

## 中国厦门地区献血者细小病毒 B19 感染情况研究

欧山海 谢金镇 张雅丽 倪宏英 宋秀宇\*

厦门市中心血站 福建厦门 361004

**摘要** 目的: 了解中国厦门地区献血者细小病毒 B19 感染情况。方法: 对中国厦门地区部分献血者标本进行细小病毒 B19 核酸检测和抗体检测, 对核酸检测阳性标本进行序列测定和基因型分析。结果: 在总共 10 452 人份献血者标本中检出 6 例 B19 核酸阳性, 阳性率 0.06%, 阳性标本的 DNA 定量结果为  $3.59 \times 10^2 - 1.07 \times 10^4$  IU/ml; 6 例核酸阳性标本测序分析结果均为基因 I 型。B19 – IgM 抗体阳性率为 4.64% (50/1078), B19 – IgG 阳性率 16.79% (181/1078); B19 – IgG 阳性率随年龄增加而升高 ( $\chi^2 = 7.964, P < 0.05$ ), 与性别差异无关。结论: 中国厦门地区献血者细小病毒的总体感染率较其他地区偏低, 但也存在一定比例的病毒血症, 在今后的输血保障工作中应引起重视。

**关键词** 细小病毒 B19; 病毒感染; 献血者; 核酸检测; 中国厦门地区

中图分类号 R457.1

文献标识码 A

doi: 10.7534/j.issn.1009-2137.2016.05.052

## Prevalence of Parvovirus B19 Infection in Chinese Xiamen Area Blood Donors

OU Shan-Hai, XIE Jin-Zhen, ZHANG Ya-Li, NI Hong-Ying, SONG Xiu-Yu\*

Xiamen Blood Center, Xiamen 361004, Fujian Province, China

\* Corresponding Author: SONG Xiu-Yu, Senior Technologist. E-mail: songxyxm@hotmail.com

**Abstract Objective:** To estimate the prevalence of parvovirus B19 infection in Chinese Xiamen area blood donors. **Methods:** Blood samples from blood donors were tested for detection of parvovirus B19 DNA and antibody. The direct sequencing and genotype analysis of B19 DNA positive samples were performed. **Results:** Six out of 10452 samples were B19 DNA positive. The viral loads of the 6 samples were between  $3.59 \times 10^2 - 1.07 \times 10^4$  IU/ml; the positive rate of B19 – IgM was 4.64% (50/1078) and B19 – IgG was 16.79% (181/1078). The positive rate of B19 – IgG increased with ages, and was not related with the sex. **Conclusion:** The overall prevalence of parvovirus B19 infection in blood donors is lower in Chinese Xiamen area than that in other areas, however, there is still a certain percentage of viremia in donors and the attention should be paid to blood safety in the future work.

**Key words** parvovirus B19; virus infection; blood donor; NAT; Chinese Xiamen area

*J Exp Hematol* 2016; (5): 1572 – 1576

人类细小病毒 B19 (human parvovirus B19, 简称 B19) 是一种无包膜的单链线性 DNA 病毒, 能对人类致病并可通过血液传播。正常成人感染 B19 后往往呈无症状或隐性携带状态, 但免疫缺陷及血液病人感染后则容易发生关节炎、脉管炎、再生障碍性贫血危象等严重并发症; 儿童感染后可能发生传染性红斑, 孕妇感染后易导致宫内窘迫、死胎等严重后果<sup>[1]</sup>。由于该病毒具有无包膜、直径小 (18 – 20 nm)、对热不敏感等特点, 使得目前应用于血液制品中病毒灭活 (或去除) 的 S/D 法 (有机溶剂/去污剂混合物法)、过滤法和热处理法均不能将其有效灭活 (或去除), 因此 B19 病毒已经成为血液制品主要污染源之一, 国外一些国家已将其列为献血者常规筛检项目<sup>[2-3]</sup>, 但国内目前尚未开展。本研究通过

对厦门地区部分献血者进行 B19 核酸检测和抗体检测, 旨在了解本地区 B19 的感染情况, 以期为今后输血安全和血液制品安全管理政策的制订提供一定的参考依据。

基金项目: 福建省自然科学基金面上项目 (2012D049), 厦门市输血医学重点专科项目 (2012 – 2014)

\* 通信作者: 宋秀宇, 主任技师. E-mail: songxyxm@hotmail.com  
2015 – 12 – 04 收稿; 2016 – 01 – 18 接受

## 材料和方法

### 标本

从 2013 年 5 月 - 2013 年 11 月间随机检测无偿献血者标本 10 452 人份。献血者年龄 18 - 52 岁,其中男性 7418 人份,女性 3034 人份。

### 试剂与仪器

B19 - IgG 检测试剂盒(德国 DRG 公司,批号 123G/K083),B19 - IgM 检测试剂盒(德国 DRG 公司产品,批号 123M/K083); B19 核酸检测试剂盒(cobas Taqscreen DPX test,瑞士罗氏公司产品,批号 R09772); STAR 全自动加样系统(瑞士 Hamilton 公司产品),FAME 全自动酶免工作站(瑞士 Hamilton 公司产品),cobas s201 全自动核酸检测系统(瑞士罗氏公司产品)。

### 献血者细小病毒核酸检测

核酸检测采用 96 人份混合检测的模式,检测在罗氏 cobas S201 全自动核酸检测系统上完成。混合检测出现有反应性结果则分别进行两级拆分,直至获得单人份的检测结果。结果无反应性的判为阴性,有反应性的判为阳性。由于该核酸检测试剂盒为定量检测试剂盒,故最终结果为定量结果。

### 序列扩增、测定与基因型分析

自行设计合成引物,对上述单人份检测阳性的标本进行 PCR 扩增;引物序列为:上游引物 F 5'-CTGCC ACAATGCCAGTGG-3',下游引物 R 5'-CAGCAATTT CTGATATGGTT-3'。PCR 反应体系为:10 × PCR buffer 2 μl,10 mmol/L dNTPmix 0.4 μl,引物 F 0.4 μl,引物 R 0.4 μl,rTaq 0.2 μl,模板 5 μl,补足 DE-PA 水至 20 μl。扩增条件:95 °C 5 min;然后 94 °C 40 sec,58 °C 40 sec,72 °C 40 sec,35 个循环后 72 °C 5 min。扩增片段经胶回收后送上海英骏生物技术有限公司进行序列测定。扩增的序列共 343 nt,位于 B19 基因 ORF2 第 906 nt - 1248 nt 位置(编码 VP1/VP2)。测定的序列使用 DNASTAR 软件包处理后,与参考序列做同源性比对,同源性分析采用 MEGA 5.0 软件。

### 献血者细小病毒抗体检测

上述 10 452 人份献血者标本中随机抽取 1 078 人份分别应用 B19 - IgG 和 B19 - IgM 检测试剂盒进行抗体检测。所有操作严格按照说明书要求完成,检

测 OD 值大于试剂盒设定的 cutoff 值判为阳性。

### 统计学分析

应用 SPSS 17.0 对数据进行统计学分析,对率的比较采用卡方检验, $P < 0.05$  示差异具有统计学意义。

## 结 果

### 献血者细小病毒核酸检测结果

总计 10452 人份标本的检测中,共检出 5 个反应性的 96 混样池(pool of 96),经拆分后,共检出 6 例单人份 B19 核酸阳性,阳性率 0.06%。阳性标本的定量结果在  $3.59 \times 10^2 - 1.07 \times 10^4$  IU/ml(表 1)。

Table 1. Characteristics of the 6 B19V - DNA - positive samples

Sample	B19 - DNA titer( IU/ml)	B19 - IgM	B19 - IgG
XMBC No. 1	$8.26 \times 10^2$	-	-
XMBC No. 2	$1.95 \times 10^3$	-	+
XMBC No. 3	$3.59 \times 10^2$	-	+
XMBC No. 4	$1.07 \times 10^4$	+	+
XMBC No. 5	$3.14 \times 10^3$	-	+
XMBC No. 6	$1.11 \times 10^3$	+	+

### 基因分型结果

6 例核酸阳性标本经序列扩增并进行测序和同源性分析,结果都是 B19 基因 I 型(附图)。

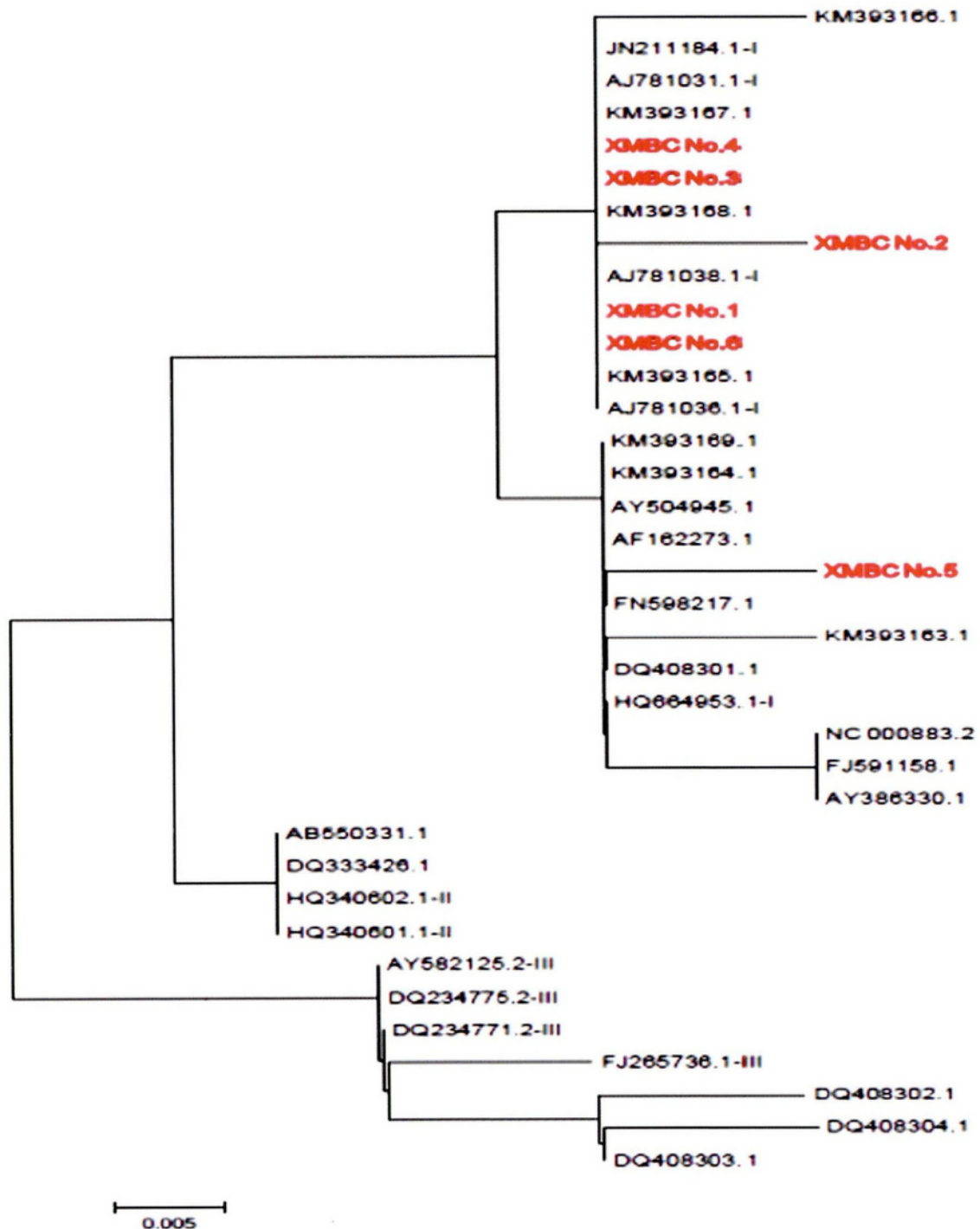
### 献血者 B19 抗体检测结果

总计 1 078 份标本中,B19 - IgM 阳性 50 份,阳性率 4.64%;B19 - IgG 阳性 181 份,阳性率 16.79%。各年龄段和性别间的阳性率如表 2 所示。B19 - IgG 阳性率随年龄增加有升高的趋势,各年龄段的阳性率总体上存在差异( $\chi^2 = 7.964, P < 0.05$ ),其中 36 - 45 岁和 46 - 55 岁两个年龄段与  $\leq 25$  岁年龄段的阳性率具有显著统计学差异( $P = 0.0065$  和  $P = 0.0007$ );女性 B19 - IgG 阳性率略高于男性,但两者间差异无统计学意义( $P = 0.1433$ )(表 2)。

### B19 抗体阳性与核酸阳性的关系

6 例 B19 核酸阳性标本中,有 5 例是 B19 - IgG 阳性,只有 2 例 B19 - IgM 阳性,见表 1。总共 50 例 B19 - IgM 阳性中,仅 2 例 B19 核酸阳性(3.9%);181 例 B19 - IgG 阳性中,仅 3 例 B19 核酸

检测阳性(1.7%) (表3)。



**Figure.** Phylogenetic tree constructed using B19V gp6 sequences by neighbor – joining with maximum composite likelihood – corrected distances. Support for the branching order was determined by 1,000 bootstrap replicates. The 6 new sequences determined in this study are labelled XMBC No1 – No 6. The scale bar at the bottom of the figure provides a scale for the amount of genetic change over time. The units of branch length are usually nucleotide substitutions per site that is the number of changes or substitutions divided by the length of the sequence.

**Table 2. Blood – donor B19V – specific IgM and IgG antibody according to donor age and gender**

Characteristic	Donors (n)	Confirmed human parvovirus B19 infection							
		IgM				IgG			
		Donors (n)	Prevalence (95% CI)	Crude OR (95% CI)	P value	Donors (n)	Prevalence (95% CI)	Crude OR (95% CI)	P value
Overall	1078	50	4.64( 3.46 – 6.07)	ND	ND	181	16.8( 14.6 – 19.2)	ND	ND
Sex									
Male	752	30	3.99( 2.71 – 5.65)	1	ND	118	15.7( 13.2 – 18.5)	1	ND
Female	326	20	6.13( 3.79 – 9.32)	3.54( 1.98 – 6.33)	< 0.0001*	63	19.3( 15.2 – 24.0)	1.29( 0.92 – 1.80)	0.1433
Age, years†									
≤25	328	17	5.18( 3.05 – 8.17)	1	ND	42	12.8( 9.34 – 16.9)	1	ND
26 – 35	403	20	4.96( 3.06 – 7.56)	0.96( 0.49 – 1.86)	0.8926	59	14.6( 11.3 – 18.5)	1.17( 0.76 – 1.79)	0.4748
36 – 45	253	12	4.74( 2.47 – 8.14)	0.91( 0.43 – 1.94)	0.8093	54	21.3( 16.5 – 26.9)	1.85( 1.19 – 2.87)	0.0065*
46 – 55	94	1	1.06( 0.03 – 5.78)	0.20( 0.03 – 1.50)	0.1164	26	27.7( 18.9 – 37.9)	2.60( 1.49 – 4.54)	0.0007*

\* P < 0.05. † Statistical comparisons were made between each age group and the youngest age group only. CI = confidence interval; ND, not determined; OR = odds ratio.

**Table 3. Relationship between blood donor B19V antibody and nucleic acid state**

	B19 – IgM +	B19 – IgG +
B19 NAT <sup>+</sup>	2	3
B19 NAT <sup>-</sup>	48	178
Total	50	181

## 讨 论

细小病毒 B19 体积小无包膜,不易通过过滤和灭活去除,可经输血传播并对部分人群造成较严重的后果,国内近年来渐有学者对献血者 B19 感染情况进行研究,但从结果看,相互的差异比较大。尤其是献血者 B19 病毒血症的检测(即 B19 核酸检测)结果,有的高达 6.33 – 20.9% [4-5],而低的仅为 0.2% – 0.58% [6-7]。这种差异除了检测的地区不同、人群不同及季节不同可能导致之外,还有个可能的重要原因是试剂差别。由于目前国内市面上缺乏权威性的商品化试剂盒,之前研究所用的 B19 核酸检测

试剂都是各单位自行研发的试剂,其检测的灵敏度和特异性等可能参差不齐,甚至不排除出现污染和假阳性的可能。本研究中 B19 核酸检测采用的是国际上较为通用的瑞士罗氏成品试剂盒,在配套的全自动核酸检测系统上完成检测,结果相对较为稳定可靠,不过,由于本研究采用的是 96 混样检测的模式,不排除有漏检更低病毒拷贝标本的可能。

从结果看,本地区献血者 B19 核酸检测阳性率为 0.06%,低于国内报道的数据 [4-7],与日本和欧美一些国家报道的数据比较接近 [8-11]。这表明本地区献血者存在相对较低阳性率的 B19 病毒血症。从定量结果看,总共 6 例阳性标本病毒载量介于  $3.59 \times 10^2 - 1.07 \times 10^4$  IU/ml,也比较低。目前国际上认为,血液中 B19 病毒载量低于  $1 \times 10^4$  IU/ml 则基本上没有传播风险 [12],因此本研究初步表明本地区血液制品在经输血传播 B19 病毒方面具有相对较低的风险系数。

关于 B19 病毒,目前公认的 3 种基因型分别为 I、II 和 III 型,其中 I 型为最主要的基因型,II 型主要在美国、巴西及一些欧洲国家出现,III 型则仅法国、巴西以及加纳有过报道 [13-16]。本研究检出的 6 例 B19 核酸阳性标本,经同源性分析显示都是基因 I

型,这与国内何苗<sup>[7]</sup>、吴瑜等<sup>[17]</sup>人报道的结果一致,提示我国流行的 B19 病毒基因型很可能也是 I 型。

本地区献血者 B19 - IgM 阳性率 4.64%, B19 - IgG 阳性率 16.79%,都低于国内其他报道的结果<sup>[6-7,18]</sup>。这也进一步佐证了本地区献血者较低的 B19 流行率。献血者 B19 - IgG 阳性率有随年龄增大而升高的趋势( $P < 0.05$ ),与郑优荣等<sup>[6]</sup>的报道一致,这可能是因为人群对细小病毒普遍易感,而且人感染细小病毒 B19 后,体内的 HPV B19 - IgG 可长时间持续存在,从而抗体阳性率随年龄增大而累积升高。献血者 B19 - IgG 阳性率与性别的关系,有的报道显示无差异<sup>[6]</sup>,有的报道则是女性高于男性<sup>[18]</sup>。本研究中女性 19.33% 高于男性的 15.69%,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),因此献血者 B19 - IgG 阳性率与性别的关系有待进一步的研究验证。

关于献血者细小病毒 B19 抗体与 B19 核酸检测的相关性,国内有人报道,33 例 B19 - IgM 阳性献血者中检出 21 例细小病毒核酸检测阳性,阳性符合率达 63.6%,而 56 例 B19 - IgG 阳性者只有 1 例核酸阳性(1.8%),似乎 B19 - IgM 与病毒血症有较强的相关性<sup>[6]</sup>。而在本研究中,181 例 B19 - IgG 阳性中只有 3 例细小病毒核酸检测阳性,阳性符合率仅 1.7%;51 例 B19 - IgM 阳性中只有 2 例细小病毒核酸检测阳性,阳性符合率也只有 3.9%,与上述 63.6% 的符合率相差甚大。造成这两个结果的巨大差异可能有两个主要方面的原因,其一是试剂原因,两个研究抗体检测的试剂相同,核酸检测试剂不同。本研究采用的是商品化试剂盒,而另一研究则是自行研制的检测试剂。不同试剂的灵敏度、特异度及准确度不同,有可能造成结果的差异;其二,根据报道,人感染细小病毒后,数天内病毒 DNA 最先被检出,大约 1-2 周后 B19 - IgM 出现,而 DNA 水平下降,随后 B19 - IgM 逐渐下降甚至消失,而 DNA 则可能逐渐下降消失也可能持续存在较长时间(数年)。由此可见,人体内 B19 - IgM 与 B19 DNA 并不是完全平行存在的,可能本研究检测到的大多数 B19 - IgM 阳性献血者体内正好处于细小病毒 DNA 消失阶段,从而造成两者较低的阳性符合率。国外的一些报道也印证了这一点,Kleinman 等<sup>[2]</sup>的研究显示 44 名 B19 DNA 阳性献血者中只有 10 名 B19 - IgM 阳性(23%),而 Kooistra 等<sup>[3]</sup>报道荷兰 67 名 B19 DNA 阳性献血者中只有 16 名 B19 - IgM 阳性(24%),两个研究结果中 B19 - IgM 与 B19 DNA 的阳性符合率都不高。

总之,本研究发现,本地区存在一定的细小病毒 B19 流行率,虽然阳性率较低且病毒载量不高,但仍不可掉以轻心。是否有必要在献血者中常规开展细小病毒 B19 筛查,有待于更多的研究来确定。

## 参 考 文 献

- 曹虹,贡树基,赵卫,等. 人微小病毒 B19 感染的研究进展. 微生物学通报 2007; 34(2): 332-338.
- Kleinman SH, Glynn SA, Lee TH, et al. Prevalence and quantitation of parvovirus B19 DNA levels in blood donors with a sensitive polymerase chain reaction screening assay. *Transfusion*, 2007; 47(10): 1756-1764.
- Kooistra K, Mesman HJ, de Waal M, et al. Epidemiology of high-level parvovirus B19 viraemia among Dutch blood donors, 2003-2009. *Vox Sang* 2011; 100(3): 261-266.
- 杨忠心,何惠君,代方,等. 无偿献血员血清人微小病毒 B19 感染情况调查. 华中科技大学学报(医学版) 2003; 32(3): 344-345.
- 李宝栋,谢圣高,宁勇. 临沂市献血人员人细小病毒 B19 感染情况的调查. 医学检验与临床 2010; 21(1): 58-60.
- 郑优荣,李仲平,梁浩坚,等. 广州地区献血人群人类细小病毒 B19 感染情况及病毒载量分析. 中国输血杂志 2009; 22(7): 549-551.
- 何苗,柯玲,李武平. 中国献血人群中人细小病毒 B19 的分子流行病学调查. 中国输血杂志 2010; 23(10): 890-891.
- Wakamatsu C, Takakura F, Kojima E, et al. Screening of blood donors for human parvovirus B19 and characterization of the results. *Vox Sang*, 1999; 76(1): 14-21.
- Heegaard ED, Panum Jensen I, Christensen J. Novel PCR assay for differential detection and screening of erythrovirus B19 and erythrovirus V9. *J Med Virol* 2001; 65(2): 362-367.
- McOmish F, Yap PL, Jordan A, et al. Detection of parvovirus B19 in donated blood: a model system for screening by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31(2): 323-328.
- Jordan J, Tiangeo B, Kiss J, et al. Human parvovirus B19: prevalence of viral DNA in volunteer blood donors and clinical outcomes of transfusion recipients. *Vox Sang*, 1998; 75(2): 97-102.
- Parsyan A, Candotti D. Human erythrovirus B19 and blood transfusion - an update. *Transfus Med* 2007; 17(4): 263-278.
- Bergallo M, Costa C, Sidoti F, et al. Variants of parvovirus B19: bioinformatical evaluation of nested PCR assays. *Intervirology*, 2008; 51(2): 75-80.
- Servant A, Laperche S, Ltidhmand F, et al. Genetic diversity within human erythroviruses: identification of three genotypes. *J Virology*, 2002; 76(18): 9124-9134.
- Koppelman MH, Rood IG, Fryer IF, et al. Parvovirus B19 genotypes 1 and 2 detection with real-time polymerase chain reaction assays. *Vox Sang* 2007; 93(3): 208-215.
- Toan NL, Duechting A, Kremsner PG, et al. Phylogenetic analysis of human parvovirus B19, indicating two subgroups of genotype I in Vietnamesse patients. *J Gen Virol* 2006; 87(Pt 10): 2941-2949.
- 吴瑜,耿彦生,王菁舟,等. 我国血液制品中人细小病毒 B19 污染情况及基因型的初步研究. 中华微生物学和免疫学杂志, 2009; 29(11): 1031-1034.
- 魏强,李岩,王健伟,等. 吉林省供血者人类细小病毒 B19 IgG 抗体的调查. 中华实验和临床病毒学杂志 2006; 20(2): 60-62.