

• 论 著 •

不同检测方法对隐匿性乙型肝炎病毒感染的诊断价值分析^{*}

张秋莹, 黄宏耀[△], 钱 进, 王 能, 邓 涛, 彭家群

(湖北医药学院附属随州医院检验科, 湖北随州 441300)

摘要:目的 探讨隐匿性乙型肝炎病毒(HBV)感染的不同诊断试验方法。方法 选取该院行肝脏活检的患者 68 例, A 组 12 例为乙型肝炎表面抗原(HBsAg)阳性患者; B 组 27 例为乙型肝炎表面抗体(HBsAb)阴性、乙型肝炎核心抗体(HBcAb)阴性, 且丙型肝炎抗体阳性的患者; C 组 11 例为 HBsAb 阳性, 且 HBcAb 阳性的患者; D 组 18 例为 HBsAb 阴性、HBcAb 阳性的患者。检测外周血清乙型肝炎标志物, 外周血单核细胞(PBMCs), 肝组织 HBV DNA 的表达。结果 A 组患者为显性乙型肝炎患者, 经血清学、PBMCs、肝组织 HBV DNA 检测均提示 DNA 阳性。HBcAb 阳性的患者(C、D 组)其隐匿性 HBV 感染的比例较 HBcAb 阴性(B 组)的患者明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 隐匿性 HBV 感染在人群中有一定的发病率, 对于高危患者(合并丙型肝炎或 HBcAb 阳性)应常规检测 HBV DNA, 联合多种检测方法可提高隐匿性 HBV 感染的诊断率。

关键词:隐匿性乙型肝炎病毒感染; 乙型肝炎表面抗原; 乙型肝炎核心抗体

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.11.026

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2015)11-1542-03

Different testing methods for the diagnosis of occult hepatitis B virus infection^{*}

Zhang Qiuying, Huang Hongyao[△], Qian Jin, Wang Neng, Deng Tao, Peng Jiaqun

(Department of Clinical Laboratory, Suizhou Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Suizhou, Hubei 441300, China)

Abstract: Objective To evaluate the different testing methods for the diagnosis of occult hepatitis B virus(HBV) infection(OBI). **Methods** A total of 68 patients accepted liver biopsy were selected in this study, 12 patients with the hepatitis B virus surface antigen(HBsAg) positive were in group A, 27 patients with hepatitis B virus surface antibody(HBsAb) negative, hepatitis B virus core antibody(HBcAb) negative and hepatitis C virus antibody positive were in group B, 11 patients with HBsAb positive, HBcAb positive in group C, 18 patients with HBsAb positive, HBcAb negative in group D. All the subjects were detected in peripheral serum HBV markers, and the expression of peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) and liver tissue HBV-DNA. **Results** The HBV-DNA detection of group A were all positive, the infection rate of OBI in group C and D were all significant higher than that of the group B($P < 0.05$). **Conclusion** OBI has a certain morbidity in the population, high-risk patients (patients with hepatitis C or HBcAb positive) should be detected HBV-DNA routinely, combined with a variety of detection methods could improve the diagnostic rate of OBI.

Key words: occult hepatitis B virus infection; hepatitis B surface antigen; hepatitis B virus core antibody

乙型肝炎病毒(HBV)感染对人类健康造成了重大影响, 是导致肝硬化和肝细胞癌的主要原因, HBV 感染的防控是一个全球性的公共卫生问题。随着 HBV DNA 检测灵敏度的不断提高, 临床发现部分血清乙型肝炎表面抗原(HBsAg)阴性的患者可以出现血清 HBV DNA 检测阳性。2008 年欧洲肝脏研究协会对隐匿性 HBV 感染(OBI)作出了定义, 即肝脏中可检测出 HBV DNA 存在, 而其血清学标志物可为阴性, 即血清检测不出 HBV DNA 的一种特殊感染状态^[1]。OBI 诊断金标准需要肝脏穿刺活检, 是一种有创的检查, 本研究观察 3 种不同方法及联合多种检测方法对 OBI 的诊断效率, 探讨可行的相对无创检测方式。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2008 年 1 月至 2013 年 7 月本院行肝脏穿刺活检的患者 68 例, 患者疾病包括不明原因的肝炎, 肝脏代谢性疾病, 肝脏占位性疾病, 肝脏酶异常, 原因不明的肝脾肿大或肝

功能异常, 丙型肝炎患者, 疑有弥漫性肝病、全身系统疾病或肝外疾病累及肝脏。患者均符合以下分组 4 种情况之一, 其中 A 组 12 例为 HBsAg 阳性患者; B 组 27 例为乙型肝炎表面抗体(HBsAb)阴性、乙型肝炎核心抗体(HBcAb)阴性, 且丙型肝炎抗体阳性的患者; C 组 11 例为 HBsAb 阳性, 且 HBcAb 阳性的患者; D 组 18 例为 HBsAb 阴性、HBcAb 阳性的患者。

1.2 检测方法 所有患者均留取外周血标本检测相关指标, 血清 HBV 标志物, HBV DNA 定量, 以及外周血单核细胞(PBMCs)、肝脏活检组织 HBV DNA 定量的检测。PBMCs 的收集参照文献[2], 采用葡萄糖-泛影葡胺密度梯度离心法。无菌采集健康志愿者及患者静脉血 4 mL 注入含抗凝剂的试管中, 加入 4 mL 磷酸盐(PBS)缓冲液混匀; 吸取 Ficoll-Hypaque 淋巴细胞分层液 8 mL 加入离心管中, 再将稀释的抗凝血液沿管壁加至分层液上, 注意保持两者界面清晰; 室温 2 000 r/min 离心 20 min, 管内液体可分为四层; 轻轻吸出乳白色的单个核

* 基金项目: 随州市卫生厅 2013~2014 年度一般科研项目(JX6B38)。作者简介: 张秋莹, 女, 主管技师, 主要从事微生物、临床检验等研究。△ 通讯作者, E-mail: hhy382151948@163.com。

细胞,加入另一支含 7 mL PBS 溶液的离心管中,混匀;室温 1 500 r/min 离心 10 min;弃上清,重复洗涤一次,白色沉淀物即为单个核细胞;加入含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液 2 mL 重新混悬细胞,将单个核细胞悬液加入细胞培养板中,在 37 °C、5% CO₂ 孵育箱中培养 3 h;置换培养液,去除悬浮细胞,黏附的贴壁细胞即为单核巨噬细胞。检测目标人群的乙型肝炎血清学标记物(酶联免疫吸附法)及 HBV DNA 定量[实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)方法]。肝组织 HBV DNA 的检测,取活检的肝组织 10 mg 左右,研磨后按照 HBV 核酸定量检测试剂盒(德国 Qiagen 公司,产品批号 69504)说明书操作,提取组织 DNA 后,置于全自动荧光定量 PCR 仪上进行检测。

1.3 统计学处理

采用 SPSS18.0 软件进行数据处理及统计

学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 4 组患者的临床特征比较 A、B、C、D 4 组患者的一般情况,如年龄、性别、患乙型肝炎的危险因素、肝功能、合并丙型肝炎病毒感染的比例等见表 1。除合并丙型肝炎感染比例外,4 组患者以上相关指标比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 4 组患者不同方法进行 HBV 检测的阳性结果比较 A 组患者为显性乙型肝炎患者,经血清学、PBMCs、肝组织 HBV DNA 检测均提示 DNA 阳性。HBcAb 阳性的患者(C、D 组)其 OBI 比例较 HBcAb 阴性(B 组)的患者明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。B、C、D 3 组患者不同方式 HBV 检测阳性结果见表 2。

表 1 4 组患者的临床特征比较

组别	n	年龄(岁)	男性构成比 [%/(n/n)]	输血患者构成比 [%/(n/n)]	外科手术构成比 [%/(n/n)]	无明显危险因素人 数构成比[%/(n/n)]	合并丙型肝炎人数 构成比[%/(n/n)]	ALT(U/L)	AST(U/L)
A 组	12	49.5 ± 15.6	58.3 (7/12)	25.0 (3/12)	41.7 (5/12)	33.3 (4/12)	16.7 (2/12)	72.1 ± 31.0	83.4 ± 34.5
B 组	27	47.8 ± 19.2	70.4 (19/27)	22.2 (6/27)	29.6 (8/27)	48.1 (13/27)	100.0 (27/27)	68.9 ± 22.8	79.8 ± 26.5
C 组	11	46.3 ± 18.4	63.6 (7/11)	27.2 (3/11)	36.4 (4/11)	36.4 (4/11)	18.2 (2/11)	70.4 ± 25.4	84.2 ± 36.1
D 组	18	48.2 ± 14.9	72.2 (13/18)	22.2 (4/18)	27.8 (5/18)	50.0 (9/18)	11.1 (2/18)	69.2 ± 29.7	80.6 ± 29.1

表 2 B、C、D 3 组患者不同方式 HBV 检测阳性结果的比较[n(%)]

组别	n	血浆	PBMCs	肝组织	血浆 + PBMCs	血浆 + 肝组织	PBMCs + 肝组织	血浆 + PBMCs + 肝组织	至少一种 检测阳性
B 组	27	0(0.00)	0(0.00)	2(7.41)	0(0.00)	0(0.00)	1(3.70)	0(0.00)	3(11.10)
C 组	11	0(0.00)	0(0.00)	2(18.2)	1(9.10)	0(0.00)	3(27.30)	1(9.10)	7(63.60)*
D 组	18	0(0.00)	0(0.00)	3(16.7)	1(5.56)	3(16.70)	4(22.20)	4(22.20)	15(83.30)*
合计	56	0(0.00)	0(0.00)	7(1.25)	2(3.57)	3(5.36)	8(14.30)	5(8.93)	25(44.60)

* : $P < 0.05$,与 B 组比较。

3 讨 论

随着 PCR 检测技术的发展,近年来发现 HBsAg 阴性而 HBV DNA 检测阳性的患者逐渐增多。因此提出了 OBI 的概念,主要是指除血清转换前的窗口期外,机体存在 HBV DNA,但无法检测到 HBsAg 的 HBV 感染,可伴有或不伴有 HBcAb 或 HBsAb 阳性^[3]。OBI 的检测及防控是临床中比较棘手的难题,因为 OBI 与许多临床问题密切相关,如影响慢性肝脏病的预后,加速肝脏癌变,影响慢性丙型肝炎的治疗效果等^[4];OBI 患者可能通过输血或组织器官移植传播 HBV,是 HBV 高流行区乙型肝炎疫苗免疫失败的重要原因。全球范围研究显示,OBI 发病率差异较大,在合并丙型肝炎患者人群中较高^[5-6]。但是 OBI 的检测金标准是肝脏穿刺活检标本中检出 HBV DNA,肝穿刺活检为有创检查,其开展受到多种因素的限制,因此积极寻找可行的无创方法或联合多种方法的检测对临幊上 OBI 的筛查非常重要。

本研究发现,显性乙型肝炎患者其外周血、PBMCs、肝组织均能检测到 HBV DNA。而 HBsAg 阴性的患者部分可检测到 HBV DNA。通过比较多组 OBI 检测结果发现,单独 HBcAb 阳性的患者 OBI 感染率最高。提示临幊工作中,一旦患者血清 HBcAb 阳性,特别是献血者血清 HBcAb 阳性,应常规检

查外周血 HBV DNA 定量。同时本研究也发现丙型肝炎患者即使乙型肝炎血清标志物全阴性,也存在较高的 OBI 发生率。这与国外多项研究一致^[7-8]。这意味着对于丙型肝炎患者,不管其乙型肝炎血清学检查结果如何,均应常规检查患者 HBV DNA 定量。

本研究结果还发现,常规外周血 HBV DNA 检测对 OBI 的阳性率较低,而需要联合多种检测方法,比如 PBMCs HBV DNA 的检测。如 Sagnelli 等^[8]通过多中心临床观察发现,联合检查患者外周血清、PBMCs 及肝脏穿刺检查 HBV 标志物及病毒定量,可明显提高 OBI 的诊断率。寻找一些新的生物标志物来提高 OBI 诊断率也有重要的意义,如独立生长因子 1(Gfi1),锌指转录阻遏蛋白,一种 T 淋巴细胞特异的转录因子,Gfi1 基因敲除的小鼠缺乏中性粒细胞,导致机体的免疫功能缺陷^[9]。OBI 与多种因素有关,主要与机体的免疫应答状态密切相关^[10],因此 Gfi1 是否与 OBI 有关,以及能否作为 OBI 的诊断指标,值得进一步研究探讨。

综上所述,OBI 在临幊上比较常见,特别是合并丙型肝炎患者、HBcAb 阳性患者,对于高危 OBI 患者应常规检查 HBV DNA 定量,并联合多种检测方式。需要进一步寻找新的生物标志物来提高 OBI 的检测诊断率。

(下转第 1545 页)

件生成工作表转换结果以 sample(可以根据需求更改)开始,见图 3(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

3 讨 论

近年来,随着计算机网络技术的飞速发展,实验室的信息化建设日趋完善,越来越多的实验室已经建立了自己的 LIS 系统,并通过网络与检测仪器及医院的 HIS 系统进行连接^[2-3]。但通常情况下,开发商提供的初步 LIS 架构与各个医院检验科的实际工作情况有很大出入,这需要不同实验室根据自身特点,适当调整 LIS 与检测仪器之间的数据连接。Microsoft Visual Studio 2010 由一套基于组件的开发工具构成,其中包括一些技术用于生成功能强大、高性能的应用程序^[4-5]。DotNetBar 是一组用于 .NET Framework 环境下的组件集,利用该组件集能够打造绚丽并且实用的应用程序界面,给开发人员提供极大的便利。

化学发光免疫分析技术是 80 年代以来发展起来的一项新的免疫标记技术^[6],临床中对于感染性指标的定量分析,应用化学发光法具有较好的灵敏度和特异度,甚至优于酶联免疫吸附法^[7]。CC 600 是国内首台批处理全自动化学发光免疫分析仪,它是由北京科美生物技术有限公司和意大利公司合作研发,由瑞士公司生产^[8]。该仪器具有批处理能力强的特点,160 个标本位,可同时进行 480 个测试,适合批量试验检测,提高了实验室工作效率,目前已在医院系统广泛应用。

大型实验室一般会设有数台相同的仪器进行标本检测,正确地采集标本是保证检测结果准确的前提^[9],将标本编号对于检验工作者而言是每天的重要工作内容之一^[10],而保证临床标本编号的连续性和唯一性显得尤为重要。使用 CC 600 操作软件添加工作表时,患者条码与试管号一一对应,输入模式为 160 个标本循环模式,要求标本数量小于或等于 160,否则提示“已选择的样品管位置无效”。笔者开发的工作表生成软件,根据实验室工作流程需求,可以是任意三位数字开始,成功地实现了 CC 600 不同试验批次之间的衔接,并且要求标本数量不大于 1 000 即可,完全满足日常检测需要,充分发挥了 2 台仪

(上接第 1543 页)

参考文献

- [1] 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.
- [2] Rosadas C, Cabral-Castro MJ, Vicente AC, et al. Validation of a quantitative real-time PCR assay for HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells [J]. J Virol Methods, 2013, 193 (2): 536-541.
- [3] Allain JP. Occult hepatitis B virus infection [J]. Transfus Clin Biol, 2004, 11(1): 18-25.
- [4] 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.
- [5] 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(8): 70768.
- [6] Franz C, Perez RM, Zalis MG, et al. Prevalence of occult hepatitis B virus infection in kidney transplant recipients [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2013, 108(5): 657-660.
- [7] 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.
- [8] Sagnelli E, Imparato M, Coppola N, et al. Diagnosis and clinical impact of occult hepatitis B infection in patients with biopsy proven chronic hepatitis C: a multicenter study [J]. J Med Virol, 2008, 80(9): 1547-1553.
- [9] Zarebski A, Velu CS, Baktula AM, et al. Mutations in growth factor independent-1 associated with human neutropenia block murine granulopoiesis through colony stimulating factor-1 [J]. Immunity, 2008, 28(3): 370-380.
- [10] Bes M, Vargas V, Piron M, et al. T cell responses and viral variability in blood donation candidates with occult hepatitis B infection [J]. J Hepatol, 2012, 56(4): 765-774.

(收稿日期:2015-01-15)

器的检测性能,基于 CHEMCLIN® 600 的工作表生成软件具有临床应用价值。

参考文献

- [1] 彭吉芳. 科美 600 化学发光分析仪的应用体会 [J]. 实用医技杂志, 2012, 19(12): 1331.
- [2] 牛爱军, 王开森, 张玮玮, 等. 医学检验自动化流水线信息化管理系统的构建及应用 [J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(14): 1784-1786.
- [3] 王全立, 王晓伟. 血液管理信息化的历史、现状与未来 [J]. 中国输血杂志, 2011, 24(6): 453-456.
- [4] Marshall D. Visual Studio 2010 并行编程从入门到精通 [M]. 梁春艳,译. 北京: 清华大学出版社, 2013.
- [5] Randolph N, Minutillo M, Gardner D, et al. Visual Studio 2010 高级编程 [M]. 高宇辉, 任鸿, 普杰, 等, 译. 北京: 清华大学出版社, 2012.
- [6] 曹艳林, 刘德贝, 邹飞扬, 等. Chemclin 600 检测系统测定乙型肝炎病毒表面抗原分析灵敏度与功能灵敏度的验证 [J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(10): 1290-1292.
- [7] 黄庆华, 周燕, 吕迎霞, 等. 化学发光法在感染性指标定量检测中的应用 [J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(5): 1293-1295.
- [8] 王建峰, 张琼. Chemclin 600 全自动化学发光仪的维护 [J]. 基层医学论坛, 2013, 17(20): 2667-2668.
- [9] 武永康, 王兰兰, 李斌, 等. 实验室信息系统用于检验与临床双向智能服务的探讨 [J]. 现代检验医学杂志, 2008, 23(2): 80-83.
- [10] 范久波, 刘海菊, 刘晓东, 等. 基于条形码的样本自动编号功能在检验科门诊的应用 [J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(19): 2427-2428.

(收稿日期:2015-02-26)

