

血液病毒核酸检测在集中化检测实验室的应用

郑显良,吴娇婵,赵 静(海南省血液中心检验科,海口市 570311)

【摘要】 目的 对病毒核酸检测与酶联免疫检测结果进行对比分析,探讨病毒核酸检测效果,同时探讨血液检测假阳性所引起的血液报废问题。**方法** 对无偿献血者血样进行乙型肝炎表面抗原、丙型肝炎病毒抗体和艾滋病抗体双试剂酶联免疫吸附试验(ELISA)筛查。同时,所有血样进行病毒核酸检测(NAT),对海口和分中心血样检测结果进行比较分析。**结果** 对海口 58 786 份和分中心 30 476 份血样进行检测,发现长途运输标本并没有影响 NAT 阳性检出率($P>0.05$);ELISA 单试剂检测阳性或灰区引起的血液报废高达 0.9%,NAT 单独阳性而鉴别试验阴性引起血液报废的占 0.2%,而在这部分血液标本中存在一些 NAT 检测假阳性因素。**结论** NAT 检测适用于血站集中化检测实验室,可以降低输血风险;同时也应重视血液检测假阳性所带来的健康血液报废问题。

【关键词】 酶联免疫; 病毒核酸检测; 血液检测
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.18.059 文献标志码:B 文章编号:1672-9455(2013)18-2458-02

输血相关传染病的预防和控制已经成为全社会关注的焦点问题。输血传播疾病有 20 多种,其中以病毒传染为主,在我国最引起社会关注为乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)和人类免疫缺陷病毒(HIV)。目前,血站对所有采集的血液使用酶联免疫吸附试验(ELISA)双试剂检测乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、丙型肝炎病毒抗体(抗-HCV)和艾滋病毒抗体(抗-HIV)。然而,由于血清转换窗口期、病毒变异、非典型血清学转阳过程与免疫沉默等现象的存在^[1],病毒阳性献血者仍然存在漏检现象。因此,核酸检测技术的引进进一步提高了血液安全。本文对血液病毒核酸检测与酶联免疫检测结果的作对比,来说明海南省集中化检测实验室核酸工作开展现况以及核酸检测存在的一些难题。

1 材料与方法

1.1 样本来源 2011 年 12 月至 2012 年 11 月海南省无偿献血者血样共 89 262 人份,采血后分别用上海科华公司的 5 mL 乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)真空抗凝管和美国 BD 公司的 5 mL PPT 试管留样。其中 5 mL EDTA-K₂ 真空抗凝管血样 24 h 内分离血浆,用于 ELISA 血液筛查;5 mL PPT 试管血样在 4 h 内分离血浆,用于 NAT 检测。

1.2 主要仪器 RSP-150 全自动样品处理系统(瑞士帝肯公司);BEP-III 全自动酶免分析系统(SIEMENS);Tigris-Ultrio 检测系统(美国 Gen-Probe Incorporated 公司);PROCLEIX 试剂制备培养箱(RPI)。

1.3 主要试剂 (1)ELISA 检测试剂盒 HBsAg(上海科华和北京万泰),HCV(上海科华和北京万泰),HIV(上海科华和法国伯乐)。(2)NAT 检测试剂盒 Procleix Ultrio Assay 检测试剂(美国诺华公司推广的 HBV、HCV、HIV-1 NAT 试剂盒,

Ultrio)。

1.4 方法

1.4.1 双试剂酶联免疫检测 将 48 494 份 5 mL EDTA-K₂ 真空抗凝管血样室温离心 15 min,分离血浆,用 RSP-150 全自动加样器和 BEP-III 全自动没面分析系统进行双试剂检测。

1.4.2 NAT 检测 (1)样品处理:将 89 262 份 5 mL PPT 试管血样采样后 4 h 内经 1 200 g、4 ℃离心分离血浆,2~8 ℃冰箱保存待检。(2)NAT 检测:海口本部 58 786 份血样在 24 h 内开始检测,48 h 内报告结果;分中心的 30 476 份血样由于长途托运,在 48 h 内开始检测,72 h 内报告结果。

1.4.3 通过对海口地区血样和下面分中心血样 NAT 单人份检测和 ELISA 检测结果的对比,来判断长途托运和检测时间是否影响了检测结果的准确性,评估开展 NAT 检测对海南省集中化检测实验室的可行性和有效性,以及开展 NAT 检测的必要性。

1.5 统计学方法 研究数据结果均采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,采用 χ^2 检验处理,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ELISA 和 NAT 阳性结果比较 见表 1。89 262 份血样按标本来源不同,分别做 ELISA 双试剂检测和 NAT 单人份检测,发现在 ELISA 方法阳性和阴性样本中 NAT 检出阳性率,海口与各分中心的检出率差异没有统计学意义($P>0.05$),特别是在 HCV 和 HIV RNA 病毒中的检出率并没有统计学差异,所以长途托运及检测时间基本没影响到 NAT 的阳性检出率。

表 1 样本 ELISA 和 NAT 阳性结果比较

采血点	样本量 (份)	HBV			HCV			HIV		
		EIA+NAT+	EIA+NAT-	EIA-NAT+	EIA+NAT+	EIA+NAT-	EIA-NAT+	EIA+NAT+	EIA+NAT-	EIA-NAT+
海口	58 786	330	58	37	55	28	0	5	0	0
分中心	30 476	280	51	32	35	13	1	1	0	1
总量	89 262	610	109	69	90	41	1	6	0	1

注:经 χ^2 检验,海口与分中心血样 NAT 阳性在各组中的检出率的差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 ELISA 单试剂检测阳性与 NAT 检测结果比较 见表 2。89 262 份血样 ELISA 双试剂检测和 NAT 单人份检测结果发现,在 791 份 ELISA 单试剂阳性血样中有 19 份被 NAT 检测阳性。

表 2 ELISA 单试剂检测阳性与 NAT 检测结果比较		
	EIA 单试剂阳性 NAT 阳性	EIA 单试剂阳性 NAT 阴性
HBV	17	347
HCV	1	184
HIV	1	241

2.3 对 ELISA 双试剂检测阴性, NAT 检测阳性血样进行分析 见表 3。NAT 检测存在不可忽视的假阳性问题。

表 3 ELISA 阴性、NAT 阳性样本核酸鉴别试验结果		
	鉴别试验阴性	鉴别试验阳性
NAT 三联检测阳性(1<S/CO<3)	51	2
NAT 三联检测阳性(S/CO>3)	209	72

3 讨 论

从 89 262 份无偿献血者血样检测中发现,有 0.17% 献血者 ELISA 双试剂检测阳性,但是 NAT 未检测出来,分析主要由于以下几个原因:(1)可能血清中存在的 HBsAg 是由 HBV DNA 整合到人染色体与宿主基因共同表达所致^[2];(2)病毒核酸变异;(3)HBV 病毒在血清中 DNA 含量较低,而 HBsAg 含量高,ELISA 可以检测到;(4)HCV 感染产生抗体,但是血清中并没有 HCV RNA 存在;(5)也存在操作失误所引起的漏检,特别是 RNA 病毒容易受外界环境因素影响而导致破坏,如剧烈震荡,在室温时间过长,未及时分离血浆等。所以标本质量是确保核酸扩增检测的前提。

在 791 份单试剂阳性的样本中,有 19 份 NAT 检测阳性,其余 772 份可能是由于病毒变异,患者不合理用药或病毒双重感染引起的单试剂阳性,也有大部分原因是由于 ELISA 试剂的非特异性反应引起的假阳性结果。在 ELISA 阴性样本中, NAT Ultrio 检测 1<S/CO<3 的有 51 份,鉴别阳性率不到 4%,这部分样本结果有待于确认,是否由于操作失误或随机误差引起的假阳性。在 89 262 份血样中,有 0.2% 的血液报废是由于 NAT 单项阳性,但是鉴别后为阴性结果。

综上所述,NAT 检测缩短了病毒检测的窗口期,自 2011 年 11 月开展核酸检测以来,本实验室发现 69 例 HBV-DNA 阳性,但是 ELISA 未检出,存在 ELISA 漏检现象。而 HBsAg 检测阴性的窗口期感染的献血者血液或 HBsAg 检测阴性抗-HBc 阳性的献血者血液,可以导致受血者感染 HBV,即现有的血液检测体系存在 HBV 的漏检^[2],虽然酶免试剂盒质量在不断提高,患者出现输血后感染疾病的风险已经很低,但是, HBsAg 检测阴性所致的 HBV 输血感染占较大的比例^[3-4]。特别是在海南,HBV 的感染率较高,再加上目前大多数患者都经过不合理的药物治疗,引起了 HBV 病毒的突变,或隐性 2 型肝炎病毒感染 OBI 感染。近几年,OBI 越来越受到关注^[5],其低病毒量对输血安全造成一定的隐患。有报道指出,输注了 OBI 献血者的血液后,有近 20% 的概率受感染,受血者体内出

现 HBsAg 或 HBV-DNA,而没受感染的也占近 30%,故 OBI 对输注是否造成影响,亦与受血者的免疫状态有关^[6]。避免 HBV 输血传播是一项非常艰巨的任务。NAT 检测可以检出 ELISA 方法漏检的一部分隐性感染者,所以开展 NAT 检测颇为重要。但是 NAT 检测并不能完全取代 ELISA 方法检测,因为 NAT 检测也受到各种因素的影响,如核酸检测窗口期、病毒核酸变异,病毒含量较低以及实验操作问题等,都会导致 NAT 检测假阴性的出现^[7]。从方法学角度看,两者只能起到与血清学互补的作用。

至 2011 年 12 月 NAT 检测开展以来,已经检测到 69 例 LEISA 漏检的 HBV 感染者。海南省血液中心是全国惟一个集中化检测的血站,对于下面市县的样本采集,运送,处理已经有一套完整的体系文件,研究表明了下级市县的样本检测与海口地区在 NAT 检测结果上没有统计学差异。有研究表明,在样品运送和保存中可以保持 RNA 完整性^[8],因此造成 RNA 降解的主要环节可能在 RNA 的提取过程,说明集中化检测并没有影响 NAT 检测的开展,进一步证实了开展血液病毒核酸检测的必要性和有效性。

与此同时,面对当前血源紧缺的现状,如何减少开展 NAT 检测后假阳性引起的血液报废。作者认为:(1)NAT 检测室严格控制实验室气流,工作人员勤换手套,严格遵守标准操作规程,积极做好日常的消毒清洁工作,特别是开臭氧消毒,对仪器内部的消毒以及环境消毒很有效;(2)对仪器设备的维护保养是确保试验准确的关键;(3)有必要对 ELISA 双试剂阴性但 NAT 低值阳性血样做进一步调查评估,以作出更好的对策。