

致 力 于 人 类 的 健 康 与 幸 福

第 04 期
2017/04

华医通讯
www.hybiome.com

乙肝血清标志物的定量检测

Quantitative Detection on Serological
Markers for Hepatitis B Virus Infection



乙型病毒性肝炎

乙型病毒性肝炎简称乙肝，是由乙型肝炎病毒（Hepatitis B Virus, HBV）感染引起的、以肝脏炎性病变为主的一种传染病。乙肝广泛流行于世界各国，据报道，全球有 2.4 亿人为慢性 HBV 感染者（图 1），每年有超过 68.6 万人死于乙型肝炎的并发症（包括肝硬化和肝癌）^[1]。中国 HBV 的感染率很高，全国约有 9300 万人携带 HBV，其中慢性乙型肝炎患者约 2000 万。

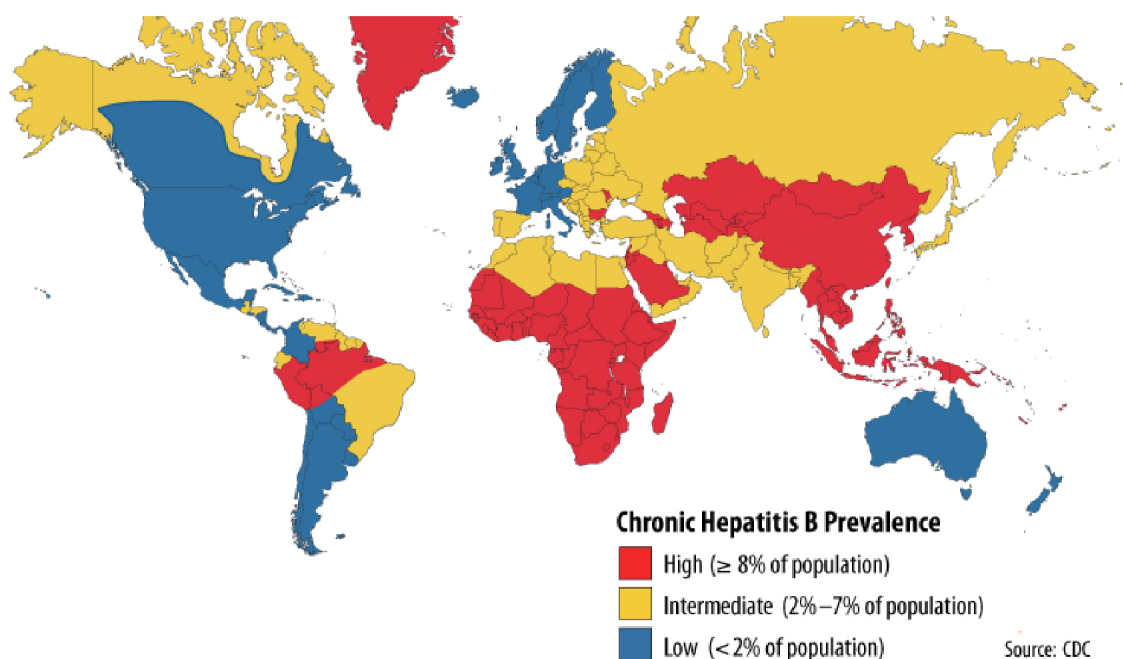


图1. HBV全球感染分布示意图

HBV结构

HBV 属于嗜肝 DNA 病毒科，其基因组及病毒颗粒结构如图 2-3 所示。HBV DNA 是长约 3.2kb 的松弛、环状、不完全闭合的双链 DNA（rcDNA），包含 4 个交错重叠的开放读码框架：S、C、P、X 区（图 2）。S 区又分为 preS1、preS2 和 S，编码 HBV 的包膜蛋白，其中 preS1、preS2 和 S 共同编码大表面蛋白，preS2 和 S 编码中表面蛋白，S 编码小表面蛋白。在 HBV 感染患者的血液中除完整的病毒颗粒（即 Dane 颗粒）外

还能观察到大量的小球形颗粒和由小球形颗粒组成的管形颗粒，这主要由病毒的小表面蛋白（HBsAg）、脂类和糖类组成，为不具感染性的亚病毒颗粒。C区包括preC和

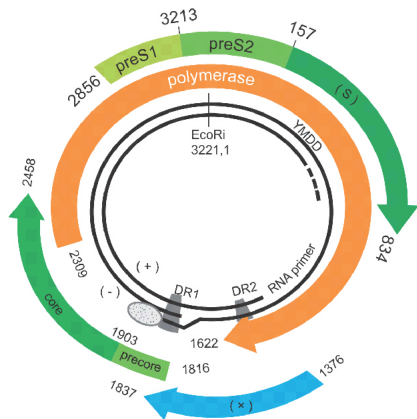


图2. HBV基因组示意图^[2]

C基因，分别编码e抗原(HBeAg)和核心抗原(HBcAg)。HBcAg组成病毒核衣壳，包裹有病毒DNA；HBeAg可分泌到细胞外，是病毒复制活跃的标志。P区负责编码兼具逆转录活性的病毒DNA聚合酶。X基因编码两种具有反式激活作用的蛋白质，不参与病毒结构组成，但可以激活HBV或者细胞的调控基因，促进病毒复制、诱导细胞癌变。

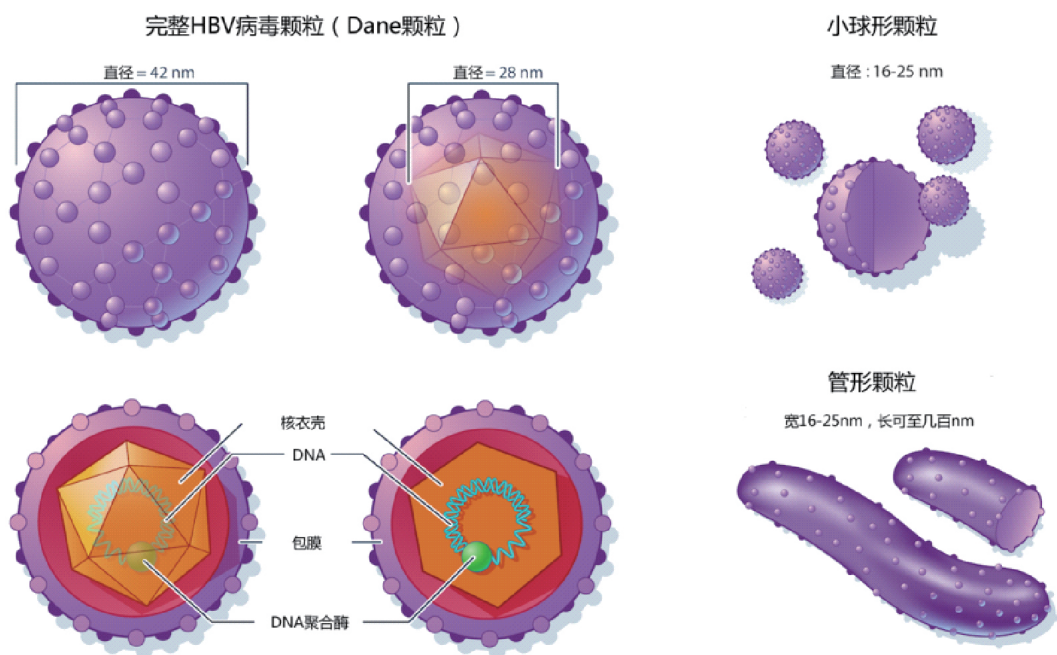


图3. HBV病毒颗粒及亚病毒颗粒结构示意图^[3]



HBV的生命周期

HBV 主要感染肝细胞（图 4）^[4, 5]：

- (1) HBV 与肝细胞表面相关受体结合入胞，脱掉衣壳，释放 rcDNA 入核；
- (2) 在宿主细胞 DNA 聚合酶作用下，rcDNA 将双链缺口补齐形成共价闭合环状 DNA (cccDNA)；

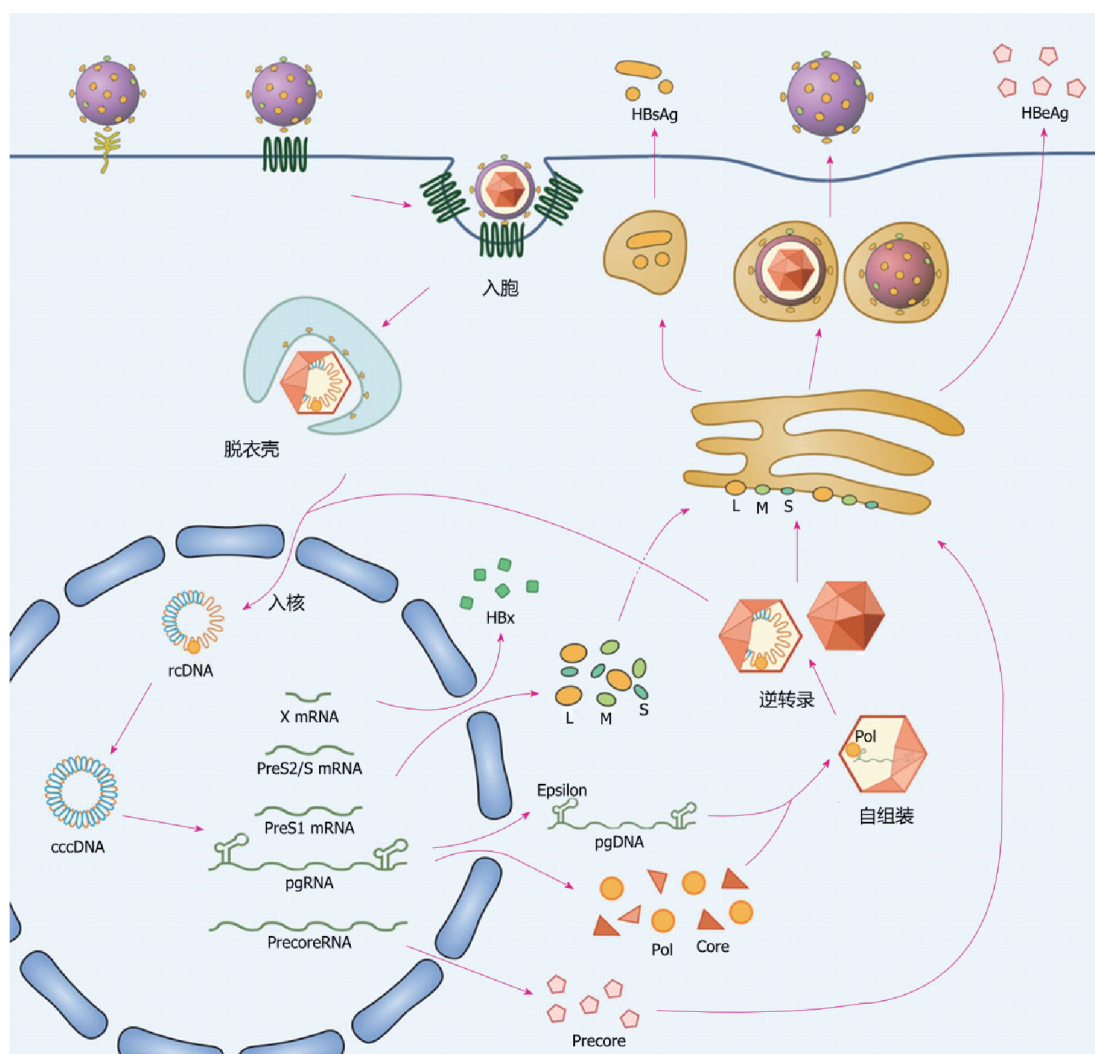


图4. HBV生命周期示意图^[5]

(3) 宿主RNA聚合酶以cccDNA为模板, 合成前基因组RNA (pgRNA) 及各种病毒 mRNA ;

(4) 病毒mRNA移至核外, pgRNA翻译成核心蛋白及DNA聚合酶, 同时三者进行自组装形成包裹有pgRNA的核衣壳 ;

(5) 核衣壳内, 病毒DNA聚合酶发挥逆转录功能, 以pgRNA为模板合成HBV DNA 的负链, 然后再以负链为模板合成新的rcDNA ;

(6) 含rcDNA的核衣壳可重新入核或进入内质网和高尔基体与病毒包膜组装形成完整的病毒颗粒或亚病毒颗粒释放到细胞外。

HBV基因型与血清亚型

HBV 复制时需以 pgRNA 为模板逆转录成病毒 DNA。因 HBV 逆转录酶缺少校正读码功能, 在复制过程中核苷酸突变率高, 核苷酸错配率大约为 $(1.4-3.2) \times 10^{-5}/(\text{位点} \cdot \text{年})^{[3]}$ 。这种单一的复制机制导致了 HBV 基因组大量的位点突变、缺失或插入, 从而导致 HBV 不同基因型、亚型、突变株、准种的存在。根据 HBV 全基因序列异质性 $\geq 8\%$ 或 $4\% \sim 8\%$ 的标准, 分别将 HBV 分为 10 个基因型(A-J)和不同的亚型。HBV 基因型的分布具有明显的地域性。我国以 B、C 两种基因型为主, 其中南方以 B 型为主, 北方以 C 型为主, 也有少量 A、D 型以及 B/C 基因型混合感染。

根据 HBV 包膜蛋白 HBsAg 抗原决定簇的不同, HBV 可分为 adw、adr、ayw 和 ayr 血清亚型。其中 a 决定簇序列高度保守, 具有很高的免疫原性, 为中和抗体作用的靶点。几个甚至单个氨基酸的变异就可以改变 a 决定簇的抗原性, 如 S 基因变异导致 145 位甘氨酸由精氨酸替代时, 因抗原空间构型的改变导致 a 决定簇抗原性的改变, 不能被 Anti- HBs 识别, 并可引起患者血清中同时存在 HBsAg 与 Anti-HBs。S 基因启动子位于 PreS1 区, PreS1 的缺失突变(氨基酸 58-118)会影响 S 基因启动子的功能, 进而影响 HBsAg 的合成, 是引起 HBsAg 阴性 HBV 感染的主要原因。

HBV感染血清学标志物

与 HBV 感染相关的抗原抗体包括 HBsAg、HBcAg、HBeAg 及相应抗体 Anti-HBs、Anti-HBc 和 Anti-HBe。除 HBcAg 外，其余五种成分均可存在于 HBV 感染者血液中，可直接进行检测。此外亦可检测到 HBV 感染者血液中的 DNA。HBV DNA 的检测采用 PCR 法，针对 HBV 特异的核酸序列，通过扩增技术，检测样本的病毒数量。但因该方法需对样本进行预处理提取病毒 DNA 后再进行 PCR 扩增，操作过程繁杂，标本易因交叉污染造成假阳性，且仪器试剂成本高，对实验室条件及操作人员水平要求高，临床无法普遍开展。目前临床上乙肝血清标志物检测主要是乙肝五项（HBsAg、Anti-HBs、HBeAg、Anti-HBe、Anti-HBc）的免疫学检测。

- ◎ HBsAg是HBV感染后首个出现的血清标志物，一般在HBV感染后的3-5周即可检出，平均检出时间为30天（检出时间：6-60天）。
- ◎ HBeAg检出表示病毒处于高复制状态，传染性强；Anti-HBe的出现表示病毒复制降低、传染性减弱。
- ◎ Anti-HBc是HBV感染后血清中最早检出的HBV抗体，并能长期存在；IgM型Anti-HBc是区分急性/近期感染与慢性感染的标志。
- ◎ 通常 HBV 感染恢复的患者血液中 HBsAg 与 HBV DNA 已被清除, Anti-HBs 出现；而慢性感染患者血液中 HBsAg 与 HBV DNA 持续存在。

乙肝血清标志物定量检测意义

HBV血清标志物的定量检测可以准确地反映其在血清中的浓度，间接反映体内HBV复制的活跃程度，对乙肝病程、疗效监测、预后判断等具有重要的临床意义：

- ◎ HBeAg 是最早用于抗病毒疗效监测的指标，HBeAg 和 Anti-HBe 的血清学转换是抗病毒治疗持续应答的重要证据。监测 HBeAg 浓度变化，可更早预测远期的血清学应答。Fried 等发现，在接受长效干扰素治疗 48 周的患者中，治疗 12 周时 HBeAg 浓度低于 10PEIU/mL 的患者中，有 53% 在 72 周时出现血清学转换；而治疗 12 周时 HBeAg 浓度高于 100PEIU/mL 的患者中，仅有 14% 在 72 周时出现血清学转换^[6]。
- ◎ 慢性乙肝患者治疗初始时 HBsAg 浓度越低，越容易获得血清学和病毒学应答。Moucari 等研究发现，早期的血清 HBsAg 浓度下降，是预测长效干扰素抗病毒治疗持续应答（SVR）的显著标志，治疗 12 周时 HBsAg 浓度下降 5~10 倍预测 SVR 的阴性预测值为 90%，阳性预测值为 89%^[7]。
- ◎ Anti-HBc 定量检测与抗病毒治疗血清学及病毒学应答具有独立的相关性^[8]。定量检测 Anti-HBc 的浓度可以反映病毒感染的状态：高浓度 Anti-HBc 提示乙肝急性感染，恢复期浓度降低；慢性乙肝呈 Anti-HBc 持续高浓度；低浓度 Anti-HBc 一般为恢复期或既往感染。
- ◎ 定量检测 Anti-HBs 在乙肝疫苗接种的效果观察和复种方案的制定有定性方法不可取代的价值，Anti-HBs $\geq 10\text{mIU/mL}$ 判为阳性，但大于 100mIU/mL 才具有保护意义。



案例

病例一：患者，女，20岁，乙肝病毒携带5年，近两周自感乏力到院就诊，检测乙肝病毒血清学指标：HBsAg(+) 145.7IU/mL，HBeAg(+) 85.3PEIU/mL，Anti-HBc(+) 125.2IU/mL，为大三阳。采用核苷类似物抗病毒治疗3个月后，复测血清学指标为：HBsAg(+) 54.2IU/mL，HBeAg(+) 8.5PEIU/mL，Anti-HBc(+) 121.2 IU/mL；继续给予相同抗病毒药物治疗，患者在24周再次复测血清学指标为 HBsAg(-) 0.03 IU/mL，HBeAg(-) 0.1PEIU/mL。

病例二：患者，男，34岁，慢性乙肝病毒携带7年，乙肝病毒血清学指标检测结果：HBsAg(+) 353.4IU/mL，HBeAg(+) 54.3PEIU/mL，Anti-HBc(+) 100.9IU/mL，为大三阳；采用核苷类似物抗病毒治疗，3个月后复测血清学指标为：HBsAg(+) 253.6 IU/mL，HBeAg(+) 43.5PEIU/mL，Anti-HBc(+) 118.4IU/mL，三项指标下降不明显。仍继续给予相同抗病毒治疗，患者在24、36周两次复测血清学指标依然没有明显下降趋势，表明抗病毒治疗无效。

分析

病例一在抗病毒治疗12周复测时，HBsAg及HBeAg浓度下降明显，特别是HBeAg浓度已下降到10PEIU/mL以下，再经12周抗病毒治疗HBsAg已阴转；而病例二在抗病毒治疗12周复测时，HBsAg及HBeAg浓度无明显下降，最终抗病毒治疗至72周时HBsAg仍未转阴，抗病毒治疗无效。治疗过程中HBsAg及HBeAg浓度下降情况可作为抗病毒治疗的有效预测指标。

乙肝病毒血清学用于抗病毒疗效观察或预测必须采用乙肝定量检测才能随时观察血清学变化情况（特别是治疗12周时浓度下降情况与最终疗效有直接关系），从而随时调整抗病毒治疗方案。与之相比，传统的定性检测的阴阳性结果不利于疗效的准确判断，这就是定量检测优势之处。

应用 问答

1. HBsAg和Anti-HBs同阳模式临床概率是多少？

根据文献报道^[9]，HBsAg/Anti-HBs同阳模式临床出现概率约为：HBsAg阳性的4-9%。

2. HBsAg 和 Anti-HBs 同阳模式临床该怎么解释？

在 HBsAg/Anti-HBs 血清转换期，高灵敏的试剂可同时检测出 HBsAg 和 Anti-HBs；

由于乙型肝炎病毒 S 基因发生突变，在血清中可以检测到突变后的 HBsAg 和针对突变前乙肝病毒的 Anti-HBs；

病人感染了不同基因型的乙型肝炎病毒，血清中存在不同的 HBsAg 亚型和 Anti-HBs；

此外，随着检测方法敏感性和特异性的不断改进，各种检测试剂对 HBV 突变株检测能力的不断提高，HBsAg 和 Anti-HBs 同时阳性的发生率也会不断增加。

3. HYBIOME 乙肝五项血清标志物溯源问题：

公司乙型肝炎病毒五项血清标志物分别溯源至：

HBsAg：WHO 国际标准品（NIBSC code: 00/588）

HBeAg：德国兰格 PEI 参考标准品

Anti-HBs：WHO 国际标准品（NIBSC code: 07/164）

Anti-HBe：德国兰格 PEI 参考标准品

Anti-HBc：WHO 国际标准品（NIBSC code: 95/522）

4. 为何化学发光试剂 Anti-HBc、Anti-HBe 阳性率高？

根据灵敏度的高低：化学发光试剂比酶免灵敏度高，酶免比金标试剂灵敏度高，所以化学发光试剂阳性检出率会高；

根据文献统计：进口化学发光检测系统核心抗体阳性率约在 80%；酶免等阳性率约 30-40%。

5. 在做乙肝五项实验时，如何避免交叉污染？

HYBIOME 仪器吸样针采用特殊工艺，保证针内壁光洁度小于 0.02，同时针外壁涂有特氟龙，以此避免携带污染；

配有强化清洗液，使用强化清洗后，仪器的携带污染率可以达到 10^{-7} ；

针对乙肝五项实验，HYBIOME 软件设有强制顺序机制。实验根据强制顺序进行，防止试剂交叉污染。



HBV感染血清标志物模式

模式	HBsAg	Anti-HBs	HBeAg	Anti-HBe	Anti-HBc	临床意义
0	-	-	-	-	-	过去现在未感染过HBV
135	+	-	+	-	+	俗称“大三阳”，急性或慢性乙肝，病毒复制，传染性强
15	+	-	-	-	+	急性乙肝或是慢性乙肝，传染性弱
145	+	-	-	+	+	俗称“小三阳”，急性乙肝已趋向恢复，或慢性携带者，传染性弱
25	-	+	-	-	+	乙肝恢复期，开始产生免疫力
45	-	-	-	+	+	既往有乙肝感染，属于急性感染恢复期，少数人仍有传染性；Anti-HBs出现前的窗口期
5	-	-	-	-	+	过去有乙肝感染或现在正处于急性感染；HBsAg极低测不出，HBsAg、Anti-HBs空白期
2	-	+	-	-	-	以前打过乙肝疫苗或以前感染过乙肝。
245	-	+	-	+	+	急性乙肝恢复期，以前感染过乙肝，开始产生免疫力
1	+	-	-	-	-	急性乙肝潜伏期后期或者慢性乙肝表面抗原携带者
14	+	-	-	+	-	慢性乙肝表面抗原携带者易转阴或者是急性感染趋向恢复
13	+	-	+	-	-	早期乙肝感染或者慢性携带者，传染性强
1345	+	-	+	+	+	急性乙肝感染趋向恢复.或者为慢性携带者
235	-	+	+	-	+	血清中有HBsAg和Anti-HBs复合物，且Anti-HBs过量
12	+	+	-	-	-	亚临床型HBV感染早期；不同亚型HBV二次感染
125	+	+	-	-	+	亚临床型HBV感染早期；不同亚型HBV二次感染
124	+	+	-	+	-	亚临床型或非典型性感染
1245	+	+	-	+	+	亚临床型或非典型性感染
1235	+	+	+	-	+	不同亚型HBV再感染

参考文献

1. Mortality, G.B.D. and C. Causes of Death, *Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013*. Lancet, 2015. 385(9963): p. 117-171.
2. Kao, J., *Molecular Epidemiology of Hepatitis B Virus*. The Korean Journal of Internal Medicine, 2011. 26(3): p. 255-261.
3. <http://www.hepwebstudy.org>.
4. Urban, S., et al., *The replication cycle of hepatitis B virus*. Journal of Hepatology, 2010. 52(2): p. 282-284.
5. Kim, D.H., H.S. Kang, and K.H. Kim, *Roles of hepatocyte nuclear factors in hepatitis B virus infection*. World J Gastroenterol, 2016. 22(31): p. 7017-7029.
6. Fried MW, et al., *HBeAg and hepatitis B virus DNA as outcome predictors during therapy with peginterferon alfa-2a for HBeAg-positive chronic hepatitis B*. Hepatology, 2008. 47(2): p. 428-434.
7. Moucari R, et al., *Early serum HBsAg drop: A strong predictor of sustained virological response to pegylated interferon alfa-2a in HBeAg-negative patients*. Hepatology, 2009. 49(4): p. 1151-1157.
8. Hou FQ, et al., *Quantitative hepatitis B core antibody level is a new predictor for treatment response in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients receiving peginterferon*. Theranostics, 2015. 5(3): p. 218-226.
9. 王蕾, 刘华, 章励, 高峰. 乙型肝炎血清标志物 HBsAg 和 HBsAb 同时阳性模式的相关研究. 检验医学, 2008.23(5):p.530-534.

有奖征集

华医通讯推出后, 受到读者的广泛赞誉。为了更好的服务客户, 解决实际工作中面临的疑问, 欢迎大家踊跃来信, 分享自己的知识经验或工作中遇到的问题。我们将给予心动的回报!
投稿邮箱: hytx@hybiome.com

有奖征答

室间质评为什么要分组呢?

下期预告

丙型肝炎病毒血清标志物

SUZHOU HYBIOME BIOMEDICAL ENGINEERING CO.,LTD 苏州长光华生物医学工程有限公司

苏州长光华生物医学工程有限公司

SUZHOU HYBIOME BIOMEDICAL ENGINEERING CO., LTD

地址: 苏州高新区锦峰路8号4号楼

Address: Building 4, No. 8, Jinfeng Road, Suzhou 215163, China

电话: 400 928 0111 传真: 0512-6689 7061

Email: hybiome@hybiome.com www.hybiome.com

