

• 调查报告 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.17.027

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20190510.1552.010.html>(2019-05-14)

重庆市无偿献血者血液核酸筛查效果分析*

秦伟斐, 毕蕾静, 李 维, 黄 霞[△]

(重庆市血液中心 400015)

[摘要] **目的** 对重庆市无偿献血人群乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)和人类免疫缺陷病毒(HIV)核酸检测效果进行分析,为献血者血液筛查策略的选择提供数据支持。**方法** 通过对该中心2013—2017年献血者血液标本HBV、HCV、HIV感染性标志物检测结果的统计学分析,得到核酸检测(NAT)在重庆市无偿献血者血液筛查中的总收益和单项收益。**结果** 667 398份血液标本中,2次酶联免疫吸附测定(ELISA)检测和NAT总的反应性为1.52%,其中ELISA方法检测反应性为1.19%,NAT反应性为0.90%。在2 150份单NAT反应性标本中,共鉴别检出反应性标本707份,其中HBV DNA反应性标本696份,HIV RNA反应性标本11份,无HCV RNA标本鉴别检出,NAT总确认收益率为1.06%,其中HBV DNA确认收益率为1.04%,HIV RNA确认收益率为0.02%。**结论** 重庆市献血者血液筛查策略中增加NAT,能有效提高血液安全,降低输血传播性疾病的风险。

[关键词] 酶联免疫吸附测定;核酸检测;效果评价;无偿献血者

[中图分类号] R446

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)17-2992-04

Effect analysis of nucleic acid screening of blood samples from donors in Chongqing*

QIN Weifei, BI Leijing, LI Wei, HUANG Xia[△]

(Chongqing Blood Center, Chongqing 400015, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the effect of nucleic acid screening for hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), human immunodeficiency virus (HIV) among blood donors in Chongqing, to provide data support for blood screening strategy among blood donors. **Methods** Results of infection markers HBV, HCV, HIV screening in Chongqing from 2013 to 2017 were analyzed. And the total yield and individual yield of nucleic acid tests (NAT) were evaluated. **Results** Among 667 398 blood samples, the total reaction rate of double ELISA-reactive and NAT-reactive was 1.52%, of which the reaction rate of ELISA-reactive was 1.19% and the NAT-reactive was 0.90%. Among 2 150 single NAT-reactive samples, a total of 707 reactive samples were identified with 696 were HBV DNA reactive and 11 were HIV RNA-reactive, no HCV RNA samples were identified. The total confirmed yield rate of NAT-reactive was 1.06%, including 1.04% for HBV DNA-reactive and 0.02% for HIV RNA-reactive. **Conclusion** The application of NAT in blood screening can effectively improve blood safety, and reduce the risk of transmitted diseases during transfusion.

[Key words] enzyme-linked immunosorbent assay; nucleic acid test; effect analysis; voluntary blood donor

目前,根据我国2015版《血站技术操作规程》中献血者血液传染性标志物筛查的规定,在实施核酸检测(NAT)试剂批签发之前,乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)和人类免疫缺陷病毒(HIV)感染标志物应采用1次核酸检测和2次酶联免疫吸附测定(ELISA)检测,ELISA检测应采用两个不同生产厂家的试剂;实施NAT试剂批签发之后,血清学方法和核酸方法即可各检测1次。对于ELISA检测阳性的标本可不再进行NAT,直接视为该项目检测结果不合格。然而,虽然采用2次ELISA检测,仍可因“窗

口期”、隐匿性感染、基因变异及检测灵敏度不够高等因素造成一定程度的漏检^[1-3]。NAT是直接检测病毒核酸,视为降低血清学窗口期漏检风险最直接、最可靠的方法^[4]。本中心于2011年以科研项目的方式启动了部分献血者核酸筛查项目的试点,2013年1月开启对所有献血者血液进行NAT和血清学检测并行的模式。为了评估正式启动献血者核酸筛查后的效果,评价其在降低输血相关感染风险和保障血液安全中的作用,作者对2013—2017年本中心无偿献血者血液筛查结果进行回顾性分析,重点分析核酸筛查的

* 基金项目:重庆市卫生局重点科研课题(2010-1-61)。

作者简介:秦伟斐(1981—),主管技师,硕士,主要从事输血医学检测及研究。

[△] 通信作者, E-mail: xiahunagy@163.com。

结果,包括对比分析 Procleix ULTRIO Assay 和 Procleix ULTRIO Plus Assay 试剂的检测结果,以评估 NAT 在重庆献血者血液筛查中的收益情况,现将结果报道如下。

1 对象与方法

1.1 对象 (1)标本来源:本中心 2013—2017 年共收集无偿献血者标本 667 398 份,分别采用乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝血真空无菌采血管,有分离胶的试管采集 8 mL 用于 NAT 和无分离胶的试管采集 5 mL 用于 ELISA 检测,标本处理过程严格按照说明书和标准操作规程执行。(2)试剂与仪器:HBsAg 检测(英国索林、北京万泰)、HCV 检测(美国强生、上海科华、北京万泰)、HIV-1/2 检测(法国伯乐、上海科华)。NAT 试剂:HBV、HCV、HIV(1 型)NAT 试剂盒及 HBV、HCV、HIV-1 鉴别探针试剂(西班牙 Grifols 公司)。全自动样品处理仪(Xan-Tus);全自动酶联免疫分析系统(Microlab FAME24/20);PRO-CLEIX TIGRIS 核酸检测系统(西班牙 Grifols);EXL808 酶标仪(美国 BIO-TEK)。

1.2 方法

1.2.1 检测方法 用于 ELISA 检测的 5 mL 标本经全自动样品处理仪加样完成后,分别采用两个不同厂家的试剂对同一项目在全自动酶联免疫分析系统上进行检测,HBsAg、抗-HCV、抗-HIV1/2 双试剂 2 次 ELISA 检测;同时,用于 NAT 检测的 8 mL 标本置于样品架,在自动生物安全开盖机内开盖,采用单人份 NAT,基于转录介导扩增(TMA)的 NAT 法在 Tigris 全自动核酸分析系统上进行 HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA 3 项联检测分析,对 NAT 联检呈反应性的标本进行进一步鉴别检测。

1.2.2 结果判定 所有检测结果判定依据严格按照试剂说明书及标准操作规程进行。ELISA 检测时,当同一检测项目两种试剂检测结果均吸光度/临界值(S/CO)≥0.8,则直接认定该标本为反应性;如某一检测结果 S/CO≥0.8,则用同一厂家试剂再次双孔复试,复试结果若任一孔 S/CO≥0.8,则认定为有反应

性,否则判为无反应性。NAT 检测时,先用 ULTRIO 试剂进行 HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA 检测,联检有反应性的标本,则判为 NAT 有反应性;再分别进行 HBV、HCV 和 HIV-1 鉴别检测,根据鉴别结果,判为某一项目的 NAT 有反应性。最后,再根据 ELISA 检测结果和 NAT 结果综合判断,NAT 与 ELISA 均无反应性的标本为合格标本;NAT 与 ELISA 均有反应性的标本为阳性标本;NAT 无反应性而 ELISA 有反应性的标本为阳性标本,NAT 有反应性而 ELISA 无反应性的标本也为阳性标本。

1.3 统计学处理 数据采用 SPSS21.0 统计软件进行分析,计数资料以率表示,二者比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ELISA 与 NAT 结果呈反应性情况 2013—2017 年共 667 398 份无偿献血者血液标本进行了 2 次 ELISA 筛查和 NAT 联检反应性,两种检测方法共检测呈反应性标本 10 125 份,总的反应性率为 1.52% (10 125/667 398)。其中 ELISA 方法检测呈反应性标本 7 975 份,反应性率为 1.19% (7 975/667 398)。NAT 呈反应性标本 5 979 例,反应性率为 0.90% (5 979/667 398)。不同年份检测总的反应性率比较差异有统计学意义($P < 0.05$),其中 2013、2014 年检测总的反应性率分别为 2.18%、2.12%;2015 年开始采取了一系列改进措施,具有反应性的标本明显降低,2016 年检测总反应性率仅为 0.88%,为 5 年中的最低值,分别与 2013、2014 年比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.2 ELISA 与 NAT 反应性标本分布情况 10 125 份反应性标本中 NAT 与 ELISA 均有反应性的标本 3 829 份,占总反应性标本的 37.82% (3 829/10 125),NAT 与 ELISA 均有反应性率为 0.57% (3 829/667 398);NAT 无反应性而 ELISA 有反应性的标本 4 146 例,占总反应性标本的 40.95% (4 146/10 125),单反应性率为 0.62% (4 146/667 398);NAT 有反应性而 ELISA 无反应性的标本 2 150 例,

表 1 不同年份 ELISA 筛查和 NAT 联检反应性情况

年份	标本(份)	ELISA		NAT		两种方法联检	
		反应性标本(份)	占比率(%)	反应性标本(份)	占比率(%)	反应性标本(份)	占比率(%)
2013	116 351	2 197	1.89	1467	1.26	2 540	2.18
2014	115 481	2 129	1.84	1 334	1.16	2 447	2.12
2015	128 973	1 490	1.16 ^a	895	0.69 ^a	1 851	1.44 ^a
2016	136 553	825	0.60 ^a	849	0.62 ^a	1 206	0.88 ^a
2017	170 040	1 334	0.78 ^a	1 434	0.84 ^a	2 081	1.22 ^a
合计	667 398	7 975	1.19	5 979	0.90	10 125	1.52

^a: $P < 0.05$,与 2013、2014 年比较

占总反应性标本的 21.23%(2 150/10 125),单反应性率为 0.32%(2 150/667 398)。2016 年开始采用新一代高灵敏度的 Plus Assay 试剂后,NAT⁺ ELISA⁻ 明显增高,2016 年和 2017 年分别与其他年份比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。ELISA 和 NAT 结果见表 2;2013—2017 年核酸与 ELISA 检测获得的反应性标本中 NAT⁺ ELISA⁺、NAT⁻ ELISA⁺、NAT⁺ ELISA⁻ 的分布情况,见表 3。

表 2 ELISA 和 NAT 结果(份)

ELISA	NAT		合计
	+	-	
+	3 829	4 146	7 975
-	2 150	657 273	659 423
合计	5 979	661 419	667 398

表 3 NAT 与 ELISA 检测获得的反应性标本分布情况

年份	NAT ⁺ ELISA ⁺		NAT ⁻ ELISA ⁺		NAT ⁺ ELISA ⁻		反应性标本 (份)
	份	构成比(%)	份	构成比(%)	份	构成比(%)	
2013	1 124	44.25	1 073	42.25	343	13.50 ^a	2 540
2014	1 016	41.52	1 113	45.48	318	13.00 ^a	2 447
2015	534	28.85	956	51.65	361	19.50 ^a	1 851
2016	468	38.81	357	29.60	381	31.59	1 206
2017	687	33.01	647	31.09	747	35.90	2 081
合计	3 829	37.82	4146	40.95	2 150	21.23	10 125

^a: $P<0.05$,与 2016、2017 年比较

2.3 NAT 联检反应性且 ELISA 检测非反应性标本鉴别情况 2 150 例单 NAT 反应性标本,共鉴别检出反应性标本 707 份,鉴别率为 32.88%(707/2 150);其中 HBV DNA 反应性标本 696 份,HIV RNA 反应性标本 11 份,无 HCV RNA 标本鉴别检出。NAT 总确认收益率为 1.06‰(707/667 398),其中 HBV DNA 确认收益率为 1.04‰,HIV RNA 确认收益率为 0.02‰,见表 4。

表 4 单核酸联检反应性标本鉴别情况[份(%)]

年份	总标本(份)	NAT ⁺	HBV DNA ⁺	HIV RNA ⁺
2013	116 351	343(2.95)	101(0.87)	3(0.03)
2014	115 481	318(2.75)	104(0.90)	1(0.01)
2015	128 973	361(2.80)	118(0.91)	3(0.02)
2016	136 553	381(2.79)	95(0.70)	3(0.02)
2017	170 040	747(4.39)	278(1.63)	1(0.01)
合计	667 398	2 150(3.22)	696(1.04)	11(0.02)

3 讨 论

受血者感染输血传播病原体风险的大小与献血人群病原体感染率、献血者血液筛查方法及试剂敏感性、病原体特性、受血者个体免疫状态等多种因素有关。献血者血液筛查是保障血液安全的重要屏障。近几十年来,随着血液筛查试剂不断升级换代,检测设备更加精密和自动化,检测流程更加规范,血液安全水平明显提高。更高灵敏度和特异度的 NAT 技术在我国献血者血液筛查中已全面采用,目前尚缺乏对我国 NAT 应用效果的全面评价。

近年来,本血液中心采用 Procleix ULTRIO[®]

System 和两种 ELISA 试剂同时对献血者血液标本检测,5 年共检测血液标本 667 398 例,总反应性率为 1.52%,高于其他地区报道^[5],NAT 联检反应性率为 0.90%,也明显高于国内其他学者报道^[6-7],可能与不同地区人群的总体感染率有关。唐卫国等^[8]曾报告 2000—2009 年重庆市无偿献血者中,HIV 感染率呈逐年上升趋势,说明重庆地区无偿献血者血液安全保障工作压力大。本研究结果显示,近 5 年来 ELISA 反应率和 NAT 联检反应率整体呈下降趋势,可能与近年来本中心在血液安全保障方面采取了一系列改进措施有关,如与加强了献血者献血前宣传教育,帮助献血者进行不适用献血的自我排除;采用了更灵敏的献血前筛查方法;逐步取消了互助献血者等因素有关。

667 398 份检测样本中,NAT 与 ELISA 同时呈反应性的标本占总反应性的 37.82%,单 NAT 反应标本占总反应性标本的 21.23%,单 ELISA 反应性标本占总反应性标本的 40.95%。单 NAT 反应标本仅为 0.32%,比吕蒙恩等^[6]报道的 0.44% 略低;而 ELISA 单反应性标本反应性率为 0.62%。作者曾经在对 2015 年献血者 HBV 筛查结果分析时发现,ELISA 单反应性的 HBsAg 反应性标本中,两种 ELISA 试剂均有反应性的标本确证阳性率为 78.7%,单试剂反应性的确证阳性率仅为 5.3%^[9],提示 ELISA 单试剂呈反应性的标本中存在相当比例的假反应性。但是,在阻断输血相关传染性疾病的传播中,ELISA 检测技术作为国家规定的血液筛查方法发挥着重要作用,尤其是 ELISA 和 NAT 两种方法联合

检测^[10],互为补充,为进一步缩短“窗口期”发挥重要作用。

本研究 NAT 的鉴别结果显示,2 150 例单 NAT 反应性标本,共鉴别检出反应性标本 707 份,其中 HBV DNA 反应性标本 696 份,HIV RNA 反应性标本 11 份,无 HCV RNA 标本鉴别检出。NAT 总确认收益率为 1.06%,略高于吕蒙恩等^[6]、YANG 等^[11]的报道结果;其中 HBV DNA 确认收益率为 1.04%,明显高于美国和欧洲等地区献血者的 HBV 阳性率,这与我国乙型病毒性肝炎(乙肝)流行率较高有关;HIV RNA 确认收益率为 0.02%,远高于林诗雅等^[12]报道的 30 多万献血者中鉴别检出 2 例 HIV;HCV RNA 确认收益率为 0,与国内大部分地区报道相一致。2017 年本中心 HBV DNA 确认阳性率为 1.63%,明显高于其他年份,这与近年来本中心采用了新一代具有更高灵敏度的 Procleix ULTRIO Plus Assay 试剂有关。另外,NAT 单反应性标本中鉴别率仅为 35.90%,而大部分的标本未被鉴别检出,这是单人份 NAT 中常遇到的问题。未被鉴别检出这部分 NAT 单反应性标本有可能是多方面原因所致。一方面是与本中心现在采用的 NAT 方法有关,LINNEN 等^[13]研究发现 TMA 技术会导致检测结果呈假阳性;另一方面可能与标本病毒载量较低,鉴别检测时可能正好未吸取到病毒核酸而导致核酸鉴别假阴性有关。VERMEULEN 等^[14]曾报道 NAT HBV 反应性标本主要为隐匿性 HBV 感染,其次是窗口期 HBV 感染。高灵敏度检测试剂的使用,可以提高鉴别确认率,有利于提高对低病毒拷贝数 HBV 窗口期及隐匿性乙肝的检出率。本研究结果显示,本中心增加 NAT 应用以来,成功阻止了 696 份 HBV DNA 阳性和 11 份 HIV RNA 阳性血液发往临床,有效避免了经输血传播该病毒的风险。本中心对其中的 4 份 HIV RNA 阳性标本的献血者进行了追踪随访,确认为“窗口期”感染标本^[15]。

综上所述,在重庆地区献血者血液筛查策略中增加 NAT,可以极大地降低经输血传播病原体的残余风险,从而提高血液的安全性。

参考文献

[1] 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.

- [2] ALLAIN J P. Occult hepatitis B virus infection; implications in transfusion[J]. Vox Sang,2004,86(2):83-91.
- [3] EAN-PIERRE A,CANDOTTI D. Diagnostic algorithm for HBV safe transfusion[J]. Blood Transfus,2009,7(3):174-182.
- [4] LAPERCHE S. Blood safety and nucleic acid testing in Europe[J]. Euro Surveill,2005,10(2):3-4.
- [5] 周丽君,郭伟鹏,谭湘涛,等.病毒核酸检测对降低输血传播疾病残余风险的分析研究[J].新疆医科大学学报,2014,37(2):214-217.
- [6] 吕蒙恩,董杰,吴亚玲,等.2011 年杭州地区无偿献血者血液核酸筛查结果分析[J].中国输血杂志,2014,27(1):63-66.
- [7] 汪德海,王瑞,葛红卫.血站核酸检测实验室质量监控指标应用[J].中国输血杂志,2012,25(6):524-527.
- [8] 唐卫国,廖红文,段恒英,等.重庆市无偿献血人群 HIV 感染情况的调查分析[J].重庆医学,2011,40(23):2343-2345.
- [9] 秦伟斐,田耘博,李小红,等.献血者乙型肝炎病毒筛查结果分析[J].中国输血杂志,2015,28(6):679-683.
- [10] 袁晓华,万国新.血液病毒筛查中血清学和核酸检测方法应用评估[J].新疆医科大学学报,2009,32(8):1201-1203.
- [11] YANG M H,LI L,HUNG Y S,et al. The efficacy of individual-donation and minipool testing to detect low-level hepatitis B virus DNA in taiwan[J]. Transfusion,2010,50(1):65-74.
- [12] 林诗雅,王湜,李仲平,等.2015 年广州地区无偿献血者核酸和 ELISA 检测结果分析[J].临床输血与检验,2017,19(2):137-141.
- [13] LINNEN J M,DERAS M L,CLINE J,et al. Performance evaluation of the PROCLEIX West Nile virus assay on semi-automated and automated systems[J]. J Med Virol,2007,79(9):1422-1430.
- [14] VERMEULEN M,LELIE N,SYKES W,et al. Impact of individual-donation nucleic acid testing on risk of human immunodeficiency virus,hepatitis B virus, and hepatitis C virus transmission by blood transfusion in South Africa [J]. Transfusion,2009,49(6):1115-1125.
- [15] 黄文娟,王芳,毕蕾静,等.核酸检测试剂灵敏度改进效果分析[J].中国输血杂志,2018,31(7):748-751.

(收稿日期:2018-02-18 修回日期:2019-04-04)