

• 论 著 •

佛山地区无偿献血人群人细小病毒 B19 感染情况分析*

严军雄¹, 伍伟健^{2△}, 周健欣², 卢 瑾²

(1. 佛山市第四人民医院, 广东佛山 528000; 2. 佛山市中心血站, 广东佛山 528000)

摘 要:目的 了解佛山地区无偿献血人群人细小病毒(HPV)B19 感染现状。方法 采用 ELISA 检测血液中的 HPV B19 IgG 和 IgM 抗体,并用 PCR 检测抗体阳性标本 HPV B19 DNA。结果 368 例无偿献血者标本中检出 HPV B19 IgG 阳性 92 例,阳性率为 25.00%;检出 HPV B19 IgM 阳性 2 例,阳性率为 0.54%,两者比较差异有统计学意义($P<0.01$)。94 例抗体阳性标本中,检测 HPV B19 DNA 阳性 4 例,阳性率为 4.26%。结论 佛山地区无偿献血人群存在较高的 HPV B19 既往感染率,急、慢性感染率较低,慢性感染者 HPV B19 病毒载量较低。

关键词:无偿献血者; 人类细小病毒 B19; 血清学检测; 实时荧光定量 PCR

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.08.010

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)08-1039-03

Human parvovirus B19 detection in voluntary blood donors of Foshan City*

Yan Junxiong¹, Wu Weijiang^{2△}, Zhou Jiangxin², Lu Jin²

(1. The Fourth People's Hospital of Foshan, Foshan, Guangdong 528000, China; 2. Foshan Blood Center, Foshan, Guangdong 528000, China)

Abstract:Objective To investigate the infection status of human parvovirus B19(HPV B19) in voluntary blood donors of Foshan City. **Methods** The HPV B19 IgG and IgM antibodies of voluntary blood donors were detected by using ELISA. Real-time PCR assay was applied to detect HPV B19 DNA on HPV B19 IgG and/or IgM antibody positive specimens. **Results** There were 92 HPV B19 IgG positive cases in 368 specimens, positive rate was 25.00%; and the HPV B19 IgM positive cases were 2, positive rate was 0.54%. 4 positive cases were detected in 94 antibody positive specimens, positive rate was 4.26%. **Conclusion** HPV B19 infection of blood donation person in Foshan is high, new infections and chronic infection rate are low. HPV B19 viral loads are low in people with chronic infection.

Key words: blood donors; human parvovirus B19; serological determination; real time PCR

人细小病毒 B19(HPV B19)是直径为 20~30 nm 无囊膜包裹,3 500 碱基组成的单链 DNA 病毒,属细小病毒科嗜红细胞病毒属^[1]。1975 年在献血者的血清中首次被发现,目前研究已经证实 HPV B19 可引起人类多种疾病^[2],有经血液传播的风险^[3],由于我国未将 HPV B19 纳入献血者血液检测项目中,故目前未见佛山市无偿献血人群 HPV B19 感染相关研究数据。为调查当前采血模式下佛山地区无偿献血人群 HPV B19 感染现状和病毒载量,笔者对无偿献血人群采用 ELISA 检测 HPV B19 抗体,采用 PCR 检测 DNA 水平,获得了本市无偿献血人群 HPV B19 感染相关研究数据,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 血液标本 随机选取非团体无偿献血者 368 例,其中男 208 例、女 160 例,年龄 18~57 岁,抽取静脉血液 10 mL,分别置于 2 支一次性试管(EDTA 抗凝,其中 1 支为核酸检测专用管)各 5 mL,离心取血浆待检。

1.2 试剂与仪器 主要仪器包括酶免全自动前处理器(STAR3-2931 型,瑞士 HAMILTON 公司)、全自动酶标仪(Anthos240rt 型,奥地利 Anthos 公司)、实时荧光 PCR 仪(Bio-Rad CFX96 型,美国 Bio-Rad 公司)。ELISA 检测试剂:HPV B19 IgG 和 IgM 抗体试剂盒(美国 WKSUBIO 公司产品)。PCR 试剂盒(上海之江生物科技股份有限公司产品),PCR 特异性引物与探针:上游引物 5'-GGC ATG GTT AAC

TGG AAT AA-3',下游引物 5'-TGC AGC ACT GTC AAC AGC ACT-3',Taqman 荧光探针。

1.3 方 法

1.3.1 献血者的筛选 严格按照《献血者健康检查要求》《血站技术操作规程(2012 版)》和市中心血站质量标准、标准操作规程筛选献血者,采集低危献血者血液。

1.3.2 HPV B19 IgG 和 IgM 抗体检测 采用 ELISA 分别检测 HPV B19 IgG 和 IgM,严格按试剂说明书进行,检测标本 A 值(S)/CO<1 为阴性,S/CO≥1 为阳性。

1.3.3 HPV B19 DNA 检测 抗体阳性标本采用 Real time RT-PCR 检测 HPV B19 DNA。标本和对照品核酸裂解处理:标本 50 μL 分别加入 50 μL 核酸提取液,震荡混匀 10 s,99 ℃ 水浴 10 min,13 000 r/min 离心 10 min,保留上清液备用,H₂O 为阴性对照,阳性对照品作 10 倍、100 倍、1 000 倍梯度稀释。试剂配制:取 HPV B19 核酸荧光 PCR 检测混合液与 1 μL 内部对照品,加入 0.4 μL 酶(Taq+UNG)震荡混匀 10 s,3 000 r/min 离心 10 s。加样:取混合液 36 μL 置于 PCR 管中,加入样品处理上清液、H₂O 和阳性对照品各 4 μL 分别加入 PCR 管。反应程序:37 ℃,2 min;94 ℃,2 min;40 个循环:93 ℃,15 s,58 ℃,30 s,60 ℃,30 s。单点荧光检测在 60 ℃,制备溶解曲线:65 ℃,5 s;0.5 ℃/s 升温至 95 ℃。荧光通道检测选择:FAM 和 HEX(或 VIC/JOE)通道。

* 基金项目:广东省佛山市卫生和计划生育局科技项目(2014160)。 作者简介:严军雄,男,主管检验技师,主要从事血液检测和输血技术研究。 △ 通讯作者,E-mail:wwjzqcn1@163.com。

1.4 统计学处理 采用多个样本率比较的 χ^2 检验和四格表 χ^2 检验(当 $n \geq 40$, 理论频数 $1 \leq T < 5$ 时, 对 χ^2 值进行连续性校正; 当 $n \geq 40$, 理论频数 $T < 1$ 时, 采用四格表的 Fisher 确切检验法), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 抗体检测结果 如表 1 所示, 368 例无偿献血者标本中检出 HPV B19 IgG 阳性 92 例, 阳性率为 25.00%; 检出 HPV B19 IgM 阳性 2 例, 阳性率为 0.54%, 男女性别间比较差异无统计学意义($P > 0.05$); IgG 与 IgM 阳性率比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。如表 2 所示, 按年龄分组, 两组间 IgG 阳性率比较差异有统计学意义($P < 0.05$), IgM 阳性率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 不同性别 HPV B19 IgG 和 IgM 的检测结果					
性别	n	HPV B19 IgG		HPV B19 IgM	
		阴性数	阳性[n(%)]	阴性数	阳性[n(%)]
男	208	158	50(24.04)	207	1(0.48)
女	160	118	42(26.25)	159	1(0.63)
合计	368	276	92(25.00)	366	2(0.54)

表 2 不同年龄人群间 HPV B19 IgG 和 IgM 的检测结果					
年龄段 (岁)	n	HPV B19 IgG		HPV B19 IgM	
		阴性(n)	阳性[n(%)]	阴性(n)	阳性[n(%)]
18~<35	227	180	47(20.70)	226	1(0.44)
35~57	141	96	45(31.91)	140	1(0.71)
合计	368	276	92(25.00)	366	2(0.54)

2.2 DNA 检测 94 例抗体阳性标本中, 检测 HPV B19 DNA 阳性 4 例, 阳性率为 4.26%, 经四格表的 Fisher 确切检验, 按组间抗体阳性比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 94 例 HPV B19 IgG 和 IgM 阳性标本 HPV B19 DNA 检测结果比较				
项目	n	阴性 (n)	阳性 [n(%)]	病毒载量(copy/mL)
HPV B19 IgG 阳性	92	90	2(2.17)	$> 1 \times 10^6$
HPV B19 IgM 阳性	2	0	2(100.00)	$(1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4)$
合计	94	90	4(4.26)	—

—: 该项无数据。

3 讨 论

HPV B19 是唯一致人感染的细小病毒, 多表现为隐性感染, 可引起小儿免疫型血小板减少症(ITP)、儿童传染性红斑、孕妇贫血、流产、死胎, 成人关节炎或关节病、贫血、肝炎、再生障碍性贫血危象等严重疾病^[4-6]。HPV B19 是一种容易变异的病毒, 对热稳定, 56℃ 30 min 仍可存活, 对甲醛敏感, 对常规血浆灭活方法不敏感^[6]。国内血液制品生产工艺中使用了灭活/去除 HPV B19 的方法, 但有研究中筛查的原料血浆及血液制品中仍检出了 HPV B19 DNA^[7]。国内多地开展了 HPV B19 检测的研究性实验。王志效等^[8]检测济宁地区无偿献血者 HPV B19 IgG 抗体、IgM 抗体阳性率分别为 36.15%、5.94%, 抗体阳性标本 DNA 阳性率为 0.83%。鲍海娥等^[9]检测三峡地区献血员 HPV B19 IgG 阳性率 43.36%, HPV B19

IgM 阳性率 2.46%。刘运保等^[10]检测 376 例广东瑶族献血者血液, HPV B19 IgG 阳性率为 29.26%, 42 例 HPV B19 IgG 阳性血液中 HPV B19 DNA 阳性率为 9.52%。检测结果显示, 不同地区献血人群均存在着 HPV B19 感染。

遏制经输血传播疾病是血液安全的重要任务。欧洲药品管理局(EMA) 2011 年发布的《血浆衍生制品指南》要求病毒灭活血浆和抗-D 免疫球蛋白需进行 B19 核酸检测^[11], 欧洲药典要求病毒灭活血浆 B19 水平应小于 10^4 IU/mL^[11]。但除了我国《血站技术操作规程(2012 版)》规定必检的项目(HBV 表面抗原或 DNA、HCV 抗体或 RNA、HIV 抗体或 RNA、梅毒抗体)外, HPV B19 等多种经血传播疾病未经检测, 对血液制品的安全构成了一定的威胁, 直接影响用血者的健康。目前, 本市采供血机构已经建立了完善的血液质量管理体系, 采血前对献血者进行详细的健康征询, 对有流感样、红斑、急性关节炎、贫血、肝炎等症状者严格筛选, 坚持从低危献血者中采集血液。本市 HPV B19 IgG 阳性率远高于 IgM, IgG 阳性率组间年龄结果比较, 高龄组高于低龄组, 显示既往感染率较高, 急、慢性感染率均较低, 慢性感染率与年龄呈正相关。IgM 抗体阳性组 DNA 检出率明显高于 IgG 阳性组, 与王志效等^[8]报道相一致。IgM 可用于 HPV B19 感染的急性期检测, 本试验 HPV B19 IgM 阳性 2 例病毒载量均大于 1×10^6 copy/mL, 提示有较强的传染性; IgG 阳性率略低于省内其他地区, HPV NDA 检测阳性 2 例, 病毒载量低于 IgM 阳性标本病毒载量。若高 HPV B19 病毒载量的血液输给患者, 可能会造成患者感染。

目前临床用量不断上升, 血液供求关系紧张, 如果全部献血者血液均进行 HPV B19 IgG 筛查, 则血液的阳性率大大攀升, 大量安全的血液将被报废浪费, 而且 Kleinman 等^[12]研究数据表明含 B19 特异性抗体的成分血在 HPV B19 DNA $< 10^6$ IU/mL 时不会导致感染 HPV B19。凌辉生等^[13]初步建立了 HPV B19 IgM 抗体间接 ELISA 检测方法。建立 HPV B19 IgM 加 HPV B19 DNA 的血液筛查模式, 则更有利于遏制 HPV B19 通过输血传播, 需要解决的问题是降低 HPV B19 相关检测试剂盒的费用, 提高试剂特异性和减少假阳性率。同时, 采供血机构应建立 HPV B19 IgM 抗体阴性和病毒核酸检测阴性的资料库, 使孕妇、婴幼儿、免疫力低下者、再生障碍性贫血危象等患者得到更加安全、有效的血液。

参考文献

[1] Brown KE. The expanding range of parvoviruses which infect humans[J]. Rev Med Virol, 2010, 20(4): 231-244.

[2] 彭燕. 人微小病毒 B19 及其研究新进展[J]. 现代医药卫生, 2013, 29(7): 1021-1023.

[3] Hourfar MK, Mayr-Wohlfart U, Themann A, et al. Recipients potentially infected with parvovirus B19 by red blood cell products[J]. Transfusion, 2011, 51(1): 129-136.

[4] 李亚飞, 赵晓明, 卢洁, 等. 人微小病毒 B19-DNA 定量检测在儿童免疫性血小板减少症中的意义[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2015, 20(1): 38-40, 44.

[5] 周惠玲, 程秀华, 甘燕玲, 等. 妊娠早期人微小病毒 B19 感染对孕妇血液系统的影响[J]. 贵阳医学院学报, 2015, 37(2): 20-23.

[6] Corcoran A, Doyle S. Advances in the biology, diagnosis and host-pathogen interactions of parvovirus B19[J]. J Med Microbiol, 2004, 53(Pt 6): 459-475.

[7] 郑荣斌, 余燕. 血液制品中人细小病毒 B19 基因的检测与分析[J]. 中国医药科学, 2015, 5(13): 151-153. (下转第 1043 页)

患者 24 h 血清 PSA 水平轻度升高,这些报道与本研究结果相一致。研究同时提示患者种族、年龄、腺体大小、膀胱镜的指征和发现等都对血清 PSA 水平的术前术后比较不产生影响。

本研究发现活检术后 24 h 患者血清 TPSA 和 FPSA 水平明显升高,因活检术 17 例患者中 10 例确诊为前列腺癌而行抗肿瘤治疗。血清 TPSA 和 FPSA 水平因受治疗的影响,对研究活检术的影响作用产生干扰,第 3 天后的检测值与术前无可比性,不再进行比较。前列腺活检术后血清 PSA 水平明显升高。然而其血清 PSA 水平升高程度及持续时间的研究报道略有不同。文献[2,5,11]报道,前列腺活检术后血清 PSA 水平升高约 10 倍,PSA 水平升高程度及持续时间与活检取材的位点和数量多少相关,而与前列腺体积大小及是否恶变无关。文献[4,12]报道,血清 PSA 水平和 FPSA/TPSA 的比值在活检术后 1 h 明显升高。但其变化程度在良/恶性肿瘤分组比较中没有明显差异。活检术后 24 h 血清 PSA 水平明显升高,且至少持续 1 周的时间,血清 FPSA 水平术后回归基线的时间比 TPSA 快得多。

本研究显示 TURP 术后血清 TPSA 和 FPSA 水平明显升高,术后 24 h 达高峰,而后回落,术后 7 d 血清 TPSA 和 FPSA 水平较术后 24 h 降低约 60%,第 14 天达基线水平,甚至检测不到。而 Oberpenning 等^[13]报道,14 例耻骨上前列腺切除术和 10 例经膀胱前列腺根治术患者术后 15 min 血清 TPSA 和 FPSA 明显升高。TPSA 分别升高 1.2 倍和 1.3 倍,而 FPSA 分别升高 4.3 倍和 7.9 倍,提示 TPSA 术后升高幅度较 FPSA 小,但下降速度较缓慢。本研究结果与其他研究结果有所不同的原因可能是切除的前列腺组织大小、位点和数量不同。切除腺体越大,损伤面积越大,可能其流入血液的 PSA 越多,另一原因可能因术后标本采集时间不同所致。Fonseca 等^[14]报道, TURP 术后 60 d,血清 TPSA 平均下降 71%。这可能是因 TURP 术后前列腺体积明显缩小,其分泌 PSA 的功能明显降低。血清 TPSA 水平的变化与其切除前列腺体积的大小、位点和数量及随访时间长短有关。

本研究的局限性在于纳入研究的样本量偏小,以及受个体、种族、年龄、前列腺腺体体积大小等生物因素的影响,使研究结果可能存在一定的偏差。这有待于进一步的扩大样本量进行研究。

总之,泌尿系统疾病的诊断及治疗操作,如导尿术、膀胱镜、前列腺切除术、活检术等可能引致血清 PSA 水平的变化。未来研究泌尿系统疾病各种诊治操作对血清 PSA 水平的影响时,应根据其可能对前列腺体造成损伤程度的不同适当延长随访时间。

参考文献

[1] 巩蓓,雷婷,张曼.比较载脂蛋白 A-1 在前列腺癌和前列腺增生中

的表达[J].国际检验医学杂志,2015,36(2):150-152.

- [2] Falzarano SM, Ferro M, Bollito E, et al. Novel biomarkers and genomic tests in prostate Cancer: a critical analysis[J]. Minerva Urol Nefrol, 2015, 67(3): 211-231.
- [3] 李鸣. CUA 与 EAU, AUA, NCCN 前列腺癌诊断治疗指南不同点及讨论[J]. 现代泌尿生殖肿瘤杂志, 2012, 4(2): 126-127.
- [4] 钟晨阳, 刘明, 邓庶民, 等. 相关因素对血清前列腺特异性抗原 (PSA) 影响的临床意义[J]. 中国医师杂志, 2003, 5(4): 458-460.
- [5] Harvey P, Basuita A, Endersby D, et al. A systematic review of the diagnostic accuracy of prostate specific antigen [J]. BMC Urol, 2009, 9(1): 14-16.
- [6] Long R, Giri S, Diver S, et al. Effect of prostate manipulation on the serum levels of complexed prostate-specific antigen and total prostate-specific antigen[J]. Int J Urol, 2006, 13(7): 947-950.
- [7] Elabbady AA, Khedr MM. Free/total PSA ratio can help in the prediction of high gleason score prostate Cancer in men with total serum prostate specific antigen (PSA) of 3-10 ng/mL[J]. Int Urol Nephrol, 2006, 38(3/4): 553-557.
- [8] Kravchick S, Bunkin I, Peled R, et al. Patients with elevated serum PSA and indwelling catheter after acute urinary retention: prospective study of 63 patients with 7-year follow-up[J]. J Endourol, 2007, 21(10): 1203-1206.
- [9] Erdogan K, Gurdal M, Tekin A, et al. The effect of urethral catheterisation on serum prostate-specific antigen levels in male patients with acute urinary retention[J]. Yonsei Med J, 2003, 44(4): 676-678.
- [10] Decastro BJ, Baker KC. Effect of flexible cystoscopy on serum Prostate-Specific antigen values[J]. Urology, 2009, 73(2): 237-240.
- [11] Morgan T, Palapattu G, Wei J. Screening for prostate cancer-beyond total PSA, utilization of novel biomarkers[J]. Curr Urol Rep, 2015, 16(9): 63-66.
- [12] Salinas M, López-Garrigós M, Flores E, et al. Differences in prostatic specific antigen request patterns in primary care setting: a pilot study in Spain[J]. Arch Esp Urol, 2015, 68(6): 554-560.
- [13] Oberpenning F, Schmid HP, Fuchs-Surdell W, et al. The impact of intraoperative manipulation of the prostate on total and free prostate-specific antigen[J]. Int J Biol Markers, 2002, 17(3): 154-160.
- [14] Fonseca RC, Gomes CM, Meireles EB, et al. Prostate specific antigen levels following transurethral resection of the prostate[J]. Int Braz J Urol, 2008, 34(1): 41-48.

(收稿日期:2016-01-08)



(上接第 1040 页)

- [8] 王志效,周贝贝,张娜,等. 济宁地区无偿献血者人细小病毒 B19 感染的相关研究[J]. 公共卫生与预防医学, 2015, 26(3): 4-7.
- [9] 鲍海斌,杨伯家,潘修银,等. 三峡地区献血人员人细小病毒 B19 感染率调查[J]. 临床血液学杂志:输血与检验, 2015, 28(2): 289-291.
- [10] 刘运保,梁伟文,喻红玲,等. 瑶族无偿献血者人细小病毒 B19 感染研究[J]. 中国输血杂志, 2014, 27(3): 306-307.
- [11] Jia J, Ma Y, Zhao X, et al. Prevalence of human parvovirus B19 in Chinese plasma pools for manufacturing plasma derivatives[J].

Virol J, 2015, 12(1): 162-164.

- [12] Kleinman SH, Glynn SA, Lee TH, et al. A linked donor-recipient study to evaluate parvovirus B19 transmission by blood component transfusion[J]. Blood, 2009, 114(17): 3677-3683.
- [13] 凌辉生,储迅涛,曾敏霞. 人细小病毒 B19 IgM 抗体间接 ELISA 检测方法的初步建立[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(5): 583-585, 588.

(收稿日期:2016-01-05)