

献血者 HBV 筛查模式的探讨*

何成涛¹ 张钰¹ 蔡杰¹ 徐保芳¹ 刘勇² 傅强¹ 孙俊艳³

【摘要】 目的:对献血者血液筛查 HBV 阳性样本进行深入分析,探讨献血者 HBV 筛查模式,以提高献血者 HBV 筛查的有效率,减少不必要的血液浪费。**方法:**收集 165 例经胶体金检测 HBsAg 阴性而 HBsAg 酶联免疫(ELISA)阳性和(或)HBV 核酸检测阳性的血液样本,定量检测其 HBV 血清学标志物,进行 HBV S 区序列分析。**结果:**2 种 ELISA 试剂检测为阳性的样本共 73 例(44.24%),抗-HBc 抗体阳性率为 90.41%,HBsAg 定量检测阳性率为 75.34%;仅 1 种 ELISA 试剂检测为阳性的样本共 68 例(41.21%),抗-HBc 抗体阳性率为 26.47%,HBsAg 定量检测阳性率为 1.47%;HBsAg 定量检测阳性样本中 79.31%的 HBsAg 低于 10 IU/mL;共扩增出 35 例 HBV S 区片段,30 例确定为 HBV C 型基因,5 例确定为 B 型基因,未发现影响 HBsAg 检测的突变。**结论:**HBV 病毒载量、HBsAg 水平极低可导致 HBV 筛查假阴性,而单独 1 种 ELISA 试剂检测 HBsAg 存在较多假阳性结果。实验室可结合 HBV 检测方法 & 检测试剂的性能验证结果,制订适合自身的检测策略。

【关键词】 乙型肝炎病毒;血液筛查;献血者

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2022.08.010

【中图分类号】 R512.6;R457.1 **【文献标志码】** A

Discussion of test strategy for HBV blood screening of blood donors

HE Chengtao¹ ZHANG Yu¹ CAI Jie¹ XU Baofang¹ LIU Yong²
FU Qiang¹ SUN Junyan³

(¹Nanjing Red Cross Blood Center, Nanjing, 210003, China; ²Department of Laboratory Medicine, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing University Medical School; ³Huai an Blood Centre)
Corresponding author: LIU Yong, E-mail:liuyongbio@126.com

Abstract Objective: To analyze the samples which were positive by blood screening for HBV of blood donors, improve the efficiency of blood donor screening and reduce unnecessary blood waste. **Methods:** Totally 165 samples with non-reactive results by colloidal gold detection HBsAg but reactive results by HBsAg ELISA test and/or HBV NAT were collected. The serological markers for HBV infection were further quantitative assessed by chemiluminescent microparticle immunoassay (CLIA). The viral S regions were amplified by nested PCR and then analyzed. **Results:** In total 73 samples (44.24%) were HBsAg reactive with two ELISA kits, in which 90.41% were positive for anti-HBc and 75.34% were positive for HBsAg quantitative detection. Totally 68 samples (41.21%) were just HBsAg reactive with one ELISA kits, in which the positive rate of anti-HBc and HBsAg quantitative detection were 26.47% and 1.47%, respectively. 79.31% of HBsAg quantitative positive samples were less than 10 IU/mL. A total of 35 cases of HBV S region were amplified, 30 cases were identified as HBV C gene, 5 cases were identified as HBV B gene, and no mutations that affected the detection of HBsAg were found. **Conclusion:** The extremely low HBV DNA load and HBsAg titer were the cause of false negatives in the blood screening of blood donor. However, there would be many false positives in samples with a single ELISA kit reactive. Test strategy should be generated according to the results of performance verification of methods and reagents for HBV test.

Key words hepatitis B virus; blood screening; blood donor

我国是 HBV 感染的高发区,在献血者血液筛查中 HBV 检测占重要地位,也是目前我国在献血

者筛查中屏蔽献血者的重要原因^[1]。《血站技术操作规程(2019 版)》规定的献血者 HBV 检测策略为至少采用核酸和血清学试剂各进行 1 次检测(对 HBV 酶免检测反应性的标本可不再进行核酸检测,直接视为检测结果不合格)。在献血者筛查中,因 HBV 检测不合格报废的血液约占不合格血液的 30%,是血液报废的主要原因^[2-3]。本研究对此类血液进行进一步分析,探讨在满足《血站技术操

*基金项目:南京市卫生科技发展医药卫生科研项目(No: YKK18180);淮安市自然科学研究计划项目课题(No: HABZ201914)

¹南京红十字血液中心(南京,210003)

²南京大学医学院附属南京鼓楼医院中心实验室

³淮安市中心血站

通信作者:刘勇,E-mail:liuyongbio@126.com

作规程(2019 版)》基本要求的前提下,献血者 HBV 的筛查模式,以提高献血者 HBV 筛查的有效率,减少不必要的血液浪费。

1 资料与方法

1.1 对象

收集 2019 年 1 月至 2019 年 12 月因 HBV 筛查不合格报废的无偿献血者血样 165 份。留样及检测等均按照《血站技术操作规程(2019 版)》要求执行。

1.2 试剂与仪器

乙型肝炎病毒表面抗原/梅毒螺旋体抗体联合检测试剂(英科新创科技股份有限公司),乙型肝炎病毒表面抗原诊断试剂盒(英科新创科技股份有限公司、上海科华生物工程股份有限公司),乙型肝炎病毒血清学标志物(包括 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb)定量检测试剂盒(美国 Abbott 公司),乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒(1 型)核酸检测试剂盒(PCR-荧光法)(上海科华生物工程股份有限公司),血浆 DNA 提取试剂盒(QIAamp DNA Blood MiNi Kit,德国 QIAamp),TAKAR Taq DNA 核酸扩增 PCR 酶[宝日医生物技术(北京)有限公司],DNA 凝胶回收试剂盒(天津擎科生物技术有限公司)。所有试剂均在有效期内使用。Sigma-6K15 型离心机(德国 Sigma),Microlab STAR 全自动加样仪(瑞士 HAMILTON),全自动酶免分析系统 FAME24/20(瑞士 HAMILTON),Microlab STAR^{IVD} 混样提取设备(瑞士 HAMILTON),ABI 7500(美国 ApplidBiosystems),ARCHITECT I2000SR 全自动免疫分析仪(美国 Abbott),ABI 2720 PCR 扩增仪(美国 ApplidBiosystems),BIO-RAD 电泳仪及凝胶成像仪(美国 BIO-RAD)。

1.3 试验方法

1.3.1 献血者 HBV 初筛 献血前采用胶体金检测方法对献血者进行 HBsAg 初筛,步骤及结果判读依照试剂说明书执行,结果阴性后进行血液采集。采血时旁路留样,留取 3 管血液样本,每管 5 mL,用于后续检测。第 1 管采用 EDTA 抗凝真空管留取,第 2 管采用核酸检测专用带分离胶 EDTA 抗凝真空管留取,第 3 管采用带分离胶促凝真空管留取。

1.3.2 献血者 HBV 检测 ① HBsAg 酶联免疫检测采用 2 种不同厂家的酶联免疫(ELISA)试剂盒同时对初筛合格献血者留取样本进行 HBsAg 检测,依照试剂说明书执行,检测 S/C. O. ≥ 1 为阳性。② HBV DNA 检测采用 PCR-荧光法进行 HBV DNA 检测。对 8 份 ELISA 检测结果阴性的血液样本进行混样检测,如混样检测结果为阳性,对混样的 8 份样本逐个进行单样本检测。检测步

骤按说明书执行,测定 CT < 40 为阳性。③ HBV 血清学标志物定量检测对 HBsAg 检测(ELISA)和(或)HBV DNA 检测结果为阳性的样本采用化学发光微粒子免疫分析(CMIA)技术,应用 ARCHITECT i2000SR 仪器及配套试剂定量检测 HBV 血清标志物,包括 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb。④ HBV S 区序列分析采用 QIAamp DNA Blood MiNi Kit 提取 HBsAg 检测(ELISA)阳性和(或)HBV DNA 检测阳性样本的血浆 DNA,巢式 PCR 扩增 HBV S 区片段基因,所用引物见表 1。2 轮循环 PCR 反应体系体积均为 50 μ L,其中 DNA 模板 5 μ L,引物浓度为 50 pmol/ μ L。PCR 扩增产物使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后观察结果。PCR 结果阳性样本的 PCR 产物纯化后送北京擎科生物科技有限公司采用 Sanger 测序技术进行 DNA 序列测定,并分别用 NCBI 服务器中的 HBV 标准序列(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/view.cgi?db=2>)进行 BLAST 同源性检索及基因树分析,确定 HBV 的基因型,并将序列与 HBV 标准株进行比较,确定变异情况。

表 1 巢式 PCR 扩增 HBV S 区片段基因所用引物

序号	引物序列	
第 1 轮	S-1stF	5'AGAACATCGCATCAGGACTC3'
	S-1stR	5'CCCCACTGT(T/C)TGGCTTTCAG3'
第 2 轮	S-2ndF	5'TCGTGTACAGGCGGGTTT3'
	S-2ndR	5'CGAACCACTGAACAAATGGC3'

2 结果

2.1 HBV 检测不合格血液样本构成分析

共收集初筛检测阴性而 ELISA 检测 HBsAg 和(或)HBV DNA 检测阳性样本 165 例。其中 2 种 ELISA 试剂均为阳性且 HBV DNA 检测也为阳性的样本(2ELISA + NAT+)共 26 例;2 种 ELISA 试剂均为阳性,而 HBV DNA 检测为阴性的样本(2ELISA + NAT-)共 47 例;1 种 ELISA 试剂检测结果为阳性,且 HBV DNA 检测也为阳性的样本(1ELISA + NAT+)3 例;仅 1 种 ELISA 试剂检测结果为阳性的样本(1ELISA + NAT-)共 68 例;2 种 ELISA 试剂检测均为阴性,仅 HBV DNA 检测为阳性的样本(2ELISA - NAT+)共 21 例,具体构成见表 2。

2.2 HBV 血清学标志物定量检测结果

165 例样本 HBeAg 定量检测均为阴性。HBsAg 定量检测阳性样本数为 58 例,其中 55.17% (32/58)样本的 HBsAg 值低于 1 IU/mL,79.31% (46/58)样本的 HBsAg 值低于 10 IU/mL。58 例 HBsAg 定量检测阳性样本的抗-HBc 均为阳性。

50 例 HBV DNA 检测阳性 (NAT+) 样本中, 90.00% (45/50) 的抗-HBc 结果为阳性。2 种 ELISA 检测 HBsAg 均为阳性 (2ELISA+) 的 73 例样本中, 抗-HBc 阳性率为 90.41% (66/73)。68 例仅 1 种 ELISA 检测 HBsAg 阳性且 HBV DNA 检测为阴性 (1ELISA+) 的样本中, 抗-HBs 阳性率为 54.41% (37/68), 抗-HBc 阳性率为 26.47% (18/68), 其中抗-HBs 和抗-HBc 均为阳性的比率为 19.12% (13/68)。上述 68 例 (1ELISA+) 样本中仅有 1 例 HBsAg 定量结果为阳性 (0.2 IU/mL), 其抗-HBs 为阴性而抗-HBc 阳性。HBV 血清学标志物定量检测结果见表 2。

2.3 HBV S 区序列分析

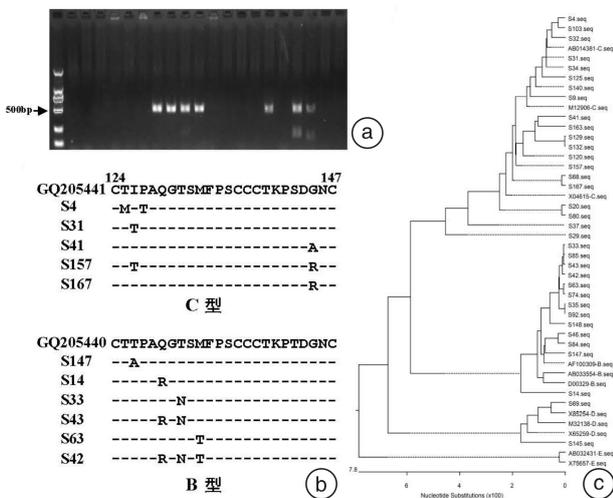
165 例样本共扩增出 35 例 HBV S 区片段, 其中 2ELISA+ NAT+ 样本 19 例、2ELISA+

NAT- 样本 5 例、1ELISA+ NAT+ 样本 1 例、1NAT+ 样本 10 例。将测定的 HBV DNA 序列与基因库中已知不同基因型 HBV 标准基因序列进行基因树比较, 见图 1。35 例样本中有 20 例确定为 HBV C 基因型, 13 例确定为 B 基因型, 2 例确定为 D 基因型。PCR 产物测序结果与对应 HBV 基因型序列同源性均在 97% 以上, 重点分析 HBV S 区“a”决定簇变异情况, 发现 11 例 (31.4%, 11/35) 样本存在变异, 变异位点有 I126T, G145R, Q129R, T131N 及 M133T 等; 进一步分析显示这 11 例样本中 2ELISA+ NAT+ 样本 7 例、2ELISA+ NAT- 样本 3 例、1ELISA+ NAT+ 样本 1 例, 其中 8 例 (72.7%, 8/11) 样本的 HBsAg 值低于 1 IU/mL。

表 2 HBV 血清学标志物定量检测结果

%(例/例)

结果	例数/ 例 (%)	HBsAg			抗-HBs 阳性率	抗-HBe 阳性率	抗-HBc 阳性率
		HBsAg 阳性率	0.05~1.00 IU/mL	1.00~10.00 IU/mL			
2ELISA+NAT+	26 (15.76)	96.15 (25/26)	60.00 (15/25)	28.00 (7/25)	3.85 (1/26)	80.77 (21/26)	100 (26/26)
2ELISA+NAT-	47 (28.48)	63.83 (30/47)	46.67 (14/30)	23.33 (7/30)	4.26 (2/47)	78.72 (37/47)	85.11 (40/47)
1ELISA+NAT+	3 (1.82)	66.67 (2/3)	100 (2/2)	0	0	66.67 (2/3)	100 (3/3)
1ELISA+NAT-	68 (41.21)	1.47 (1/68)	100 (1/1)	0	54.41 (37/68)	11.76 (8/68)	26.47 (18/68)
2ELISA-NAT+	21 (12.73)	0	/	/	19.05 (4/21)	19.05 (4/21)	76.19 (16/21)
合计	165 (100.00)	35.15 (58/165)	55.17 (32/58)	24.14 (14/58)	26.67 (44/165)	43.64 (72/165)	62.42 (103/165)



a: 部分样本巢式 PCR 产物凝胶电泳结果; b: 样本 HBV S 区“a”决定簇氨基酸 GQ205441 及 GQ205440 为 HBV 野生株来源序列; c: 35 例样本与 HBV 标准基因序列的基因树分析。

图 1 HBV S 区序列分析结果

3 讨论

我国目前仍是 HBV 高流行地区, 为有效切断 HBV 的输血传播, 对献血者血液进行 HBV 筛查, 报废潜在有引起 HBV 传播的血液就显得尤为重要^[4]。另一方面, 我国目前仍面临血源紧缺的问题, 减少不必要的血源浪费也是需要进一步解决的问题^[1]。本研究发现在胶体金法检测 HBsAg 阴性而经 HBV ELISA 和 HBV DNA 检测阳性报废的血液样本中, ELISA 检测 HBsAg 阳性样本占 87.27%, 是判定血液不合格的主要原因, 与冯瑾等^[2]报道相符。在 HBsAg 定量检测阳性样本中, 79.31% HBsAg 值低于 10 IU/mL, 而胶体金法检测 HBsAg 的最低检出量是 5 IU/mL, 提示 HBsAg 水平较低仍是胶体金法检测 HBsAg 出现假阴性的原因。由此可见, 仍需进一步提升胶体金法 HBsAg 初筛检测的灵敏性, 以减少不必要的血液采集。

本研究中因 HBV 检测阳性报废的血液样本, 1ELISA+ 样本占主要比例。在所有 1ELISA+ 样

本中,超过95%的样本经HBsAg定量检测和HBV DNA检测结果呈阴性,显著高于2ELISA+的样本,推测仅1种ELISA试剂检测HBsAg阳性的样本中存在一定的假阳性情况,与以往报道相符^[5-6]。HBsAg阴性而抗-HBc阳性是既往感染HBV的标记,且感染恢复后体内抗-HBc可长期呈现阳性。本研究中2种ELISA试剂检测阳性和(或)HBV DNA阳性的样本中,抗-HBc阳性率均在80%以上,而1种ELISA试剂检测阳性的样本中抗-HBc阳性率仅为26.47%,进一步证明1种ELISA试剂检测阳性可能存在较多的假阳性结果。抗-HBs阳性而抗-HBc阴性通常见于接种过HBV疫苗人群,这类人群HBsAg阳性的情况极为罕见^[4]。而本研究中仅1种ELISA试剂检测HBsAg阳性的样本中抗-HBs阳性而抗-HBc阴性的比例高达35.29%,进一步证明存在较多的HBsAg假阳性情况。建议对仅1种ELISA试剂检测阳性的样本可增加HBsAg的定量检测或不同厂家试剂的重复检测,同时进行HBV DNA检测,必要时可结合抗-HBs及抗-HBc检测,以减少因HBsAg检测假阳性导致的血液报废,避免不必要的血液浪费,这也与深圳血液中心的最新研究结果类似^[7]。在所有报废的血液样本中,HBeAg均为阴性,而所有抗-HBe阳性的样本抗-HBc也均为阳性,说明目前不采用HBeAg及抗-HBe进行血液筛查的策略是科学的。

有报道显示HBV S区变异,尤其是“a”决定簇的变异与HBsAg检测假阴性和隐匿性HBV感染的发生有关^[8-9]。本研究中31.4%的样本中存在“a”决定簇的变异,其中G145R, Q129R, T131N及M133T等变异可导致HBsAg的分泌减少或检测灵敏性的降低^[10-12],但本研究中有约70%的样本未发现“a”决定簇的变异,可见病毒变异可能仅是HBsAg和HBV DNA检测假阴性的原因之一。但本研究未能扩增出所有NAT阳性样本的HBV S区片段,且在部分NAT阴性的样本中扩增出HBV S区片段,可能是由于病毒含量低所致,因为目前混检法NAT检测HBV DNA的灵敏度为5 IU/mL,与巢式PCR扩增HBV DNA的灵敏度相当^[13]。同时血浆定量结果显示大部分样本HBsAg水平均小于10 IU/mL,是由于HBV病毒载量低,因而产生的HBsAg量极少,且受检测试剂灵敏度影响,导致HBsAg检测假阴性^[14]。

按照《血站技术操作规程(2019版)》规定,采供血机构应至少采用核酸和血清学试剂各进行1次检测。本研究结果提示,1种ELISA试剂检测结果存在较多假阳性,导致不必要的血液报废;而NAT检测阴性的样本可能存在低水平的HBsAg,产生漏检风险。笔者认为各采供血机构应结合自身具体情况,对选用的HBV检测方法 & 检测试剂性能进行验证,明确检出限,正确评估检

测结果的准确性,必要时可结合抗-HBs及抗-HBc进行分析,在满足《血站技术操作规程(2019版)》要求的前提下,制订适合自身实验室的检测策略,提高检测灵敏度的同时尽可能避免不必要的血液报废。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Shi J. Status analysis and evaluation of the blood scrap rate from 2015-2017 for a blood center in China[J]. *Transfus Clin Biol*, 2020, 27(3):109-114.
- [2] 冯瑾,刘璇.成都地区无偿献血者的职业分布及检测不合格情况调查[J]. *中国输血杂志*, 2019, 32(4):376-378.
- [3] 王乐,汪峰,莫艳萍,等.无偿献血者血液HBsAg、抗-HCV、抗-HIV和抗-TP不合格情况分析 & 研究[J]. *临床血液学杂志*, 2021, 34(4):263-267.
- [4] 中华医学会感染病学分会.中华医学会肝病学会.慢性乙型肝炎防治指南(2019年版)[J]. *临床肝胆病杂志*, 2019, 35(12):2648-2669.
- [5] 冯涛,朱胜江,朱绍汶,等.献血者HBsAg ELISA筛查单试剂假阳性的原因分析[J]. *中国实验血液学杂志*, 2020, 28(4):1386-1390.
- [6] 庞栋,申卫东,张翔,等.ELISA筛查单试剂反应献血者追踪检测[J]. *中国输血杂志*, 2014, 27(4):381-383.
- [7] Ye X, Zhao Y, Li R, et al. High Frequency Occult Hepatitis B Virus Infection Detected in Non-Resolved Donations Suggests the Requirement of Anti-HBc Test in Blood Donors in Southern China[J]. *Front Immunol*, 2021, 12:699217.
- [8] Ye X, Li T, Li R, et al. Molecular characteristics of HBV infection among blood donors tested HBsAg reactive in a single ELISA test in southern China[J]. *BMC Infect Dis*, 2021, 21(1):83.
- [9] Kuhns MC, Holzmayer V, Anderson M, et al. Molecular and Serological Characterization of Hepatitis B Virus(HBV)-Positive Samples with Very Low or Undetectable Levels of HBV Surface Antigen[J]. *Viruses*, 2021, 13(10):2053.
- [10] Wang H, Wang M, Huang J, et al. Novel hepatitis B virus surface antigen mutations associated with occult genotype B hepatitis B virus infection affect HBsAg detection[J]. *J Viral Hepat*, 2020, 27(9):915-921.
- [11] Ye X, Li T, Shao W, et al. Nearly half of Ultrio plus NAT non-discriminated reactive blood donors were identified as occult HBV infection in South China[J]. *BMC Infect Dis*, 2019, 19(1):574.
- [12] Tang Y, Liu X, Lu X, et al. Occult Hepatitis B Virus Infection in Maintenance Hemodialysis Patients: Prevalence and Mutations in "a" Determinant[J]. *Int J Med Sci*, 2020, 17(15):2299-2305.
- [13] Liu Y, Li P, Li C, et al. Detection of hepatitis B virus DNA among accepted blood donors in Nanjing, China[J]. *Virology*, 2010, 7:193.
- [14] 何成涛,庞蓉蓉,马成平,等.2015—2017年血液筛查室间质评结果分析[J]. *临床血液学杂志*, 2019, 32(8):614-617.

(收稿日期:2022-01-21 修回日期:2022-04-08)