

· 论 著 ·

以转录介导扩增技术大规模筛查无偿献血者的应用研究

张立波^{1,2}, 夏欣一³, 马贵明², 姚根宏^{1,3}

[摘要] **目的** 研究和探讨以转录介导扩增(transcription mediated amplification, TMA)技术对无偿献血者进行大规模病毒核酸检测,以增强临床使用血液的安全性。**方法** 以 TMA 技术对无偿献血者血液进行 HBV DNA、HCV RNA、HIV1 RNA 3 项联合病毒核酸检测,同时对上述样本以 ELISA 技术检测 HIV、HBV 和 HCV 抗原或抗体。**结果** 54 744 份献血者血液中以 TMA 技术共检出病毒核酸阳性样本 208 例,阳性检出率为 0.38%。ELISA 检出阴性而 TMA 检出阳性的样本共 75 份,阳性率为 0.14%,其中病毒核酸阳性共 46 份,即 HBV DNA 阳性 45 份与 HIV1 RNA 阳性 1 份,HCV RNA 阳性未检出视为不确定结果 29 份。ELISA 阴性而病毒核酸阳性共 46 份,ELISA 检测漏检率为 0.08%。**结论** 以 TMA 技术对无偿献血者血液进行大规模病毒核酸检测能有效缩短无偿献血人群中 HIV、HBV 和 HCV 检测的“窗口期”,显著降低输血可能存在的风险。

[关键词] 核酸检测;转录介导扩增技术;窗口期;血液安全

[中图分类号] R446.5 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2014.01.002

Application of transcription mediated amplification (TMA) technique in large scale voluntary blood donor screening

ZHANG Li-bo^{1,2}, XIA Xin-yi³, MA Gui-ming², YAO Gen-hong^{1,3}. 1. Medicinal School, Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210093, China; 2. Laboratory of Nanjing Red Cross Blood Center, Nanjing, Jiangsu 210003, China; 3. Jinling Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210002, China.

[Abstract] **Objective** To research and investigate the effect of applying the viral nucleic acid test (NAT) on the safety of blood transfusion in large scale. **Methods** Voluntary donors' blood samples were tested with TMA technique by detecting HBV DNA, HCV RNA, HIV1 RNA nucleic acid. The samples were test with ELISA at the same, by detecting HIV/HBV/HCV antigen or antibody. **Results** 208 viral nucleic acid positive samples were detected out of 54 744 donors' blood samples and the positive rate was 0.38%. ELISA negative, NAT positive samples were further tested with discrimination assays. 45 samples were confirmed as HBV DNA positive, none as HCV RNA positive and 1 as HIV1 RNA positive. **Conclusion** TMA can efficiently shorten the window period of HIV, HBV and HCV infection in blood screening in large scale, therefore significantly decrease the potential risks of blood transfusion.

[Key words] nucleic acid test (NAT); transcription mediated amplification(TMA); window period; blood safety

目前不少研究均表明,输血后病毒感染主要是由于献血者处于病毒感染“窗口期”献血^[1-3],或处于隐性感染状态下献血^[4],此时血液中含有病毒核酸,但常规血清学检测技术无法测出。但使用核酸检测技术,正常人病毒感染后数天即能检出极微量的病毒核酸,可缩短“窗口期”,发现隐性病毒感染^[5-6]。本中心自 2012 年 5 月开始采用美国诺华核酸检测系统(Procleix TIGRIS system)及转录介导扩增(transcription mediated amplification, TMA)技术,对献血者 HBV DNA、HCV RNA、HIV1 RNA3 项联合进行病

毒核酸检测,该技术具有易于自动化、标准化、结果可靠等特点,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 2012 年 5 月-2013 年 6 月来我血液中心的献血成功人群,使用无菌、真空、带分离胶、无 RNA 酶的抗凝试管采集血液 5 ml,另用普通抗凝及促凝真空采血管各采集血液 5 ml。

1.1.2 主要试剂 HBV/HCV/HIV 三项联合核酸检测试剂,为美国诺华公司产品。ELISA 试验所用抗 HCV 检测试剂分别为厦门新创和北京万泰产品,HBsAg 检测试剂分别为厦门新创和上海科华产品,抗 HIV/P24 检测试剂分别为厦门新创和北京万泰产品,测乙肝“二对半”试剂为厦门新创产品。

1.1.3 主要仪器 核酸检测系统,为美国诺华

基金项目: 国家自然科学基金(30901652)

作者单位: 1. 210093 江苏南京,南京大学医学院; 2. 210003 江苏南京,南京红十字血液中心实验室; 3. 210002 江苏南京,南京大学医学院附属金陵医院

通讯作者: 姚根宏, E-mail: 37280240@qq.com

生产;全自动酶免分析系统,为哈密尔顿公司生产。

1.2 方法

1.2.1 以 TMA 技术进行三项联合病毒核酸检测
检测模式为单检,在一个反应管中同时检测 HIV1 RNA、HCV RNA、HBV DNA。步骤为:特异性捕获探针与病毒核酸及内标物杂交结合,借助逆转录酶和 RNA 多聚酶的作用,在等温条件下扩增目标产物片段,用荧光检测内标和病毒分子信号。实际操作与结果判定按说明书进行。

1.2.2 以 TMA 技术进行核酸鉴别检测 三项联合病毒核酸检测阳性者分别进行 HIV、HCV 和 HBV 的鉴别试验。同一样本在三个反应管中分别加入特异性捕获探针与病毒核酸及内标物杂交结合,步骤同联检。实际操作与结果判定按说明书进行,鉴别试验未检出视为不确定结果。

1.2.3 ELISA 检测 与核酸检测同步进行,各采用 2 种 ELISA 试剂进行 HBsAg、抗 HCV、抗 HIV/P24 抗原检测,对核酸检出阳性 ELISA 检出阴性样本进行乙肝“两对半”检测。实际操作与结果判定按说明书进行。

1.2.4 跟踪随访 对 ELISA 结果皆为阴性但三项联合病毒核酸结果为阳性的献血者进行跟踪随访,随访时间为 30 ~ 120 d,不定期采集其血样进行常规血液筛查、病毒核酸检测及补充血清学实验。

2 结果

2.1 三项联合病毒核酸检测结果 54 744 份样本检测病毒核酸阳性共 208 份,阳性率为 0.38%,其中 TMA 检测阳性而 ELISA 检测阴性共 75 份,阳性率为 0.14%。

2.2 病毒核酸鉴别结果 对 TMA 检测阳性而 ELISA 检测阴性的 75 份病毒核酸样本进行鉴别试验,其中 TMA 鉴别为 HBV DNA 阳性共 45 份,HIV1 RNA 阳性 1 份,HCV RNA 阳性未检出为不确定结果 29 份。ELISA 阴性而病毒核酸阳性共 46 份,

ELISA 检测漏检率为 0.08%。

2.3 乙肝“两对半”结果 对 45 份 HBV DNA 阳性献血者血液进行“两对半”检测,结果见表 1。

2.4 跟踪随访结果 45 例 HBV DNA 阳性献血者随访到 10 例,乙肝“两对半”检测结果见表 2。29 例鉴别为结果不确定的献血者随访到 8 例,重新进行核酸检测,发现 HBV DNA 阳性 1 例,其余为阴性。

对 1 例 HIV1 RNA 阳性献血者随访进行 7 d 及 15 d 的抗 HIV/P24 抗原检测,并委托南京市疾控中心进行免疫印迹确证试验(western blot, WB),结果见表 3。第 7 天患者 ELISA 检测显示抗 HIV 抗体及 HIV/P24 抗原出现,均为弱阳性结果(新创 1.44、万泰 1.43);第 15 天抗 HIV 抗体检测结果增高(新创 5.47),HIV/P24 抗原检测亦显示为强阳性(万泰 17.71)。对第 15 天样本进行确证试验,结果为可疑,但检出 GP160 弱阳性及 HIV/P24 阳性。

3 讨论

本文结果显示,南京地区部分献血者单独病毒核酸检测阳性率为 0.14%,与华东地区的一些城市如常州(0.1%)^[7]、张家港(0.12%)^[8]和南昌(0.18%)^[9]接近,高于济南(0.066%)^[6]、天津(0.047%)^[10]和大连(0.07%)^[11]的阳性率,分析其原因,可能与人群分布的地区差异与所使用的核酸检测试剂的不同有关。核酸检测阳性的样本中绝大多数为 HBV DNA 阳性,与我国是乙肝高发区,HBsAg 阳性率达 10.2%^[12-13]有关。10 位 HBV 感染者随访追踪结果显示,HBV 感染者中存在 HBV 窗口期患者 3 例,即 7、8、9 号感染者,初筛乙肝“两对半”为全阴性,随访发现 7、8 号感染者 HBsAg(+),抗 HBe(+),抗 HBc(+);9 号感染者 HBsAg(+),HBeAg(+),抗 HBc(+);其他随访者均为隐匿性感染患者。本文未发现 HCV RNA 阳性,有可能与 HCV 在我国的地域分布不一相关^[14],而南京地区 HCV 处于低流行状态。对 1 例 HIV 感染者追踪

表 1 45 份 HBV DNA 阳性血液“两对半”检测结果

| <i>n</i> | HBsAg | 抗 HBs | HBeAg | 抗 HBe | 抗 HBc |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 5 | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) |
| 17 | (-) | (-) | (-) | + | + |
| 13 | (-) | (-) | (-) | (-) | + |
| 3 | (-) | + | (-) | (-) | + |
| 4 | (-) | + | (-) | (-) | (-) |
| 2 | (-) | + | (-) | + | + |
| 1 | (-) | (-) | + | (-) | (-) |

表 2 HBV DNA 阳性献血者原始及追踪检测结果 (n = 10)

| 编号 | 间隔时间 (d) | HBsAg | 抗 HBs | HBeAg | 抗 HBe | 抗 HBc | 结果判定 |
|----|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|
| 1 | 0 | (-) | (-) | (-) | (-) | + | HBV 隐匿性感染 |
| | 32 | (-) | + | (-) | + | + | |
| 2 | 0 | (-) | (-) | (-) | (-) | + | HBV 隐匿性感染 |
| | 62 | (-) | + | (-) | (-) | + | |
| 3 | 0 | (-) | + | (-) | (-) | + | HBV 隐匿性感染 |
| | 36 | (-) | + | (-) | (-) | + | |
| 4 | 0 | (-) | + | (-) | (-) | + | HBV 隐匿性感染 |
| | 33 | (-) | + | (-) | (-) | + | |
| 5 | 0 | (-) | (-) | (-) | + | + | HBV 隐匿性感染 |
| | 40 | (-) | (-) | (-) | + | + | |
| 6 | 0 | (-) | (-) | (-) | + | + | HBV 隐匿性感染 |
| | 45 | (-) | + | (-) | + | + | |
| 7 | 0 | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | HBV 窗口期 |
| | 50 | + | (-) | (-) | + | + | |
| 8 | 0 | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | HBV 窗口期 |
| | 47 | + | (-) | (-) | + | + | |
| 9 | 0 | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | HBV 窗口期 |
| | 83 | + | (-) | + | (-) | + | |
| 10 | 0 | (-) | + | (-) | (-) | (-) | HBV 隐匿性感染 |
| | 49 | (-) | + | (-) | (-) | (-) | |

注:7、8、9 号 HBsAg 转阳

表 3 1 例 HIV1 RNA 阳性献血者追踪检测结果

| 试剂 | 第 1 天 | 第 7 天 | 第 15 天 |
|---------------|---------------------|-------|--------|
| ELISA:新创抗 HIV | 0.02 | 1.44 | 5.47 |
| 万泰抗 HIV/P24 | 0.03 | 1.43 | 17.71 |
| 诺华 TMA | 16.11 | 18.96 | 22.20 |
| WB: | GP160 弱阳性 HIV/P24 + | | |

注:表中 ELISA 检测结果为样品吸光度/临界值

显示,第 7 天患者 ELISA 检测显示抗 HIV 抗体及 HIV/P24 抗原出现,均为弱阳性结果(新创 1.44、万泰 1.43);第 15 天抗 HIV 抗体检测结果增高(新创 5.47),HIV/P24 抗原检测亦显示为强阳性(万泰 17.7)。对第 15 天样本进行确证试验,结果为可疑,但检出 GP160 及 HIV/P24 抗原条带,说明大规模的病毒核酸筛查可有效缩短 HIV 窗口期。8 位不确定结果献血者追踪显示,只有 1 例经鉴别试验检出 HBV DNA,其余均为阴性。对于不确定结果推断可能与以下几个原因有关:①因鉴别试验具有周期性,阳性样本不能立即进行鉴别,样本储存损伤可能影响核酸的检测结果。②联检试剂与鉴别试剂的探针质量和数量上的差异导致检出能力不同。③病毒载量过低导致漏检,病毒载量处于检出下限时,液体中病毒的不均匀分布导致吸样后提取扩增差异可影响病毒的检测结果。④污染导致的假阳性,因诺华检测系统为一体机,且与 ELISA 技术同步进行检测,

存在大量阳性样本被直接扩增,使一体机狭小的空间产生少量气溶胶致污染的可能。

本研究发现,ELISA 检测方法会产生一定数量的漏检风险(漏检率为 0.08%),同时发现 HBsAg 或抗 HCV 双试剂阳性但病毒核酸检测结果阴性样本 6 例,由于未对 HBsAg 进行“中和试验”及抗 HCV 进行 WB 试验,因此尚不能确认其为 HBsAg 或抗 HCV 为真阳性,故未在结果中加以显示。但与曾劲峰等^[15]研究相似,可能为病毒在献血者体内存在间歇性或低拷贝,而抗原或抗体存在时间较长等导致 ELISA 法检出而 TMA 法未检出。这在一定程度上亦说明了病毒核酸检测不能替代常规的血清学检测,两者在降低输血相关病毒感染风险中的作用也并不只是简单的互补,将 TMA 技术与 ELISA 技术充分结合起来有利于更好地保证输血安全系数,有效保证临床用血安全。如一袋血处于 HIV 窗口期且检测结果阴性,经成分制备可制备成红细胞悬液、

冰冻血浆及冷沉淀 3 种制品,若未进行病毒核酸检测,势必造成至少 3 名受血者感染。因此,以 TMA 技术大规模筛查无偿献血者能明显降低输血可能导致的感染风险。

【参考文献】

[1] Soldan K, Barbara JA, Ramsay ME, et al. Estimation of the risk of hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus infectious donations entering the blood supply in England [J]. Vox Sang, 2003, 84(4): 274-286.

[2] Gallarda JL, Dragon E. Blood screening by nucleic acid amplification technology: current issues, future challenges [J]. Mol Diag, 2000, 5(1): 11-12.

[3] 何亚琴,徐立,杨爱龙. 核酸检测在筛查献血者乙型肝炎病毒中的应用[J]. 中国输血杂志, 2013, 26(3): 147-149.

[4] Allain JP. Occult hepatitis B virus infection; implications intransfusion[J]. Vox Sang, 2004, 86(2): 83-91.

[5] Stramer SL, Glynn SA, Kleinman SH, 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.

[6] 张妍,朱海峰,孙波,等. 核酸检测技术在血液筛查中的应用及分析[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(12): 1298-1300.

[7] 何亚琴,张建伟,杨爱龙,等. 核酸检测技术在常州地区献血筛查中的应用[J]. 中国输血杂志, 2011, 24(7): 560-561.

[8] 夏云峰. 张家港地区献血者血液核酸检测结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(16): 2174-2175.

[9] 徐晶. 核酸检测技术在南昌地区无偿献血血液筛查中的应用[J]. 实验与检验医学, 2012, 30(5): 437-438.

[10] 王霞,潘彤,李娜,等. 天津市无偿献血者 HBV、HIV 和 HCV 核酸检测分析[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(10): 1008-1009.

[11] 邓雪莲,安万新,梁晓华. 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): 38-39.

[12] 成军,孙长贵,戴玉柱,等. 驻浙部队 HBV 感染情况及低浓度 HBsAg 流行病学调查[J]. 东南国防医药, 2009, 11(4): 298-301.

[13] 陈勇,胡毓安,袁大莉,等. 乙型肝炎病毒表面大蛋白的检测及其临床应用[J]. 东南国防医药, 2012, 14(6): 525-527.

[14] 林秀蓉,陈巧绘,林海. TaqMan-MGB 探针针对 HCV 基因的检测及分型研究[J]. 东南国防医药, 2012, 14(1): 20-22.

[15] 曾劲峰,郑欣,许晓陶. ELISA 检测与 NAT 在血液筛查应用中的互补性研究[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(10): 1012-1013.

(收稿日期:2013-11-14;修回日期:2013-11-27)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)

(上接第 5 页)

[7] Hara AK, Paden RG, Silva AC, et al. Iterative reconstruction technique for reducing body radiation dose at CT; feasibility study[J]. AJR, 2009, 193(3): 764-771.

[8] Hirai N, Horiguchi J, Fujioka C, et al. Prospective versus retrospective ECG-gated 64-detector coronary CT angiography: assessment of image quality, stenosis, and radiation dose [J]. Radiology, 2008, 248(2): 424-430.

[9] Shuman WP, Branch KR, May JM, et al. Prospective versus retrospective ECG gating for 64-detector CT of the coronary arteries; comparison of image quality and patient radiation dose[J]. Radiology, 2008, 248(2): 431-437.

[10] Stolzmann P, Leschka S, Scheffel H, et al. Dual-source CT in step-and-shoot mode; noninvasive coronary angiography with low radiation dose[J]. Radiology, 2008, 249(1): 71-80.

[11] Ko SM, Kim NR, Kim DH, et al. Assessment of image quality and radiation dose in prospective ECG-triggered coronary CT angiography compared with retrospective ECG-gated coronary CT angiography[J]. Int J Cardiovasc Imaging, 2010, 26(1): 93-101.

[12] 张晓东,唐秉航,李芳云,等. 心率对 256 层 CT 前瞻性心电门控冠状动脉成像质量的影响[J]. 放射学实践, 2011, 26(7): 712-725.

[13] Austen WG, Edwards JE, Frye RL, et al. A reporting system on patients evaluated for coronary artery disease. Report of the Ad Hoc Committee for Grading of Coronary Artery Disease, Council on Cardiovascular Surgery, American Heart Association[J]. Circulation,

1975, 51(4 Suppl): 5-40.

[14] Bischoff B, Hein F, Meyer T, et al. Comparison of sequential and helical scanning for radiation dose and image quality; results of the prospective multicenter study on radiation dose estimates of cardiac CT angiography (PROTECTION) I Study [J]. AJR, 2010, 194(6): 1495-1499.

[15] Bongartz G, Golding SJ, Jurik AG, et al. European Commission Website. European guidelines for multislice computed tomography: appendix C. Funded by the European Commission, March 2004. Contract No. FIGM-CT2000-20078-CTTIP. www.msct.eu/PDF_FILES/EC%20CA%20Report%20D5%20%20Dosimetry.pdf. Accessed March 26, 2009.

[16] 吴兆苏,姚崇华,赵冬,等. 我国多省市心血管病趋势及决定因素的人群监测(中国 MONICA 方案)I. 发病率和死亡率监测结果[J]. 中华心血管病杂志, 1997, 25(1): 6-11.

[17] Brenner DJ, Hall EJ. Computed tomography; an increasing source of radiation exposure [J]. N Engl J Med, 2007, 357(22): 2277-2284.

[18] McCollough CH, Bruesewitz MR, Kofler JM Jr. CT dose reduction and dose management tools; overview of available options[J]. Radiographics, 2006, 26(2): 503-512.

[19] 高建华,孙尧昶,李剑颖,等. 后置滤过器 C2 对 64 排螺旋 CT 冠状动脉成像质量的影响[J]. 中国医学影像技术, 2007, 23(1): 73-76.

(收稿日期:2013-10-21;修回日期:2013-11-01)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)