

核酸检测实验室研究专题·论著 DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.15.001

核酸检测技术在中山地区血液筛查中的应用*

廖艳婷,孙爱农,李 乔

广东省中山市中心血站检验科,广东中山 528400

摘要:目的 探讨在中山地区献血者血液筛查中应用核酸检测技术的必要性及效果。方法 选用 2 种酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂检测 2015 年 8 月至 2019 年 12 月中山地区献血者标本,对其中无反应性或单试剂反应性标本进行核酸检测。结果 对 203 836 例 ELISA 双试剂无反应性标本进行核酸检测,共检出核酸反应性标本 223 例,其中乙型肝炎病毒 DNA 220 例,丙型肝炎病毒 RNA 3 例,未检出人类免疫缺陷病毒 RNA。对 575 例 ELISA 单试剂反应性标本进行核酸检测,共检出 18 例乙型肝炎病毒 DNA 反应性标本。ELISA 双试剂无反应性标本和单试剂反应性标本的核酸反应率分别为 1.09% 和 31.30%,核酸检测 Ct 均值分别为 37.42 ± 18.73 和 34.36 ± 2.65 ,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 核酸检测技术在献血者血液安全筛查中的应用,可以提高病毒检出率,缩短病毒检测“窗口期”,发现隐匿性病毒感染,降低输血相关病毒感染风险。

关键词: 献血者; 血液筛查; 核酸检测; 中山地区

中图分类号:R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)15-2113-04

Application of nucleic acid detection technology in blood safety screening in Zhongshan area*

LIAO Yanting, SUN Ainong, LI Qiao

Department of Clinical Laboratory, Zhongshan Central Blood Station,

Zhongshan, Guangdong 528400, China

Abstract: Objective To explore the necessity and effect of nucleic acid detection technology in blood screening of blood donors in Zhongshan area. **Methods** Two kinds of ELISA reagents were used to detect the samples of blood donors in Zhongshan area from August 2015 to December 2019, among which non reactive or single reagent reactive samples were used for nucleic acid detection. **Results** A total of 223 nucleic acid reactive samples were detected in 203 836 ELISA double reagents non reactive samples, including 220 cases of hepatitis B virus DNA, 3 cases of hepatitis C virus RNA, and no human immunodeficiency virus RNA was detected. A total of 18 hepatitis B virus DNA reactive samples were detected in 575 ELISA single reagent reactive samples. The reaction rate of nucleic acid was 1.09% and 31.30% in the double reagents non reactive samples and the single reagent reactive samples, and the Ct of nucleic acid detection was 37.42 ± 18.73 and 34.36 ± 2.65 , respectively, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The application of nucleic acid detection technology in blood safety screening of blood donors can improve the detection rate of virus, shorten the "window period" of virus detection, find hidden virus infection, and reduce the risk of blood transfusion related virus infection.

Key words: blood donors; blood screening; nucleic acid detection; Zhongshan area

输血安全是全球关注的问题,乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)和人类免疫缺陷病毒(HIV)能通过输血传播,是输血安全重点监测的病原微生物。如何降低经输血传播病毒风险是输血医学一大难题和研究方向。随着科技水平的不断进步,核酸检测技术广泛应用,按《血站技术操作规程(2015版)》要求,中山市中心血站自 2015 年 8 月起对

HBV、HCV 和 HIV 项目开展核酸检测,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 标本来源 选取 2015 年 8 月至 2019 年 12 月中山地区无偿献血者标本。每位献血者留取标本 2 份,一份为乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)真空抗凝管留取的 5 mL 血液,用于酶联免疫吸附试验(ELISA)等常规试验。另一份是带分离胶的真空抗凝管留取的

* 基金项目:广东省中山市社会公益科技研究项目(2016B1096)。

作者简介:廖艳婷,女,副主任技师,主要从事血液安全检测研究。

8 mL 血液,用于核酸检测,在采血后 4 h 内,2 200×g 离心 10 min,标本 2~8 °C 保存,72 h 内完成检测。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 主要仪器 TECAN 全自动加样仪;BEP III 和 FAME24-20 全自动酶联免疫分析仪;罗氏 Cobas 201 全自动核酸检测分析系统,包括 Hamilton Micro-lab STAR 加样仪、Cobas AmpliPrep 核酸提取仪、Cobas TaqMan 核酸扩增仪。

1.2.2 主要试剂 乙型肝炎表面抗原(HBsAg) ELISA 试剂(珠海丽珠和厦门新创);抗-HCV(HCV-Ab) ELISA 试剂(珠海丽珠和北京万泰);HIV(Ag/Ab1+2) ELISA 试剂(美国伯乐和北京万泰);Cobas MPX 2.0 核酸检测试剂(美国罗氏)。试剂均在有效期内使用,严格按试剂盒说明书进行操作和结果判定。

1.3 方法 采用 2 种 ELISA 试剂对献血者标本进行 HBsAg、HCV-Ab 及 HIV(Ag/Ab1+2)检测,无反应性或单试剂反应性标本采用罗氏核酸筛查试剂进行 6 人份混样检测,混样检测为有反应性则进行拆分检

测,拆分检测有反应性的标本判定结果为不合格。

1.4 统计学处理 采用 SPSS23.0 软件进行统计学分析,计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ELISA 双试剂无反应性标本核酸检测情况及趋势 2015 年 8 月至 2019 年 12 月 ELISA 双试剂无反应性标本共 203 836 例进行核酸检测,检出核酸反应性标本 223 例,其中 HBV-DNA 220 例,HCV-RNA 3 例,未检出 HIV-RNA 反应性标本,核酸反应率为 1.09%。不同年份间核酸检测反应率比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 1.865, P = 0.761$)。见表 1。

2.2 ELISA 单试剂反应性标本核酸检测情况 ELISA 单试剂反应性标本共 575 例进行核酸检测,检出核酸反应性标本 18 例,均为 HBV-DNA 反应性标本,反应率为 31.30%。ELISA 双试剂无反应性标本与单试剂反应性标本核酸反应率比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 419.097, P < 0.001$)。见表 2。

表 1 ELISA 双试剂无反应性标本核酸检测情况

时间	标本数(n)	核酸检测反应性标本数(n)				合计	反应率(%)
		HBV-DNA	HCV-RNA	HIV-RNA			
2015 年 8—12 月	18 513	21	0	0	21	1.13	
2016 年	45 732	50	1	0	51	1.12	
2017 年	45 253	54	2	0	56	1.24	
2018 年	46 871	50	0	0	50	1.07	
2019 年	47 467	45	0	0	45	0.95	
合计	203 836	220	3	0	223	1.09	

表 2 ELISA 单试剂反应性标本核酸检测情况

项目	ELISA 单试剂反应性标本数(n)						核酸反应性标本数(n)	反应率(%)
	2015 年 8—12 月	2016 年	2017 年	2018 年	2019 年	合计		
HBsAg	26	64	25	32	33	180	16	88.89
HCV-Ab	25	63	90	19	20	217	2 ^a	9.22
HIV(Ag/Ab1+2)	14	60	35	40	29	178	0	0.00
合计	65	187	150	91	82	575	18	31.30

注:^a表示 2 例 ELISA、HCV-Ab 反应标本核酸结果为 HBV-DNA 反应。

表 3 核酸反应性标本 Ct 值分布情况[n(%)]

Ct 值	ELISA 双试剂无反应性	ELISA 单试剂反应性
<30	1(0.45)	1(5.56)
30~<35	68(30.49)	8(44.44)
35~<40	146(65.47)	9(50.00)
≥40	8(3.59)	0(0.00)
合计	223(100.00)	18(100.00)

2.3 核酸反应性标本的扩增情况 ELISA 双试剂无反应性标本和单试剂反应性标本共有 241 例核酸反应性标本,Ct 值 35~<40 的有 155 例,占 64.32% (155/241),2 组 Ct 均值分别为 37.42±18.73 和 34.36±2.65。ELISA 单试剂反应性标本与无反应性标本的核酸反应性标本 Ct 均值之间比较,差异有统计学意义($t = 55.540, P < 0.001$)。见表 3。

3 讨 论

中山市中心血站从 2015 年 8 月把核酸检测技术应用到献血者血液筛查中,截至 2019 年 12 月,对 203 836 例 ELISA 双试剂无反应性标本进行核酸检测,共检出核酸反应性标本 223 例,总反应率为 1.09%,略低于东莞市的 1.26%^[1],明显高于上海地区的 0.75%^[2]。这一结果表明,虽然血清学检测已大幅度降低经输血感染病毒的风险,但仍有漏检情况发生,造成极大的输血安全隐患^[3]。对于献血者血液筛查模式在血清学检测的基础上增加核酸检测是有必要的,有效地保障了血液安全。对于不同地区的核酸检测反应率的差异,考虑与地区之间的病毒流行率差异有关,也可能与使用核酸试剂不同有关。本研究使用的 MPX 2.0 核酸联合检测试剂的灵敏度优于上一代试剂^[4],可有效降低 HBV 输血残余风险。

有报道全球的 HBsAg 流行率为 3.9%,而我国的流行率高达 6.1%^[5],降低 HBV 传染流行风险仍是我国现阶段输血界有待攻克的难题。本研究检出核酸反应性标本 223 例,其中 HBV-DNA 220 例,占 98.65%(220/223),表明输血传播 HBV 残余风险明显高于 HCV 和 HIV。HBV-DNA 反应性的原因复杂多样,主要有隐匿性感染、病毒感染“窗口期”、DNA 变异等。隐匿性感染是由于病毒变异、感染者自身免疫等因素导致 HBsAg 的结构改变或合成降低,血清 HBsAg 呈阴性,但血清或肝组织中仍可检出 HBV-DNA。有研究发现,单 HBV-DNA 反应性献血者中有 90%以上是隐匿性 HBV 感染^[6]。人体感染病毒后需要一段时间才能检测出病毒抗体,而核酸检测是在分子生物学水平直接检测病原体核酸,具有特异度高及灵敏度高的优点。本站检测出的 3 例 HCV-RNA 反应性标本对应献血者有可能正处于感染“窗口期”。所以核酸检测可大大缩短病毒检测的“窗口期”,发现隐匿性感染,减少 ELISA 造成的漏检,进一步提高血液安全性^[7]。

本研究回顾分析 2015 年 8 月至 2019 年 12 月核酸检测情况,不同年份间核酸反应率的差异无统计学意义($P>0.05$)。分析原因可能为:一方面,与中山市中心血站质量体系的不断完善有关,从标本采集到血液检测,有效控制每个关键点,科室注重培训工作,实验人员操作技术成熟,核酸检测工作开展运行一直顺畅,假阳性结果比较少;另一方面,与中山地区献血人群有关,由于中山地区无偿献血团体和固定献血者比例大,故核酸反应率维持在比较平稳的状态。

本研究对 575 例 ELISA 单试剂反应性标本进行核酸检测,发现核酸反应性标本有 18 例,均为 HBV-DNA 反应性,反应率为 31.30%,明显高于 ELISA 双试剂无反应性标本的核酸反应率(1.09%),2 组标本

核酸反应率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。因此,对于罗氏 Cobas 201 血液核酸筛查平台,ELISA 等常规试验合格后再进行核酸检测的血液筛查策略是合适的,可以减少核酸拆分的次数,从而降低核酸实验室污染风险,减少检验人员工作量,同时节省检测成本。有报道指出,ELISA 检测 HBV、HCV 单试剂阳性,其假阳性率较高^[8],从表 2 可以看出,2017—2019 年,HBsAg 和 HIV(Ag/Ab1+2)单试剂反应例数相对稳定,而 HCV-Ab 单试剂反应性标本 2017 年明显增多,可能与人员操作、ELISA 试剂质量、标本等有关。有报道细菌、真菌污染及正常血浆蛋白等因素均可引起非特异性反应,导致结果呈假阳性^[9]。由于 4 代 HCV-Ab 试剂灵敏度和特异度较 3 代更佳^[10],通过加强人员培训,更换 4 代试剂,加强控制标本质量后,2018 年和 2019 年的 HCV-Ab 单试剂反应性标本大幅度减少。由于假阳性结果既造成宝贵血液资源的浪费,也给献血者带来心理压力,因此,在血液筛查中加入核酸检测,不仅对献血者检测结果反馈工作有指导意义,同时还为 ELISA 试剂选用提供有力证据,假阳性结果减少,自然减少血液的浪费。

本研究结果显示,ELISA 双试剂无反应性标本和单试剂反应性标本的 Ct 均值分别是 37.42 ± 18.73 和 34.36 ± 2.65 ,2 组标本的均值差异有统计学意义($P<0.05$),后者病毒含量较高。在 ELISA 双试剂无反应性标本中,Ct 值 $35\sim <40$ 占 65.47%,而 Ct 值 $30\sim <35$ 占 30.49%,两者相差 1 倍多;在 ELISA 单试剂反应性标本中,Ct 值 $35\sim <40$ 占 50.00%,而 Ct 值 $30\sim <35$ 占 44.44%,两者相近。核酸检测在标本病毒含量极低时,有可能正好未能吸取到病毒核酸而导致核酸结果假阴性^[11],同时,注意核酸标本检测前处理和检测时效,避免病毒的降解造成核酸检测假阴性结果。

综上所述,核酸检测在血液安全筛查中的应用,可大大提高无偿献血者病毒检出率,有效弥补血清学检测的局限性,但核酸检测仍不能替代 ELISA 检测,两者在降低输血相关病毒感染风险中发挥互补作用,这是血液筛查检测的重要策略。

参考文献

- [1] 何子毅,余霖,王庆,等.核酸检测技术在不同血液安全筛查模式的应用分析[J].中国输血杂志,2016,29(7):693-694.
- [2] 高智俊,蔡茵,唐晴钧,等.病毒核酸检测在无偿献血者中的应用及其质量控制方法的探讨[J].临床输血与检验,2018,20(18):2799-2802.
- [3] 林玉蓓,鲁思文,项汉城,等.ELISA 联合核酸检测技术对血液筛查的应用价值和输血残余风险的对比分析[J].贵州医药,2016,40(11):1212-1214. (下转第 2118 页)

用不规范、初始耐药、人口流动性、治疗管理不善等多种因素有关,我国耐多药结核病患者人数逐年增加,已成为该疾病的高负担国家之一^[6]。耐多药结核病的治疗十分困难,治疗成本较高,因此,快速准确地对结核分枝杆菌耐药性进行检测,以便制订合理、有效的治疗方案,有助于提高疾病的治疗效果,并降低耐药菌传播的风险^[7]。传统药敏试验是耐多药结核病诊断的“金标准”,但是该方法检测所需时间长,时效性较差,在一定程度上限制了其临床应用。线性探针技术是利用多重 PCR 扩增反应原理,针对异烟肼和利福平耐药常见基因突变位点而设计探针,是一种快速的分子生物学诊断方法,有利于结核病耐药情况的早期筛查和诊断,目前已在很多地区得到推广应用^[8-10]。

本研究发现,线性探针技术对异烟肼耐药性(21.46%)、利福平耐药性(24.29%)及耐多药结核病(20.24%)的检出率与药敏试验差异无统计学意义($P>0.05$),并且线性探针技术对异烟肼耐药性、利福平耐药性及耐多药结核病检测的灵敏度、特异度、准确性及约登指数也均较高,这与以往研究结果一致^[11-12],说明线性探针技术在耐多药结核病的早期诊断方面具有较好的临床应用价值,为疾病的及时、有效治疗提供保障。

综上所述,线性探针技术作为一种辅助诊断技术,对耐多药结核病检测的灵敏度、特异度及准确性均较高,能准确、快速诊断结核分枝杆菌对利福平、异烟肼的耐药性及多药耐药性,与传统的药敏试验检测结果具有高度的一致性,对于耐多药结核病的早期诊断具有重要意义。

参考文献

[1] 赵誉洁,闫凯,陈金瓯,等.耐多药肺结核患者生命质量及

(上接第 2115 页)

- [4] 朱为刚,王立林,聂冬梅,等.核酸检测试剂 cobas MPX v2.0 降低输血 HBV 残余风险的评估[J].中国输血杂志,2016,29(6):574-577.
- [5] The Polars Obervatory Collaborates. Global prevalence, teament, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016: a modelling study[J]. Lancet Gastroen Hepatol, 2018,3(6):383-403.
- [6] FANG Y, SHANG Q L, LIU J Y, et al. Prevalence of occult hepatitis B virus infection amanghepatopathy patients and healthy people in China[J]. J Infent, 2009, 58(5): 383-388.
- [7] 张锋,张琼,林碧,等.血清学联合核酸检测在献血者血液筛查中的互补性[J].中国艾滋病性病,2016,23(3):197-199.

其影响因素分析[J].中国防痨杂志,2019,41(1):88-94.

- [2] 许璐,孙一鑫,詹思延.线性探针技术诊断耐药肺结核准确性的 Meta 分析[J].中华流行病学杂志,2018,39(11): 1491-1495.
- [3] 陈丽,秦玉宝,邹剑,等.线性探针技术检测结核分枝杆菌耐药性的效果分析[J].结核病与肺部健康杂志,2018,7(1):49-53.
- [4] 赵雁林,王黎霞.结核分枝杆菌药物灵敏度试验标准化操作程序及质量保证手册[M].北京:人民卫生出版社,2013:25.
- [5] 赵雁林.结核病实验室诊断技术培训教程[M].北京:人民卫生出版社,2014:184-188.
- [6] 陈华昕,于志明,郑建,等.耐多药肺结核患者预后的影响因素分析[J].医学临床研究,2018,35(11):2192-2194.
- [7] 侯婧,韩菁,张艳,等.线性探针技术检测肺结核患者耐药情况临床评价[J].中国药业,2019,28(2):23-26.
- [8] 钟业腾,林翀,陈灼霖,等.线性探针技术在海南省结核病诊断及耐药性检测中的应用[J].中国热带医学,2019,19(7):662-666.
- [9] 李树涛,杨鹤,关文龙,等.线性探针技术在新疆耐药结核病诊断中的应用评价[J].疾病预防控制通报,2018,33(6):83-85.
- [10] 刘昕亮,曹铸,牟怀德,等.乐山市应用线性探针法快速检测耐药结核病研究[J].预防医学情报杂志,2019,35(9): 1005-1008.
- [11] 张海燕,缪家文,潘洪秋,等.应用线性探针杂交技术快速检测结核分枝杆菌的多药耐药性[J].江苏大学学报(医学版),2017,27(6):539-541.
- [12] 杨健,庄贵华,王西娣,等.线性探针技术在耐多药结核病诊断中的应用评价[J].检验医学与临床,2016,13(10): 1336-1338.

(收稿日期:2019-12-11 修回日期:2020-04-09)

- [8] 马晓军,杨仍勇,李治鹏.乙型肝炎、丙型肝炎单试剂检测阳性献血者的分析[J].检验医学与临床,2019,16(8): 1107-1109.
- [9] LINNEN J M, DERAS M L, CLINE J, et al. Performanceevaluation of the PROCLEIX West Nile virus assayon semi-automated and automated systems[J]. J Med Virol, 2007,79(9):1422-1430.
- [10] 徐志华,张永,周军兵.国产酶免疫双抗原夹心法检测丙型肝炎病毒抗体试剂的应用于分析[J].中国输血杂志, 2017,(11):1285-1287.
- [11] 李云,夏正武,瞿良.乙型肝炎血清学标志物与 HBV DNA 的相关性分析[J].国际检验医学杂志,2011,32(4):442-443.

(收稿日期:2019-12-15 修回日期:2020-04-22)