

尽管本研究 3 组间甲状腺激素水平差异无统计学意义($P>0.05$),但 HP 阳性组异常检出率、TPOAb、TRAb 明显升高,推测长期 HP 感染可能会造成以后的甲状腺激素异常,影响甲状腺功能。

炎症是胰岛素抵抗的触发因素,研究认为 HP 感染可使胃肠运动功能紊乱导致吸收异常,使进餐后血糖的高峰与胰岛素吸收的高峰不匹配而影响血糖^[8]。HP 感染产生的炎症因子可能会增加患者的胰岛素抵抗状态,导致血糖难以控制。本研究发现,FBG、胰岛素、HOMA-IR 在 3 组间依次升高,两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$),HP 感染阳性组 BMI 高于阴性组,提示 HP 感染可能干扰甲状腺结节患者的内分泌代谢,产生代谢综合征等。不同毒力的 HP 感染影响胰岛素生成和释放水平,造成血糖升高或不稳定而导致胰岛素抵抗。胰岛素抵抗又加重机体的免疫反应,诱导甲状腺结节的发生。因此,根除 HP 治疗有助于控制血糖,延缓并发症的产生及进展,也有助于改善甲状腺疾病的治疗^[9]。

综上所述,HP 感染与甲状腺结节发病密切相关,HP 感染可能是甲状腺结节的高危因素之一。对于社区体检发现的甲状腺结节患者,应密切观察 HP 感染情况,必要的 HP 根除有助于改善机体免疫微环境,减轻甲状腺结节的发病,也为甲状腺结节的治疗提供一个新思路。

参考文献

[1] MA F,ZHAO W,AOKI K. Inhibition of vacuolation toxin activity of *Helicobacter Pylori* by Iodine, nitrite and Po-
• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.18.034

tention by Sodium chloride, sterigmatocystin and fluoride[J]. *Toxicol In Vitro*,2002,16(5):531-537.
[2] CAO Q,RAN Z H,XIAO S D. Screening of atrophic gastritis and gastric cancer by serum pepsinogen, gastrin-17 and *Helicobacter pylori* immunoglobulin G antibodies[J]. *J Dig Dis*,2007,8(1):15-22.
[3] CHOI J H,CHO S O,KIM H. Alpha-Lipoic acid inhibits expression of IL-8 by suppressing activation of MAPK, Jak/Stat, and NF-kappa B in *H. pylori*-infected gastric epithelial AGS cells[J]. *Yonsei Med J*,2016,57(1):260-264.
[4] D'ELIOS M M,CZINN S J. Immunity, inflammation, and vaccines for *Helicobacter pylori*[J]. *Helicobacter*,2014,19(Suppl 1):19-26.
[5] 李菊兰,苏智军,余雪平. 慢性乙型肝炎患者血清甲状腺相关物质和 IL-6 检测及其临床意义[J]. *实用肝脏病杂志*,2014,17(1):48-50.
[6] 谢永双,覃伟武. 自身免疫性甲状腺疾病与 TNF- α /IL-6 比值的关系研究[J]. *山东医药*,2009,49(25):78-79.
[7] HYBENOVA M,HRDA P,PROCHAZKOVA J A,et al. The role of environmental factors in autoimmune thyroiditis[J]. *Neuro Endocrinol Lett*,2010,31(3):283-289.
[8] 王少真,史亚男,赵静,等. 幽门螺杆菌对 2 型糖尿病患者血糖波动的影响[J]. *中华医学杂志*,2009,89(14):958-961.
[9] 汪茂荣,姚平,陈碧玲. 幽门螺杆菌感染与自身免疫性甲状腺炎的相关性研究[J]. *中华医院感染学杂志*,2015,25(9):1984-1986.

(收稿日期:2018-01-12 修回日期:2018-03-15)

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

高智俊,蔡茵,唐晴钧,周国平,郑 岚[△]
(上海市血液中心检验科 200051)

摘要:目的 分析 2015 年 8 月至 2017 年 3 月该血液中心核酸检测情况,探讨核酸检测在血液筛查中的应用及质量控制。方法 在常规血液筛查酶联免疫吸附试验(ELISA)的基础上,采用罗氏 Cobas S 201 血液筛查系统和 MPX v2.0 核酸定性筛查试剂盒混样或单样本检测,统计 ELISA 阴性样本中核酸阳性检出率,评估其在血液安全中的作用;同时通过分析日常室内质控失控率、检测无效率、设备故障统计数据对核酸进行质量监控。结果 在此期间共有 384 212 例标本,检测到 MPX 核酸阳性标本 289 例(0.075%);统计显示室内质控失控率 1.76%、检测批次无效率 2.71%、无效测试率 0.15%、主要故障 43 次。结论 对献血者的血液进行核酸检测筛查,能有效降低经输血传播疾病的风险,从而提高血液安全,实时分析日常检测数据可做好质量控制及提高检测质量。

关键词:血液核酸检测; 质量控制; 血液筛查
中图分类号:R331 **文献标志码:**A

文章编号:1672-9455(2018)18-2799-04

输血安全一直被社会所关注,尤其是人类免疫缺陷病毒(HIV-1、HIV-2)、丙型肝炎病毒(HCV)和乙

[△] 通信作者,E-mail:zhenglan@sbc.org.cn.

型肝炎病毒(HBV),这些病毒主要是通过暴露于污染的血液或血液血浆产品、暴露于特定的机体组织或体液、通过性接触或通过母婴进行传播。血清学检测广泛运用于血液筛查,针对无偿献血者的筛查研究发现,每年仍有新发输血后感染病例报道。这些风险主要来源于感染者窗口期献血、病毒变异、免疫静默感染及实验室操作错误。如美国无偿献血者每单位供血传播 HBV 的危险性为 $1/63\ 000^{[1]}$,由此引起的献血者投诉及医疗纠纷成为采供血急需解决的问题之一。因此单纯抗原或抗体的血清学检测不能有效地保障血液安全。资料证明,90%的 HBV、HIV 及 70%的 HCV 患者发生感染,血液检测漏检是由窗口期引起的^[2]。在目前使用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂的条件下,HBsAg、抗-HCV、抗-HIV 的平均“窗口期”分别为 56、82、22 d,而采用核酸检测技术(NAT)HBV、HCV、HIV 的平均“窗口期”可分别缩至 36、13、11 d^[3]。因此大大降低了输血感染的风险。本中心自 2015 年 8 月起使用罗氏二代试剂开展核酸检测,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2015 年 8 月 1 日至 2017 年 3 月 31 日于本血液中心参加无偿献血者血液标本,使用罗氏核酸系统检测共计 384 212 例。所有核酸检测的标本均使用 PPT 管留取血样 5 mL,8 h 内 1 600 g 离心 20 min,分离出血浆后 2~4 ℃ 保存,72 h 内完成核酸定性(罗氏 MPX v2.0)筛查。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 罗氏 Cobas S201 核酸血液筛查系统(包括 Hamilton STAR IVD Version 2.0.14、Cobas Ampliprep、Cobas TaqMan96);FAME24/30 全自动 ELISA 后处理系统;Thermo 全自动 ELISA 后处理系统;日立 7600 全自动生化仪;罗氏 P800 全自动生化仪;BD PPT 管。

1.2.2 试剂 核酸定性(罗氏 MPX v2.0)筛查试剂盒;国产 ELISA 检测试剂盒:HBsAg(上海科华),抗 HCV 抗体(上海科华),抗 HIV 抗体(北京万泰);进口 ELISA 检测试剂盒:HBsAg(Murex),抗 HCV 抗体(Murex),抗 HIV 抗体(Murex)。

1.3 方法 标本分为常规标本、加急标本和血小板标本。常规标本先经血液 ELISA 常规检测后,挑选 HBsAg、抗-HCV 和抗-HIV 阴性或 3 项中任 1 项 ELISA 单试剂阳性标本进行血液核酸定性(MPX v2.0)检测;加急标本和血小板标本采用核酸与 ELISA 检测平行进行的检测流程。

1.3.1 血液 EIA 常规检测 所有标本先经过国产 ELISA 试剂初检 HBsAg、抗 HCV 和抗 HIV 1/2,以及进口 ELISA 试剂对上述 3 项指标复检。

1.3.2 血液核酸定性(MPX v2.0)检测 采用罗氏 Cobas s201 核酸血液筛查系统和核酸定性筛查试剂盒对本标本进行核酸混样或单样本检测;混样阳性标本再进行单样本检测,单样本检测阳性则报告该标本阳性。

1.4 质量控制

1.4.1 室内质控品 每天实验开始时以混样模式检测一套 HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA 室内质控品、阴性质控品(康彻斯坦生物技术有限公司),选择合适的浓度通过 STAR 混样模式使 3 种阳性室内质控品与 3 份阴性质控品进行混样检测,另设一孔为阴性室内质控。每套室内质控品监控当天献血者样本检测结果是否有效。

1.4.2 试剂盒阴阳性对照品 每架带 1 份阴性对照和 5 种阳性对照[HIV-1 M(+),HIV-1 O(+),HIV-2(+),HCV(+),HBV(+)],用于监控每架实验有效性,如果一个架中有某个对照品不合格,则整架结果无效,重新检验。

1.4.3 内标 每管设立内标,相当于加入每管中的阳性质控,监测每个反应体系产生假阴性的偶然误差,以确保阴性结果的可靠性。只有当检测样本的内标有效,且试剂盒及室内质控品阴阳性对照的内标有效并且结果符合时,才确认实验结果的有效性。

1.4.4 无效及故障统计 统计 1 年时间内发生无效批次的次数,导致整个批次无效的原因分类统计;对有效批次中出现的无效测试进行统计,查找其发生的原因,进行分类统计。同时对于硬件故障导致的无效,统计故障发生的类型。

1.5 统计学处理 采用 Microsoft Excel 2003 对数据进行整理分析。计数资料采用百分数表示。

2 结果

2.1 核酸检测结果 2015 年 8 月 1 日本中心开始使用罗氏 MPX v2.0 试剂,截止 2017 年 3 月 31 日检测样本数 384 212 例,其中检出 ELISA 血清学阴性核酸检测阳性的样本共计 289 例,阳性率为 0.075%。

2.2 质量控制数据 在 2015 年 8 月 1 日至 2017 年 3 月 31 日共检测室内质控品 510 次,阴性室内质控失控 3 次,阳性室内质控失控 5 次,质控品内标未起 1 次,失控率 1.76%。在 2015 年 8 月 1 日至 2017 年 3 月 31 日参与室间质评 8 次,其中原国家卫生和计划生育委员会(卫生计生委)临检中心室间质评项目 3 次,澳大利亚 NRL 国际室间质评项目 5 次,本室结果均与预期结果符合,见表 1。在 2015 年 8 月 1 日至 2017 年 3 月 31 日核酸检测共 4 724 批次,无效批次 128 次,无效率 2.71%。其中试剂盒对照引起的无效批次为 69 次,其余 59 批次无效均由设备发生故障。无效原因分析,见表 2。2015 年 8 月 1 日至 2017 年 3

月 31 日数据,对检测过程中有效 batch 中单个无效 pool 进行了统计,无效测试率 0.15%,并对其原因进行了原因分析(表 3),起到预警提示或及时采取相对应对措施。收集 2015 年 8 月 1 日至 2017 年 3 月 31 日期间数据,对每台检测设备的主要故障发生进行了分类统计,见表 4。

表 1 参与室间质评情况		
室间质评机构	时间	符合率(%)
原国家卫生计生委临检中心	2015 年 10 月	100.0
原国家卫生计生委临检中心	2016 年 4 月	100.0
原国家卫生计生委临检中心	2016 年 10 月	100.0
澳大利亚 NRL	2015 年 9 月	100.0
澳大利亚 NRL	2016 年 3 月	100.0
澳大利亚 NRL	2016 年 6 月	100.0
澳大利亚 NRL	2016 年 9 月	100.0
澳大利亚 NRL	2017 年 3 月	100.0

表 2 核酸检测无效原因分析统计		
无效原因	n	百分比(%)
试剂盒阴性对照假阳性	15	11.72
试剂盒阳性对照假阴性	42	32.80
扩增曲线锯齿状	8	6.25
系统错误	4	3.13
硬件故障	59	46.10

表 3 单个无效测试频次和原因分类统计分析		
报错代码	频次(n)	原因
AP25	13/69 351	样本中检测出细小凝块
TM03、TM05	30/6 9351	样本亮度值超出范围、暗漂移大于最大暗漂移
TM77	9/69 351	DSLM:正曲线的双 S 形评估质量小于 0.8
TM83	29/69 351	DSLM:归一化曲线的所有荧光值高于 AFL
TM93	5/69 351	Ct 值计算中的计算误差
无	10/69 351	内标曲线未起
无	7/69 351	系统自动判定无效

表 4 设备故障分类统计分析		
故障原因分类	次数(n)	百分比(%)
CAP 试剂针液面探测异常、管路有气泡、漏液等	12	27.91
CAP/CTM 机械臂抓手无法拾取或释放耗材等	17	39.53
CAP/CTM 机械臂移动位置错误	7	16.28
CTM 孵育模块温度超限	3	6.98
其他故障	4	9.30

3 讨 论

根据原国家卫生计生委要求,我国血站已全面广泛开展核酸检测血液筛查项目,为进一步确保血液安全,开展 NAT 血液筛查已经成为各级血站的重点工作内容。早在 2000 年之前,国外特别是一些发达国家和地区已先后应用 NAT 技术进行血液筛检。在日本及欧美等发达国家,NAT 已成为常规血液筛查技术,并逐步在全球范围内得到推广^[4]。德国和荷兰从 1997 年起开始了 NAT 筛查血液的尝试^[5];欧盟委员会规定,1999 年 7 月 1 日以后所有原料必须经 HCV NAT 筛查合格后才能投产;美国则从 1999 年 3 月开始在 FDA 批准将 NAT 技术应用于常规血液筛查;英国和法国的部分血站也从 2000 年起开始用 NAT 筛查血液^[6]。NAT 还可以检出因病毒变异及亚型、隐匿性 HBV 感染等 ELISA 而漏检的污染血液。西方发达国家报道 HBV、HCV、HIV 漏检率分别为几万分之一、几十万分之一、几百万分之一,国内报道的 HCV 漏检率与国外相近^[7-9]。从 2005 年年初起,美国 FDA 开始强制要求血液中心和血液制品生产企业采用批准的 NAT 试剂盒进行血源筛查,强制进行 NAT 筛查的病毒有 HIV-1 和 HCV。据评估,采用目前获准的 NAT 筛查试剂,HIV 的残余风险低于 1:100 万,肝炎的残余风险低于 1:20 万^[10]。有文献报道,应用不同的核酸检测系统,HBV 核酸阳性检出率结果差异较大,有低至 0/9 611(8 人份混合),推测是由于核酸检测系统的差异造成。因而,在开展核酸检测前,有必要对核酸检测系统进行评估^[10]。

本中心自 2015 年 8 月开始使用罗氏 MPX v2.0 试剂盒起,至 2017 年 3 月 31 日,共有 384 212 例样本使用该试剂盒进行的核酸检测,在血清学检测阴性的基础上检测出 289 例样本呈反应性,阳性率达到 0.075%。在使用罗氏 MPX v2.0 试剂盒起 1 年内,共进行室内质控品检测 510 次,共发生 9 次失控,失控率为 1.76%。其中阴性室内质控品检测呈反应性 3 次,阳性室内质控品检测呈非反应性或检测的 Ct 值大于本实验室质控规则所限定范围 5 次,质控品内标未起 1 次。在这段时期内,对于献血者样本共进行试验 4 724 个批次,无效批次为 128 次,无效率 2.71%;因试剂盒对照引起的无效批次为 69 次,阴性对照品出现假阳性 15 次,占全部无效的 11.72%;阳性对照品出现假阴性 42 次,占全部无效的 32.80%;扩增曲线异常及系统计算错误导致的无效分别占总无效的 6.25%和 3.13%,其余 59 批次无效均由设备发生故障,实验终止所导致,占总无效的 46.10%。

室间质量评价是多家实验室分析同一标本,并由外部独立机构收集和反馈实验室上报的结果,以此评价实验室检测能力,它能降低人为或其他原因导致的

检测误差风险,提高实验室检测能力^[11]。室间质量评价作为一种质量控制工具可以帮助实验室提高检验质量,通过分析实验中存在的问题,采取相应的措施去纠正改善问题,以达到提高检测能力,降低输血风险的目的。定期参加室间质量评价也是判断实验室的检测能力及监控其持续能力。在 2015 年 8 月至 2017 年 3 月参与原国家卫生计生委临检中心室间质评项目 3 次,澳大利亚 NRL 国际室间质评项目 5 次,本室结果均与预期结果符合。

对于出现阴性室内质控品或试剂盒阴性对照检测呈阳性的情况,一般情况下呈偶发,在这种情况下首先考虑为在操作过程中出现样本间的交叉污染所致,也可能为自动开盖机在开盖过程中造成交叉污染,而不轻易认定实验室污染,实验室发生扩增产物的污染往往为大片出现阳性结果,怀疑时可进行环境监测实验来监测是否发生实验室污染^[12]。当发生阴性室内质控品或试剂盒阴性对照检测呈阳性时,可观察当天实验是否出现较多的高 Ct 值测试,以及观察近日的阳性拆分情况。对于有多套设备的实验室,可以观察多次出现高 Ct 值测试所在的检测设备是否有特异性。当出现阳性室内质控品或试剂盒阳性对照检测呈阴性或 Ct 值过高,首先考虑的因素为人为因素,如溶解后的室内质控品或阳性对照品没有充分混匀、没有平衡至室温。当怀疑扩增仪孔间温度不均一或不符合目标温度、仪器加样量准确性、试剂中酶失活等仪器和试剂原因导致的反应体系出现问题时,可通过观察该孔的内标扩增情况,或比较该批次其他孔位、甚至当天或今日所有实验中内标的整体扩增情况,来判断是否出现了系统误差。在排除了以上原因后,考虑该批号或者单支室内质控品、对照品是否出现效价降低。

对于发生在有效批次中的无效测试,对于其报错信息予以分类以及在不同设备上出现的频次进行统计,如对于样本中出现细小凝块的信息提示,根据一段时间内出现的频次,考虑是否近期样本离心不规范,或该批试管质量存在缺陷。若集中出现在某一台设备,可考虑是否该设备的探测系统存在一定问题。

统计导致无效批次的原因发现,设备故障终止实验所导致的无效,占到总无效率的 46.10%,对于主要故障进行了分类,并对每台设备的故障重复次数予以整理,这样有助于提醒工程师在维修保养时更加注意此类故障的排除和预防。值得注意的是除了设备应当进行的每年一次的校准以外,当更换或维修涉及试剂样本加样量、孵育温度、荧光信号检测等配件或模块后,应对该涉及内容进行校验。

综上所述,NAT 用于献血者血液筛查可以提高

输血安全系数,保护献血者资源,保证用血安全,降低输血所引发疾病传播的可能性。在完成日常工作的同时,收集工作检测数据,进行分类整理统计,有助于检测的质量控制,以更好地提高检测质量。

参考文献

- [1] Japanese Red Cross, NAT Screening Research Group. Nationwide nucleic acid amplification testing of hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type 1 for blood transfusion and follow-up study of nucleic acid amplification positive donors [J]. Jpn J Infect, 2000, 53(1): 116-123.
- [2] 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): 834-835.
- [3] 谢云峥, 陈凌燕, 李超, 等. 上海地区无偿献血者乙肝病毒核酸检测分析 [J]. 中国输血杂志, 2012, 25(s1): 738-741.
- [4] KRAJDN M, COOK D, MAK A, et al. Pooled nucleic acid testing increases the diagnostic yield of acute HIV infections in a high-risk population compared to 3rd and 4th generation HIV enzyme immunoassays [J]. J Clin Virol, 2014, 61(1): 132-137.
- [5] ROTH W K, WEBER M, BUHR S, et al. Yield of HCV and HIV-1 NAT after screening of 3.6 million blood donations in central Europe [J]. Transfusion, 2002, 42(7): 862-868.
- [6] JARIVS L M, SIMMONDS P. Scottish experience with NAT [J]. Transfuse Med, 2002, 42(2): 259-264.
- [7] 任芙蓉. 血液核酸检测技术 [J]. 北京医学, 2008, 30(10): 624-627.
- [8] STRAMER S L, GLYNM S A, KLEINMAN S H, et al. Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody-negative blood donors by nucleic acid-amplification testing [J]. N Engl J Med, 2004, 351(8): 760-768.
- [9] MINE H, EMURA H, MIYAMOTO M, et al. High throughput screening of 16 million serologically negative blood donors for hepatitis B virus, and human immunodeficiency virus type-1 by nucleic acid amplification testing with specific and sensitive multiplex reagent in Japan [J]. Virol Methods, 2003, 112(1/2): 145-151.
- [10] 任芙蓉, 王憬惺, 赵海燕. 我国五城市合格献血者 HIV 及 HCV 残余风险研究 [J]. 中国输血杂志, 2007, 20(6): 469-475.
- [11] 李凤园, 杨文玲, 李红珠, 等. 应用室间质评数据分析影响核酸检测结果的因素 [J]. 中国输血杂志, 2015, 28(2): 199-201.
- [12] 汪德海, 葛红卫. 自动开盖机在血站核酸检测实验室使用前确认 [J]. 中国输血杂志, 2012, 25(6): 536-537.