏度高关系密切。

但与 6 混样检测模式比较,48 混样检测还是存在一定的漏检风险,例如 48 混样检测 HBV DNA、HCV RNA 均比 6 混样少检出 1 例,经定量单检确认,HBV 的核酸水平为 50.2 U/mL,HCV 的核酸水平为 232 U/mL,均低于 48 混样检测方式的检测下限(HBV 144 U/mL、HCV 960 U/mL)。

总计有 9 份 HBV、13 份 HCV、1 份 HIV 背景为酶联免疫阳性,但 6 混样、48 混样及单检定量核酸检测均阴性;整体酶联免疫背景和核酸的符合率分别为 72.73%、53.36%、95.24%。结合大量临床研究结果表明,酶联免疫检测和核酸方法检测的结果存在一定的不一致性^[9-11],该研究符合率属于正常情况。

目前,核酸检测在临床实际检测应用中存在检测时间长、成本高的特点,根据本研究结果,临床可以结

合不同类别的献血人群^[12],在对突发大量采血或时间紧迫条件下,可考虑采用 48 混样的核酸检测方式。尤其是血液制品公司,目前按国家要求也必须在酶联免疫检测的基础上增加核酸筛查以进一步降低血液制品感染病毒的风险^[13-15],由于血液制品公司的血浆原料在生产中会加入去除及灭活病毒工艺,病毒传播的风险比血站低很多,但其标本检测时间更集中,检测量更大,如何保证短时间内完成大量标本检测,降低检测成本,是血液制品公司面临的主要问题,本研究的 48 混样核酸检测方式对我国的血站血浆病原筛查具有很好的借鉴意义。

参考文献

[1] LAPERCHE S. Blood safety and nucleic acid testing in Europe[J]. *Eurosurveill*,2005,10(1):3-4.

[2] 彭冬菊. 血液批放行实施过程中的思考[J]. *中国输血杂志*,2012,24(5):495-496.

[3] 孟忠华,杨劲,周华平,等. 血液批放行的模式和运作[J]. *中国输血杂志*,2008,20(6):477-478.

[4] 申俊锋,周晓泉,刘玉姣,等. 血站血液“批放行”新模式的探索[J]. *贵州医药*,2010,31(1):77-78.

[5] 郭永建,王鸿捷,林豪,等. 实施血液批放行,提升血液安全新高度[J]. *中国输血杂志*,2008,20(3):232-235.

[6] 李燕红,王敏,冯艳红,等. 如何避免血液报废的几点体会[J]. *中国卫生产业*,2011,9(9):172-173.

[7] 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.

[8] 王庆敏,蒋昵真,朱绍汶,等. 室间质评标本混样核酸检测模式的探讨[J]. *中国输血杂志*,2012,24(25):90.

[9] 李玉泉. 核酸检测与酶免检测平行筛查血液的效果评价[J]. *中国卫生产业*,2016,14(29):92-94.

[10] 毛慧. 血液核酸检测和酶联免疫检测的误区分析[J]. *临床合理用药杂志*,2016,9(22):141-142.

[11] 赵红娜,王艺芳,等. 郑州地区无偿献血者中核酸检测的初步应用[J]. *中国输血杂志*,2014,26(9):923-926.

[12] 汪小华,王小万,谷洋. 无偿献血人群特征与行为分析[J]. *临床输血与检验*,2007,9(4):346-349.

[13] 刘伟雄,王坚,葛文超,等. PCR 检测病毒核酸在血制品生产中的应用[J]. *中国输血杂志*,2004,16(6):415-417.

[14] 白坚石,王威,朱文斯,等. 原料血浆混样 HCV/HIV-1 核酸检测的方法学研究[J]. *中国输血杂志*,2003,15(5):309-312.

[15] 白坚石,王威. 核酸检测技术的应用与血液制品的安全保障[J]. *中国输血杂志*,2003,15(5):301-302.