

# HBV 感染者 HBsAg 和 HBsAb 同时阳性的血清学异常模式的研究

徐飞 牛文彦 何艳群 孙喜斌 周淳 魏红山

**【摘要】** 目的 分析 HBsAg 和 HBsAb 同时阳性的慢性 HBV 感染者的血清学模式, 分析病毒 Pre-S/S 区基因序列变异或缺失情况对其进行基因分型, 并探讨其临床意义。方法 采用酶联免疫分析法筛选出 HBsAg 和 HBsAb 同时阳性的慢性 HBV 感染者共 100 例, 采用化学发光微粒子免疫分析确认, 用实时荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 检测其 HBV DNA 含量, 其中 HBV DNA 阳性者 60 例, HBV DNA 阴性者 40 例。将 60 例 HBsAg 和 HBsAb 同时阳性的慢性 HBV 感染者作为实验组, 并选取 60 例 HBsAg (+) HBsAb (-) 的慢性乙型肝炎患者作为对照组。采用 PCR 法体外扩增两组患者 HBV Pre-S/S 基因序列并测序分析, 根据测序结果对患者的基因型进行分型, 比较两组 Pre-S/S 基因变异情况, 结合临床资料探讨其临床意义。结果 实验组患者中 B 基因型 19 例、C 基因型 41 例, 对照组患者中 B 基因型 18 例、C 基因型 42 例。实验组 B 基因型患者的年龄 [ (50.0 ± 16.3) 岁 ] 大于 C 基因型 [ (34.0 ± 13.4) 岁 ], 差异具有统计学意义 (  $F = 31.6, P = 0.0432$  )。实验组 B 基因型和 C 基因型的 S 区氨基酸突变率分别为 10.8% 和 21.6%, 差异具有统计学意义 (  $F = 24.31, P = 0.046$  )。同样为 C 基因型的两组患者, 实验组 S 区氨基酸突变为 41.6%, 显著大于对照组的氨基酸突变率 (3.2%), 差异具有统计学意义 (  $F = 85.68, P = 0.006$  )。结论 HBsAg (+) 且 HBsAb (+) 并伴有 HBeAg (+) 的患者血清中 HBV DNA 的阳性率显著增高。HBsAg 和 HBsAb 同时阳性的现象与 pre-S/S 区基因突变具有显著相关性, 且 C 基因型的突变率高于 B 基因型患者的突变率。

**【关键词】** 肝炎, 乙型; 表面抗原; 表面抗体; Pre-S/S 基因; 点突变

**Study on the serology anomaly pattern of HBsAg and HBsAb positive at the same time of patients with HBV infection** XU Fei\*, NIU Wenyan, HE Yanqun, SUN Xibin, ZHOU Chun, WEI Hongshan.\*Tianjin Medical University, Tianjin 300071, China

Corresponding author: NIU Wenyan, Email: dtjykhua@126.com

**【Abstract】 Objective** To analyze the serological patterns of both HBsAg and HBsAb positive patients with chronic HBV infection, and to investigate the virus gene sequence variation or missing pre-S/S field for genotyping and in order to explore its clinical significance. **Methods** Total of 100 cases with chronic HBV infection whom with both HBsAg and HBsAb positive at the same time were screened by enzyme linked immunoabsorbent assay analysis method and the results were reconfirmed by chemiluminescence micro-particle immunoassay. HBV DNA content were detected by real-time fluorescent quantitative PCR. There were 60 cases with HBV DNA positive and 40 cases with HBV DNA negative. Among the 100 cases, 60 cases with both HBsAg and HBsAb positive as experimental group, and 60 cases with chronic hepatitis B whom with HBsAg (+) and HBsAb (-) as control group. HBV pre-S/S gene sequences and sequencing analysis of the two groups were detected by polymerase chain reaction (PCR) method with in vitro amplification. Compared the two groups of pre-S/S gene variants according to the sequencing results of genetic classification, thus combined with clinical data to explore its clinical significance. **Results** Among the experimental group, genotypes B were 19 cases and genotype C were 41 cases; among the control group, of genotype B were

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2014.01.011

作者单位: 300071 天津市, 天津医科大学 (徐飞、牛文彦); 张家口医学院附属医院 (孙喜斌); 首都医科大学附属北京地坛医院 (何艳群、周淳、魏红山)

通讯作者: 牛文彦, Email: dtjykhua@126.com

18 cases and genotype C were 42 cases. Patients with genotype B were older than cases with genotype C in experimental group ( $50.0 \pm 16.3$  vs  $34.0 \pm 13.4$ ,  $F = 31.6$ ,  $P = 0.0432$ ). The amino acid mutation rate in S area of cases with genotype B and C in experimental group were 10.4% and 21.6%, respectively ( $F = 24.31$ ,  $P = 0.046$ ). The amino acid mutation rate in S area of cases of genotype C in experimental group was 41.6%, which significantly higher than those in control group (3.2%), with significant difference ( $F = 85.68$ ,  $P = 0.006$ ).

**Conclusions** The serum HBV DNA positive rate in patients with HBsAg (+) and HBsAb (+) accompanied by HBeAg (+) increased significantly. The phenomenon of both HBsAg and HBsAb positive genetic mutations and pre-S/S area has significant relevance, while the mutation rate of genotype C higher than that of genotype B.

**【Key words】** Hepatitis B; Surface antigen; Surface antibody; Pre-S/S gene; Gene mutation

HBV 感染是一种全球性的常见传染病, 据世界卫生组织统计, 世界范围内曾感染过 HBV 者约 20 亿, 其中约 3.5 亿为慢性 HBV 携带者, 携带者中约 20% 将死于严重肝病, 其余 15% ~ 40% 将进展为肝硬化、肝细胞癌或肝功能衰竭<sup>[1]</sup>, 每年导致约 100 万人死亡。我国慢性 HBV 感染者全国约 1.2 亿, 其中 2000 ~ 3000 万为活动性肝病患者, 故我国为乙型肝炎的高发区。临床工作中经常会遇到 HBsAg 和 HBsAb 同时阳性的异常血清学模式, 这种情况在排除试剂检测影响后依然存在, 给临床工作带来很大的挑战。到目前为止, HBsAg 和 HBsAb 同时阳性现象的确切原因仍不明确, 相关临床意义的报道也较少, 因此, 本研究收集本院 2011 至 2012 年收治的 100 例 HBsAg 和 HBsAb 同时阳性的患者标本, 对其进行了血清学, 基因测序及分型的相关研究, 进一步探讨其临床意义。

## 资料和方法

### 一、研究对象

血清来源于首都医科大学附属北京地坛医院 2011 至 2012 年门诊及住院的 100 例 HBsAg 和 HBsAb 同时阳性的患者标本, 实验组为 HBV DNA 阳性组, 其中男性 39 例, 女性 21 例; 年龄 21 ~ 67 岁, 平均年龄为 ( $43.5 \pm 23.0$ ) 岁; 随机选择 HBsAg 阳性、抗-HBs 阴性、HBV DNA 阳性血清 60 份作为对照组, 其中男性 41 例, 女性 19 例, 年龄最小 24 ~ 62 岁, 平均年龄为 ( $42.2 \pm 20.0$ ) 岁, 均为经抗病毒治疗后且 HBsAg  $\geq 0.05$  IU/ml, HBsAb  $\geq 10$  mIU/ml。分离血清后冻存于  $-80^\circ\text{C}$  备用。

### 二、主要仪器及试剂

HBsAg 和 HBsAb 检测采用美国雅培公司 ARCHITECT i2000SR 全自动免疫分析仪及配套试

剂和质控物。HBV DNA 检测仪器为罗氏生物公司的 Lightcycler 480 基因扩增仪。HBV 血清免疫学检测试剂盒购自上海科华生物公司, 引物合成和 PCR 产物测序由上海英俊公司完成。

### 三、方法

1. HBV DNA 的提取: 血清 200  $\mu\text{l}$ , 加裂解液 200  $\mu\text{l}$  (100 mmol/L Tris-HCl, 2 mmol/L 乙二胺四乙酸, 1% 十二烷基硫酸钠, 2 mg/ml 蛋白酶 K),  $56^\circ\text{C}$  消化 3 h, 加 400  $\mu\text{l}$  酚/氯仿/异戊醇 (25 : 24 : 1), 震荡混匀后 13 000 r/min 离心 10 min (离心半径  $r = 12$  cm); 取上清液, 加入等量异丙醇,  $-20^\circ\text{C}$  沉淀 2 h, 13 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液; 75% 预冷乙醇漂洗, 真空抽干, 沉淀物溶于 20  $\mu\text{l}$  TE 缓冲液,  $-20^\circ\text{C}$  保存。

2. 引物设计: 参照中国 HBV 感染者常见的病毒基因型 (A、B、C、D 基因型) 序列以及文献设计两对引物进行巢式 PCR 扩增。外侧引物为 BP1 (5'-CTGCTGGTGGCTCCAGTT-3') 和 BP2 (5'-CAATACCACATCATCCAT-3') 目的片段长度为 1410 bp 位于核苷酸序列的 2829 ~ 1017 位。内侧引物为上游引物 NS1: 5'-TTCTIGGGAACAAGAGCTAC-3'。下游引物 NS2: 5'-GCAAACCCCAAAGAGCCACAAT-3' (nt 836-819)。

3. PCR 扩增测序: 第 1 次 PCR 反应条件:  $94^\circ\text{C}$  热启动 5 min,  $98^\circ\text{C}$  变性 10 s,  $50^\circ\text{C}$  退火 15 s,  $72^\circ\text{C}$  延伸 30 s, 30 个循环,  $72^\circ\text{C}$  延伸 5 min。反应结束后取 7  $\mu\text{l}$  样品进行第 2 次 PCR 扩增, 反应条件为:  $95^\circ\text{C}$  热启动 15 min;  $94^\circ\text{C}$  变性 20 s,  $52^\circ\text{C}$  退火 20 s,  $72^\circ\text{C}$  延伸 20 s, 30 个循环,  $72^\circ\text{C}$  延伸 10 min。巢式 PCR 反应结束后, 以 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 若获得特异性条带, 则对 PCR 产物进行纯化, 备用。

4. 序列测定: 将上述纯化的 PCR 产物进行双向测序, 测序引物如下: 上游 5'-GTATGTTGCCCGTTTGTCTC-3', 下游:

5'-GGAGTCTACAGTAGAGCCACAAT-3' (nt286 ~ 266)。

5. 分析: 使用 Primer Premier 5.0 软件对相关序列进行分析, 用 BIO Edit 进行点突变分析, 了解患者血清型、基因型以及 S 基因不同区段的基因变异情况。将两组的测序结果运用 BLAST 进行分析, 检测各序列变异位点及相关的基因型。

#### 四、统计学处理

使用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析, 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组患者之间均数比较采用  $t$  检验。样本率之间的比较采用  $\chi^2$  检验。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 结 果

### 一、HBsAg 和抗 -HBs 双阳性的发生率

收集入院 HBsAg 阳性患者共计 1098 例, 选择其中 HBsAg 和 HBsAb 双阳性患者 100 例, 占 HBsAg 阳性 HBV 感染者的 9.1% (100/1098)。HBsAg 和 HBsAb 中的 HBV DNA 阳性 60 例, 其中 ALT 升高者 56 例。在选取的 100 例 HBsAg 和 HBsAb 同时阳性的患者中血清型及其阳性率分别: ① HBsAg (+) HBsAb (+) HBeAg (+) HBeAb (+) HBcAb (+) 者占 6%, HBV DNA 阳性率为 67%; ② HBsAg (+) HBsAb (+) HBeAg (+) HBcAb (+) 者占 51%, HBV DNA 阳性率为 88.7%; ③ HBsAg (+) HBsAb (+) HBeAb (+) HBcAb (+) 者占 40%, HBV DNA 阳性率为 62.5%; ④ HBsAg (+) HBsAb (+) HBcAb (+) 者占 3%, HBV DNA 阳性率为 52%。实验组患者 HBV DNA 总阳性率为 60%。结果显示, HBsAg (+) HBsAb (+) 并伴有 HBeAg (+) 的患者血清中 HBV DNA 的阳性率高于其他组, 差异具有统计学意义 ( $F = 29.6, P = 0.0369$ ), 见表 1。

表 1 100 例 HBsAg 和 HBsAb 同时阳性患者的血清模式分类

分类	例数	HBsAg	HBsAb	HBeAg	HBeAb	HBcAb	百分比 (%)	HBV DNA 阳性率 (%)
1	6	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	6	67.0
2	51	(+)	(+)	(+)		(+)	51	88.7
3	40	(+)	(+)		(+)	(+)	40	62.5
4	3	(+)	(+)			(+)	3	60.0

表 2 HBsAg 和 HBsAb 同时阳性患者 S 区基因变异情况

组别	年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$ )	例数	S 区突变率 (%)
实验组			
基因型 B	50.0 ± 16.3	19	10.8
基因型 C	34.0 ± 13.4	41	21.6
对照组			
基因型 B	42.0 ± 12.6	28	4.9
基因型 C	36.0 ± 10.1	32	6.1

### 二、两组患者基因型和血清型的分布

利用 Primer Premier 5.0 进行序列分析, 其中实验组患者中 B 基因型 19 例、C 基因型 41 例, 对照组 B 基因型 28 例、C 基因型 42 例。实验组 B 基因型患者的年龄 [(50.0 ± 16.3) 岁] 大于 C 基因型 [(34.0 ± 13.4) 岁]; 实验组 B 基因型和 C 基因型的 S 区氨基酸突变率分别为 10.8% 和 21.6%, 差异具有统计学意义 ( $F = 24.31, P = 0.046$ )。而对照组的 B、C 两种基因型的突变率分别为 1.9% 和 2.8%, 差异无统计学意义 ( $F = 2.19, P = 0.098$ )。同样为 C 基因型的两组患者, 实验组 S 区氨基酸突变为 21.6%, 显著高于对照组的氨基酸突变率 (6.1%), 差异具有统计学意义 ( $F = 32.60, P = 0.006$ ), 见表 2。

### 三、变异位点情况

HBsAg 与 HBsAb 同时阳性的乙型肝炎患者主要亲水区变异位点主要有 T126S/I/A、Q129H、T131N、M133L/T、P142L/S、M133K、F134L、D144A 和 G145R/K 等; 主要亲水区外区变异位点有 G7R、V14G、L42P、S61L、P62L、L175S、L186H 和 Y206C 等, 突变大多发生于 S 区的 “a” 决定簇内, C 基因型比 B 基因型更易发生突变; 可能因此种突变的产生使 HBsAg 的抗原性发生改变, 最终导致了 HBsAg 和 HBsAb 同时阳性。

## 讨 论

慢性 HBV 感染者血清中存在 HBsAg 和 HBsAb 同时阳性的现象, 近年来不断被国内外学者所报道<sup>[2]</sup>。HBsAg 和 HBsAb 同时阳性现象的确切原因仍未明确。HBsAg 和 HBsAb 在体内共存的机制有多种观点<sup>[3-4]</sup>, S 区或前-S 区基因变异, HBsAg “a” 决定簇

的抗原性和免疫原性发生改变;在强的宿主免疫压力下,病毒免疫逃避;“a”抗原决定簇内或外周残基变异的聚集可能改变T细胞抗原决定簇结构<sup>[5-6]</sup>;同一患者可能受“a”抗原决定簇不同残基突变或不同亚型的HBV株混合感染<sup>[7-8]</sup>。本研究所收集的患者包括门诊随访以及住院的慢性中、重度的乙型肝炎患者。本组患者中,男性多于女性,以中青年为主,大部分患者肝功能在正常范围,88.7%的患者HBeAg阳性,100例患者中有12例(12.0%)HBV DNA为阳性,ALT与HBV DNA阳性并无相关性。Colson等<sup>[9]</sup>研究发现编码HBsAg的核苷酸序列发生变异可以导致HBsAg和HBsAb同时阳性,且HBsAg和HBsAb同时阳性的现象与变异产生的免疫逃避突变有关。某些慢性HBV感染者、器官移植者以及成功接种乙肝疫苗的部分肝炎患者也可以出现HBsAg和抗-HBs双阳性<sup>[10-11]</sup>。本研究结果表明,HBsAg与HBsAb双阳性本地区的发生率为9.1%,高于国内外的报道<sup>[12]</sup>。可能与地域差异、使用的检测试剂盒不同等有关。目前由于随着HBV耐药性的增加,其突变率或混合感染不同病毒株的几率可能略有增加;对于HBsAg和HBsAb双阳性感染者,HBeAg可以阳性或阴性,100例患者有60例HBV DNA阳性,而HBeAg阳性时的HBV DNA阳性率为88.7%。显著升高,北方地区以B型为主<sup>[13]</sup>,但基因分型C型突变率显著高于B型基因,可能由于就诊患者的分布有所不同,本研究对照组中也出现了部分S区点突变的情况,可能的原因为扩增过程中出现的突变。HBsAg和HBsAb同时阳性的现象与pre-S/S区基因突变具有一定的相关性,HBV DNA阳性的患者中出现的HBsAb不具有保护作用。因此,对于HBsAg和HBsAb同时阳性的机制的探讨需要大样本持续性的深入跟踪研究,更加全面地考虑该特殊血清学模式的机制,以便得出更加准确地结论。

徐飞,牛文彦,何艳群,等. HBV感染者HBsAg和HBsAb同时阳性的血清学异常模式的研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2014, 8(1): 50-53.

## 参考文献

- 1 Wang YM, Nq WC, Lo SK. Detection of preS/S gene mutants in chronic hepatitis B carriers with concurrent hepatitis B surface antibody and hepatitis B surface antigen[J]. *J Gastroenterol*,1999,34(5):600-606.
- 2 Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus:clinical and diagnostic impact[J]. *J Clin Virol*,2005,32(2):102-112.
- 3 张瑞,李荣成,朱风才,等. 乙型肝炎病毒“a”决定簇突变对乙型肝炎疫苗保护效果的影响[J]. *中华流行病学杂志*,2007,28(4):334-337.
- 4 Zhang JM, Xu Y, Wang XY, et al. Coexistence of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and heterologous subtype-specific antibodies to HBsAg among patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. *Clin Infect Dis*,2007,44(9):1161-1169.
- 5 余文辉,周小梅,周大桥,等. 隐匿性慢性乙型肝炎与乙肝病毒重叠基因突变相关性研究[J]. *国际检验医学杂志*,2007,28(8):701-704.
- 6 张定凤. 乙型肝炎抗病毒治疗的前瞻[J]. *中华肝脏病杂志*,2006,14(7):483-489.
- 7 Hsu HY, Chang MH, Ni YH, et al. Survey of hepatitis B surface variant infection in children 15 years after a nationwide vaccination program in Taiwan[J]. *Gut*,2004,53(10):1499-1503.
- 8 Mathet VL, Feld M, Espinola L, et al. Hepatitis B virus S gene mutants in a patient with chronic active hepatitis with circulating anti-HBs antibodies[J]. *J Med Virol*,2003,69(1):18-26.
- 9 Colson P, Borentain P, Motte A, et al. Clinical and virological significance of the co-existence of HBsAg and anti-HBs antibodies in hepatitis B chronic carriers[J]. *Virology*,2007,367(1):30-40.
- 10 Mesenas SJ, Chow WC, Zhao Y, et al. Wild-type and a epitope variants in chronic hepatitis B virus carriers positive for hepatitis B surface antigen and antibody[J]. *J Gastroenterol Hepatol*,2002,17(2):148-152.
- 11 Lada O, Benhamou Y, Poynald T, et al. Coexistence of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and anti-HBs antibodies in chronic hepatitis B virus carriers:influence of “a” determinant variants[J]. *J Virol*,2006,80(6):2968-2975.
- 12 张振华,彭静,夏剑波,等. 表面抗原和抗体双阳性慢性乙型肝炎病毒感染者病毒S基因的变异分析[J]. *中华肝脏病杂志*,2009,7(4):266-270.
- 13 Shiels MT, Tasrell HF, Czaja AJ, et al. Frequency and significance of concurrent hepatitis B surface antigen and antibody in acute and chronic hepatitis B[J]. *Gastroenterology*,1987,93(4):675-680.

(收稿日期: 2013-08-23)

(本文编辑: 孙荣华)