· 论著 ·

酶免检测双试剂反应性核酸初筛无反应性献血者核酸重复检测结果分析

臧亮 周磊 刘笑春 孙鹏 范亚欣 梁晓华
(大连市血液中心,辽宁 大连 116001)

摘要:目的 通过分析酶免检测(ELISA)双试剂反应性核酸检测(NAT)初筛无反应性献血者的标本的 NAT 重复检测结果,探讨实验室现有检测模式和检测策略对血液安全的影响。**方法** 收集 2017—2025 年大连市血液中心 ELISA 检测双试剂反应性 NAT 初筛检测无反应性的献血者标本,采用转录介导扩增(TMA)及聚合酶链反应(PCR)2 个系统进行 NAT 重复检测,结合 NAT 重复检测结果的出现次数及检测模式(混检与单检)进行比较分析。**结果** 共纳入 ELISA 检测双试剂反应性 NAT 初筛无反应性标本 199 份,其中 HBsAg ELISA 反应性标本 66 份、抗-HCV ELISA 反应性标本 130 份、HIV Ag/Ab ELISA 反应性标本 3 份。HBsAg ELISA 反应性标本中,57 份(57/66,86.4%)在 NAT 重复检测中至少出现 1 次反应性结果,其中 49 份可重复检出≥2 次。HBcAb ECA 反应性标本 64 份(64/66,97.0%),无反应性 2 份(2/66,3.0%),2 份 HBcAb ECA 无反应性标本在 NAT 重复检测中均未检出反应性结果。抗-HCV 和 HIV Ag/Ab ELISA 反应性标本未观察到 NAT 的重复检出。TMA 检测系统经 3 次联检和 1 次鉴别检测共检出反应性标本 50 份(50/66,75.8%);PCR 检测系统经 4 次单检共检出反应性标本 51 份(51/66,77.3%)。2 个检测系统均检出反应性标本 44 份,仅 TMA 检测系统检出反应性标本 6 份,仅 PCR 检测系统检出反应性标本 7 份。**结论** 在 ELISA 双试剂反应性 NAT 初筛无反应性的献血者标本中,HBsAg ELISA 反应性标本存在较高比例的低病毒载量感染,HBV DNA 检出呈间歇性及概率性特征。NAT 次数及检测策略对低病毒载量标本的识别具有重要影响。应充分认识 HBV 低病毒载量感染标本的检测特点,以优化血液筛查策略并提高血液安全性。

关键词:血液筛查;核酸检测;酶免检测;重复检测
中图分类号:R457.1 R446 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2026)6-0757-05
DOI:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2026.06.008

Analysis of repeated nucleic acid test results in blood donors with dual-reactive enzyme-linked immunosorbent assay results and nonreactive nucleic acid test results

ZANG Liang, ZHOU Lei, LIU Xiaochun, SUN Peng, FAN Yaxin, LIANG Xiaohua.
Dalian Blood Center, Dalian 116001, *China.*
Co-corresponding authors: FAN Yaxin, Email: yaxinfan@163.com; LIANG Xiaohua, Email: liangxiaohua1968@126.com

Abstract: Objective To investigate the impact of current laboratory testing models and screening strategies on blood safety by analyzing repeat nucleic acid testing (NAT) results obtained from blood donors who had dual-reactive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) results but were initially nonreactive by NAT. **Methods** Samples from blood donors with dual-reactive ELISA results and initially nonreactive NAT results collected at Dalian Blood Center from 2017 to 2025 were included. Repeated testing was performed using two NAT systems: transcription-mediated amplification (TMA) and polymerase chain reaction (PCR). The results were analyzed in terms of the frequency of reactive NAT results and the testing strategies, including minipool and individual donation testing. **Results** A total of 199 samples with dual-reactive ELISA results and initially nonreactive NAT results were included, comprising 66 HBsAg-reactive samples, 130 anti-HCV-reactive samples, and 3 HIV Ag/Ab-reactive samples. Among the HBsAg-reactive samples, 57 (57/66, 86.4%) showed at least one reactive NAT result upon repeated testing, and 49 showed two or more repeat reactive results. Anti-HBc was reactive in 64 samples (64/66, 97.0%) and nonreactive in 2 samples (2/66, 3.0%); both anti-HBc-nonreactive samples remained nonreactive in repeated NAT. No stable repeat nucleic acid reactivity was observed in anti-HCV- or HIV Ag/Ab-reactive samples. The TMA system detected 50 reactive samples (50/66, 75.8%) through three combined assays plus one

第一作者简介:臧亮(1977-),主任技师,Email:zangliangdl@163.com;**共同通信作者:**范亚欣,Email:yaxinfan@163.com;梁晓华,Email:liangxiaohua1968@126.com

discriminatory assay, whereas the PCR system detected 51 reactive samples (51/66, 77.3%) through four rounds of individual-donation testing. Fortyfour samples were reactive on both systems, 6 were reactive only on the TMA system, and 7 were reactive only on the PCR system. **Conclusion** Among blood donors with dual-reactive ELISA results and initially nonreactive NAT results, HBsAg-reactive samples contain a high proportion of low viral load HBV-related cases, with intermittent and probabilistic nucleic acid detectability. Both testing frequency and detection strategy significantly affect the detection of low viral load samples. These findings highlight the importance of recognizing the detection characteristics of low viral load HBV-related samples in order to optimize blood screening strategies and improve blood safety.

Key words: blood screening; nucleic acid testing; enzyme-linked immunosorbent assay; repeat testing

输血传播感染(transfusion-transmitted infections, TTIs)始终是血液安全管理的核心问题。随着核酸检测(nucleic acid testing, NAT)技术的广泛应用,献血者筛查体系不断完善,病毒感染窗口期显著缩短,输血相关感染风险已明显降低,但低病毒载量标本的识别与确认仍然是血液筛查面临的重要挑战[1-3]。目前我国多数采供血机构采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)与 NAT 联合筛查策略,通常对 ELISA 无反应性标本进一步开展 NAT[4]。在此筛查流程下,ELISA 反应性 NAT 无反应性的结果相对少见,但其生物学意义较为复杂。该类结果可能与既往感染后抗体持续存在、非特异性反应(假反应性)及低病毒载量状态等因素有关[5-6]。其中,HBV 在低病毒载量条件下可表现为间歇性或随机性 DNA 血症,HBV DNA 检出具有一定不稳定性[3,5-6];而 HCV 感染在病毒清除后,抗-HCV 可长期持续存在,但 HCV RNA 通常呈现 NAT 持续无反应性,因此抗-HCV ELISA 反应性而 NAT 无反应性的标本较少出现 NAT 重复检出[7]。HIV 相关检测结果在个别情况下(如药物治疗)亦可能受极低病毒载量等因素影响,其判读需结合多种检测结果综合分析[8-9]。值得注意的是,在常规筛查流程中,ELISA 反应性标本通常不会系统开展多次 NAT 重复检测,因此该类标本中是否存在间歇性核酸检出及其检测结果特征仍缺乏系统研究。同时,不同 NAT 策略对低病毒载量标本的检出结果也可能存在差异,这对血液安全评估及筛查策略优化具有潜在意义[4,15-16]。本研究收集 2017—2025 年大连市血液中心 ELISA 反应性 NAT 初筛无反应性的献血者标本,通过多系统(TMA 及 PCR)及多次重复检测,分析其 NAT 检出情况,并结合检测次数及检测模式进行比较,旨在为献血者结果解释、质量管理及血液筛查策略优化提供数据依据,现报告如下。

1　对象与方法

1.1　研究对象

收集 2017 年 1 月—2025 年 12 月大连市血液中心 ELISA 双试剂反应性 NAT 初筛无反应性的献血者留样标本,共 199 份。献血者均符合《献血者健康检查要求》。按照常规操作,每位献血者采血时同步留取 3 管检测标本:1 管 5 mL EDTA-K_2 抗凝全血标本及 2 管 5 mL EDTA-K_2 抗凝/带分离胶全血标本。标本处理和保存均严格按照《血站技术操作规程(2019)》执行。根据 ELISA 反应标志物,将研究标本分为 3 组:HBV 相关标志物反应性组、抗-HCV 反应性组和 HIV Ag/Ab 反应性组。HBV 相关标志物反应性组纳入 HBsAg ELISA 反应性 NAT 初筛无反应性的标本;抗-HCV 反应性组纳入抗-HCV ELISA 反应性 NAT 初筛无反应性的标本;HIV Ag/Ab 反应性组纳入 HIV Ag/Ab ELISA 反应性 NAT 初筛无反应性的标本。

1.2　试剂与仪器

ELISA 试剂:HBsAg 检测试剂(厦门新创公司,批号:2016075116—2022065118;北京万泰公司,批号:B20221150B—B20250308B;DiaSorin 公司,批号:D428110—A016410);抗-HCV 检测试剂(ORTHO 公司,批号:EXE263—EXE361;北京万泰公司,批号:CS20160706B—CS20250203B);抗-HIV 检测试剂(厦门新创公司,批号:2016056608-2025026604);HIV-Ag/Ab 检测试剂(BIO-RAD 公司,批号:6A0348—3G0577;北京万泰公司,批号:H20221119B—H20250408B)。NAT 试剂:Cobas® TaqScreen MPX Test v2.0 (Roche 公司,批号:210761-M09487);Ultrio Plus(2017 年 5 月前)和 Ultrio Elite(2017 年 5 月后)(Grifols 公司,批号:136308-708172)。HBcAb 检测试剂盒[电化学发光法(electrochemiluminescence assay, ECA), Roche 公司,批号:00851732]。EVO 全自动加样仪(Tecan

公司);FAME24/20 全自动酶免分析仪(Hamilton 公司);Cobas s201 PCR 核酸检测系统、Cobas e 411 电化学发光检测仪(Roche 公司);Tigris/Panther TMA 核酸检测系统(Grifols 公司)。所有试剂均在有效期内使用。

1.3 方法

1.3.1 常规筛查

献血者血液标本常规筛查包括 ELISA 检测和 NAT。ELISA 检测采用双试剂(来自 2 个不同厂家)平行检测模式。NAT 初筛根据本中心不同时期常规工作流程分别采用 TMA 系统或 PCR 系统完成。TMA 系统采用单检模式;PCR 系统常规采用 6 混样模式进行筛查,混检标本有反应性结果时进行拆分单检。

1.3.2 NAT 重复检测

对 ELISA 双试剂反应性 NAT 初筛无反应性的标本进行多系统 NAT 重复检测。重复检测所用标本均来自于常规筛查后自血浆袋分装并冻存保存的留样标本。检测前将冻存标本解冻后尽快完成相应检测项目,未完成检测的标本于冷藏条件下暂存,48 h 内完成全部检测。TMA 系统采用 HBV/HCV/HIV 联检重复检测 3 次,并进行 1 次 dHBV/dHCV/dHIV 鉴别检测。PCR 系统进行 4 次单检重复检测。重复检测中任意 1 次结果为反应性定义为 NAT 重复检测反应性;多次重复检测均未检出反应性的标本定义为 NAT 重复检测未检出。

1.3.3 HBcAb 检测

对 HBsAg 反应性组标本采用电化学发光法检测 HBcAb。根据试剂说明书判定结果,HBcAb 结果分为反应性和无反应性。

1.3.4 HBsAg S/CO 值分层分析

对 HBsAg 反应性组标本按 HBsAg ELISA 的 S/CO 值进行分层分析。鉴于不同试剂体系 S/CO 值不宜直接合并比较,本研究统一采用初筛阶段 ELISA 试剂 A 检测结果进行分组。根据筛查结果将 S/CO 值分为 1<S/CO<5、5<S/CO<10 和 S/CO ≥10 3 个区间,比较不同区间 NAT 重复检测反应性与 NAT 重复检测未检出的结果分布。

1.4 统计学分析

使用 Excel 2021 和 SPSS 27.0 软件做数据统计。计数资料以例数和构成比表示。HBsAg ELISA S/CO 值分层与 NAT 重复检测结果之间的比较采用 Pearson χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 献血者标本检测的总体情况

2017—2025 年共有 ELISA 双试剂反应性 NAT 初筛无反应性献血者标本 199 份,其中 HBsAg 反应性组标本 66 份,抗-HCV 反应性组标本 130 份,HIV Ag/Ab 反应性组标本 3 份。抗-HCV 反应性组标本未观察到明确的 NAT 重复检出现象,故未纳入进一步分析。HIV Ag/Ab 反应性组标本例数较少,亦未观察到 NAT 重复检出情况。在 66 份 HBsAg 组标本中,57 份(57/66,86.4%)为 NAT 重复检测反应性,9 份(9/66,13.6%)在 NAT 重复检测中未检出反应性结果。在 57 份 NAT 重复检测反应性标本中,8 份(8/57,14.0%)仅出现 1 次反应性结果,49 份(49/57,86.0%)出现≥2 次反应性结果。

2.2 HBcAb 检测结果

66 份 HBsAg 反应性组标本中检出 HBcAb 反应性标本 64 份(64/66,97.0%),无反应性 2 份(2/66,3.0%)。2 份 HBcAb 无反应性标本在 NAT 重复检测中均未检出反应性结果。

2.3 NAT 重复检测结果

66 份 HBsAg 反应性组标本,TMA 系统共检出反应性标本 50 份(50/66,75.8%),PCR 系统共检出反应性标本 51 份(51/66,77.3%),TMA 与 PCR 2 个系统均检出反应性标本 44 份,仅 TMA 系统检出反应性标本 6 份,仅 PCR 系统检出反应性标本 7 份,2 个系统均未检出反应性 9 例。

2.4 不同 HBsAg ELISA S/CO 值区间标本的 NAT 重复检测结果

结果见表 1,不同 HBsAg ELISA S/CO 区间标本的 NAT 重复检测反应性率比较无差异($\chi^2=4.335$,$P=0.114$)。

表 1 不同 HBsAg ELISA S/CO 值区间标本的 NAT 重复检测结果

Table 1 Analysis of repeated NAT results by HBsAg ELISA S/CO category

ELISA	NAT 重复检测(n)			反应性率(%)
	反应性	无反应性	合计	
1<S/CO<5	16	3	19	84.2
5<S/CO<10	10	4	14	71.4
S/CO≥10	31	2	33	93.9

2.5 献血者特征分析

HBsAg 反应性组的 66 份标本对应的献血者中,重复献血者仅 4 名,其中 2 名在 NAT 重复检测

中出现多次反应性,另 2 名 NAT 重复检测均未检出。

3　讨论

本研究结果显示,在 66 份 HBsAg ELISA 双试剂反应性 NAT 初筛无反应性标本中,57 份在 NAT 重复检测中至少出现 1 次 NAT 反应性,其中 49 份可重复检出≥2 次,提示单次 NAT 无反应性并不能完全排除低病毒载量 HBV 感染的存在。本研究中绝大多数 HBsAg ELISA 反应性标本同时表现为 HBcAb 反应性(64/66,97.0%),提示该类标本多具有 HBV 感染相关血清学背景。仅有的 2 份 HBcAb ECA 无反应性标本在 NAT 重复检测中均未检出反应性结果,但由于例数较少,尚不能据此作进一步推断。从生物学机制角度看,HBV 感染过程中抗原表达与病毒复制并不完全同步:一方面,HBV DNA 可整合入宿主基因组,整合序列虽不具备完整复制能力,但仍可持续表达 HBsAg[11];另一方面,在宿主免疫压力或表观遗传调控作用下,共价闭合环状 DNA (cccDNA) 可能处于低转录或转录抑制状态,使病毒复制水平极低,从而难以被 NAT 试剂稳定捕获[12]。此外,在低复制或感染恢复阶段,肝细胞仍可分泌不含完整病毒基因组的亚病毒颗粒,进一步导致抗原与核酸检测结果的不一致[13]。结合检测方法和病毒生物学特点,HBsAg 与 HBV DNA 检出并不总是同步。在极低病毒载量条件下,病毒复制水平可能低于 NAT 试剂可稳定识别的范围,而 HBsAg 仍可持续表达,因此可出现“ELISA 反应性而 NAT 无反应性”的检测结果[10,14]。

从检测次数和检测方法的角度分析,TMA 系统采用 3 次联检加 1 次鉴别检测,PCR 系统采用 4 次单检,在 66 份 HBsAg ELISA 双试剂反应性 NAT 初筛无反应性标本中,TMA 系统共检出反应性标本 50 份,PCR 系统共检出反应性标本 51 份;其中 2 个系统均检出反应性标本 44 份,仅 TMA 系统检出反应性标本 6 份,仅 PCR 系统检出反应性标本 7 份。上述结果提示,在低病毒载量条件下,病毒核酸的检出更符合概率性事件特征,增加检测次数有助于提高反应性结果的累积概率;同时,不同检测系统对低病毒载量标本的检出亦可能存在一定差异。本研究中不同检测系统间的检出差异更可能反映检测次数和检测策略的综合作用,而非单一检测系统性能的差异。既往研究表明,混检(minipool,MP-NAT)由于稀释效应可能降低低病毒载量标本的检出机率,而单检(individual donation,ID-NAT)在该区间具有更高敏感性[15-16]。这进一步提示检测策略在低病毒载量标本识别中的重要作用。

从筛查策略角度看,在低病毒载量条件下,ELISA 与 NAT 更可能呈现互补关系,而非简单替代关系。ELISA 反应性不仅反映既往或当前感染状态,也可能作为低水平病毒血症的提示信号;而 NAT 结果在单次检测中具有一定不确定性。因此,对于 ELISA 双试剂反应性 NAT 初筛无反应性的标本,单次 NAT 结果可能不足以完全反映其真实生物学状态,其结果解释及质量管理需更加谨慎。同时,在现有筛查流程中,ELISA 反应性标本未必均进入系统性的 NAT 重复检测,这可能使部分低病毒载量标本未被充分识别[4,15-16]。未来在筛查策略优化中,可进一步关注特定高风险标本是否需要更有针对性的补充检测方案,但仍需在检测成本、操作复杂性及血液安全收益之间取得平衡。

HBsAgELISA S/CO 值分层分析显示,不同 S/CO 区间的标本 NAT 重复检测反应性率无差异(P>0.05),但高 S/CO 区间的标本中 NAT 重复检测反应性数量较多,且不同区间仍存在明显重叠。这提示 ELISA S/CO 值虽与感染可能性相关,但难以准确反映病毒复制状态,单纯依赖其判断感染状态具有局限性[10,14]。

与 HBV 不同,本研究中抗-HCV ELISA 反应性标本未观察到 NAT 重复检出。既往研究表明,抗-HCV ELISA 反应性 NAT 无反应性多提示既往感染后病毒已清除,抗体可长期持续存在,而 HCV RNA 通常不再检出,本研究结果与既往认识一致[7]。HIV Ag/Ab ELISA 反应性标本例数较少,未观察到 NAT 重复检出,其检测结果需结合临床背景综合判读[8-9]。此外,本研究在重复献血者中亦观察到 NAT 检出的不同表现模式,提示该类标本具有一定异质性,可能与病毒学特征及检测策略共同作用有关。

本研究亦存在一定局限性。首先,本研究旨在探讨低病毒载量标本的检出特点,而不宜作严格的系统方法学比较;其次,部分标本缺乏长期随访数据,难以进一步明确其真实感染状态及长期转归;此外,本研究重复检测所用标本均来自于血浆袋分装冻存留样,标本中含有保存液成分,理论上可能

对病毒核酸浓度有一定稀释,尤其在低病毒载量条件下可能影响检测结果。因此,本研究观察到的 NAT 重复检测结果可能存在偏差。虽然不同系统检测原则上同期完成,且解冻后尽快完成相应项目检测,未完成检测的标本于冷藏条件下暂存,不进行反复冻融,但作为单中心回顾性研究,仍难以完全排除标本保存条件差异对检测结果的潜在影响。本研究结果仍需在更大样本量及前瞻性研究中进一步验证。

综上所述,在 ELISA 双试剂反应性 NAT 初筛无反应性的献血者标本中,HBsAg ELISA 反应性标本中存在较高比例的 HBV 低病毒载量标本,HBV DNA 检出具有间歇性及概率性特征。检测次数及检测策略对低病毒载量标本的识别具有重要影响。上述结果提示,在血液筛查实践中,应充分认识 HBV 低病毒载量感染的检测特点,以进一步优化筛查策略并提高血液安全性。

利益冲突说明/Conflict of Interests

所有作者均声明不存在利益冲突。

伦理批准及知情同意/Ethics Approval and Donor/Patient Consent

本研究已通过大连市血液中心伦理委员会审批(批准号:LL-05011);本研究纳入的所有献血者均已签署知情同意书。

作者贡献/Authors' Contribution

臧亮:试验设计、论文撰写;周磊:试验实施和数据分析;孙鹏、刘笑春:试验实施和数据收集;范亚欣、梁晓华:论文校对和审核。

[参考文献]

[1] ROTH W K. Hepatitis B and blood transfusion[J]. Infus Ther Transfus Med,2007,34(1):20-24.

[2] CANDOTTI D,ALLAIN J P. Transfusion-transmitted hepatitis B virus infection[J]. J Hepatol,2009,51(4):798-809.

[3] RAIMONDO G,ALLAIN J P,BRUNETTO M R,et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection[J]. J Hepatol,2008,49(4):652-657.

[4] 景媛媛,段勇,刘雅东,等. 2012—2021 年西安地区无偿献血者血液筛查结果的回顾性研究[J]. 中国输血杂志,2023,35(6):533-538.
JING Y Y, DUAN Y, LIU Y D, et al. A retrospective study of blood screening results among voluntary blood donors in Xi'an from 2012 to 2021[J]. Chin J Blood Transfusion, 2023,35(6):533-538.

[5] ALLAIN J P. Occult hepatitis B virus infection:implications in transfusion[J]. Vox Sang,2004,86(2):83-91.

[6] KIELY P,MARGARITIS A R,SEED C R,et al. Hepatitis B virus nucleic acid amplification testing of Australian blood donors highlights the complexity of confirming occult hepatitis B virus infection[J]. Transfusion,2014,54(8):2084-2091.

[7] ALTER M J. Epidemiology of hepatitis C virus infection[J]. World J Gastroenterol, 2007,13(17):2436-2441.

[8] KLEINMAN S H,LELIE N,BUSCH M P. Infectivity of human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus and risk of transmission by transfusion[J]. Transfusion,2009,49(11):2454-2489.

[9] BRANSON B M,OWEN S M,WESOLOWSKI L G,et al. Laboratory testing for the diagnosis of HIV infection:updated recommendations[R]. Atlanta:Centers for Disease Control and Prevention,2014.

[10] GERLICH W H. Medical virology of hepatitis B:how it began and where we are now[J]. Virol J,2013,10(1):239-264.

[11] TU T,BUDZINSKA M A,SHACKEL N A,et al. HBV DNA integration:molecular mechanisms and clinical implications[J]. Viruses,2017,9(4):75-93.

[12] REVILL P A,CHISARI F V,BLOCK J M,et al. A global scientific strategy to cure hepatitis B[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol,2019,4(7):545-558.

[13] BRUSS V. Hepatitis B virus morphogenesis[J]. World J Gastroenterol,2007,13(1): 65-73.

[14] GERLICH W H,BREMER C,SANIEWSKI M,et al. Occult hepatitis B virus infection: detection and significance[J]. Dig Dis,2010,28(1):116-125.

[15] 侯云,冯秋霞,李蓓,等. 改进核酸筛查混检阳性池再检模式的探讨[J]. 中国输血杂志, 2024,37(2):190-195.
HOU Y,FENG Q X,LI B,et al. Discussion on improving the retesting mode for minipool NAT-positive samples in blood screening[J]. Chin J Blood Transfusion,2024,37(2):190-195.

[16] 何子毅,韩国伟,陈庆恺,等. 献血者混合标本与单标本核酸检测扩增效率及成本分析[J]. 中国输血杂志,2023,36(4):341-345.
HE Z Y,HAN G W,CHEN Q K,et al. Analysis of amplification efficiency and cost of minipool and individual-donation nucleic acid testing in blood donors[J]. Chin J Blood Transfusion,2023,36(4):341-345.

(2026-05-12 收稿,05-30 修回,06-10 接收)

本文编辑:闻欣