

計畫編號：DOH92-DC-1017

行政院衛生署疾病管制局九十二年度委託研究計畫

在臺灣 anti-HBc 陰性受血者輸血後急性 B 型肝炎的發生率  
-前瞻性研究及 NAT 之價值(第二年)

## 委 託 研 究 成 果 報 告

執行機構： 國立台灣大學

研究主持人：劉俊人 醫師

共同主持人：高嘉宏 教授、羅仕琦 醫師

研究人員： 曾品聰

執行期間：92 年 1 月 1 日至 92 年 12 月 31 日

\* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見 \*

# 目 錄

	頁 碼
封面	
目錄	( 1 )
中文摘要	( 2-4 )
英文摘要	( 5-7 )
本文	
一、前言	( 8-10 )
二、材料與方法	( 11-15 )
三、結果	( 16-19 )
四、討論	( 20-22 )
五、結論與建議	( 23 )
六、參考文獻	( 24-26 )

共 ( 26 ) 頁

## 中文摘要：

輸血或血液成份治療已被確認是很基本的醫療行為。然而自一大群人收集到的血液卻不免帶有一些隱藏的感染性病原體，且可能經由輸血傳染給受血者。為減少經輸血感染病毒，目前以血清酵素免疫法(EIA)篩檢血液中病毒抗原或人體產生的抗體，是可以有效地減少病毒感染的辦法。然而少數受血者仍會因接受處於血清陰性空窗期的含病毒血液而得到感染。因此，需找尋更有效方法來保障輸血的安全性。

在已開發或開發中國家，對捐血者篩檢 B 型肝炎的策略並不同。在已開發國家，捐血者需接受 HBsAg 和 anti-HBc 檢測，任一項目陽性的患者會被摒除在捐血者之列。此策略在 B 型肝炎感染率很低的已開發國家是可行的。相對地，在 B 型肝炎盛行的國家，此一篩選條件將會排拒大多數自願捐血者，因此不可能採用。所以在這些國家地區(包括台灣)，捐血者僅被篩選目前是否仍有 B 型肝炎持續感染的跡象(HBsAg 陽性和 ALT 值升高)，而不檢測是否過去得過 B 型肝炎病毒感染(anti-HBc 陽性)。這些步驟已在台灣實施超過 20 年，也確實降低經輸血得到 B 型肝炎至相當低的程度。然而，新的病毒檢測技術 (PCR 法或相關技術如 nucleic acid testing (NAT)) 卻發現即使 HBsAg 陰性但過去曾得過 B 型肝炎的患者(anti-HBc 陽性)中約 10-30% 的人在血液或血液細胞中存有 HBV DNA。即使 anti-HBc 和 anti-HBs 皆為陽性的人當中，仍有 5~15% 可藉由 NAT 法找到 HBV DNA。從這些觀察，我們必須重新探討當這些含 HBV DNA 的血輸入受血者的後果為何？這也是一個很獨特的情況去了解含低濃度 HBV DNA 的血液經輸血後會有多高的感染能力。臺灣地區自 1984 年起，逐步全面實施 B 型肝炎疫苗注射，成效卓著，但疫苗注射十幾年後，有些人的 anti-HBs 效價已下降，甚至偵測不到。我們也很有興趣了解經疫苗注射產生過 anti-HBs 但效價降低的青少

年，經輸血接觸到 HBV 的後果。

為了研究臺灣地區 anti-HBc 陰性患者經輸血得到急性 B 型肝炎病毒感染的發生率，第一年計劃中，我們已前瞻性篩選約 5300 位受血者並收集了 370 位 anti-HBc 陰性受血者；第二年計劃中，我們繼續前瞻性篩選 3028 位受血者並再收集了 228 位 anti-HBc 陰性受血者。整體而言，個案合適率約為 7.2% ( $370+228/5300+3028$ )。其中 351 位 anti-HBc 陰性受血者完成輸血後一星期之追蹤，130 位 anti-HBc 陰性受血者完成輸血後三至六個月之追蹤。針對這 598 位 anti-HBc 陰性受血者，我們以即時 PCR 法 (real-time PCR) 偵測及定量輸血前後一系列的血清 HBV DNA 的結果顯示：(1) 598 位 anti-HBc 陰性受血者，輸血前 B 型肝炎病毒血症的發生率為 1.8% ( $11/598$ )；(2) 輸血前無 B 型肝炎病毒血症且接受後續追蹤的 340 位個案中，輸血後暫時性 B 型肝炎病毒血症的發生率則為 1.5% ( $5/340$ )；這 5 位受血者在輸血後六個月時皆無法在血清中偵測到 HBV DNA。當中，為了探討經疫苗注射產生過 anti-HBs 但效價降低的兒童及青少年(小於 15 歲)，經輸血接觸到 HBV 的後果，在兩年計畫中我們也收集了 73 位小於 15 歲且 anti-HBc 陰性的受血者，接受後續半年抽血追蹤者共 54 位，初步結果顯示；輸血前 B 型肝炎病毒血症的發生率為 1.4% ( $1/73$ )；輸血前無 B 型肝炎病毒血症之 anti-HBc 陰性受血者，輸血後暫時性 B 型肝炎病毒血症的發生率為 7.5% ( $4/53$ )；同樣地，這 4 位受血者在輸血後六個月時皆無法在血清中偵測到 HBV DNA。目前最後階段，我們正積極收集相關臨床資料並測試這些輸血後曾出現病毒血症患者的血清肝炎病毒標記，以釐清此病毒血症為單純的暫時性 B 型肝炎病毒血症 抑或為已經恢復的無症狀的 B 型肝炎病毒感染。同時，我們也將定量這 73 位小於 15 歲且 anti-HBc 陰性的受血者的輸血前 anti-HBs 濃度，以釐清 anti-HBs 濃度對輸血後 B 型肝炎病毒血症的影響。

我們的初步結果顯示 anti-HBc 陰性的受血者中約 2% 患者存有 B 型肝炎病毒血症。未曾接觸過 B 型肝炎病毒的受血者，在現行捐血政策下，有 1.5% 的機率會輸入含少量 HBV 的血液製品並造成暫時性 B 型肝炎病毒血症。在本前瞻性研究中合適個案有限的情形下，雖然並未發現輸血後急性 B 型肝炎的病例，但在現行的捐血決策下，國人經輸血暴露於 B 型肝炎病毒的機率的確高於歐美國家（五萬至十萬分之一）。這些重要訊息反映出應修訂現行的捐血決策以進一步減少經輸血暴露於 B 型肝炎病毒的機會。

中文關鍵詞(至少三個)：B 型肝炎病毒、核酸檢驗法、B 型肝炎表面抗原、B 型肝炎核心抗體、前瞻性研究、輸血

## **English Abstract:**

Blood components collected from a large population inevitably carry certain incipient or silent infections that may transmit to the recipients by transfusion. For reducing the transfusion-transmitted viral infections, currently, screening serological assays, such as enzyme immunoassay (EIA), have been the standard procedure. It effectively decreases the viral infections to around 0.2 per 100,000 transfused blood units for HIV, 1.0 per 100,000 transfused blood units for HCV and 1.6 per 100,000 transfused blood units for HBV. These cases are probably infected by blood from donors in the seronegative window periods of viral infections. So the pursuit for better blood transfusion safety continues. To reduce the transfusion-transmitted viral infections further, more sensitive test by nucleic acid amplification test (NAT) to directly detect viral genomes are advocated and even implemented in USA, Canada and Japan. This represents an important advance in blood safety control.

The screening program for HBV infection among blood donors differs between developed countries and developing countries that are endemic for hepatitis B infections. In developed countries, blood donors are screened for both hepatitis B surface antigens and also antibodies against hepatitis B core antigen (anti-HBc). People positive for either one are disqualified on the basis of evidence of ongoing or past infections. Such practice is feasible in developed countries in which hepatitis B infection rate is low (less than 3%). It also eliminates most of blood-transmitted hepatitis B. In contrast, in developing countries where hepatitis B is endemic, about 80-90% of adults have either past or ongoing hepatitis B infections. Such strict criteria will reject most of the volunteer blood donors and are impossible to implement. Therefore in such areas (including Taiwan), blood donors are screened only for evidence of ongoing infections by hepatitis B surface antigen and elevated ALT, but not for

past infections (by anti-HBc). This protocol has been carried out for more than 20 years in Taiwan and really reduced the transfusion-transmitted hepatitis B to a lower level. However, with the advent of new viral detection technology, especially the NAT, around 10-30 % of people with past hepatitis B infection seronegative for HBsAg actually harbored viral DNA in their blood or blood cells. Even in people positive for anti-HBs and anti-HBc, a conventional criteria for full-recovery from past hepatitis B infections, there are still 5-15% reported positive for HBV DNA by NAT, though at a very low titer. These observations call for re-evaluation of the current protocol to screen blood donors in Taiwan. It is imperative to know among blood donors qualified by current hepatitis B screening protocol, the prevalence of seropositive for HBV DNA. More important, what the consequences of transfusion of those HBV DNA positive blood into recipients? This is a very unique setting to understand the infectivity of blood containing a low titer HBV DNA by transfusion. In addition, since the launch of mass vaccination program to prevent HBV infection in Taiwan since 1984, the HBsAg carriage rate decreases dramatically. Nevertheless, the serum anti-HBs titer may drop significantly decade after the vaccination. It is also interestingly to know the outcome of exposing to foreign HBV in those vaccinated adolescent with low titer anti-HBs.

To study the prevalence of post-transfusion acute HBV infection in anti-HBc-seronegative recipients, we prospectively screened 8328 blood component recipients and collected 598 anti-HBc-negative recipients in this 2-year project. The overall eligibility rate was 7.2%. The hepatitis B viremic rate by real-time PCR before transfusion was 1.8% (11/598). Of the remaining 587 anti-HBc-negative and pre-transfusion non-viremic recipients, 340 recipients received 1-week post-transfusion follow-up and 203 patients completed the 3~6-month post-transfusion follow-up. By real-time PCR, the transient hepatitis

B viremic rate 1 week post-transfusion was 1.5% (5/340). None of the 5 recipients with transient viremia had developed abnormal serum ALT level during the 6-month follow-up period and none had detectable viremia at the 6th month follow-up. The serial serum hepatitis markers including HBsAg, anti-HBs, and anti-HBc will be examined soon in these recipients with pre- or post-transfusion hepatitis B viremia, to differentiate among simple transient viremia (or aborted infection), subclinical recovered HBV infection, and low-titered HBV carrier. To evaluate the outcome of exposing to low titer HBV DNA in the children or adolescents with low titer anti-HBs, we also collected 73 children and adolescents seronegative for anti-HBc in this project. Pre-transfusion hepatitis B viremic rate was 1.4% (1/73). Of the remaining 53 anti-HBc-negative and pre-transfusion non-viremic recipients, 53 recipients received 1-week post-transfusion follow-up and 44 patients completed the 3~6-month post-transfusion follow-up. By real-time PCR, the transient hepatitis B viremic rate 1 week post-transfusion was 7.5% (4/53). Again, none of the 4 recipients with transient viremia had developed abnormal serum ALT level during the 6-month follow-up period and none had detectable viremia at the 6th month follow-up. The pre-transfusion serum anti-HBs titer will be determined soon to clarify the impact of serum anti-HBs titer on the exposure to low-titered HBV.

Preliminarily, we found that about 2% of anti-HBc-negative blood recipients were actually hepatitis B viremic. Most importantly, about 1.5% of those recipients can develop hepatitis B viremia after transfusion. The exposure incidence is much higher than that in the United States or the Europe (1/50,000 ~1/100,000). This information will help deciding whether current practice programs are to be revised.

Keyword: Hepatitis B virus, nucleic acid testing (NAT), anti-HBc, transfusion



## 一、前言

輸血或血液成份治療已被確認是很基本的內科醫療行為。然而自一大群人收集到的血液卻不免帶有一些隱藏的感染性病原體如 HIV、HTLV-1、HBV 和 HCV, 且可能經由輸血傳染給受血者[1,2]。為減少經輸血感染病毒, 世界各國自 1970、1980、和 1990 年代相繼對捐血者進行 HBV、HIV、和 HCV 的篩檢[3,4]。目前以血清學酵素免疫法 (EIA) 篩檢血液中病毒的抗原或人體產生的抗體是被認可可以有效地減少病毒性感染的方法[5], 就 HBV 而言, 其機率已降至 1.6/每十萬捐血單位; 就 HIV 而言, 其機率已降至 0.2/每十萬捐血單位; 就 HCV 而言, 其機率已降至 1/每十萬捐血單位[1]。然而這些病例仍有可能因接受處於血清陰性空窗期的病毒感染血液而得到感染 [1,6-8]。因此, 需找尋更有效方法來保障輸血的安全性。為更進一步降低因輸血造成的病毒性感染, 以更靈敏的核酸增殖法 (nucleic acid amplification test, NAT) 來直接偵測病毒基因體便受到相當的肯定[9-15], 此篩檢法甚至已經在美國、加拿大和日本正式採用[16]。

在已開發或開發中國家, 在捐血者篩檢 B 型肝炎的策略並不同。在已開發國家, 捐血者需接受 HBsAg 和 anti-HBc 檢測, 任一項目陽性的患者代表目前或以前得過 B 型肝炎, 這些人也因此會被摒除在捐血者之列。此策略在 B 型肝炎盛行率很低 (小於 3%) 的已開發國家是可行的[5,17]。相對地, 在 B 型肝炎盛行的國家, 約 80~90% 成人曾經得過或仍然持續 B 型肝炎[18,19], 此一篩選條件將會排拒大多數自願捐血者, 因此不可能採用。所以在這些國家地區 (包括台灣), 捐血者僅被篩選目前是否仍有 B 型肝炎持續感染的跡象 (藉由 HBsAg 陽性和 ALT 值升高), 而不檢測是否過去得過 B 型肝炎病毒感染 (藉由 anti-HBc 陽性)。這些步驟已在台灣實施超過 20 年, 也確實降低經輸血得到 B 型肝炎至相當低的程度。然而, 新的病毒檢

測技 (PCR 法或相關技術如 NAT) 卻發現即使 HBsAg 陰性但過去曾得過 B 型肝炎的患者 (anti-HBc 陽性) 中約 10-30% 的人在血液或血液細胞中存有 HBV DNA[20]。即使 anti-HBc 和 anti-HBs 皆為陽性的人當中 (符合傳統上認為 B 型肝炎已完全恢復的準則), 仍有 5~15% 可藉由 NAT 法找到 HBV DNA[20-22], 雖然病毒濃度非常低。從這些觀察, 我們必須重新探討當這些含 HBV DNA 的血輸入受血者的後果為何? 這也是一個很獨特的情況去了解含低濃度 HBV DNA 的血液經輸血後會有多高的感染能力[8,23]。我們將就兩個族群來探討這一個問題。過去研究顯示台灣地區成年人 (大多數未曾接受過 B 型肝炎疫苗注射) 中, anti-HBc 陰性的比例約為 10~20% [18,19]; 另一方面, 過去台大醫院的研究結果也顯示 HBsAg 陰性的自願捐血者中, 約 4% 含有低濃度的 HBV DNA[24], 依此我們將可研究輸血後發生急性 B 型肝炎的機率。我們欲研究的另一族群是 15 歲以下的青少年及兒童, 臺灣地區自 1984 年起, 逐步全面實施 B 型肝炎疫苗注射, 其涵蓋率超過 90% [25], 成效卓著[25-27], 但疫苗注射十幾年後, 有些人的 anti-HBs 效價已下降, 甚至偵測不到。長期追蹤學齡兒童顯示約 22% 的疫苗接種者其血清 anti-HBs 效價已經偵測不到[25]。隨著追蹤期延長, 其效價將更為降低。就此, 我們也很有興趣了解經疫苗注射產生過 anti-HBs 但效價降低的 anti-HBc 陰性青少年, 經輸血接觸到 HBV 的臨床病程[28]。

本兩年計劃之目的即在於進一步探討臺灣地區 anti-HBc 陰性患者經輸血得到急性 B 型肝炎病毒感染的發生率。我們自臺大醫院收錄 anti-HBc 陰性受血者。由一系列血清 HBV DNA, anti-HBc, anti-HBs 和 HBsAg 測試, 了解 anti-HBc 陰性患者經輸血得到急性 B 型肝炎病毒感染的發生率; 由 15 歲以下經疫苗注射的青少年及兒童族群追蹤, 了解低效價 anti-HBs 對 B 型肝炎病毒的保護效果。而由輸血前以及輸血後一至二星期血中 HBV DNA

之比較，了解 anti-HBc 陰性患者經輸血得到 B 型肝炎病毒血症的發生率；由此，我們亦可評估未來是否採用新的檢驗法如 NAT，以增加捐血者殘存 HBV DNA 的偵測率。這些重要訊息將有助於決定是否需要修訂現行的捐血政策，以進一步提高輸血的安全性。

## 二、材料與方法

研究設計：我們進行單一醫學中心，前瞻性，世代觀察性研究，採連續性個案收集模型，探討 anti-HBc 陰性受血者輸血後出現 HBV DNA 病毒血症的機率及得到輸血後急性 B 型肝炎的發生率。

### I. 確認個案：

**目標個案：** anti-HBc 陰性受血者 (target population)

**個案來源：** 在台大醫院接受輸血治療之住院患者。

-與台大醫院血庫合作，我們第一年收集了 5,300 位受血者，第二年收集了 3,028 位受血者 (source population)。

**合適個案：** 受血者經確認為 anti-HBc 陰性，且同意接受後續半年抽血追蹤者。經 anti-HBc 測試並取得書面同意，我們共收集約 598 例合適個案，其中包括 73 名小於 15 歲之合適受血者個案。針對這些合適個案，我們追蹤輸血後 anti-HBc，並且以即時 PCR 定量其血清 HBV DNA 濃度。

**研究個案：** 受血者經確認為 anti-HBc 陰性，收錄且完成接受後續半年抽血追蹤者。

-我們共完成 340 例 anti-HBc 陰性受血者輸血後一星期之追蹤，完成 203 位 anti-HBc 陰性受血者輸血後續三至六個月之追蹤。

### II. 資料及血清收集：

1. 受血者基本資料：我們記錄 anti-HBc 陰性受血者之年齡、性別、住院疾病、過去受血次數、及輸血原因。
2. 受血者血清收集時間：我們測試受血後三個月及受血後六個月之血清之 anti-HBc 和 anti-HBs。Anti-HBc 由陰性轉陽性者，我們亦測試受血後三個月及受血後六個月之血清 HBsAg、IgM anti-HBc、

anti-HBs、血清 ALT 值及血清 HBV DNA，以決定輸血後急性 B 型肝炎的發生。

3. 針對所有 598 位受血前 anti-HBc 陰性的受血者，我們收集受血前 (598 位)、受血後一星期(340 位)、及受血後三至六個月(192 位)之血清，以決定 (1). 輸血前 HBV DNA 是否存在，(2). 輸血後短暫性或持續性病毒血症的發生率。
4. 輸血前後病毒血症持續性存在者，我們進一步分析比對受血前後一系列血清 HBV 之基因型和基因體核酸序列。

### III. 分析方法

1. 血清肝炎病毒標記 (HBsAg、anti-HBs、anti-HBc)：我們利用已上市套組進行測試 (AxSYM, Abbott Laboratories, North Chicago, IL)。
2. 巢聚合酵素鏈反應偵測血清 HBV DNA: 血清 DNA 以市售套組加以萃取。之後採巢聚合酵素鏈反應 (nested polymerase chain reaction, nested PCR) 偵測血清 HBV DNA。PCR 引子選自 HBV 基因體的表面蛋白基因片段，其條件為如下：

Denaturation	94	10min	
Denaturation	94	1min	
Annealing	58	40s	x35cycles
Extension	72	1min	
Final extension	72	10min	

外引子對：

ST1 (nt 159-178: 5'-AGAACATCGCATCAGGACTC-3'),

SB2 (nt 642-623: 5'-CATAGGTATCTTGCGAAAGC-3')

內引子對：

ST3 (nt 181-200: 5'-AGGACCCCTGFCGTGTTAC-3'),

SB4 (nt 619-600: 5'-AGATGATGGGATGGGAATAC-3')

3. **即時聚合酵素鏈反應偵測及定量血清 HBV DNA**：由於巢聚合酵素鏈反應容易有偽陽性反應而且無法定量，因此除了採巢聚合酵素鏈反應，我們針對每一位 anti-HBc 陰性的受血者採用即時聚合酵素鏈反應 (real-time polymerase chain reaction, RT-PCR) 來同時定性及定量血清 HBV DNA, 本計畫成果報告中之病毒血症相關資料亦採用即時聚合酵素鏈反應之結果。所使用引子及即時聚合酵素鏈反應條件為如下[36]：

a. HBV DNA 之定性及定量：

➤ 第一組反應引子和探針：

◇ 反應引子：nucleotide (nt)1232-1251 和 nt1599-1581，產物：polymerase 片段，368 bp

◇ Anchor 探針引子：nt1436-1455

◇ Sensor 探針引子：nt1414-1434

➤ 第二組反應引子和探針：

◇ 反應引子：nt1261-1279 和 nt1600-1580, 產物：polymerase 片段，340 bp

◇ Anchor 探針引子：nt1552-1576

◇ Sensor 探針引子：nt1533-1550

➤ Real-time PCR 反應條件：

Reagent Formulation	Thermal Cycling Profile
0.3mcM each of the probes	45 , 30 min

2 mM magnesium chloride	95 °C, 3 min
500 nM each primer	10 cycles of
1 mcl FastStart DNA Master Hybridization Mixture ( <i>Taq</i> DNA polymerase, PCR reaction buffer, 10 mM magnesium chloride, and dNTP mixture)	95 °C, 10 sec; 60 °C, 10 sec (decrease by 1 °C per cycle); 72 °C, 30 sec
2 mcl DNA	40 cycles of
10 mcl total volume	95 °C, 10 sec; 56 °C, 10 sec; 72 °C, 30 sec

➤ 標準曲線：加入已知濃度的 HBV 檢體，我們劃出標準曲線，藉此進一步推算出每一檢體的 HBV 濃度。本方法能可靠地偵測及定量 1000 copies/mL 以上的血清病毒濃度。

➤ Real-time PCR 機器：Roche LightCycler

b. HBV 基因型定型法：藉此 real-time PCR 反應，我們亦可區分 HBV 基因型，其原理在於利用不同基因型 HBV 位於 sensor 探針引子上的核酸序列差異，分別設計出專一於基因型 B 和基因型 C 的 sensor 探針引子，此一差異會反應在熔解溫度(melting temperature)上，最後由分析熔解曲線尖峰出現的時間便可區分出 HBV 基因型 B 和基因型 C。

4. HBV DNA 定序比對：巢聚合酵素鏈反應之產物逕行定序。

定序引子：ST3 (nt 181-200: 5'-AGGACCCCTGFCGTGTTAC-3')

IV. 人體檢體取得及進行測試之考量: 所有血清之收集及測試, 皆在取得收錄受試者同意書後進行。

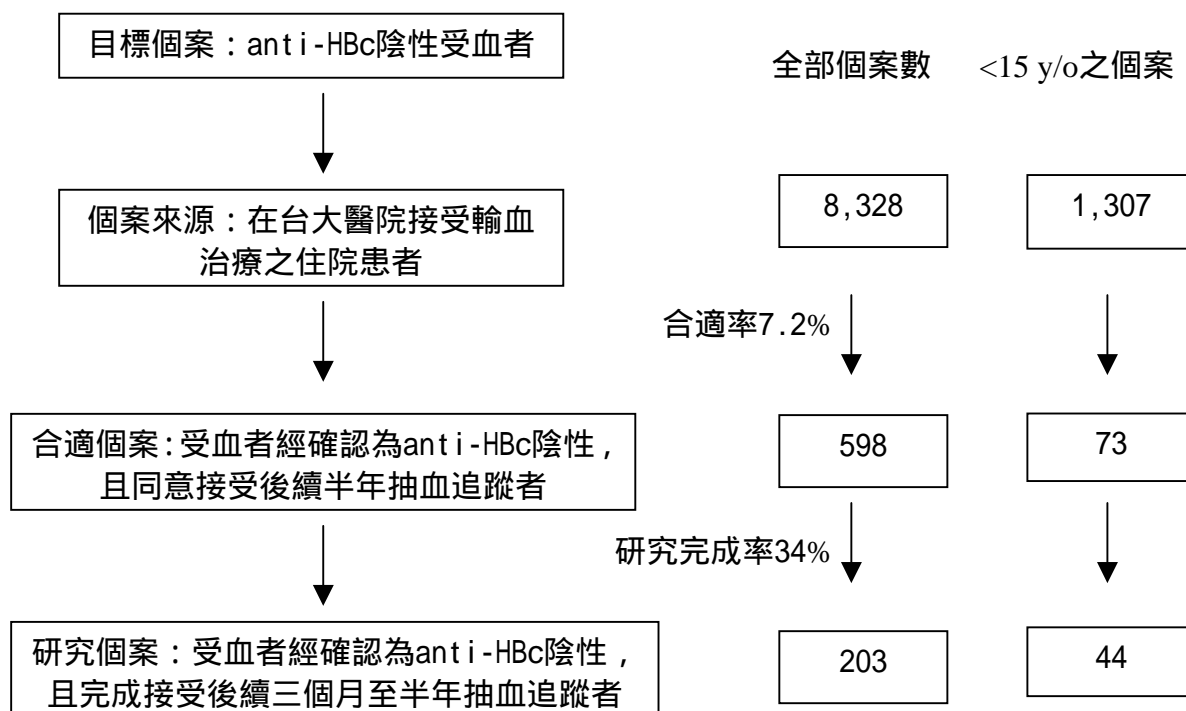
#### V. 統計

本研究計算 anti-HBc 陰性受血者輸血前病毒血症 輸血後發生病毒血症及急性 B 型肝炎的發生率為主, 不涉及複雜的統計方法。



### 三、結果

I. 個案收集: 在第一年及第二年計劃中, 我們全部收集的個案數圖示如下:



第一年及第二年計劃執行至今, 個案來源如預期收案, 我們共收集8,328個受血病患。這些病患中, anti-HBc陰性且同意接受後續半年抽血追蹤者約7.2% (合適率, 共598位患者)。後續追蹤過程中有96例死亡, 有170例轉至他院診治或失去追蹤, 血清不足者有129位, 最後我們完成203例研究個案(包括輸血前即有病毒血症者)的追蹤, 研究完成率約為34%。當中, 小於15歲且anti-HBc陰性的受血者共73位, 經確認為HBsAg陰性、血清ALT值正常、且同意接受後續半年抽血追蹤者共54位, 未死亡且完成半年抽血追蹤者共44位。

II. 個案分析: 針對598例anti-HBc陰性受血者, 初步分析如下:

1. Anti-HBc陰性受血者輸血前血清HBV DNA陽性率：1.8% (11/598) (表一)。
2. 輸血前無B型肝炎病毒血症且完成追蹤的340位anti-HBc陰性受血者，輸血後一星期時之血清HBV DNA陽性率：1.5% (5/340)。這5位輸血後一星期出現病毒血症的患者在六個月追蹤過程中血清ALT值皆在正常範圍，而且在輸血後三個月及六個月時皆無法偵測到血清HBV DNA (表二)。
3. 我們也收集了73位小於15歲且anti-HBc陰性的受血者，其中接受後續半年抽血追蹤者共54位。初步結果顯示；輸血前B型肝炎病毒血症的發生率為1.4% (1/73)；輸血前無B型肝炎病毒血症之anti-HBc陰性受血者，輸血後暫時性B型肝炎病毒血症的發生率為7.5% (4/53)；同樣地，這4位受血者在輸血後六個月時皆無法在血清中偵測到 HBV DNA (表二)。

目前最後階段，我們正積極收集相關臨床資料並測試這些輸血前後曾出現病毒血症患者的血清肝炎病毒標記，以釐清此間接或持續性病毒血症為低濃度病毒帶原、單純的暫時性輸血後 B 型肝炎病毒血症、抑或為已經恢復的無症狀 B 型肝炎病毒感染。同時，我們也將定量這 73 位小於 15 歲且 anti-HBc 陰性的受血者的輸血前 anti-HBs 濃度，以釐清 anti-HBs 濃度對輸血後 B 型肝炎病毒血症的影響。

表一、 Anti-HBc 陰性受血者在輸血前後出現的 B 型肝炎病毒血症			
年齡 (年)	B 型肝炎病毒血症		
	輸血前	輸血後一星期	輸血後一星期至六個月持續有病毒血症
≥15 y/o	10/525 (1.9%)	1/287* (0.3%)	0/149 <sup>&amp;</sup> (0%)
<15 y/o	1/73 (1.4%)	4/53* (7.5%)	0/43 <sup>&amp;</sup> (0%)
Total	11/598 (1.8%)	5/340* (1.5%)	0/192 <sup>&amp;</sup> (0%)

\*扣除輸血前有 B 型肝炎病毒血症者。

<sup>&</sup>扣除輸血前有 B 型肝炎病毒血症者且輸血前一星期以後失去追蹤者。

HBV DNA 之定性乃以即時 PCR (real-time PCR)決定。

表二、輸血前或輸血後一星期出現 B 型肝炎病毒血症之 anti-HBc 陰性受血者之一系列血清病毒量變化

Case No.	Age (year)	Sex	HBV DNA* (copies/mL)			
			Pre-transfusion	Post-transfusion		
				1 week	3 months	6 months
第一組、輸血前出現 B 型肝炎病毒血症						
1	3	M	45320	NA	NA	NA
2	17	M	40000	<1000	<1000	<1000
3	17	M	19830	36200	<1000	24440
4	17	M	38570	<1000	<1000	<1000
5	31	F	37820	8750	<1000	<1000
6	45	M	31280	<1000	<1000	<1000
7	53	M	34650	<1000	<1000	<1000
8	62	F	25590	NA	NA	NA
9	65	M	16950	<1000	31110	7650
10	80	M	22220	21100	<1000	<1000
11	83	F	94740	<1000	NA	NA
第二組、輸血前無 B 型肝炎病毒血症且輸血後一星期出現 B 型肝炎病毒血症						
12	5	M	<1000	334800	<1000	<1000
13	7	M	<1000	71510	<1000	<1000
14	13	M	<1000	57990	<1000	<1000
15	14	F	<1000	34580	<1000	<1000
16	53	F	<1000	100900	<1000	<1000
*本表中所有 HBV DNA 值乃以即時 PCR (real-time PCR)決定。NA, 血清未收集而無法分析。 M, male; F, female.						

#### 四、討論

目前以血清酵素免疫法(EIA)篩檢血液中病毒抗原或人體產生的抗體，是可以有效地減少病毒感染的方法。在台灣，捐血者僅被篩選目前是否仍有 B 型肝炎持續感染的跡象(HBsAg 陽性和 ALT 值升高)，而不檢測過去是否得過 B 型肝炎病毒感染(anti-HBc 陽性)。新的病毒檢測技術(PCR 法或相關技術如 nucleic acid testing (NAT))發現即使 HBsAg 陰性但過去曾得過 B 型肝炎的一部份患者，可藉由 NAT 法找到 HBV DNA。從這些觀察，我們必須重新探討當這些含 HBV DNA 的血輸入受血者的後果為何？為了研究臺灣地區 anti-HBc 陰性患者經輸血得到 HBV 感染的發生率，兩年計劃中，我們前瞻性收集了 598 位 anti-HBc 陰性受血者。結果顯示：(1) 598 位 anti-HBc 陰性受血者，輸血前 B 型肝炎病毒血症的發生率為 1.8% (n = 11)；(2) 輸血前無 B 型肝炎病毒血症且接受後續追蹤的 340 位個案中，輸血後暫時性 B 型肝炎病毒血症的發生率則為 1.5% (n = 5)；(3) 這 5 位有輸血後暫時性 B 型肝炎病毒血症的受血者在輸血後六個月時皆無法在血清中偵測到 HBV DNA；(4) 小於 15 歲且 anti-HBc 陰性的受血者 (n=73)，初步結果顯示輸血前 B 型肝炎病毒血症的發生率為 1.4% (1/73)；輸血前無 B 型肝炎病毒血症之 anti-HBc 陰性受血者，輸血後暫時性 B 型肝炎病毒血症的發生率為 7.5% (4/53)；同樣地，這 4 位受血者在輸血後六個月時皆無法在血清中偵測到 HBV DNA。

我們初步結果發現約 1.5% anti-HBc 陰性受血者在輸血後出現 B 型肝炎病毒血症。此意味著在現行輸血政策下，未曾感染過 HBV 的受血者仍有機會因輸血而接觸到 HBV。相符合地，過去的研究也發現即使 HBsAg 陰性但過去曾得過 B 型肝炎的患者(anti-HBc 陽性)中約 10-30%的人在血液或血液細胞中存有 HBV DNA。即使 anti-HBc 和 anti-HBs 皆為陽性的人當中，

仍有 5~15% 可藉由 NAT 法找到 HBV DNA。這些結果再次突顯出自 HBsAg 陰性但過去曾得過 B 型肝炎的捐血者(anti-HBc 陽性)中偵測潛藏 HBV DNA 的重要性。唯有偵測出潛藏 HBV DNA，才能減低接觸的風險。

我們初步結果發現約 1.8% anti-HBc 陰性受血者其血清 HBV DNA~PCR 呈陽性反應，從另一方面來看，下列可能原因需要進一步考慮：

1. **低濃度帶原者或收錄前輸血造成的病毒血症：**因本研究乃收錄接受輸血的住院患者，有些患者在收錄前便曾接受過輸血，因此有可能已經由前次輸血輸入含 HBV 的血液製品。另一方面，有 4 位患者在輸血後亦可間接偵測到低濃度的病毒存在(表一，病例 3、5、9、10)，此暗示有些患者屬於低濃度 HBV 帶原者。目前，我們正積極收集相關臨床資料並測試這些輸血前出現病毒血症患者的血清肝炎病毒標記，以釐清此病毒血症為低濃度 HBV 帶原者、為單純的暫時性 B 型肝炎病毒血症、抑或為已經恢復的無症狀的 B 型肝炎病毒感染。
2. **Anti-HBc 檢驗試劑的專一性：**本研究所使用市售 anti-HBc 檢驗試劑(EIA, AxSYM, Abbott Laboratories, North Chicago, IL)有相當好的準確度(敏感性：1 PEI U/mL；專一性：> 99%)，但仍不能完全排除偽陰性及偽陽性之可能性。舉例來說，文獻上曾經報告過 anti-HBc 陰性但 HBV DNA 陽性之案例[32,34]，其原因包括宿主對 HBV 的免疫反應異常等。因此針對受血者 HBV DNA 陽性之患者，是否 anti-HBc 陰性即代表未曾接觸過 HBV，將藉由另一種廠牌試劑(如普生公司)來加以驗證。
3. **Real-time PCR 法之偽陽性：**本研究第一年計畫乃以 home-brew nested PCR 法偵測 HBV DNA，因此常常出現偽陽性，常見原因包括實驗環境中既存 HBV 污染等。為避免此一現象發生，本研究後來全面採用 real-time PCR 來偵測及定量病毒，實驗過程中我們也嚴格遵照 Kwok 等

人建議的預防法則，並採用含有 filter 的 tip [35]。我們初步結果發現約 1.8% anti-HBc 陰性受血者其體內存有 HBV DNA，經重複實驗結果相當一致。至於是否 anti-HBc 陰性即代表未曾接觸過 HBV，將採用另一種廠牌試劑來加以驗證。

目前最後階段，我們正積極收集相關臨床資料並測試這些輸血後曾出現病毒血症患者的血清肝炎病毒標記，以釐清此病毒血症為單純的暫時性 B 型肝炎病毒血症、抑或為已經恢復的無症狀的 B 型肝炎病毒感染。同時，我們也將定量這 73 位小於 15 歲且 anti-HBc 陰性的受血者的輸血前 anti-HBs 濃度，以釐清 anti-HBs 濃度對輸血後 B 型肝炎病毒血症的影響。

我們的初步結果顯示未曾接觸過 B 型肝炎病毒的受血者，在現行捐血政策下，有 1.5% 的機率會輸入含少量 HBV 的血液製品並造成暫時性 B 型肝炎病毒血症。若依過去每次輸血平均輸入 15 個不同捐血來源而且假設每位受血者僅接受一次輸血來粗估，每百萬個捐血單位中會有 1000 個機會因輸入含少量 HBV 的血液製品而造成暫時性 B 型肝炎病毒血症 ( $0.015/15=1/1000=1000/10^6$ )。在本前瞻性研究中合適個案有限的情形下，雖然並未發現輸血後急性 B 型肝炎的病例，但在現行的捐血決策下，國人經輸血暴露於 B 型肝炎病毒的機率的確高於歐美國家（五萬至十萬分之一）[37]。這些重要訊息反映出應修訂現行的捐血決策以進一步減少經輸血暴露於 B 型肝炎病毒的機會。

## 五、結論與建議

1. Anti-HBc 陰性住院病患，輸血前 B 型肝炎病毒血症約 1.8%。此意味 anti-HBc 陰性患者中，可能有少數是屬於低濃度病毒血症患者，未來應進一步比較不同廠牌 anti-HBc 試劑的專一度。
2. Anti-HBc 陰性且輸血前 B 型肝炎病毒血症陰性住院病患，經輸血後約 1.8% 曾出現 B 型肝炎病毒血症。因此，未曾感染過 HBV 的患者在接受輸血後應定期追蹤肝功能，若有異常，應進一步檢驗血清病毒標記。
3. 住院病患中約有 1/13 未曾感染過 HBV (anti-HBc 陰性)，建議應進一步檢驗 B 肝之保護性抗體(anti-HBs)，若缺乏，宜儘早接種疫苗。
4. 全面 B 型肝炎疫苗接種除可減少一般人口之帶原率外，預期亦可減少住院病患輸血後 B 型肝炎病毒之感染。
5. 未來應針對捐血者，引進更敏感且可自動化之檢測試劑(如 NAT 篩檢)和機器作更詳細之檢查，以減少因輸血而感染 HBV 的機率。
5. 應回顧性針對 HBsAg 陰性之 B 肝帶原捐血者，評估受血者肝功能和長期病程，以查證其此類 B 肝帶原者捐出血液是否具有感染性。



## 六、參考文獻

1. Schreiber GB et al: The risk of transfusion-transmitted viral infections. *N Engl J Med* 1996;334:1685-90.
2. Hoofnagle J: Posttransfusion hepatitis B. *Transfusion* 1990;30:384-6.
3. Alter HJ et al: Post-transfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen positive donors. *Ann Intern Med* 1972;77:691-9.
4. Donahue JG et al: The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1992;327:369-73.
5. Busch MP et al: Prevention of hepatitis B, hepatitis C, and human immunodeficiency virus infection through blood transfusion by anti-HBc testing. *Vox Sang* 1998;74(suppl):147-54.
6. Busch MP et al: Dynamics of HCV viremia and seroconversion in transfusion acquired HCV infections. *Transfusion* 1998;38(suppl):72S.
7. Sacher RA et al: Prevention of transfusion-transmitted hepatitis. *Lancet* 2000;355:331-2.
8. Matsumoto C et al: Analysis of HBV infection after blood transfusion in Japan through investigation of a comprehensive donor specimen repository. *Transfusion* 2001;41:878-84.
9. Flanagan P et al: PCR testing of plasma pools: from concept to reality. *Trans Med Rev* 1999;13:164-76.
10. Gallarda JJ et al: Blood screening by nucleic acid amplification technology: current issues, future challenges. *Molecular Diagnostics* 2000;5:11-21.
11. Rawal BD et al: Infectious HBV window period and its projected reduction by genome amplification testing. *Transfusion* 1998;38(suppl):91S.
12. Schuttler CG et al: Hepatitis C virus transmission by a blood donation negative in nucleic acid amplification tests for viral RNA. *Lancet* 2000;355:41-2.
13. Sun R et al: Experience with PCR screening. In Brown F, Vyas G (eds): *Advances in Transfusion Safety*. Dev Biol. Basel, Karger, 1999;Vol 102, pp81-91.

14. Wang JT et al: Effect of hepatitis C antibody screening in blood donors on post-transfusion hepatitis in Taiwan. *J Gastroenterol Hepatol* 1995;10:454-8.
15. Roth Wk et al: NAT and viral safety in blood transfusion. *Vox Sang* 2000;78:257-9.
16. Stramer SL et al: NAT of the United States and Canadian blood supply. *Transfusion* 2000;40:1165-8.
17. Allain JP et al: Evidence that anti-HBc but not HBV DNA testing may prevent some HBV transmission by transfusion. *Br J Hematol* 1999;107:186-95.
18. Chen DS: From hepatitis to hepatoma: lessons from type B viral hepatitis. *Science* 1993;262:369-70.
19. Chen DS: Natural history of chronic hepatitis B virus infection: new light on an old story. *J Gastroenterol Hepatol* 1993;8:470-5.
20. Noborg U et al: Levels of viraemia in subjects with serological markers of past or chronic hepatitis B virus infection. *Scand J Infect Dis* 2000;32:249-52
21. Shih LN et al: Serum hepatitis B virus DNA in healthy HBsAg-negative Chinese adults evaluated by polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1990;32:257-60.
22. Yotsuyanagi H et al: Persistent viremia after recovery from self-limited acute hepatitis B. *Hepatology* 1998 May;27:1377-82.
23. Prince AM et al: Infectivity of blood from PCR-positive, HBsAg-negative, anti-HBs-positive cases of resolved hepatitis B infection. *Transfusion* 2001;41:329-32.
24. Wang JT et al: Detection of hepatitis B virus DNA by polymerase chain reaction in plasma of volunteer blood donors negative for hepatitis B surface antigen. *J Infect Dis* 1991;163:397-9.
25. Hsu HM et al: Seroepidemiologic survey for hepatitis B virus infection in Taiwan: the effect of hepatitis B mass immunization. *J Infect Dis* 1999;179:367-70.
26. Chang MH et al: Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. *N Engl J Med*

1997;335:1855-9.

27. Chen HL et al: Seroepidemiology of hepatitis B virus infection in children: ten years of mass vaccination in Taiwan. *JAMA* 1996;276:906-8.
28. Da Villa G et al: Anti-HBs responses in children vaccinated with different schedules of either plasma-derived or HBV DNA recombinant vaccine. *Res Virol* 1997 Mar;148:109-14.
29. Cacciola I et al: Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *N Engl J Med* 1999;341:22-6.
30. Kao JH et al: Chronic hepatitis C without detectable anti-hepatitis C antibodies by second generation assay: a clinipathologic study and demonstration of the usefulness of a third-generation assay. *Dig.Dis Sci* 1996;41:161-5.
31. Wang JT et al: Hepatitis C virus infection in volunteer blood donors in Taiwan: evaluation by hepatitis C antibody assays and the polymerase chain reaction. *Arch Pathol Lab Med* 1993;117:152-6.
32. Laperche S et al. Blood donors infected with the hepatitis B virus but persistently lacking antibodies to the hepatitis B core antigen. *Vox Sang* 2001;80:90-94.
33. Ni YH et al. Hepatitis B virus infection in children and adolescents in a hyperendemic area: 15 years after mass hepatitis B vaccination. *Ann Intern Med* 2001;135:796-800.
34. Gotoh K et al. Nucleotide sequence of hepatitis B virus isolated from subjects without serum anti-hepatitis B core antibody. *J Med Virol* 1995;46:201-206.
35. Kwok S, et al. Avoid false positive with PCR. *Nature* 1989;339:237-238.
36. Yeh SH, et al. Combined real-time PCR quantification and signature single nucleotide polymorphism genotyping of hepatitis B virus in one-tube reaction. (Submitted)
37. Wang JT, et al. Transfusion-transmitted HBV infection in an endemic area: the necessity of more sensitive screening for HBV carrier. *Transfusion* 2002;42:1592-1597.