

HBsAb 阳性隐匿性乙型肝炎病毒感染者 HBV PreS-S 区基因突变研究*

郭 燕, 蔡 斌, 段 勇, 景媛媛, 白 珉, 现红斌, 巩晗实 (陕西省血液中心, 西安 710061)

摘要:目的 分析血清 HBsAb 阳性的隐匿性乙型肝炎病毒感染者 HBV PreS-S 区基因变异, 初步探讨该特殊感染模式的发生机制。方法 使用巢式聚合酶链反应(Nested PCR), 对陕西省血液中心保存的 38 份 HBsAb 阳性隐匿性乙肝病毒感染(OBI)血清样本进行 HBV PreS-S 基因片段扩增并测序, 确定基因型和血清型, 并与对应基因型 HBsAg 阳性野毒株序列进行比对。结果 38 份 HBsAb 阳性 OBI 血清样本中, 11 份成功扩增出目的基因, 其中 8 份测序成功。C 基因型 5 份, 其中 1 份为血清型 adw, 4 份为血清型 adr; B 基因型 3 份, 全部为血清型 adw。OBI 毒株 PreS-S 区, PreS-S 免疫反应区以及亲水区(MHR)氨基酸变异率均显著高于对应野毒株, 差异有统计学意义(2.6% vs 0.8%, $\chi^2=40.23$; 3.2% vs 0.3%, $\chi^2=52.13$; 3.6% vs 0.6%, $\chi^2=13.25$, 均 $P<0.01$), “ α ”抗原决定簇检测到 I126T, Q129R, M133T, F134I, D144E, G145K 突变。C 基因型 PreS-S 区氨基酸变异率高于 B 基因型, 差异有统计学意义(3.5% vs 1.2%, $\chi^2=15.98$, $P<0.01$); 而其 MHR, “ α ”抗原决定簇以及 PreS-S 免疫反应区氨基酸突变率虽均高于 B 基因型, 但差异均无统计学意义(分别是 4.7% vs 1.7%, $\chi^2=2.96$; 3.6% vs 2.9%, $\chi^2=0.25$; 4.1% vs 2.3%, $\chi^2=3.59$, 均 $P>0.05$)。结论 OBI 毒株 PreS-S 区, 尤其是 PreS-S 免疫反应区氨基酸发生较多变异, 可能改变了病毒的免疫原性, 造成免疫逃逸, 从而导致 HBsAb 阳性 OBI 发生。

关键词: 隐匿性乙肝病毒感染; HBV PreS-S 区; 基因变异

中图分类号: R512.62; Q754 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2017)04-016-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.04.005

Study on PreS-S Gene Mutation of HBV in Occult Hepatitis B Virus Infected Persons with Positive HBsAb

GUO Yan, CAI Bin, DUAN Yong, JING Yuan-yuan, BAI Min, XIAN Hong-bin, GONG Han-shi
(Shaanxi Blood Center, Xi'an 710061, China)

Abstract: **Objective** To analyze the mutation of PreS-S region in occult hepatitis B virus(OHBV) in HBV infected persons with positive HBsAb and investigate the biological mechanisms of the special infectious model. **Methods** A total of 38 HBsAb positive OBI serum samples were amplified by Nested PCR and sequenced, HBV genotype and serotype were determined. The amino acid sequences of OHBV were compared to the corresponding sequence of wild-type strains of similar genotype obtained from the GenBank database. **Results** PreS-S segment of 11 samples were obtained and 8 samples were sequenced successfully. Among which, 5 were genotype C and 3 were genotype B. Genotype B were all serotype adw, while genotype C were 1 adw and 4 adr. The mutation rates of PreS-S region, the immunoreactive area and the major hydrophilic region (MHR) were higher in OHBV than the wild-type strains (2.6% vs 0.8%, $\chi^2=40.23$; 3.2% vs 0.3%, $\chi^2=52.13$; 3.6% vs 0.6%, $\chi^2=13.25$, all $P<0.01$) and the substitutions of I126T, Q129R, M133T, F134I, D144E, G145K in “ α ” determinant were found in OBI samples. The mutation rate of amino acids in PreS-S region was higher in genotype C than genotype B (3.5% vs 1.2%, $\chi^2=15.98$, $P<0.01$), meanwhile, the mutation rates in MHR, “ α ” determinant and immunoreactive region were higher in genotype C too, but no statistical significance was attained (4.7% vs 1.7%, $\chi^2=2.96$; 3.6% vs 2.9%, $\chi^2=0.25$; 4.1% vs 2.3%, $\chi^2=3.59$, all $P>0.05$). **Conclusion** Mutations in PreS-S region, especially in immunopeptide, might change the virus' immunogenicity leading to escape from immune response and cause OBI with HBsAb positive.

Keywords: occult hepatitis B virus infection(OBI); preS-S region; mutation

隐匿性乙型肝炎病毒感染(occult HBV infection, OBI)是一种特殊的乙肝感染形式, 其基本特征为血清 HBsAg 阴性但肝细胞中 HBV DNA 阳

性, 通常血清中 HBV DNA 滴度 ≤ 200 IU/ml^[1]。OBI 发生于输血、器官移植、血液透析、慢性肝炎、不明原因的肝癌和重型肝炎患者, 以及 HIV/HCV

* 作者简介: 郭 燕(1980—), 女, 博士研究生, 研究方向: 血液输血安全, E-mail: 20524988@qq.com。

通讯作者: 巩晗实(1985—), 女, 博士研究生, 研究方向: 血液输血安全, E-mail: hanshi-gong@163.com。

等联合感染的患者中^[2],是目前乙肝临床和流行病学研究需要面对的重大难题之一。荟萃分析结果显示,HBsAb 阳性,HBsAg 阴性的 CHB 感染率可占隐匿性感染的 16.9%^[3]。HBsAb 一般认为是乙肝痊愈或有保护性的抗体,而对于部分 OBI 患者,机体已经出现 HBsAg 血清学转换,HBsAb 却未起到保护作用,这一矛盾现象的生物学机制仍不完全清楚。本研究对陕西省血液中心保存的无偿献血者 HBsAb 阳性 OBI 血清样本 PreS-S 区基因序列进行了深入的分析,力图在基因水平探讨该特殊感染模式发生机制,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 陕西省血液中心保存的 2015 年 1 月~12 月期间 38 份 HBsAb 阳性 OBI 血清样本作为研究对象。

1.2 仪器与试剂 QIAGEN QIAamp[®] MinElute[®] Virus Spin Kit(批号:154032453),罗氏公司 Expand High Fidelity PCR system(批号:11732641001),QIAquick[®] Gel Extraction Kit(批号:28706),美国 ABI 公司 PE9600 PCR 扩增仪,美国 ALPHA 公司 ALPHA 凝胶成像系统,美国 Applied Biosystems 公司测序仪(型号:3130XL),PCR 引物合成及基因序列测定均由金唯智生物科技有限公司完成。

1.3 实验方法

1.3.1 核酸提取:HBsAg- /HBV DNA+ /HBsAb+ 标本均使用 QIAGEN QIAamp[®] MinElute[®] Virus Spin Kit 进行 DNA 提取,实验方法参照说明书,最终以 35 μ l ddH₂O 溶解 DNA。

1.3.2 HBV DNA 的 PreS-S 区 PCR 扩增与序列测定:使用罗氏公司 Expand High Fidelity PCR system 进行巢式 PCR 扩增,该试剂盒包含 Taq 酶及具有校正活性的高保真聚合酶混合物,保证扩增效率的同时兼顾了保真性。PCR 引物以及扩增条件参考容莹等^[4]人的研究,分别为:第一轮扩增引物 P1: 5'-ACA TAC TCT TTG GAA GGC KG-3'(nt2 750-2 769);R1: 5'-CGT CAG CAA ACA CTT GGC -3'(nt1 192-1175);第二轮扩增引物 P2: 5'-GCC TCA TTT TGY GGG TCA -3'(nt2 802-2819);R2: 5'-AGC AAA RCC CAA AAG ACC -3'(nt1 019-1002)。第一轮 PCR 反应体系为:10 \times PCR Buffer 2.5 μ l,3.5 U/L rTaq 酶 0.4 μ l,10 mmol/L dNTP 0.5 μ l,10 μ mol/L 上下游引物各 1 μ l,DNA 模板 10 μ l,补充双蒸水至 25 μ l。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 45 s,50 $^{\circ}$ C 45s,72 $^{\circ}$ C 2 min,38 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。第 2 轮 PCR 反应体系同上,但模板为第 1 轮 PCR 反应产物 5 μ l,

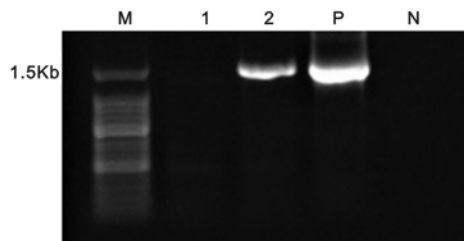
反应条件为:95 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 40 s,50 $^{\circ}$ C 40s,72 $^{\circ}$ C 2 min,37 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。第 2 轮 PCR 产物经琼脂糖凝胶纯化回收后,送至金唯智生物科技有限公司采用 Sanger 测序法进行双向测序。

1.3.3 基因型、血清型及基因序列分析:在 GenBank 中下载文献[4,5]中的 A-H 基因型代表株基因序列作为参照,使用 MegAlign 软件对 OHBV PreS-S 区绘制系统进化树,确定基因型,同时将参照序列和测序结果翻译为氨基酸,分析野毒株和变异株突变情况。HBV 血清型通过比较 S 区第 122,160 位氨基酸确定。

1.4 统计学分析 应用 SPSS18.0 统计分析软件处理数据,率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 HBsAb 阳性 OBI 血清样本 PreS-S 区 PCR 扩增结果 扩增片段为 1 433bp (nt2 802-01 019),理论上涵盖了完整的 PreS-S 区,38 份 HBsAb 阳性 OBI 样品,成功扩增出 PreS-S 区片段者 11 份,见图 1。



M:DNA Marker;1,2:OBI 样品;P:阳性对照;N:阴性对照

图1 OHBV PreS-S 区扩增产物凝胶电泳

2.2 基因型和血清型分析 3 份 OBI 样品因 PCR 产物浓度太低测序失败,其余 8 份测序成功,其中 B 基因型 3 份,C 基因型 5 份,未发现 A,D,E,F,G,H 等基因型(见图 2)。本地献血者 OBI 毒株存在 adw 和 adr 两种血清型,B 基因型全部为血清型 adw,C 基因型 1/5 为血清型 adw,4/5 为血清型 adr。

2.3 MHR 和“ α ”抗原决定簇氨基酸变异情况 S 蛋白 MHR 以及“ α ”抗原决定簇的显著变异是 OBI 发生的重要机制,本实验中,OHBV 的 MHR 区变异率高于野毒株,差异有统计学意义(3.6% vs 0.6%, $\chi^2 = 13.25$, $P < 0.01$),“ α ”抗原决定簇变异率高于野毒株,差异无统计学意义(3.8% vs 1.2%, $\chi^2 = 3.26$, $P > 0.05$)。OHBV C 基因型毒株 MHR 及“ α ”抗原决定簇的突变率均高于 B 基因型,差异均无统计学意义(分别为 4.7% vs 1.7%, $\chi^2 = 2.96$; 3.6% vs 2.9%, $\chi^2 = 0.25$,均 $P > 0.05$)。在 5 份样品中发现了 6 种“ α ”抗原决定簇

内变异(见表1),分别是 I126T, Q129R, M133T, F134I, D144E, G145K。其中,两份样本发生

I126T 突变,1份发生 M133T, G145K 联合突变,1份发生 I126T, D144E 联合突变。

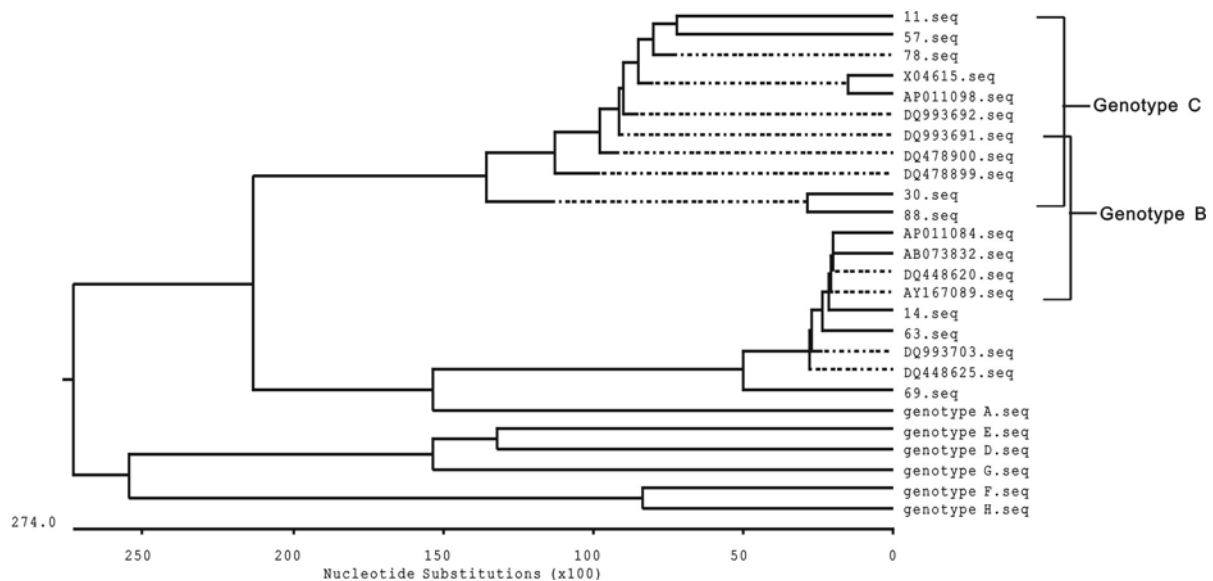


图2 OHBV 基因型

2.4 PreS-S 区 B 细胞, 细胞毒性 T 细胞(CTL), Th 细胞表位氨基酸变异情况 将 OHBV PreS-S 区 B 细胞, CTL, Th 细胞表位的氨基酸序列与对应基因型野毒株进行比较, 分析变异情况(具体见表1), 免疫表位参考文献[4, 6]。OHBV PreS-S 区以及 PreS-S 区 B-, Th-, CTL 细胞表位氨基酸变异率高于野毒株, 差异有统计学意义(2.6% vs 0.8%, $\chi^2 = 40.23$; 3.2% vs 0.3%, $\chi^2 = 52.13$, 均 $P < 0.01$)。C 基因型 PreS-S 区氨基酸变异率高于 B 基因型, 差异有统计学意义(3.5% vs 1.2%, $\chi^2 = 15.98$, $P < 0.01$); 而上述免疫反应区氨基酸变异率虽高于 B 基因型, 但未见统计学意义(4.1% vs 2.3%, $\chi^2 = 3.59$, $P > 0.05$)。OHBV PreS-S 免疫反应区氨基酸变异率高于非免疫区, 差异无统计学意义(3.4% vs 2.7%, $\chi^2 = 1.30$, $P > 0.05$)。C 基因型 OHBV 除了在 CTL 表位 7, 10 高度保守, 其他免疫表位均出现变异; B 基因型在 B 细胞表位 1, 4, 6, CTL 表位 1, 5, 7, 9 高度保守, 其他免疫表位均出现变异。C 基因型的 B 细胞表位 4, CTL 表位 6 和 9, Th 表位 3 变异率较高, 达到 7.0% ~ 14.3%; B 基因型 CTL 表位 2 和 10 变异率最高, 均为 6.7%。C 基因型 Pre-S1 变异位点 D27E, G35R, N39K, P41Q, P47H, Q105K, S115T; Pre-S2 变异位点 M1I, T6K, A11T, D14N, S44L, R48M 均同时出现在两个免疫表位上; B 基因型 Pre-S1 变异位点 S101T, Pre-S2 变异位点 Q2K, T6P, Q10K, L46S 同时出现在两个免疫表位, Pre-S1 变异位点 L45F 同时出现在三个免疫表位。

3 讨论 乙肝病毒感染是世界性的公共卫生问题, 对献血者开展严格的 HBsAg 和 HBV DNA 筛查是防止乙肝病毒传播的关键途径之一。然而, 由于我国采供血机构只针对 HBsAg 进行 ELISA 检测, 难以发现 OBI, 而高灵敏度的核酸检测也存在漏检的可能, OBI 已成为输血安全面临的重大问题, OBI 相关领域也一直是医学工作者研究的热点。本实验对 HBsAb 阳性的 OBI 形成机制进行了初步探讨, 结论如下: HBsAg(S 蛋白, S 基因编码)含有多个抗原表位, 可诱导机体产生保护性免疫。对欧洲 D 基因型 HBV 研究发现, S 蛋白 MHR 区及“ α ”抗原决定簇显著变异与 OBI 发生相关。“ α ”决定簇是 S 蛋白免疫优势区, 位于 125 ~ 147aa, 该区域氨基酸变异可能改变 HBsAg 的抗原性和构象, 导致 HBV 免疫逃逸或血清学检测失败^[1]。本研究发现 HBsAb 阳性 OBI 毒株 MHR 区氨基酸变异率高于野毒株, “ α ”抗原决定簇虽未见最经典的 G145R 变异, 但发现了 G145K, 以及 I126T, M133T, D144E, Q129R, F134I 突变。D144E 可降低 HBV 抗原性^[7]; Q129R 阻碍了 S 蛋白的分泌^[8]; M133T 突变可重建新的糖基化位点 131NST133, 部分补偿其他位点如 G145R 突变导致的病毒分泌性降低^[9]; G145K 虽然在乙肝临床病例可见, 但出现的频率远低于 G145R, OBI 患者中更是鲜有报道, I126T, F134I 相关报道也不多见, 这些突变在 OBI 形成中的生物学功能和意义, 还需要进一步的研究。

表 1

OHBV 在 PreS-S 免疫反应区的氨基酸突变情况

免疫表位	HBV 野毒株 免疫表位序列	野毒株各免疫 表位所在位置	C 基因型 OHBV 变异位点	B 基因型 OHBV 变异位点
“α”决定簇	C 型: TIPAQGTSMFSCCCTKPS DGNC B 型: TTPAQGTSMFSCCCTKPT DGNC	S nt 125~147	I126T×2 M133T D144E G145K	Q129R F134I
MHR	C 型: CPLLPGTSTTSTGPCKTCT IPAQGTSMFSCCCTKPSDGNC CIPISSWAFARFLWEW B 型: CPLIPGSSTTSTGPCKTCT TPAQGTSMFSCCCTKPTDGNC TCIPISSWAFAYLWEW	S nt 107~165	P111L S114A S117N S117I T118R × 2 T118V P120Q I126T× 2 M133T D144E G145K R160K	L109Q Q129R F134I
B 细胞表位	C 型 1: DHQLDPAFG B 型 1: DHQLDPAFK	Pre-S1 nt27~35	D27E G35R	NO
	C 型 2: NSNPDWDFN B 型 2: NSENPDWDLN	Pre-S1 nt37~46	N39K P41Q	L45F
	C 型 3: PDWDFNPNKDHWEPE B 型 3: PDWDLNPHKDNWPD	Pre-S1 nt41~54	P47H E54K	L45F
	C 型 4: GGLLGWS B 型 4: GGLLGWS	Pre-S1 nt72~78	G73S×4 L75I	NO
	C 型 5: PPASTNRQSGRQP B 型 5: PPASTNRQSGRQP	Pre-S1 nt93~105	Q105K	S101T
	C 型 6: PISPPLRDSHPQ B 型 6: PLSPPLRDTHPQ	Pre-S1nt107~118	S115T Q118H	NO
	C 型 7: MQWNSTTFHQA LLDPRVRGLYFPAGG B 型 7: MQWNSTTFHQT LQDPRVRALYFPAGG	Pre-S2 nt1~26	M1I T6K A11T D14N R16K	Q2K T6P Q10K V17I
CTL 表位	C 型 1: PLGFFPDH B 型 1: PLGFFPDH	Pre-S1 nt21~28	D27E	NO
	C 型 2: MQWNSTTFHQALLDP B 型 2: MQWNSTTFHQTLDQP	Pre-S2 nt1~15	M1I T6K A11T D14N S44L R48M	Q2K T6P Q10K L46S
	C 型 3: SIFSRTGDPA B 型 3: SILSKTGDPV	Pre-S2 nt44~53		
	C 型 4: VLQAGFLL B 型 4: VLQAGFLL	S nt 14~22	V14G	V14G
	C 型 5: FFLLTRILTI B 型 5: FFLTKILTI	S nt 19~28	R24K	NO
	C 型 6: FLGGAPTCP B 型 6: FLGGTPVCL	S nt 41~49	A45T T47A T47K×2 NO	G44E
	C 型 7: LLCLIFLLV B 型 7: LLCLIFLLV	S nt 88~96		NO
	C 型 8: LLDYQGMLPV B 型 8: LLDYQGMLPV	S nt 97~106	L98R L104F	P105R
	C 型 9: WLSLLVPFV B 型 9: WLSLLVPFV	S nt 172~180	S174N × 2 L175S×2 V177A×2 NO	NO
	C 型 10: NILSPFLPLL B 型 10: NILSPFMPLL	S nt 207~216		P211L M213I
Th 细胞表位	C 型 1: QLDPAFGANSNPDWDFN PN B 型 1: QLDPAFKANSENPDWDLN PH	Pre-S1 nt29~48	G35R N39K P41Q P47H	L45F
	C 型 2: PPASTNRQSGRQPTISPP LRDSHP B 型 2: PPASTNRQSGRQPTPLSPP LRDTHP	Pre-S1 nt93~117	Q105K S115T	S101T
	C 型 3: SGTVPNPVPTTASPISSIFSR B 型 3: SGTVSPAQNTVSAISSILSK	Pre-S2 nt29~48	G30E T38I I41T×3 S44L R48M	Q36L L46S

前 S 蛋白与病毒复制相关并且富含 B/T 细胞抗原表位, PreS 和 S 基因变异可能引起免疫靶抗原改变, 出现免疫逃避; 可能影响 MHC-II 限制的 Th 细胞对抗原的识别^[10]; 而 CTL 表位突变可能导致特异性 CTL 对靶抗原的有效识别或应答减弱, 病毒得以逃避机体免疫监视, 在体内保持低水平持续复制^[11]。本实验中, PreS-S 区 B-, Th-, CTL 细胞表位氨基酸变异率显著高于野毒株, Pre-S1, Pre-S2 某些变异位点同时发生在两个甚至三个不同的细胞表位, 重叠的免疫识别表位发生变异可能会进一步减弱体液或细胞免疫。

本实验中 C 基因型 MHR 区、“ α ”抗原决定簇、PreS-S 免疫反应区突变率均高于 B 基因型, 但无统计学意义。目前普遍认为 C 基因型在病毒复制水平上显著高于 B 基因型, 且更易引起慢性肝炎、肝硬化和较重的肝损伤, 然而, C 基因型是否与 OBI 感染形成相关, 尚无定论^[12, 13], 需要在更大样本量基础上进一步研究。此外, 本实验中 PreS-S 区扩增成功率较低, 仅 28.9% (11/38)。究其原因, 可能因为 OHBV 与野毒株相比, 病毒载量较低, 扩增片段相对较长, 加之 Nested-PCR 技术并不能达到 100% 检出率所致。

总之, OBI 的形成机制尚不明确, 针对 HBsAb 阳性 OBI 的研究也不多见, 现有研究提示, HBsAb 阳性 OBI 可能与疫苗接种有关^[5]。本研究发现 OHBV PreS-S 区免疫表位氨基酸发生显著变异, 有可能改变了病毒的免疫原性, 造成免疫逃逸, 导致 OBI 发生, 而突变的具体生物学功能和意义还需要更深入的研究, 以期能够进一步阐明 OBI 感染机制。

参考文献:

- [1] Zhu HL, Li X, Li J, et al. Genetic variation of occult hepatitis B virus infection[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(13): 3531-3546.
- [2] 景媛媛, 李锦, 段勇, 等. 青年献血人群 HBV/OBI 感染者血清中 IL-10 表达水平的分析[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(5): 107-110.
Jing YY, Li J, Duan Y, et al. Analysis of IL-10 in serum of blood donors with OBI/HBV infection among young adults[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(5): 107-110.
- [3] 张振华, 赵西平, 夏剑波, 等. 隐匿性乙型肝炎病毒感染者血清表面抗体性质鉴定[J]. 中华肝脏病杂志, 2011, 19(7): 506-510.
Zhang ZH, Zhao XP, Xia JB, et al. Characterization of HBsAbs in occult hepatitis B virus infection[J]. Chin J Hepatol, 2011, 19(7): 506-510.
- [4] 容莹, 郑欣, 叶贤林, 等. 无偿献血者隐匿性乙型肝炎病毒 Pre-S/S 区变异的研究[J]. 中国输血杂志, 2011, 24(7): 565-571.
Rong Y, Zheng X, Ye XL, et al. Study on Pre-S/S gene mutation of occult hepatitis B virus from blood donors[J]. Chin J Blood Transfusion, 2011, 24(7): 565-571.
- [5] 何水珍, 苏成豪, 沈理通, 等. 厦门市自然人群中乙型肝炎病毒隐匿性感染状况调查[J]. 中华预防医学杂志, 2015, 49(2): 132-136.
He SZ, Su CH, Shen LT, et al. Occult hepatitis B virus infection in normal population, Xiamen[J]. Chin J Prev Med, 2015, 49(2): 132-136.
- [6] Lin YM, Jow GM, Mu SC, et al. Naturally occurring hepatitis B virus B-cell and T-cell epitope mutants in hepatitis B vaccinated children[J]. Scientific World Journal, 2013(2013): 571875.
- [7] Kim KH, Chang HY, Park JY, et al. Spontaneous HBsAg loss in Korean patients: relevance of viral genotypes, S gene mutations, and covalently closed circular DNA copy numbers[J]. Clin Mol Hepatol, 2014, 20(3): 251-260.
- [8] Huang CH, Yuan Q, Chen PJ, et al. Influence of mutations in hepatitis B virus surface protein on viral antigenicity and phenotype in occult HBV strains from blood donors[J]. J Hepatol, 2012, 57(4): 720-729.
- [9] Ito K, Qin Y, Guarnieri M, et al. Impairment of hepatitis B virus virion secretion by single-amino-acid substitutions in the small envelope protein and rescue by a novel glycosylation site[J]. J Virol, 2010, 84(24): 12850-12861.
- [10] Bauer T, Weinberger K, Jilg W, et al. Variants of two major T cell epitopes within the hepatitis B surface antigen are not recognized by specific T helper cells of vaccinated individuals[J]. Hepatology, 2002, 35(2): 455-465.
- [11] Khakoo SI, Ling R, Scott I, et al. Cytotoxic T lymphocyte responses and CTL epitope escape mutation in HBsAg, anti-HBe positive individuals[J]. Gut, 2000, 47(1): 137-143.
- [12] Yuan Q, Ou SH, Chen CR, et al. Molecular characteristics of occult hepatitis B virus from blood donors in southeast China[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(2): 357-362.
- [13] Chamni N, Louisirirotchakul S, Oota S, et al. Genetic characterization and genotyping of hepatitis B virus (HBV) isolates from donors with an occult HBV infection[J]. Vox Sang, 2014, 107(4): 324-332.

收稿日期: 2017-06-08

修回日期: 2017-06-14