

负相关关系,受教育程度越高,抗-HCV 流行率越低;与职业状况呈负相关,职业越稳定(如学生、公务员、军人、医务人员)抗-HCV 流行率越低,这与许多报道均相符<sup>[10]</sup>。

综上所述,我国 HCV 流行率虽略有所下降,但仍处于一个较高的流行水平。抗-HCV 确证阳性献血者人口学特征的变化,也提示这些地区应该重新制定新的招募计划,以达到最大限度地降低输血感染 HCV 风险。同时,单试剂反应性样本如此低的确证阳性率也提示我国急需性能更优异的检测试剂,在提高输血安全的同时,减少不必要的血液浪费。

#### 参 考 文 献

- [1] 张玉,高瞻,杨亚闪,等. 中国 5 个地区献血人群 HCV 基因型分布及进化分析. 中国输血杂志, 2017, 30(5): 443-448.
- [2] Collaborators POH. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 2017, 2(3): 161-176.
- [3] 杨娜,魏广勇,房金娟,等. 2011 至 2014 年衡水市无偿献血者抗-HCV 筛查结果分析. 河北医药, 2017, 39(5): 773-775.
- [4] 欧阳玲,黄建国,谢秀华,等. 无偿献血人群 HCV 感染的检测和输血残余风险分析. 实验与检验医学, 2010, 28(4): 344-

346.

- [5] Song Y, Bian Y, Petzold M, et al. Prevalence and trend of major transfusion-transmissible infections among blood donors in western China, 2005 through 2010. *Plos One*, 2014, 9(4): 217-225.
- [6] 释艳华, 龚妍妍. 2011~2014 年襄阳地区无偿献血人群抗-HCV 检测结果分析. 临床输血与检验, 2016, 18(5): 467-468.
- [7] 杨瑞云. 2011 年郑州市无偿献血者 HCV 感染情况分析. 河南预防医学杂志, 2013, 24(2): 112.
- [8] 丁卫平, 李晶. 2009-2014 年宝鸡地区不同人群无偿献血者血液检测结果分析. 临床血液学杂志(输血与检验), 2016(5): 823-825.
- [9] 陈文霞, 左丽, 钟江, 等. 贵阳地区无偿献血人群 HCV 筛查的结果分析. 重庆医学, 2017, 46(17): 2392-2393.
- [10] Wang J, Liu J, Huang Y, et al. The persistence of hepatitis C virus transmission risk in China despite serologic screening of blood donations. *Transfusion*, 2013, 53(10 Pt 2): 2489-2497.
- [11] 程玉根, 梁启忠, 费海燕. 单试剂阳性献血者屏蔽与归队的可行性分析. 中国输血杂志, 2017(12): 1376-1378.

(2018-08-25 收稿, 09-15 修回)

本文编辑: 闻欣

## • 论 著 •

# 核酸筛查中混检阳性拆分单检阴性血液标本的 HBV 残余风险分析

周磊 刘颖 邓雪莲 邹亚轩 周璐 王新梅 臧亮<sup>△</sup>(大连市血液中心 辽宁 大连 116001)

**摘要:**目的 了解大连地区无偿献血者血液筛查中混样反应性拆分单检无反应性血液标本的输血传播乙型肝炎病毒(HBV)残余风险,评估应用不同原理核酸检测(NAT)血液筛查系统在降低输血传播 HBV 残余风险中的作用。方法 应用 PCR-荧光探针法(Cobas TaqScreen MPX Test, V2.0)以 6 人份混样模式做定性检测 HBV/HCV/HIV,混检反应性标本行拆分单检,采用 TMA 检测平台(Ultrio Plus /Ultrio Elite)对拆分无反应性的标本进行单检。TMA NAT 平台得到的反应性标本再分别重复联检 3 遍,同时应用 PCR-荧光探针法进行 4 遍 6 人份混样检测和 4 遍单人份检测,并用罗氏电化学发光作为第 3 方试剂,对本标本乙肝血清学 5 项进行检测,以确认 HBV 感染情况。结果 2017 年 8 月—2018 年 7 月,本中心 MP-NAT 方法共检测 9 689 pool(57 868 份无偿献血者标本),混检呈反应性的有 88 pool,经单人份拆分检测,其中拆分实验结果呈无反应性的有 24 pool(141 份标本),拆分阳性率为 72.73%。141 份标本用 TMA 联检实验复检,4 份标本呈反应性。将 4 份标本分别重复 4 遍 MPX-6 NAT,结果均为无反应性;4 份标本又进行 4 遍 ID-NAT 实验,仅有 2 份标本呈反应性(S018001 1/4, S018002 3/4),其余 2 份标本仍不能重现反应性结果。Tigris 和 Panther NAT 系统对该 4 份标本分别重复 3 遍 HBV/HCV/HIV 联检实验,结果显示,Tigris 系统有 2 份标本呈反应性(S018002 3/3, S018004 1/3);Panther 系统中,也有 2 份标本检测结果呈反应性(S018001 2/3, S018002 1/3)。仅 1 份标本不可重现核酸反应性。用电化学发光法检测乙肝两对半,结果可见,4 份标本的 A-HBc 均为阳性;2 份标本 A-HBe 为阳性(S018002, S018004);2 份标本 HBsAg 为阳性(S018001, S018004)。结论 核酸筛查中混样阳性拆分单检阴性血液标本有输血 HBV 感染残余风险,对这部分标本的结果判定需慎重对待,防止漏检,以提高血液的安全性。

**关键词:** 核酸检测; 血液筛查; 乙型肝炎病毒; 残余风险

中图分类号: R446.11<sup>+</sup>2 R512.6<sup>+</sup>2 文献标识码: A 文章编号: 1004-549X(2018)9-0985-04

doi: 10.13303/j. cjbt. issn. 1004-549x. 2018. 09. 018

<sup>△</sup>通信作者: 臧亮(1977.09-),男,副主任技师,主要从事输血传播疾病和血液安全的研究,电话: 0411-82653557,Email: zangliangdl@163.com

**HBV residual risk analysis of MPX-6 Positive but Individual Test negative blood specimens in nucleic acid screening**  
ZHOU Lei, LIU Ying, DENG Xuelian, ZOU Yaxuan, ZHOU Lu, WANG Xinmei, ZANG Liang. Dalian Blood Center, Dalian

116001 ,China. Corresponding author: ZANG Liang.

**Abstract: Objective** In order to analyze the residual risk of HBV transfusion-transmitted hepatitis B virus ( HBV) in the blood screening of blood donors in Dalian area ,and to evaluate the role of nucleic acid detection ( NAT) blood screening systems in reducing the residual risk of HBV transfusion-transmitted. **Methods** The QPCR Test ( Cobas TaqScreen MPX Test ,V2.0) was used for qualitative detection of HBV/HCV/HIV in pools of 6 ,and the reactive pool's specimens were tested by ID-NAT. If the results were non-reactive ,the specimens were examined using the transcription-mediated amplification ( TMA) technique ( Ultrio Plus /Ultrio Elite) . The replicated reactive specimens were tested 3 times joint test and plus discrimination test by TMA NAT platform ,at the same time Roche Cobas s 201 TaqScreen system was applied to 4 times MPX-6 test and 4 times individual test. We applied Roche electrochemical luminescence as third party reagent to confirm HBV infection status. **Results** From August 2017 to July 2018 ,a total of 9 689 pools ( 57 868 blood donors) were detected by MPX Test method in the blood center. 88 pools were reactivity in the mixed test ,and 24 pools ( 141 specimens) were non-reactive in the split test ,with a positive rate of 72. 73%. 141 specimens were re-tested using the Procleix Ultrio Plus/Elite assay ,then 4 specimens presented reactivity. But the repeated test showed not all 4 specimens were repeated reactivity. HBsAg positivity was confirmed by using ECL method. As a result ,the residual risk of HBV was found in all 4 samples ,which could not be used in clinical blood transfusion. **Conclusion** Blood specimens of MPX-6 positive ,but individual test negative in nucleic acid screening have the residual risk of HBV infection in blood transfusion. The determination of the results of these samples should be treated carefully to improve the safety of blood.

**Key words:** NAT; blood screening; HBV; residual risk

近年来 输血安全已成为全球关注的医学焦点问题。为了降低输血传播疾病风险 国家卫生行政主管部门要求 2015 年底全国血站对献血者的血液筛查开展核酸检测( Nucleic Acid Testing ,NAT) ,实现血液 NAT 筛查全覆盖。目前应用于血站大规模血液检测的 NAT 方法主要有转录介导的扩增 ( Transcription-mediated Amplification ,TMA) 和聚合酶链式反应( Polymerase Chain Reaction ,PCR) -荧光探针法( QPCR) ,两种筛查模式各有优势<sup>[1-3]</sup>。TMA NAT 方法对标本进行单人份联检( ID-NAT) ,灵敏度高 ,但需要后续对反应性标本进行鉴别试验; QPCR NAT 法对血液进行 6 人份混样检测 ( MPX-6) 通量大 效率高 ,但需对反应性 pool 进行拆分单检实验 ,以确定反应性标本 最终结果以拆分单检结果为准 ,当单检标本全无反应性时 ,标本全部合格放行。我国 HBV 流行率较高 ,由于其血清学模式较复杂 ,部分为 HBsAg 阴性、HBV DNA 阳性的隐匿性 HBV 感染( Occult HBV Infection ,OBI) ,且病毒载量较低 ,易出现检测时阴时阳的情况 ,导致漏检的发生<sup>[4-5]</sup>。因此 ,对混样检测反应性而拆分单检无反应性的标本进行血液传染病的残余风险评估尤为重要。为此 ,本站自 2017 年 8 月对混检反应性而拆分单检无反应性的标本进行 TMA 方法复检 ,分析不同筛查模式的检测结果 ,分析此类标本的传染病病毒残余风险 ,评估基于不同原理 NAT 方法在减少血液残余风险中的作用 ,评价当前的核酸检测模式 ,为改进血液筛查策略提供依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 研究对象** 研究对象为 2017 年 8 月—2018 年 7 月本站 MPX Test Screen 检测的无偿献血者标本 ,献血者均符合国家《献血者健康检查要求》。

**1.2 样本的采集与运送** 每位献血者采血后留取 3 支血标本 ,第 1 支采用 EDTA-K<sub>2</sub> 真空抗凝管留取 5 mL ,用于 ELISA 检测; 第 2 ,3 支采用 EDTA-K<sub>2</sub> 带分离胶真空抗凝管留取 5

mL ,用于 NAT 检测。运送时样本放置于冷藏储存箱 ,温度控制在 2—10℃ ,4 h 内离心 ,72 h 内完成检测。

### 1.3 仪器与试剂

**1.3.1 仪器** MP-NAT 采用 Cobas s 201 全自动核酸提取扩增检测系统 ,包括 Hamilton STAR 全自动混样仪、Cobas AmpliPrep 核酸提取仪及 Cobas Taqman Analyzer 核酸扩增检测仪( Roche 美国); TMA NAT 采用 Tigris 全自动核酸检测系统及 Panther 全自动核酸检测系统( Grifols ,西班牙); ELISA 采用 FAME24/20( Hamilton 瑞士); ECL 采用 Cobas e 411 系统( Roche 美国); Caris 200 全自动化学发光免疫分析仪( 万泰生物 北京)。所有设备使用前进行了常规校准和维护。

**1.3.2 试剂** ELISA 筛查试剂: 乙型肝炎病毒表面抗原诊断试剂盒( DiaSorin 英国; 英科新创 ,厦门); 丙型肝炎病毒抗体诊断试剂盒( Ortho-Clinical Diagnostics 美国; 万泰生物 ,北京); 人类免疫缺陷病毒抗原抗体诊断试剂盒( BIO-RAD 法国; 英科新创 ,厦门); 梅毒螺旋体抗体诊断试剂盒( 英科新创 ,厦门; 万泰生物 ,北京)。NAT 检测试剂: 乙型肝炎病毒丙型肝炎病毒 人类免疫缺陷病毒( 1+2 型) 核酸检测试剂盒( PCR-荧光法) ( Roche); Procleix Ultrio Plus Assay 联检试剂盒、Procleix Ultrio Elite Assay 联检试剂盒、HBV、HCV、HIV-1 鉴别探针试剂( Grifols)。电化学发光试剂: HBsAg、A-HBs、A-HBc、HBeAg 和 A-HBe 乙肝血清学 5 项检测试剂( Roche); HBsAg CLIA 试剂( 万泰凯瑞 ,厦门)。

**1.4 方法** 采用 ELISA 方法对 HBsAg、抗-HCV、抗-HIV、抗-TP 分别进行 2 遍( 不同厂家试剂) 检测 ,同时应用 Cobas Taqscreen MPX Test 进行 1 遍 MPX-6 NAT 检测 ,无反应性 pool 标本合格放行; 反应性 pool 样本需进行拆分单检 ,拆分结果无反应性的标本行 TMA NAT( ID-NAT) 检测。ID-NAT 检测呈反应性的样本再进行 4 遍 MPX-6 NAT ,4 遍 ID-NAT ( CobasTaqscreen MPX Test V2.0) ,3 遍 TMA NAT( Ultrio Plus) 及 3 遍 TMA NAT( Ultrio Elite) ,同时采用电化学发光方法检

测乙肝血清学 5 项。

2 结果

2.1 NAT 常规检测结果 2017 年 8 月—2018 年 7 月间,本站 MP-NAT 方法共检测 9 689 pool( 57 868 份无偿献血者标

本) ,混检呈反应性的有 88 pool ,占总检测 pool 的 0.91%( 1/110) 。经单人份拆分检测 ,其中拆分实验结果呈反应性的有 64 pool( 71 份标本) ,拆分阳性率为 72.73%( 表 1) 。71 份反应性标本 ELISA 及 NAT 结果见表 2。

表 1 Cobas TaqScreen MPX Test 对无偿献血者标本 MPX-6 检测结果

	检测标本数	混样 pool 数	阳性 pool 数	拆分阳性 pool 数	拆分阳性率	MPX-6 阳性 pool 数检出率	MPX NAT 阳性 样本数	MPX 阳性 样本检出率
混样检测	57 868	9 689	88	64	72.73%	0.91%( 1/110)	71	0.12%( 1/815)

表 2 71 份反应性标本中 HBV、HCV 和 HIV 分布情况及 ELISA 检测结果

酶免检测	核酸检测			小计
	HBV DNA+	HCV RNA+	HIV RNA+	
ELISA( +)	18	8	9	35
ELISA( -)	34	1	1	36
合计	52	9	10	71

阳性 pool 拆分结果无反应性的有 24 pool( 141 份标本) ,占总检测数的 0.24%。141 份标本用 TMA 联检实验复检 ,4 份标本呈反应性 ,初次混样检测结果均为 HBV DNA +。4 份标本的 ELISA 结果见表 3 ,其中有 1 份标本 HBsAg +/+ ,其它 3 份均为 HBsAg -/-。留取标本血浆分别进行核酸混检和单检重复检测 ,并用电化学发光法对标本进行 HBV 阳性确认 ,实验结果见表 3。

2.2 拆分无反应性标本的鉴别和确认 常规血液筛查中,

表 3 拆分无反应性标本的鉴别、重复实验和确认结果

编号	MPX-6 NAT Initial Pool 结果 (CT)	ELISA 结果	TMA NAT		Repeated Nucleic Acid Test 结果			万泰 ECL		Roche ECL					
			方法	TMA NAT 结果	Discrimination 结果	MPX-6 NAT	ID-NAT	Ultrio Plus NAT	Ultrio Elite NAT	HBsAg (Rz1)	A-HBc (Rs1)	A-HBe (R≤1)	A-HBs (IU/L)	HBsAg (Rz1)	HBsAg (Rz0.9)
S018001	HBV 37.2	HBV +/+	Ultrio Plus	+	-	----	---+	---	---	10.99	0.001	0.255	2	0.109	0.61
S018002	HBV 36.9	-/-	Ultrio Elite	+	HBV	----	+++	+++	---	0.07	0.007	1.101	2	0.106	0.717
S018003	HBV 38.3	-/-	Ultrio Elite	+	-	----	----	---	---	0.33	0.010	0.005	7.4	0.087	0.414
S018004	HBV 35.7	-/-	Ultrio Plus	+	HBV	----	----	---	---	1.81	0.006	1.101	2	0.085	0.431

3 讨论

近年来国内外的研究数据表明低病毒载量的 HBV DNA 感染仍然是血液筛查中最为主要的风险<sup>[6-8]</sup>。由于血清学检测的局限性 ,无法检测窗口期感染( WP)、隐匿性感染( OBI) 等献血者标本 ,因此 HBV 的检出需要具有较高灵敏度的 NAT 作为保证。在这种感染状态下 ,HBV DNA 病毒载量低 ,NAT 也会出现检测不到或检测结果时阴时阳的情况 ,即使是曾经能够检出的试剂也很难得到可重复的反应性结果。

文中 24 pool 混检时反应性标本 ,其中初检 HBV 反应性 20 pool ,HCV 反应性 4 pool ,所有标本拆分单检实验结果为无反应性 ,所有实验标本来自于 NAT1 采血管。将 24 pool( 141 份) 标本的 NAT1 管标本全部用另外一种检测方法( TMA) 进行联检实验时 ,有 4 份标本呈反应性 ,占 2.84%( 1/35) 。用 4 份阳性标本的 NAT2 管行鉴别试验( dHBV ,dHCV ,dHIV) ,其中 2 份标本呈 HBV DNA +( S018002 ,S018004) ,其余 2 份为无反应性。由于所采集的 NAT1 和 NAT2 管均来源于血袋 ,相当于中段血 ,检测时间也都在所要求的 72h 时限内 ,因此并无顺序差异。由于剩余血浆不能满足重复检测实验 ,因此留取 4 份反应性标本血浆袋 ,并对袋中的血浆进行分装。所有样本检测前均在 37℃ 条件下解冻 ,以减少血浆中纤维蛋白等沉淀的产生并用振荡器混匀 30s 后轻微离心。4 份标本分别重复 4 遍 MPX-6 NAT ,结果均为无反应性; 对该 4 份标本又进行 4 遍 ID-NAT 实验 ,仅有 2 份标本呈反应

性( S018001 1/4 ,S018002 3/4) ,其余 2 份标本仍不能重现反应性结果。

研究中采用 Tigris 和 Panther NAT 系统对该 4 份标本分别重复 3 遍 HBV/HCV/HIV 联检实验 ,结果显示 ,Tigris 系统有 2 份标本呈反应性( S018002 3/3 ,S018004 1/3) ; Panther 系统中 ,也有 2 份标本检测结果呈反应性( S018001 2/3 ,S018002 1/3) 。结果可见 ,无论采用哪种检测体系 ,都无法每次重现反应性结果。可能的原因: 1) 本组这 4 份标本 HBV 病毒载量非常低 ,检出重复率不高 ,与临界检出限附近的低浓度病毒颗粒在血浆中呈现泊松分布 ,此时检测到病毒的可能性概率是不确定的有关; 2) 由于受采样量限制 ,重复实验只能采用冰冻血浆作为检测样本 ,与采血管中样本的储存条件以及病毒浓度均有差异 ,导致检测实验结果重复性不佳; 3) 可能由于 HBV 病毒 DNA 序列发生突变 ,导致核酸检测试剂的靶向探针捕获不到 DNA 序列 ,或者结合不稳定 ,造成两个检测系统结果不一致 ,检出重复率低。所有重复检测实验中 ,标本 S018003 不能再现反应性结果 ,其原因分析如下: 1) 标本中病毒载量极低 ,低于试剂检测下限 ,导致阳性结果无法重复; 2) 由于病毒基因突变 ,导致检测试剂探针无法识别; 3) 核酸检测灵敏度较高 ,且检测中存在一定的不确定度 ,如标本采集和预处理、DNA 提取、扩增反应、荧光采集和数据处理等的不确定性 ,导致两种不同检测模式在检测过程中都出现假反应性。对于该标本有待于进一步追踪 ,以明确其 HBV 感染状况。

为了进一步对该 4 份献血者标本 HBsAg 阳性进行确认,本研究用万泰公司的电化学发光法对 4 份标本的 HBsAg 进行检测,并以罗氏的电化学发光检测作为第 3 方检测试剂,检测标本的乙肝两对半情况<sup>[9]</sup>。结果可见,4 份标本的 A-HBc 均为阳性,为乙肝现症感染或既往感染;结合万泰 ECL 结果,标本 S018001 和 S018004 呈 HBsAg 反应性,确认为 HBV “小三阳”;有学者报道 HBsAg 阴性、A-HBc 及 HBV DNA 阳性的血清,HBV DNA 水平近似急性肝炎恢复期患者水平,A-HBc 阳性的健康献血者中可能存在 HBV 的低水平释放<sup>[10]</sup>。标本 S018002 HBV DNA 可重复反应性,结合数据分析,可能为 OBI,需后续追踪以进行确认;标本 S018003 虽然核酸检测无法重现反应性,但 ECL 结果显示,A-HBc 与 A-HBe 同时呈现反应性,说明该献血者曾感染乙肝,现可能处于恢复期,HBV 病毒复制减少,血清中病毒载量低,导致核酸重复检测实验无法重现反应性结果,推测该标本初筛假阳性的可能性较小。此时献血者的传染性较 HBV 病毒模式弱,但并非完全没有传染性。无论是窗口期、感染期、恢复期或者隐匿性感染,这些献血者所捐献的血液都存在 HBV 残余风险,均不能用于临床<sup>[11]</sup>。

综上所述,核酸检测可一定程度上弥补血清学检测的局限性,应用 TMA 与 QPCR 两种检测方法都可以显著降低献血者血液 HBV 残余风险,2 种 NAT 检出的反应性结果能够互补,但无论是哪一种 NAT 方法或平台,对于部分病毒载量很低或病毒基因序列发生突变的乙肝感染者都会存在一定的漏检率。本研究中,未拆分出阳性的混样标本 141 份,有 4 份存在传染 HBV 的风险,占 2.84%。混检反应性拆分无反应性的标本是否存在风险?是否可以按照现有的检测策略合格放行?当前的血液筛查策略是否需要更改?如何进行风险效益分析评估,建立合理的检测与评价体系,减少漏检,并完善输血传染病确认实验体系,是我们今后需要关注的问题。

### 参 考 文 献

- [1] Stramer SL, Wend U, Candotti D, et al. Nucleic Acid Testing to Detect HBV Infection in Blood Donors. *N Engl J Med*, 2011, 364 (1): 236-247.
- [2] Candotti D, Allain JP. Transfusion-transmitted hepatitis B virus infection. *J Hepatol*, 2009, 51(4): 798-809.
- [3] Vermeulen M, Coleman C, Mitchel J, et al. Sensitivity of individual donation and minipool nucleic acid amplification test options in detecting window period and occult hepatitis B virus infections. *Transfusion*, 2013, 10(53): 2459-2466.
- [4] 方昌志,傅颖媛,钱榕,等. HBsAg 阴性献血者输血 HBV 感染残余风险分析. *南昌大学学报*, 2012, 52(12): 35-41.
- [5] 李仲平,王湫,郑优荣,等. 广州地区 HBsAg 阴性无偿献血血液传播 HBV 残余风险评估. *广东医学*, 2013, 35(3): 442-445.
- [6] Satake M, Taira R, Yugi H, et al. Infectivity of blood components with low hepatitis B virus DNA levels identified in a lookback program. *Transfusion*, 2007, 47(7): 1197-1205.
- [7] Levicnik-Stežinar S, Rahne-Potokar U, Candotti D, et al. Anti-HBs positive occult hepatitis B virus carrier blood infectious in two transfusion recipients. *J Hepatol*, 2008, 48(6): 1022-1025.
- [8] Samal J, Kandpal M, Vivekanandan P. Molecular mechanisms underlying occult Hepatitis B virus infection. *Clinical Microbiol Reviews*, 2012, 25(1): 142-163.
- [9] 邓雪莲,陈辉,王新梅,等. 电化学发光法进行 HBsAg 阳性确认的可行性及应用研究. *中国输血杂志*, 2016, 29(8): 806-811.
- [10] 刘宇宁,伍晓菲,贾尧,等. 乙型肝炎病毒表面抗原血液复查阳性结果确认方案的研究. *临床输血与检验*, 2011, 13(4): 303-306.
- [11] Allain JP, Mihaljevic I, Gonzalez-Fraile MI, et al. Infectivity of blood products from donors with occult hepatitis B virus infection. *Transfusion*, 2013, 53: 1405-1415.

(2018-08-16 收稿, 09-24 修回)

本文编辑:李弘武