

· 论 著 ·

苏州地区抗-HBc 阳性合格青年献血人群隐匿性 HBV 感染的血清学及分子生物学特性分析

张 辉

(苏州市中心血站质量管理科, 江苏苏州 215006)

摘要:目的 探讨苏州地区乙型肝炎核心抗体(抗-HBc)阳性合格的青年献血人群隐匿性 HBV 感染的生物学及血清学特性。方法 选取 2013 年 10 月至 2016 年 6 月乙型肝炎表面抗原(HBsAg)阴性、核酸检测(NAT)有反应性的青年献血者 120 例作为研究对象,进行乙型肝炎表面抗体(抗-HBs)定量检测和乙型肝炎两对半检测,对抗-HBc 阳性标本进行病毒核酸提取和基本核心启动子区(BCP 区)/前 C 区(PC 区)及 S 区巢式 PCR 扩增,对扩增结果阳性标本进行基因测序及序列分析。结果 120 例献血者中,抗-HBc(+)31 例,其中 22~25 岁组 25 例,18~21 岁组 6 例,差异有统计学意义($P < 0.05$);抗-HBs(+)89 例,其中 22~25 岁组 16 例,18~21 岁组 73 例。利用巢式 PCR 扩增法对抗-HBc(+)标本进行 PCR 扩增,其中 1 例 BCP 区阳性,2 例 S 区阳性,均属于 22~25 岁组。S 区阳性标本的分型和测序结果显示:2 例均为 B 型 HBV,与野生型 DNA 序列相比,其中 1 例存在氨基酸序列 E44U 变异,1 例存在 T532G 变异。结论 对于 HBsAg 检测合格的抗-HBc(+)青年献血者,并不能保证其血液中一定不含有 HBV DNA。为降低 HBV 经输血传播的风险,仍然需要进一步提高乙肝高流行地区核酸检测方法的灵敏度。

关键词: 隐匿性乙肝病毒感染; 乙型肝炎病毒 DNA; 乙型肝炎病毒核心抗体; 献血者

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.21.018

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)21-2990-03

Analysis on serological and molecular biological characteristics of occult HBV infection among qualified young blood donors with anti-HBc positive in Suzhou area

ZHANG Hui

(Department of Quality Management, Suzhou Municipal Central Blood Station, Suzhou, Jiangsu 215006, China)

Abstract: Objective To explore the biological and serological characteristics of occult HBV infection among qualified young blood donors with anti-HBc positive in Suzhou area. **Methods** 120 young blood donors with negative HBsAg and reactivity in NAT in our hospital from October 2013 to June 2016 were selected as the research subjects. The anti-HBs quantitative detection and two pairs of semi-hepatitis B detection were performed. The samples of anti-HBc positive were conducted the viral nucleic acid extraction and nested PCR at the basic core promoter(BCP) region, pre-core(PC) region and S region. The samples with positive amplification results were performed the gene sequencing and sequential analysis. **Results** Among 120 volunteer blood donors, anti-HBc(+) had 31 cases, in which 25 cases were in the 22-25 years old group and 6 cases in the 18-21 years old group, the difference was statistically significant($P < 0.05$); anti-HBs(+) had 89 cases, among them, 16 cases were in the 22-25 years old group and 73 cases in the 18-21 years old group. The nest PCR was used to conduct PCR amplification in 31 samples of anti-HBc(+), in which 1 case was BCP region positive and 2 cases were S region positive, all belonged to the 22-25 years old group. In the typing and sequencing for the samples of S region positive, the results showed that all 2 cases were B type HBV. Compared with wild type DNA sequence, among them 1 cases had amino acid sequence E44U variation and 1 cases had T532G mutation. **Conclusion** For the anti-HBc(+) young blood donors qualified in HBsAg detection, it is not guaranteed that their blood do not contain HBV DNA. It is still needed to further increase the sensitivity of nucleic acid detection method in hepatitis B highly prevalent areas fro decreasing the risk of HBV transmission by blood transfusion.

Key words: occult hepatitis B virus infection; HBV DNA; anti-HBc; blood donors

随着医学检测技术的不断改进和提高,乙型肝炎病毒(HBV)经输血传播的风险也逐渐降低^[1-3],但隐匿性乙型肝炎感染及窗口期感染仍然是当今威胁输血安全性的两大主要原因。隐匿性乙型肝炎病毒感染(OBI)是指患者血清或肝组织中乙肝表面抗原(HBsAg)检测结果为阴性而 DNA 检测结果为阳性的感染,其病毒载量常常不可定量或较低^[4-5]。有研究证实 OBI 可以通过输血途径进行传播,是当前造成输血途径传播 HBV 的一个重要原因^[6-7]。由于 HBsAg 检测的局限性,不能够对 HBV 传播进行完全的阻断,因此接种乙型肝炎疫

苗、开展病毒核酸检测(NAT)预防 HBV 感染是非常必要的^[8]。本文旨在探讨苏州地区乙型肝炎核心抗体(抗-HBc)阳性合格的 OBI 献血人群乙肝两对半、HBV 基本核心启动子区(BCP 区)/前 C 区(PC 区)及 S 区特征,为断判 HBV 传播的残余风险性提供一定的科学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 从 2013 年 10 月至 2016 年 6 月 270 250 例无偿献血者中筛查出 120 例 HBsAg(-)、NAT 检测有反应性的 18~25 岁献血者作为研究对象,按献血者年龄将其分为 22~

25 岁组(41 例)和 18~21 岁组(79 例)。

1.2 试剂与仪器 乙型肝炎 e 抗原、乙型肝炎 e 抗体、抗-HBc 检测试剂盒购自厦门英科新创科技有限公司,乙型肝炎表面抗体(抗-HBs)定量、HBsAg 检测试剂盒购自北京万泰有限公司,病毒核酸提取试剂盒购自德国罗氏公司,EB 替代物购自北京普利莱基因技术有限公司,琼脂购自西班牙 Biowest 公司, DNA 凝胶回收试剂盒购自北京天根有限公司生产, DL2000 DNA Maker 购自大连 Takara 公司, Premix Ex Taq 试剂盒购自大连宝生物有限公司。凝胶成像仪系统购自上海山富科学仪器有限公司,暗箱式紫外透射仪购自北京鼎国有限公司,水平电泳仪购自美国 Embi Tec 公司,7500 扩增仪购自美国 Bio-Rad 公司, MX3005P 实时荧光定量仪购自美国 Agilent 公司, Microlab STAR 全自动加样系统与 Microlab FAME 酶免后处理系统购自瑞士 HAMILTON 公司, COBAS S201 全自动血液核酸筛查系统, Viral Nu-cleic Acid Large Volume Kit 购自美国罗氏公司。

1.3 方法

1.3.1 血清学标志物检测 献血者标本采用进口与国产 2 种试剂同时筛查。HBs Ag 检测和抗-HBc 的复检采用酶联免疫吸附试验,当初检和复检结果为阳性时则判断为抗-HBc(+)。

1.3.2 病毒核酸筛查、提取 采用全自动血液核酸筛查系统进行三联荧光病毒 6 人份混检,对反应性标本进行拆分鉴别,进行阳性确认试验。采用 High Pure Viral Nu-cleic Acid Large Volume Kit 对本标本进行病毒核酸提取,操作过程需严格按照说明进行。

1.3.3 HBV 基因的测序与扩增 采用 7500 扩增仪对本标本基因片段进行巢氏 PCR 扩增,对扩增所得到的 PCR 产物进行凝胶回收,并送至上海英潍捷基公司进行序列测定。

1.3.4 标本病毒载量的测定 采用 Premix Ex Taq 试剂盒及 MX3005P 实时荧光定量仪进行病毒载量测定。引物序列为 HBV-1(5'-ATA TGA TAA AAC GCC GCA GAC AC-3')和 HBV-2(5'-CAA CCT CCA ATC ACT CAC CAA C-3')。双标探针为上海英竣技术生物公司合成的 BS-1: 5'-(Cy5) TCC TCC AAT TTG TCC TGG TTA TCG CT-(BHQ2) -3'。反应体系为: Rox Dye II (50×) 0.4 μL, 2×Premix Ex Taq 12.5 μL, 引物 HBV-1(10 μmol/L)与 HBV-2(10 μmol/L)终浓度均为 0.4 μmol/L, 探针 BS-1(5 μmol/L)终浓度为 0.2 μmol/L, 补充蒸馏水至 25 μL。

1.4 统计学处理 采用 STATA 12.0 软件进行统计学处理,分类变量资料采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 青年献血者分子生物学及血清学特点 抗-HBc(+)31 例,其中 22~25 岁组 25 例,18~21 岁组 6 例,差异有统计学意义($P < 0.05$)。抗-HBs(+)89 例,其中 22~25 岁组 16 例,18~21 岁组 73 例。利用巢式 PCR 扩增法对 31 例抗-HBc(+)标本进行 PCR 扩增,其中 1 例 BCP 区阳性,2 例 S 区阳性,均属于 22~25 岁组。

2.2 青年献血者抗-HBS 检测结果比较 见表 1。

2.3 青年献血者抗-HBc 检测结果比较 18~21 岁组与 22~25 岁组抗-HBc 阴、阳性检出率差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.4 青年献血者 HBV 两对半模式 所有研究对象 HBeAg 检测结果均为阴性,其中最常见 HBV 两对半模式为抗-HBc(-)/抗-HBs(+)/抗-HBe(-),且 HBV 两对半在不同模式中所占的比例顺序均一致。

表 1 抗-HBS 检测结果比较(n)

抗-HBS (IU/L)	抗-HBc(+)		抗-HBc(-)	
	18~21 岁组	22~25 岁组	18~21 岁组	22~25 岁组
<10	0	1	20	18
10~100	1	6	9	11
>100	5	18	8	13
<i>P</i>	0.074		0.131	

表 2 抗-HBc 检测结果比较(n)

组别	<i>n</i>	抗-HBc(+)	抗-HBc(-)	<i>P</i>
18~21 岁组	48	27	21	<0.05
22~25 岁组	72	50	22	<0.05

2.5 HBV DNA 检测结果比较 对 2 例 S 区阳性标本进行分型和测序,检测结果显示:2 例均为 B 型 HBV,与野生型 DNA 序列相比,其中 1 例存在氨基酸序列 E44U 变异,1 例存在 T532G 变异,但未发生氨基酸序列变异。病毒载量分析结果显示,抗-HBc(+)标本中 HBV 载量介于不可定量至 25.7 IU/mL 之间, NAT 检测阳性标本中 HBV 载量介于不可定量至 58 IU/mL 之间, HBsAg(+)标本中 HBV 载量均大于 200 IU/mL。

3 讨论

虽然 HBV 疫苗对乙肝的预防起到了一定的效果,但由于我国国情复杂、人口基数较大,HBV 流行仍然是我国重点进行防治的一个公共卫生问题^[9-10]。据相关调查显示,我国大约有 75% 的肝硬化患者都是由 HBV 继发引起的,严重危害了患者的生命安全^[11-12]。隐匿性 HBV 感染和窗口期感染仍然是当今威胁输血安全性的两大主要原因^[13]。

本研究结果显示:抗-HBc(+)31 例,其中 22~25 岁组 25 例,18~21 岁组 6 例,差异有统计学意义($P < 0.05$);抗-HBs(+)89 例,其中 22~25 岁组 16 例,18~21 岁组 73 例;对 31 例抗-HBc(+)标本进行 PCR 扩增时发现 1 例 BCP 区阳性,2 例 S 区阳性,且均属于 22~25 岁组。分析造成这种情况的原因可能是:由于乙型肝炎疫苗从 1992 年才开始纳入儿童计划免疫中,22~25 岁组乙肝疫苗的接种率可能相对 18~21 岁组较低;另外年龄越小者暴露于 HBV 的机会也就相对越小,加上本次研究标本量相对较小,有可能造成上述结果。通过对 31 例抗-HBc(+)标本进行 PCR 扩增,并对扩增结果为 S 区阳性的标本进行分型和测序,其检测结果显示为 B 型 HBV。由此可见,虽然标本检测为 HBsAg(-)、NAT 检测有反应性,但是存在部分有特殊变异或 HBV 载量相对较低的标本,因此目前输血前的检测方法仍然存在漏洞。

人体输入极微量的 HBV DNA 后是否会造成 HBV 感染目前尚无定论,仍需要进一步的研究^[14-15]。抗-HBs(+)血制品对受血者感染 HBV 具有一定的保护性意义,即使输入含

HBV DNA 的血制品, 受血者感染 HBV 的概率相对较低, 特别是在抗-HBs>100 IU/L 情况的感染概率极低。本研究结果显示, 抗-HBc(+) 标本中 HBV 载量介于不可定量至 25.7 IU/mL 之间, NAT 检测阳性标本中 HBV 载量介于不可定量至 58 IU/mL 之间。虽然受血者感染 HBV 的风险极低, 但不代表一定不存在 HBV 感染的风险。因此, 普及减少输血相关病毒感染风险的方法, 加强 NAT 检测是非常有必要的。

综上所述, 对于 HBsAg 检测合格的抗-HBc(+) 青年献血者, 并不能保证其血液中一定不含有 HBV DNA。为降低 HBV 经输血传播的风险, 仍然需要进一步提高 HBV 高流行地区核酸检测方法的灵敏度。

参考文献

- [1] 陈海霞, 王铁兵, 唐曙明, 等. 乙肝母婴阻断中婴幼儿隐性 HBV 感染研究[J]. 广东医学, 2015, 12(11): 1670-1672.
- [2] Coppola N, Onorato L, Pisaturo M, et al. Role of occult hepatitis B virus infection in chronic hepatitis C[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(42): 11931-11940.
- [3] Helaly GF, Ghazzawi EFE, Shawky SM, et al. Occult hepatitis B virus infection among chronic hemodialysis patients in Alexandria, Egypt[J]. J Infect Public Health, 2015, 8(6): 562-569.
- [4] 田雅茹, 吴昊. HIV 感染者合并乙型肝炎病毒感染的研究进展[J]. 医学研究杂志, 2016, 45(9): 164-167.
- [5] Laurenti L, Autore F, Innocenti I, et al. Prevalence, characteristics and management of occult hepatitis B virus infection in patients with chronic lymphocytic leukemia: a single center experience[J]. Leuk Lymphoma, 2015, 56(10): 2841-2846.
- [6] Saitta C, Lanza M, Bertuccio A, et al. Evaluation of CT-NNB1 and TP53 variability in patients with hepatocellular

carcinoma and occult hepatitis B virus infection[J]. Cancer Genet, 2015, 208(10): 513-516.

- [7] 谢迎春. 不明原因肝病患者中隐匿性 HBV 感染情况观察[J]. 山东医药, 2015, 10(4): 72-73.
- [8] 周姗, 杜鹏, 郑欣, 等. 2010 年至 2012 年深圳地区献血者隐匿性乙型肝炎病毒感染的分子病毒学特征[J]. 中华传染病杂志, 2015, 33(3): 150-153.
- [9] 吕豪, 江素君, 孙爱华, 等. 衢州市无偿献血者中隐匿性 HBV 感染的基因型别及突变类型分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2014, 28(5): 371-373.
- [10] Eslamifar A, Ramezani A, Ehteram H, et al. Occult hepatitis C virus infection in Iranian hemodialysis patients[J]. J Nephrothol, 2015, 4(4): 116-120.
- [11] Civan J, Hann HW. Giving rituximab in patients with occult or resolved hepatitis B virus infection; are the current guidelines good enough? [J]. Expert Opin Drug Saf, 2015, 14(6): 865-875.
- [12] 李晓明. 隐匿性 HBV 感染与原发肝癌患者的疾病进展及预后的相关性研究[J]. 实用癌症杂志, 2016, 31(6): 979-982.
- [13] 张秋莹, 黄宏耀, 钱进, 等. 不同检测方法对隐匿性乙型肝炎病毒感染的诊断价值分析[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 24(11): 1542-1543.
- [14] Mandour M, Nemr N, Shehata A, et al. Occult HBV infection status among chronic hepatitis C and hemodialysis patients in northeastern Egypt: regional and national overview[J]. Rev Soc Bras Med Trop, 2015, 48(3): 258.
- [15] 曾雪珍, 叶贤林, 曾劲峰, 等. 核酸检测方法在血液 HBV-DNA 检测中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(12): 1695-1697.

(收稿日期: 2017-04-18 修回日期: 2017-07-20)

(上接第 2989 页)

通常情况下, 小标本资料可以使用 SPSS 统计软件进行统计分析。但大标本资料, 特别是分不同年龄段的大标本资料, 如采用 SPSS 统计软件进行统计分析, 则需要操作人员具有编程能力, 而且数据分析工作较为繁琐^[10]。VFP 6.0 系统软件可以轻松提取各年龄段统计数据, 可以将方便、快捷地将数据导入 SPSS 统计软件中进行复杂的统计分析工作, 不需要计算机专业知识, 是从事临床资料分析的好帮手。

参考文献

- [1] 李人贤, 孔庆彦. 任务驱动式 Visual FoxPro 实用教程[M]. 北京: 清华大学出版社, 2010: 1-3.
- [2] 余文芳, 罗朝盛. Visual FoxPro 6.0 程序设计教程[M]. 北京: 人民邮电出版社, 2004: 2-3.
- [3] 杨绍增. 中文 VISUAL FOXPRO 应用系统开发教程[M]. 3 版. 北京: 清华大学出版社, 2014: 1-4.
- [4] 中华心血管病杂志委员会血脂异常防治对策专题组. 血脂异常防治建议[J]. 中华心血管病杂志, 1997, 25(3):

169-172.

- [5] 中国成人血脂异常防治指南制订联合委员会. 中国成人血脂异常防治指南[J]. 中国实用乡村医生杂志, 2012, 19(18): 5-15.
- [6] 王文, 陈伟伟, 王增武, 等. 1990 年至 2005 年我国城乡居民主要疾病死亡率及构成比变化[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2009, 1(3): 130-131.
- [7] Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, et al. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics[M]. 6th ed. St Louis Mo: Elsevier Saunders, 2008: 402-430.
- [8] 王琼, 张青, 刘娟. 北京地区 13 336 例成人空腹血脂水平分析[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(5): 524-528.
- [9] 程学先. 深入浅出数据库系统及应用基础[M]. 北京: 清华大学出版社, 2015: 6-7.
- [10] 张文彤. SPSS11 统计分析教程基础篇[M]. 北京: 北京希望电子出版社, 2002: 48-50.

(收稿日期: 2017-03-22 修回日期: 2017-06-28)