

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.06.003

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.06.003>

常州市中心血站 HBV 筛查中酶联免疫检测与核酸检测结果不一致的分析

董珀, 何亚琴, 濮云峰

(常州市中心血站检测中心, 江苏 常州 213000)

[摘要] 目的: 调查常州地区无偿献血者HBV筛查中ELISA HBsAg阴性/核酸扩增检测(nucleic acid amplification detection technology, NAT)HBV DNA阳性的情况, 确保输血安全。方法: 经2种不同的ELISA试剂检测合格的献血者标本, 采用罗氏或者科华核酸检测系统检测HBV DNA, HCV RNA, HIV RNA 的6人份混合样本(POOL), 混样阳性的POOL再进行拆分检测, 采用化学发光的方法对拆分阳性的标本检测乙肝标志物5项, 并对所检出乙肝标志物5项结果全为阴性的血液进行追踪。结果: 48 635份2遍ELISA阴性的献血者标本混检11 016个POOL, 混检阳性的POOL数为66个, 经拆分为HBV DNA阳性的POOL数为40个, 未检出HCV RNA和HIV RNA, NAT总有效拆分率为60.61%, NAT检测出的标本阳性率为0.08%。针对上述HBV DNA阳性的血液, 用化学发光再次检测乙肝5项, 有7份标本五项全阴; 其余为6份抗-HBs⁺、6份抗-HBs⁺/抗-HBc⁺、4份抗-HBs⁺/抗-HBe⁺、7份抗-HBc⁺/抗-HBe⁺、10例抗-HBc⁺。追踪其中4份乙肝5项检测结果全阴的血液, HBsAg均由阴性转为阳性。结论: NAT能在ELISA阴性的标本中筛检出HBV DNA阳性的标本, 减少窗口期乙肝和隐匿性乙肝的发生, 进一步保证了血液的安全。ELISA HBsAg阴性/NAT HBV DNA阳性的献血者中以隐匿性乙肝为主, 为输血残余风险的主要隐患。

[关键词] 核酸扩增检测技术; HBV DNA; 窗口期; 隐匿性乙肝病毒感染

Analysis of the inconsistency between ELISA and NAT in HBV screening in Changzhou Blood Center

DONG Po, HE Yaqin, PU Yunfeng

(Texting Laboratory, Changzhou Blood Center, Changzhou Jiangsu 213000, China)

Abstract **Objective:** To analyze the inconsistency between enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) HBsAg-negative and nucleic acid amplification assay (NAT) HBV DNA positive in HBV screening of unpaid blood donors in Changzhou, and further ensure the safety of blood transfusion. **Methods:** The qualified blood donor samples tested by two different ELISA reagents were further tested by the Roche or Kehua nucleic acid detection system for detecting HBV DNA, HCV RNA and HIV RNA in 6 mixed blood samples, and the positive POOLs were separated and detected. The specimens with positive segregation were tested by chemiluminescence for detection

收稿日期 (Date of reception): 2020-01-21

通信作者 (Corresponding author): 濮云峰, Email: pyxf1978@163.com

of 5 markers of hepatitis B, and the blood with 5 negative results was traced. **Results:** A total of 48 635 ELISA-negative blood donor samples tested for 2 times were mixed with 11 016 POOLs. The number of positive POOLs was 66 in the mixed test, and the number of POOLs that were split into HBV DNA positive was 40. No HCV RNA and HIV RNA were detected. The total effective resolution rate of NAT is 60.61%, and the positive rate of specimens detected by NAT is 0.08%. For the above-mentioned HBV DNA-positive blood, the five markers of hepatitis B were all negative in 7 cases by chemiluminescence; 6 cases of anti-HBs⁺, 6 cases of anti-HBs⁺/anti-HBc⁺, 4 cases of anti-HBs⁺/anti-HBe⁺, 7 cases of anti-HBc⁺/anti-HBe⁺, and 10 cases of anti-HBc⁺. Four negative cases were traced, and HBsAg in all these four turned from negative to positive. **Conclusion:** NAT can screen HBV DNA-positive specimens in ELISA-negative specimens, reduce the incidence of window period hepatitis B infection and occult hepatitis B infection, further ensure blood safety. The investigation shows that ELISA HBsAg-negative/NAT HBV DNA-positive blood donors were mainly occult hepatitis B virus infection, which was the main risk of residual blood transfusion.

Keywords nucleic acid amplification detection technology; HBV DNA; window period; occult HBV infection

我国是乙型肝炎高流行区, 人群携带率是7.18%, 约有1亿的病毒携带者, 是威胁我国血液安全的主要因素之一^[1]。为确保血液的安全, 进一步降低输血感染的风险, 常州市中心血站检测中心自2015年开始对所有献血者进行血液核酸扩增检测技术(nucleic acid amplification detection technology, NAT)的全覆盖。在实际的检测工作中, 在HBV筛查中一些血液存在ELISA检测HBsAg阴性与核酸检测HBV DNA阳性不一致的情况, 现对这部分血液标本调查分析, 结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源

常州市中心血站2019年1—9月采集的无偿献血者标本48 991份。

1.2 仪器与试剂

全自动加样仪(EVO150-8)购自长沙泰肯生物技术有限公司; 全自动ELISA处理系统(FAME24/20和FAME24/30)购自威海澳斯邦公司; Cobas s201核酸检测系统购自罗氏诊断产品(上海)有限公司; 科华核酸血液筛查平台(Hamilton Star 全自动混样提取纯化仪)购自瑞士Hamilton公司; 实时荧光定量PCR仪(ABI7500)购自美国应用生物系统公司; 全自动化学发光仪

(安图A2000plus)购自郑州安图生物工程股份有限公司。HBsAg ELISA检测试剂盒和TP抗体检测试剂盒购自上海科华生物工程股份有限公司和英科新创(厦门)科技有限公司; HCV抗体检测试剂盒购自珠海丽珠试剂股份有限公司和英科新创(厦门)科技有限公司; HIV抗原抗体检测试剂盒购自北京万泰生物药业股份有限公司和英科新创(厦门)科技有限公司; Roche cobas MPX Test Version 2.0购自美国罗氏诊断核酸试剂耗材; HBV, HCV, HIV(1型)核酸检测试剂盒购自上海科华生物工程股份有限公司; 化学发光仪检测HBsAg, HBeAg, 抗-HBs, 抗-HBe, 抗-HBc试剂盒购自郑州安图生物工程股份有限公司。所有试剂经中国药品生物制品检定研究院批检合格, 在有效期内使用。

1.3 方法

采用2种不同厂家试剂对献血者标本进行HBsAg、抗-HCV、抗-HIV、抗-TP血清学ELISA检测。ELISA检测合格的标本进行罗氏或者科华核酸检测系统的6人份混样检测, 无反应性POOL标本合格放行, 有反应性POOL标本进行拆分检测, 拆分结果无反应标本合格放行, 拆分结果有反应标本送常州妇幼保健院检验科进行化学发光的乙肝标志物5项的检测; 并对乙肝标志物5项检测结果全为阴性的血液进行追踪检测(图1)。

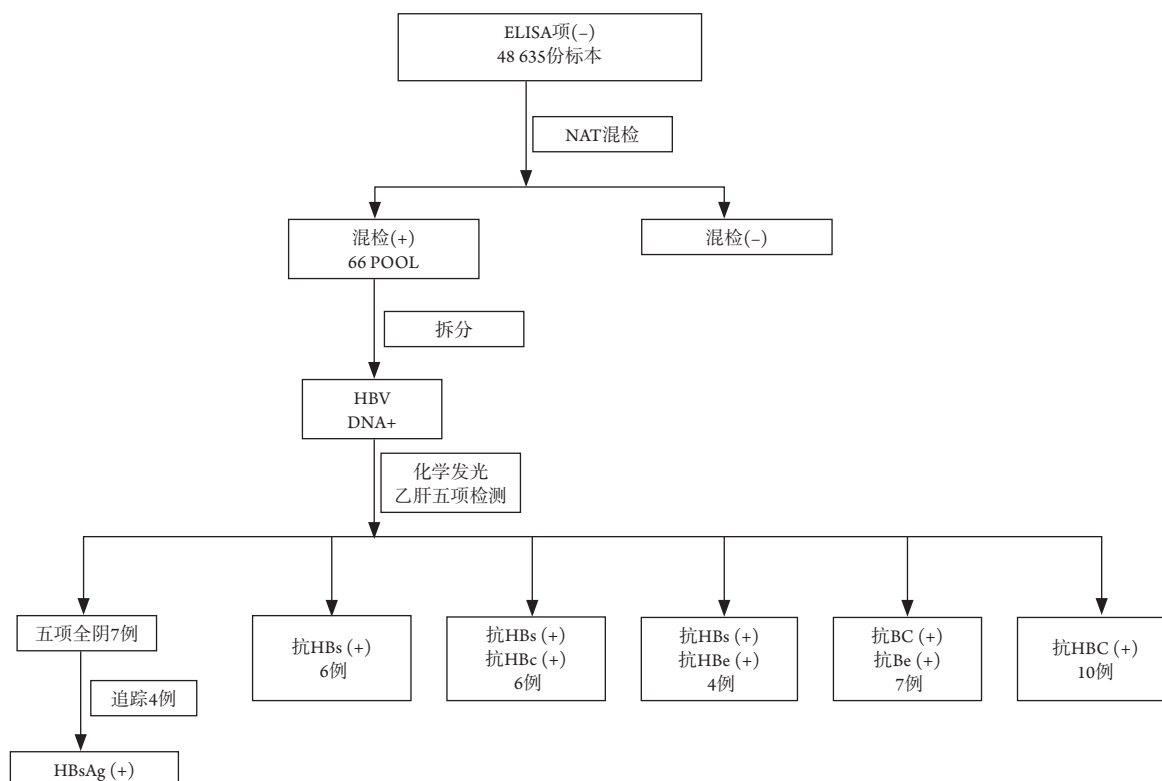


图1 检测流程图

Figure 1 Detection flowchart

2 结果

2.1 血清学 ELISA 检测结果

所有收集的48 991样本中, ELISA检测合格48 635份, 不合格356份。

2.2 NAT 检测结果

NAT共检测48 635份标本, 总混检11 016 POOL, 混检阳性66 POOL, 拆分阳性40 POOL, NAT总的有效拆分率为60.61%, NAT检测出的标本阳性率为0.08%(表1)。

2.3 NAT 检测 HBV DNA 阳性标本的化学发光检测结果

40例HBV DNA阳性的标本中, 7例标本乙肝5项全阴; 6例抗HBs⁺, 6例抗HBs⁺/抗HBc⁺, 4例抗HBs⁺/抗HBe⁺, 7例抗HBc⁺/抗HBe⁺, 10例抗HBc⁺(表2)。

2.4 乙肝5项标志物检测全为阴性的血液追踪检测

对乙肝5项标志物检测全为阴性的血液进行追踪, 收集到4例, 检测结果如表3。

表1 ELISA检测合格标本的NAT检测结果

Table 1 NAT test results of qualified samples by ELISA

NAT试剂	检测标本数	混样POOL数	混样阳性POOL数	拆分阳性POOL数	有效拆分率/%	标本阳性率/%
罗氏NAT	27 501	6 710	43	25	58.14	0.09
科华NAT	21 134	4 306	23	15	65.22	0.07
总计	48 635	11 016	66	40	60.61	0.08

表2 HBsAg阴性/NAT HBV DNA阳性标本的化学发光检测结果

Table 2 Chemiluminescence test results of HBsAg negative NAT HBV DNA positive specimens

标本号	罗氏拆 分CT值	科华拆 分CT值	化学发光法检测				
			HBsAg/(IU·mL ⁻¹)	抗-HBs/(mIU·mL ⁻¹)	HBeAg/(PEI U·mL ⁻¹)	抗HBe/(PEI U·mL ⁻¹)	抗HBc/(PEI U·mL ⁻¹)
1	37.6		—	—	—	—	—
2		34.33	—	—	—	—	—
3		33.74	—	211.90	—	—	—
4	39.4		—	54.23	—	—	—
5	38.4		—	129.88	—	8.56	—
6	37.2		—	—	—	—	—
7		29.89	—	13.00	—	—	—
8		34.39	—	—	—	—	—
9	36.7		—	—	—	—	—
10	40.9		—	213.66	—	—	—
11	37.6		—	—	—	—	—
12		36.70	—	—	—	—	—
13	38.5		—	155.3	—	—	—
14	39.1		—	101.5	—	—	—
15		33.30	—	99.7	—	2.50	—
16	35.3		—	68.3	—	10.10	—
17	34.2		—	67.3	—	3.00	—
18	37.8		—	66.0	—	—	1.7
19	36.8		—	55.1	—	—	1.8
20	37.1		—	40.1	—	—	3.3
21		30.40	—	20.3	—	—	2.4
22		31.40	—	66.7	—	—	1.5
23	38.4		—	22.1	—	—	2.1
24	36.9		—	—	—	5.00	3.0
25	35.4		—	—	—	3.00	1.2
26		32.60	—	—	—	1.90	1.1
27	34.9		—	—	—	2.10	2.1
28		33.60	—	—	—	1.20	1.0
29	34.1		—	—	—	0.90	2.2
30	35.1		—	—	—	0.90	3.0
31	34.2		—	—	—	—	2.3
32	36.1		—	—	—	—	1.2
33		34.80	—	—	—	—	3.0
34		37.20	—	—	—	—	10.0
35	37.1		—	—	—	—	7.1
36		37.90	—	—	—	—	2.0
37	37.9		—	—	—	—	2.6
38	38.5		—	—	—	—	1.3
39		36.70	—	—	—	—	1.5
40		35.40	—	—	—	—	3.4

表3 4例乙肝5项标志物检测全为阴性的血液追踪检测

Table 3 Blood tracing tests for 4 cases of hepatitis B with 5 negative markers

标本号	罗氏单检CT值	HBsAg/(IU·mL ⁻¹)	抗HBs/(mIU·mL ⁻¹)	HBeAg/(PEI U·mL ⁻¹)	抗HBe/(PEI U·mL ⁻¹)	抗HBc/(PEI U·mL ⁻¹)
2	35.3	12.3	—	—	—	2.0
6	36.1	20.3	—	—	2.1	5.1
9	35.1	7.3	—	1.2	—	3.1
11	37.0	3.3	—	—	1.9	—

3 讨论

献血者血液经过血清学ELISA检测后安全性已经大大提高,但由于血清学无法检出窗口期感染、隐匿性感染等情况,一些低病毒载量的HBV DNA感染仍是威胁血液安全的主要风险^[2]。核酸检测技术可以直接检测病毒的遗传物质,缩短病毒检测的窗口期^[3],灵敏度和特异性高,从而弥补血清学检测的不足。《2015版血站技术操作规程》颁布后,全国血站都必须用ELISA和NAT两种方法检测献血者血液。由于HBV的感染地区流行性差异以及检测方法不同、ELISA灰区设置不同、进入核酸检测的标本不同等,HBV DNA阳性检出率也不尽相同。2019年1—9月常州地区共检出ELISA合格标本数为48 635,经核酸检测HBV DNA阳性的标本数为40,标本阳性检出率为0.08%,符合我国乙肝病毒感染的现状,高于焦作市、济南市报道的0.055%^[4],0.067%^[5],低于东莞市报道的0.09%^[6]。

窗口期感染的判定标准是HBV DNA阳性,乙肝5项标志物全为阴性^[7]。我站NAT检测出HBV DNA阳性标本中,化学发光检测显示5项全阴7份(17.5%),高于苏州地区报道的7.1%^[8]。后续追踪到4例献血者HBsAg由阴性转为阳性,这4例标本可判定为窗口期,另外3例由于没有追踪到,暂定为可疑窗口期。另外利用高科技含量的化学发光技术发现HBsAg与ELISA的检测结果一致,都为阴性,可能由于乙肝病毒S基因区的突变引起S蛋白变性改变,导致现有的抗体检测试剂对HBsAg不反应^[1]。

隐匿性HBV感染指血清中的HBsAg阴性,血清或肝组织中可以检出低水平的HBV DNA,可伴有抗HBs⁺和/或抗HBc⁺,抗HBe⁺。本研究中6份(15%)单纯抗HBs⁺,出现此模式原因可能是:1)注射乙肝疫苗后的突破感染^[9]。2)隐匿性乙肝感染,隐匿性乙肝感染的血液中即使存在抗HBs,也只能降低

病毒传播的概率,并不能完全中和病毒。抗HBc半衰期长且在血清中较稳定,是既往感染的标志。抗HBc⁺被认为是隐匿性乙肝感染血清学的一种重要的特征^[10]。隐匿性乙肝感染是常州地区经输血传播HBV的主要残余风险,主要原因是近年来乙肝疫苗的普及和抗病毒的治疗,导致HBsAg结构改变或者合成降低,或是病毒复制和表达受到抑制等^[11]。由于HBV感染有复杂的血清学转变和模式,仍需要后续的追踪检测才能确认感染模式(窗口期、隐匿性感染、一过性感染等)。

综上所述,NAT可以弥补血清学检测HBV病毒的不足,进一步降低输血的残余风险;化学发光法作为NAT的补充,可以进一步确认病毒感染的模式,提高隐匿性乙肝感染的检出率,确保血液的安全。

参考文献

- 倪修文,徐利强,李建华,等. ELISA HBsAg⁻/NAT HBV DNA⁺献血者的血清学与核酸定量检测的研究分析[J]. 中国输血杂志, 2018, 31(9): 993-997.
NI Xiuwen, XU Liqiang, LI Jianhua, et al. Analysis of serological and nucleic acid quantitative detection of HBsAg⁻/HBV-DNA⁺ blood donors[J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2018, 31(9): 993-997.
- 周磊,刘颖,邓雪莲,等. 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[J]. 中国输血杂志, 2018, 31(9): 985-988.
ZHOU Lei, LIU Ying, DENG Xuelian, et al. HBV residual risk analysis of MPX-6 Positive but Individual Test negative blood specimens in nucleic acid screening[J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2018, 31(9): 985-988.
- 李俊英,王艺芳,葛文超,等. 2种核酸筛查系统应用于病毒核酸检测的比较[J]. 中国输血杂志, 2015, 28(6): 720-723.
LI Junyin, WANG Yifang, GE Wenchao, et al. Comparison in the application of two kinds of nucleic acid screening systems in nucleic

- acid detection[J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2015, 28(6): 720-723.
4. 来祝樾, 韩惠云, 张国平. 核酸检测HBV DNA 阳性献血者的追踪检测结果分析[J]. 中国输血杂志, 2017, 30(5): 525-528.
LAI Zhubing, HAN Huiyun, ZHANG Guoping. Analysis of the results on tracking assay of the blood donors with positive HBV DNA in nucleic acid test[J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2017, 30(5): 525-528.
 5. 朱永宝, 张妍, 李英莲, 等. 2010-2012年济南地区无偿献血者核酸检测结果分析[J]. 中国输血杂志, 2013, 26(8): 722-724.
ZHU Yongbao, ZHANG Yan, LI Yinglian, et al. Analysis of nucleic acid test results of the blood donors in JiNan from 2010 to 2012[J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2013, 26(8): 722-724.
 6. 师玲玲, 刘赴平, 王德文, 等. 核酸检测技术在献血者血液筛查中的初步应用[J]. 中国输血杂志, 2010, 23(1): 11-13.
SHI Lingling, LIU Fuping, WANG Dewen, et al. Preliminary application of nucleic acid detection technology in blood screening of blood donors[J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2010, 23(1): 11-13.
 7. 姚凤兰, 汪德海, 查祎, 等. 核酸检测单反应性无偿献血者HBV感染状态分析[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(11): 1513-1516.
YAO Fenglan, WANG Dehai, ZHA Yi, et al. Detection of occult HBV infection and probably window period infection among single NAT reactive blood donors[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2017, 38(11): 1513-1516.
 8. 周怡, 史恩溢, 曹谊, 等. HBsAg阴性献血者隐匿性HBV感染的血清学特征及其与病毒载量的关系[J]. 临床输血与检验, 2017, 19(6): 570-573.
ZHOU Yi, SHI Enyi, CAO Yi, et al. Study on the serological characteristics and HBV DNA Levels of HBsAg-negative blood donors with occult HBV infection[J]. Journal of Clinical Transfusion and Laboratory Medicine, 2017, 19(6): 570-573.
 9. 蒋昵真, 王金花, 陈晓莉. 单独抗-HBs 阳性献血者HBV DNA 阳性原因分析[J]. 中国输血杂志, 2019, 32(4): 370-373.
JIANG Nizhen, WANG Jinhua, CHEN Xiaoli. Analysis of HBV DNA positive blood donors with anti-HBs only[J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2019, 32(4): 370-373.
 10. Allain JP, Mihaljevic I, Gonzalez-Fraile MI, et al. Infectivity of blood products from donors with occult hepatitis B virus infection[J]. Transfusion, 2013, 53(7): 1405-1415.
 11. 邓雪莲, 安万新, 梁晓华, 等. 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): 38-40.
DENG Xuelian, AN Wanxin, LIANG Xiaohua, et al. Observation on the effect of parallel serological test and nucleic acid test in Dalian Blood Center[J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2012, 25(1): 38-40.

本文引用: 董珀, 何亚琴, 濮云峰. 常州市中心血站HBV筛查中酶联免疫检测与核酸检测结果不一致的分析[J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(6): 1357-1362. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.06.003

Cite this article as: DONG Po, HE Yaqin, PU Yunfeng. Analysis of the inconsistency between ELISA and NAT in HBV screening in Changzhou Blood Center[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2020, 40(6): 1357-1362. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.06.003