

论著·临床研究

运用单样本核酸扩增检测技术对提高深圳地区 HIV 检出率的效果分析*

王宋兴,熊文,古醒辉,刘衡,徐筠婷,曾劲峰[△]

(深圳市血液中心,广东深圳 518035)

摘要:目的 分析运用单样本核酸扩增检测技术(SS-NAT)对提高深圳地区 HIV 检出能力的效果,探讨 SS-NAT 对降低输血感染 HIV 残余风险的作用。方法 采用 Procleix Tigris 单样本核酸检测系统和第三代、第四代两种酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂对 2015 年 1 月至 2017 年 8 月采集的 269 228 份无偿献血者血液标本进行平行检测。对 ELISA 检测无反应性而 SS-NAT 有反应性的标本进行 HIV 鉴别试验,并对鉴别有反应性的献血者进行追踪检测。所有 ELISA 或 SS-NAT HIV 鉴别试验有反应性的样本均送到深圳市疾病预防控制中心(CDC)做免疫印迹法(WB)确证试验。结果 269 228 份样本 HIV 第三代 ELISA 试剂检测有反应性 188 份,有反应性率为 0.698%(188/269 228),第四代 ELISA 试剂检测有反应性 340 份,有反应性率为 1.263%(340/269 228),两种 ELISA 试剂共检测有反应性 422 份,有反应性率为 1.567%(422/269 228),SS-NAT 检测有反应性共 103 份,有反应性率为 0.383%(103/269 228),其中有 4 份 ELISA 无反应性而 SS-NAT 有反应性标本,对应献血者随访追踪血液标本 ELISA 和 SS-NAT 均呈有反应性。所有 ELISA 或 SS-NAT HIV 鉴别试验有反应性标本经 CDC 确认有 103 份标本呈阳性。ELISA 检测后 HIV 窗口期检出率为 1:67 307(4/269 228)。结论 SS-NAT 应用于血液筛查可提高 HIV 检出率,缩短 HIV 检测窗口期,降低输血感染 HIV 残余风险,从而有效提高输血安全性。

关键词:核酸检测; 酶联免疫吸附试验; 人类免疫缺陷病毒; 窗口期; 输血安全

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.13.008 中图法分类号:R512.91

文章编号:1673-4130(2018)13-1562-04 文献标识码:A

Effect analysis of improving the HIV positive detection rate by single sample nucleic acid amplification test in Shenzhen*

WANG Songxing, XIONG Wen, GU Xinghui, LIU Heng, XU Yunping, ZENG Jinfeng[△]

(Shenzhen Blood Center, Shenzhen, Guangdong 518035, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of improving the human immunodeficiency virus(HIV) positive detection rate by single sample nucleic acid amplification test (SS-NAT) in Shenzhen, and to explore the effect of SS-NAT on reducing the risk of HIV infection in transfusion. **Methods** 269 228 blood samples were performed parallel detection by SS-NAT (Procleix Tigris) and two kinds of enzyme-linked immuno sorbent assay(ELISA) reagents, and then the samples with nonreactive by ELISA and reactive by SS-NAT were tested by HIV identification assay. The blood donors with reactive HIV identification assay were made tracing tests. All the samples with reactive by ELISA or HIV identification assay were sent to the Shenzhen Center for Disease Control and Prevention (CDC) for Western Blot (WB) diagnostic tests. **Results** The samples with reactive by the third generation ELISA reagents, the fourth generation ELISA reagents, both ELISA reagents and SS-NAT were 188, 340, 422 and 103, which reactive rate was 0.698%(188/269 228), 1.263%(340/269 228), 1.567%(422/269 228) and 0.383%(103/269 228), respectively. We found four samples with nonreactive by ELISA but reactive by SS-NAT. The four donors were found HIV reactive by both ELISA and SS-NAT after tracing. All the samples with reactive by ELISA or HIV identification assay were sent to CDC for confirmatory tests and 103 of them were positive. The positive detection rate of transfusion-transmissible HIV infection after ELISA detection was 1:67 307(4/269 228). **Conclusion** The application of SS-NAT in blood screening can improve the HIV positive detection rate, shorten window period of HIV detection and reduce residual risk

* 基金项目:广东省医学科研基金资助(A2016222);深圳市战略新兴产业发展专项资金资助(JSGG20160328103642937)。

作者简介:王宋兴,男,主管技师,主要从事医学检验、输血技术和免疫遗传研究。△ 通信作者, E-mail:zzengjf@163.com。

本文引用格式:王宋兴,熊文,古醒辉,等.运用单样本核酸扩增检测技术对提高深圳地区 HIV 检出率的效果分析[J].国际检验医学杂志, 2018,39(13):1562-1565.

of transfusion-transmissible HIV infection, and then blood safety can be effectively improved.

Key words: nucleic acid amplification test; enzyme-linked immuno sorbent assay; human immunodeficiency virus; window period; blood safety

人类免疫缺陷病毒(HIV)为目前输血性传播疾病的主要病原体之一,是一种严重威胁人类健康的全球性传染病病原体,由于其具有极快的蔓延速度和极高的致死性,所以早发现、早诊断 HIV 感染对于艾滋病的早期诊断和有效预防尤为重要^[1]。世界卫生组织(WHO)官网数据显示,截至 2016 年,全球有约 3 670 万 HIV 携带者,且每年新增的 HIV 携带者中有 5%~10% 经输血或血液制品感染^[2]。截至 2011 年,我国存活 HIV 感染者和艾滋病患者 78 万,其中经既往有有偿供血、输血或使用血制品传播的占 6.6%^[3]。随着科技的发展,各种新的 HIV 检测方法不断被研发。目前检测 HIV 的主要方法为酶联免疫吸附试验(ELISA)和核酸扩增技术(NAT),而 ELISA 主要分为第三代试剂和第四代试剂,第四代试剂在第三代试剂基础上增加了 p24 抗原检测,从而实现了 HIV 抗原抗体的同步检测^[4]。NAT 直接检测 HIV-RNA,理论上能明显缩短 HIV 的窗口期,有效防范 ELISA 漏检的发生^[5]。本文对深圳地区无偿献血者 HIV 感染情况进行调查,并分析比较 ELISA 和单样本核酸扩增技术(SS-NAT)对 HIV 的检出能力及 HIV 输血残余风险,从而评估运用 SS-NAT 对提高深圳地区 HIV 检出率的效果,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 选取 2015 年 1 月至 2017 年 8 月本中心无偿献血者的标本 269 228 份。标本采集前均经过献血者知情同意,每位献血者采血时分别留取 2 管血液标本:第 1 管采用 EDTA 抗凝真空管留取 5 mL 全血,用于血清学 ELISA 检测;第 2 管采用核酸检测专用带分离胶的乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝真空管留取 8 mL 全血,用于病毒核酸检测。所有标本均在采集后 4 h 内离心,3 000×g 离心 10 min,离心后标本于 2~8℃ 冰箱保存,并于 72 h 内完成检测。所有实验数据均有完整并可溯源的原始资料。

1.2 仪器与试剂 瑞士 HAMILTON 公司 Microlab STAR 全自动加样仪,深圳艾康公司 Xantus200 全自

动加样仪,瑞士 HAMILTON 公司 FAME24/20 全自动酶免分析系统,德国西门子医学公司 BEP III 酶联免疫分析系统,美国诺华公司 Procleix Tigris 核酸检测系统。北京万泰生物药业股份有限公司抗-HIV 第三代 ELISA 检测试剂盒,美国伯乐 HIV 第四代 ELISA 检测试剂盒,美国 Chiron 公司 Procleix Ultrio TMA-化学发光法核酸检测及鉴别试剂。所有试剂均在有效期内使用。

1.3 方法

1.3.1 血清学 ELISA 检测 同时采用 HIV 第三代和第四代 2 种 ELISA 检测试剂对所有血液标本进行 HIV 抗原和/或抗体检测。2 种试剂检测结果均为无反应性的标本判为阴性;任何 1 种试剂检测结果为有反应性的标本判为待查并对其进行双孔复检,复检结果为无反应性的标本判为阴性,有反应性的标本送深圳市疾病预防控制中心(CDC)艾滋病确认实验室进行确认检测。

1.3.2 病毒核酸检测 采用 TMA-化学发光法核酸检测试剂对血液标本同时进行单人份乙型肝炎病毒(HBV)-DNA、丙型肝炎病毒(HCV)-RNA、HIV-RNA 联合检测,如联合检测结果为有反应性而对应标本 ELISA 检测结果为阴性则进行鉴别试验。若鉴别试验为 HIV-RNA 有反应性,则送 CDC 艾滋病确认实验室进行确认检测,并同时对该标本对应献血者进行随访追踪检测。

1.4 统计学处理 ELISA 检测和 NAT 检测有反应性率差异采用 SPSS20.0 统计软件进行 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

本研究对深圳地区近 3 年的无偿献血者血液标本的 HIV 检测情况进行了回顾性分析,并分别对 ELISA 第三代单试剂、第四代单试剂和 SS-NAT 检测及 ELISA 检测总有反应性率进行了两两比较,结果显示所有有反应性率比较差异均具有统计学意义($P<0.05$),见表 1~5。

表 1 献血者 ELISA、NAT 和 WB 检测结果[n(%)]

时间	标本总数 (n)	第三代 ELISA 单试剂有反应性	第四代 ELISA 单试剂有反应性	双试剂 有反应性	总检出数	NAT 有反应性	WB 确认阳性
2015 年 1—12 月	94 665	31(0.327)	86(0.908)	45(0.475)	162(1.711)	44(0.465)	44(0.465)
2016 年 1—12 月	102 338	27(0.264)	91(0.889)	41(0.401)	159(1.554)	39(0.381)	39(0.381)
2017 年 1—8 月	72 225	24(0.332)	57(0.789)	20(0.277)	101(1.398)	20(0.277)	20(0.277)
合计	269 228	82(0.305)	234(0.869)	106(0.394)	422(1.567)	103(0.383)	103(0.383)

表 2 第三代与第四代 ELISA 试剂检测结果比较 (n)

第四代 ELISA 试剂	第三代 ELISA 试剂		合计
	有反应性	无反应性	
有反应性	106	234	340
无反应性	82	268 806	268 888
合计	188	269 040	269 228

注:第三代与第四代 ELISA 试剂检测有反应性比较, $\chi^2 = 43.801$, $P < 0.05$

表 3 第三代 ELISA 试剂与 NAT 检测结果比较 (n)

第三代 ELISA 试剂	NAT		合计
	有反应性	无反应性	
有反应性	96	92	188
无反应性	7	269 033	269 040
合计	103	269 125	269 228

注:第三代 ELISA 试剂与 NAT 检测有反应性比较, $\chi^2 = 24.842$, $P < 0.05$

表 4 第四代 ELISA 试剂与 NAT 检测结果比较 (n)

第四代 ELISA 试剂	NAT		合计
	有反应性	无反应性	
有反应性	99	241	340
无反应性	4	268 884	268 888
合计	103	269 125	269 228

注:第四代 ELISA 试剂与 NAT 检测有反应性比较, $\chi^2 = 126.897$, $P < 0.05$

表 5 两代 ELISA 试剂与 NAT 检测结果比较 (n)

ELISA 试剂	NAT		合计
	有反应性	无反应性	
有反应性	99	323	422
无反应性	4	268 802	268 806
合计	103	269 125	269 228

注:两代 ELISA 试剂与 NAT 检测有反应性比较, $\chi^2 = 194.020$, $P < 0.05$

3 讨 论

艾滋病是当今全球面临的一个严重公共卫生问题,目前, HIV 感染在我国正处快速增长期,流行形势十分严峻。急性感染 HIV 指的是初期的、快速广泛的免疫细胞破坏及 HIV 感染后,出现不受控制的病毒血症,这段时间通常持续约 4 周,在此期间 HIV 传染性最高^[6-7],感染者体内呈现一过性的高病毒血症状态,常无特异的临床表现,常规的抗原抗体检测方法无法检出,容易被忽视而造成病毒的进一步传播^[8]。血液传播是 HIV 的主要传播途径之一,为确保输血和血液制品的安全,世界各国都在不断加强血液筛查力度。HIV ELISA 抗原抗体检测和核酸检测是诊断 HIV 最常用的方法,ELISA 检测 HIV 抗原抗体的窗口期平均为 22 d^[9], NAT 检测可以将其缩短

10 d^[10],从而大大降低输血风险。NAT 检测方法经过大量研究证实,其灵敏度、精确度和准确度已符合对窗口期标本的检出要求,对病毒载量大于或等于 50 IU/mL HIV 检出阳性率可达 100%^[11-13]。

核酸检测灵敏度高,可以直接检测血清中的病原,能够从 ELISA 阴性标本中检出 ELISA“窗口期”和隐匿性感染者。但是,研究发现有核酸检测漏检而 ELISA 有反应性的情况,主要原因是部分献血者血液中病毒载量低于酸检测的检测下限,而抗原抗体水平较高。因此,核酸检测不能完全替代常规的 ELISA 检测,ELISA 可以检测出低病毒量的血清学阳性感染者,两者在降低输血相关病毒感染风险发挥重要的互补作用。大量事实也证明,核酸检测技术和 ELISA 技术在血液筛查中均存在漏检风险,联合应用 NAT 和 ELISA 检测,可以有效提高血液安全。2012 版《血站技术操作规程》提出:血站可以采用 1 种 ELISA 试剂检测抗原(抗体),同时采用 1 种试剂检测核酸的血液筛查模式。目前国内采供血机构血液检测存在 3 种模式:2 遍 ELISA 加 1 遍核酸检测,1 遍 ELISA 加 1 遍核酸检测及只采用 2 遍 ELISA,大多数检测采用第 1 种模式。如果采用 1 遍 ELISA 加 1 遍核酸检测,部分核酸阴性、ELISA 单试剂阳性标本将会被漏检,这一部分血液的安全性还有待进一步探讨。

本研究对深圳地区近 3 年的无偿献血者血液标本的 HIV 检测情况进行了回顾性分析,并分别对 ELISA 第三代单试剂、第四代单试剂和 SS-NAT 检测及 ELISA 检测总有反应性率进行了两两比较。表 1 结果显示 ELISA 第三代单试剂、第四代单试剂和 SS-NAT 检测及 ELISA 检测总有反应性率分别为 0.305% (82/269 228), 0.869% (234/269 228), 1.567% (422/269 228), 0.394% (103/269 228), 表 2~5 结果显示其有反应性率两两间比较差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$),由此得出,目前用于 HIV 血清学标志物检测常用方法的有反应性率从大到小依次为第四代 ELISA、第三代 ELISA、SS-NAT。表 1 中 WB 确认结果显示,第三代 ELISA 单试剂有反应性标本均为 HIV 阴性,而在第四代 ELISA 单试剂有反应性标本中,有 3 份标本经 WB 确认为 HIV 阳性,提示该 3 份标本 HIV 抗原浓度较高,而 HIV 抗体浓度仍低于检测限。值得注意的是,表 1 结果还显示 269 228 份标本的核酸检测共检出 103 份有反应性标本,且经 WB 确认检测均为 HIV 阳性,其中有 4 份标本的 ELISA 检测结果为阴性,提示该 4 份血液标本处于 ELISA 检测窗口期。SS-NAT 成功检出窗口期标本,阻止了相关血液制品进入临床使用,保障了血液质量,提高了输血安全性,这与何成涛等^[14]报道的南京地区数据基本一致。日本、美国、德国等发达国家也证实了 SS-NAT 在筛查中应用进一步降低经血液传播疾病的可能性^[15-17]。

本研究结果显示,深圳地区献血人群经 ELISA 检测后 HIV 的窗口检出率为 1:67 307(3/269 228),低于本地区 2011 年的 1:45 872^[18],也低于柳州地区(1:32 605)^[19],高于南京地区(1:69 118)^[14]、广州地区(1:645 099)^[20]、东莞地区(1:72 046)^[21]和新疆地区(0:14 696)^[22]。然而以上所提不同地区文献报道 HIV 输血残余风险存在差异,其值得考虑的原因可能包括各地区 HIV 感染率不同,献血人群初次再次献血等构成比存在差异,数据采集的标本量、时间段不同,运用的仪器试剂不同等。当然,本研究仅是在回顾过往检测结果的基础上进行的简要数据分析,研究时间较短,标本量较少,覆盖地区有限。在今后的研究中,仍需对残余风险的评估开展深层次的研究,逐步探讨符合地区特点的残余风险评估方法,建立相关的评估模型。

4 结 论

本研究认为联合运用 ELISA 和单样本核酸扩增技术能有效缩短窗口期,提高深圳地区 HIV 检出率,大大减少 HIV 的输血残余风险,可为有效血液筛查策略的选择提供有力支持,从而提高血液的安全性,对保障血液质量及临床输血安全具有重要意义,同时可为公共卫生政策的制定提供基础资料和理论依据。

参考文献

- [1] BENJAMIN R J. Nucleic acid testing: update and applications[J]. *Semin Hematol*, 2001, 38(4): 11-16.
- [2] 刘玉磊, 马丽英. HIV、HCV 和 HBV 核酸检测技术及策略在血筛应用中的研究进展[J]. *中国艾滋病性病*, 2012, 18(7): 496-499.
- [3] 中华人民共和国卫生部, 联合国艾滋病规划署, 世界卫生组织. 2011 年中国艾滋病疫情估计[J]. *中国艾滋病性病*, 2012, 18(1): 1-5.
- [4] DE SOUZA M S, Phanuphak N, Pinyakorn S, et al. Impact of nucleic acid testing relative to antigen/antibody combination immunoassay on the detection of acute HIV infection[J]. *AIDS (London, England)*, 2015, 29(7): 793-800.
- [5] LIU Z, LI W, XU M, et al. Development of an In-House multiplex nested RT-PCR method for detecting acute HIV-1 infection in high risk populations[J]. *Current HIV Res*, 2015, 13(4): 315-324.
- [6] WAWER M J, GRAY R H, SEWANKAMBO N K, et al. Rates of HIV-1 transmission per coital Act, by stage of HIV-1 infection, in rakai, uganda[J]. *J Infect Dis*, 2005, 191(9): 1403-1409.
- [7] COHEN M S, SHAW G M, MCMICHAEL A J, et al. Acute HIV-1 infection[J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(20): 1943-1954.
- [8] 侯海燕, 燕清丽, 刘靓, 等. 核酸检测与抗体检测在 HIV 感染中的应用[J]. *国际检验医学杂志*, 2015, 36(23): 3431-3432.
- [9] 何子毅, 余霖, 王庆, 等. 核酸检测技术在不同血液安全筛查模式的应用分析[J]. *中国输血杂志*, 2016, 29(7): 693-695.
- [10] 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.
- [11] SUN Z, MING L, ZHU X, et al. Prevention and control of hepatitis B in China[J]. *Med Virol*, 2002, 67(3): 447-450.
- [12] TOSTI M E, SOLINAS S, PRATI D, et al. An estimate of the current risk of transmitting blood-borne infections through blood transfusion in Italy[J]. *Br J Haematol*, 2002, 117(1): 215-219.
- [13] 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.
- [14] 何成涛, 黄敏, 马贵明, 等. 核酸检测对提高南京地区 HIV 检出率的分析研究[J]. *中国输血杂志*, 2017, 30(2): 156-158.
- [15] SOLDAN K, DAVISON K, DOW B. Estimates of the frequency of HBV, HCV, and HIV infectious donations entering the blood supply in the United Kingdom, 1996 to 2003[J]. *Euro Surveil*, 2005, 10(2): 17-19.
- [16] VELATIC C, FOMIATTI L, BARUFFI L, et al. Impact of nucleic acid amplification technology (NAT) in Italy in the three years following implementation (2001-2003) [J]. *Euro Surveil*, 2005, 10(2): 12-14.
- [17] OFFERGELD R, FAENSEN D, RITTER S, et al. Human immunodeficiency virus, hepatitis C and hepatitis B infections among blood donors in Germany 2000-2002: risk of virus transmission and the impact of nucleic acid amplification testing[J]. *Euro Surveill*, 2005, 10(2): 8-11.
- [18] 王宋兴, 曾劲峰, 杨爱莲, 等. 深圳地区无偿献血者 HIV 感染情况调查分析及输血残余风险评估[J]. *中国输血杂志*, 2012, 25(7): 674-676.
- [19] 吴敬林, 周仲民, 罗保红. 核酸检测对降低柳州地区输血病原感染残余风险的评估[J]. *中国输血杂志*, 2014, 27(7): 727-729.
- [20] 黄珂, 戎霞, 花文峰, 等. 2010-2011 年广州地区输血传播 HBV、HCV、HIV 残余风险评估[J]. *中国输血杂志*, 2013, 26(2): 128-131.
- [21] 王德文, 刘赴平. 东莞市无偿献血者血液筛查后传播 HIV 残余风险度的评估[J]. *广州医药*, 2004, 35(2): 543-544.
- [22] 周丽君, 郭伟鹏, 谭湘涛, 等. 病毒核酸检测对降低输血传播疾病残余风险的分析研究[J]. *新疆医科大学学报*, 2014, 37(2): 214-217.

(收稿日期: 2018-01-20 修回日期: 2018-04-16)