

• 临床检验研究论著 •

昆明地区丙肝患者合并 HBV 隐性感染实验室调查与研究

张悦,王惠萱,陈忠明,权彤彤,姜昌丽
(成都军区昆明总医院检验科,云南昆明 650032)

摘要:**目的** 分析昆明地区丙型肝炎(简称丙肝)合并乙型肝炎病毒(HBV)隐性感染状况和相关实验室特征。**方法** 酶联免疫吸附法对 244 例抗丙型肝炎病毒 IgG 类抗体[抗-HCV(IgG)]阳性血清标本进行 HBV 血清标志物(HBVM)检测,同时检测丙氨酸氨基转移酶(ALT)及胆红素(Bil)水平。选择 HBsAg 阴性标本,以巢式 PCR 技术和荧光 PCR 技术进行 HBV DNA 定性及定量检测。**结果** 244 例抗-HCV(IgG)阳性标本中 HBsAg 阴性 198 例,其中 HBV DNA 阳性 76 例,丙肝患者合并 HBV 隐性感染率为 31.15%(76/244),包含 5 种 HBVM 模式,分别为抗 HBs(+)、抗 HBe(+)、抗-HBc(+)(4 例(A 组)),抗 HBe(+)、抗-HBc(+)(40 例(B 组)),抗 HBs(+)、抗 HBc(+)(5 例(C 组)),抗-HBc(+)(24 例(D 组)),HBVM 全阴 3 例(E 组),B 组所占比最高($P<0.05$),D 组 HBV DNA 平均含量最高($P<0.05$)。90.8%(69/76)的标本 ALT、Bil 均增高。老年男性为丙肝伴 HBV 隐性感染高发人群。**结论** 该地区丙肝合并 HBV 隐性感染发病率较高,且 HBVM 种类多样。HBV DNA 检测是判断丙肝患者 HBV 感染状况的重要方法。

关键词: 肝炎,丙型; 肝炎病毒,乙型; 肝炎抗体,乙型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.19.018 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2012)19-2340-02

Research of latent HBV infection in patients with C hepatitis in Kunming

Zhang Yue, Wang Hui-xuan, Chen Zhong-ming, Quan Tong-tong, Jiang Chang-li

(Clinical Laboratory, Kunming General Hospital of Chengdu Command, Kunming, Yunnan 650032, China)

Abstract:**Objective** To explore the state of latent HBV infection and the laboratory features in patients with C hepatitis in Kunming. **Methods** ELISA was performed in 244 cases of anti-HCV(IgG)-positive serum for analysis of HBV serum markers (HBVM), while the activity of alanine aminotransferase(ALT) and bilirubin(Bil) were also detected. HBsAg-negative specimens were selected for qualitative and quantitative detection of HBV DNA. **Results** Among the 244 cases, 198 cases were HBsAg-positive, but with 76 cases positive with HBV DNA. The latent HBV infection rate in patients with C hepatitis was 31.15%(76/244), with five kinds of HBVM, including anti-HBs(+), anti-HBe(+) and anti-HBc(+)(group A, $n=4$), anti-HBe(+) and anti-HBc(+)(group B, $n=40$), anti-HBs(+) and anti-HBc(+)(group C, $n=5$), anti-HBc(+)(group D, $n=24$), HBVM whole negative (group E, $n=3$). Proportion of group B and HBV DNA content in group D were the highest($P<0.05$). 90.8%(69/76) of patients were with increased level of ALT and Bil. Older male were susceptible for C hepatitis combined with latent HBV infection. **Conclusion** The incidence of latent HBV infection might be high in patients with hepatitis C in this region, with a variety of HBVM. HBV DNA detection could be very important for the accurate judgment of HBV infection in patients with C hepatitis.

Key words: hepatitis C; hepatitis B virus; hepatitis B antibodies

乙型肝炎病毒(HBV)与丙型肝炎病毒(HCV)是最主要的病毒性肝炎病原体,且二者具有相同传播途径,故 HBV/HCV 合并感染较为常见,且合并感染可因病毒间的相互作用而影响疾病的发生、发展和预后^[1]。HBV/HCV 合并感染类型中,慢性 HCV 或 HBV 感染合并隐性 HBV 或 HCV 感染较二者显性合并感染更易影响疾病的诊断,导致漏诊,并造成患者病情的不良转归。本研究旨在了解昆明地区丙肝患者中隐性 HBV 感染的状况及特征。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2009 年 9 月至 2011 年 11 月于本院确诊的抗-HCV(IgG)阳性患者 244 例,年龄 14~76 岁,男性 152 例、女性 92 例。

1.2 仪器与试剂 乙肝血清标志物(HBVM)酶联免疫吸附法(ELISA)检测试剂盒(上海科华);AU5400 全自动生化分析仪及原装丙氨酸氨基转移酶(ALT)及胆红素(Bil)检测试剂盒(速率法,日本奥林巴斯);蛋白酶 K(美国 Sigma),Taq 聚合酶、dNTPs 及 50~800 bp DNA 分子标记物(美国 Promega),QIA-GEN 病毒基因组提取试剂盒(北京天根);HBV DNA 荧光定量聚合酶链反应(PCR)试剂、7600DNA 扩增仪(广州达安)。

1.3 方法

1.3.1 引物设计^[2] 分别依 HBV S 及 C 基因设计 2 对套式引物。引物序列见表 1。

表 1 巢式 PCR 技术检测 HBV DNA 引物序列

基因及引物名称	引物序列(5'→3')	位置	产物大小(bp)
S 基因			
1s	AGAACATCGCATCAGGACTC	159~178	484
2a	CATAGGTATCTTGCGAAAGC	642~623	
3s	AGGACCCCTGGTGTGTGTTAC	181~200	439
4a	AGATGATGGGATGGGAATAC	619~600	
C 基因			
1s	CTGGGAGGAGGTGGGGGA	1730~1747	774
2a	GTAGGAGAATAAAGCCC	2503~2487	
3s	GGTCTTTGTACTCGGAGGCTG	1763~1783	693
4a	ATACTAACATTG	2455~2436	

1s、2a:外侧引物;3s、4a:为内侧引物。

1.3.2 HBV DNA 检测 采集患者空腹静脉血,按 QIAGEN

病毒基因组提取试剂盒要求提取提取、制备 HBV DNA。以 HBV DNA 为模板进行 PCR 检测。50 μ L 扩增体系(引物 0.5 μ mol/L, dNTPs 各 200 μ mol/L, MgCl₂ 1.5 mmol/L, TaqDNA 聚合酶 1 U, HBV DNA 5 μ L), 第 1 轮 PCR(外引物)扩增产物液 2 μ L 用作第 2 轮 PCR(内引物)扩增反应模板。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 60 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s 循环 32 次, 72 $^{\circ}$ C 5 min。以琼脂糖(1.5 g/L)凝胶电泳法对 PCR 产物进行电泳, 紫外检测仪观察电泳结果, 以 DNA 分子标记物为对照, 出现 S、C 基因特异性条带时判为阳性。每份标本 S、C 基因均为阳性时, 判断为 HBV 阳性。设置蒸馏水空白对照(1 份)、HBV 阳性对照(2 份)及 HBV 阴性对照(2 份)与待检标本同时检测, 对照品检验结果合格为判断检测结果有效的前提。以上述方法确定的 HBV 阳性标本进一步进行 HBV DNA 定量检测。

1.4 统计学处理 采用 Excel2003 软件进行数据分析, 各组率的比较采用 χ^2 检验, 各组 HBV DNA 定量均值的比较采用 *t* 检验, 显著性检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

244 例抗-HCV(IgG)阳性标本中, HBV 表面抗原(HBsAg)阴性 198 例, 198 例 HBsAg 阴性标本中, HBV DNA 阳性率为 38.38%(76/198), 即 244 例丙肝阳性患者隐性 HBV 感染率为 31.15%(76/244)。76 例丙肝伴隐性 HBV 感染患者血清标本检出 5 种 HBVM 模式, 分为 A、B、C、D、E 5 组(见表 2), 其中 B 组构成比最高[52.6%(40/76), $P<0.05$], D 组 HBV DNA 平均含量最高($P<0.05$), 90.8%(69/76)的患者 ALT 及 Bil 异常升高, 但升高比例组间比较无统计学差异($P>0.05$)。76 例丙肝伴隐性 HBV 感染者中, 男性占 71.05%(54/76), 年龄分布为 28~76 岁, 平均 62 岁; 女性占 28.95%(22/76), 年龄 32~57 岁, 平均 47 岁。年龄大于 50 岁男性是 76 例丙肝伴隐性 HBV 感染者的主要人群(见表 3)。

表 2 76 例丙肝伴隐性 HBV 感染标本 HBVM 分布及特征

分组	HBVM 模式	<i>n</i>	HBV DNA 平均含量(copy/mL)	ALT 及 Bil 异常升高(<i>n</i>)
A	抗 HBs(+), 抗 HBe(+), 抗 HBc(+)	4	7.47×10^2	4
B	抗 HBe(+), 抗 HBc(+)	40	8.94×10^2	34
C	抗 HBs(+), 抗 HBc(+)	5	6.77×10^2	4
D	抗 HBc(+)	24	6.42×10^3	24
E	HBVM 全阴	3	7.86×10^2	3

表 3 76 例丙肝伴隐性 HBV 感染者年龄性别分布(*n*)^{*}

年龄(岁)	男性	女性
11~<21	0	0
21~<31	2	0
31~<41	3	7
41~<51	9	12
51~<61	30	3
61~<71	8	0
71~76	2	0
合计	54	22

^{*}: 无 60 岁以上女性标本。

3 讨 论

HBV、HCV 因具有相同传播途径, 使二者合并感染较为

常见。HBV/HCV 合并感染形式多样, 包括: (1) HBV、HCV 同时现症感染(多见于急性感染); (2) 慢性 HBV 或 HCV 感染合并现症 HCV 或 HBV 感染; (3) 慢性 HBV 或 HCV 感染合并隐性 HCV 或 HBV 感染; (4) HBV、HCV 同时隐性感染^[1]。HBV/HCV 合并感染较单一感染更易诱发肝硬化和肝细胞癌(HCC)^[3-4]。已有流行病学研究证实^[1], 静脉注射吸毒、血液透析、输血、器官移植和获得性免疫缺陷综合征(AIDS)等高危人群不仅 HBV/HCV 合并感染率明显增加, 隐性合并感染也更为普遍。云南省为高危人群分布相对较多的地区, 相关的临床医疗内容尤显重要。笔者以两年多时间内检出的丙肝患者标本为研究对象, 涉及患者覆盖昆明地区及云南省其他地区, 研究结论具有本区域代表性。

本研究显示, 昆明地区 HCV 感染合并 HBV 隐性感染率为 31.15%, 较已有报道的其他地区数据明显增高或基本一致^[2,5]。其中, 丙肝伴 HBV 隐性感染患者 HBVM 以抗-HBe、抗-HBc 双阳性模式为主要模式(52.6%), 以抗 HBc 单阳性模式对应的 HBV DNA 平均定量水平为最高(6.42×10^3 copy/mL)。故可认为本地区 HCV 感染合并 HBV 隐性感染患者 HBVM 主要模式分布单一且显著, 为抗-HBe、抗-HBc 双阳模式, 而抗-HBc 单阳模式时 HBV DNA 平均载量可超过 10^3 copy/mL。同时, 本研究发现本地区丙肝伴 HBV 隐性感染者以老年男性为主。而 HBVM 全阴时亦可通过巢式 PCR 技术检出 HBV DNA 阳性, 表明常规血清学检测已不能完全反映 HBV 感染的存在, 提示 HBV 隐性感染时, 病毒复制受限或表达异常致使血清标志物浓度低于常规血清学检测的检出下限, 因此 HBV DNA 检测显得必需和尤为关键。

有研究表明, HCV、HBV 合并感染过程中, 病毒间可相互干扰, 互相抑制, HBV 可抑制 HCV, 但不如 HCV 抑制 HBV 明显, 机制可能与 HCV C 蛋白有关^[1]。研究证实, HCV C 蛋白的 C-端疏水区可抑制 HBsAg 和 HBeAg 的表达, 且 HBV 核心启动子和增强子 2 是 HCV C 蛋白的效应靶标^[6]。故本研究从 244 例抗-HCV(IgG)阳性标本中检出 76 例 HBsAg 和 HBeAg 均为阴性而 HBV DNA 却为阳性的 HBV 隐性感染者。上述 76 例丙肝伴 HBV 隐性感染患者虽然 HBV DNA 均为阳性, 但定量水平普遍较低, 多数处于 10^2 copy/mL 水平, 仅少部分超过 10^3 copy/mL 水平。此现象与 HCV 对 HBV 的抑制有关^[7-9], 可能是 HCV 感染诱导干扰素(INF)、INF 样物质或其他可溶性介质释放, 激活特定细胞, 下调 HBV 表达; 亦或 HCV 促进 HBV 诱导 T 淋巴细胞反应从而抑制 HBV 复制; 还有学者认为, HBV C 蛋白亚单位受细胞周期的调节, 而 HCV 诱导肝损伤伴随细胞更新, 故增加了 HBV 抗原在肝细胞表面表达, 从而引起细胞毒性 T 细胞发挥清除 HBV 的作用, 致使肝和血清中 HBV 水平降低^[6]。

有研究证明 HBV/HCV 合并感染可增加重型肝炎、肝硬化和 HCC 发病率和患者病死率^[3-4]。本研究中也对 76 例丙肝伴 HBV 隐性感染者肝功能进行了检测, 结果表明 90.8%(69/76)的患者出现了 ALT、Bil 均增高的肝功能严重受损指征, 此比例显著高于 HBV 或 HCV 单项感染导致的肝功能异常状况, 表明本地区慢性丙肝伴 HBV 隐性感染患者肝脏损伤显著加重。其机制可能为 HCV、HBV 合并感染中, HCV 抑制 HBV 复制及抗原表达, 致使 HBV 感染呈隐匿状态而逃避免疫清除, 两种病毒与宿主免疫之间也许存在一种平衡造成长期慢性 HCV/HBV 感染, 而长期的慢性炎症可造成肝细胞持续的炎性坏死和肝功能受损加重, 甚至可刺激(下转第 2343 页)

素为马红球菌显性特征,易与其他类似菌区别,如奴卡和氏菌菌落干燥;与棒状杆菌属区别是不发酵任何糖类,并可根据菌落形态、硝酸盐还原、溶血性进行鉴别;与李斯特菌鉴别是不能水解七叶苷,不发酵糖醇和动力阴性;与丹毒丝菌鉴别是为触酶阳性,H₂S 阴性;与肠球菌鉴别是触酶阳性,不水解七叶苷,不分解任何糖醇类。

2.4 药敏实验结果 用 K-B 法对 16 株马红球菌进行药敏试验结果见表 1。

表 1 16 株马红球菌对常用抗菌药物敏感率和耐药率观察					
药物名称	试验株 (n)	敏感株 (n)	敏感率 (%)	耐药株 (n)	耐药率 (%)
环丙沙星	16	16	100.0	1	6.3
氧氟沙星	16	14	87.5	0	0.0
头孢噻嗪	16	12	75.0	1	6.3
氯霉素	16	12	75.0	2	12.5
利福平	16	14	87.5	0	0.0
头孢哌酮	16	16	100.0	0	0.0

3 讨 论

马红球菌为人类罕见的条件致病菌。近年来,由于艾滋病患者的增多,马红球菌引起人类呼吸道和败血症等报告亦增多^[5],从人类感染性标本中检出本菌的报道呈上升趋势。马红球菌是细胞内的兼性寄生菌,具有持续性破坏肺泡巨噬细胞的能力,是其致病的基础,马红球菌在细胞内的持续发展与溶酶体起融合作用的吞噬小体缺失有关^[6];马红球菌致病能力可能取决于宿主和微生物两方面的因素,宿主体内融合作用的吞噬小体数量增加能明显提高巨噬细胞杀灭马红球菌的能力。HIV 继发马红球菌感染者,常以肺部表现为主,临床常见发热、咳嗽、呼吸困难及胸痛^[7]。本实验分离出的 16 株马红球菌均来自本院呼吸内科病区,临床诊断为肺部重度感染,年龄 18~55 岁,有吸毒史 8 例,冶游史 7 例,输血史 1 例;16 株马红球菌感染的患者临床表现持续高热(体温 38.5~40.7℃),咳嗽、呼吸困难,X 线片可见肺部弥漫性渗出性浸润病变、蜂窝状改变、结节或团块病灶、胸腔积液等,多为重度感染,可导致免疫系统受损。

马红球菌感染最常用的治疗方法是根据药物敏感试验选择两种抗菌药物治疗,由表 1 可见,马红球菌对环丙沙星和头孢哌酮的敏感率为 100.0%,其他药物敏感率依次为氧氟沙星和利福平(87.5%),头孢噻嗪和氯霉素(75.0%);对头孢哌酮、氧氟沙星和利福平耐药率为 0%,环丙沙星、头孢噻嗪耐药率为 6.25%,氯霉素 12.5%;马红球菌耐药目前尚无相关标准,本实验结果与文献报道有少许差异^[8],可能与抗菌药物选用不一致,故产生耐药性不一致,因此,临床应根据药敏实验结果选用抗菌药物。本院采用头孢哌酮与利福平联合治疗 7~21 d 后行体格检查:患者双肺呼吸音清,无干湿罗音,复查痰菌培养阴性,复查 X 线片病灶明显吸收或完全吸收,所有患者均好转或痊愈出院。

在进行临床标本细菌培养中可根据马红球菌生长缓慢、可产生鲜明色素的明显特征,对已培养 18~24 h 后菌落仍较小或结果为阴性时,应观察培养至 72 h 后再做鉴别,以提高该菌的阳性检出率。本组 16 例标本中,培养 24 h 可确诊阳性 5 例,其余 11 例均培养至 72 h 后确诊阳性。

参考文献

[1] 蒙志好,李勇,黄葵,等. 艾滋病患者马红球菌肺部感染的临床特点与治疗观察[J]. 中华医学杂志,2010,90(9):593-596.
[2] 刘雁芳,陈艳芝,王林仙. 26 例艾滋病患者外周血象及骨髓象的观察分析[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(10):1032-1034.
[3] 朱荣华,杨雪梅. 采血时间的选择对 CD4⁺T 淋巴细胞检测结果的影响[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(17):2041-2042.
[4] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,1997:495-576.
[5] 叶东方,梁桂忠. 艾滋病并发胸部马红球菌病 11 例的临床分析[J]. 广西医学,2008,30(9):1412-1413.
[6] 唐柳生. AIDS 患者呼吸道感染马红球菌 21 株耐药分析[J]. 中国医学创新,2010,7(3):71-72.
[7] 黄绍标. 艾滋病合并马红球菌感染的临床特征及诊治[J]. 中国全科医学,2011,14(3):316-317.
[8] 金法祥,王红华,黄志刚. 32 株马红球菌的耐药性分析[J]. 中国预防医学杂志,2006,7(1):55-56.

(收稿日期:2012-03-09)

(上接第 2341 页)

潜在的肝脏癌细胞增殖^[10]。因此,当慢性丙肝伴 HBV 隐性感染时,虽然病毒间互相干扰、抑制,但肝损伤有所加重。

本研究涉及的 244 例标本均来自不同的患者,虽保证了研究取样的广泛性,但部分标本(约 70 余例)对应为仅单次检测的患者,故不能完全确认所选标本均来源于慢性丙肝患者,也无法明确其为急性或慢性感染,影响了研究结论的明确性,因此还需进行更为深入及明确的研究。

参考文献

[1] 覃月秋,郑欣,王文敬,等. HBV 和 HCV 的合并感染[J]. 微生物学免疫学进展,2009,20(3):54-58.
[2] 徐峰. 不明原因肝炎患者隐匿性乙型肝炎病毒感染检测分析[J]. 四川医学,2010,30(1):95-97.
[3] Mrai S,Chemin I,Menouar K,et al. Occult HBV infection may represent a major risk factor of non-response to antiviral the therapy of chronic hepatitis[J]. J Med Virol,2007,79(8):1075-1081.
[4] Chiaramonte M,Stroffolini T,Vian A,et al. Rate of incidence of

hepatocellular carcinoma in patients with compensated viral cirrho[J]. Cancer,1999,85(18):2132-2137.
[5] 仪爱文. 隐匿性乙型肝炎病毒感染[J]. 肝脏,2010,15(2):140-141.
[6] 区映研,朱科伦,杨海红,等. 重叠 HCV 感染的慢性乙肝患者病毒复制及肝损伤情况[J]. 广州医药,2002,33(1):11-13.
[7] Liaw Y,Yeh C,Tsai S. Impact of acute hepatitis B virus superinfection on chronic hepatitis C virus infection[J]. Am J Gastroenterol,2000,95(15):2978-2980.
[8] 陆宗良. 血脂异常与心血管病危险因素控制[J]. 中华心血管病杂志,2001,5(3):316.
[9] Fan CL,Wei L,Jiang D,et al. Spontaneous viral clearance after 6-21 years of hepatitis B and C viruses confection in high HBV endemic area[J]. World J Gastroenterol,2003,9(13):2012-2016.
[10] Gurtsevitch VE. Human oncogenic viruses hepatitis B and hepatitis C viruses and their role in hepatocarcinogenesis[J]. Biochemistry(Moscow),2008,73(5):504-513.

(收稿日期:2012-08-09)