

湖州地区献血人群隐匿性乙型肝炎病毒感染血清学及病毒变异分析

杨海英,汪峰

湖州市中心血站,浙江 湖州 313000

摘要: 目的 探讨湖州地区献血人群中 HBsAg(-) 而 HBV DNA(+) 的血清学和病毒变异特征。方法 对 56 例 HBsAg(-)/HBVDNA(+) 无偿献血者的血清学特征进行分析,并对随访确认的隐匿性乙型肝炎病毒感染(occult hepatitis B infection, OBI) 患者的标本进行核酸检测和 S 基因序列测定,分析突变位点情况。结果 不同性别间 OBI 感染率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。初次献血者 OBI 感染 25 例(感染率为 0.09%);重复献血者 31 例(感染率 0.13%),两者相比较差异无统计学意义($P>0.05$)。不同年龄组献血者 OBI 感染率比较差异有统计学意义($P<0.001$),以 41~50 岁 OBI 感染率最高(0.23%),18~30 岁最低(0.03%)。HBsAg(-)/HBVDNA(+) 献血者免疫特征共 7 种血清学模式,各种血清标志物阳性中,HBcAb(+) 率最高,达 78.57%,S 基因存在高变区 M133T/L, S143T, Q129H 的高频率突变。结论 献血者中存在一定比例的 OBI 患者,应加强 HBV 感染的检测,降低输血传播 HBV 的风险。

关键词: 乙肝表面抗原;隐匿性乙型肝炎病毒感染;核酸检测;S 基因

中图分类号: R512.6⁺2 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2022)08-1000-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2022.08.027

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是全世界共同关注的公共卫生问题之一^[1],我国也属于 HBV 感染高发区^[1-2]。据报道^[3],截至 2018 年,全球约有 HBV 感染者 3.5 亿人。在我国普通人群 HBV 感

染率为 7.2%,即约有 1 亿人感染 HBV。因此,对于该疾病的快速诊断已成为全球性公共卫生问题。输血是 HBV 的重要传染途径之一,严格筛查是避免携带 HBV 的血液应用于临床而使受血者感染的有效手段^[4]。在目前的血站血液检测方式下,ELISA 因其方便、快捷、准确率较高等特点,使其成为检测 HBV 常用方法之一,但可能存在因患者体内病毒含量低或病毒发生

基金项目:湖州市科技局科技计划项目(2019GY19)

作者简介:杨海英(1983-),女,浙江省湖州市人,大学本科,主管技师,主要从事血站血液检测工作。

治疗时要及早进行。

本次疫情中,由于首发病例对结核病传染性认识不够,缺乏结核病防治知识,后续的宣传教育不及时,导致患者没有按照医生要求进行防护,一方面痰液处理不规范;另一方面由于家庭条件限制,和家人没有有效隔离,增加了家人感染的风险。建议要继续加大健康教育,普及结核病防治知识,尤其是基层医务人员在患者首次入户随访和后续管理中一定要严格落实患者的防护措施,避免家庭内传播^[8-9]。

由于实验室条件限制,本研究未对患者进行菌株基因分型鉴定,无法从实验室来确认感染的同源性。

参考文献

- [1] 国家卫生健康委员会办公厅.关于印发中国结核病预防控制工作技术规范(2020 年版)的通知[Z]. 2020-04-02.
- [2] 国家卫生健康委员会办公厅,教育部办公厅.关于印发中国学校结核病防控指南的通知[Z]. 2020-10-16.
- [3] 国家卫生和计划生育委员会.肺结核诊断(代替 WS 288—2008)

[S/OL]. (2017-11-09) [2021-08-01]. <http://www.nhc.gov.cn/ewebeditor/uploadfile/2017/12/20171212154852389.pdf>.

- [4] 吴睿彦,陈品儒,许柳清,等.广东汉族家庭聚集性发病的肺结核病人及家庭密切接触者调查情况分析[J]. 现代医院, 2021, 21(4): 620-622.
- [5] 张威,李成俊,王洋,等.312 例不典型肺结核病老年患者临床特点和治疗转归的性别差异[J]. 实用预防医学, 2018, 25(9): 1121-1124.
- [6] 任哲雯,成君,徐彩红,等.肺结核患者密切接触者潜伏性结核感染预防性治疗研究进展[J]. 中国防痨杂志, 2019, 41(9): 1021-1024.
- [7] 刘二勇,周林,成诗明.结核分枝杆菌潜伏性感染及预防性治疗研究进展的系统评价[J]. 中国防痨杂志, 2013, 35(4): 231-239.
- [8] 陈其琛,刘国标,李笑颜,等.广州市越秀区 2013—2017 年本地居民肺结核流行特征[J]. 实用预防医学, 2019, 26(9): 1121-1125.
- [9] 朱宝平,王茜,贾雪.青少年结核病的影响因素研究[J]. 实用预防医学, 2021, 28(10): 1278-1280.

收稿日期:2021-07-15

变异等因素而引起 ELISA 检测结果假阴性,出现漏诊现象^[5]。随着分子检测技术的推广,发现部分 HBsAg(-)献血者血浆 HBV DNA 检测呈阳性,这种排除窗口期的 HBsAg(-)/HBVDNA(+)感染定义为隐匿性 HBV 感染(occult hepatitis B infection, OBI)。为保证输血更安全有效,故在血液筛查中必须进行核酸检测(nucleic acid testing, NAT),不过核酸筛查不合格的献血者并非全部能够检测出 HBV 病毒核酸^[6]。目前,我国供血系统普遍采用 2 套不同的 ELISA 试剂对献血者标本进行 HBsAg 检测,除此之外,在 ELISA 检测完成后或与 ELISA 同步对献血者血液进行 HBV 核酸检测(本站为节约时间,采用同步检测的方式)。然而在实际工作中发现存在着一定比例的 HBsAg 与 HBV DNA 检测结果不完全一致的现象^[7]。为了解湖州地区献血者 OBI 的血清学特性及病毒变异情况,本研究选择经鉴别 HBsAg(-)而 HBV DNA(+)献血者的标本为对象,进行相关分析,现报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 本研究纳入湖州市中心血站 2020 年 1 月 1 日—2021 年 5 月 31 日无偿献血者中 HBsAg(-)且 HBVDNA(+)样本,留取其血浆袋于 -70℃ 冷冻保存备用。

1.2 试剂与仪器 HBsAg 定性试剂盒来源于珠海丽珠试剂股份有限公司和 DiaSorin S.p.A.UK Branch 公司;HBsAb、HBeAb、HBcAb 定性试剂盒来源于珠海丽珠试剂股份有限公司。ELISA 设备:STAR 全自动加样仪,EVO 全自动加样仪,FAME 全自动后处理仪;核酸设备及试剂:全自动医用 PCR 分析系统(罗氏);7500 型荧光定量 PCR 仪(ABI 公司),PCR 扩增仪(Eppendorf)为德国产品,HBVDNA 检测试剂盒(Roche Molecular Systems, Inc.)。

1.3 检测方法

1.3.1 血清学标志物检测 采用国产和进口 2 套试剂对献血者血液进行 HBsAg 检测,2 种试剂都有反应,报告 HBsAg 双试剂阳性;如 2 种试剂皆无反应,则报告 HBsAg(-);当 2 种试剂检测结果不一致时,用有反应的试剂再进行双孔检测,双孔检测皆有反应或其中一孔有反应,则报告 HBsAg 单试剂阳性。

1.3.2 核酸检测 将献血者的血液 6 人份混合提取核酸进行病毒核酸检测,混检无阳性反应,判定 6 份标本核酸检测均阴性;如混检有阳性,再分别提取各自的核酸进行核酸扩增,如果核酸扩增无阳性反应,判定 HBV DNA(-),如果核酸扩增有阳性反应,则判定该

标本 HBV DNA(+)

1.3.3 OBI 确认 对 HBsAg(-)/HBVDNA(+)献血者进行 HBsAb、HBeAb、HBcAb 检测,对 3 种抗体全阴献血者进行追踪回访。每次回访时采集 2 份血液标本,1 份用于检测 HBsAg,1 份用于检测 HBV DNA。在随访检测中如果出现 HBsAg 检测阳性,该献血者被视为感染窗口期;如果随访检测一直是 HBsAg(-)/HBVDNA(+),则被认为是 OBI。

1.3.4 病毒核酸提取和基因扩增 使用高通量病毒提取试剂盒,吸取追踪试验中确认的 OBI 血浆 2.5 ml 提取 DNA。根据文献^[8]报道的引物和反应条件采用巢式 PCR 扩增 HBV S 基因片段,扩增片段长度为 496 bp。外引物序列:5'-AGAACATCGCATCAGGACTC-3'和 5'-CATAGGTATCTTGCGAAAGC-3'。反应参数:94℃ 5 min;94℃ 45 s、55℃ 1 min、72℃ 60 s,循环 10 次;94℃ 45 s、53℃ 1 min、72℃ 90 s,循环 15 次;72℃ 10 min,共 35 个循环;内引物序列:5'-AGGACCCCTGCTCGTGTAC-3'和 5'-AGATGATGGGATGGGAATAC-3',以第一轮 PCR 产物为模版,第二轮 PCR 反应参数设置 94℃ 5 min;94℃ 45 s、57℃ 1 min、72℃ 90 s,循环 10 次;94℃ 45 s、55℃ 1 min、72℃ 60 s,循环 25 次;72℃ 10 min。对第 2 轮 PCR 产物进行电泳分析、对电泳出现扩增条带的产物送湖州鼎晶独立检测实验室进行序列测定。

1.4 统计学分析 采用 Microsoft Excel 2010 和 SPSS 22.0 软件进行统计处理,不同性别、年龄、献血次数的差异采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义

2 结果

2.1 研究队列 2020 年 1 月—2021 年 5 月共有无偿献血 51 809 人次,标本经筛查 HBsAg(-)/HBVDNA(+)标本共 59 份,经随访确认 OBI 患者共 56 例。其中男性 31 603 人次,占总献血人数 61.0%,确认 OBI 41 例,感染率为 0.13%(41/31 603);女性献血者 20 206 人次,占总献血人数 39.0%,确认 OBI 15 份,感染率为 0.07%(15/20 206),不同性别的 OBI 感染率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。初次献血者 27 925 人次,其中确认 OBI 25 例(感染率为 0.09%);重复献血者 23 884 人次,确认 OBI 31 例(感染率为 0.13%),两者感染 OBI 比例相比较差异也无统计学意义($P>0.05$)。不同年龄组献血者 OBI 确认比例比较差异有统计学意义($P<0.001$),以 41~50 岁年龄组 OBI 感染率最高(0.23%),18~30 岁年龄组 OBI 感染率则最低(0.03%),见表 1。

表 1 2020 年 1—5 月湖州市无偿献血者中 OBI 感染情况分布

特征	献血人数	百分比(%)	OBI 感染人数	感染率(%)	χ^2 值	P 值
性别					3.516	0.061
男	31 603	61.00	41	0.13		
女	20 206	39.00	15	0.07		
年龄(岁)					26.506	<0.001
18~	12 085	23.32	4	0.03		
31~	21 453	41.40	15	0.07		
41~	10 732	20.71	25	0.23		
≥51	7 539	14.60	12	0.16		
献血次数						
初次	27 925	53.89	25	0.09	1.933	0.164
重复	23 884	46.10	31	0.13		
合计	51 809	100.00	56	0.11	/	/

2.2 OBI 感染者的血清学特征 经确诊的 56 例 OBI 感染者标本经血清标志物检测发现 7 种血清学模式,其中以单 HBcAb 阳性出现例数最高,共 18 例,占比 32.14%;HBsAb 和 HBcAb 同时阳性出现例数次之,为 15 例,占比 26.79%;出现例数最低的是 HBsAb 和 HBeAb 同时阳性,仅 1 例,占比 1.79%;血清学标志物全阴 8 例,占比 14.28%,见表 2。

表 2 2020 年 1—5 月湖州地区无偿献血者 OBI 血清学模式

模式	例数	构成比(%)
HBsAb(+)	3	5.36
HBcAb(+)	18	32.14
HBsAb(+),HBcAb(+)	15	26.79
HBcAb(+),HBeAb(+)	7	12.50
HBsAb(+),HBeAb(+)	1	1.79
HBsAb(+),HBcAb(+),HBeAb(+)	4	7.14
全阴	8	14.28
合计	56	100.00

2.3 OBI 标本 S 基因突变分析 56 份标本血浆经提取核酸并扩增,电泳发现有 38 份标本在近 500 bp 附近出现特异性条带,将这 38 份 PCR 扩增产物进行 S 基因核酸序列测定,将获得的序列与 GenBank 数据库相应序列比对,对 S 基因高变区(main hydrophilic region,MHR)和外区进行氨基酸突变分析发现在 MHR 外区和 MHR 共有 12 处基因位点发生了突变,高频率(频率>10%)基因突变位点有 8 处,见表 3。

表 3 38 份 OBI 献血者 S 基因位点突变情况

区域	突变位点	频率(n,%)
MHR 外区	T45A	3(7.9)
	V47G/E	5+1(15.8)
	N52D	2(5.3)
	I68T	4(10.5)

续表 3

区域	突变位点	频率(n,%)
MHR	C78S	1(2.6)
	F85S	6(15.8)
	L110I	3(7.9)
	R160K	6(15.8)
	V177A	4(10.5)
	Q129H	5(13.2)
	M133T/L	7+2(23.7)
	S143T	7(18.4)

3 讨论

OBI 是 HBV 感染中存在的一种特殊形式,在健康人群中也就占有一定比例^[9-10]。OBI 可通过献血等造成 HBV 的传播从而成为潜在传染源^[11]。HBcAb(+),HBsAb(+)与 OBI 有一定的关系,特别是 HBcAb(+)与 OBI 有明显的关联性^[12-13]。据 Satake 等^[14]报道,HBsAg(-)患者输入带有 HBV 的血液后,会有 2%~18%的患者感染上乙型肝炎,并且患者输入 HBcAb(+)的 OBI 血液比输入 HBV 窗口期献血者的血液引起 HBV 感染的风险要大得多。HBcAb(+)常常被认为是既往感染的标志,当 HBcAb(+)时,表示病毒感染可能处于慢性感染期或恢复期,单独 HBcAb(+)可能是 OBI 存在的标志^[15]。本文对 56 例 OBI 患者标本的 HBV 感染免疫标志物进行研究,发现 7 种血清学模式,其中以单 HBcAb(+)出现例数最多,占比 32.14%;HBsAb 和 HBcAb 同时阳性出现例数次之,占比 26.79%;另外,各种血清标志物阳性中,HBcAb(+)率最高,达 78.57%(44/56),其次是 HBsAb(+),达 41.07%(23/56),与相关报道基本一致^[12,16-17]。西方一些国家将 HBcAb 作为血液筛查项目之一,但由于我国属于 HBV 高发地区,HBcAb 阳性率在献血者中的比例要高于 60%^[18],若将 HBcAb 作为血液筛查项目,势必造成一定的血源流失。由此可见,NAT 检测显得更为重要,通过 NAT 检测可减少甚至避免 OBI 引起的输血风险,大大提高临床用血安全。

从献血人群一般资料来看,男女感染 OBI 比例比较差异无统计学意义($P>0.05$),与此前报道一致^[19]。不同年龄组献血者 OBI 感染比例比较差异有统计学意义($P<0.001$),其中以 41~50 岁年龄组 OBI 感染率最高(0.23%),18~30 岁年龄组 OBI 感染率则最低(0.03%),与相关文献报告一致^[19]。这可能与我国从 1992 年开始对 0、1 和 6 个月的新生儿强制性实施乙肝计划免疫,18~30 岁人群大多数按计划接种过 HBV 疫苗等因素有关。

OBI 形成机制目前尚未完全清楚,一般认为可能与基因突变特别是 HBV S 基因变异有一定关系^[20]。研究表明 S 基因突变是以血浆 HBsAg(-) 为特点的 OBI 重要形成机制之一^[21-22]。因为 HBsAg 由 HBV 基因组的 S 基因编码,特别是在“a”决定簇区域(氨基酸 124-147 区域),分布着重要的抗原表位,对维持 HBsAg 的抗原性具有特殊意义,是血清学诊断试剂检测所针对的主要位点。这些区域氨基酸突变均能引起免疫逃逸,从而影响 HBsAg 的检测,会导致献血者体内存在 HBV 却检测不到 HBsAg 现象。本研究对 38 例 OBI 患者的标本进行 HBV S 基因序列检测和氨基酸变异分析发现 HBV MHR 的 M133T/L, S143T, Q129H 均出现高频率突变,同时发现 MHR 外区也存在 5 处(V47G/E, I68T, F85S, R160K, V177A) 氨基酸高频率突变。有文献报道^[23] MHR 外区区域的氨基酸变异也可能影响 HBsAg 检测结果,甚至导致检测失败。

综上所述,本研究结果表明在献血者中存在一定比例的 OBI,其原因是多方面的,为避免出现 OBI 以及病毒其他变异出现逃避检测的问题,供血系统应采用高灵敏性检测方法,以提高血液传染病的检出能力,降低输血传播疾病的风险。

参考文献

- [1] 李鸽,王洁,鲍艳婷,等.慢性乙型肝炎 HBsAg 及 HBsAg/HBVDNA 比值与组织病理炎症活动度的相关性[J].中华肝脏病杂志, 2015, 23(1): 40-45.
- [2] Liang X, Bi S, Yang W, et al. Epidemiological serosurvey of hepatitis B in China-declining HBV prevalence due to hepatitis B vaccination [J]. Vaccine, 2009, 27(4): 6550-6557.
- [3] 吴晓敏,全巧云,刘伟.慢性乙型肝炎的免疫治疗[J].临床肝胆病杂志, 2019, 35(11): 2569-2572.
- [4] 黄爱琼.核酸检测在献血者标本内乙肝病毒检测中的应用价值分析[J].中国实用医药, 2020, 15(14): 53-54.
- [5] 王娜,方建华,刘玉振.乙肝表面抗原阴性核酸阳性无偿献血者的特点[J].河南医学研究, 2020, 29(25): 4753-4756.
- [6] 叶贤林,许晓绚,张若皓,等.献血者 HBsAgELISA 弱阳性 NAT 阴性标本的乙肝感染确证研究[J].中国输血杂志, 2019, 32(9): 866-869.
- [7] 邓雪莲,陈辉,王新梅,等.电化学发光法进行 HBsAg 阳性确认的可行性及应用研究[J].中国输血杂志, 2016, 29(8): 806-811.
- [8] 张锋,张琼,林碧,等.无偿献血者隐匿性乙肝感染病毒变异检测分析[J].中国卫生检验杂志, 2017, 27(6): 804-807.
- [9] 姚晴青,董晓莲,王学才,等.浙江省农村自然人群隐匿性乙型肝炎病毒感染(OBI)情况及进化特征分析[J].复旦学报(医学版), 2013, 40(5): 534-540.
- [10] Delfino CM, Berini C, Eirin ME, et al. New natural variants of hepatitis B virus among Amerindians from Argentina with mainly occult infections[J]. J Clin Virol, 2012, 54(2): 174-179.
- [11] 周豪杰,李然,游冉冉.乙肝表面抗原阴性而核酸阳性献血者血液的安全性评估[J].包头医学院学报, 2017, 33(7): 4-5, 21.
- [12] Allain JP, Mihaljevic I, Gonzalez-Fraile MI, et al. Infectivity of blood products from donors with occult hepatitis B virus infection[J]. Transfusion, 2013, 53(7): 1405-1415.
- [13] 张宏,郑欣,吴桂丹,等.HBsAg-/HBV-DNA+献血者生物学分布特征的研究[J].中国输血杂志, 2014, 27(8): 838-842.
- [14] González R, Torres P, Castro E, et al. Efficacy of hepatitis B virus (HBV) DNA screening and characterization of acute and occult HBV infections among blood donors from Madrid, Spain [J]. Transfusion, 2010, 50(1): 221-230.
- [15] 吴落颖,蔡刚,林佳菲,等.隐匿性乙型肝炎炎患者乙肝病毒 preS/S 基因突变分析[J].中华微生物学和免疫学杂志, 2011, 31(8): 724-728.
- [16] 樊璐.隐匿性乙肝病毒血液核酸筛查及血清学特性分析[J].实验与检验医学, 2015, 33(5): 584-587.
- [17] 王东,邓雪莲,周璐,等.大连地区无偿献血者隐匿性乙型肝炎病毒感染 pre-S/S 区基因分析[J].中国输血杂志, 2015, 28(1): 26-31.
- [18] Candotti D, Allain JP. Transfusion-transmitted hepatitis B virus infection [J]. J Hepatol, 2009, 51(4): 798-809.
- [19] 许晓绚,郑欣,熊文,等.乙肝疫苗免疫 HBsAg 阴性献血者的血液传播 HBV 风险研究[J].中国输血杂志, 2019, 32(10): 988-992.
- [20] Huang CH, Yuan Q, Chen PJ, et al. Influence of mutations in hepatitis B virus surface protein on viral antigenicity and phenotype in occult HBV strains from blood donors[J]. J Hepatol, 2012, 57(4): 720-729.
- [21] 顾红芳,梁晓华,郑雪莲,等.乙型肝炎病毒 PreS/S 基因突变的研究进展[J].中国输血杂志, 2020, 33(1): 89-91.
- [22] 孙妮,谢毓滨,张会平,等.长沙地区无偿献血人群隐匿性乙型肝炎病毒感染情况分析[J].实用预防医学, 2022, 29(5): 560-563.
- [23] Coleman PF, Chen YC, Mushahwar IK. Immunoassay detection of hepatitis B surface antigen mutants[J]. J Med Virol, 2012, 59(1): 19-24.

收稿日期: 2021-09-29