

計畫編號：DOH90-DC-1023

行政院衛生署疾病管制局九十年度委託研究計畫

以核酸檢驗法(nucleic acid testing, NAT)篩檢  
B 型肝炎表面抗原陰性捐血者之成效評估

委託研究成果報告

執行機構：國立台灣大學醫學院臨床醫學研究所

研究主持人：高嘉宏 副教授

研究人員：張馨勻 陳雯玲

執行期間：90 年 2 月 9 日至 90 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	
中文摘要	( 2 )
英文摘要	( 4 )
本文	
一、前言	( 6 )
二、材料與方法	( 8 )
三、結果	( 9 )
四、討論	( 10 )
五、結論與建議	( 12 )
六、參考文獻	( 13 )
	共 ( 15 ) 頁

## 中文摘要：

在醫療處置中，輸血是一種非常重要的治療措施，它有時可以挽救患者的生命，但卻也使患者冒著因輸血而感染病毒如 HIV、HTLV-1、HBV 和 HCV 的風險。其中 HIV 會造成後天免疫缺損症候群(AIDS)，而 HBV 及 HCV 會造成肝炎。為了減少輸血帶來的風險，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。目前使用之捐血者篩檢法多採用酵素免疫法(EIA)偵測血液中之抗原或抗體。雖然此種篩檢已大幅減少輸血後病毒感染的機會，但仍有殘存之風險，原因在於”空窗期”(感染後到抗原或抗體出現)捐血者的存在。為達到”輸血零風險”的要求，許多歐洲國家及美國自 1999 年起嘗試利用超高敏感的 PCR 法或相關技術，進行捐血者的病毒核酸篩檢(nucleic acid testing, NAT)以縮短空窗期。台灣地區為 B 型肝炎之盛行區，據估計一般人口之帶原率為 15-20%，約有 300 萬個帶原者，而 80%以上之成年人體內有 anti-HBc，表示曾感染 HBV。台灣地區之捐血中心(中華血液基金會)自 1970 年代初期開始進行捐血者 HBsAg 之篩檢，結果顯示成效良好，可大幅減少因輸血而感染病毒的機會。但因輸血而感染 HBV 者仍時有所聞，顯示對捐血者之篩檢仍有努力的空間。本計劃之目的在於利用商用自動核酸增幅系統(COBAS AMPLICOR system)研究本地 HBsAg 陰性捐血者體內 HBV DNA 之存在情形，並比較不同處理方法(單一血漿檢體或混合血漿檢體)之敏感性和特異性，奠定後續 Minipool NAT 研究之基礎。自北、中、南三地之捐血中心收集 HBsAg 陰性之自願捐血者血漿檢體共 600 支(每支 2 毫升)，並以 HBV 血清檢驗試劑(anti-HBs 和 anti-HBc)將捐血者分組。隨後以自動核酸增幅系統(COBAS AMPLICOR HBV MONITOR)測試各組捐血者血漿中有無 HBV DNA 存在，並比較不同處理方法(單一血漿檢體或混合血漿檢體)之敏感性

和特異性。再由初步結果決定 minipool NAT 系統之可行性及未來之研究方向。結果顯示本地 HBsAg 陰性自願捐血者中，約有 61% 屬於自然感染，14.1% 僅有 anti-HBs 抗體，而 25% 沒有任何抗體。NAT 測試之結果顯示目前之商用 HBV 定量法因敏感度不足且無法全自動操作，並不適合作捐血者之 NAT 篩檢。未來應引進更敏感且可以全面自動化之試劑和儀器作進一步之評估。

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、捐血者、自動核酸增幅系統

## Abstract:

Transfusion is an important therapeutic procedure in modern medicine. Although blood transfusion can save the lives of patients, it also put them at the risk of blood-borne viral infections such as HIV, HBV and HCV. To reduce the risk of blood transfusion, the blood donor screening for HBV, HIV and HCV has been started in 1970s, 1980s and 1990s. Most of the current screening tools are using the EIA to detect the viral antigens or antibodies in the blood of donors. Although these measures have dramatically reduced the chance of post-transfusional viral infection, the residual risk remains because of the existence of “window period” in the donors with early-stage infection. To achieve the goal of zero risk of blood transfusion by shortening the window period, some European countries and the United States attempted to screen the blood donors by using the ultrasensitive PCR techniques (NAT, nucleic acid amplification test) to detect viral genomes. Taiwan is endemic for HBV infection, and 15 to 20% of the general population are HBV carriers. In addition, about 80% of the general population are positive for anti-HBc, indicating a past infection of HBV. Although the Blood Center in Taiwan started to screen blood donors for persistent HBV infection by HBsAg since early 1970s and a good effect has been documented, acute HBV infection in the recipients is not uncommon. We therefore conducted a study to evaluate the feasibility of screening the HBsAg-negative blood donors by using a semiautomatic commercial HBV quantification assay (Cobas Amplicor HBV Monitor). With the help of Blood Services Foundation of the Republic of China, a total of 600 serum samples were collected from HBsAg-negative volunteer blood donors. These samples were divided into 4 groups by the results of HBV markers (anti-HBs and anti-HBc) and then subjected to minipool NAT assays. Our results showed that among the HBsAg-negative blood donors, 61% were positive for

anti-HBc, indication a past natural infection of HBV and 25% were negative for both antibodies. The data of minipool NAT assays showed that the current commercial HBV quantification test is not sensitive enough as a screening tool for extremely low level of HBV DNA. In addition, the lack of full automation also undermines this test to serve as a NAT assay for blood donors in Taiwan. Further studies on more sensitive assays as well as fully automatic apparatuses are thus needed to solve this important issue.

Keyword: Hepatitis B virus, nucleic acid testing (NAT), hepatitis B surface antigen (HBsAg), blood donors, automatic nucleic acid amplification system.

## 一、前言

在醫療處置中，輸血是一種非常重要的治療措施，它有時可以挽救患者的生命，但卻也使患者冒著因輸血而感染病毒如 HIV、HTLV-1、HBV 和 HCV 的風險〔1, 2〕。其中 HIV 會造成後天免疫缺損症候群(AIDS)，而 HBV 及 HCV 會造成肝炎。為了減少輸血帶來的風險，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〕。目前使用之捐血者篩檢法多採用酵素免疫法(EIA)偵測血液中之抗原(如 HIV 之 p24 抗原和 HBV 之表面抗原)或抗體(如 HIV-1 和 HIV-2 抗體，HBV 核心抗體及 HCV 抗體)〔5〕。雖然此種篩檢已大幅減少輸血後病毒感染的機會，但仍有殘存之風險，原因在於”空窗期”(感染後到抗原或抗體出現)捐血者的存在〔1〕。以 HCV 而言，其抗體空窗期約為 70-80 天，但 HCV RNA 之空窗期僅有 10-14 天〔6〕。HBV 之表面抗原空窗期平均為 59 天(37-87 天)〔7〕。以美國為例，1996 年時因輸血而感染 HCV 的機率为 9.7/每百萬捐血，而感染 HBV 之機率为 15.8/每百萬捐血。為達到”輸血零風險”的要求，許多歐洲國家及美國自 1999 年起嘗試利用超高敏感的 PCR 法或相關技術，進行捐血者的病毒核酸篩檢(nucleic acid testing, NAT)以縮短空窗期。預計可將輸血後感染 HCV 和 HBV 的機率降至 2.7/每百萬捐血(降低 72%)和 9.1/每百萬捐血(降低 42%)〔8-12〕。然而亦有研究者建議使用 anti-HBc 而非 NAT 來篩檢捐血者〔5, 13〕。除空窗期外，許多研究顯示某些 HBV 和 HCV 帶原者體內雖有病毒，但以目前之篩檢方法並不能偵測到 HBsAg 和 anti-HCV 存在，此點亦會造成捐血者篩檢的漏洞〔14, 15〕。

台灣地區為 B 型肝炎之盛行區，據估計一般人口之帶原率為 15-20%，約有 300 萬個帶原者，而 80% 以上之成年人體內有 anti-HBc，表示曾感染 HBV〔16, 17〕。一般人口之 anti-HCV 盛行率為 2%，約有 40 萬個帶原者〔18，

19〕。如同其他先進國家，台灣地區之捐血中心(中華血液基金會)自 1970 年代初期，1989 年和 1992 年開始進行捐血者 HBsAg、anti-HIV 和 anti-HCV 之篩檢，結果顯示成效良好，可大幅減少因輸血而感染這些病毒的機會〔20, 21〕。但因輸血而感染 HIV、HBV 或 HCV 者仍時有所聞，顯示對捐血者之篩檢仍有努力的空間。台灣地區 1999 年共有 190 萬次捐血，因台灣 anti-HCV 之盛行率和美國接近，故每年可能有 5 例受血者因輸血而感染 HCV。至於 HBV 之情況，因台灣地區為 HBV 之盛行區，故因輸血而感染 HBV 者應較美國高出甚多。本院曾以 PCR 法檢測 HBsAg 陰性成年人體內之 HBV DNA，結果顯示 7.5% 受試者體內有 HBV DNA 存在，但是否具感染性仍未明瞭〔22〕。由於本地成年人體內 anti-HBc 之盛行率相當高，不適合以 anti-HBc 作取代性之篩檢，不然將面臨無血可用之情形。因此利用以 PCR 或相關生物技術為基礎之病毒核酸檢測法(NAT)篩檢捐血者將是未來發展的方向。

本計劃之目的在於利用商用自動核酸增幅系統(COBAS AMPLICOR system)研究本地 HBsAg 陰性捐血者體內 HBV DNA 之存在情形，並比較不同處理方法(單一血漿檢體或混合血漿檢體)之敏感性和特異性，奠定後續 Minipool NAT 研究之基礎，並將資料提供中華血液基金會參考，使國人之健康更有保障，以期達到“輸血零風險”之願景。



## 二、材料與方法

1. 與中華血液基金會合作，自北、中、南三地之捐血中心收集 HBsAg 陰性之自願捐血者檢體共 600 支，每支約 2 毫升。
2. 血漿檢體先行接受 HBsAg，anti-HBs 和 anti-HBc 之測試(HBsAg 屬確認性檢查，以免混入其他不適用檢體)。
3. 依 anti-HBs 和 anti-HBc 之結果，將血漿檢體分為 4 組並萃取血漿中之 DNA：
  - a. anti-HBs(+), anti-HBc(+)
  - b. anti-HBs(+), anti-HBc(-)
  - c. anti-HBs(-), anti-HBc(+)
  - d. anti-HBs(-), anti-HBc(-)
4. COBAS AMLPICOR HBV MONITOR 為目前最敏感之商用自動核酸增幅系統 [ 23 ]，敏感度為 100-200 copies/mL。PCR 反應可全自動進行，減少檢體受污染之機會。
  - ①Minipool NAT：600 支檢體中，先以 24 支為單位，混合後進行 NAT 測試，其次再以 12 支為單位。
  - ②混合後進行 NAT 測試，NAT 陽性再依次分成 6 支或 3 支之混合檢體。
5. 對病毒核酸陽性之捐血者，將委請中華血液基金會追蹤。必要時，請其再次抽血確認並偵測有無抗原或抗體陽轉。對受血者亦可檢測其有無抗原或抗體陽轉，病毒核酸狀態及肝功能數值。

### 三、結果

1. 600 支 HBsAg 陰性自願捐血者血清檢體經 anti-HBs 和 anti-HBc 測試後之結果如下：

a. anti-HBs(+), anti-HBc(+): 302 支(50 %)

b. anti-HBs(+), anti-HBc(-): 84 支(14 %)

c. anti-HBs(-), anti-HBc(+): 63 支(11 %)

d. anti-HBs(-), anti-HBc(-): 151 支(25 %)

2. a. 以 24 支為單位混合檢體之 NAT 測試，有一組呈陽性結果( $1.9 \times 10^2$ copies/mL)。

b. 以 12 支為單位混合檢體之 NAT 測試，有四組呈陽性結果( $6.8 \times 10^2$ copies/mL,  $8.4 \times 10^2$ copies/mL,  $1.7 \times 10^2$ copies/mL,  $3.6 \times 10^3$ copies/mL)。然而這幾組在以 6 支為單位之 NAT 測試，只有一組呈陽性反應( $3.6 \times 10^2$ copies/mL)，表示此種方法並不穩定。

3. 以 in-house PCR 法針對 12 支和 6 支為單位混合檢體所作測試結果均呈陰性反應。

#### 四、討論

台灣地區為 B 型肝炎病毒感染之高盛行區，一般人口之 HBsAg 帶原率約 15-20%，而自然感染者(anti-HBc 陽性)更高達 90%。所幸自民國 75 年施行全面 B 型肝炎疫苗接種以後，目前兒童之 HBsAg 帶原率已降到 0.7% [24]。然而由本計劃之結果可知本地 HBsAg 陰性自願捐血者中，約有 61% 屬於自然感染，而 14% 已經接種 B 肝疫苗(僅有 anti-HBs 陽性)，顯示全面疫苗接種除了可減少一般人口之帶原率外，亦可大幅減少 B 型肝炎病毒之自然感染。然而仍有 25% 的民眾體內並無保護性抗體，存在被感染的可能性。因此，應建議這些體內欠缺保護性抗體的民眾儘早接受 B 型肝炎疫苗接種，以免形成防疫上的漏洞。

病毒核酸試驗(NAT)篩檢捐血者之出發點在於縮短病毒急性期感染時之血清標記空窗期，因此先進國家在 1999 年開始作全面性推廣。根據日本全國 NAT 測試 HBV、HCV 和 HIV 的結果顯示，以 500 支血清為單位的 NAT 篩檢在 2001 年 1 月找到 19 個 HBV DNA 陽性的個案。而以 50 支血清為單位的 NAT 篩檢在 2001 年 2 月找到 7 個 HBV DNA 陽性個案。在此 26 例個案中，22 例為野生型病毒，其中 6 例以 EIA 法測不到 HBsAg，17 例接受追蹤者均有表面抗原陰轉。而其他 4 例屬前核心突變病毒，其 HBsAg 均測不到。由此可知，NAT 確可縮短早期感染之空窗期。而在 NAT 篩檢所發現的低濃度 HBsAg 帶原者通常屬於突變型病毒 [25]。

本地之情形與歐美和日本有所不同，吾人主要目的在於以 NAT 來篩檢以 EIA 測試為 HBsAg 陰性之低濃度帶原者。一般而言急性感染者之病毒量極高，可達  $10^8$ - $10^{10}$  copies/mL，而此種 HBsAg 陰性帶原者之病毒量極低，可能只有  $10^2$ - $10^3$  copies/mL，因此不適合以大量混合血漿檢體(如 50~500 支血清為單位)來執行 NAT 測試，此外目前並無商用篩檢捐血者 HBV DNA

之 NAT 試劑,因此本研究嘗試用當今最敏感之商用 HBV 定量試劑(Amplicor HBV Monitor)執行本計劃,結果發現 NAT 測試結果並不穩定,顯示過程中仍有人為污染的可能性。因此,未來應尋求更敏感且適合從事 HBV NAT 篩檢之試劑和全自動機器以解決這些問題。

由於 HBsAg 陰性帶原者體內之病毒常有基因缺損和突變之現象,單一的 PCR 方法並不能完全排除 HBV DNA 的存在。因此本實驗室正利用 HBV 其他區段基因之 PCR 引子來澄清此一問題。

## 五、結論與建議

1. 全面 B 型肝炎疫苗接種除可減少一般人口之帶原率外，亦可減少 B 型肝炎病毒之自然感染。
2. 一般人口中仍有 1/4 缺乏 B 肝之保護性抗體，應儘早接種疫苗。
3. 目前的商用 HBV 定量法，因敏感度不足且無法全自動執行，較不適合作捐血者之 NAT 篩檢。
4. 未來應引進更敏感且可自動化之檢測試劑和機器作進一步之評估。
5. 未來應針對 HBsAg 陰性之 B 肝帶原者，評估其肝功能和長期病程並查證其捐出血液是否具有感染性。

## 六、參考文獻

1. Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ. The risk of transfusion-transmitted viral infections. *N Engl J Med* 1996; 334: 1685-90.
2. Hoofnagle J. Posttransfusion hepatitis B. *Transfusion* 1990; 30: 384-86.
3. Alter HJ, Holland PV, Purcell RH, et al. Post transfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen positive donors. *Ann Intern Med* 1972; 77: 691-99.
4. Donahue JG, Munoz A, Ness PM, et al. The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*, 1992; 327: 369-73.
5. Busch MP, Prevention of transmission of hepatitis B, hepatitis C and human immunodeficiency virus infection through blood transfusion by anti-HBc testing. *Vox Sang* 1998; 74 (suppl 2):147-54.
6. Busch MP, Rawal BD, Feiberg EW, et al. Dynamics of HCV viremia and seroconversion in transfusion acquired HCV infections. *Transfusion* 1998; 38 (suppl): 72S.
7. Sacher RA, Schreiber GB, Kleinman SH. Prevention of transfusion-transmitted hepatitis. *Lancet*. 2000;355:331-2.
8. Flanagan P, Barbara J. PCR testing of plasma pools: from concept to reality. *Trans Med Rev* 1999; 13: 164-76.
9. Gallarda JJ, Dragon E. Blood screening by nucleic acid amplification technology: current issues, future challenges. *Molecular Diagnostics* 2000; 5: 11-21.
10. Rawal BD, Kleinman SH, Kuhns MC, Busch MP. Infectious HBV window period and its projected reduction by genome amplification testing. *Transfusion* 1998; 38 (suppl): 91S.
11. Schüttler CG, Caspari G, Jursch CA, et.al. Hepatitis C virus transmission by a blood donation negative in nucleic acid amplification tests for viral RNA. *Lancet* 2000; 355: 41-2.

12. Sun R, Jayakar H, Yeh S, Mendoza M, Wisbeski M, Iszczyszyn W, Dragon EA. Experience with PCR screening. In: Brown F, Vyas G (eds): *Advances in Transfusion Safety*. Dev Biol. Basel, Karger, 1999, Vol 102, pp 81-91.
13. Allain JP, Jewitt PE, Tedder RS, Williamson LM. Evidence that anti-HBc but not HBV DNA testing may prevent some HBV transmission by transfusion. *Br J Hematol* 1999; 107: 186-95.
14. Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Orlando ME, Raimondo G. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *N Engl J Med* 1999;341:22-6.
15. Kao JH, Lai MY, Hwang YT, Yang PM, Chen PJ, Sheu JC, Wang TH, Hsu HC, Chen DS. Chronic hepatitis C without detectable anti-hepatitis C antibodies by second generation assay: a clinicopathologic study and demonstration of the usefulness of a third-generation assay. *Dig Dis Sci* 1996;41:161-5.
16. Chen DS, From hepatitis to hepatoma: lessons from type B viral hepatitis. *Science* 1993; 262: 369-70.
17. Chen DS, Natural history of chronic hepatitis B virus infection: new light on an old story. *J Gastroenterol Hepatol* 1993;8:470-5.
18. Kao JH, Chen DS. Hepatocellular Carcinoma in Taiwan: Progress in the Past Decade (1988-1997). In: Leong ASY, Liew CT, Lau JWY, Johnson PJ, eds. *Hepatocellular carcinoma: contemporary diagnosis, investigation and management*. London: Arnold, 1999, pp 235-50.
19. Kao JH, Chen DS. Overview of Hepatitis B and C Viruses. In: *Infectious Causes of Cancer: Targets for Intervention*. Ed. Goedert JJ. Humana Press Inc.; 2000, pp 313-30
20. Wang JT, Wang TH, Lin JT, Lee CZ, Sheu JC, Chen DS. Effect of hepatitis C antibody screening in blood donors on

- post-transfusion hepatitis in Taiwan. *J Gastroenterol Hepatol.*; 1995;10:454-8.
21. Chung JL, Kao JH, Kong MS, Yang CP, Hung IJ, Lin ZT. Hepatitis C and G virus infections in polytransfused children. *Eur J Pediatr* 1997; 156: 546-9.
  22. Shih LN, Sheu JC, Wang JT, Huang GT, Yang PM, Lee HS, Sung JL, Wang TH, Chen DS. Serum hepatitis B virus DNA in healthy HBsAg-negative Chinese adults evaluated by polymerase chain reaction. *J Med Virol.* 1990; 32: 257-60.
  23. Kao JH, Heptonstall J, Chen DS. Molecular methods for hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus infection: Implications for occupational health practice. *Occupational and Environmental Medicine* 1999; 56: 730-4.
  24. Ni YH, Chang MH, Huang LM, Chen HL, Hsu HY, Chiu TY, Tsai KS, Chen DS. 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.
  25. Japanese Red Cross NAT Screening Research Group. Nationwide Nucleic Acid Amplification Testing of Hepatitis B Virus, Hepatitis C Virus and Human Immunodeficiency Virus Type 1 for Blood Transfusion and Follow-Up Study of Nucleic Acid Amplification Positive Donors. *Jpn J Infect Dis* 2000;53,116-23.