

国产全自动血液病毒核酸筛查系统的建立和应用研究

叶贤林¹, 孙淑君¹, 容莹², 李活¹, 许晓绚¹, 张红¹, 古醒辉¹

(1 深圳市血液中心卫生部临检中心病毒核酸检测联合实验室, 广东 深圳 518035; 2 深圳市血液中心龙岗分站, 广东 深圳 518000)

[摘要] **目的** 建立适合我国供血者全自动核酸检测的方法(国产), 探讨在我国血液筛查中引进全自动核酸筛查的可行性。**方法** 在酶联免疫吸附试验筛查血液基础上, 采用全自动核酸提取仪进行血样汇集(8人份), 提取样本核酸, 应用聚合酶链反应(实时荧光 PCR)在 ABI 7300 上进行扩增和检测, 并用国际标准核酸质控品考评检出限量, 对阳性供血者追踪检测。**结果** 经考评及常规应用, 该系统全自动汇集及全自动核酸提取、扩增、检测 95% 的检出限量, 乙型肝炎病毒(HBV) DNA、丙型肝炎病毒(HCV) RNA 和人免疫缺陷病毒(HIV)-1 RNA 分别为 35.9 IU/mL、147.7 IU/mL、66.1 IU/mL, 95% 可信区间分别为 [21.9 ~ 124.8]、[93.3 ~ 386.4] 和 [38.8 ~ 235.3]。对 60 112 份样本共 7 514 汇集池进行检测分析, HBV DNA 阳性 12 份, 阳性比例为 1:5 009, 其中 6 份为抗 HBc 阳性; HCV RNA 阳性 1 份, 比例为 1:60 112; 未检出 HIV-1 RNA 阳性。对 7 例 HBV DNA 阳性者进行追踪, 发现 4 例发生了血清转换现象。**结论** 我国产全自动血液核酸筛查系统可应用于血液 HBV DNA、HCV RNA 和 HIV RNA 的筛查工作。

[关键词] 血液筛查; 输血传播病毒; 核酸扩增技术; 供血者; 输血安全

[中图分类号] R446 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2010)05-0327-04

Establishment and application of domestic entirely automatic system of nucleic acid amplification testing in blood screening

YE Xian-lin¹, SUN Shu-jun¹, RONG Ying², LI Huo¹, XU Xiao-xuan¹, ZHANG Hong¹, GU Xing-hui¹ (1 Shenzhen Blood Center Collaborative Laboratory for Nucleic Acid Test of National Center for Clinical Laboratories, Shenzhen 518035, China; 2 Shenzhen Blood Center, Shenzhen 518000, China)

[Abstract] **Objective** To establish domestic entirely automatic nucleic acid testing (NAT) assay for blood screening, and to study the feasibility of domestic NAT. **Methods** On the basis of enzyme linked immunosorbent assay for blood screen, blood samples were pooled and extracted nucleic acid with entirely automatic nucleic acid apparatuses, then the extracted nucleic acid was amplified and detected with real-time polymerase chain reaction, sensitivity and efficacy was evaluated, NAT positive donors were traced. **Results** The 95% detection limits of HBV DNA, HCV RNA and HIV-1 RNA tested by automatic system were 35.9 IU/mL, 147.7 IU/mL and 66.1 IU/mL, respectively, 95% confidence intervals were [21.9, 124.8], [93.3, 386.4] and [38.8, 235.3] respectively. Twelve of 60 112 samples were HBV DNA positive, DNA positive ratio was 1:5 009, 6 of which were anti-HBc positive; one sample was HCV RNA positive, RNA positive ratio was 1:60 112; no HIV-1 RNA positive was detected among all samples. Seven HBV DNA donors were followed up, 4 of whom had seroconverted. **Conclusion** The domestic entirely automatic system can be applied in blood HBV DNA, HCV RNA and HIV RNA screening.

[Key words] blood screen; blood-transmitted virus; nucleic acid amplification techniques; donor; safety blood transfusion

[Chin Infect Control, 2010, 9(5):327-330]

核酸扩增技术(nucleic acid amplification test, NAT)是一种新兴的血液传染病检测方法,可直接检

[收稿日期] 2009-12-25

[作者简介] 叶贤林(1966-),男(汉族),湖北省浠水县人,教授,主要从事输血传染病检测研究。

[通讯作者] 叶贤林 E-mail: yexianlin@hotmail.com

测病毒核酸,显著缩短目前酶联免疫检测方法的“窗口期”,检出因病毒变异、免疫沉默感染等造成的漏检感染病毒的血液,降低输血感染风险,已成为发达国家的血液筛查病毒的必要手段^[1-2]。深圳市血液中心于 2006 年与上海科华生物股份有限公司合作,建立了全自动样本汇集的方法和平台,对全自动核酸提取仪 STARLET 进行了评估和应用,对 ABI 7300 核酸扩增和检测系统进行了日常工作的测试,均获得满意结果,现报告如下。

1 材料与方 法

1.1 试剂与仪器 全自动核酸提取仪(瑞士 HIM-ILTON STARLET)、核酸扩增检测仪(美国 ABI 7300)、核酸分离纯化试剂盒(上海科华,批号 20080912)、核酸扩增检测试剂盒(上海科华,批号 20080912);乙型肝炎病毒(HBV)DNA、丙型肝炎病毒(HCV)RNA 和人免疫缺陷病毒(HIV)-1 RNA 国际标准品(澳大利亚 NRL 提供,编号 NAT4315),浓度均为 2 000 IU/mL;乙型肝炎表面抗原(HBsAg)ELISA 试剂(国产新创,批号:20081122;美国 Abbott,批号 L406610)、乙型肝炎两对半试剂(国产新创和美国 Abbott,批号 201001641、L406610)以及 HBsAg 中和试剂(美国 Abbott,批号 L3301120)。

1.2 样本准备 将采集的 5 mL EDTA 抗凝全血保存于 2℃~8℃ 冰箱中,HBV/HCV/HIV 检测均为阴性,3 000 r/min 离心 5~10 min,取上清血浆用于实验。

1.3 全自动汇集 在 STARLET 上启动级汇集程序,进行 45 μL×8 份样本汇集。储存汇集池的样本条码文件以备追溯。汇集完毕后,仪器自动将汇集

样及阴阳对照转移至 AGOWA 磁分离器以备提取用,若汇集样检测为阳性,将对应的 8 份样本取出,进行单人份检测,以确认最终阳性标本。

1.4 核酸全自动提取 将所需要的裂解液,磁珠,洗液 A、B 和 C 及所有耗材等装载在 STARLET 核酸提取仪工作台上,仪器可自动提取核酸。

1.5 核酸全自动扩增及检测 按检测试剂盒操作说明要求准备聚合酶链反应(PCR)液,往反应管中加 15 μL PCR 反应液及 15 μL 已提取的核酸,置入核酸扩增检测仪上,按程序操作,仪器自动完成扩增和检测。内标阳性,样本阳性报阳性结果。

1.6 质量控制 每天室内质控物由试剂公司合作配制,参加卫生部和澳大利亚 NRL 的室间质评。进行方法灵敏度和重复性实验时,将已知浓度的标准品用阴性血清于不同时间配制不同拷贝数的应用标准液,进行重复全自动提取、扩增和检测。

1.7 追踪检测 对追踪的 HBV DNA 阳性样本进行乙型肝炎两对半、血清丙氨酸转氨酶(ALT)检测,HBsAg 同时用 3 种试剂测定,阳性结果用中和试验确证。同时进行 HBV DNA 定量检测(科华荧光定量 PCR)。

2 结果

2.1 方法灵敏度和重复性 结果见表 1。应用 Probit 概率统计(SAS 9.0)计算 95% 检测限量及 95% 可信限,HBV DNA、HCV RNA 及 HIV-1 RNA 95% 检测限量分别为 35.9 IU/mL、147.7 IU/mL 和 66.1 IU/mL。95% 可信区间分别为 [21.9~124.8]、[93.3~386.4] 和 [38.8~235.3]。

表 1 HBV DNA、HCV/HIV-1 RNA 标准品全自动考评结果

Table 1 The results of HBV DNA, HCV/HIV-1 RNA sensitivity tests

测定批	浓度 (IU/mL)	HBV DNA		HCV RNA		HIV-1 RNA	
		阳性数/ 重复数	检出率 (%)	阳性数/ 重复数	检出率 (%)	阳性数/ 重复数	检出率 (%)
1	500	12/12	100.00	12/12	100.00	12/12	100.00
2	200	12/12	100.00	12/12	100.00	12/12	100.00
3	100	10/10	100.00	11/12	91.67	12/12	100.00
4	50	19/20	95.00	7/12	58.33	11/12	91.67
5	25	11/12	91.67	4/12	33.33	8/12	66.67
6	10	5/8	62.50	1/8	12.50	3/8	37.50
7	5	1/8	12.50	0/8	0.00	1/8	12.50

2.2 检测结果 2006—2009 年期间共对 60 112 人

份样本计 7 514 个汇集池进行扩增检测,最终确认

HBV DNA 阳性样本 12 份,经对献血员重新采血单份检测仍为阳性,HBV DNA 阳性比例为 1:5 009,其中 6 例为抗 HBc 阳性。从 3 份汇集池阳性确认 HCV RNA 阳性样本 1 份,比例为 1:60 112。未检出 HIV-1 RNA 阳性。

2.3 阳性献血员追踪检测 见表 2。共对 7 例 HBV DNA 阳性献血员进行不定期追踪检测,其中 4 例发现有血清转换,2 例呈明显窗口期现象(编号 1

和 10,乙型肝炎两对半结果初期全部为阴性)。其中 1 号(编号)2 次定量结果在 200 IU/mL 以上,HBsAg 在 38 d 转阳,47 d 后检测 HBsAg 为阴性,抗 HBs 和抗 HBc 转换为阳性,机体免疫产生抗体对病毒进行中和作用;10 号(编号)检出阳性后,HBsAg 很快转阳性,病毒载量呈快速增长态势,同时乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)转阳性,回访该献血者已进行药物治疗。

表 2 ELISA 阴性 NAT HBV DNA 阳性献血者资料及追踪概况

Table 2 Tracing results of ELISA(-) HBV DNA(+) donors

编号	采血时间	性别	年龄(岁)	HBsAg	抗 HBs	HBeAg	抗 HBe	抗 HBc	DNA(IU/mL)
1	2008-04-10	女	24	-	-	-	-	-	251.6
	12 d			-	-	-	-	-	293.4
	38 d			+	-	-	-	-	136.0
	47 d			-	+	-	+	+	-
2	2008-04-03	男	29	-	-	-	-	+	21.8
3	2008-07-11	男	22	-	+	-	-	+	32.4
4	2008-08-07	男	26	-	-	-	-	+	230.0
5	2008-08-07	男	20	-	-	-	-	+	9.0
	19 d			-	-	-	-	+	7.8
6	2008-09-25	女	21	-	-	-	-	-	15.2
	105 d			-	+	-	-	+	-
7	2008-10-02	女	21	-	+	-	-	-	9.0
	57 d			-	+	-	-	-	-
8	2008-12-17	女	28	-	+	-	-	-	-
9	2009-01-22	男	45	-	-	-	-	+	+
	35 d			-	-	-	+	+	+
10	2009-03-03	男	19	-	-	-	-	-	135.0
	13 d			+	-	-	-	-	25.8
	20 d			+	-	+	-	-	3.84×10^4
	42 d			+	-	+	-	-	1.1×10^8
	127 d			-	-	-	+	+	+
11	2009-03-27	女	19	-	+	+	-	+	0.8×10^3
12	2009-04-14	男	22	-	-	-	-	-	15.6
	8 d			-	-	-	-	-	-

-:阴性;+:未能定量,定性弱阳性

样品追踪的时间为定期采样间隔

3 讨论

目前用于 NAT 的全自动方法,国际上有罗氏公司 PCR 和 Chiron 公司转录依赖扩增技术(TMA)。最早为 1999 年日本和罗氏公司合作采用全自动方法同时检测 HBV、HCV 和 HIV 3 项病毒^[3],之后该公司应用 MPLC 全自动核酸提取的成套设备加上 COBAS AMPLICOR 扩增检测设备在国际上首次实现核酸全自动提取和检测,还开发了 COBAS s201 Taqscreen™ 实时荧光核酸血液筛查系统,该自动化设备可在单管中同时对 3 种病毒进行检测,提高了

检测灵敏度,2005 年获 FDA 注册。而 Chiron 公司基于 TMA 技术研发的 Tigris 系统也可全自动化完成血液核酸筛查,且速度快,通量大^[4],特别适合单份检测,2007 年 5 月获 FDA 注册。但这 2 种进口仪器的成本和试剂的费用都很高,阻碍了在我国推广和应用。我国部分地区应用核酸扩增检测技术对血液筛查进行了尝试,但大多数都停留在手工及半自动化操作阶段,缺点为耗时、繁琐、核酸提取效率差,易导致假阴性,也易导致污染而产生假阳性^[5]。本实验应用 STARLET 自动化平台进行样本汇集和核酸自动化提取,在 ABI7300 平台扩增和检测,建立了一套完整的自动化体系对血液标本进行常规检

测和参加国内与国际室间质评, HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA 灵敏度分别为 35.9 IU/mL、147.7 IU/mL、66.1 IU/mL, 虽然与国际先进水平相比还存在一定差距, 但是我国开始从手工阶段向自动化阶段的一个有效尝试。

本次在 60 112 份血清学检测阴性标本中检出 12 份 HBV DNA 阳性标本, 阳性比例为 1:5 009, 大大高于西方发达国家。由于深圳市重复献血人数达到 60% 以上, 另外采用进口高质量、高灵敏度试剂进行筛查, 血液质量较国内其他地区高, 表明在我国现有的 HBsAg 检测系统下, HBV 经输血传播的危险应引起高度重视, 在条件好的地区应该首先实施病毒核酸检测血液, 进一步提高血液安全。乙型肝炎是经血传播的危害严重的病毒性传染病, 每年新发病例 50 万^[6]。目前我国仍以 HBsAg 阳性与否作为筛查献血者 HBV 感染的指标, 由于存在窗口期、低水平感染不易检出及基因变异等, 可导致 HBV DNA 阳性血样漏检。有研究表明^[7], HBsAg 阴性、抗 HBc 阳性的健康人群中约有 10% HBV DNA 阳性, 抗 HBs 和抗 HBc 阳性的健康人群中亦有 5% ~ 15% HBV DNA 阳性。由于 HBV 感染后最先存在于血清中的是 HBV DNA, 而就算用灵敏度较高的 ELISA 试剂检测抗原、抗体也要经过 50 ~ 80 d 的窗口期^[8]。因此, 目前采用的 ELISA 方法不能提高血液的安全性, 应采用提高检测灵敏度的方法如 NAT, 以保证血液安全。

输血所致传染病一直是国内外输血学界关注的热点, 由于加强血源管理及检测技术的不断改进, 经输血传染病的感染率明显下降。美国经过 10 多年利用 NAT 技术检测血液中的 HIV 和 HCV, 无偿献血者 HCV RNA 和 HIV RNA 阳性检出率下降至 1/222 200 及 1/2 200 000^[9]。近年国内报道的献血者 HBV DNA 和 HCV RNA 阳性检出率显著高于国外献血者^[1], 给输血安全带来极大的威胁。而我国各地供血机构发展不平衡, 在献血者中全面推广应用 NAT 技术, 自动化程度是关键。由于手工方法及半自动实验误差大, 核酸提取效率差, 易致假阴性或

假阳性, 因而难以在我国血液筛查中推广使用, 而进口设备、试剂又太贵。本研究应用我国自己的成套核酸提取及扩增检测试剂, 实现从样本准备、核酸提取及扩增、检测一体化与自动化, 符合大批量的 NAT 血液检测中心工作流程的需要。这是国内首次将国产 NAT 全自动系统应用于血液筛查的有益尝试, 在有条件的地区可考虑推广应用。

[参 考 文 献]

- [1] 任芙蓉. 核酸检测技术在国内外血液筛查中应用[J]. 北京医学, 2008, 30(8): 561-563.
- [2] Engelfriet C P, Reesink H W. Implementation of donor screening for infectious agents transmitted by blood by nucleic acid technology (International Forum) [J]. Vox Sanguinis, 2002, 82(1): 87-111.
- [3] Meng Q, Wong C, Rangachari A, et al. Automated multiplex assay system for simultaneous detection of hepatitis B virus DNA, hepatitis C virus RNA, and human immunodeficiency virus type 1 RNA [J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(12): 2937-2945.
- [4] Reesink H W, Engelfriet C P, Henn G, et al. Occult hepatitis B infection in blood donors [J]. Vox Sanguinis, 2008, 94(1): 153-166.
- [5] Mahony J B. Role of confirmatory PCRs in determining performance of chlamydia Amplicor PCR with endocervical specimens from women with a low prevalence of infection [J]. J Clin Microbiol, 1994, 32(11): 2490-2493.
- [6] 叶贤林, 曾昭鉴. 乙型肝炎病毒血液核酸筛查进展[J]. 中国输血杂志, 2007, 20(6): 537-539.
- [7] Drosten C, Weber M, Seifried E, et al. Evaluation of a new PCR assay with competitive internal control sequence for blood donor screening [J]. Transfusion, 2000, 40(2): 718-724.
- [8] Yoshikawa A, Tomasaka D, Simasaku L, et al. Hepatitis B NST virus-positive blood donors in the early and late stages of HBV infection: analyses of the window period and kinetics of HBV DNA [J]. Vox Sang, 2005, 88(1): 77-86.
- [9] Stramer S L, Simone A C, Steven H K, et al. Detection of HIV-1 and HCV infectious among antibody-negative blood donors by nucleic acid amplification testing [J]. N Engl J Med, 2004, 351(2): 760-768.