

隐匿性乙型肝炎病毒感染的检测及其临床应用价值

刘金涛(呼和浩特市第二(传染病)医院 实验诊断科, 呼和浩特 010031)

摘要: 统一隐匿性乙型肝炎病毒感染(occult hepatitis B virus infection, OBI)的检测和判定标准已成为临床应用实践中面对的重要课题之一, 尤其应进一步对OBI的分子机制及分子模式发生频率的不同进行细致、深入的探究, 为进一步阐明OBI的临床及公共卫生学价值奠定基础, OBI的检测具有积极的现实意义和深远的临床实践意义。

关键词: 隐匿性乙型肝炎病毒感染(OBI); 肝炎表面抗原, 乙型; 乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸; 聚合酶链反应; 临床价值

Detection and clinical value of occult hepatitis B virus infection

LIU Jin-tao (Clinical Laboratory, the No.2 (Infectious Diseases) Hospital of Hohhot, Hohhot 010031, China)

Abstract: Unification of detection methods and diagnostic criteria of occult hepatitis B virus infection (OBI) have become an important research issue. Further research on its molecular mechanism and the frequency of occurrence of different molecular patterns were needed in order to lay the foundation for further clarification in clinical and public health. The detection of OBI has a positive practical significance and far-reaching clinical significance.

Key words: Occult hepatitis B virus infection (OBI); Hepatitis B surface antigen (HBsAg); Hepatitis B virus DNA (HBV DNA); Polymerase chain reaction (PCR); Clinical value

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染而乙型肝炎病毒表面抗原(hepatitis B virus surface antigen, HBsAg)阴性很难用常规检测方法检出, 是较为复杂的流行病学和临床课题之一。HBsAg和HBV DNA血液筛查和预防接种至关重要^[1]。然而, 流行病学对隐匿性乙型肝炎病毒感染(occult hepatitis B virus infection, OBI)的研究主要集中于不同人群OBI患病率的横断面调查, 鉴于研究对象的选取方法不一及检测指标和手段等的不同, 结果差异很大^[2]。OBI作为一种特殊形式的感染类型, 正逐渐受到临床医师及患者的高度重视。随着社会、经济的发展, 人们对健康及诊疗水平提出了更高的要求与期盼, 特别是对临床及医学检验OBI提出了更高的要求。产科OBI水平筛查是能否及时阻断母婴垂直传播(mother to infant vertical transmission of hepatitis B virus, MIVT)和父婴垂直传播(father to infant vertical transmission of hepatitis B virus, FIVT)、能否优生优育、能否造福后代的关键。另外, OBI水平筛查在减少和避免医院感染及医疗纠纷、减少医务人员职业暴露风险方面也

具有重要意义。本文就OBI的感染机制、生物学特性及临床特征作简要概述。

1 OBI

OBI亦称隐匿性乙型肝炎(occult hepatitis B, OHB), 是指除血清转换前的机会性“窗口”(window of opportunity)外, 血清和(或)肝组织内HBV DNA(+)而HBsAg(-)或常规方法(如ELISA等)无法检测到, 伴或不伴抗-HBc或抗-HBs^[3], 是HBV感染的一种特殊形式。其发生机制尚未明确, 多以输血、母(父)婴、器官移植等方式传播, 且与慢性肝病、肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的发生、发展及治疗密切相关, 对公共卫生学具有重要价值。近年, 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术的广泛开展与应用, 特别是外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中HBV DNA的检测, 为OBI的真实存在提供了更多更为确切的信息^[4]。

区分隐性感染与隐匿性感染非常重要, 隐性感染是指感染了病原体, 因免疫系统很强大, 未出现临床症状, 产生了对这种疾病的抵抗力, 将病原体清除。大多免疫功能正常者在感染病毒或细菌后都会表现出隐性感染, 所以只有少数人患病。隐匿性感染是指感

染了病原体,病原体没有被免疫系统清除,潜伏在体内,但没有表现出临床症状,大多无症状HBsAg携带者(asymptomatic hepatitis B virus surface antigen carriers, ASC)就属于这种情况。HBV感染常隐袭起病,很少有明显临床症状。

2 OBI的发生原因及影响其检出的因素

2.1 OBI的发生是病毒和机体相互作用的结果,可能具有多种机制

2.1.1 HBV DNA复制水平低是OBI发生的原因之一 OBI的存在和临床意义已经被许多研究所证实,目前已有大量研究开始关注其发生机制^[5]。临床上,OBI存在多种形式,如肝功正常、HBsAg(-)者,可在急性HBV感染恢复后,也可能在慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者自发或使用抗病毒药物后出现。OBI者肝脏HBV DNA水平一般低于 10^5 拷贝/ml^[6,7]。

2.1.2 HBV基因变异致现有试剂难以检出HBsAg OBI与抗-HBs(-)、抗-HBs低水平或孕产妇高病毒载量和逃避S基因突变有关^[8]。病毒变异是致OBI发生的原因之一^[9,10],除少数HBsAg变异无法被检测试剂所辨识外,多数变异可以同野毒株一样被辨识,大多数OBI是由于HBV DNA的低水平复制所致。目前,研究主要集中在S基因,而X基因是转录、反转录和正链合成的起点,此处变异可能会影响病毒的转录和复制,但由于X基因结构和功能的复杂性,对其变异与OBI的关系研究相对较少^[11]。

2.1.3 HBV整合到宿主染色体中导致HBsAg表达的改变和HBsAg(-)感染^[12] OBI患者中可检测到整合型HBV DNA,HBV DNA的整合可导致HBV DNA序列重排,引起HBsAg表达的改变。HBV DNA的高整合率与HBV感染(包括OBI)和肝硬化(hepatocirrhosis, LC)的发生密切相关。

2.1.4 PBMC HBV DNA的存在可能是OBI的原因之一 HBV和其他嗜肝DNA病毒能够感染PBMC^[13],在急性乙型肝炎(acute hepatitis B, AH)和CHB患者PBMC中出现HBV DNA的频率很高,包括T、B等细胞;HBsAg(-)患者PBMC HBV感染的确立支持PBMC可能是HBV持续存在的原因。研究发现,某些患者自发或药物清除HBsAg 4年后仍可在PBMC检测出HBV DNA^[14];有抗-HBs(+)和抗-HBc(+)患者在接受了血清抗-HBc(+)供体肝移植5个月时发现HBsAg(+),移植10年后血清HBV DNA(-),但肝脏、PBMC仍可检出HBV DNA^[15]。

2.2 宿主免疫应答异常 HBV感染的转归取决于病毒复制和机体免疫系统的相互作用与平衡,细胞免疫介导的免疫应答是中止HBV DNA复制的主要机制。HBV

生活周期中产生的共价闭合环状DNA分子(covalently closed circular DNA, ccc DNA)作为附加体存在于细胞核中,仍然作为与OBI有关的分子基础以及基因转录的模板。隐匿性HBV携带者HBsAg(-)状态是强大的抑制病毒复制的机制,可能是由于宿主的免疫反应,合并感染其他传染性病原体 and 遗传因素等所致^[16]。

2.3 受其他病毒感染的干扰 对合并OBI的丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)慢性感染者进行抗逆转录病毒治疗(antiretroviral therapy, ART)时,随着HCV RNA复制被抑制,HBV DNA载量却在增加^[17]。HBV和HCV混合感染肝细胞中HBV DNA水平低于单纯HBV感染的肝细胞^[18],混合感染时存在相互干扰、抑制,血清HBsAg表达通常被延迟,且水平相对较低、持续时间相对较短,可能与HCV核心蛋白抑制HBV相关。感染血吸虫也能抑制肝实质细胞HBV DNA的复制^[19]。另外,长期饮酒可以降低HBV DNA的表达,可以部分解释HBsAg(-)酗酒者中HBV DNA(+)的高发生率^[20]。

2.4 HBV免疫复合物 急性自限性HBV感染者恢复后,虽然血清中抗-HBs(+),但仍能检测到HBV DNA颗粒,患者HBV DNA阳性率高达91%,且可持续20到30年或更长。AH早期HBV可以自由形式和免疫复合物(immune complex, IC)形式存在,在HBsAg转为抗-HBs后就转化为以IC为主,这表明血清中的HBV DNA与抗-HBs形式的IC可能会促成OBI的发生。

2.5 检测试剂的灵敏度和质量问题 血清HBV DNA特异性抗原或抗体水平低于该试剂盒检测的灵敏度时,乙型肝炎病毒血清学标志物(hepatitis B virus markers, HBV-M)常会漏检。

3 OBI检测的金标准

动物实验也证实存在OBI^[21]。HBV DNA PCR检测是检测OBI的金标准^[22]。确立OBI的诊断,需对HBV DNA基因组的不同区段扩增并重复检测^[23,24]。研究表明,OBI为二次隐性感染(SOI),这种形式的残余感染是一种常见的、长期的后果^[25]。也有研究表明,OBI可以促进肝纤维化及LC的发生与进展^[26]。血液透析患者预防HBV感染仍然是巨大挑战^[27]。一些地区OBI在血液透析患者中普遍存在,并与年龄、糖尿病等因素有直接的关系。

4 OBI的检测包括HBsAg和HBV DNA检测两方面

4.1 检测试剂 大多检测试剂只针对某一基因(血清型),对其他基因(血清型)灵敏度相对较差。不同试剂对HBV DNA变异株的检测能力相差甚远。有的ELISA试剂仅采用单一单克隆抗体(monoclonal antibodies, Mc-Ab),缺少对突变株的检测能力,

造成漏检;而含多克隆抗体(polyclonal, Pc-Ab)的检测试剂能有效识别各种逃逸变异株,较大程度避免可能出现的漏诊。HBV感染后出现不同HBV-M, HBV-M血清学检查结果不同具有不同的判定意义。OBI患者通常会出现抗-HBc和(或)抗-HBs(+),但有时HBV-M全为(-)。电化学发光免疫分析技术(electrochemiluminescence immunoassay, ECLIA)对HBsAg检测灵敏度可达0.09 ng/ml;微粒子酶免法(microparticle immunoassay, MEIA)对HBsAg检测的灵敏度为0.17~0.2 ng/ml,很大程度上避免了HBsAg的漏检。

4.2 OBI的确诊 建议用敏感度高的PCR(如nested PCR)来检测HBV DNA,至少采用3对或以上针对HBV DNA不同基因区的引物进行PCR扩增,因HBV DNA水平较低,只有两对以上引物扩增同时阳性才能确诊为OBI。逆转录PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测OBI具有高度的灵敏性。由于成本、诊断、疗效等原因,对防止HBV通过输血传播的高灵敏度分析采用核酸扩增技术(NAT)仍存在争议^[28]。HBsAg(-)献血者中存在OBI,潜在性血源性感染高危人群进行传染性标志物的检测对于血液传染性疾病的预防和减少因输血后感染引起的医疗纠纷有着十分重要的意义^[29],为此,在献血者中开展NAT非常有必要,在减少和避免院内感染、医疗纠纷,减少医务人员职业暴露等方面也具重要意义。

5 讨论

5.1 一般CHB患者通过血清HBsAg检测而确诊 近年,越来越多的文献资料和临床研究表明,不管是自限性AH,还是CHB ART成功者,HBsAg清除后,部分患者肝组织仍可检出HBV DNA,肝细胞损伤其实并未停止,仍然可以发生LC或HCC。

5.2 我国人群HBV感染率较高是OBI存在的基础 HBsAg(-)不能排除HBV感染,尤其是在HBV感染高发地区。因OBI检测较为复杂,目前还未在临床开展广泛的常规检测,建议对以下情形进行OBI检测:

①HCV感染者通过抗病毒治疗(antiviral therapy, AVT)后,HCV RNA已完全清除,ALT仍升高且不能用其他原因解释(脂肪肝、药物肝功能损伤等);②有HBV感染的高危因素,患者免疫系统可能会受到抑制;③不明原因肝病者;④单纯抗-HBc(+)患者若存在OBI,会影响临床处理(如捐献器官、生殖医学、计划接种疫苗等)。

6 OBI检测的临床价值

OBI是输血、血液透析以及脏器移植和生殖医学(如试管婴儿等)等播散HBV的潜在危险,也是隐匿性肝病的致病因素之一。OBI恶化已有诸多报道,

但发生频率尚不明确。在HCC患者中常发现OBI的存在,认为OBI与原发肝癌(primary liver cancer, PHC)发生有关,尤其是合并HCV感染时。当HCV感染合并OBI时,将会影响其自然病程或增加疾病的严重程度。OBI是乙肝疫苗(HB-accin, HBac)接种无应答的原因之一。OBI水平筛查在减少和避免医院感染及医疗纠纷、减少医务人员职业暴露风险方面也具有重要意义。OBI还是MIVT和(或)FIVT途径的重要传染源之一。

综上所述,HBV是一种严重危害人类健康的病原体,是CHB、LC和PHC发生的主要原因之一。临床研究和实践充分证实,OBI是一种特殊形式的HBV隐性感染,其发生与诸多因素相关。不同因素在OBI发生中的主次地位不同,不同地区和人群中的流行规律也不确切,而临床实践中检测方法和判定标准的不一致,降低了不同研究检测结果间的可比性。因此,OBI检测方法和诊断、判定标准的统一,已成为OBI研究亟待解决的重要课题。因此,迅速、准确的诊断,尤其是OBI的检出,对乙型肝炎的治疗和预后具有极其重要的价值。

参考文献

- [1] Romanò L, Velati C, Cambiè G, et al. Hepatitis B virus infection among first-time blood donors in Italy: prevalence and correlates between serological patterns and occult infection. SIMTI study group for HBV infection among first-time blood donors[J]. Blood Transfus, 2013, 11: 281-288.
- [2] 孔令娜, 秦波. 隐匿性乙型肝炎病毒感染的流行病学研究进展[J]. 中华流行病学杂志, 2013, 34: 844-848.
- [3] Caviglia GP, Abate ML, Manzini P, et al. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C treated with antiviral therapy[J]. Hepat Mon, 2012, 12: e7292.
- [4] Vakili Ghartavol Z, Alavian SM, Amini S, et al. Prevalence of occult hepatitis B virus in plasma and peripheral blood mononuclear cell compartments of patients with chronic hepatitis C infection in tehran-iran[J]. Hepat Mon, 2013, 13: e10134.
- [5] 戴钰, 张振华, 李旭. 乙型肝炎病毒S基因变异与隐匿性感染的关系[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2011, 38: 317-321.
- [6] Cacchiola I, Pollicina T, Souadrito G, et al. Quantification of intrahepatic Hepatitis B Virus (HBV) DNA in patients with chronic HBV infection[J]. Hepatology, 2000, 31: 507-512.
- [7] Kim YS, Jang JY, Eun SH, et al. Detection of intrahepatic HBV DNA in HBsAg negative liver diseases[J]. Korean J Hepatol, 2006, 12: 201-208.
- [8] Su H, Zhang Y, Xu D, et al. Occult hepatitis B virus infection in anti-HBs-positive infants born to HBsAg-positive mothers in China[J]. PLoS One, 2013, 8: e70768.
- [9] Hou J, Wang Z, Cheng J, et al. Prevalance of naturally occurring surface gene variants of hepatitis B virus in nonimmunized surface antigen negative Chinese carriers [J]. Hepatology, 2001, 34: 1027-1034.
- [10] Jeantet D, Chemin I, Mandrand B, et al. Cloning and expression

- of surface antigens from occult chronic hepatitis B virus infections and their recognition by commercial detection assays[J]. *J Med Virol*,2004,73:508-515.
- [11] 孙丙虎, 张振华, 李旭. 乙型肝炎病毒X基因变异与隐匿性感染的关系[J]. *国际流行病学传染病学杂志*,2012,39:41-44.
- [12] Yotsuyanagih H, Hashidume K, Suzuki M, et al. Role of Hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis in alcoholics [J]. *Alcohol Clin Exp Res*,2004,28:181S-185S.
- [13] Lamlein JP, Trepo C. The hepatitis B virus and the peripheral blood mononuclear cells: a brief review[J]. *J Hepatol*,1990,10:120-124.
- [14] Blendis L, Lurie Y, Oren R. Occult HBV infection both hidden and mysterious [J]. *Gastroenterology*,2003,125:1903-1905.
- [15] Tai DI, Chung ZJ, Chen CL, et al. Reappearance of HBsAg with compartmentalized different HBV strains in allograft versus PBMC of the recipient [J]. *J Gastroenterol*,2002,36:200-205.
- [16] Larrubia JR. Occult hepatitis B virus infection: A complex entity with relevant clinical implications[J]. *World J Gastroenterol*,2011,17:1529-1530.
- [17] Khattab E, Chemin I, Vuillermoz I, et al. Analysis of HCV coinfection with occult hepatitis B virus in patients undergoing IFN therapy[J]. *J Clin Virol*,2005,33:150-157.
- [18] Rodríguez-Iñigo E, Bartolomé J, Ortiz-Movilla N, et al. Hepatitis C virus (HCV) and hepatitis B virus (HBV) can coinfect the same hepatocyte in the liver of patients with chronic HCV and occult HBV infection[J]. *J Virol*,2005,79:15578-15581.
- [19] Mcclary H, Koch R, Chisari FV, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication during schistosoma mansoni infection in transgenic mice[J]. *J Exp Med*,2000,192:289-294.
- [20] Ganne Carrié N, Kremsdorf D, Garreau F, et al. Effect of ethanol on hepatitis B virus preS/S gene expression in the human hepatocellular carcinoma derived HEP G2 hepatitis B DNA positive cell line[J]. *J Hepatol*,1995,23:153-159.
- [21] Dickens C, Kew MC, Purcell RH, et al. Occult hepatitis B virus infection in chacma baboons, South Africa[J]. *Emerg Infect Dis*,2013,9:598-605.
- [22] Said ZN. An overview of occult the patitis B virus infection[J]. *World J Gastroenterol*,2011,17:1927-1938.
- [23] Marrero JA, Lok AS. Occult hepatitis B virus infection in patients with hepato cellular carcinoma: innocent bystander, cofactor, or culprit?[J]. *Gastroenterology*,2004,126:347-350.
- [24] Conjeevaram HS, Lok AS. Occult Hepatitis B virus infection: a hidden menace?[J]. *Hepatology*,2001,34:204-206.
- [25] Mulrooney-Cousins PM, Michalak TI. Persistent occult hepatitis B virus infection: Experimental findings and clinical implications[J]. *World J Gastroenterol*,2007,13:5682-5686.
- [26] De la Fuente RA, Gutiérrez ML, Garcia-Samaniego J, et al. Pathogenesis of occult chronic hepatitis B virus infection[J]. *World J Gastroenterol*,2011,17:1543-1548.
- [27] Keyvani H, Agah S, Kabir A, et al. Prevalence and risk factors of isolated anti-HBc antibody and occult hepatitis B infection in hemodialysis patients: a nationwide study[J]. *Ann Hepatol*,2013,12:213-219.
- [28] Izmirli S, Celik DG, Yuksel P, et al. The detection of occult HBV infection in patients with HBsAg negative pattern by real-time PCR method[J]. *Transfus Apher Sci*,2012,47:283-287.
- [29] 徐小燕, 邱学勋, 郭希. 潜在性血源性感染高危人群传染性标志物检测结果分析[J]. *国际检验医学杂志*,2011,32:2493-2494.

收稿日期: 2015-06-16