

· 论 著 ·

实时荧光 PCR 检测 HBsAg 阴性、抗 HBc 阳性献血者血液中 HBV DNA 研究

叶贤林¹, 刘晓红², 马 兰¹, 张 红¹, 李 活¹, 曾劲峰¹

(1 深圳市血液中心卫生部临检中心病毒核酸检测联合实验室, 广东 深圳 518035; 2 大连医科大学输血医学系, 辽宁 大连 116027)

[摘要] **目的** 对乙型肝炎表面抗原(HBsAg)阴性、乙型肝炎核心抗体(抗 HBc)阳性的献血者血液进行经输血传播乙型肝炎病毒(HBV)的风险评估, 为完善 HBV 血液筛查模式及确保临床用血安全提供依据。**方法** 对献血者血液常规检测阴性的标本进行 $8 \times 45 \mu\text{L}$ 汇集, 应用实时荧光聚合酶链反应(PCR)进行混样核酸检测 HBV DNA。对血液常规筛查和混样核酸检测合格的标本, 进行随机乙型肝炎血清学 5 项标志物的酶联免疫吸附试验(ELISA)。对获得的 HBsAg 阴性、混样 HBV DNA 阴性、抗 HBc 阳性的标本, 进一步采用单份样本($720 \mu\text{L}$)实时荧光 PCR 法检测并定量分析。**结果** 混样标本共检测 12 552 份, 检出 HBsAg 阴性、HBV DNA 阳性标本 2 份, 阳性率为 0.02%。随机筛查混样核酸检测阴性标本 614 份, 检出抗 HBc 阳性标本 320 份, 对此 320 份标本进行单份核酸检测, 检出阳性标本 1 份, 阳性率为 0.31%。**结论** HBsAg 阴性、抗 HBc 阳性献血者血液存在输血传播 HBV 的风险, 应用核酸扩增技术检测血液 HBV DNA 能大大提高血液安全性。

[关键词] 输血; 献血者; 核酸扩增技术; 实时荧光聚合酶链反应; 肝炎病毒; 乙型; 乙型肝炎核心抗体

[中图分类号] R512.6+2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2009)04-0241-05

Detection of blood HBV DNA in blood donors with HBsAg(-)/anti-HBc(+) by real-time fluorescence PCR

YE Xian-lin¹, LIU Xiao-hong², MA Lan¹, ZHANG Hong¹, LI Huo¹, ZENG Jing-feng¹ (1 Shenzhen Blood Center, Shenzhen 518035, China; 2 Dalian Medical University, Dalian 116027, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the risks of blood-transmitted HBV through blood donors with HBsAg(-)/anti-HBc(+), so as to improve better blood screening mode and ensure blood safety in clinical application.

Methods Blood HBV DNA in serologically screened negative blood samples pooled at $8 \times 45 \mu\text{L}$ size were detected by real-time fluorescence PCR, and PCR negative samples were tested for HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe and anti-HBc by ELISA. All HBsAg(-), HBV DNA(-) and anti-HBc positive samples were detected by real-time fluorescence PCR individually for HBV DNA, HBV DNA positive samples were analysed by quantitative fluorescence PCR. **Results** Among 12 552 sero-negative samples, 2 were detected HBsAg(-)/HBV DNA(+), the positive rate was 0.02%. Among 614 PCR negative samples, 320 were positive anti-HBc, and one of which was positive HBV DNA, the positive rate was 0.31%. **Conclusion** Donors with HBsAg(-)/anti-HBc(+) remain potential risk for HBV transmission, and nucleic acid amplification technique can implement and improve blood safety.

[Key words] blood transfusion; blood donor; nucleic acid amplification technique; real-time fluorescence PCR; hepatitis B virus; anti-HBc

[Chin Infect Control, 2009, 8(4): 241-244, 240]

[收稿日期] 2008-12-23

[基金项目] 深圳市科学计划重大攻关项目(200601001)

[作者简介] 叶贤林(1966-), 男(汉族), 湖北省浠水县人, 教授, 主要从事血液分子生物学检测研究。

[通讯作者] 叶贤林 E-mail: yexianlin90@hotmail.com

随着无偿献血事业的发展和血液筛查检测技术的不断进步,经输血传播乙型肝炎病毒(HBV)感染的发病率已经显著降低,但由于窗口期、病毒变异、病毒重复感染、隐匿性肝炎等因素影响,经输血传播HBV的风险依然存在。我国是乙型肝炎高流行区,有调查数据显示^[1],人群(>3岁)中乙型肝炎表面抗原(HBsAg)携带率为9.09%,乙型肝炎核心抗体(抗HBc)阳性人群达60%^[2]。当前我国广泛采用金标法对HBsAg快速筛查,再用血清丙氨酸转氨酶(ALT)联合进口、国产两种酶免疫试验(EIA)试剂进行HBsAg复检的血液筛查模式;抗HBc的检测尚未列入常规筛查项目。这种模式虽能有效防止血液废弃过多和献血员流失,但近年来有大量研究证明^[3]部分HBsAg阴性、抗HBc阳性的血液仍有传播HBV的危险,HBsAg阴性、抗HBc阳性“健康人群”HBV DNA阳性报道中最高达18%。本实验对随机无偿献血人群进行HBV DNA筛查,评估HBsAg阴性、抗HBc阳性人群的血液及血液制品传播HBV的风险,为完善我国HBV的血液筛查模式提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 RSP-200全自动加样仪(瑞士TECAN);Microlab FAME(瑞士HAMILTON)和DADE Behring全自动酶免分析仪(德国DADE);安托斯340恒温酶标仪(瑞士ANTHOS);MicrolabSTAR LET全自动核酸提取仪(瑞士HAMILTON);7300实时聚合酶链反应(PCR)扩增检测仪(新加坡ABD);7080自动生化分析仪(日本HITACHI);血液筛查用核酸全自动提取及扩增检测试剂盒(上海科华);乙型肝炎5项血清学标志物酶联免疫吸附试验(ELISA)国产试剂盒(上海科华)和进口试剂盒(美国Abbott Murex);HBV DNA质控血清(澳大利亚)。

1.2 检测对象 2008年8月25日—12月3日深圳市无偿献血者,常规检测合格的血液标本12552份。所有标本均经乙型肝炎金标试纸条和ALT试纸条筛查合格后,再进行HBsAg、抗丙型肝炎病毒(HCV)及抗人免疫缺陷病毒(HIV)国产和进口试剂2遍ELISA筛查及梅毒、ALT检测合格。行核酸检测的标本于EDTA抗凝管留取血样5 mL,3500 r/min离心3 min,分离血浆保存于4℃冰箱中待检。

1.3 混样核酸检测 血液标本经常规筛查合格后,应用STAR LET核酸提取仪,启动全自动汇集程序,按试剂盒要求进行8人份($8 \times 45 \mu\text{L}$)混合标本汇集,并将每个汇集池的标本条码文件储存、输出以备追溯和确认使用。按核酸提取试剂盒要求准备裂解液(加有内标)、磁珠(与去抑制剂1:1混合)溶液、洗涤液A、B、C及洗脱液,待汇集结束后装载提取试剂;启动自动化核酸提取程序,逐步完成核酸提取。取出核酸提取液,按检测试剂盒要求准备PCR的反应液,向反应管中加PCR反应液及已提取的核酸(反应液与核酸提取样比例为 $15 \mu\text{L}:15 \mu\text{L}$)置于核酸扩增检测仪上,按程序说明进行核酸扩增检测。若汇集样经检测为阳性,再进行单个标本360 μL 检测,以最终确认阳性标本。该混样核酸检测方法经国家生物制品所考评,灵敏度为160 IU/mL。

1.4 抗HBc阳性标本的采集 随机分批抽取混样核酸检测阴性的标本,用ELISA法检测HBsAg、乙型肝炎表面抗体(抗HBs)、抗HBc、乙型肝炎e抗原和抗体(HBeAg和抗HBe),留取抗HBc阳性标本做单份样本的核酸检测。

1.5 单份样本核酸检测 按照1.3步骤启动自动化核酸提取程序操作,单份样本分2孔各360 μL 进行核酸提取(裂解液不加内标,C洗液结束后手工弃尽残液,再加80 μL C洗液,将相同样本进行二合一转移,2次弃尽C洗液,再加入40 μL 洗脱液),反应液与核酸提取样比例为20 $\mu\text{L}:20 \mu\text{L}$ 。

1.6 HBV DNA荧光PCR定量检测 利用标准阴性对照血清,将澳大利亚质控5000 IU/mL的标准品样本稀释至终浓度为10、50、100、500 IU/mL的标准样本。按1.5步骤操作,对待检样本与标准样本同时进行核酸检测。

2 结果

2.1 HBV DNA单份核酸检测灵敏度考评 将已知浓度为5000 IU/mL的标准品用阴性血清于不同时间配制成不同拷贝数的应用标准液,采用单份样本核酸检测方法进行重复核酸提取、扩增及检测,结果见表1。应用SAS软件统计该单份样本核酸检测方法95%的检测限为12.90 IU/mL,可信区间为[7.81~103.23]。

表 1 HBV DNA 标准品考评结果

Table 1 Sensitivity evaluated by national HBV DNA standards

测定批次	浓度(IU/mL)	阳性数/重复数	检出率(%)
1	500	6/6	100.00
2	100	8/8	100.00
3	50	16/16	100.00
4	25	8/8	100.00
5	10	11/12	91.67
6	5	4/7	57.14
7	2.5	2/6	33.33

表 2 614 份 HBsAg 阴性标本中抗 HBc 与抗 HBs 的分布情况(n,%)

Table 2 Distribution of anti-HBc and anti-HBs in 614 HBsAg negative samples(n,%)

批次	HBsAg 阴性 抽检样本(份)	抗 HBc 阳性		抗 HBc 阴性	
		抗 HBs 阳性	抗 HBs 阴性	抗 HBs 阳性	抗 HBs 阴性
1	67	31(46.27)	1(1.49)	23(34.33)	12(17.91)
2	86	49(56.98)	1(1.16)	24(27.91)	12(13.95)
3	67	30(44.77)	3(4.48)	23(34.33)	11(16.42)
4	91	48(52.75)	4(4.39)	22(24.18)	17(18.68)
5	86	43(50.00)	7(8.14)	18(20.93)	18(20.93)
6	43	20(46.51)	1(2.33)	12(27.91)	10(23.26)
7	91	36(39.56)	4(4.39)	31(34.07)	20(21.98)
8	83	40(48.19)	2(2.41)	23(27.71)	18(21.69)
合计	614	297(48.37)	23(3.75)	176(28.66)	118(19.22)

2.3 室内质控 为监控实验进行,对整个实验进行质量控制。在每次核酸检测过程中,依靠阴性与阳性对照、质控及内标进行监控。阴性质控品用来监测试剂以及实验室环境是否存在污染等可引起假阳性的系统误差,以减少假阳性;阳性质控品用来监测试剂及整个实验过程产生假阴性的系统误差,以减少假阴性。内标是相当于加入每管中的阳性质控,监测每个反应体系产生假阴性的偶然误差及个体性错误,以减少标本的假阴性。阴性对照采用上海科华公司提供的阴性稀释血浆。

2.4 室间质控 本实验室参加 2008 年卫生部临检中心质评,质控品编号 0851~0855(共 5 支),按本方法检测,结果全部符合;参加 2008 年澳大利亚室间质评,质控品编号 A~O(共 15 支),按本方法检测,结果全部符合。

2.5 实时荧光 PCR 检测结果 在质控合格的前提下,共对 12 552 份血清学筛查合格样本进行核酸混样检测,计 1 569 份汇集池。初检发现 HBV DNA 阳性样本 3 份,对初检阳性样本进一步拆分检测,检出 HBV DNA 阳性 2 份,阳性率为 0.02%,假阳性率为 0.01%。对 320 份抗 HBc 阳性样本进行加高灵敏度的单份样本核酸检测,初检出 HBV DNA 阳性 3 份,相同方法复检,检出阳性 1 份,阳性率为

2.2 抗 HBc 阳性标本筛查结果 在混样核酸检测阴性的样本中分 8 次随机抽取 614 份献血者样本,经 ELISA 筛查出抗 HBc 阳性标本 320 份,阳性率为 52.12%。其中,抗 HBc 阳性、抗 HBs 阴性标本 23 份,占总数的 3.75%;抗 HBc、抗 HBs 均阳性标本 297 份,占总数的 48.37%,见表 2。

0.31%,见表 3。将核酸检测阳性样本进行乙型肝炎 5 项血清学标志物及定量检测,结果见表 4。

表 3 实时荧光 PCR 检测结果

Table 3 Detection results of real-time PCR

方法	标本数 (份)	初检阳性 (份)	复检阳性 (份)	阳性率 (%)	假阳性率 (%)
混样(8×45 μL)	12 552	3	2	0.02	0.01
单份(720 μL)	320	3	1	0.31	不确定

表 4 核酸检测阳性样本的血清学标志物及定量检测结果

Table 4 Results of serological markers and quantitative PCR in nucleic acid positive samples

组别	抗 HBc	抗 HBs	HBsAg	抗 HBc	循环数	HBV DNA (IU/mL)
混样检测 1	+	+	-	-	31.31	76.00
混样检测 2	+	-	-	-	32.52	45.00
单份检测	+	+	-	-	37.45	2.65

+ : 阳性; - : 阴性

3 讨论

当前,血清学检测 HBsAg 阴性不能排除 HBV 感染已经成为共识。早在 1978 年就有报道^[4],HBsAg 阴性、抗 HBc 阳性的供血者可导致受血者感染 HBV。最近的研究表明^[5],HBsAg 阴性、抗 HBc

阳性“健康人群”中约有 10% HBV DNA 阳性,抗 HBs 和抗 HBc 阳性的“健康人群”中有 5%~15% HBV DNA 阳性。Yotsuyanagli 等报道^[6], HBsAg 阴性、抗 HBc 阳性的 HBV DNA 阳性血清中,部分 HBV 以免疫复合物形式存在,HBV DNA 水平近似急性肝炎恢复期患者水平,说明抗 HBc 阳性的“健康献血者”中可能存在 HBV 的低水平释放,存在严重的输血传播乙型病毒性肝炎的风险。有报道^[7],血液循环中 HBV DNA 的浓度不管多少,即使是低于相应检测方法的测定下限,也可以引起 HBV 的输血后感染。经动物实验证实^[8],在 HBV 感染者克隆出来的 1~10 个病毒颗粒可以使猩猩发生典型 HBV 感染临床表现。但在我国,为防止血液废弃过多和献血员流失,抗 HBc 的检测尚未列入常规筛查项目。近年来研究发现^[9],HBsAg 阴性、抗 HBc 阳性的血液经核酸检测 HBV DNA 阳性率约为 2.03%(0.0%~8.1%),其中 0.96%(0.0%~2.4%)抗 HBs 为阴性;大约 87%(60%~90%)的 HBsAg 阴性、抗 HBc 阳性血液中抗 HBs 为阳性,但其滴度却未统计。抗 HBc 阳性的血液确实存在相当大的经输血传播 HBV 的风险,国际上有些国家已将抗 HBc 纳入血液筛查的指标以提高输血安全水平。

本实验对 ELISA 法筛查合格献血者的 12 552 份血标本进行 HBV DNA 检测,结果检出 2 份(0.02%)阳性标本,均为抗 HBc 阳性者;从混样检测阴性的样本中随机抽取 320 份抗 HBc 阳性标本进行高灵敏度单份样本检测,结果检出 HBV DNA 阳性标本 1 份(0.31%)。虽然深圳市血液中心的 100%无偿献血保证了较高质量血源,并于 2006 年正式在常规血液筛查基础上增加 8 人份混样核酸检测,以进一步提高血液质量,确保临床用血安全,但因为混样检测方法及试剂灵敏度的局限性,仍不能完全消除 HBV 经输血传播的风险。本次实验混样核酸检测 HBV DNA 阴性的血液样本再经单份样本核酸检测,检出 1 例阳性,标准品定量检测其病毒含量计算值为 2.65 IU/mL(<10 IU/mL),低于常规混样核酸检测灵敏度的下限,故常规定量检测方法很难检出,提示混样核酸检测方法及试剂的灵敏度需进一步提高,并应考虑采用单样本核酸检测 HBV DNA。

当前已有报道^[10],增加血清学抗 HBc 筛查,能够提高血液安全性。但由于抗 HBc 检测特异性较差,即使在低流行地区筛查血液仍可导致献血者损

失,假阴性率高以及同样存在“窗口期”的问题^[11],因此如何更有效地利用抗 HBc 标志物提高血液安全,仍为尚待解决的问题。为改善抗 HBc 检测的假阴性问题,在常用的 ELISA 检测法中,可使用还原剂二硫苏糖、重亚硫酸钾和半胱氨酸等预处理血清标本^[12-13]。对于窗口期问题,NAT 技术能直接检测病毒 DNA,可以大大缩短病毒感染的窗口期,但 HBsAg 阴性、抗 HBc 阳性人群血液中病毒含量很低(一般在 100 拷贝/mL,甚至更低),对核酸检测的灵敏度要求较高,普通 PCR 技术的检测效果不能满足血液筛查标准,所以应发展并推广使用灵敏度较高的核酸检测技术。现阶段,抗 HBc 的检测在乙型肝炎低流行国家的血液筛查中普遍使用,如美国是乙型肝炎低流行国家(流行率<2%)^[11],已将抗 HBc 纳入血液常规检测模式中,抗 HBc 阳性的血液不能用于临床。而日本是乙型肝炎中流行国家(流行率<7%),其血液筛查采用的是 HBsAg、抗 HBc 和抗 HBs 的联合检测模式,抗 HBc 弱阳性或阴性的样本直接进行 NAT 检测,而对抗 HBc 强阳性(滴度>10⁵)的样本,尚需检测抗 HBs 滴度,>200 mIU/mL 方可作进一步的 NAT 检测,否则废弃^[11]。HBsAg 阴性、抗 HBc 阳性献血者血液存在的传播 HBV 的风险不容忽视,我国可考虑借鉴日本这一检测模式,在血清学方法中增加抗 HBc 和抗 HBs 的联合检测,再进行 NAT 筛查,既可避免献血员的大量流失,又可大大降低 HBV 经输血传播的风险。

[参 考 文 献]

- [1] 梁晓峰,陈园生,王晓军. 中国 3 岁以上人群乙型肝炎血清流行病学研究[J]. 中华流行病学杂志,2005,26(9):655-658.
- [2] 王培华. 输血技术学[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:107-108.
- [3] Wang J T, Lee C Z, Chen P J, *et al.* Transfusion-transmitted HBV infection in an endemic area; the necessity of more sensitive screening for HBV carriers [J]. *Transfusion*, 2002, 42(12):1592-1597.
- [4] 史宇军,庄辉. 隐匿性乙型肝炎研究现状[J]. 传染病信息, 2005,18(3):97-99.
- [5] Drosten C, Weber M, Seifried E, *et al.* Evaluation of a new PCR assay with competitive internal control sequence for blood donor screening[J]. *Transfusion*, 2000, 40(5):718-724.
- [6] Yotsuyanagli H, Yasuda K, Moriya K, *et al.* Frequent presence of HBV in the sera of HBsAg negative, anti-HBc positive blood donors [J]. *Transfusion*, 2001, 41(9): 1093-1099.

发现其 AmpC 酶基因复杂多样,检测到仅携带 DHA 基因的菌株、仅携带 ACC 基因的菌株、同时携带 ACC 和 MIR 基因的菌株、同时携带 ACC、MIR 和 FOX 基因的菌株 4 种型别。其基因型以 ACC 型为主,与国内很多学者的研究结果一致。有学者对解放军第 98 医院分离的菌株所进行的研究表明^[9],该院阴沟肠杆菌中质粒 AmpC 酶基因阳性率达 81.80%,且以 ACC 基因为主,占 79.50%;本研究与之相比,阳性率相对低,基因型的构成却更加复杂,说明 AmpC 酶基因的流行有明显的地域特征。

药敏结果显示,AmpC 酶阳性菌对第三代头孢菌素头孢噻肟和头孢他啶均已高度耐药。AmpC 酶能够水解灭活第三代头孢菌素和单环 β -内酰胺类抗生素,使产 AmpC 酶细菌对第三代头孢菌素耐药,导致临床治疗无效。第三代头孢菌素是 AmpC 酶的弱诱导剂,所产生的低水平 AmpC 酶不足以导致耐药,如果不正确使用,使细菌处于第三代头孢菌素的选择压力下,易筛选出持续高产 AmpC 酶突变株,并可导致耐药菌的流行。头孢噻肟的耐药率很高,可能与临床医生的用药习惯有关。亚胺培南对产 AmpC 酶菌的敏感率为 100%,目前国内对亚胺培南耐药的肠杆菌科细菌非常少见,因此亚胺培南可用于产 AmpC 酶菌株感染的治疗。这是由于亚胺培南对 β -内酰胺酶具有高度稳定性,与所有 G^- 杆菌的青霉素结合蛋白(PBPs)具有较强的亲和力,同时亚胺培南极易进入细菌的微孔蛋白 D2 通道,从而显示出强大的抗菌活性。因此,在阴沟肠杆菌中及时检测 AmpC 酶,对防止产 AmpC 酶菌的广泛

传播和指导临床合理用药具有重大意义。

[参考文献]

- [1] 李岩,许淑珍,苏建荣,等. 阴沟肠杆菌产超广谱 β -内酰胺酶、AmpC 酶的检测及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2007,17(12):1586-1589.
- [2] Bush K, Jacoby G A, Medeiros A A. A functional classification for β -lactamases and its correlation with molecular structure[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1995,39(6):1211-1214.
- [3] 蒋燕群,倪语星,王坚强,等. 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌质粒 β -内酰胺酶的筛选[J]. 上海医学检验杂志, 2001,16(1):10-12.
- [4] Coudron P E, Moland E S, Thomson K S. Occurrence and detection of AmpC Beta-lactamases among Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, and Proteus mirabilis isolates at a veterans medical center[J]. J Clin Microbiol, 2000,38(5):1791-1796.
- [5] Perez-Perez F J, Hanson N D. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases genes in clinical isolates by using multiplex PCR[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(6):2053-2162.
- [6] 周强,黄宪章,张文,等. 147 株阴沟肠杆菌 AmpC 酶及 ESBLs 的表型测定[J]. 广东医学,2007,28(9):1444-1446.
- [7] 顾怡明,张杰,俞云松,等. 多重耐药阴沟肠杆菌流行情况及耐药机制研究[J]. 中华医院感染学杂志,2004,12(14):1321-1324.
- [8] 刘建明,聂新民,孙圣华,等. 产 AmpC 酶及或产超广谱 β -内酰胺酶的阴沟肠杆菌的检测及耐药性研究[J]. 中国现代医学杂志,2008,18(21):3096-3099.
- [9] 黄支密,仵蕾,糜祖煌,等. 阴沟肠杆菌 β -内酰胺酶基因检测[J]. 东南国防医药, 2005, 7(5): 324-326.

(上接第 244 页)

- [7] Weber B. Recent developments in the diagnosis and monitoring of HBV infection and role of the genetic variability of the S gene[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2005, 5(1):75-91.
- [8] 叶贤林,曾昭鉴. 乙型肝炎病毒血液核酸筛查进展[J]. 中国输血杂志,2007,20(6):537-540.
- [9] Nantachit N, Thaikruea L, Thongsawat S, et al. Evaluation of a multiplex human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus nucleic acid testing assay to detect viremic blood donors in northern Thailand[J]. Transfusion, 2007,47(10):1803-1808.
- [10] Roth W K, Marijke M, Detlev P. NAT for HBV and anti-HBe

testing increase blood safety[J]. Transfusion, 2002, 42(7):869-872.

- [11] Comanor L, Holland P. Hepatitis B virus blood screening: unfinished agendas[J]. Vox Sanguinis, 2006, 91(1):1-12.
- [12] Weare J A, Robertson E F, Madsen G, et al. Improvement in the specificity of assays for detection of antibody to hepatitis B core antigen[J]. J Clin Microbiol, 1991, 29(3):600-604.
- [13] Cheng Y, Dubovoy N, Hayes-Rogers M E, et al. Detection of IgM to hepatitis B core antigen in a reductant containing, chemiluminescence assay[J]. J Immunol Methods, 1999, 230(1-2):29-35.