

核酸检测技术在唐山地区献血者血液筛查中的应用*

曹晓¹, 曹庆宝², 李杰^{3△}, 张国强¹, 常在娟¹ (1. 河北省唐山市中心血站 063000; 2. 河北省唐山市第三医院 063100; 3. 中山大学孙逸仙纪念医院, 广州 510120)

【摘要】 目的 探讨核酸检测(NAT)技术应用于献血者血液筛查过程中的必要性。方法 采用上海浩源生物科技有限公司罗氏血筛核酸检测系统,对2010年12月15日至2013年6月20日唐山市中心血站常规ELISA检测合格的献血者190 175份标本进行人类免疫缺陷病毒(HIV)、丙型肝炎病毒(HCV)和乙型肝炎病毒(HBV)3项联合筛查,并对NAT筛查阳性的标本做确证试验。结果 190 175份血清学全部合格的血液标本中,经过核酸检测为阳性的血液共77份,阳性检出率为0.40%(77/190 175)。其中,57例HBV-DNA阳性标本,15例HBV-DNA阴性标本,检出1例HIV-RNA阳性标本,未检出HCV-RNA阳性标本,确证试验中阳性检出率为79.45%(58/73)。结论 NAT系统应用于献血者血液筛查有助于提高血液及输血安全。

【关键词】 核酸检测; 人类免疫缺陷病毒; 丙型肝炎病毒; 乙型肝炎病毒; 血液筛查

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.05.024 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)05-0634-02

血液及血液制品的安全,越来越受到社会的重视。为保障输血安全,预防及控制输血传染病的传播,各采供血机构不断更新血清学检测试剂,不断提高血液检测技术,缩短检测“窗口期”,预防和控制输血相关传染病,降低输血传播病毒的风险。现行的血液检测方法中,血清学检测技术仍存在较长的“窗口期”。核酸检测(NAT)技术作为一种新兴的血液传染病检测方法,逐渐在国内各采供血机构推广。本站作为卫生部NAT试点之一,自2010年12月开始对常规血清学筛查合格的唐山地区无偿献血者血液进行HBV-DNA、HCV-RNA和HIV-RNA检测,现将结果报道如下。

1 材料与与方法

1.1 标本来源 选取2010年12月15日至2013年6月20日唐山市中心血站常规血清学筛查合格的血液标本共190 175份。采血后每人留取2管标本:7 mL真空EDTA-K₂抗凝采血管(用于血清学检测),5 mL带分离胶真空EDTA-K₂抗凝采血管。核酸检测管在4 h内离心,离心条件为2 000×g,20 min。采血后将标本放在2~8℃临时保存。

1.2 方法 (1)ELISA检测。对献血者血液标本采用2种ELISA试剂平行检测乙型肝炎(乙肝)表面抗原(HBsAg)、抗-HCV、抗-HIV1/2、梅毒螺旋体抗体和丙氨酸氨基转移酶(ALT),操作中严格按照试剂说明书和本站操作规程进行操作。(2)核酸检测。经血清学检测合格的标本,采用Cobas s201核酸检测系统(6个标本×167 μL血浆汇集为1个测试共1 mL血浆)或上海浩源核酸检测系统(8个标本×150 μL血浆汇集为1个测试共1.2 mL血浆)进行核酸检测。每组检测均设有阴性对照、阳性对照(罗氏核酸试剂阳性对照;HBV/HCV/HIV-1-M/HIV-1-O/HIV-2;浩源核酸试剂阳性对照;HBV/HCV/HIV-1)和内对照。对混样结果为反应性的测试做进一步拆分检测,其中无反应性的标本判为核酸阴性,有反应性标本判为阳性,留取血浆袋和红细胞袋上的辨管再次检测,检测结果均为无反应性的标本,判为核酸阴性;辨管检测有一管或双管仍为反应性的标本判为核酸阳性。浩源核酸试剂结果可区分为HBV-DNA阳性、HCV-RNA阳性或HIV-RNA

阳性,罗氏核酸试剂暂不能区分是何种病毒呈阳性。

1.3 试剂与仪器 (1)试剂。HBsAg(沈阳惠民公司、英科新创公司)、抗-HCV检测(上海科华公司、北京万泰公司)、抗-HIV1/2检测(北京万泰公司、法国伯乐公司,均为4代试剂,可检测P24抗原;珠海丽珠抗体检测)和梅毒检测(北京万泰公司、珠海丽珠公司)ELISA试剂盒;ALT检测试剂(日本和光公司、四川迈克公司);核酸检测试剂:上海浩源核酸检测试剂和美国罗氏核酸试剂、蛋白印迹确证试剂。(2)仪器。ELISA检测:深圳爱康Xantus全自动加样仪、Uranus AE 200全自动酶免一体机、全自动酶免分析仪(FAME);ALT检测:7600-010全自动生化分析仪;核酸检测:Cobas s201核酸检测系统(Hamilton STAR全自动混样仪、Cobas Ampliprep全自动核酸提取仪、Cobas TaqMan实时荧光扩增分析仪)及相应配套耗材,上海浩源核酸检测系统(Hamilton STAR全自动混样仪、Ezbead System-32核酸提取仪、ABI7500实时荧光扩增分析仪)及相应配套耗材;采血管:ELISA检测留样管(沧州永康公司)、核酸检测留样管(美国BD公司);一次性无菌带滤芯的混样加样针;离心机;全自动脱盖机。

1.4 核酸阳性标本的确证 核酸阳性标本血浆采用罗氏核酸定量检测系统做病毒核酸定量检测,并对HBV、HCV和HIV的分项进行确证检测,采用罗氏电化学发光检测系统对乙肝“两对半”进行检测。对HIV-RNA阳性献血者进行追踪采血,除进行ELISA、核酸定量检测外,同时采用蛋白印迹确证试剂进行确证检测。

1.5 统计学处理 采用WHONET 5.6统计软件进行分析,百分率之间的比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 核酸检测结果 ELISA检测合格的献血者标本190 175份进行核酸检测,筛检出混样、拆分和辨管检测结果均是阳性的标本77例,阳性检出率为0.40%(77/190 175)。

2.2 确证试验及定量检测结果 核酸阳性血浆用罗氏核酸定量检测系统做病毒核酸定量检测及HBV、HCV和HIV的分

* 基金项目:广东省自然科学基金资助项目(S2012040008068);广东省科技计划生物技术领域项目(2010A030100011-06)。

△ 通讯作者, E-mail: lijie@mail.sysu.edu.cn。

项确证检测, 确认试验结果中有 57 例 HBV-DNA 阳性标本, 15 例 HBV-DNA 阴性标本, 检出 1 例 HIV-RNA 阳性标本, 未检出 HCV-RNA 阳性标本, 确证试验中阳性检出率为 79.45% (58/73), 有 4 例标本因脂肪浆报废和标本量不够未做罗氏定量确证检测及乙肝“两对半”检测, 见表 1。

2.3 乙肝“两对半”结果 乙肝标志物 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb 检测中, 全阴性标本 11 例 (19.3%),

单独 HBsAb 阳性 6 例 (10.5%), 单独 HBeAb 阳性或 HBcAb 联合其他标志物阳性 40 例 (70.2%)。

2.4 HIV-RNA 阳性献血者追踪结果 对检出的 HIV-RNA 阳性的献血者分别于献血后第 4 天、1 个月、2 个月进行追踪采血, 采用 ELISA、蛋白印迹确证试验、核酸定量进行检测。结果见表 2。

表 1 HBV、HCV 和 HIV 核酸检测结果

试剂种类	n	初筛检测 阳性数[n(%)]	未确认 标本数(n)	确认 标本数(n)	确认阳性数 n(%)	HBV-DNA (n)	HCV-RNA (n)	HIV-RNA (n)
浩源试剂	143 185	54(0.38)	3(HBV)	51	41(80.39)	40	0	1
罗氏试剂	46 990	23(0.49)	1	22	17(77.27)	17	0	0

注: 确认阳性标本的病毒载量结果中, 除 1 例 HIV-RNA 载量为 (2.00e+04 IU/mL), 1 例 HBV-DNA 载量为 2 520 IU/mL 外, 其余 HBV-DNA 阳性标本载量均小于 100 IU/mL, 最低载量小于 12 IU/mL。

表 2 HIV-RNA 阳性献血者追踪结果

采血间隔	酶免万泰试剂 4 代	酶免伯乐试剂 4 代	珠海丽珠 (抗体)	核酸定量	蛋白印记确证
献血采血	阴性	阴性	阴性	阳性	不确定
第 1 次追踪 (第 4 天)	阴性	阳性	阴性	阳性	不确定
第 2 次追踪 (1 个月)	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
第 3 次追踪 (2 个月)	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性

3 讨 论

本研究采用 Cobas s201 核酸检测系统和上海浩源核酸检测系统对本站 2010 年 12 月 15 日至 2013 年 6 月 20 日常规血清学筛查合格的献血者标本共 190 175 人份进行核酸检测。共检出 ELISA 合格但核酸阳性的标本 77 例, 阳性检出率为 0.40%。其中上海浩源核酸检测系统检出 54 例, 检出率约为 0.38%, 罗氏 Cobas s201 核酸检测系统检出 23 例, 检出率约为 0.49%。确证试验结果显示, 浩源试剂阳性标本中有 40 例 HBV-DNA 确证阳性, 1 例 HIV-DNA 确证阳性, 10 例 HBV-DNA 确证阴性, 3 例 HBV-DNA 阳性标本因标本量不足未做确认, 确认阳性率约为 80.39%; 罗氏试剂阳性标本中有 17 例 HBV-DNA 确证阳性, 5 例确证试验 HBV-DNA、HCV-RNA 和 HIV-RNA 均阴性, 1 例阳性标本因标本量不足未做确认, 确认阳性率约为 77.27%。两种试剂阳性检出率及确证阳性率近似。0.40% 的检出率与文献报道的江苏地区无偿献血者中隐匿性 HBV 0.80% 的感染率及深圳地区 0.49% 的感染率研究结果接近^[1-2], 而陈长荣等^[3]报道南方某城市献血人群隐匿性肝炎的感染率为 0.19%。宝鸡地区血液核酸筛查漏检率为 1.14% 及南宁地区血液核酸筛查阳性检出率为 0.14%, 可能是各地区感染情况不一造成^[4-5]。共 15 例核酸阳性标本确证结果阴性, 可能是由于标本在核酸检测过程中受到污染、鉴别确证平台的灵敏度比混检系统低、确证标本送检过程中病毒降解或血袋中保养液对低载量病毒血液的稀释等引起^[5]。

乙肝“两对半”检测结果显示, 有 11 例 (19.3%) HBV-DNA 阳性标本血清标志物均为阴性, 可能是“窗口期”感染病例, 也可能是 HBV 隐匿性感染者感染 HBV 后逐渐丢失了血清标志物, 或感染之初即丢失了标志物, 这一现象可在嗜肝病毒感染的土拨鼠模型上重现^[6]。Torbenon 等^[7]也报道超过 20% 的 HBV 隐匿性感染者血清乙肝标志物是阴性。本研究中单纯 HBsAb 阳性标本有 6 例 (10.5%), 既往认为 HBsAb

为保护性抗体, 在 HBsAb 阳性血样中也可检出 HBV-DNA, 不能排除隐匿性感染, 这在其他文献中也有报道^[8]。血清标志物中单纯 HBcAb 阳性或 HBcAb 联合其他标志物阳性的标本占 40 例 (70.2%), 有研究显示 HBcAb 与隐匿性乙肝感染有一定的相关性, 可以作为既往 HBV 感染的标志, 也可提示隐匿性 HBV 感染的可能^[9]。

本研究中, 浩源核酸检测试剂成功捕获了 1 例 HIV-RNA 阳性标本, 经过对该献血者的追踪检测, 证明该献血者献血时正处于“窗口期”感染。血清学 ELISA 检测在第 1 次追踪检测时, 进口伯乐试剂开始转阳, 而国产万泰试剂和丽珠试剂仍为阴性, 说明在献血后第 4 天, 血液中 P24 抗原已经转为阳性, 且进口试剂灵敏度高于国产试剂。第 2 次和第 3 次追踪检测时, 所有的血清学指标和蛋白印迹确证试验都转为阳性。有文献报道, 核酸检测技术能够缩短 HBV、HCV、HIV 感染的平均“窗口期”, 分别缩短 9、57、11 d, 缩短“窗口期”百分比分别 20%、82%、50%^[10]。在本研究中, 核酸检测将病毒检测“窗口期”提前了 4 d。

核酸检测技术在我国起步较晚, 发展水平较低, 但从各地检测报道和本站的检测结果来看, 核酸检测在血液筛查中的必然性和重要性逐步显现。国家卫生和计划生育委员会 (原卫生部) 关于印发全面推进血站核酸检测工作实施方案 (2013~2015 年) 的通知中, 明确规定到 2015 年, 血液筛查核酸检测基本覆盖全国。随着核酸检测技术在全国各采供血机构中陆续开展, 不断提高血液检测质量, 缩短病毒检测“窗口期”, 为社会提供安全、有效的血液, 保障患者生命安全。

参考文献

[1] 王庆敏, 蒋呢真, 肖建宇, 等. 江苏地区献血者隐匿性 HBV 感染情况调查 [J]. 临床输血与检验, 2012, 14(2): 119-120. (下转第 637 页)

2.2 两组患者术后 4 周及 12 月随访指标比较 术后 4 周及 12 月, 两组患者患膝关节的各项功能较治疗前均有显著改善, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且观察组患者与对照组比较改善更为明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 3 两组患者术后 4 周及 12 月随访指标比较 ($\bar{x} \pm s$, 分)

组别	n	术后 4 周	术后 4 周	术后 12 月	术后 12 月
		HSS 评分	VAS 评分	HSS 评分	VAS 评分
观察组	45	78.57 ± 2.27	3.39 ± 0.67	97.16 ± 5.29	1.32 ± 0.87
对照组	45	69.63 ± 3.76	4.17 ± 0.59	87.29 ± 3.58	2.16 ± 0.82
t		8.773	3.361	9.357	2.472
P		0.000	0.009	0.000	0.013

3 讨 论

OA 以进行性关节软骨退变为特征^[4], 滑膜在膝 OA 发生、发展过程中起到了重要作用, 关节滑膜组织炎症与关节损害和骨破坏进程密切相关, 是导致膝关节肿胀、疼痛的主要原因, 切除滑膜是挽救膝关节功能的重要手段。TKR 是一种安全、有效的膝关节功能重建方法, 资料显示 90% 的患者术后膝关节功能改善, 生活质量明显提高^[5]。目前滑膜切除术+全膝关节置换可明显改善关节疼痛肿胀和功能, 从而得到临床的普遍重视。

段鑫等^[6]通过研究认为滑膜是 OA 患者疼痛的重要来源, 滑膜在 OA 疾病的病理演变过程中发挥了“启动子”的作用, 在 TKR 术中切除滑膜是很有必要的。Furnes 等^[7]通过研究发现在 TKR 中切除滑膜和保留滑膜, 两组患者术后 26 周的 C-反应蛋白(CRP)、红细胞沉降率(ESR)水平等差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 认为 TKR 中切除滑膜中并不能缩短术后患膝的炎症反应期。彭玉兰等^[8]通过研究结果显示膝关节滑膜切除术后患者的 HAO 评分、ESR、CRP 等指标均有明显改善。骆宇春等^[9]研究结果显示在滑膜切除术后, 所有患者关节周围的骨破坏均有不同程度改善, 继发性骨关节炎得到好转。Robertsson 等^[10]研究结果表明在 TKR 中切除滑膜对患者的膝关节整体功能(HSS 评分)、VAS 评分均有改善, 值得临床推广。

本研究结果显示在 TKR 中切除滑膜患者隐性失血量、手术时间、引流量高于对照组患者, 差异有统计学意义 ($P <$

0.05); 手术后 4 周及 12 月, 观察组患者患膝关节的各项功能与对照组比较, 改善更为明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在 TKR 中切除滑膜不仅及时制止病变的发展, 而且最大限度地保留关节功能, 提高患者的生活质量状态, 值得在临床中推广应用。

参考文献

- [1] Russell GB, Graybeal JM. Hypoxemic episodes of patients in a postanesthesia care unit[J]. Chest, 1993, 104(3): 899-903.
- [2] 徐昭宇, 杨旭, 田少奇, 等. 滑膜切除对全膝关节置换术后失血及功能恢复的影响[J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7(4): 1553-1556.
- [3] 易显树. 人工全膝关节置换治疗老年股骨颈骨折 36 例疗效观察[J]. 四川医学, 2012, 33(8): 1469-1470.
- [4] 陈福灵. 膝关节骨性关节炎的治疗进展[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(12): 1596-1598.
- [5] 李龙. 全髌置换术与半髌关节置换术治疗老年股骨颈骨折疗效对比[J]. 河北医学, 2013, 19(4): 498-500.
- [6] 段鑫, 李程, 牟健雄, 等. 滑膜切除术治疗早期强直性脊柱炎髌关节病变的疗效[J]. 广东医学, 2012, 33(20): 3112-3114.
- [7] Furnes O, Espehaug B, Lie SA, et al. Early failures among 7,174 primary total knee replacements: a follow-up study from the Norwegian Arthroplasty Register 1994-2000[J]. Acta Orthop Scand, 2002, 73(2): 117-129.
- [8] 彭玉兰, 周英, 乐劲涛. 中医治疗儿童髌关节滑膜炎 197 例临床体会[J]. 四川医学, 2013, 34(3): 416-417.
- [9] 骆宇春, 刘云鹏, 张焱, 等. 258 例人工全膝关节置换术临床疗效分析[J]. 东南国防医药, 2010, 12(6): 493-496.
- [10] Robertsson O, Knutson K, Lewold S, et al. The Swedish knee arthroplasty register 1975-1997: an update with special emphasis on 41233 knees operated on in 1988-1997 [J]. Acta Orthop Scand, 2011, 72(5): 503-513.

(收稿日期: 2013-09-08 修回日期: 2013-10-22)

(上接第 635 页)

- [2] 王良华, 叶贤林, 尚桂芳, 等. 免疫筛查阴性献血者血样病毒核酸检测的研究[J]. 中国输血杂志, 2005, 18(4): 286-289.
- [3] 陈长荣, 袁权, 葛胜祥, 等. 无偿献血者中隐匿性乙型肝炎病毒感染及表面抗原突变分析[J]. 病毒学报, 2009, 25(3): 178-184.
- [4] 李晶, 周艳, 丁卫平, 等. 核酸检测技术在宝鸡地区血液筛查中的应用[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(8): 784-786.
- [5] 颜秀娟, 陆祝选, 邱昌文, 等. 核酸检测技术应用于血清学筛查合格的献血者标本检测[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(12): 1322-1324.
- [6] Mulrooney-Cousins PM, Michalak TI. Persistent occult hepatitis B virus infection: experimental findings and clinical implications [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13

(43): 5682-5686.

- [7] Torbenson M, Thomas DL. Occult hepatitis B[J]. Lancet Infect Dis, 2002, 2(8): 479-486.
- [8] Minuk GY, Sun DF, Uhanova J, et al. Occult hepatitis B virus infection in a North American community-based population[J]. J Hepatol, 2005, 42(4): 480-485.
- [9] Chevrier MC, St-Louis M, Perreault J, et al. Detection and characterization of hepatitis B virus of anti-hepatitis B core antigen-reactive blood donors in Quebec with an in-house nucleic acid testing assay[J]. Transfusion, 2007, 47(10): 1794-1802.
- [10] 王迅, 郑岚, 张晰, 等. 核酸扩增技术在上海血液筛检中的初步应用[J]. 中国输血杂志, 2003, 16(3): 157-160.

(收稿日期: 2013-10-17 修回日期: 2013-11-29)