

• 综 述 •

低水平乙型肝炎病毒表面抗原研究现状*

张志明 综述, 计玉仙 审校

(陕西省西安市中心医院检验科 710003)

关键词: 肝炎表面抗原, 乙型; 嗜肝病毒属**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.03.033**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2012)03-0329-02

乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)一直以来作为诊断乙型肝炎病毒感染的重要指标,虽然从 20 世纪 70 年代开始,已经逐步建立了 HBsAg 的检测方法,并且近年来 HBsAg 的检测的方法和技术在不断更新,检测敏感性也得到显著提高,但各种检测方法还是会受到某些限制,特别是近年来 HBV 疫苗、高效价免疫球蛋白以及抗病毒药物的广泛应用,造成 HBsAg 变异呈低水平表达^[1],如果低水平 HBsAg 患者没能得到准确检测,漏检将给临床诊断、输血及手术安全带来隐患^[2-4],低水平 HBsAg 已经成为国内外学者的研究热点,本文就有关问题综述如下。

1 低水平乙型肝炎病毒表面抗原特征

乙型肝炎病毒为专一的嗜肝病毒^[5],HBV 基因组(HBV-DNA)是由不完全闭合环形结构的双链 DNA 组成,长链即负链,完全闭合,具有固定的长度,约含 3 200 个核苷酸,其 5'端有一短肽;而短链即正链,呈半环状,长度可变,其 5'端有一寡核苷酸帽状结构,可作为合成正链 DNA 的引物。长链和短链 5'端的粘性末端互补,使 HBV 基因组 DNA 形成部分环形结构。在正、负链的 5'端的互补区的两侧有 11 个核苷酸(5'-TTC ACC TCT GC-3')构成的直接重复序列(direct repeat, DR)DR1 和 DR2,其中 DR1 在负链,DR2 在正链。DR 区在 HBV 复制中起重要作用。

HBV 含 4 个部分重叠的开放读码框架(open reading frame, ORF),即:(1)S 基因区,由 S 基因、前 S2 (pre-S2)基因、前 S1 (pre-S1)基因组成。分别编码 HBsAg、pre-S、pre-S1 及多聚人血清蛋白受体(PHSA-R);(2)C 基因区,由前 C 基因和 C 基因组成。分别编码 HBeAg 及 HBcAg;(3)P 基因区,编码聚合酶,具依赖 DNA 的 DNA 聚合酶、依赖 RNA 的 DNA 聚合酶、反转录酶和 RNA 酶 H 活性;(4)X 基因区编码 X 蛋白(hepatitis B X antigen, HbxAg),并具有激活 HBcAg 基因的作用^[6]。

HBV 复制是由共价环形 DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA)转录为前基因组 RNA 中间体,反转录为负链 DNA 再合成正链 DNA,然后双链 DNA 又成熟为 cccDNA 的连续过程,其反转录是利用病毒本身的 DNA 聚合酶进行的,由于 HBV 复制方式有其特殊性,即 mRNA 中间体进行逆转录过程中,由于缺乏校对酶易发生 HBV-DNA 序列内变异且很难修复,其变异率高于其他 DNA 病毒约 4 个数量级,而低于 RNA 病毒 1~2 个数量级^[7]。且基因组突变率与疾病所处的阶段存在一定相关性。由于其宿主范围较小,体外细胞培养

分离病毒尚未成功。近年随着分子克隆技术的应用及体外培养细胞系转染的成功,对 HBV 复制过程有了进一步的了解,慢性乙型肝炎中,天然的 HBV 基因组进化率为每年 $1.4 \times 10^5 \sim 32.0 \times 10^5$ /点。突变常见于核心(C)启动子区域、前 C 区以及 S 区的 a 决定簇。在 S 区的变异中,主要又有以下 3 种类型^[8]:(1)自发性突变(spontaneous mutation),由于 HBV-DNA 多聚酶不具备自我纠错(self-proof)功能,因此存在较高的自发性突变;S 区基因突变导致 HBsAg 亚型改变及血清 HBsAg 阴性、HBV-DNA 阳性乙型肝炎,使临床诊断困难。一些人接种乙肝疫苗后产生 HBsAb,但仍可被 HBV 的 S 区基因突变株感染,而逃避宿主的免疫反应;前 C 基因区突变与 HBV 感染后免疫及重型肝炎发病有关,一般认为乙型肝炎患者 HBeAg 转阴, HBeAb 转阳,表示 HBV 复制活跃程度减弱,临床症状好转。然而,一些患者当 HBeAg 转阴后,仍有病毒复制及病情进行性发展,其血清中除检出 HBsAg 和 HBeAb 外,还可检出 HBV-DNA、IgM 型 HBeAb,肝内 HBcAg 阳性,排除其他致肝损害的原因,提示病情变化与 HBV 有关。其特点为不易自然缓解,常发展为肝硬化,抗病毒治疗反应差,经研究表明,此类患者系感染了前 C 基因突变 HBV 突变株;P 区基因突变可致 HBV 复制减弱或停止;X 区基因突变可使 HBxAg 合成障碍。(2)人群选择(population pressure),天然发生的变异是多年来人群选择压力的随机改变,这些变异导致出现了 HBV 不同基因型(A~H)以及不能被免疫学检测到的少见序列,不同的 HBV 基因型是病毒变异后的稳定形式(变异率超过 8%),是多年人群选择压力的结果;(3)免疫逃逸(immune escape),疫苗、高效价免疫球蛋白治疗导致的逃逸突变主要源自于免疫压力,在肝移植患者中,高滴度的抗体、低滴度的病毒以及大量的易感细胞(肝移植术后)是发生突变的理想场所。免疫逃逸的结果导致出现了疫苗逃逸突变株、诊断逃逸突变株以及抗病毒耐药突变株。在慢性 HBV 感染,天然发生的逃逸突变还可能发生 HBV 携带者的 HBsAb 选择,其结果是在某些慢性携带者,同时出现 HBsAg、HBsAb,但这种抗体未能有效针对循环中存在的抗原,因此不具有保护作用。因此常见的 HBsAg、HBsAb 共存多见于依次感染不同的病毒亚型,所产生的抗体未能有效抗 a 决定簇,因为 a 决定簇内氨基酸的替换可导致 HBsAg 构型的改变,从而改变其与抗体结合。

2 低水平乙型肝炎病毒表面抗原产生原因

目前国内文献研究发现低水平 HBsAg 产生的可能原因包括^[9-12]:(1)因患者机体免疫状况等综合因素使 S 基因表达

* 基金项目:陕西省社会发展攻关计划项目(2011K12-01-05)。

的 HBsAg 绝对浓度偏低,使得部分慢性 HBV 感染者 HBsAg 呈低水平特征且持续存在,宿主方面表现为对病毒的相容性,免疫系统对病毒耐受,应答异常等,低水平 HBsAg 的产生可能与诸多因素有关,并不完全提示疾病转归、预后良好,部分低水平 HBsAg 患者可能存在着肝脏的持续性损伤和病毒复制,应引起临床的高度重视和关注;(2)当前关注较多的是病毒基因变异,因其可致抗原、抗体检测出现假阴性,亦可导致病毒低水平复制,抗原表达量低,低于检测最低值或导致病毒颗粒分泌障碍,因 S 基因变异使表达 HBsAg 结构和抗原性出现差异(即 S 基因编码异型 HBsAg),引起检测的灵敏度下降,从而导致突变株的 HBsAg 检测出现阴性,由于检测方法灵敏度不够高(低于最低检测限),而导致 HBsAg 检测出现阴性结果,实际上外周血中变异的 HBsAg 仍呈高水平表达;(3)检测因素造成的情况,尽管近年来 HBsAg 的检测的方法和技术在不断更新,检测灵敏度也得到显著提高,但各种检测方法还是会受到某些方法学上限制,王蕾等^[11]对 97 例经确认为低水平乙型肝炎表面抗原(HBsAg)的阳性结果进行微粒子酶免疫分析法(MEIA)和酶联免疫吸附试验(ELISA)检测和比对分析发现 2 种方法的检测灵敏度分别为 0.095 IU/mL 和 0.378 IU/mL,ELISA 对 97 例低水平 HBsAg 的检出率仅为 45.4%(44/97);在 97 例低水平 HBsAg 患者中,HBV-DNA $\geq 1 \times 10^3$ copy/mL 占 17.5%(17/97),肝功能异常率为 38.1%(37/97),其中明确诊断为乙型肝炎相关疾病的 19 例患者中,肝硬化占 57.9%(11/19)。因此灵敏度高、特异性好的方法有助于低水平 HBsAg 的检出,有利于对这些人群的诊断和治疗。

从实验室诊断角度看,一般有 4 种乙肝病毒标志物模式(HBV-M)可能是由 S 基因突变引起的^[13-14]:(1)单独抗乙型肝炎核心抗体(HBcAb)阳性的个体;(2)不同商品试剂盒之间检测同一患者血清 HBsAg 结果不一致;(3)患者血清 HBsAg 阴性但 HBeAg 或 HBcAb 与 HBsAb 阳性;(4)HBsAg 或 HBeAg 与 HBsAb 共存。从临床诊疗角度看,一般也有 4 种情况可以推测可能存在或发生 S 基因变异^[15]:(1)接受过主、被动免疫仍然发生 HBV 感染的;(2)接受过核苷类药物(如拉米夫定等)治疗后乙肝病毒核酸(HBV-DNA)等指标出现反弹的;(3)乙肝感染痊愈后的复发;(4)慢性活动性肝炎的反复发作。于乐成等^[8]2009 年收集 49 例 HBsAg 和 HBsAb 阳性患者的血清 HBV-DNA 样本,采用 PCR-RFLP 及测序法鉴定其基因型,对其中 6 例患者的 S 区基因进行克隆测序发现了若干新变异、少见的 W196 和 C69 终止突变,1 例患者检测到 G145R 变异。童文彬等^[16]从乙肝病毒表面抗原、乙肝病毒 e 抗原均阳性的血清中提取病毒脱氧核糖核酸,经聚合酶链反应和核苷酸测序后,比较和分析 S 基因和 P 基因核苷酸和氨基酸变异,结果发现 47 例慢性 HBV 感染者血清标本中变异主要集中在 a 决定簇的第 1 环上,其抗原性已改变,对乙肝疫苗接种人群构成了潜在的威胁,对 HBsAg 和 HBeAg 阳性标本进行 S 基因局部片段序列分析的研究,结果其中发现 1 个标本的 HBeAg 113 和 114 位置氨基酸之间插入了 4 个氨基酸(12 个核苷酸)序列。检索 GenBank 和相关文献未见报道,属全球首次报道,并完成 GenBank 注册工作,其结果为进一步研究乙肝病毒变

异和乙肝诊断与防控工作提供了依据,该文献已刊登在英国权威杂志《病毒》上。

3 小 结

《献血法》、《侵权责任法》、《传染病法》、《医疗事故处理条例》等一系列法律法规的出台给医疗服务提供保障的同时也带来了新的挑战,如何及时准确地检测低水平乙型肝炎病毒表面抗原已成为医务人员当务之急。

参考文献

- [1] 高春芳. HBV S 区基因变异与 HBsAg 检测[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(6): 574-576.
- [2] Wolf FH, Fuchs SC. Absence of occult hepatitis B among blood donors in Southern Brazil[J]. Braz J Infect Dis, 2011, 15(2): 159-162.
- [3] Garc BM. Molecular and serological characterization of occult hepatitis B infection in blood donors from Mexico[J]. Ann Hepatol, 2011, 10(2): 133-141.
- [4] Olokoba AB, Salawu FK, Danburam A, et al. Hepatitis B virus infection amongst pregnant women in North eastern Nigeria—a call for action[J]. Niger J Clin Pract, 2011, 14(1): 10-13.
- [5] 张瑞, 李金明. HBV 与 HCV 感染及相关标志物[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(1): 90-91.
- [6] 倪语星, 尚红. 临床微生物学与检验[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 446-447.
- [7] 黄琴, 许红梅. 乙型肝炎病毒前 C 区基因变异的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 27(12): 1097-1098.
- [8] 于乐成, 马世武, 王雪刚. HBV 基因型和 S 基因序列特点与慢性乙型肝炎患者 HBsAg/抗-HBs 共存关系[J]. 肝脏, 2010, 15(4): 259-264.
- [9] 顾晓东, 俞碧霞, 黄海龙. 低浓度 HBsAg 人群乙肝标志物检测及其临床意义[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 12(6): 1515-1516.
- [10] 陈瑜, 钟步云, 徐根云, 等. 低水平血清乙肝病毒表面抗原测定及其临床意义[J]. 中华检验医学杂志, 2001, 24(1): 39-41.
- [11] 王蕾, 刘华, 王雯静. 低水平乙型肝炎表面抗原的检测及其临床价值评估[J]. 微生物与感染, 2009, 4(1): 9-10.
- [12] Tong MJ, Blatt LM, Kao JH, et al. Basal core promoter T1762/A1764 and precore A1896 gene mutations in hepatitis B surface antigen-positive hepatocellular carcinoma: a comparison with chronic carriers[J]. Liver Int, 2007, 27(10): 1356-1363.
- [13] 成军, 孙长贵, 陈瑜. 慢性 HBV 感染者低浓度 HBsAg 持续存在的临床特点及分子流行病学研究进展[J]. 现代检验医学, 2010, 25(2): 1-3.
- [14] Weber B. Diagnostic impact of the genetic variability of the hepatitis B virus surface antigen gene[J]. J Med virol, 2006, 78(suppl 1): 59-65.
- [15] Peng Y. 乙型肝炎病毒编码 HBsAg 区基因突变对免疫检测的影响[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(7): 687-690.
- [16] 童文彬, 孙莉, 何吉兰, 等. 四川省两县区乙型肝炎病毒基因型、血清亚型分析[J]. 现代预防医学, 2009, 36(4): 763-765.

(收稿日期: 2011-10-09)