技术方法

DOI:10.16016/j.1000-5404.201504038

核酸检测技术应用于血液筛查的检测效能分析

李莉华[1],马印图[2] (050071 石家庄,河北省血液中心检验科[1];050082 石家庄,解放军白求恩国际和平医院输血科[2])

[摘要] **目的** 分析比较不同核酸检测模式的核酸检测(nucleic acid technology,NAT)结果及血小板、全血捐献者的核酸检测结果,评价NAT应用于血液筛查中的检测效能。**方法** 2013年1月至2014年10月采集的305 912份全血和单采血小板标本进行常规ELISA检测,其中303 616份标本分别采用单检模式和混样模式进行核酸检测,分析各项检测结果数据。**结果** 采用单检模式进行核酸检测,单独NAT不合格率为1.32‰,采用混检模式进行核酸检测,单独NAT不合格率为0.33‰;全血标本的单独NAT不合格率为0.67‰,单采血小板标本的单独NAT不合格率为0.94‰。**结论** NAT应用于血液筛查,其检测效能与检测灵敏度成正比、与献血者献血间隔成反比。对于献血间隔要求较短的单采血小板捐献者实施NAT,其检测效能尤为突出。

[关键词] 核酸检测;检测效能;献血间隔;检测模式

[中图法分类号] R446 [文献标志码] B

核酸检测技术(nucleic acid technology, NAT)通过捕获血液标本中较早出现的病毒核酸,缩短了人类免疫缺陷病毒(HIV)、丙型肝炎病毒(HCV)、乙型肝炎病毒(HBV)等病毒检测的窗口期[1],提高了病毒的检出率,因而NAT被视为降低血清学窗口期漏检风险及低病毒载量检出的最佳解决方法[2]。采供血机构将NAT应用于血液筛查,与ELISA方法形成互补,可有效发挥其检测效能[3-4]。NAT所采用的检测系统、检测模式不同,环境条件、标本质量以及检测灵敏度等因素造成的核酸检出率上的差异,导致NAT所得出的试验结果也存在一定差异[5-6]。本研究对河北省血液中心2013年1月至2014年10月的献血者血液标本NAT检测结果进行回顾性分析,发现NAT检测技术应用于不同献血人群的血液筛查,所发挥的检测效能不同。现将单检模式和混检模式下的血液NAT结果以及全血标本和单采血小板标本的血液检测结果分析报告如下。

1 资料与方法

1.1 标本来源

2013年1月至2014年10月河北省血液中心的石家庄地区无偿献血者305 912人份标本(其中278 214人份全血标本和27 698人份单采血小板标本),标本采集后于4 ℃冰箱保存。用于NAT的采血管为5 mL EDTA-K2带分离胶真空采血管(美国BD公司),献血者均符合《献血者健康检查标准》[7]。

1.2 试剂与仪器

乙型肝炎病毒丙型肝炎病毒人类免疫缺陷病毒(1型)核酸检测试剂盒(PCR-荧光法)(上海浩源生物科技公司,批号:MF20130808、MF20140103 等),Procleix Ultrol 核酸联检试剂(GRIFOLS 公司,批号:609833、611457、614952 等)。核酸检测试剂盒为中国药品生物制品检定所批批检合格产品,且在有效期内使用。STAR 全自动加样仪(瑞士 HAMILTON),Tigris 核酸检测系统(Grifols 生物诊断公司),TBG 全自动核酸提取仪、ABI7500 荧光定量 PCR 仪,CHITAS 核酸检测系统,现代 SHINENOW 实验室管理软件。

1.3 检测方法及判定规则

305 912份全血标本和单采血小板标本进行常规ELISA检测。部分标本由于ELISA检测项目不合格直接被淘汰而未进入到核酸检测环节,有303 616份标本分别进行混样核酸检测(191 222人份)和单人份核酸检测(112 394人份)。①混样核酸检测:按照试剂盒说明书要求,筛选ELISA检测合格标本进行8个标本混样核酸检测,无反应性汇集地(pooling)的8个标本视为该项目核酸检测合格,有反应性pooling的进行

[基金项目] 河北省卫生和计划生育委员会指令性课题(ZL-20140122)

[通信作者] 马印图,E-mail:13722793663@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150702.1653.002.html(2015-07-02)

标本的拆分单检,拆分无反应性的标本判为合格,拆分亦有反应性的标本判为该项目核酸检测不合格。②单人份核酸检测:采用单个标本核酸检测模式,按照试剂盒和全自动核酸检测设备要求进行检测,检测无反应性的标本视为HBV DNA、HCV RNA、HIV-1 RNA项目联检合格,检测有反应性的标本则视为HBV DNA、HCV RNA、HIV-1 RNA项目联检不合格。

1.4 统计学处理

采用χ^2检验,比较各项目不合格率的差异。

2 结果

2.1 单检模式及混检模式下的NAT结果

303 616例标本进行核酸检测,其中112 394例采用单人份核酸检测系统进行检测,检出单独NAT不合格148例,不合格率为1.32‰;191 222例标本采用另外的混样核酸检测系统进行检测,检出单独NAT不合格63例,不合格率为0.33‰。两者不合格率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 全血标本和单采血小板标本ELISA检测结果

305 912份全血标本和单采血小板标本中,采用ELISA方法检测全血标本278 214例,HBsAg、抗-HCV、抗-HIV-1/2三项不合格2 536例,不合格率为9.12‰;采用ELISA方法检测单采血小板标本27 698例,HBsAg、抗-HCV、抗-HIV-1/2三项不合格78例,不合格率为2.82‰。两者不合格率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 全血标本和单采血小板标本NAT检测结果

NAT不合格结果包括两类,一类为NAT反应性而ELISA无反应性,即为单独NAT不合格结果,此类不合格的检出即为NAT在血液筛查中所发挥的检测效能。另一类为NAT反应性ELISA亦为反应性,即为通过NAT和ELISA均能检出的结果。303 616份全血标本和单采血小板标本中,276 018例全血标本的单独NAT不合格186例,不合格率为0.67‰;27 598例单采血小板标本的单独NAT不合格为26例,不合格率为0.94‰。两者不合格率比较,差异有统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

确保临床输血的血液安全是血站工作的重心。目前,国内已有多家血站采用ELISA+NAT方法进行检测的筛查策略。NAT技术具有高度特异性和敏感性,可以有效缩短ELISA检测的"窗口期",还可以避免因病毒变异、隐匿性感染等原因造成的ELISA方法的漏检。在19世纪末,美日等国家的血站已开展血液相关病毒核酸检测。我国卫生和计划生育委员会于2010年6月开始对献血者血液进行HIV、HBV和HCV病毒核酸检测的试点[8],拟定2015年国内血站全面实施核酸检测技术。由于NAT检测技术对实验操作的各个环节和实验室环境等都有很高的要求,因此NAT实验室质量管理水平的高低直接关系到这项技术的实际应用效果。如何根据自身实验室的情况建立适宜的检测模式,不断改进以提高检测效能,既防止漏检,又最大限度降低由于NAT假阳性而导致的血液淘汰是今后我们需要认真探讨的问题[9]。本中心作为首批参评的试点单位,自2010年6月对献血者血液常规开展NAT检测,在此期间我们将全血标本和单采血小板标本的血液检测模式进行了优化,将NAT检测技术应用于不同献血人群的血液筛查,在一定程度上提高了检测效能。

本中心自2013年1月至2014年10月采用单检模式进行标本的核酸检测,NAT不合格率为1.32‰,明显高于同期采用混样核酸检测系统所得到的0.33‰ NAT不合格率。由于检测系统、检测模式的差异,导致其检测灵敏度不同、检出率也不同。对于混样核酸检测系统而言,混样检测的方式势必有稀释标本的作用,其检测灵敏度也一定低于试剂说明书所提供的检测灵敏度。单人份核酸检测系统的检测灵敏度高于混样核酸检测系统,其检出率也相对较高,因此,NAT检测效能的影响因素与所采用的检测模式、检测灵敏度有关。在单采血小板的标本中,HBsAg、抗-HCV、抗-HIV1/2三项ELISA检测不合格率为2.82‰(78/27 698),明显低于同期全血标本9.12‰(2 536/278 214)的不合格率。由于我中心单采血小板捐献者85%以上来自于重复献血者,受过更多的血液安全教育,每次献血都进行体检和检测,也就是通常所说的"低危献血人群",传播输血传染病的危险性最小。而捐献全血的重复献血者占献血人群比例不足50%。全血和单采血小板标本均有单独NAT不合格检出,不合格率分别为0.67‰(186/276 018)和0.94‰(26/27 598)。由于病毒感染者窗口期献血,病毒变异,免疫静默感染等原因,导致单纯抗原或抗体血清学检测不能有效保障血液安全。NAT直接检测病毒核酸,能显著缩短血液感染病毒的检测窗口期,与ELISA方法形成互补,有效发挥其检测效能。我国已将NAT血液筛查纳入新的输血技术操作规程[10]。国内多家采供血机构将

NAT技术应用于献血者的血液筛查中,均有不同程度HBsAg阴性而HBV DNA的阳性检出,从而发挥了NAT技术应有的检测效能。综合相关文献的报道[11-14],核酸检测技术在血液筛查检测中的广泛应用,阻断了部分因ELISA检测窗口期漏检而导致的输血传染病发生。其检出窗口期感染和隐匿性感染的能力得到了更为广泛的数据支持[15-16]。

本研究数据显示:单采血小板捐献者ELISA三项不合格率明显低于全血捐献者,而单独NAT不合格率却高于全血捐献者,证实无论是否为低危的重复献血者,ELISA检测存在漏检而NAT在不同血液成分捐献者中进行血液筛查,可以发挥其不同程度的检测效能[17]。与此同时,NAT检测效能的发挥与献血间隔相关。献血间隔越短,在窗口期内献血的概率就加大[18],NAT检出病毒窗口期的概率越大。献血者献血间隔要求为两周的单采血小板和献血间隔为半年的全血相比较,在感染病毒窗口期献血的概率,前者要远远大于后者。NAT检测效能与献血者献血间隔呈反比,对于献血间隔要求较短的单采血小板捐献者实施NAT,其检测效能尤为突出。因此,NAT检测效能的影响因素不仅与检测灵敏度有关,还和献血者献血间隔有关。

参考文献:

[1] Alvarez-do Barrio M, Gonzalez-Diez R, Hernandez-Sanchez J M, *et al*. Residual risk of transfusion-transmitted viral infections in Spain, 1997-2002, and impact of nucleic acid testing[J]. Euro Surveill, 2005, 10(2): 20-22.

[2] 于志军, 邓雪莲, 高慧卉, 等. 血清学检测与核酸检测在献血者血液筛查中的相关性研究[J]. 实用预防医学, 2014, 21(5): 532-534.

[3] 邓雪莲, 安万新, 梁晓华, 等. 大连市血液中心血清学检测与核酸检测并行的效果观察[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(1): 38-40.

[4] Candotti D, Lin C K, Belkhiri D, *et al*. Occult hepatitis B infection in blood donors from South East Asia: molecular characterisation and potential mechanisms of occurrence[J]. Gut, 2012, 61(12): 1744-1753.

[5] Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? [J]. Clin Chem Lab Med, 2006, 44(7): 750-759.

[6] 蔡丽娜, 陈宝安. 核酸扩增技术(NAT)在献血者血液初筛中的应用现状[J]. 中国实验血液学杂志, 2014, 22(4): 1171-1177.

[7] 曹志刚. 我国血液安全面临的问题和挑战[J]. 临床血液学杂志, 2014, 27(8): 713-715.

[8] 中华人民共和国卫生部医政司. 卫办医政函[2010]226号关于开展2010年血站核酸检测试点工作的通知[Z]. 北京: 中华人民共和国卫生部医政司, 2010.

[9] 李执如. 血液相关病毒核酸检测工作模式概述[J]. 中国输血杂志, 2013, 26(7): 675-677.

[10] 施欣, 孙莉, 高波, 等. 从新版血站技术操作规程看我国血站管理的发展[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(5): 508-512.

[11] 段友红, 程卫芳, 孟海萍, 等. 合肥地区无偿献血者核酸检测的应用研究[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(13): 1742-1744.

[12] 徐志华, 黄宏亮, 姜斌, 等. 2011-2013年盐城市无偿献血者血液核酸检测结果分析[J]. 中国输血杂志, 2014, 27(7): 756-758.

[13] 谢敬文, 蓝文莉, 黎淑贞, 等. 番禺地区无偿献血者酶免阴性样本的核酸检测结果分析[J]. 临床输血与检验, 2014, 16(4): 355-357.

[14] 柯苑, 赵静, 马成平, 等. 核酸检测技术在献血人员血液筛查中的应用[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(20): 2858-2859.

[15] 邹峥嵘, 谢云峥, 伍晓菲, 等. 上海地区无偿献血者乙型肝炎病毒隐匿性感染情况和突变分析[J]. 中国输血杂志, 2013, 26(8): 701-704.

[16] 许友山, 高犁, 胡越, 等. 核酸检测技术在无锡地区无偿献血者检测中的初步应用[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(15): 2067-2068.

[17] 王卓妍, 陈立, 任芙蓉, 等. 实施核酸检测后献血者乙型肝炎病毒筛查策略的探讨[J]. 中国输血杂志, 2014, 27(2): 132-135.

[18] 王宏, 张宁, 王芳, 等. 对献血者血液进行HIV、HBV和HCV病毒核酸检测质量管理的初探[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(8): 1204-1205, 1207.

(**收稿**:2015-04-08;**修回**:2015-05-14)

(编辑 邓强庭)