

· 综述 ·

乙型肝炎病毒表面抗原定量检测和临床应用研究进展

梁柱石

乙型肝炎病毒表面抗原 (hepatitis B surface antigen, HBsAg) 是病毒的外膜结构蛋白多肽, 人体感染乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 后4~7周就能从血清内检测到HBsAg, 但HBsAg本身不具有传染性, 以往临床一直将HBsAg作为HBV感染的一个指标; 近年来, 随着HBsAg定量检测技术的进步和不断开展相关的研究, 人们对HBsAg定量与慢性乙型肝炎自然史、疾病转归以及疗效预测的关系逐渐变得乙型肝炎病毒清晰起来, HBsAg这个“古老”的指标再次焕发出新的生命。

一、HBsAg定量检测技术的发展

1965年Blumberg等在研究输血时首次发现了HBsAg, 1972年HBsAg检测试剂盒问世, 最初的检测方法只能做定性, 且灵敏度和特异度较低, 大多数已被淘汰, 在上世纪90年代, 医学检验技术取得突飞猛进的发展, 有多项新检验技术应用于HBsAg检测, HBsAg检测的灵敏度和特异度得到较大提高, 其中应用最广泛的是酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunoabsorbent assay, ELISA), ELISA虽然只能做定性或半定量, 但具有灵敏度高、特异性强优点, 对HBsAg的检测灵敏度可达0.5 ng/ml, 且快速、简易, 不需要昂贵的设备, 该方法至今在我国仍普遍使用。此外还有电化学发光法检测技术 (electrochemiluminescence, ECL)、固相放射免疫法 (solid phase radioimmunoassay, SPRIA)、时间分辨荧光免疫法 (time-resolved fluorescence immunoassay, TRFIA) 等, 但ECL成本相对较高, SPRIA检测操作繁琐、污染环境、线性范围狭窄, TRFIA费用较为昂贵, 这些检测方法逐渐被淘汰。近十年来, 在ECL基础上开发的电化学发光免疫分析法 (electro-chemiluminescence immunoassay, ECLIA)、化学发光微粒子分析法 (chemiluminescent microparticle immunoassay, CMIA)、微粒子酶免疫分析法 (microparticle enzyme immunoassay, MEIA) 使HBsAg的检测更准确、更稳定, 这些都是目前较先进的HBsAg定量测定技术, 已广泛应用于临床和科研。HBsAg定量最初是以ng/ml为单位, 为了建立在全球范围内广泛认可的HBsAg标准, 世界卫生组织制备了以IU/ml为浓度单位的HBsAg标准品。目前罗氏公司开发的ECLIA全自动检

测仪及配套试剂和雅培公司的Architect试剂 (CMIA) 检测HBsAg的灵敏度可达0.05 IU/ml, 罗氏Elecsys HBsAg II Quant可将HBsAg定量检测上限扩大到52000 IU/ml, 灵敏度和精确度比ELISA、TRFIA高几个数量级。蛋白质芯片技术、液相芯片技术虽然早已存在, 但应用于检测HBsAg定量的时间较晚, 蛋白质芯片检测表面抗原定量效果与ELISA法相当, 但方法简单、快捷、廉价, 结果可视, 并直接通过软件计算出抗原含量, 既定性又定量, 很适合于对患者疗效的观察^[1]。液相芯片检测HBsAg方法通量大, 灵敏度、准确性高, 重复性、灵活性好, 只需要微量的样品即可进行检测^[2], 最高检测浓度为16 000~32 000 pg/ml。近期开发检测HBsAg定量的新技术还有免疫PCR法, 目前该检测技术还处于研究阶段。

二、以HBsAg定量估测HBV复制

HBV DNA水平是反映HBV复制活动的标志, 近年发现慢性HBV感染者肝细胞内小球形颗粒的输出与血清HBV DNA是一致的^[3]。Chen等^[4]定量检测4组无症状HBV携带者血清HBsAg浓度, 提示血清HBsAg与HBV DNA水平存在良好的相关性, 血清HBsAg水平可替代HBV DNA来评估HBV复制情况, Su等^[5]研究也获得相似的结论。Deguchi等^[6]发现血清中HBsAg水平与HBV DNA和HBV多聚酶水平都具有良好的相关性。HBsAg水平可随HBV DNA水平变化而变化, 在HBeAg阴性的慢性肝炎低复制期的患者, HBsAg水平较基线值升高可能提示慢性乙型肝炎再激活^[7-8]。但也有研究显示血清中HBsAg与HBV复制水平变化并不一定与其保持一致, Kuhns等^[9]在研究用HBV DNA替代HBsAg进行献血员乙型肝炎筛查的可行性时, 发现HBsAg阳性、抗-HBc阳性鲜血标本中, 血清HBsAg水平与HBV DNA相关性极弱 ($r = 0.33, P < 0.01$)。王临旭等^[10]研究提示仅在免疫清除期HBsAg滴度水平与HBV DNA定量具有相关性。引起血清HBsAg水平与HBV DNA失去相关性的原因可能是在HBV复制周期中, HBsAg合成的复杂性和持续感染的长期积累、变异等^[11-12], 例如前 (pre) S/S基因变异, HBeAg阳性和阴性慢性HBV感染均会出现HBsAg的滴度与HBV DNA失去相关性, 如果以HBsAg水平作为诊断和预测指标时, 应先行检测感染病毒的pre-S/S基因变异情况^[13]。在慢性HBV感染者体内, HBsAg的合成量远远超过需要组装的完整病毒量, 血清中的HBsAg以不含

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.04.042

作者单位: 543001 梧州市, 梧州市第三人民医院肝病科 (Email: lzs388640@126.com)

病毒核酸的小球形颗粒和管形颗粒为主,浓度可达50~300 $\mu\text{g/ml}$,是Dane颗粒的 $10^2\sim 10^5$ 倍^[14],因此,以HBsAg定量估测慢性HBV感染者的HBV复制状态依然存在一定局限性。

三、应用HBsAg定量估测体内HBV ccc DNA含量

HBV ccc DNA是产生HBsAg的模板,近年研究表明HBsAg定量与肝内HBV ccc DNA密切相关^[6, 15-16],李韦杰等^[17]对54例慢性乙型肝炎患者的肝组织HBV ccc DNA定量和血清HBsAg定量分析,结果显示肝组织HBV ccc DNA定量与血清HBsAg定量存在一定相关性($r=0.459, P<0.01$)。有学者认为血清HBsAg定量是衡量感染肝细胞数量的标志,可作为评价感染细胞替代指标^[18-19],但Thompson等^[20]研究显示,在HBeAg阳性的CHB患者,血清HBsAg水平与肝内ccc DNA呈正相关性较好,而在HBeAg阴性的CHB患者中,HBsAg水平与血清HBV DNA相关性较差。多项临床研究证实HBsAg阴转并不能表示所有患者体内的HBV完全清除,在一些患者已发生血清HBsAg清除而体内仍可检测到ccc DNA^[21]。目前已有较多的研究表明血清HBsAg与肝内ccc DNA的相关性在慢性HBV感染自然史所处各个阶段并不相同,应用血清HBsAg定量估测体内的ccc DNA含量还需结合HBV感染自然史。

四、应用HBsAg定量评估机体免疫及肝炎活动状态

近年发现HBsAg定量与慢性HBV感染自然史关系密切,在免疫耐受期HBsAg滴度非常稳定,高达 $5\log_{10}\text{IU/ml}$,如果慢性HBV感染者HBsAg定量高达 $5\log_{10}\text{IU/ml}$,可以判断患者居于免疫耐受期,免疫清除期HBsAg滴度约为 $4\log_{10}\text{IU/ml}$,同样非常稳定,在HBeAg阴性患者中下降缓慢,虽然无确切的HBsAg水平可以准确预测疾病活动或病毒清除,但每年HBsAg下降 $>1\log_{10}\text{IU/ml}$ 反映免疫控制病毒较好^[22]。对HBeAg阴性慢性患者,如果HBsAg定量在 1000IU/ml 以内,HBV DNA在 2000IU/ml 以内,则基本上可判断为非活动性携带者,获得了免疫控制状态。Brunetto等^[19]报道联合检测HBsAg $<1000\text{IU/ml}$ 及HBV DNA $\leq 2000\text{IU/ml}$ 诊断非活动性携带者的精确性、敏感性、特异性、阳性和阴性预测者值分别为94.3%、91.1%、95.4%、87.9%和96.7%。HBsAg定量和HBV DNA低水平是免疫控制期的特征,目前较多学者都认同HBsAg定量判断机体免疫和肝炎活动状态具有较高准确性。

五、应用HBsAg定量指导抗病毒治疗

在以往各个慢性乙型肝炎治疗指南中都是以HBV DNA和HBeAg指标来评价抗病毒治疗效果,近年随着HBsAg定量与预测疗效及转归相关研究的深入,逐渐认识到HBsAg定量对指导抗病毒治疗具有重要价值,尤其是应用干扰素治CHB时,在治疗早期HBsAg、HBV DNA和HBeAg较治疗基线下降的幅度对预测疗效有较大意义^[23]。Chan等^[24]对HBeAg阳性的CHB患者应用PegIFN治疗6个月时联合监测,结果显

示HBsAg $\leq 300\text{IU/ml}$ 及HBsAg下降 $>1\log_{10}\text{IU/ml}$ 预测达到发生持续应答(SR)的敏感性、特异性、阳性和阴性预测值分别为43%、96%、75%和85%,监测血清HBsAg对预测获得SR具有较高的特异性。HBeAg阳性的CHB应用PegIFN- α -2a治疗,治疗12周和24周后的HBsAg滴度 $<1500\text{IU/ml}$ 也有助于预测HBeAg血清学转换,如果治疗12周时HBsAg滴度仍然 $>20000\text{IU/ml}$,患者发生HBeAg血清学转换的概率则很低^[25]。还有研究显示接受PegIFN- α -2b治疗12周,如HBsAg滴度不下降,同时HBV DNA下降 $<2\log_{10}$ 拷贝/ml者,认为此标准可以作为早期停药的依据,以减少不必要的用药^[26]。我国《干扰素慢性乙型肝炎专家建议(2010年更新)》认为HBsAg定量是IFN抗病毒RGT治疗策略中的重要观测指标之一^[27]。HBsAg定量对监测核苷类药物抗病毒治疗也有一定意义,有研究应用HBsAg定量和e抗原滴度预测恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎的疗效,发现治疗期间HBsAg下降水平对预测VR与SR非常有用,根据HBsAg、HBeAg水平还可以帮助选择合适的慢性乙型肝炎患者进行治疗^[28]。对于亚洲B和C基因型的患者如果HBsAg下降到 100IU/ml 以下时可考虑停药并预示停药后复发概率较低^[25]。应用HBsAg定量可以监测拉米夫定抗病毒治疗发生耐药,出现耐药毒株时,血清HBsAg升高且常早于HBV DNA反弹和生化学突破,部分患者在对LAM产生耐药性(YMDD变异)和HBV DNA升高前几个月,HBsAg已升高^[29-30]。核苷类药物本身可导致HBV聚合酶基因发生变异,HBV聚合酶基因与基因的读码框部分重叠,会使HBsAg表达发生变化,如阿德福韦酯所致的rtA181T可使HBsAg分泌障碍^[31]。由于血清HBsAg与肝内ccc DNA具有良好相关性,因此,HBsAg预测抗病毒治疗终点的价值高于HBV DNA和HBeAg,但必须是在获得血清HBV DNA低于检测线下限和发生血清HBeAg转换后才有意义。

六、结语

随着HBsAg定量检测技术不断进步,HBsAg定量越来越获得精准,血清HBsAg与体内HBV的关系不断得到阐明,尤其是血清HBsAg水平与体内ccc DNA的关系越来越明确,使HBsAg定量在临床的实用价值变得更高,HBsAg定量已成为当前监测和预测乙型肝炎病情进展、抗病毒治疗后应答状态最有用的指标之一,有不少学者建议应把HBsAg定量的临床实用性写进《慢性乙型肝炎防治指南》中,但HBsAg分泌与HBV合成并非完全对等,且还有变异等因素,HBsAg定量对临床的作用依然有一定局限性,还需从多方面进一步深入研究。

参考文献

- 1 吴昊,罗进,郭晏海,等.蛋白质芯片定量检测乙肝表面抗原系统的建立.中国卫生检验杂志,2008,18(5):857-859.

- 2 陈玮, 李明, 吴英松, 等. 用液相芯片技术定量测定人血清CEA、AFP和HbsAg. 中山大学学报(医学科学版),2007,28(1):105-109.
- 3 骆抗先主编. 乙型肝炎基础和临床. 2版. 北京: 人民卫生出版社,2001:44-45.
- 4 Chen CH, Lee CM, Wang JH, et al. Correlation of quantitative assay of hepatitis B surface antigen and HBVDNA levels in asymptomatic hepatitis B virus carriers. Eur J Gastroenterol Hepatol.2004,16(11):1213-1218.
- 5 Su TH, Hsu, CS, Chen CL, et al. Serum hepatitis B surface antigen concentration conelates with HBVDNA level in patients with chronic hepatitis B. Antivir ther,2010,15(8):1133-1139.
- 6 Deguchi M, Yamashita N, Kagita M, et al. Quantitation of hepatitis B surface antigen by an automated chemiluminescent microparticle immunoassay. J Virol Methods,2004,115(2):217-222.
- 7 Jaroszewicz J, Calle SB, Warsthorn K, et al. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) levels in the natural history of hepatitis B virus (HBV)-infection: a European perspective. J Hepatol,2010,52(4):514-522.
- 8 Nguyen T, Thompson AJ, Bowden S, et al. Hepatitis B surface antigen levels during the natural history of chronic hepatitis B: a perspective on Asia. J Hepatol,2010,52(4):508-513.
- 9 Kuhns MC, Kleinman SH, McNamara AL, et al. Lack of correlation between HBsAg and HBV DNA levels in blood donors who test positive for HBsAg and anti-HBc: implications for future HBV screening policy. Transfusion,2004,44(9):1332-1339.
- 10 王临旭, 黄长形, 李新红, 等. 慢性乙型肝炎病毒感染自然史中表面抗原水平的研究. 中华临床医师杂志:电子版,2011, 5 (17):5122-5123.
- 11 Vanlandscchoot P, Leroux-Roels G. Viral apoptotic mimicry: an immune evasion strategy developed by the hepatitis B Virus? Trends Immunol,2003,2(3):144-147.
- 12 Noguchi C, Ishino H, Tsuge M, et al. G to A hypermutation of hepatitis B virus. Hepatology 2005 41(3):626-633.
- 13 Pollicino T, Amaddeo G, Restuccia A, et al. Impact of hepatitis B virus (HBV) preS/S genomic variability on HBV surface antigen and HBV DNA serum levels. Hepatology,2012,56(2):434-443.
- 14 Locarnini S, Bowden S. Hepatitis B surface antigen quantification: not what it seems on the surface. Hepatology,2012,56(2):411-414.
- 15 Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, et al. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. Gastroenterology,2004, 126(7):1750-1758.
- 16 Warsthorn K, Lutgehetmann M, Dandri M, et al. Peginterferon alpha-2b plus adefovir induce strong cccDNA declne and HBsAg reduction in patients with chronic hepatitis B. Hepatology,2006,44(3):675-684.
- 17 李韦杰, 李伯安, 赵景民, 等. 54例慢性乙型肝炎患者肝组织乙型肝炎病毒共价闭环状DNA与血清HBsAg定量检测结果分析. 中华肝脏病杂志,2011,19(11):815-817.
- 18 Chan HL, Wong VW, Tse AM, et al. Serum hepatitis B surface antigen qua ntitation can reflect Hepatitis B virus in the liver and predict treatment response. Clin Gastroenterol Hepatol,2007,5(12):1462-1468.
- 19 Brunetto MR. A new role for an old marker, HBsAg. J Hepatol,2010,52(4) 475-477.
- 20 Thompson AJ, Nguyen T, Lser D, et al. Serum hepatitis B surface antigen and hepatitis B e antigen titers: disease phase influences conelation with viral load and intrahepatic hepatitis B virus markers. Hepatology,2010,51(6):1933-1944.
- 21 Yune MF, Wong DK, Sablon E, et al. HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B in the Chinese: virological, histological, and clinical aspects. Hepatology,2004,39(6):1694-1701.
- 22 Chan HL, Womg VW, Wong GL, et al. A longitudinal study on the natural history of serum hepatitis B surface antigen changes in chronic hepatitis B. Hepatology,2010,52(4):1232-1241.
- 23 Moucari R, Mackiewicz V, Lada O, 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):1151-1157.
- 24 Chan HL, Wong VW, Chim AM, et al. Serum HBsAg quantificuton to predict response to peginterferon therapy of e antigen positive chronic hepatitis B. Aliment Pharmacol Ther,2010,32(11):1323-1331.
- 25 Chan HL, Thompson A, Martinot-Peignoux M, et al. hepatitis B surface antigen quantification: Why and how to use it in 2011-a core group report. J Hepatol,2011,55(5):1121-1131.
- 26 Rijckborst V, Hansen RE, Ferenci P, et al. Validation of a stopping rule at week 12 using HBsAg and HBV DNA for HBeAg-negative patients treated with peginterferon alfa-2a. J Hepatol,2012,56(5):1006-1011.
- 27 万谟彬, 翁心华. 干扰素治疗慢性乙型肝炎专家建议(2010年更新). 中华传染病杂志,2010,28(4):193-200.
- 28 Lee JM, Ahn SH, Kim HS, et al. Quantitative hepatitis B surface antigen and hepatitis B e antigen titers in prediction of treatment response to entecavir. Hepatology,2011,53(5):1486-1493.
- 29 Takagi K, Tanaka Y, Naganma H. et al. Clinical e-valuation of a novel HbsAg quantitative assay. Rinsho Byori,2007,55(7):619-625.
- 30 秦来英, 刘葵花, 张照华, 等. 拉米夫定治疗期间患者血清乙型肝炎表面抗原定量的变化. 中华肝脏病杂志,2005,13(8):602-602.
- 31 Yeh CT. Development of HBV S gene mutants in chronic hepatitis B patients receiving nucleotide/nucleoside analogue therapy. Antivir Ther,2010,15(3):471-475.

(收稿日期: 2012-04-01)

(本文编辑: 孙荣华)