

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.02.040

· 技术与方法 ·

血源性乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒和艾滋病病毒核酸筛查系统的建立与应用

陈泽惠¹ 陈嘉昌² 丁渭² 陈华云²

(1 云梦县人民医院 湖北 云梦 432500; 2 中山大学达安基因诊断中心 广东 广州 510010)

摘要 目的: 建立同时实现乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV)、丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV)、艾滋病病毒 (human Immunodeficiency Virus, HIV) 检测的多重核酸筛查系统。**方法:** 以 HBV、HCV、HIV 的保守序列为模板设计特异性引物和探针, 通过核酸自动提取系统结合一步法 RT-PCR 技术平台, 优化相关反应体系和条件, 建立多重多色实时荧光 PCR 检测血源性传播病毒的核酸筛查系统。将该系统用于 101387 例血浆样本的筛查。**结果:** 本研究建立的核酸筛查系统特异性好, HBV 灵敏度可以达到 20IU/ml, HCV 灵敏度可以达到 100IU/ml, HIV 灵敏度可以达到 50IU/mL。**结论:** 本研究建立的核酸筛查系统具有高度自动化、高灵敏度、低成本等特点, 适合我国血站系统推广使用。

关键词: 血液筛查; 荧光定量 PCR; 灵敏度; 特异性

中图分类号: R512.6, R18 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)02-347-06

Establishment and Application of Multi-color Nucleic Acid Screening System for the Detection of Blood Transmitted HBV, HCV and HIV

CHEN Ze-hui¹, CHEN Jia-chang², DING Wei², CHEN Hua-yun²

(1 Peoples' hospital of Yunmeng county, Yunmeng, Hubei, 432500, China;

2 Anda Gene diagnostic center of Zhongshan University, Guangzhou, Guangdong, 510010, China)

ABSTRACT Objective: To establish a multiple nucleic acid screening system for simultaneous detection of hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus in blood samples. **Methods:** Conservative sequences of HBV, HCV and HIV were used to design specific primers and probes, automatic nucleic acid extract system combined with one-step RT-PCR technology were used, the reaction system and conditions were optimized to establish multi-color and multiple real-time fluorescence PCR nucleic acid screening system for detection of blood transmitted viruses. The system was used in screening of 100,000 plasma samples of our hospital. **Results:** The established system was highly specific with the sensitivity of HBV detection of 20IU/ml, sensitivity of HCV detection of 100IU/ml and sensitivity of HIV detection of 50IU/ml. **Conclusion:** The nucleic acid screening system in this study is highly automatic, highly sensitive and inexpensive, it is applicable for nationwide generalization in blood centers to insure the clinical blood utilization safety.

Key words: Blood screening; FQ-PCR; Sensitivity; Specificity

Chinese Library Classification (CLC): R512.6, R18 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)02-347-06

前言

杜绝血源性传染病的传播是安全使用血液及血制品的首要任务^[1]。乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎(HCV)、艾滋病病毒(HIV)是对血制品安全性构成严重威胁的主要病毒^[2], HBV在我国人群中的感染率高达 10%-12%^[3], HCV在我国人群中感染人群达 3000-4000 万^[4], 严重威胁着我国的血液及血制品的使用安全。由于检测技术相对落后, 对供血者还存在一定的漏检率, 致使绝大多数输血传播性肝炎是由 HCV 引起^[5,6]。HIV 的传播途径之一是经血传播, 输入了带 HIV 的血液, 感染 HIV 的可能性超过 90%^[1]。

长期以来, 我国血站及单采血浆站的血液病毒筛查都是使

用免疫学方法, 该方法存在以下不足: (1) 低滴度血清敏感性: 如病毒感染“窗口期”的检测; (2) 突变株的检测; 如现有的 HBsAg 检测试剂都采用单克隆抗体, 新的突变株不断出现, 如何检测这些突变株; (3) ELISA 检测试剂 HOOK 效应和非特异性反应问题, 非典型血清转换; (4) 实验室检测误差。这些问题的存在使血清学试验并不能百分之百地检出被病毒污染的血液, 而核酸检测技术(nucleic acid testing, NAT)灵敏度和特异性均显著的高于免疫学方法, 可检出标本中极微量的核酸, 在病毒感染后数天即能检出, 可大大缩短“窗口期”。研究表明, 混合血样 NAT 检测可将 HBV、HCV 和 HIV 感染的平均“窗口期”缩短 9 天(缩短“窗口期”20%), 59 天(82%)和 11 天(50%)^[7]。如果将核酸检测技术用于献血员的筛查中, 可将献血员传播 HBV、HCV 和 HIV 病毒性疾病的概率分别降低 42%、72%和 50%^[8]。

目前国内主要用于血源筛查的试剂都为进口产品, 试剂及配套仪器价格昂贵, 只有少数的大型血液中心和血制品企业在

作者简介: 陈泽惠(1971-), 男, 主管检验师, 主要研究方向: 输血医学, 电话: 0712-4322905, E-mail: chenzechui20070105@163.com

(收稿日期: 2013-04-08 接受日期: 2013-04-30)

试用,研发国产化的血源性病毒筛查系统势在必行。本研究的目的在于开发出低成本、高灵敏度和特异性,并能同时实现 HBV、HCV 和 HIV 多重检测的主要血源性传播病毒核酸筛查系统。通过大量测试,确立核酸检测的判断标准,为我国血站系统应用核酸检测技术作血源筛查的决策提供科学的数据及优良的试剂,为临床血液及血制品安全提供保障。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

主要仪器为 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪,达安公司核酸自动提取系统;RNasin,dNTPs 购自 Promega 公司;SuperScript III Platinum One-step Quantitative RT-PCR 购自 Invitrogen 公司;mMLV,热启动核酸提取试剂盒和 Taq 酶由中山大学达安基因股份有限公司提供。

1.2 国家标准品与临床考核标本

国家标准品 I:“中检所乙型肝炎病毒(HBV)核酸定量标准品”,组成为 HBV DNA 阴性参考品 8 份;HBV DNA 阳性参考品 9 份;HBV DNA 定量及线性灵敏度参考品 7 份。

国家标准品 II:“第二代 HCV RNA 国家标准品”,组成为阴性参考品 10 份;阳性参考品 10 份;最低检出量定量标准品 1 份。

国家标准品 III:“HIV 核酸国家参考品”,组成为 HIV RNA 特异性参考品 8 份;HIV RNA 阳性参考品 8 份;HIV RNA 线性参考品 4 份;HIV RNA 灵敏度参考品 6 份。

临床考核标本:来源于血液中心等单位的标本共 1000 例。

1.3 引物与探针

采用引物设计软件 Primer Express 3.0,针对 HBV、HCV、HIV 的保守区进行引物探针设计,并由中山大学达安基因股份有限公司合成。

1.4 核酸提取

使用达安公司核酸自动提取系统及相配套的核酸提取试剂进行标本核酸提取。该系统可以完成自动装卸枪头、转移样品、试剂、试剂烘干、成品转移等一系列提取核酸工序的自动化操作。该系统的全自动功能避免潜在的交叉污染,既提高了可靠性,又节省了繁多的分离仪器。同时性能优越的移液器装置,确保了样本的精确性和一致性。

1.5 灵敏度参考品制备

以中国药品生物制品检定所提供的 HBV、HCV、HIV 国家参考品的灵敏度参考品或最低检出量定量标准品为基准,用阴性血液行倍比稀释。HBV 参考品稀释成 100、50、20 和 10 IU/ml 四种浓度。HCV 稀释后的浓度分别为 500、250、100、50 IU/ml。HIV 稀释后的浓度分别为 250、100、50、20 IU/ml。

1.6 血源性乙型肝炎、丙型肝炎和艾滋病病毒核酸筛查系统的建立

通过 Mg^{2+} 浓度、酶用量、dNTPs 量、引物和探针量筛选优化,确定最佳实时荧光定量 PCR 的反应条件。

1.6.1 国产化的一步法 RT-PCR 技术平台的建立 通过对离子浓度、离子组成成分等进行优化,筛选出一步法 RT-PCR 的 Buffer,结合自产的热启动 Taq 酶及耐高温逆转录酶 mMLV,组成一步法 RT-PCR 体系。通过与 Invitrogen 公司的 Super-

Script III Platinum One-step Quantitative RT-PCR 试剂进行对比,确定最佳国产化一步法 RT-PCR 技术平台。检测步骤为:使用浓度梯度为 $1E7-1E3IU/ml$ 的 RNA 作为扩增模板,分别加入到达安的一步法荧光 RT-PCR 体系和 Invitrogen 公司的 SuperScript III Platinum One-step Quantitative RT-PCR 试剂。在 ABI 7500 上进行实时荧光 PCR 反应。

1.6.2 标准曲线建立 标准品为国家参考品标定的阳性血清,经过倍比稀释、核酸提取、实时荧光 PCR 反应后,利用仪器自带软件建立标准曲线。

1.6.3 特异性检测 以 HBV、HCV、HIV 国家参考品为阳性参考品,以确认试验阴性样本作为阴性参考品,使用血源性传播病毒的核酸筛查系统进行检测。特异性试验以常见病毒为样本,提取核酸后,使用血源性传播病毒的核酸筛查系统进行检测。HBV 选用:人类免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1),丙型肝炎病毒(HCV),丁型肝炎病毒(HDV),戊型肝炎病毒(HEV),EB 病毒(EBV),人巨细胞病毒(HCMV),梅毒螺旋体(TP),单纯疱疹病毒 2 型(HSV-2);HCV 选用:甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒(HBV)、HIV 亚型 A、HIV 亚型 B、HIV 亚型 C、HIV 亚型 D、HIV2 型、腺病毒(ADV)、巨细胞病毒(CMV);HIV 选用:乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、丙型肝炎病毒(HCV)、巨细胞病毒(CMV)、EB 病毒(EBV)。

1.6.4 灵敏度试验 用质检合格的三批试剂对灵敏度参考品进行检测,以此确定血源性乙型肝炎、丙型肝炎和艾滋病病毒核酸筛查系统的灵敏度。

1.6.5 重复性试验 利用该方法对 HBV、HCV、HIV 的高中低浓度样本分别重复检测 8 次,统计分析 CT 值的 CV 值。

2 结果

2.1 实时荧光定量 PCR 反应条件的优化

经过筛选比较,PCR 反应液中最佳引物浓度确定为 10pmol,探针确定为 5pmol;HBV 体系中酶的最佳用量确定为:3U Taq 酶,100U mMLV;20U RNasin;10 mmol dNTPs;10 μL $5\times$ RT-PCR 反应缓冲液;加入模板量为 10 μL ,反应总体积 50 μL 。

反应条件:50℃ 15min,95℃ 15min;然后 94℃ 15sec,55℃ 45sec,45 个循环。

2.2 国产化的一步法 RT-PCR 技术平台建立

达安的一步法荧光 RT-PCR 体系与 Invitrogen 公司的 SuperScript III Platinum One-step Quantitative RT-PCR 试剂进行对比,使用浓度梯度为 $1E7-1E3IU/ml$ 的 RNA 作为扩增模板。结果如图 1 和图 2 示,CT 值的比较见表 1。可见在各个浓度下,达安的一步法荧光 RT-PCR 体系的 CT 值都比 Invitrogen 公司的显著提前,说明达安的一步法荧光 RT-PCR 技术平台具有优良的逆转录效率及扩增效率。

2.3 标准曲线的建立

以 HBV、HCV、HIV 国家参考品标定的阳性血清(108IU/ml)作为标准品,以此为起始浓度,依次 10 倍稀释:1E8 IU/ml-1E2 IU/ml,利用核酸自动提取仪进行病毒核酸提取后,进行实时荧光定量 PCR 检测,根据背景信号情况,在反应结束后调整其基线和阈值,利用仪器自带软件自动制作标准曲线。

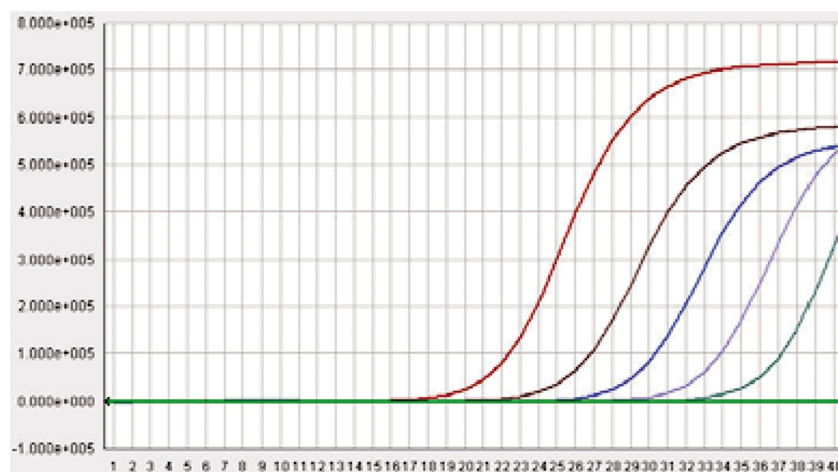


图1 达安的一步法荧光定量 PCR 扩增 RNA 梯度 1E7 IU/mL-1E3 IU/mL 的上机图

Fig. 1 Results of the amplification of RNA gradients by DaAn One step real-time RT-PCR

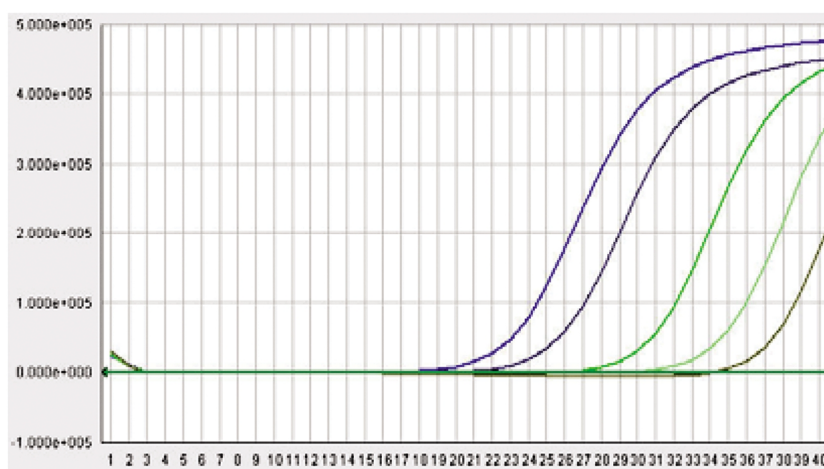


图2 Invitrogen 的 SuperScript III Platinum One-step Quantitative RT-PCR 扩增 RNA 梯度 1E7IU/mL-1E3 IU/mL 的上机图

Fig. 2 Results of the amplification of RNA gradients by Invitrogen SuperScript III Platinum One-step Quantitative RT-PCR

表 1 两种一步法体系比较结果

Table 1 Comparison result of RSV by Two one-step RT-PCR System

Concentration(IU/ml)	< 0.1	0.1~0.3	0.4~0.6	0.7~0.9	> 1.0
DaAn(CT)	14.4	19.6	24.3	19.4	30.9
Invitrogen(CT)	15.8	19.1	26.2	28.8	34.1

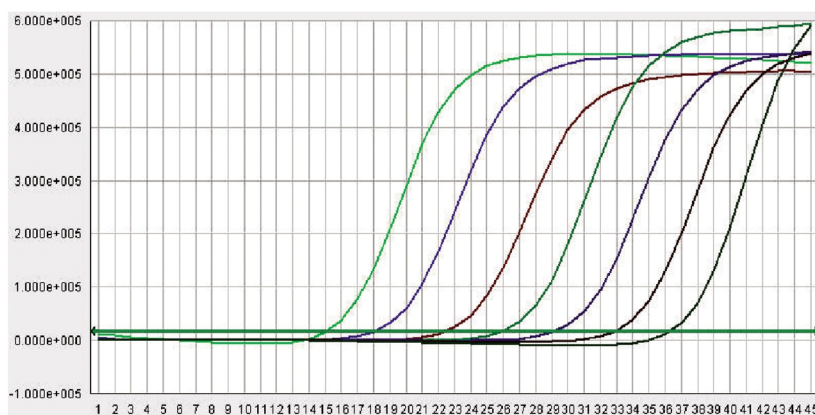
图3 实时荧光定量 PCR 扩增 HBV 梯度(1.0× 10⁸ IU/mL-0× 10² IU/mL)的上机图

Fig.3 Results of the amplification of RNA gradients by fluorescent quantitation PCR

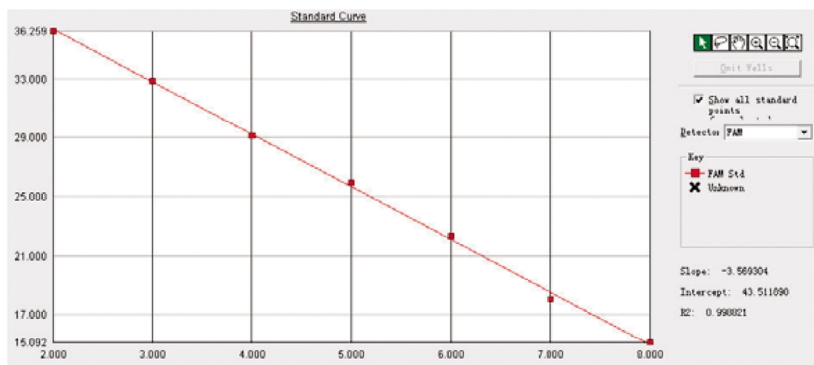


图 4 实时荧光定量 PCR 扩增 HBV 的标准曲线
Fig.4 Standard curve of amplification of HBV by real-time RT-PCR

如图 3 和图 4 示,以 HBV 检测结果为例,起始模板浓度和 CT 0.999。值间呈现良好的线性关系,标准曲线斜率为 -3.56,相关系数为

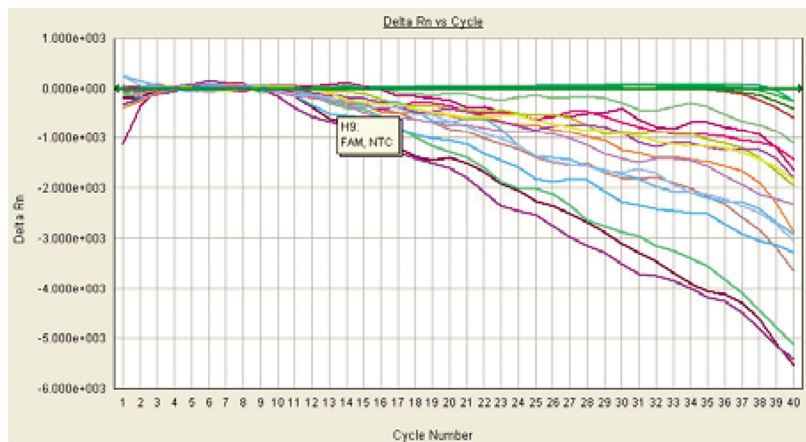


图 5 实时荧光定量 PCR 特异性实验结果
Fig.5 Results of the specific identification of blood-borne HBV, HCV and HIV nucleic acid screening system

2.4 特异性

其他病毒经血源性乙型肝炎、丙型肝炎和艾滋病病毒核酸筛查系统检测,结果均为阴性,提示该系统无干扰,各体系之间无交叉反应,其特异性为 100%,见图 5。

2.5 灵敏度

2.5.1 HBV 的灵敏度 HBV 稀释后的浓度分别为 100、50、20、10 IU/ml。使用血源性乙型肝炎、丙型肝炎和艾滋病病毒核酸筛查系统的检测结果显示,可检出的 HBV 样本最低浓度为 20 IU/mL,表明该体系检测 HBV 的灵敏度较高,见表 2。

表 2 HBV 灵敏度检测结果

Table 2 Sensitivity of HBV detected by real-time PCR

Concentration of the samples	Number of positive samples/Number of total samples	Positive rate (%)
100IU/ml	24/24	100
50IU/ml	24/24	100
20IU/ml	24/24	100
10IU/ml	15/24	62.5

表 3 HCV 灵敏度检测结果

Table 3 Sensitivity of HCV detected by real-time PCR

Concentration of the samples	Number of positive samples/Number of total samples	Positive rate (%)
500IU/ml	24/24	100
250IU/ml	24/24	100
100IU/ml	24/24	100
50IU/ml	18/24	75

2.5.2 HCV 的灵敏度 HCV 稀释后的浓度分别为 500、250、100、50IU/ml。使用血源性乙型肝炎、丙型肝炎和艾滋病病毒核酸筛查系统检测的结果显示,能检出的最低 HCV 样本浓度为 100 IU/mL,表明该体系检测 HCV 的灵敏度较高,见表 3。

2.5.3 HIV 的灵敏度 HBV 稀释后的浓度分别为 250、100、50、20IU/ml。使用血源性乙型肝炎、丙型肝炎和艾滋病病毒核酸筛查系统检测的结果显示,能检出的最低 HIV 样本浓度为 50 IU/mL,表明该体系检测 HIV 的灵敏度较高,见表 4。

表 4 HIV 灵敏度检测结果

Table 4 Sensitivity of HIV detected by real-time PCR

Concentration of the samples	Number of positive samples/Number of total samples	Positive rate (%)
250IU/ml	24/24	100
100IU/ml	24/24	100
50IU/ml	24/24	100
20IU/ml	19/24	79

表 5 重复性实验 CT 值的统计分析

Table 5 Statistical analysis of the CT values of the repetitiveness tests

Concentration of the samples	CT value		
	High	Medium	Low
1	9.346	17.086	24.729
2	9.200	17.035	24.640
3	9.064	16.323	24.198
4	9.332	17.101	23.325
5	9.229	17.161	24.266
6	9.447	15.208	23.108
7	9.776	16.402	25.230
8	9.206	15.572	24.552
Mean value	9.325	16.486	24.256
STDEV	0.216	0.756	0.716962
CV (%)	2.3	4.6	3.0

2.6 重复性

对高、中、低浓度梯度样本的 8 次重复检测结果显示,扩增曲线 CT 值的 CV 均小于 5%,分别为 2.3%、4.6%和 3.0%,说明该系统重复性好,见图 1 和表 5。

2.7 献血员筛查结果

按照随机、双盲、对照的试验设计原则,收集献血员原料血浆样本 101387 例(按 $1 \times 12/\text{pooling}$ 混浆,共获得初级混合样本 8450 例)。检出疑似阳性初级混合样本共 27 例,阴性初级混合样本 8423 例。与血清学试验结果比较,共有 17 例单样本 HBV 检测结果不符,其中,血清学阴性而单样本检测疑似阳性的样本 1 例,血清学阳性而单样本核酸检测为阴性的样本 16 例,而复核检测结果与单样本血筛核酸结果一致。经统计分析,血源性乙型肝炎、丙型肝炎和艾滋病病毒核酸筛查系统的特异度、准确度均为 100%。

3 讨论

输血/血制品是抢救生命和治疗疾病的重要措施,但是使用不慎却可以引起血传播性疾病的发生。近年来,因输血导致的输血后肝炎的诉讼不断增加,血液安全再次受到全社会的关注,输血/血制品相关传染病的预防和控制已经成为全社会关

注的焦点。发展高灵敏度和高特异性的检测方法,筛除隐形感染输血者,成为提高血液安全性的最重要的措施^[9]。核酸检测技术(NAT)因其灵敏度高,准确性强,重复性好,而且是直接检测病毒本身,受到各国血源筛查工作者的重视^[10],甚至在德国等一些发达国家被强制性应用于所有献血员的 HBV、HCV 和 HIV 筛查^[11]。Assal 等对诺华公司的 Procleix Tigris 和诺氏公司的 cobas s 201 两种著名 NAT 筛查系统进行了应用研究,结果显示 Tigris 单样本 NAT 和 cobas s 201 多样本混合微池 NAT 对 HCV RNA、HIV RNA 和 HBV DNA 稀释标准品的检测灵敏度分别为 8.7IU/mL 和 21.9IU/mL,6.7IU/mL 和 14.8IU/mL 及 0.71IU/mL 和 11.6IU/mL,且它们的检测特异性均达到 100%^[12]。我国经济发达地区从本世纪初也逐渐重视 NAT 在血液筛查中的应用^[13-15]。我国目前还没有成熟的用于血源筛查的病毒核酸检测试剂盒,而进口试剂价格极为昂贵,严重影响 NAT 在我国血源筛查中的推广应用。研究和开发完全国产化的血源筛查系统可以大大降低检测成本,有利于病毒核酸检测在全国范围内单采血浆站、血站和血制品企业的全面推广,提高血液制品和临床输血的使用安全性。

本研究建立的血源性乙型肝炎、丙型肝炎和艾滋病病毒核酸筛查系统特异性评价结果表明,该系统与其它病原体检测体

系无交叉反应,具有较好的特异性。其对 HBV、HCV 和 HIV 的最低出浓度分别为 20IU/ml、100IU/ml 和 50IU/mL,其中 HCV 和 HBV 的检测灵敏度已接近 cobas s 201 多样本混合微池 NAT 筛查系统^[12],而 HIV 检测灵敏度尚低于 cobas s 201 系统;对 HCV、HBV 和 HIV 的检测灵敏度均高于国内多数研究结果^[16,17,18]。虽然该系统对 HCV 检测的灵敏度低于王文博等建立方法^[19],但同时检测血液 HCV、HBV 和 HIV 的病毒核酸筛查系统在国内还不多见。该系统检测重复性好,三种病原体检测 CT 值的 CV 均小于 5%;将其应用于 101387 万例的献血员血液样品中,其特异度、准确度均达到 100%,从血清免疫学检测阴性的血样中成功检出 1 例 HBV 反应性样本,同时对 16 例 HBV 免疫学检测假阳性样本进行了排除。

总之,该血源性 HBV、HCV 和 HIV 病毒核酸筛查系统具有自动化程度高、灵敏度较高、特异性好、成本低廉、操作简便的优点。如将其实现产业化,以低成本、高效益的优势迅速占领市场,在全国推广使用,不但能够保障血液质量,确保安全输血,减少因输血传播的疾病带来的社会负担,同时也减轻了对血源筛查进口试剂的依赖,具有积极深远的社会效益。

参考文献(References)

- [1] Tosti ME, Solinas S, Prati S, et al. An estimate of the current risk of transmitting blood-borne infections through blood transfusion in Italy [J]. *Br J Haematol*, 2002, 117: 215-219
- [2] Zanetti A, Romano L, Zappa A, et al. Changing patterns of hepatitis B infection in Italy and NAT testing for improving the safety of blood supply[J]. *J Clin Virol*, 2006, 36: S51-55
- [3] Liang XF, BI SL, Yang WZ, et al. Epidemiological serosurvey of Hepatitis B in China-Declining HBV prevalence due to Hepatitis B vaccination[J]. *Vaccine*, 2009, 27(47): 6550-6557
- [4] 王东生,姜艳芳,牛俊奇. 丙型肝炎的免疫学研究进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2010, 4: 378-380
Wang Dong-sheng, Jiang Yan-fang, Niu Jun-qi. Progress of immunology research on hepatitis C[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2010, 4: 378-380
- [5] Jorgensen PA, Neuwald PD. Standardized hepatitis C virus RNA panels for nucleic acid testing assays[J]. *Journal of Clinical Virology*, 2001, 20: 35-40
- [6] 马现君,陈元峰,楚中华,等. 无偿献血者不同人群抗-HCV 流行情况调查研究[J]. *临床血液学杂志(输血与检验版)*, 2008, 21: 195-197
Ma Xian-jun, Chen Yuan-feng, Chu Zhong-hua, et al. Investigation of epidemic status of anti-HCV in various populations [J]. *Journal of Clinical Hematology (Blood Transfusion and Laboratory Medicine Edition)*, 2008, 21: 195-197
- [7] Michael PB. Should HBV DNA NAT replace HBsAg and/or anti-HBc screening of blood donors[J]. *Transfusion Clinique et Biologique*, 2004, 11: 26-32
- [8] Stramer SL. US NAT yield: where are we after 2 years[J]. *Transfusion Clinique et Biologique*, 2003, 10: 10-18
- [9] Yuen MF, Wong DK, Lee CW, et al. Transmissibility of hepatitis B virus (HBV) infection through blood transfusion from blood donors with occult HBV infection [J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2011, 52(5): 624-632
- [10] Vermeulen M, Lelie N, Sykes W, et al. Impact of individual-donation nucleic acid testing on risk of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and hepatitis C virus transmission by blood transfusion in South Africa[J]. *Transfusion*, 2009, 49: 1115-1125
- [11] Nü bling CM, Heiden M, Chudy M, et al. Experience of mandatory nucleic acid test (NAT) screening across all blood organizations in Germany: NAT yield versus breakthrough transmissions[J]. *Transfusion*, 2009, 49: 1850-1858
- [12] Assal A, Barlet V, Deschaseaux M, et al. Comparison of the analytical and operational performance of two viral nucleic acid test blood screening systems: Procleix Tigris and cobas s 201[J]. *Transfusion*, 2009, 49: 289-300
- [13] 吴玉清,杨忠思,赵林等. 青岛地区无偿献血者血液病毒核酸检测的研究[J]. *中国输血杂志*, 2008, 11: 834-836
Wu Yu-qing, Yang Zhong-si, Zhao Lin, et al. Study of nuclei-acid-test (NAT) among volunteer blood donors from Qingdao area[J]. *Chinese Journal of Blood Transfusion*, 2008, 11: 834-836
- [14] 刘德春,孙波,徐群,等. 核酸检测技术与酶联免疫检测技术在血液筛查中的初步应用比较[J]. *中国输血杂志*, 2007, 1: 43-45
Liu De-chun, Sun Bo, Xu Qun, et al. Comparison of NAT and ELISA application in blood screening[J]. *Chinese Journal of Blood Transfusion*, 2007, 1: 43-45
- [15] 任芙蓉,王憬惺,赵海燕,等. 我国 5 城市合格献血者血液 HIV 及 HCV 残余风险研究[J]. *中国输血杂志*, 2007, 6: 469-475
Ren Fu-rong, Wang Jing-xing, Zhao Hai-yan, et al. Nucleic acid testing of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus among blood donors from five cities of China: estimation of residual transfusion risk[J]. *Chinese Journal of Blood Transfusion*, 2007, 6: 469-475
- [16] 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, 5: 309-312
Bai Jian-shi, Wang Wei, Zhu Wen-si. Establishment of the method of nucleic acids amplification test for HCV/HZV-1 of pooled source plasma[J]. *Chinese Journal of Blood Transfusion*, 2003, 5: 309-312
- [17] 王迅,贾尧,郑岚,等. 环介导的等温扩增技术对 HBV、HCV 和 HIV 核酸检测的研究[J]. *中国输血杂志*, 2008, 11: 829-833
Wang Xun, Jia Yao, Zheng Lan, et al. Nucleic acid testing based on loop-mediated isothermal amplification technique for the detection of hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus [J]. *Chinese Journal of Blood Transfusion*, 2008, 11: 829-833
- [18] 叶贤林,孙淑君,容莹,等. 国产全自动血液病毒核酸筛查系统的建立和应用研究[J]. *中国感染控制杂志*, 2010, 5: 327-330
Ye Xian-lin, Sun Shu-jun, Rong Ying, et al. Establishment and application of domestic entirely automatic system of nucleic acid amplification testing in blood screening[J]. *Chinese Journal of Infection Control*, 2010, 5: 327-330
- [19] 王文博,许刚,查占山,等. 献血者 HCV RNA 实时荧光定量 PCR 方法的建立[J]. *中国输血杂志*, 2012, 25(4): 351-355
Wang Wen-bo, Xu Gang, Zha Zhan-shan, et al. Establishment of rapid FQ-PCR screening method for HCV RNA in blood donors [J]. *Chinese Journal of Blood Transfusion*, 2012, 25(4): 351-355