

# 核酸检测技术 (NAT)应用综述

于荣锋<sup>1,2</sup>

(1. 山东大学药学院, 山东 济南 250012 2 山东泰邦生物制品有限公司, 山东 泰安 271000)

**摘要:** 预防和控制血液相关传染病一直是世界各国关注的焦点, 选择合适的检测技术可以有效地提高血液安全性。本文综述了核酸检测技术 (nucleic acid testing NAT) 在血液筛查中的应用情况, 为此方法在我国的推广和应用提供一定参考。

**关键词:** 酶联免疫吸附试验; 核酸检测技术; 血液制品

**中图分类号:** R957. 1<sup>+</sup> 4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672- 7738(2011)09- 0539- 03

## Review on nucleic acid detection technology application

YU Rong-feng<sup>1,2</sup>

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China; 2. Shandong Taibang Biological Product Co., Ltd., Taian 271000, China)

**Abstract** Prevention and control of transfusion-related diseases has always been the focus of attention of all countries in the world. Select the appropriate detection technology can improve the safety of blood effectively. This article reviewed NAT's application on blood screening and provide a reference for this method's promotion and application in our country.

**Key words** ELISA; NAT; Blood products

《中国生物制品规程》规定, 血液制品是指“由健康人血浆或特异免疫人血浆分离、提纯或由重组 DNA 技术所制的血浆蛋白组分或血细胞组分, 如人血白蛋白, 主要用于诊断、治疗或免疫预防”。但是通过血液制品传播的病毒有很多种, 其中 HIV、HBV、HCV 等几种病毒由于感染率高, 危害严重, 受到国内外医学界的关注。

广泛用于血液筛查的方法主要是 ELISA, 即酶联免疫吸附法, 是指采用抗原与抗体的特异性反应将待测物与酶连接, 然后通过酶与底物发生颜色反应, 用于定量测定, 测定的对象可以是抗体或者抗原。用此方法对血浆进行病毒筛查已经显著降低了原料血浆的病毒污染, 但仍存在病毒传播的危险性, 如: 病毒感染者“窗口期”献血, 病毒发生变异, 免疫静默感染 (immunosilent infection) 及人工操作失误等<sup>[1]</sup>。为缩短病毒抗体检测的“窗口期”, 目前 NAT 检测方法成为国内外研究热点, NAT 是一系列直接检测病原体核酸的技术的总称, 主要是使用一些物理、化学和生物学的方法, 通过靶核酸扩增的方法, 将极微量的核酸转变成直观的光电或可视信号, 从而判断是否存在病原体<sup>[2]</sup>。此方法敏感度高, 可检测出极微量的核酸, 大大缩短了“窗口期”, 并已在欧美等国家血液制品行业 and 我国少数血液制品生产企业得到应用, 有必要在我国血液制品生产企业进一步加以推广。

### 1 我国原料血浆管理状况

血液制品的病毒安全性首先取决于原料血浆的管理, 包括供血浆者的筛选和原料血浆的检测。卫生部和国家食品药品监督管理局要求单采浆站和血液制品生产企业必须依据《中国药典》《血液制品管理条例》《单采血浆站基本标准》《单采血浆站质量管理规范》和《单采血浆站管理办法》进行操作; 原料血浆必须经两种不同的 ELISA 试剂初、复检抗 HIV-1/2 抗-HCV、HBsAg 梅毒和 ALT 合格后, 方可投料生产。截止 2010 年底, 全国共有 156 家单采浆站, 负责为国内 30 多家血液制品生产企业提供原料血浆。目前我国血液制品生产企业对原料血浆的管理和质量控制以及不合格血浆的处理基本符合规定, 企业能够在划定区域的合法采浆站采集血浆, 与采浆站签有质量保证书或协议, 并对采浆站进行各种形式的检查评估<sup>[3]</sup>。生产企业购买并分发给采浆站的一次性套材的使用量与血浆量及成品量一致, 并能够使用国家药监局批准的、中国药品生物制品检定所逐批检定合格的试剂盒作核对与复检, 但个别企业对复验血浆废液和血浆破袋后废袋的处理不符合规定。尽管单采浆站按规定实施了严格的原料血浆质量控制措施, 但生产企业在复检血浆时仍然会发现一定数量的酶免阳性样品, 原因可能是由于试剂灵敏度差异, 或检测方法出现假阳性, 或实验过程中存在人为差错, 也不能完全排除献血浆者冒名顶替的可能。

### 2 我国血液制品行业采用 NAT 的可行性

早期的 NAT 采用电泳方法分析扩增产物, 是开放式检测, 易出现气溶胶污染导致的假阳性; 目前 NAT 采用实时动态定量扩增方法, 由于引入探针杂交技术、UNG 防污染技术与内标准技术, 进行封闭、实时和定量测定, 使得检测特异性、灵敏度和准确率有很大提高, 是迄今为止检测病毒的最灵敏方法, 可以明显缩短血浆感染病毒抗体阳转前的“窗口期”的检出期限, 降低血液传播病毒的危险。国外研究证实: 采用 NAT 后, HCV “窗口期”可减少 57~59 d, HBV “窗口期”可减少 30 d, HIV “窗口期”可减少 10~11 d<sup>[4]</sup>。欧美血液制品生产企业已普遍采用 NAT 筛查血浆, WHO 生物标准化委员会也有专门会议讨论并认定 NAT 在血液和血液制品病毒安全性检测方面的使用, 美国 FDA 早已经正式批准用于原料血浆筛查的 HIV/HCV 定量检测试剂<sup>[5]</sup>。

国外药监机构对原料血浆混浆投料前的 NAT 检测已有相关法规。美国 FDA 分别于 1998 年 7 月、1999 年 11 月和 2001 年 6 月发布 NAT 检测试剂和应用于原料血浆检测的管理规范和指南, 认为 NAT 可以用于原料血浆 HCV 和 HIV 筛查, 但应与目前使用的 ELISA 方法结合, 并且对合并血浆 NAT 的管理有明确规定, 核酸检测应归为生物制品, 必须按照新药观察 (ND) 的要求实施管理; 核酸检测已被推荐用于一定范围和数量的合并样品检测; 核酸检测须灵敏、特异、可重复连续制造、符合 GMP 要求; 企业采用核酸检测属重大变更, 应予补充报告上报待批。另外 FDA 也在考虑进行 HAV 核酸检测的可能性。欧洲专有药物委员会 (CPMP/BWP) 也在 1998 年发布原料血浆混浆 HCV-RNA 的 NAT 检测指南。《欧洲药典》(2001 年补充版) 已将 NAT 纳入其中<sup>[6]</sup>。2001 年 12 月 18 日, FDA 批准美国国家遗传研究所 (National Genetics Institute) 的合并血浆样品 HIV 和 HCV 检测系统和美国 Alpha 公司采用 NAT 用于血浆筛查。2002 年 2 月 28 日, FDA 批准美国 GEN-Probe 公司 (现属于 Chiron 公司) 的 HIV-1 和 HCV 核酸定量检测系统 (Proclik) 用于血液制品 (包括凝血因子) 生产过程中的献血者筛查。欧美许多血液制品生产企业已经采用 NAT 检测血浆混浆后的 HCV-RNA 和 HIV-RNA, 以及 HAV 和细小病毒 B19<sup>[2]</sup>。从血液制品的安全性和血液制品行业的发展来讲, 由于 NAT 可以缩短病毒“窗口期”, 降低 HCV 的高感染率, 并有可能取代两次 ELISA 检测中的一次检测, 我国血液制品生产企业应当尽早推行原料血浆混浆投料前的核酸检测<sup>[7]</sup>。目前, 国内已经有血液制品生产企业开始采用原料血浆的核酸检测, 为这一技术在我国血液制品行业的推行提供了范例。《中国遏制艾滋病行动计划 (2005-2010)》明确提出: 2010 年底前, 实行原料血浆混浆投料前的核酸抽检。可以说, 我国血液制品生产企业在原料血浆的筛查中采用 NAT 的外部环境开始具备。

### 3 我国血液制品行业采用 NAT 面临的问题

NAT 及其试剂的研究进展确立了原料血浆核酸检测应用的技术可行性, 国外血液制品生产企业的大规模应用提供了可以借鉴的经验, 但是 NAT 用于原料血浆筛查也存在局限性。

3.1 最主要的问题是混浆样品数的限制 目前 NAT 还不能直接用于 > 10 000 份的血浆或血浆制品混合物检测, 原因是病毒分子浓度会明显降低试剂的敏感性, 血浆中存在的特异性病毒抗体也会影响测定结果; 因此采用 NAT 用于合并血浆病毒检测必须首先确定血浆的最佳混合样品数量。国外研究证实, 50~100 人份的血浆混合物不会减弱 PCR 检测系统的敏感性。在美国, FDA 对此并没有明确规定, 但建议原料血浆核酸检测的样品合并数为 96~1 200 份, 全血的样品合并数为 16~128 份<sup>[8]</sup>。生产企业采用的合并数量应由其所用试剂的灵敏度和原料血浆的病毒感染率, 并经严格的验证来决定<sup>[9]</sup>。

3.2 确定 NAT 试剂的灵敏度是推广原料血浆的核酸检测面临的一个重要课题 美国 FDA 在相关文件中, 对欲获批准的 NAT 试剂的灵敏度有明确规定: 对 HIV-1/HCV 达到 > 100 cp·mL<sup>-1</sup> 且检出率不低于 95%, 对原料血浆混合检测应能达到 5 000 IU·mL<sup>-1</sup><sup>[10]</sup>。现阶段这一标准已经可以满足原料血浆的 HIV 和 HCV 筛查, 而在美国已获批准的 NAT 试剂均能达到这个标准。国产试剂用于原料血浆筛查尚处于开始阶段, 试剂的特异性和灵敏度还有待进一步验证<sup>[11]</sup>。

3.3 NAT 是一项很复杂的技术, 需要具备一系列基本条件, 包括管理规范、程序文件、实验室设置、人员资格、操作规范、仪器配置和试剂保障, 国外药监机构对此都有明确规定。我国血液制品的管理机构应当尽早作好 NAT 管理方面的准备工作, 建立与国际接轨的管理程序、技术标准、管理模式、管理规范、试剂审批和方法验证等一系列内容的管理体系, 以确保这项技术的规范化应用。另外, 必须建立完善的检测程序, 以确保检测结果的可靠性和准确性。

3.4 目前我国血液制品生产企业推行原料血浆的 NAT 可能会面临一系列问题, 如实验设施的配置、操作人员的培训、检测试剂的选择、血浆筛查成本增加 (耗材、试剂、设施) 和管理内容增加。另外, 中国地域辽阔, 各地经济发展不平衡, 血液制品生产企业的从业人员素质和技术水平也有差距。药品监督管理部门应当根据我国血液制品行业的实际情况制定相应的管理要求, 并应当按集中管理、分段实施、条件成熟时全面铺开的管理思路。

综上所述, NAT 技术以其高敏感性和特异性已在海外得到广泛应用, 我国有部分地区已开始尝试此新方法, 但是仍然存在一些需要克服的问题, 因此, 我国现阶段应研发适合我国国情的血液筛检技术, 进一步提高我国血液安全水平。

### 参考文献:

- [1] Gallarda JL, Dragon E. Blood screening by nucleic acid amplification technology: current issues, future challenges [J]. Mol Diagn, 2000, 5(1): 11-22
- [2] 王迅. 核酸检测技术 (NAT) 及其在血液筛检中的应用 [J]. 中国输血杂志, 2004, 17(6): 465-468
- [3] 白坚石. 核酸检测技术的应用与血液制品的安全保障 [J]. 中国输血杂志, 2003, 16(5): 301-302

(下转第 545 页)

制、药品注册审批程序等内容的变化,加深了对新版的《药品注册管理办法》的理解。对药品的各种审批流程采用图表设计的流程图设计,框线图清晰明了,既方便教师讲解,又利于学生掌握。

4.2 案例式教学 在药事管理学教学中,药事法规是主要组成部分,其内容抽象而难以记忆。教学中采用典型案例结合法律法规讲解,可以变抽象为形象、变枯燥为生动,引导学生参与讲述、归纳、分析和讨论。如在讲授药品广告管理时,针对现在违法药品广告的普遍现状,以国家药监局近期公布的违法药品广告为例,根据法律依据,确认其违法事实,对其违法行为进行定性,分析对其的行政处罚是否得当。通过案例分析,让学生既学习、巩固、升华了所学的理论知识,又熟悉了药事管理实践活动,从而做到理论联系实际。

4.3 导学式教学 为了提高课堂教学的有效性和高效率,教学过程中围绕教学目标,编写导学案,引导学生主动参与课堂教学活动,构建导学式课堂教学模式。设置“自主学习,交流展示,释疑点拨,巩固提升”的环节,实现课堂教学的最大效益,培养学生自主学习、合作探究的学习能力和品质。导学案中题目的设计要注重基础知识和基本技能的训练。学生按照导学案中题目课前充分预习,并对内容进行总结整理,以 PPT 形式进行课堂汇报,通过学生互评、讨论和教师点评等环节的课堂教学活动,使学生进一步掌握课程标准和学习目标。

4.4 探究式教学 探究式教学指在老师的启发诱导下,以现行教材为基本探究内容,让学生通过个人、小组、集体等多种解难、释疑、尝试活动,将自己所学知识应用于解决实际问题的一种教学形式。在药事管理学教学过程中,根据不同专业学生就业方向,药事管理知识的侧重点也不同,由老师精心设计若干课题,供学生分类选择。课题主要针对药学领域的现状如创新药物少、生产技术低、经营不规范、用药不合理、药学专业人员缺乏等方面。学生通过图书馆、计算机网络

查阅文献资料,并对所研究课题的当前形势、发展趋势、存在问题做出总结、分析和讨论;以撰写论文的形式作为平时考核成绩。探究式教学,不仅可以评价和检查学生掌握知识和运用知识的情况,提高分析解决实际问题的能力;同时给学生提供了广阔的思维空间,拓展了学生的知识面。

4.5 考察式教学 药事管理学是具有社会学属性的学科,教学应突出“实践”二字,深入实际,参观实习,利于学生加深理解。如药品生产质量管理及认证,内容繁多抽象,采用带领学生到药厂参观的办法。边参观、边学习、边讲解,将理论与实践融会贯通。了解工厂的组织机构及人员设置,理解厂房的整体布局和设施设备要求对药品生产过程、药品质量的影响。介绍各部门工作职责、工作任务、工作流程和工作要求,了解各工序、各环节、各岗位的质量控制,明确生产管理、质量管理对药品质量的重要性。

## 5 课后沟通

药事管理学的教学课时少,内容多,教师课后需要加强和学生的沟通,做到师生之间平等对话、坦诚相见。沟通方式多种多样,采用面对面交流、作业沟通、电话短信交流和互联网沟通等多种形式相结合,主要包括情感沟通、信息沟通和意见沟通等三个层面,力图从情感上贴近学生,亦师亦友,激发学生学习兴趣,构建和谐和谐的师生关系。除了耐心地帮助学生分析、解答学习生活中的疑难问题外,面对同学们对课程教学提出的意见和建议,应该虚心接受并适时作出调整。

## 6 教学研究

药事管理学全面体现了药品研制、生产、经营、使用、价格、信息、检验等诸多管理与实践知识,看似内容庞杂,头绪较多,只要潜心研究,就能找出其中内在规律和相互联系。其核心内容为药品的监督管理,其目的达到药品的安全、有效、质量可控,主要涉及药监部门、企业和医院的政策、法规、标准和管理等方面。同时对于各个环节的法律法规及标准都有相类似的地方,可采用类比法进行讲解,记忆。

(上接第 540 页)

- [4] 陈渊卿. 全血清直接法聚合酶链反应检测 HBVDNA [J]. 中华传染病杂志, 1990, 8(1): 6
- [5] Engelfriet CP, Reesink- Ass HW. Inplementation of donor screening for infections agents transmitted by blood by nucleic acid technology [J]. Vox Sanguinis 2002, 82(2): 87 - 111
- [6] 骆抗先, 周荣, 梁焯森, 等. 聚合酶链反应鉴定 HBsAg 阴性慢性活动性肝炎中的乙型肝炎病毒感染 [J]. 中华内科杂志, 1991, 30(1): 21- 23
- [7] 汪兴大, 周诚. 检测 HCV RNA 的 PCR 试剂质控试行参考品的建立 [J]. 中国生物制品学杂志, 1994, 7(3): 133 - 135

- [8] 白坚石, 王威, 朱文斯. 原料血浆混样 HCV/HIV-1 核酸检测的方法学研究 [J]. 中国输血杂志, 2003, 16(5): 309- 312
- [9] 于红, 张文卿, 王笑峰, 等. 用 PCR 检测临床标本中人类微小病毒 B19 DNA [J]. 微生物学免疫学进展, 1997, 25(4): 46- 48
- [10] 黄素钦, 吴秋芳. HBV 感染者血清 HBVDNA 定量检测临床价值的探讨 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2004, 18(1): 79
- [11] 魏民, 梁浩, 陈建平, 等. 使用多重巢式 PCR 对我国 HIV-1 主要流行株亚型鉴定方法的建立 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2004, 18(1): 83- 87