

HBsAg ELISA 阴性血液中 HBV DNA、HBVNRAg 检测情况及 HBV 基因变异分析

吕岳峰¹, 朱志斌², 黄升中², 高兰², 唐瑶³, 谭梅娟¹, 杨丽华¹

1. 湖南省第二人民医院、湖南省临床检验中心, 湖南 长沙 410007;

2. 湖南省常德市中心血站; 3. 湖南圣湘生物科技有限公司

摘要: **目的** 研究献血者 HBsAg ELISA 筛查阴性血液中 HBV 漏检情况, 分析漏检血液中 HBV 基因型、血清型及 S 区基因变异与漏检的关系。 **方法** 收集从 2013 年 11 月-2015 年 10 月 HBsAg ELISA 筛查阴性血液 31 184 份, 以高敏 HBV DNA 及 HBV 核酸相关抗原 (HBVNRAg) 方法检测; 测定分析 HBV DNA 阳性者 HBV 基因序列。 **结果** 31 184 份标本中, HBVNRAg 全部阴性, HBV DNA 阳性 82 例, 检出率 0.26% (82/31 184), 其中, HBV B 型 79 例 (79/82, 96.3%), C 型 3 例 (3/82, 3.7%)。血清型全部为 adw (82/82, 100%); 检测到 27 个样本分别存在 S 区突变 (27/82, 32.9%), 其中的 21 个氨基酸位点突变都集中在主要亲水区 (major hydrophilic region, MHR) HBsAg 第 99~169 位氨基酸之间。主要突变位点有 S 区 133 号氨基酸位点 (7/82, 8.5%); 126 号位 (6/82, 7.3%); 161 号位 (5/82, 6.1%); 134 号位 (4/82, 4.8%); 145 号位 (2/82, 2.4%), 其他还检测到 121、122、125、128、129、131、132、140、143、150、156、157、158、159、164、166 共计 21 个氨基酸位点 47 种突变。 **结论** HBVNRAg 对血筛意义不大, HBsAg 第 99~169 位氨基酸之间 MHR 免疫逃逸变异是导致酶免法筛查漏检的主要原因之一, 其它漏检可由血液中 HBsAg 浓度较低而检测试剂灵敏度不够等原因引起。血液筛查加入核酸检测方法, 能够有效减少单独酶免法检测漏检现象, 显著提高血液安全性。

关键词: 献血者; HBV; HBsAg; HBV DNA; HBVNRAg; 主要亲水区; S 区基因变异

中图分类号: R446.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2017)06-0662-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2017.06.006

HBV DNA and HBVNRAg detection and HBV gene mutation in HBsAg negative blood screened by ELISA

LYU Yue-feng*, ZHU Zhi-bin, HUANG Sheng-zhong, GAO Lan, TANG Yao, TAN Mei-juan, YANG Li-hua

*The Second People's Hospital of Hunan Province, Hunan Center for Clinical Laboratory, Changsha, Hunan 410007, China

Abstract: **Objective** To investigate the HBV positive rate and the reasons of HBsAg miss detection in the HBsAg negative blood donors screened by ELISA, and to analyze the features of HBV genotypes and serotypes as well as the relationship between amino acid substitution of HBsAg S region and the ELISA miss detection. **Methods** A total of 31,184 HBsAg negative blood samples screened by ELISA were collected from November 2013 to October 2015 and tested for HBV DNA and HBV nucleus-related antigen (HBVNRAg). HBV gene sequence was then determined and analyzed in HBV DNA positive samples. **Results** All the 31,184 HBsAg negative blood samples were HBVNRAg negative. 82 samples were HBV DNA positive, with a detection rate of 0.26% (82/31,184). Among the 82 samples, 79 (79/82, 96.3%) had HBV genotype B and 3 (3/82, 3.7%) had HBV genotype C. All samples had serotype adw. S mutations were detected in 27 (27/82, 32.9%) samples, among which 21 amino acid mutation sites were located in 99a.a.-169a.a. at major hydrophilic region (MHR) of S protein, with the major sites at 133 a.a. (7/82, 8.5%), 126 a.a. (6/82, 7.3%), 161 a.a. (5/82, 6.1%), 134 a.a. (4/82, 4.8%) and 145 a.a. (2/82, 2.4%). 47 mutations were also detected in 21 amino acid sites (121, 122, 125, 128, 129, 131, 132, 140, 143, 150, 156, 157, 158, 159, 164, 166). **Conclusions** For blood donor screening, HBVNRAg detection is not significant. One of the main reasons of ELISA miss detection is the immune escape mutation of MHR located in 99-169 amino acid sites. Other reasons may be low blood HBsAg concentration and insensitive detection reagent. HBV DNA detection in blood screening can effectively reduce the miss detection rate by ELISA alone and significantly improve blood safety.

Key words: blood donor; HBV; HBsAg; HBV DNA; HBVNRAg; major hydrophilic region; S gene mutation

HBV 是引起输血感染的最主要病原体,HBsAg 是血站按国家规定对献血者血液进行筛查的主要项目。在 2015 年前,国内采供血机构对献血者血液传播疾病项目的筛查大部分仅采用酶免试剂进行 HBsAg 及 HCV、HIV 和梅毒初复筛,阴性结果者方可进入临床供患者治疗使用,但酶免法由于方法学限制,尚存在较高漏检现象^[1-5]。为探索一种新的 HBV 核酸相关抗原检测方法在血液筛查中的价值,以及了解采用高敏 HBV 核酸扩增试验在 HBsAg ELISA 阴性血液中的检出情况,查找分析漏检与 HBV 基因变异关系等原因,特对 31 184 份 HBsAg ELISA 阴性献血者血液以 HBV 核酸相关抗原(HBVNRAg)和高敏 HBV 核酸扩增两种方法检测,并对漏检的阳性者进一步测定基因序列和分析,现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 资料来源 本次研究共收集 2013 年 11 月-2015 年 10 月间湖南省常德市中心血站检测的 HBsAg ELISA 阴性血液 31 184 份,年龄从 18~60 岁,其中男性 19 147 名,占 61.4%,女性 12 037 名,占 38.6%。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂与仪器 HBsAg ELISA 检测试剂盒(北京万泰生物药业股份有限公司及厦门英科新创公司),HBVNRAg ELISA 试剂(北京万泰生物药业股份有限公司);HBsAg 及 HBV DNA 质控品,购自北京康彻思坦生物技术有限公司。Taq 酶(rTaq 酶,大连宝生物工程公司);DNA 提取试剂(北京金麦格生物公司);PCR 产物胶回收试剂盒(德国 QIAGEN 公司);HBV 核酸检测试剂(瑞士 Roche Diagnostics)。Xantus150 加样器(瑞士 Sias 公司),FAME24/20 后处理(瑞士 HAMILTON 公司);Uranus AE 200 全自动酶免分析仪(深圳爱康生物科技有限公司);Roche cobas s 201 HBV/HCV/HIV 和 HIV 1/HCV 核酸检测系统(瑞士 Roche Diagnostics);Biomek NX96 通道核酸提取工作站(美国/Beckman Coulte);C1000™ Thermal Cycler 及 T100™ Thermal Cycler(美国 BIO-RAD 公司)。

1.2.2 检测方法 ①对 HBsAg ELISA 阴性血液进行 HBV 核酸相关抗原(HBVNRAg)及高敏 HBV DNA 检测。②获得 HBV DNA 全长 S 区序列的检测数据:先以 HBsAg ELISA 试剂对血液进行初筛,初筛后的 HBsAg 阴性者做 HBV 核酸相关抗原(HBVNRAg)与 HBV DNA 核酸检测,其中 HBV DNA 阳性者再行 HBV S 区基因测序,分析 S 区基因变异情况。

1.2.3 分析 HBV S 区基因变异时氨基酸变异位点确

认原则 由 HBV S 基因编码的小 HBsAg 是 HBV 包膜蛋白的主要成分,由 226 个氨基酸组成,是 HBV 感染后首先出现的血清标志物之一。HBsAg 蛋白序列中有些氨基酸片段或位点与其抗原性和生物学功能等密切相关^[6]。结构示意图见图 1。

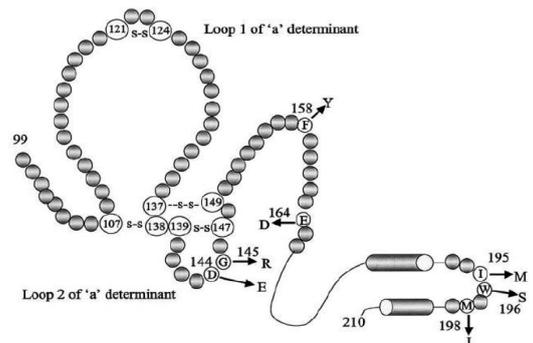


图 1 HBsAg 蛋白结构示意图

1.2.4 HBsAg 血清型的定义 HBV 血清型是由 S 区第 122 和 160 两个位点氨基酸的类型决定的,122 位的氨基酸为 K/R 对应血清型 d/y,而 160 位的 K/R 对应 w/r^[7]。不论何种血清型,其“a”抗原决定簇是共有的,因此,HBV 的主要血清型被命名为 adr、adw、ayr 和 ayw。

1.2.5 多态性位点及变异的定义 所有序列在某一位置若仅有 1 种野生型氨基酸,则该位点被定义为保守位点;若有 2 种以上可能的野生型氨基酸,则被定义为多态性位点,这种现象则被称为氨基酸多态性^[8]。例如,位于 HBsAg 第 126 位的氨基酸在 HBV 基因 B 型野生株为 T,而在基因 C 型为 I,那么 s126 氨基酸位点就被视为多态性位点。若在某位点上出现野生共有序列(consensus sequence)上未曾出现过的氨基酸,则被定义为变异^[8]。

1.2.6 序列分析 对核苷酸序列和氨基酸序列采用 Bioedit5.0、DNASTar 软件及 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中的生物信息学工具进行分析。

2 结果

2.1 HBVNRAg 和 HBV DNA 检测情况 对 31 184 份 HBsAg ELISA 阴性血液进行 HBVNRAg 和 HBV DNA 检测的结果:HBVNRAg 均为阴性,而 HBV DNA 有 82 例阳性(82/31 184,0.26%),其中男性 49 人,年龄 19~53 岁;女性 33 人,年龄 18~51 岁。

2.2 基因型与血清型检测情况 对 82 例 HBV DNA 阳性结果的基因型、血清型以及 S 区突变情况进一步分析研究,其中 HBV B 型 79 例(79/82,96.3%),C 型 3 例(3/82,3.7%);对血清型的检测结果均为 adw;检

测到血清型相关位点 K122E 突变及 122 后插入 SR 突变一例。

2.3 S 区氨基酸变异位点检测情况 变异位点共检测到 27 个(27/82,32.9%)样本分别存在 S 区 21 个氨基酸位点的突变,都主要集中在主要亲水区(major hydrophilic region, MHR)的 HBsAg 第 99~169 位氨基酸之间。其中,变异检出率最高的是 S133 号氨基酸位点,突变率达到 8.5%(7/82 例);其次是 126 位,突变率为 7.3%(6/82);161 位突变率为 6.1%(5/82);134 号位为 4.8%(4/82);国外最常见的 G145R 突变在本次研究中仅检测到 2 例,占比 2.4%(2/82)。其他还检测到 121、122、125、128、129、131、132、140、143、150、156、157、158、159、164、166 共计 21 个氨基酸位点的突变。均集中在 MHR。其中存在 2 个及以上 S 区氨基酸位点变异的样本 12 例(12/82,14.6%)。

表 1 本次研究中 S 区主要变异位点及其对应 RT 区位点分析

HBsAg 重要变异位点	对应 RT 区位点	例数
二硫键形成位点		
sC121A	rtM129Q	1
sC121W	rtQ130E	1
免疫逃逸变异位点		
T125M	rtH133	2
sI126T(C 型)	rtD134	1
sT126A(B 型)	rtN134S	5
A128V	rtC136	1
Q129P	rtS137	1
sT131N	rtN139K/Q	1
sT132F	rtL140	1
sM133T	rtY141	5
sM133S	rtY141	2
sF134K	rtV142	1
sF134Y	rtV142	2
sF134R	rtV142	1
sT140I	rtY148	2
sT143M	rtF 151	2
sT143S	rtF 151	1
sG145A	rtR153	2
sI150T	rtY158	1
W156G	rtL164	1
A157G	rtG165	1

续表 1

HBsAg 重要变异位点	对应 RT 区位点	例数
F158S	rtF166	2
A159G	rtR167	1
Y161F	rtI169	5
A166G	rtM171	1
由 RT 区耐药变异引起的 S 区变异位点		
sE164D	rtV173L	1
血清型相关位点		
sK 122E		1
122 后插入 SR		1

3 讨论

本次研究对 31 184 份 HBsAg ELISA 阴性的献血者血液进行了 HBVNRAg、HBV DNA 检测,HBVNRAg 结果均为阴性,与 HBsAg ELISA 结果一致。HBVNRAg 是一种对 HBsAg 变异株有一定检出能力的新试验,对 eAg(-)慢性乙肝病例有较好的检出作用,可做 HBeAg 试剂的补充;在临床上对 HB 患者的抗病毒治疗中,它是在 DNA 转阴后仍然有一段时间能检出的指标,所以有一定的用药指导意义^[9-15],但本研究结果表明它在血液 HBV 筛查中主要意义在其特异性,对阳性者筛查价值不大。而 HBV DNA 检测则有 82 例(82/31 184, 0.26%),检出率处于既往报道值中间^[1-5],证实酶免法确实存在较高漏检;检出的 82 例阳性中,27 例(27/82,32.9%)存在 HBV S 区基因变异,分析表明其基因型与我国南方 HBV 以 B 型为主 C 型次之的情况相符合^[1-5],表明乙肝感染情况与其他地区无明显异常,研究的献血者样本具有普遍性研究价值。从基因序列进一步分析,这 27 例变异基因全部位于 HBV S 区的 MHR,国外广泛的研究表明,发生在该区域的任何一个氨基酸突变几乎均能导致 HBsAg 抗原性变化,这些变异被认为是导致病毒逃逸宿主免疫监控以及临床 HBsAg 抗原检测逃逸的主要原因^[8,16-17],据此可以推断本次研究中,32.9%的 HBsAg 漏检是由于 HBV S 区 MHR 99~169 位氨基酸的基因变异导致 HBsAg 决定簇表达异常所引起,而其余未检测到基因变异的漏检血样则应与血液中 HBsAg 浓度较低而试剂检测限不够等原因相关。

基因变异类型方面,国外最常见的是 G145R 突变,其他位点也常发生突变^[16-18]。国外相关研究 6 个公认的免疫逃逸位点(sP120、sT126(B 基因型)/sI126(C 基因型)、sI31T、sM 133、sD144、sG145)中^[17],本研

究检测到 126、131、133、145 位的四个位点氨基酸变异,变异检出率最高的是 S133 号氨基酸位点,突变率达到 8.5%(7/82 例);其次是 126 位,突变率为 7.3%(6/82);161 位突变率为 6.1%(5/82);134 号位为 4.8%(4/82);G145R 突变在本次研究中仅检测到 2 例,占比 2.4%(2/82)。研究结果与国外研究结果存在一定差异,可能与我国南方地区 HBV 主要感染型别为 B 型有关。

本研究中也检测到 1 例 sE164D 位的 S 区变异,由于 S 区基因完全包含于 RT 区内,sE164D 位的变异直接导致 RT 区 rtV173L 变异,这种 RT 区和 HBsAg 编码区变异相互影响被称作“镜像改变”^[19]。而 rtV173L 属于拉米夫定耐药变异位点,所以 S 区的免疫逃逸变异对 RT 区功能的影响也不容忽视。另外,本次研究还检测到血清型相关位点 K122E 突变及 122 后插入 SR 突变 1 例和二硫键形成位点 121 位的 2 例变异,122 位变异虽未引起 HBV 血清型的变化,但也导致了 HBsAg 的抗原表位变化。121 位的变异将导致该位置半胱氨酸发生变异,使 HBsAg 不能形成二硫键,形成结构表位的变化,从而导致自身免疫和抗原诊断的逃逸^[20]。其他还检测到 125、128、129、131、132、140、143、150、156、157、158、159、166 非常见的 14 个氨基酸位点变异,这些位点在宿主免疫逃逸以及临床 HBsAg 检测诊断逃逸中的意义,值得今后在更大规模的相关研究中深入探讨。

综上所述,本次研究表明 HBsAg 酶免法筛查血液存在较高漏检率(0.26%,82/31 184),通过对漏检的 82 例 HBV DNA 阳性标本进行 HBV 基因测序分析,认为 HBsAg 第 99~169 位氨基酸之间的 MHR 免疫逃逸变异是导致酶免检测漏检的主要原因之一;而血液筛查加入核酸检测方法,能够有效减少单独酶免检测的漏检,提高血液安全。可喜的是,按国家卫生计生委要求,2015 年底血液筛查核酸检测已基本覆盖全国,此举将有效降低我国经血传染病传播水平。

志谢:感谢厦门大学国家传染病诊断试剂研究中心夏宁邵教授团队为本研究的基因序列测定实验所提供的帮助和贡献!

参考文献

- [1] 卢姗姗,徐东平,李进. HBV 前 S/S 基因突变的研究进展[J]. 传染病信息, 2016, 29(2):171-173.
- [2] 陈秉宇,沈健. HBsAg 阴性献血者 HBV-DNA 检测的临床意义[J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(10):1240-1241.
- [3] 叶贤林,李活,许晓绚,等. 核酸扩增技术在献血者血液 HBV DNA、HCV RNA 及 HIV-1 RNA 筛查中的应用研究[J]. 中国输血杂志, 2010, 23(1):6-10.
- [4] 黄建国,谢秀华,欧阳玲,等. HBsAg 阴性献血者人群 HBV 感染

的检测和输血残余风险分析[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(7):774-776.

- [5] 曾劲峰,郑欣,熊文,等. 核酸筛查后 HBsAg-/NAT+/HBV DNA-献血者标本的确认试验[J]. 中国输血杂志, 2013, 26(12):1215-1218.
- [6] Torresi J, Earnest L, Deliyannis G, et al. Reduced antigenicity of the hepatitis B virus HBsAg protein arising as a consequence of sequence changes in the overlapping polymerase gene that are selected by lamivudine therapy[J]. Virology, 2002, 293(2):305-313.
- [7] Echevarría JM, Avellón A. Hepatitis B virus genetic diversity[J]. Med Virol, 2006, 78(Suppl 1):S36-S42.
- [8] Borroto-Esoda K, Miller MD, Arterburn S. Pooled analysis of amino acid changes in the HBV polymerase in patients from four major adefovir dipivoxil clinical trials[J]. Hepatol, 2007, 47(4):492-498.
- [9] Yuan Q, Ge SX, Yan Q, et al. Establishment of a new combined enzyme immunoassay for detection of HBV prs1 and core antigens and the consistency with HBV DNA test. [J]. Bing Du Xue Bao, 2007, 23(4):252-257.
- [10] Kimura T, Rokuhara A, Matsumoto A, et al. New enzyme immunoassay for detection of hepatitis B virus core antigen (HBcAg) and relation between levels of HBcAg and HBV DNA[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(5):1901-1906.
- [11] Yuan Q, Ge SX, Xiong JH. A novel immunoassay for PreS1 and/or core-related antigens for detection of HBsAg variants[J]. J Virol Methods, 2010, 168(1-2):108-113.
- [12] 章述军,田德英,李晖,等. 联合检测 HBV 前 S1 抗原和核心抗原的临床意义[J]. 中西医结合肝病杂志, 2008, 18(1):74-77.
- [13] 王林川,于燕,徐莉. 乙型肝炎病毒核酸相关抗原检测及其临床意义[J]. 国外医学医学地理分册, 2011, 32(4):261-264.
- [14] Huang YH, Huang HH. Core antigen expression is associated with hepatic necroinflammation in e antigen-negative chronic hepatitis B patients with low DNA loads[J]. J Clin Vaccine Immunol, 2010, 17(1):33-35.
- [15] 胡伟,胡孝彬,代琼. 慢性乙型肝炎病毒感染者血清乙型肝炎病毒相关抗原检测的应用价值[J]. 实用医技杂志, 2013, 20(10):1055-1057.
- [16] Chinese Society of Hepatology, Chinese Medical Association, Chinese Society of Infectious Diseases, Chinese Medical Association. Guideline on prevention and treatment of chronic hepatitis B in China (2005) [J]. Chin Med J (Engl), 2007, 120(24):2159-2173.
- [17] Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009[J]. J Hepatol, 2009, 50(3):661-662.
- [18] Lok AS. Evolution of nucleoside/tide analogues for hepatitis B: Is the ideal drug here yet? [J]. J Hepatol, 2009, 51(2):416-418.
- [19] Sheldon J, Soriano V. Hepatitis B virus escape mutants induced by antiviral therapy[J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 61(4):766-768.
- [20] Villet S, Pichoud C, Billioud G, et al. Impact of hepatitis B virus rtA181V/T mutants on hepatitis B treatment failure [J]. J Hepatol, 2008, 48(5):747-755.

收稿日期:2016-11-17