

• 检验技术与方法 •

核酸检测技术在酶联免疫吸附法漏检 HIV 和 HBV 血样筛查中的应用

余 谨, 毕 昊, 陆华新, 王先广, 赵 磊, 沈 钢

(湖北省武汉市血液中心 430033)

摘要:目的 应用核酸检测(NAT)技术筛查经两遍酶联免疫吸附(ELISA)法检测各项指标均为阴性的无偿献血者的标本。方法 将 ELISA 法检测的阴性标本采用六混样用两种试剂进行平行核酸检测,在检测出阳性标本后,也用两种试剂对其拆分进行单管核酸检测。结果 4 879 例 ELISA 法检测呈阴性的标本中,核酸检测出 1 例 HIV 阳性样本,6 例 HBV 阳性样本。结论 开展核酸检测可以提高临床用血质量,为临床安全用血提供强力有保障。

关键词:HIV; 肝炎病毒,乙型; 核酸检测; 酶联免疫吸附测定

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.08.033

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)08-0964-02

核酸检测(nucleic acid testing, NAT)技术不仅能检测出窗口期乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)和 HIV 感染,还可以避免病毒变异、免疫沉默性感染等造成的漏检,降低 HBV、HCV 和 HIV 经血液传播的风险,弥补酶联免疫吸附(ELISA)方法的不足^[1-2]。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2011 年 7 月至今留取的该中心无偿献血者经两遍 ELISA 法检测各项指标均合格的血样本 4 879 例。血液采集后置于 NAT 专用分离胶试管保存,采集后 4 h 内 3 000 r/min 离心 20 min,置于 4 ℃ 保存。待两遍 ELISA 法检测各项指标完成后,剔除不合格标本,选取各项指标均合格的样本于 24 h 内进行检测。

1.2 仪器与试剂 HAMILTON Microlab STAR(IVD)混样仪(瑞士);Cobas AmpliPrep + Cobas TaqMan(美国罗氏公司);低温离心机(德国 Thermo);Cobas TaqScreen MPX 试剂盒(美国罗氏公司);Cobas TagScreen 洗液(美国罗氏公司);Cobas TaqScreen MPX 对照试剂盒(美国罗氏公司);Cobas TagScreen MPX V2 试剂盒(美国罗氏公司);Cobas TaqScreen MPX V2 对照试剂盒(美国罗氏公司)。

1.3 方法

1.3.1 两次 ELISA 法筛查 加样器自动加样后,用全自动酶联免疫分析仪对 HBsAg、抗-HCV 和抗-HIV 进行两次 ELISA 法检测,结果判定依据《中国输血技术操作规程》(血站部分)的标准。对于 NAT 判定为阳性而 ELISA 判定为阴性的样本,再次从血袋取标本采用 ELISA 重新检测。

1.3.2 ELISA 检测阴性标本核酸筛查 标本于生物安全柜内开盖,置于样本架上,用 HAMILTON Microlab STAR(IVD)混样仪进行全自动六混样加样,平行混合两份。将其中一组六混样的样本管置于 Cobas AmpliPrep + Cobas TaqMan 全自动血液病毒核酸检测仪采用 Cobas TaqScreen MPX 试剂盒(第 1 代试剂)进行六混样 NAT 检测,检测 HBV、HCV 和 HIV 3 个项目。同时在另一台相同仪器上采用 Cobas TaqScreen MPX V2 试剂盒(第 2 代试剂)进行 HBV、HCV 和 HIV 3 个项目的检测。出现阳性结果的六混样试管,再进行单人份 NAT 检测。在初筛六混样中两种试剂均判为阳性,同时拆分结果仍为一致的同一样本阳性结果,实验确定为 NAT 结果阳性,由 Cobas TaqScreen MPX V2 试剂盒(第 2 代试剂)的结果确定为阳性。

2 结果

2.1 窗口期 HIV 两次 ELISA 检测结果 加样器自动加样

后,用全自动酶免分析仪对 HBsAg、抗-HCV 和抗-HIV 用两种不同厂家的试剂在两台仪器上平行进行两次 ELISA 法检测,OD 值分别为 0.049 和 0.003,结果判定均为阴性。NAT 检测确定该标本为 HIV 阳性后,再次从血袋取标本用两种试剂同时重做,OD 值为 0.038 和 0.005,仍然判定为 ELISA 检测阴性。

2.2 ELISA 法漏检 HIV 标本采用 NAT 六混样检测结果 采用 Cobas TaqScreen MPX 试剂在六混样的 PCR 扩增曲线中,在第 19.2 个循环时荧光探针就检测出了靶标核酸片段。但是其内置控并未扩增出来,考虑到该批次检测其他阴性样本均扩增出内置控,唯独此阳性样本未扩增出内置控,推测是该样本病毒载量浓度过高,抑制其反应。采用 Cobas TaqScreen MPX V2 试剂在六混样的 PCR 扩增曲线中,在第 21.8 个循环时荧光探针就检测出了靶标核酸片段。Cobas TaqScreen MPX V2 试剂(第 2 代试剂)采用多荧光探针技术,CH1 为 HIV,CH4 为内置控,即使在六混样检测中相较于内置控多荧光探针也体现出了较好的灵敏度,同时内置控在高浓度抑制扩增方面也有所改进。

2.3 酶联免疫技术漏检 HIV 血液 NAT 拆分单检结果 该样本在单管 NAT 检测的 PCR 扩增曲线中,在第 16.4 个循环时荧光探针就检测出了靶标核酸片段,体现出了更高的浓度。但是同样其内置控仍然未扩增出来,更加有理由推断是该标本病毒载量浓度过高,抑制了其反应。因此将此标本用阴性血浆稀释 400 倍后,再做 NAT 检测。将该样本用阴性血浆稀释 400 倍后再用 Cobas TaqScreen MPX 试剂复孔做单管核酸检测,在第 24.7 个循环时荧光探针检测出靶标核酸片段,内置控在第 30.3 个循环时扩增曲线出现抬头,内置控的扩增通过样本的稀释不再被抑制,但此时稀释过的样本仍然远提前于内置控扩增出来。该样本的 CH1(HIV)探针在第 19 个循环就检测出靶标核酸片段,实验判定该样本为 HIV 阳性样本。

2.3 ELISA 法漏检 HBV 情况 2011 年 7 月至今,抽检各献血点的 4 879 例 ELISA 法呈阴性的标本中,NAT 检测出 HBV 6 例,阳性率为 0.12%。

3 讨论

6 个月抽检的 4 879 例 ELISA 法呈阴性的标本中,用 NAT 检测筛查出的 1 例 HIV 阳性和 6 例 HBV 阳性。说明隐匿性或窗口期的 HBV、HIV 以及 HCV 标本还是目前安全用血的隐患。NAT 技术从理论上并不能完全消除 HBV 窗口期,但可以使输血传播 HBV 的危险性降到最低。

目前国内外针对抗体检测的试剂已有第 4 代,前 3 代针对

两种抗体的检测,第 4 代试剂同时针对 P24 抗原、IgM 和 IgG 抗体,窗口期已经缩短至 21 d^[3-4]。该血液中心检验科目前检测血液 HIV 这一项即是采用两种不同厂家的第 4 代试剂进行的两次检验,然而通过本组核酸筛查实验,将 ELISA 法两次检测呈阴性的标本进行核酸检测再次筛查,仍会检测到 HIV 阳性标本,说明目前现行开展的检测技术仍有安全隐患,为保证临床用血的进一步安全,开展核酸检测具有重要意义^[5-6]。

感染者体内最早被检测到的是病毒核酸,且病毒核酸呈一过性高水平,此后水平有所下降^[7-8]。在本实验中,通过 CH1 (HIV)探针在第 19 个循环就检测出靶标核酸片段远远提前于内置控在 38.9 个循环才扩增出的结果,因此推断相较于内置控的病毒载量水平,其是相当高的。而此时酶免技术既没有检测出 P24 抗原,也没有检测出 IgM、IgG 类抗体,说明此样本极有可能在最早期的感染阶段,此时病毒核酸呈一过性高水平而 P24 没出现或刚好在 P24 抗原水平下降而抗体还未升高时造成漏检。核酸技术相对于第 4 代酶免试剂缩短了 5 d 的窗口期,该筛查结果极有力地说明了缩短窗口期对血液安全起到了重要的作用。

参考文献

[1] Tani Y, Aso H, Matsukura H, et al. Significant background rates of HBV and HCV infections in patients and risks of blood transfusion from donors with low anti-HBc titres or high anti-HBc titres

with high anti-HBs titres in Japan: a prospective, individual NAT study of transfusion-transmitted HBV, HCV and HIV infections [J/OL]. Vox Sang, 2011-11-14[2012-03-25], http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22082342.

[2] 任芙蓉. 血液核酸检测技术[J]. 北京医学, 2008, 30(10):624-627.
 [3] Shihai H, Brian E, Wai BM, et al. A novel real time HIV-1 qualitative assay for the detection of HIV-1 nucleic acids in dried blood spots and plasma[J]. J Virol Methods, 2011, 178(1/2):216-224.
 [4] Speers D, Phillips P, Dyer J. Combination assay detecting both human immunodeficiency virus(HIV)p24 antigen and anti HIV antibodies opens a second diagnostic window[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(10):5397-5399.
 [5] Jos JA, Weusten M, Harry AJ, et al. Mathematic modeling of the risk of HBV, HCV and HIV transmission by window phase donations not detected by NAT[J]. Transfusion, 2002, 42(3):537-548.
 [6] 吴玉清, 杨忠思, 赵林, 等. 青岛地区无偿献血者血液病毒核酸检测的研究[J]. 中国输血杂志, 2008, 21(11):834-836.
 [7] 王良华, 叶贤林, 尚桂芳, 等. 免疫筛查隐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.
 [8] 任芙蓉, 刘长利, 吕秋霜, 等. 病毒核酸检测在献血者血液筛查中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(9):596-599.

(收稿日期:2012-01-17)

• 检验技术与方法 •

FQ-PCR 法与培养鉴定法检测解脲支原体结果比对分析

梁勇彪, 屈雅川, 黄丽英, 肖词英, 黎冬梅

(广西壮族自治区南宁市第二人民医院检验科 530031)

摘要:目的 了解 FQ-PCR 法与培养鉴定法检测解脲支原体(UU)检出率的差异性,并探讨导致差异的原因。方法 用 PCR 法和培养鉴定法分别检测不孕不育患者和泌尿疾病患者的 UU,并回顾性分析两种方法的检测结果。结果 不孕不育标本中 PCR 法和培养鉴定法比较,两者阳性率差异无统计学意义($\chi^2=1.56, P>0.05$);进一步研究发现在男性泌尿疾病患者即用棉拭子取样所检测的结果显示,两种方法的阳性率差异有统计学意义($\chi^2=28.5, P<0.05$),女性泌尿疾病患者则差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 用培养鉴定法检测男性泌尿疾病患者的 UU 时,男性患者宜以前列腺液代替尿道口棉拭子取样,以确保检测结果的可靠性。

关键词:不育; 解脲支原体; 荧光定量聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.08.034

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)08-0965-03

解脲支原体(Ureaplasma urealyticum, UU)引起的泌尿生殖道感染又称非淋菌尿道炎,是性传播疾病的病原体之一,与不孕不育症以及泌尿生殖道疾病有着密切的关系^[1-2]。现通过对 UU 主要检测方法(PCR 法和培养鉴定法)相关性进行分析比对,提示影响检测 UU 的重要因素,并探讨两种检测方法影响其阳性率的干扰因素,确保检测 UU 的准确性,以供临床参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2009~2011 年该院生殖中心的 5 360 对不育夫妻(即 10 726 例)和 4 318 例泌尿疾病患者。其中男性年龄 23~50 岁,平均年龄 35 岁;女性年龄 22~44 岁,平均年龄 30 岁。5 360 对夫妻都是 3 年以上未避孕而不能生育者,符合不孕不育标准。泌尿疾病患者也为 3 年来泌尿科和妇科门诊的泌尿病患者,其中男性 2 512 例,年龄 19~60 岁,平均年龄 32 岁;女性 1 806 例,年龄 16~53 岁,平均年龄 27 岁。

1.2 方法 (1)标本采集,生殖中心男性取前列腺液或精液送检,泌尿疾病患者男性用无菌棉拭子在尿道口沾取,置无菌 0.9%氯化钠溶液离心管内送检或取中段尿送检。女性标本采集用窥阴器扩展阴道,用无菌棉拭子内旋 180 度沾取分泌物,置无菌 0.9%氯化钠溶液离心管内,洗出分泌物送检。(2)PCR 法标本处理,在振荡器上充分振荡标本,使分泌物游离,经高速离心后制成沉淀物,裂解制成反应液模板,最后置入反应管,操作过程严格按试剂说明书进行实验。培养鉴定法把标本直接接种在基础液中,并严格按说明书进行操作。

1.3 仪器与试剂 美国生产的 ABI 7300 型实时荧光定量 PCR 仪。试剂盒由广州中山医科大学达安基因诊断中心提供的 PCR UU 试剂盒。培养鉴定法支原体培养鉴定药敏试剂盒由郑州安图绿科生物工程技术有限公司提供。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 计算机统计软件进行数据分析,计数资料采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。