

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2015.06.020

· 综述 ·

隐匿性乙型肝炎病毒感染的实验室检测与诊断

Laboratory detection and diagnosis of occult HBV infection

李工厂(LI Gong-chang)^{1,2}, 吴尚为(WU Shang-wei)^{1,2}

(1 广州金域医学检验中心有限公司, 广东 广州 510330; 2 天津医科大学, 天津 300070)

(1 Guangzhou Kingmed Center for Clinical Laboratory, Guangzhou 510330, China; 2 Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

[关键词] 乙型肝炎病毒; 隐匿性乙型肝炎病毒感染; 实验室检测; 诊断标准

[中图分类号] R512.6⁺2 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2015)06-0429-04

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus infection, HBV)感染仍然是一个严重的公共卫生问题,全球约三分之一的人存在曾存在过 HBV 感染的血清学证据,约 3.5 亿人发生过感染,其流行特征存在地域差异^[1]。中国处于 HBV 感染分布的高、中流行区,平均感染率约 8%^[2]。HBV 感染临床分型包括:无症状携带者、急性乙型肝炎、重型乙型肝炎(乙肝相关肝衰竭)、慢性乙型肝炎、乙肝相关肝硬化、肝癌等。临床上发现部分 HBV 感染者乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)血清学检测阴性,但分子生物学检测 HBV DNA 阳性,这类特殊感染模式引起研究者和临床医生的广泛关注,也由此发展出隐匿性乙型肝炎病毒感染(occult hepatitis B virus infection, OBI)的概念。近几年来,随着研究的不断深入,对其认知已经达到较高水平^[3]。

1 OBI 定义及血清型

1.1 OBI 定义 OBI 首次报道于 1978 年,也称为沉默性(silent)或潜在性(latent)HBV 感染^[4]。OBI 曾被定义为 HBsAg 阴性,肝脏组织或血清中 HBV-DNA 阳性,伴或不伴血清 HBV DNA 阳性的 HBV (<200 IU/mL)感染^[5]。国内专家对其定义为:在排除 HBV 感染的急性窗口期后,主流试剂检测血清 HBsAg 阴性,血清和(或)肝组织中 HBV DNA 阳性,且处于低水平复制状态(HBV DNA < 200

IU/mL),可伴有血清乙型肝炎病毒表面抗体(抗-HBs, HBsAb)、乙型肝炎病毒 e 抗体(抗-HBe, HBeAb)和(或)乙型肝炎病毒核心抗体(抗-HBc, HBcAb)阳性^[6]。

1.2 血清型 依据血清中是否存 HBcAb 和 HBsAb,患者可被分为血清学阳性及血清学阴性 OBI,前者血清 HBcAb 阳性,伴或不伴 HBsAb 阳性,约占 78%;后者二者均阴性,约 22%^[7-8]。血清学阳性 OBI 患者血液中病毒载量相对较高^[9],能够刺激宿主产生保护性记忆 T 细胞,从而抑制病毒复制;血清学阴性患者因感染较为隐匿和缺少保护性免疫 T 细胞,反而更具流行病学意义。另外,对患者进行血清学分型可能有助于对患者进行个体化临床干预。

2 OBI 临床意义

OBI 的患病率因地域、人群而异,但检测技术的不同也可导致患病率的差异^[10]。部分研究可能夸大 OBI 的患病率,因为临床上确实存在一些因素使其患病率难以准确估计^[11]。迄今为止,有关 OBI 的临床影响一直存在着争论,其与临床相关性方面的研究日益增多^[3, 12-16],特别是其潜在的传染性,复发风险,加速肝脏其他疾病和肝细胞癌进展等方面还需要更为深入的研究^[17]。国外学者^[10]通过对患有肝脏疾病(丙型肝炎、隐源性肝病)、肠外感染高风险患者(胃十二指肠、脾脏、骨髓感染者等)、人类免疫

[收稿日期] 2014-11-18

[作者简介] 李工厂(1988-),男(汉族),河南省商丘市人,硕士研究生,主要从事临床微生物检验研究。

[通信作者] 吴尚为 E-mail:lab-wushangwei@kingmed.com.cn

缺陷病毒(HIV)感染者、献血者、血液透析患者,以及一般人群进行研究^[11],发现在伴有可引起肝损伤因素的情况下,OBI 能加速肝纤维化和肝细胞癌发生,HBV 感染可以在宿主免疫抑制时复燃,HBV 可经器官移植和输血途径传播。研究进而认为在上述人群中 OBI 的检测与诊断是有必要的^[18]。但 OBI 患者大多无明显临床症状,因此,检验用标志物的选择和组合,以及相关的实验室检测能力尤显重要。目前,OBI 的实验诊断是以常规血清学检测为基础,联合分子检测技术;前者主要包括乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、HBcAb、HBsAb,以及乙型肝炎病毒表面大蛋白(hepatitis B virus large surface protein,HBLP)等标志物,后者主要包含肝组织或血清中 HBV DNA 的检测。

3 OBI 实验室检测

3.1 血清学检测 HBsAg 是 HBV 感染的特征性标志物之一,故 OBI 筛查也从该项检测开始,要求检测灵敏度高^[17]。目前,HBsAg 检测技术已趋于成熟,且多样化,灵敏度可达 0.1~0.62 ng/mL,特异性也有了极大地提高^[6],现有技术,如微粒子电化学发光技术可满足 HBsAg 检测要求。HBsAg 检测也面临着挑战,如各种选择压力下病毒发生突变,病毒载量较少致 HBsAg 分泌减少,宿主免疫系统功能,多种不同 HBsAg 的检测试剂和设备,以及报告结果采用的单位和各单位之间的换算,都可能对其检测结果以及诊断造成影响^[18]。

HBcAb 是由 HBcAg 刺激免疫细胞产生的特异性抗体,也是出现最早的抗体^[18]。HBcAb 几乎存在于每个曾经感染过 HBV 的患者血清中,不具有保护性,也不能完全用来区分急、慢性感染,其 IgM 亚型能在一定程度上证明患者处于急性感染期^[19]。Brechot 等^[20]研究发现,HBV DNA 的阳性率在“抗 HBc 单项阳性模式”的患者中较高,HBsAb 和 HBcAb 均阳性患者中居中,在血清学阴性中最低,提示“抗 HBc 单项阳性”的血清学模式对 OBI 的筛查与诊断具有一定的意义^[21]。研究^[18]推荐 HBcAb 作为在不宜进行肝穿刺 HBV DNA 检测时的替代标志物。Urbani 等^[23]研究认为 HBcAb 检测比较经济实用,其检测人群包括 OBI 携带者、献血者、器官移植者、面临感染高风险的免疫抑制人群,以及普通人群。HBcAb 检测存在争议,如 HIV 感染、器官移植等,因宿主免疫功能遭受严重损害,

致使患者血清中无 HBcAb 或低于 HBcAb 检测限;HBV 感染率的地域性差异会影响该项结果的解读;但 HBcAb 和 HBV DNA 同时检测对筛查和诊断间歇性病毒血症的 OBI 患者具有很大意义。总之,多数研究仍倾向于 HBcAb 对诊断 OBI 的重要意义。

HBsAb 是 HBV 感染自然病程中最后出现的抗体,能中和病毒,具有保护性,与 HBcAb 联合进行 OBI 的血清学分型。多数研究认为,HBsAb 阴性 OBI 携带者具有一定的传染性^[24]。此外有研究^[25]发现,0.5%~15% HBsAb 阳性个体血清中存在着低拷贝的 HBV DNA,威胁器官移植和接受输血患者的健康。在德国、澳大利亚和日本等国家,要求单位血液制品中 HBsAb 滴度超过 100 IU/mL,才可进行输注。

HBLP 是 HBV Dane 颗粒和亚病毒颗粒包膜蛋白的主要成分之一,与 HBV 复制程度密切相关^[26]。HBV 感染后,肝细胞合成的 HBLP 数量远远超过病毒组装所需要的量,可用于 HBV 和 OBI 的筛查^[26]。HBLP 检测相对提高了血清学检测的灵敏度,但其表达的多变性使其应用具有局限性,尤其是作为监测 HBV 复制的标志物,有待进一步研究。

3.2 分子生物学检测 近 20 年来,分子生物学检测在疾病诊断和疗效监测方面的应用得到了极大发展。其原理主要通过靶分子扩增和信号放大机制,对核酸分子进行高灵敏检测和精确鉴别,在 DNA 病毒检测方面也得到广泛应用。OBI 检测主要是应用分子生物学技术对患者肝脏组织内或血清中 HBV DNA 进行定性或定量测定。

3.2.1 肝组织中的 HBV DNA 检测 目前,肝组织内 HBV DNA 的检测是 OBI 最具权威的诊断方法^[17],也是研究人员建议的 OBI 诊断金标准^[18]。此检测方法因需要肝脏穿刺取样检测,具有一定的难度,不能大范围的推广和应用,作为 OBI 诊断金标准难以得到广泛接受。同时,国内专家研究^[6]中发现,整合到宿主细胞中的 HBV DNA,使 OBI 诊断金标准进一步受到挑战,因此,肝组织 HBV 共价闭合环状 DNA(HBV covalently closed circular DNA,HBV cccDNA)的检出更具权威性^[6],但具体的检测技术、实验操作步骤及相关试剂选择还有待进一步研究。

3.2.2 血清 HBV DNA 检测 OBI HBV DNA 水平一般在 10~425 copies/mL(约 2~80 IU/mL),表明其对检测技术的敏感性和特异性具有较高的要求。

目前,检测 HBV DNA 的分子技术主要有巢式聚合酶链反应(PCR)、荧光定量 PCR 和转录介导扩增(transcription-mediated amplification, TMA)等,这些方法的检测范围均低至 5 IU/mL,其敏感性可以满足 OBI 诊断的需求。此外,在特异性方面,Taormina Group 要求引物必须能够特异性扩增 HBV 基因组不同区域,如 Enhancer I(ENHI)区、前 C/C(precore/core)区、S[surface/polymerase (S) genomic region]区等区域^[18],同时,与各种基因型共有的高度保守序列互补。目前,对 OBI 的分子诊断标准为:(1)HBsAg 阴性患者的肝脏或外周血中 HBV DNA 的 4 个靶向扩增区域至少 2 个以上检测阳性;(2)必须对 DNA 靶向检测区进行定量检测,以 HBV DNA < 200 IU/mL 临界值排除突变所致的 HBsAg 检测假阴性,从而出现的 OBI 假阳性。

Brechot 等^[27]于 1985 年报道了在慢性乙型肝炎患者的肝脏或血清中检测到了 HBV DNA,同时得出在传统血清标志物检测阴性患者中存在 HBV DNA 扩增的结论。随后研究^[28]证实,病毒基因组可存在于肝脏以外组织,为分子检测技术在外周血样本中检测 HBV DNA 奠定了基础。目前,绝大部分研究都应用分子检测技术对 HBsAg 阴性群体进行检测,Minuk 等^[22]应用特异性引物(分别针对 ENHI 区、前 C/C 区和 S 区 3 区)对 1 007 例 HBsAg 阴性血清患者样本进行实时 PCR 扩增,阳性结果者应用巢式 PCR 技术进一步分析,证明基于实验研究人群得出的 OBI 的诊断标准和检测方法对于一般人群也适用。另外,对比分析肝脏组织内和外周血中 HBV DNA 检测结果,国内专家^[6]倾向于认为后者阳性对 OBI 的诊断意义更大,可能与 HBV DNA 可整合于宿主肝细胞基因组有关,这对 OBI 诊断金标准产生了一定的影响。目前,可以利用 PCR 及其他分子检测技术的高灵敏性和特异性进行 OBI 的辅助诊断,但仍面临一些问题,如分子检测中的污染、假阳性;另外,间歇性病毒血症患者检测结果假阴性问题对 OBI 的诊断也具有挑战,改良和完善相关技术非常必要。

4 结论与展望

OBI 危害人类健康,大多数患者因无明显症状而被忽视;同时,对于 OBI 的检测与诊断也缺少权威性检测指南作为指导。目前,OBI 筛查主要依据 HBV 感染检测的常用标志物:HBsAg、HBcAb、

HBsAb 和肝脏组织及血清中 HBV DNA。对其诊断,必须包括 HBsAg 和 HBV DNA 的组合检测,且标志物组合应具有一定的层次性,因人因地而异。目前,HBsAg 和肝脏组织 HBV DNA 是最理想的检测组合,但难以广泛使用,HBcAb 可作为肝脏组织 HBV DNA 的替代检测;HBsAg 和血清中 HBV DNA 的组合次之,却最常用,不同人群的广泛适用性已被证明^[22]。HBcAb 和 HBsAb 的检测除有助于 OBI 分型外,在一定程度上可以预测 OBI 的检测结果,尤其是“抗 HBc 单项阳性”的血清学模式,而 HBsAb 作为保护性抗体在器官移植和输血过程中也有重要的临床意义。OBI 已可采用相关标志物进行检测与诊断,但参照现有某些感染疾病的筛查模式仍难以对全体人群进行有效筛查。结合我国国情和国内外相关研究,OBI 筛查的目标人群应极具针对性^[18, 29],包括献血者和器官捐献者、长期接受免疫抑制剂治疗的患者、血液透析患者、慢性丙型肝炎病毒感染者、肝细胞癌患者、隐性肝脏疾病患者、孕妇和老年人等特殊人群。

综上所述,目前 OBI 的检测与诊断依赖血清学和分子生物学的联合检测,高敏感性的 HBsAg 检测方法是 OBI 筛查与诊断的基础,在此基础上进行分子检测确认,最后加以血清学分类,有助于临床诊断和治疗。乙肝标志物检测技术的高速发展,促进了对 OBI 的认识,同时我们仍面临挑战,制定出适合我国国情的 OBI 检测操作指南还需多方努力。

[参考文献]

- [1] Kane M. Global programme for control of hepatitis B infection [J]. *Vaccine* 1995,13 (Suppl 1):S47 - S49.
- [2] 庄辉. 乙型肝炎流行病学研究进展[J]. *中国医学前沿杂志(电子版)*,2009,1(2):18 - 24.
- [3] Nishikawa H, Osaki Y. Clinical significance of occult hepatitis B infection in progression of liver disease and carcinogenesis [J]. *J Cancer*,2013,4(6):473 - 480.
- [4] Hu KQ. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications[J]. *J Viral hepat*,2002,9(4):243 - 257.
- [5] Raimondo G, Allain JP, Brunetto MR, et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection [J]. *J Hepatol*, 2008,49(4):652 - 657.
- [6] 鲁凤民,王杰,杨紫伟,等. 乙型肝炎表面抗原检测技术演变及对隐匿性乙型肝炎病毒感染实验室检测的思考[J]. *中国医学前沿杂志(电子版)*,2013,5(7):3 - 7.
- [7] Torbenson M, Thomas DL. Occult hepatitis B [J]. *Lancet Infect Dis*,2002,2(8):479 - 486.
- [8] Raimondo G, Caccamo G, Filomia R, et al. Occult HBV infec-

- tion [J]. *Semin Immunopathol*, 2013, 35(1):39-52.
- [9] Zerbini A, Pilli M, Boni C, et al. The characteristics of the cell-mediated immune response identify different profiles of occult hepatitis B virus infection [J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(5):1470-1481.
- [10] Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, et al. Occult hepatitis B virus infection [J]. *J Hepatol*, 2007, 46(1):160-167.
- [11] Gutiérrez-García ML, Fernández-Rodríguez CM, Lledo-Navarro JL, et al. Prevalence of occult hepatitis B virus infection [J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(12):1538-1542.
- [12] Romero M, Madejón A, Fernández-Rodríguez C, et al. Clinical significance of occult hepatitis B virus infection [J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(12):1549-1552.
- [13] Said ZN, Sayed MH, Salama II, et al. Occult hepatitis B virus infection among Egyptian blood donors [J]. *World J Hepatol*, 2013, 5(2):64-73.
- [14] El-Ghitany EM, Farghaly AG, Hashish MH. Occult hepatitis B virus infection among hepatitis C virus seropositive and seronegative blood donors in Alexandria, Egypt [J]. *J Egypt Public Health Assoc*, 2013, 88(1):8-13.
- [15] Kao JH, Chen PJ, Lai MY, et al. Occult hepatitis B virus infection and clinical outcomes of patients with chronic hepatitis C [J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(11):4068-4071.
- [16] de Matos MA, Ferreira RC, Rodrigues FP, et al. Occult hepatitis B virus infection among injecting drug users in the Central-West Region of Brazil [J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2013, 108(3):386-389.
- [17] Raimondo G, Pollicino T, Romanò L, et al. A 2010 update on occult hepatitis B infection [J]. *Pathol Biol (Paris)*, 2010, 58(4):254-257.
- [18] Ocana S, Casas ML, Buhigas I, et al. Diagnostic strategy for occult hepatitis B virus infection [J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(12):1553-1557.
- [19] Milich DR, Sallberg M, Maruyama T. The humoral immune response in acute and chronic hepatitis B virus infection [J]. *Springer Semin Immunopathol*, 1995, 17(2-3):149-166.
- [20] Bréchet C, Thiers V, Kremsdorf D, et al. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely "occult"? [J]. *Hepatology*, 2001, 34(1):194-203.
- [21] Vitale F, Tramuto F, Orlando A, et al. Can the serological status of anti-HBc alone be considered a sentinel marker for detection of occult HBV infection? [J]. *J Med Virol*, 2008, 80(4):577-582.
- [22] Minuk GY, Huynh C, Uhanova J, et al. Establishing diagnostic criteria for occult hepatitis B virus infections in community based populations [J]. *J Med Virol*, 2014, 86(1):156-161.
- [23] Urbani S, Fagnoni F, Missale G, et al. The role of anti-core antibody response in the detection of occult hepatitis B virus infection [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2010, 48(1):23-29.
- [24] Katsoulidou A, Paraskevis D, Magiorkinis E, et al. Molecular characterization of occult hepatitis B cases in Greek blood donors [J]. *J Med Virol*, 2009, 81(5):815-825.
- [25] Minuk GY, Sun DF, Uhanova J, et al. Occult hepatitis B virus infection in a North American community-based population [J]. *J Hepatol*, 2005, 42(4):480-485.
- [26] 吴正林, 张文洛, 钟小强, 等. 隐匿性乙型肝炎病毒感染检测的实验研究 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2010, 24(6):202-204.
- [27] Bréchet C, Degos F, Lugassy C, et al. Hepatitis B virus DNA in patients with chronic liver disease and negative tests for hepatitis B surface antigen [J]. *N Engl J Med*, 1985, 312(5):270-276.
- [28] Oesterreicher C, Hammer J, Koch U, et al. HBV and HCV genome in peripheral blood mononuclear cells in patients undergoing chronic hemodialysis [J]. *Kidney Int*, 1995, 48(6):1967-1971.
- [29] Said ZN. An overview of occult hepatitis B virus infection [J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(15):1927-1938.

(本文编辑:熊辛睿)