

HBsAg 阴性献血者人群 HBV 感染的检测和输血残余风险分析*

黄建国^{1,2}, 谢秀华², 欧阳玲^{2△}, 黄守民², 杨玉发², 黄呈辉² (1. 广东省龙川县妇幼保健院检验科 517300; 2. 广东省深圳市宝安区中心血站 518101)

【摘要】 目的 了解献血人群乙型肝炎病毒(HBV)感染状况和血液经酶免疫法(EIA)筛查乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)后经血传播 HBV 感染的残余风险。**方法** 采用国产和进口两种 EIA 试剂对献血者血液进行 HBsAg 筛查, 罗氏诊断 COBAS Ampliscreens NAT 血筛系统检测 EIA 检测合格标本中 HBV DNA, 对 HBV DNA 阳性标本进行半套式 PCR 检测, 并对 PCR 扩增产物进行测序和病毒基因亚型分析。**结果** 共筛查 1998~2008 年的献血者 232 305 例, 发现 HBsAg 阳性 2 999 例, 阳性率为 1.3%; 对 2002~2007 年 EIA 检测合格的 113 639 例献血者血液标本进行 NAT 检测, 检测出 13 份 HBV DNA 阳性、HBsAg 阴性的献血者血液, HBV 残余风险高达 1.1/10 000。**结论** EIA 筛查后血液安全性有了很好的保障, 经血传播 HBV 残余风险依然处于较高的水平, NAT 应用对提高血液安全, 降低输血传播 HBV 残余风险意义重大。

【关键词】 献血者; 乙型肝炎病毒; 核酸扩增检测; 残余风险

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.07.003 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)07-0774-03

Detection of HBV DNA in voluntary blood donors with HBsAg negative and analysis on blood transfusion residual risk*

HUANG Jian-guo^{1,2}, XIE Xiu-hua², OU Yang-ling^{2△}, HUANG Shou-min², YANG Yu-fa², HUANG Cheng-hui² (1. Department of Laboratory, Longchuan County Maternal and Child Health Care Center, Longchuan, Guangdong 517300, China; 2. Shenzhen Baoan Blood Center, Shenzhen, Guangdong 518101, China)

【Abstract】 Objective To estimate the residual risk of transfusion-transmitted HBV infection in blood donations after HBsAg screening by enzyme immunoassay(EIA). **Methods** The samples of blood donors were tested for HBsAg antibody by enzyme EIA. The samples of EIA-negative reaction for HBsAg were tested HBV DNA by MP-nucleic acids test (NAT) using COBAS AmpliScreens HBV test reagents. The samples of HBV NAT positive were further detected for HBV DNA from plasma by semi-nested PCR method. The partial S genome of HBV was sequenced and genotyped. **Results** The HBsAg positive was tested in 2999 of 232305 blood donations during the period 1998~2008. The positive rate was 1.3%. Of 113639 serologically negative blood donations, 13 were positive for HBV DNA, but negative for HBsAg. The residual risk of transfusion-transmitted HBV infection was 1.1/10000. **Conclusion** There exists high residual risk of transfusion-transmitted HBV infection in blood donations. NAT screening can further enhance the blood safety and decrease the risk of HBV infection by transfusion.

【Key words】 blood donors; HBV; NAT; residual risk

乙肝病毒(HBV)感染是危害全球性人类健康问题之一, 据估计全球大约有 3.5 亿 HBV 感染者, 我国是 HBV 感染的高流行区, 约 9.7% 的人群为 HBV 携带者^[1]。乙肝表面抗原(HBsAg)是检测 HBV 感染最常用的指标, 也是大多数发展中国家用于血液及制品 HBV 感染筛查的惟一指标。通过采用酶免疫法(EIA)对献血者血液进行 HBsAg 检测, 输血后感染 HBV 的风险已经大大降低, 但是由于 HBV 感染的窗口期和隐匿性 HBV 感染的存在, 输血传播 HBV 潜在的风险仍然存在。为了解南方某城市献血者人群 HBV 感染情况, 以及血液经病毒血清学筛查后的输血传播 HBV 残余风险, 在 EIA 检测 HBsAg 的基础上, 采用核酸检测技术(NAT)对合格的献血者血液再进行 HBV DNA 检测^[2], 现将研究结果报道如下。

1 对象与方法

1.1 筛查对象 1998 年 1 月至 2008 年 12 月在南方某城市中

心血站献血的所有志愿无偿献血者 232 305 例, 其中男 132 466 例, 女 99 839 例, 年龄范围 18~55 岁, 平均 25.7 岁。NAT 检测用样本采用无菌抗凝管留取全血 5 mL, 于 6 h 之内离心分离出血浆, 并冻存在 -20℃ 冰箱。

1.2 试剂与仪器 HBsAg 检测 EIA 试剂分别来自厦门新创、美国雅培、Ortho 公司和法国生物梅里埃公司, 试剂盒均有中国生物制品研究所批批检及防伪标签。抗-HBc 检测试剂为美国 Ortho 公司产品; 抗-HBs 检测试剂为厦门新创公司产品。NAT 检测试剂和病毒核酸的提取试剂为瑞士罗氏诊断公司产品。

1.3 血清学检测 所有献血者血液标本按照国家《献血者健康检查要求》(GB 184672-2001)进行常规的抗-HIV 1/2、HBsAg、抗-HCV、抗-TP 和 ALT 项目的初检和复检。其中 HBsAg EIA 筛查试剂初检为国产试剂厦门新创, 复检为进口美国

* 基金项目: 深圳市科技计划项目资助(201003387); 深圳市宝安区科技计划项目资助(2001B061)。 △ 通讯作者, E-mail: oylsz@126.com。

雅培或 Ortho 公司试剂,所有 EIA 检测均采用瑞士 Hamilton Microlab AT2 全自动样本加样系统和 FAME 全自动酶免分析系统进行自动检测,任何一种试剂检测呈阳性反应报告为 HBsAg 阳性。

1.4 HBV DNA 的 NAT 检测 采用混合样本 NAT(MP-NAT)方法检测 EIA 阴性的献血者血液标本^[2]。将 EIA 检测 HBsAg、抗-HCV、抗-HIV 1/2 阴性和 ALT 正常的血浆标本,按 48 份×50 μL 汇集于 2 个离心管中(1 份备用),23 600 g,4 ℃离心 1 h,吸去上清液,留 200 μL 血浆,提取病毒核酸,具体按说明书操作。用 COBAS AmpliScreens HBV Test 试剂检测 HBV DNA,由配套 Amplicor 分析仪自动完成 RT-PCR 扩增、变性、探针杂交、显色、检测和结果判断。MP-NAT 检测呈阳性反应时,将其 2 个 24 份混合标本分别检测,24 份混合标本检测呈阳性反应时,将这 24 份标本按 6×4 排列交叉混合汇集成 10 组再进行检测,根据交叉组合判断具体的阳性反应标本,最后再对阳性反应标本进行单人份 NAT(ID-NAT)检测。

1.5 HBV DNA 检测及 S 基因序列测定 按文献[3]合成引物,半套式聚合酶链反应(PCR)扩增 HBV S 基因,PCR 产物经纯化后直接进行双向核苷酸序列测定,对所测定的基因进行基因分型。同时采用 TagMan 荧光定量 PCR 检测 HBV DNA 水平(送南方医科大学附属深圳宝安医院完成)。

2 结 果

2.1 EIA 检测献血者中 HBsAg 的结果 从 1998 年 1 月至 2008 年 12 月 11 年来,共筛查 232 305 份献血者血液标本,筛查出 HBsAg 阳性 2 999 份,总的阳性率为 1.3%(波动在 0.81%~3.26%)。在 1998 年,HBsAg 筛查的阳性最高,达 3.

26%,以后逐年下降,近几年献血者 HBsAg 筛查的阳性均小于 1%,结果见表 1。

表 1 献血人群中 HBV 感染的 EIA 和 NAT 检测结果

年份	EIA 检测 HBsAg			NAT 检测 HBV DNA		
	标本数	阳性数	阳性比例(%)	标本数	阳性数	阳性比例(%)
1998	20 079	654	3.26	/	/	/
1999	23 789	482	2.03	/	/	/
2000	19 100	313	1.64	/	/	/
2001	17 256	179	1.04	/	/	/
2002	18 469	179	0.97	15 352	3	0.020
2003	20 040	195	0.97	14 705	3	0.020
2004	21 545	188	0.87	20 962	2	0.010
2005	22 111	208	0.94	21 124	2	0.009
2006	22 061	189	0.86	21 416	2	0.009
2007	24 428	199	0.81	20 083	1	0.005
2008	23 427	213	0.91	/	/	/
合计	232 305	2 999	1.30	113 639*	13	0.011

注:/表示未检测;* 2002~2007 数据。

2.2 合格献血者中 HCV RNA 的检测结果 对 2002~2007 年 EIA 检测合格的 113 639 份献血者血液标本进行 NAT 检测,结果检测出 13 份 HBV DNA 阳性、HBsAg 阴性的献血者血液,HBV 残余风险高达 1.1/10 000。这 13 份献血者的标本的 NAT 检测结果见表 2。

表 2 EIA HBsAg 阴性、NAT HBV DNA 阳性献血者标本的检测情况

编号	采样时间	HBsAg(EIA)			抗-HBs	抗-HBc	NAT(反应/检测次数)		基因型	病毒定量 (copy/mL)
		新创	Ortho	Abbott			单份样本	混合样本		
D1	2002-06-15	—	—	—	—	+	HBV+(2/2)	HBV+(4/4)	B	<10 ³
D2	2002-10-25	—	—	—	—	ND	HBV+(2/2)	HBV+(4/4)	B	/
D3	2002-11-13	—	—	—	—	+	HBV+(2/2)	HBV+(4/4)	C	<10 ³
D4	2003-04-11	—	—	—	—	+	HBV+(3/3)	HBV+(4/4)	D	<10 ³
D5	2003-06-29	—	—	—	—	+	HBV+(2/2)	HBV+(4/4)	C	<10 ³
D6	2004-02-3	—	—	—	—	+	HBV+(3/3)	HBV+(4/4)	C	<10 ³
D7	2003-12-14	—	—	—	—	+	HBV+(2/2)	HBV+(4/4)	NC	<10 ³
D8	2004-02-29	—	—	—	—	+	HBV+(2/2)	HBV+(4/4)	B	<10 ³
D9	2005-09-28	—	—	—	—	+	HBV+(2/2)	HBV+(4/4)	B	<10 ³
D10	2005-12-11	—	—	—	—	+	HBV+(2/2)	HBV+(4/4)	D	/
D11	2006-06-14	—	—	—	/	/	HBV+(2/2)	HBV+(4/4)	/	/
D12	2006-07-13	—	—	—	/	/	HBV+(2/2)	HBV+(4/4)	/	/
D13	2007-09-5	—	—	—	/	/	HBV+(2/2)	HBV+(4/4)	/	/

注: +表示阳性; —表示阴性; /表示未检测; NC 表示无结果。

2.3 HBsAg 阴性/HBV DNA 阳性献血者病毒载量和基因分型 检测 13 例 HBV NAT 检测阳性的标本,10 例经半套式 PCR 扩增 HBV S 区部分基因,9 例扩增出 S 基因片段,1 例反复检测扩增出片段;序列分析 B 亚型 4 例,C 亚型 3 例,D 亚型 2 例。1b 基因型。8 例经荧光定量 PCR 检测 HBV DNA 水平

数均小于 10³ copy/mL(见表 2)。

3 讨 论

在我国 HBV 感染普遍存在,人群中有近 50% 感染过 HBV,HBsAg 阳性的携带者达 9.7%。对献血者的血液进行 HBsAg 筛查是预防 HBV 经血传播的重要措施。目前,第 3、4

代 HBsAg EIA 试剂灵敏度可达 0.05~0.5 ng/mL,采用 EIA 对献血者进行 HBsAg 筛查后,输血传播 HBV 得到明显控制,但输注 HBsAg 阴性血液后,仍有输血后乙型肝炎(PTHB)的发生^[4]。据报道,输注 HBsAg 阴性血液或成分血液后,PTHB 的发生率为 0.3%~1.7%,占输血后肝炎病例总数的 7%~17%。目前认为造成 HBsAg 阴性血液传播 HBV 感染的主要原因包括:(1)HBV“窗口期”血液感染;(2)隐匿性 HBV 感染;(3)S 基因突变 HBsAg 检测呈阴性反应等。本研究采用国产及进口两种 EIA 试剂的筛查模式对本地区献血者血液进行检测,在一定程度上保证了血液的安全,但该模式下本地区输血感染 HBV 的风险仍然存在,主要表现为 HBV 低水平复制的隐匿性感染情况。本研究共筛查出 13 例 HBsAg 阴性、HBV DNA 阳性的献血者血液,从定量结果分析均为 HBV 隐匿性感染,表明 HBV 隐匿性感染可能是输血传播 HBV 风险的主要原因。

NAT 自 20 世纪 90 年代末开始,逐步应用于献血者血液病毒感染筛查,研究显示可使 HBV 检测的窗口期缩短为 34 d,能够降低输血传播病毒的残余危险度 50%以上^[5]。目前,欧美等一些发达国家和地区已经将 NAT 常规用于血液的筛查,在降低输血传播病毒风险方面取得良好的效果^[6]。澳大利亚报道 EIA 筛查后 HBV 残余风险为 1/483 000^[7],德国 1/60 000^[8];本次的 HBV DNA NAT 筛查结果显示,HBV 的残余风险高达 1.1/10 000,明显高于这些欧美等 HBV 非流行国家的研究报道。我国台湾地区报道采用 6 份混合标本 HBV DNA NAT 筛查残余风险为 0.11%^[9],明显高于本次采用 48 份混合样本 HBV DNA NAT 筛查结果。本研究结果显示 HBsAg 阴性、HBV DNA 阳性的 HBV 感染献血者 HBV 处于低水平复制状态,HBV DNA 载量多在 10³ 以下,采用 48 例混合 NAT 检测,可能造成部分漏检。目前罗氏 TagMan 血筛技术已经采用 6 份混合标本检测,以减少 NAT 检测假阴性的发生^[9]。

本地区输血传播 HBV 风险比较高,控制输血传播 HBV 任重而道远。NAT 检测目前正在我国 15 个省份推广使用,考虑到本地区献血者的特点和 HBV 流行情况,增加 NAT 筛查血液对减少输血传播病毒感染的风险意义重大。

参考文献

[1] 庄辉. 加强对新生儿以外人群乙型肝炎疫苗免疫[J]. 中

(上接第 773 页)

al. The clinicopathological and prognostic relevance of pyruvate kinase M2 and pAkt expression in breast cancer [J]. Anticancer Res, 2010, 30(5):1689-1694.

[7] Blay JY, Le Cesne A, Alberti L, et al. Targeted cancer therapies[J]. Bull Cancer, 2005, 92(2):8-13.

[8] Blum R, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, et al. Ras inhibition in glioblastoma down-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha, causing glycolysis shutdown and cell death[J]. Cancer Res, 2005, 65(3):999-1006.

华流行病学杂志, 2004, 25(5):376.

[2] 黄呈辉, 黄建国, 欧阳玲. 应用核酸扩增技术对血液中 HBV、HCV 和 HIV-1 检测[J]. 中国输血杂志, 2005, 18(3):202-204.

[3] 欧阳玲, 黄呈辉. 乙型肝炎核心抗体阳性献血者乙肝病毒 DNA 检测及基因变异分析[J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(20):3103-3106.

[4] 庞启迪, 张明良, 樊少勇. 抗-HBc 阳性 HBsAg 阴性献血者乙型肝炎病毒感染性分析[J]. 中国输血杂志, 2001, 14(3):164-165.

[5] Muller-Breitkreutz K. Results of viral marker screening of unpaid blood donations and probability of window period donations in 1997. EPFA Working Group on Quality Assurance[J]. Vox Sang, 2000, 78(3):149-157.

[6] Stramer SL, Glynn SA, Kleinman SH, et al. Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody negative blood donors by nucleic acids amplification testing[J]. N Engl J Med, 2004, 351(8):760-768.

[7] Seed CR, Cheng A, Ismay AL, et al. Assessing the accuracy of three viral risk models in predicting the outcome of implementing HIV and HCV RNA donor screening in Australia and the implications for future HBV NAT[J]. Transfusion, 2002, 42(10):1365-1372.

[8] Ofergeld R, Faensen D, Ritter S, et al. Human immunodeficiency virus, hepatitis C and hepatitis B infections among blood donors in Germany 2000-2002: risk of virus transmission and the impact of nucleic acid amplification testing [J]. Euro Surveill, 2005, 10(2):8-11.

[9] Li L, Chen PJ, Chen MH, et al. A pilot study for screening blood donors in Taiwan by nucleic acid amplification technology: detecting occult hepatitis B virus infections and closing the serologic window period for hepatitis C virus [J]. Transfusion, 2008, 48(6):1198-1206.

(收稿日期:2010-12-17)

[9] Lee WN, Guo P, Lim S, et al. Metabolic sensitivity of pancreatic tumour cell apoptosis to glycogen phosphorylase inhibitor treatment[J]. Br J Cancer, 2004, 91(12):2094-2100.

[10] Macpherson GR, Figg WD. Small molecule-mediated anti-cancer therapy via hypoxia-inducible factor-1 blockade [J]. Cancer Biol Ther, 2004, 3(6):503-504.

(收稿日期:2010-12-20)