

静注人免疫球蛋白 (pH4) 病毒标志物核酸检测试剂适用性评价

勾洋梅^{*1} 王亚丽^{*2} 卜文² 周小娟² 孙海琼¹ 张阳阳¹ 郭朝晖² 杨福军¹ 刘晓^{1,▲}

1 兰州兰生血液制品有限公司 2 甘肃省药品检验研究院 甘肃兰州 730046

【摘要】目的 评价核酸检测试剂用于静注人免疫球蛋白 (pH4) 病毒标志物检测的适用性。**方法** 用静注人免疫球蛋白 (pH4) 成品, 制备不同 pH 和不同病毒载量的检测样本, 通过核酸检测试剂盒进行核酸病毒检测, 完成适应性评价后, 对静注人免疫球蛋白进行检测。**结果** 静注人免疫球蛋白调整 pH 为 7 的样品中加入病毒后核酸检测结果均符合可接受标准, HIV、HCV、HBV 三种病毒阳性检出率均为 100%。静注人免疫球蛋白成品 pH 为 4 的样品加入病毒载量为 0、3、5LOD 的检测结果符合可接受标准, 病毒载量为 1LOD 的样品检测结果不符合可接受标准。**结论** 核酸检测试剂能够用于静注人免疫球蛋白成品的病毒标志物检测, 前提是样品 pH 需调整至 7, 才能确保检测结果的准确性。

【关键词】 静注人免疫球蛋白 (pH4); 核酸检测; 病毒; 安全性

【中图分类号】 R735.7

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-4083 (2021) 01-001-02

【基金项目】 甘肃省药品监督管理局 2020 年度药品科研项目, 项目编号: 2020GSMPA002

血液和血液制品因其在急救治疗中具有良好的效果, 已在临床上广泛地应用。为确保血液及血液制品的安全, 最大限度地降低经血传播疾病的危险, 特别是经血液传播的某些病毒如 HBV、HCV、HIV、HDV、HTLV、CMV、EBV、HDV、B19 等, 其中 HIV、HBV、HCV 不仅感染率高且危害非常严重, 一直是世界各国关注的重大问题^[1-3]。尽管采用具有较高特异性和灵敏度的 ELISA 试剂对献血者和原料血浆进行认真、严格的筛查, 但由于“血清转换窗口期”和试剂本身的局限性原因, 并不能完全排除病毒存在的危险。近年来, 随着以核酸扩增检测技术 (Nucleic acid amplification technology/test, NAT) 为代表的分子生物学技术在血液筛查方面的应用, 输血及血液制品安全性有了很大的提高, 从理论上该技术能显著地缩短病原体检出的“窗口期”。NAT 检测 HBV、HCV、HIV 病毒的窗口期较抗体检测分别提前 9 天、25 天和 14 天。目前, 这项技术已经成为国内外输血中心和血液制品厂家进行血液及原料血浆病毒筛查的必要手段^[4-6]。

1 材料和方法

1.1 材料和设备

静注人免疫球蛋白 (pH4) 成品为兰州兰生血液制品有限公司生产; PCR-荧光法检测乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒 (1+2 型) 的核酸检测试剂及质控品均购自罗氏诊断产品上海有限公司; HBV DNA 标准物质、HCV RNA 标准物质、HIV RNA 标准物质购自北京康彻思坦生物技术有限公司; Microlab®STAR 混样仪购自 HAMILTON 公司; COBAS® AmpliPrep 提取仪、COBAS® TaqMan® 分析仪购自罗氏公司。

1.2 方法

1.2.1 样品选择

随机选取采用 ELISA 检测 HBsAg、HIV 抗体、HCV 抗体阴性的 20 批静注人免疫球蛋白 (pH4) 成品, 用于 HBV、HIV、HCV 核酸检测。

1.2.2 核酸检测流程

* 第一作者: 勾洋梅, 女, 医学生物工程师, 硕士研究生, 从事血液制品研发和质量管理工作。

* 共同第一作者: 王亚丽, 女, 主管药师, 硕士研究生, 主要从事血液制品质量控制工作。

▲ 通讯作者: 刘晓, 男, 副研究员, 硕士研究生, 从事血液制品科研和质量管理工作。

静注人免疫球蛋白 (pH4) 成品经过 COBAS® AmpliPrep 提取仪和 COBAS® TaqMan® 分析仪, 进行全自动分析检测。

1.2.3 静注人免疫球蛋白 (pH4) 成品病毒核酸检测的影响因素试验

静注人免疫球蛋白 (pH4) 成品的初始 pH 为 4, 为酸性样本。按照表 1 的方案分别在 pH 为 4 和 7 的产品中分别加入 0、1、3、5LOD 的病毒, 按照核酸检测流程进行核酸检测。

表 1: 产品 pH 对病毒核酸检测的影响试验

编号	pH	病毒载量 (LOD)	静注人免疫球蛋白 (pH4) 浓度	可接受标准		
				HIV	HCV	HBV
1	4	0	50g/L	-	-	-
2		1	50g/L	+	+	+
3		3	50g/L	+	+	+
4		5	50g/L	+	+	+
5	7	0	50g/L	-	-	-
6		1	50g/L	+	+	+
7		3	50g/L	+	+	+
8		5	50g/L	+	+	+

1.2.4 静注人免疫球蛋白 (pH4) 成品加入病毒后核酸检测

将 20 批静注人免疫球蛋白 (pH4) 成品调整 pH 至 7, 每个样本分为三份, 分别加入 1、3LOD 的病毒, 按照病毒核酸检测流程进行核酸检测。

1.2.5 静注人免疫球蛋白 (pH4) 成品核酸检测

将 pH 调整为 7 的静注人免疫球蛋白成品进行核酸检测。

2 结果

2.1 静注人免疫球蛋白 (pH4) 成品病毒核酸检测的影响因素试验结果

表 2 结果显示, pH 为 7 的静注人免疫球蛋白样品中分别加入 0、1、3、5LOD 的病毒后核酸检测结果均符合可接受标准。pH 为 4 的静注人免疫球蛋白样品分别加入 0、1、3、5LOD 的病毒后, 病毒载量为 0、3、5LOD 的检测结果符合可接受标准, 病毒载量为 1LOD 的样品检测结果仅检测出 HBV 阳性, HIV 和 HCV 为阴性, 不符合可接受标准。

2.2 静注人免疫球蛋白 (pH4) 成品加入病毒后病毒核酸检测结果

将 20 批静注人免疫球蛋白 (pH4) 成品调整 pH 至 7, 每个样本分为三份, 分别加入 0、1、3LOD 的病毒, 按照核酸检

测流程进行检测,结果显示,加入病毒的样品,HIV、HCV、HBV 三种病毒阳性检出率均为 100%。不加病毒的样品检测结果为阴性。

表 2: 产品 pH 对病毒核酸检测的影响试验结果

编号	pH	病毒载量 (LOD)	静注人免疫球 蛋白 (pH4) 浓度	试验结果		
				HIV	HCV	HBV
1	4	0	50g/L	-	-	-
2		1	50g/L	-	-	+
3		3	50g/L	+	+	+
4		5	50g/L	+	+	+
5	7	0	50g/L	-	-	-
6		1	50g/L	+	+	+
7		3	50g/L	+	+	+
8		5	50g/L	+	+	+

表 3: 产品中加入不同的病毒载量对病毒核酸检测的影响试验结果

病毒载量 (LOD)	检出率 (%)		
	HIV	HCV	HBV
0	未检出	未检出	未检出
1	100	100	100
3	100	100	100

2.3 静注人免疫球蛋白 (pH4) 成品病毒核酸检测结果

将 20 批静注人免疫球蛋白 (pH4) 成品按照病毒核酸检测流程进行核酸检测,结果显示,HIV、HCV 和 HBV 三种病毒的核酸检测均为阴性。

表 3: 静注人免疫球蛋白 (pH4) 成品病毒核酸检测结果

编号	检测结果		
	HIV	HCV	HBV
1	阴性	阴性	阴性
2	阴性	阴性	阴性
3	阴性	阴性	阴性
4	阴性	阴性	阴性
5	阴性	阴性	阴性
6	阴性	阴性	阴性
7	阴性	阴性	阴性
8	阴性	阴性	阴性
9	阴性	阴性	阴性
10	阴性	阴性	阴性
11	阴性	阴性	阴性
12	阴性	阴性	阴性
13	阴性	阴性	阴性
14	阴性	阴性	阴性
15	阴性	阴性	阴性
16	阴性	阴性	阴性
17	阴性	阴性	阴性
18	阴性	阴性	阴性
19	阴性	阴性	阴性
20	阴性	阴性	阴性

3 讨论

随着血液制品行业中核酸检测 (nucleic acid

testing, NAT) 技术的应用于发展,可明显缩短血浆感染病毒阳转前潜伏期 (窗口期) 的检出期限,降低血源性病毒的传播危险。1994 年,欧洲最早开始将 NAT 技术用于原料血浆筛查,随后该方法迅速应用于临床输血血液筛查^[1]。目前, NAT 技术已在国内外广泛应用于血液和原料血浆的病原体筛查。

血液制品的独特疗效和安全性关系到人民的生命健康,原料血浆的病毒安全性控制是血液制品 (血浆蛋白衍生物) 的安全与质量控制的关键,世界各国药品监管机构都非常关注这一问题。可经血 / 血液制品传播的病毒有甲型肝炎病毒 (HAV)、乙型肝炎病毒 (HBV)、人免疫缺陷病毒 (HIV)、人类细小病毒 (B19)、巨细胞病毒 (CMV) 以及人类朊病毒^[3]。现阶段,国内外普遍采用原料血浆病原体筛查、原料血浆检疫期管理和血浆蛋白分离过程中增加病毒灭活 / 去除工艺等不同手段,进行病毒安全性控制,以最大限度降低血液制品病原体污染的风险。另外各种病原体核酸扩增检测技术从生产源头起作用,以灵敏度高和特异性强的特点成为迄今为止最灵敏的病毒检测方法,已经广泛用于原料血浆的病原体早期筛查^[5]。但是《中国药典》没有规定血液制品成品病毒标志物的检测要求。

为确保血液制品成品的病毒安全性,我公司建立了原料血浆核酸检测方法。本文对病毒核酸检测试剂检测静注人免疫球蛋白成品中病毒标志物的适用性进行评价,建立相应检测方法,提高血液制品的安全性^[6]。分别采用静注人免疫球蛋白 pH 为 4 的酸性样本及将 pH 调整为 7 的中性样本,加入 0、1、3、5LOD 的病毒,按照核酸检测流程进行检测。结果显示静注人免疫球蛋白调整 pH 为 7 后的样品核酸检测结果均符合可接受标准, pH 为 4 的样品检测结果中,病毒载量为 1LOD 的样品仅检测出 HBV 阳性, HIV 和 HCV 为阴性,不符合可接受标准。研究表明,静注人免疫球蛋白产品的 pH 对病毒标志物核酸检测结果有一定影响。在 pH 为 7 的静注人免疫球蛋白样品中分别加入 0、1、3LOD 的 HIV、HCV、HBV 三种病毒,核酸检测结果显示阳性检出率均为 100%,表明在静注人免疫球蛋白 pH 为 7 的条件下,病毒载量对检测结果无明显影响。本文通过对静注人免疫球蛋白成品中病毒标志物进行检测,表明核酸检测试剂能够用于静注人免疫球蛋白 (pH4) 的病毒标志物检测,将静注人免疫球蛋白的 pH 调整至 7 是确保检测结果准确的前提条件。

参考文献

- [1] 白坚石, 王威. 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
- [2] 钱榕, 后平钦, 方昌志. 核酸检测技术在献血者血液筛查中的应用 [J]. 中国输血杂志, 2012, 25(3): 246-248.
- [3] BUSCH M P. HIV, HBV, and HCV: new developments related to transfusion safety [J]. Vox Sang, 2000, 78: 253-253.
- [4] 马玉媛, 赵雄, 尹惠琼等. 血液制品病毒安全性控制措施研究进展 [J]. 军事医学, 2015, (3): 225-228.
- [5] 杨敬鹏, 徐晓楠. 血液制品生产用血浆国内外监管的异同 [J]. 中国药事, 2019, 33(7): 732-736.
- [6] 余伟, 赵辉, 刘文芳. 病毒灭活 / 去除工艺与血液制品病毒安全性 [J]. 中国输血杂志, 2009, (7): 606-610.