

血筛核酸检测——临床用血安全的有力保障

随着医疗技术的发展，临床对输血安全的要求也越来越高。目前采供血机构已经建立了严格的病毒血清学检测方法，在献血前筛除可能含有传染性病原体如 HIV、HBV、HCV 等的献血者。近年来，我国临床用水量以年均 10% 的涨幅持续上升，HIV 和 HCV 的初筛阳性样本明显增加，使受血者感染的风险也随之增加。近 10 多年来，免疫检验技术水平和试剂的发展优化使得输血的安全性在不断地增强。但是由于病毒变异、血清转换窗口期、免疫静默感染、HBsAg 治疗后转阴等情况囿于免疫方法学局限，导致了现行血液筛查方法可能造成漏检。

一、 核酸检测技术的发展状况

核酸检测 (nucleic acid testing, NAT) 作为一项新兴的检测技术已在血液筛查领域开展应用，它是对免疫学检测方法的重要补充，在缩短检测窗口期、提高病毒检出率方面具有相当的优势。NAT 是直接检测病原体核酸的一系列技术的总称，可在尚未检测到抗原或抗体前，先检测到病毒核酸，其基本步骤包括核酸提取、扩增和检测。NAT 对血液样本的筛查常放在血清学筛查之后进行，经核酸检测不合格血液不能用于临床输血。早在 1999 年，美国和日本就开始进行血液核酸检测，并取得了很好的成效，检出多例酶免方法不能检出的乙肝、丙肝、艾滋病毒感染的血液样本，使输血风险度大大降低。目前，世界上已有 30 余个国家和地区开展了 NAT 常规血液筛查。

在国内，输血界也一直在关注着 NAT 技术的发展和应用。目前 NAT 技术经过了在医疗机构、血制品厂原料血浆筛检和部分血站多年的应用和摸索，积累了丰富的技术经验和研究数据。血筛 NAT 技术已被国内外输血相关机构认为是血液检测发展的必然趋势。国家卫生部也充分认识到其重要性，于 2010 年初提出将“开展血液筛查核酸检测的试点工作”作为今年的重点工作之一，血液 NAT 筛查对保证临床用血安全的重要意义已获其充分认可。

二、 血筛 NAT 应用的基本要求

根据卫生部要求，血站核酸扩增检测实验室开展血液病毒 NAT 项目使用的商品化试剂盒，都须针对血液样本中的乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒和人类免疫缺陷病毒 I 型进行检测。

血站血筛使用的 NAT 试剂与临床使用的检测试剂在目的和要求方面完全不同，为了能够最大程度地检出血清学漏检的病毒阳性样本，血筛核酸试剂必须有非常高的灵敏度。且出于工作量以及成本因素的考虑，NAT 在血筛工作中常使用多样本汇集的混合方案，因此对系统的检测灵敏度提出了更进一步的要求。美国 FDA 于 1999 年 12 月颁布了一项针对 HIV NAT 试剂的指南，其中提到了对 HIV NAT 的分析灵敏度，按照 95% 检出率，混合血浆样本检测的最低分析灵敏度为 100IU/ml，单个供者样本的最低分析灵敏度为 5000IU/ml。德国 PEI (Paul-Ehrlich-Institute, 为 WHO 协作中心单位，负责血液制品、输血安全及相关标准制定等) 制定的试剂灵敏度标准是：NAT 对单个献血员最低灵敏度 HCV 为 5000IU/ml，HIV 为 10000IU/ml。

为满足血站日常化和应急检测工作的需求，保证血液的及时发放，核酸血筛工作对血筛系统平台提出了很高的自动化和通量检测要求，体现于全面自动化及经设计优化的样本汇集、核酸提取、核酸扩增检测及样本拆分这一整套检测流程。另外，由于 NAT 技术具有极高的灵敏度，提取和扩增检测中任何一个环节操作不当均可能造成检测污染，可导致假阴性或假阳性的检测结果，系统的自动化程度还决定了整个检测流程的抗污染能力。

在血液样本检测过程中，由于每个样本的情况各不相同，一些样本中可能含有不能为核酸提取步骤中去除的扩增抑制物，结果导致标本扩增受抑制；另外，扩增仪可能存在高于允许范围的孔间差，导致不同管间扩增效率差异。因此每批次检测中的阳性和阴性对照标本还不能完全满足血筛质控的要求。为防止假阴性检测结果，血筛核酸检测中须使用内对照质控。其原理是在试剂中使用包含模板引物结合区域的核酸片段，监控样本裂解、提取、扩增和检测整个过程，以反映每管内真实的反应情况，避免因扩增抑制而出现假阴性结果，使得检测全程质量得以监控。同时在核酸检测过程中，还必须做到信息化，以自带的过程控制软件，实现对检测数据和检测过程的自动信息化控制。

三、科华核酸血筛系统简介

科华生物长期以来致力于诊断产品的开发和研究，对血液安全非常重视。作为目前国内血液安全检测 ELISA 试剂最大的供应商，一直关注国际上血液筛查新技术的发展和应用。从 2003 年开始科华生物正式启动了血源筛查用核酸检测测试

剂的研究，此项目总投资约 7000 万元，并被列为国家卫生部“十一五重大专项”和上海市科教兴市项目。

科华核酸血筛试剂“乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒和人类免疫缺陷病毒 型核酸检测试剂盒（PCR-荧光法）”已在血制品企业、血站、CDC、卫生部临检中心、中检所等各级机构进行临床考核，并获得了世界卫生组织(WHO)指定、澳大利亚国家血清学参考实验室(NRL)组织的室间质评证书。在公司进行的 10 万人份的临床研究中，检出现行血筛漏检标本 HBV/HCV/HIV 分别为 22/10 万、2/10 万、1/10 万，其中 HIV、HCV 标本经过献血员跟踪调查，证明确系窗口期漏检^[1-2]。目前，科华核酸血筛系统已在江苏省血液中心、云南昆明血液中心、成都市血液中心等三家卫生部指定试点血站，及其他一些非试点血站用于常规血液核酸筛查检测。

科华核酸血筛系统采用“磁珠提取 - PCR 扩增 - 实时荧光检测”的技术路线，经中国药品生物制品检定所检定，对 HBV、HCV、HIV 三项病毒核酸的检测灵敏度已分别达到 5IU/ml、50IU/ml、50IU/ml，按照 8 份样本汇集检测的模式，三项病毒的样本检测灵敏度分别为 40 IU/ml、400 IU/ml、400 IU/ml，完全达到了美国 FDA 对试剂灵敏度的要求。检测过程中通过采用内对照质控参与核酸提取、扩增检测，对核酸检测全过程进行质量控制，有效地避免假阴性检测结果。

科华生物与国际著名的工作站制造商 Hamilton 合作打造了全自动核酸工作站，通过在 Hamilton Star 自动化液体处理工作站上整合核酸提取磁珠分离模块，实现了在同一平台上从标本条形码扫描、标本汇集、核酸提取到扩增检测反应液分装上样的全部自动化操作；采用具备多色检测功能的荧光 PCR 仪 ABI 7500 进行后续的实时核酸扩增检测，在检测结束后直接通过软件分析获得三个病毒项目的分项检测结果。通过这两个平台的组合，实现了核酸血筛全过程的自动化和高通量检测，一套科华核酸血筛标准系统可以在 5 - 6 小时内完成 752 人份的检测任务。同时，该系统在实验室管理软件的基础上增加了核酸检测的管理模块，实现所有数据和仪器操作过程的计算机管理，将条形码扫描记录的样本信息、汇集信息、检测结果有效地进行整合，保证了所有检测样本的可溯源性和检测报告的可靠性。