

乙型肝炎患者 3 种血清标志物模式 HBV DNA 含量比较

汪文明¹, 简芳², 杨夕¹, 周靖¹, 钟邦原¹ (1. 重庆市南川区人民医院检验科 408400; 2. 重庆市南川区宏仁医院急诊科 408400)

【摘要】 目的 比较乙型肝炎患者 3 种血清标志物模式 HBV DNA 含量。**方法** 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测乙型肝炎病毒 (HBV) 血清标志物, 同份血清标本采用荧光定量 PCR 法检测 HBV DNA。**结果** 乙型肝炎患者血清学标志物模式均表现出一定的 HBV DNA 水平, 尤以模式 (HBsAg、HBeAg、抗-HBc 阳性) HBV DNA 含量最高, 为 $10^{7.16\pm 1.79}$, 且明显高于模式 (HBsAg、抗-HBc 阳性) ($P < 0.01$) 和模式 (HBsAg 阳性、抗-HBe、抗-HBc 阳性) ($P < 0.05$)。**结论** 应用定量 PCR 法检测 HBV DNA 含量对反映 HBV 复制情况及其传染性强弱优于 HBV 血清学检测指标, 对乙型肝炎患者决定是否接受治疗以及疗效监控也优于血清学标志物。

【关键词】 乙型肝炎病毒; 血清标志物; 酶联免疫吸附试验; 聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.19.029

中图分类号: R512.62

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2010)19-2100-02

乙型肝炎是由乙型肝炎病毒 (HBV) 感染所致, 临床上表现多样化, 常发展为慢性肝炎和肝硬化, 也可呈慢性携带状态, 少数病例可发展为原发性肝癌^[1]。为临床有效治疗乙型肝炎, 控制乙型肝炎病情的发展提供可靠的实验依据就显得尤为重要。目前, HBV 感染的诊断主要依赖于血清特异性抗原抗体和 HBV DNA 的检测^[2]。作者采用荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 方法检测乙型肝炎患者血清中 HBV DNA, 以比较乙型肝炎患者 3 种血清学标志物模式下 HBV DNA 含量及其意义, 报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2004 年 1 月至 2005 年 1 月来本院门诊及住院确诊的乙肝患者 493 例, 其中住院 216 例, 门诊 277 例, 男 295 例, 女 198 例。年龄 12~64 岁。正常血清 21 例 (HBV 血清标志物 5 项均为阴性, 肝功能正常)。

1.2 仪器 FX990 PCR 荧光定量检测仪购自上海复兴实业股份有限公司, TC-25/H 基因扩增仪购自杭州大和热磁电子有限公司, TGL16C 台式离心机, 酶标仪购自 BIORAD 美国伯乐公司。

1.3 试剂 ELISA 试剂盒购自上海科华实业技术生物有限公司, 乙型肝炎病毒 PCR 荧光定量试剂盒购自上海复兴实业

股份有限公司, 该试剂对 HBV DNA 有效定量范围 $4.2 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^8$ copy/mL, 超出定量范围的样品采用稀释或浓缩后重新测定。

1.4 标本采集 用一次性的针筒抽取患者静脉血约 3 mL。将 2 mL 的静脉血置于试管中用于 HBV 血清标志物检查; 另 1 mL 置于灭菌的一次性试管中, 室温自然凝固或 $800 \sim 1\ 600$ r/min 离心 20 min, 取出离出的血清 0.2 mL 左右送检 HBV DNA。当天未能检测血清标本置于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 冰箱保存。

1.5 操作方法 HBV 血清标志物采用酶联免疫吸附实验 (ELISA 法) 检测, 同份血清标本采用荧光定量 PCR 法检测 HBV DNA。操作严格按试剂盒说明书要求进行。

1.6 统计学方法 HBV DNA 含量以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 *t* 检验。

2 结果

2.1 HBV DNA 标准曲线 每次试验设立 5 个 HBV DNA 标准品系列浓度, 依次为 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 copy/mL, 严格按照说明书要求建立 HBV DNA 标准曲线。其检测的灵敏度为 10^3 copy/mL, 大于该浓度为阳性结果。

2.2 结果 493 例乙型肝炎患者检出 HBV DNA 阳性 448 例, 阳性率为 90.9%, 详细结果见表 1。

表 1 乙型肝炎患者 3 种血清学标志物模式 HBV DNA 含量

模式	HBV 标志物类型					n	HBV DNA			
	HBsAg	抗-HBs	HBeAg	抗-HBe	抗-HBc		阳性数 (%)	含量 (copy/mL)	平均拷贝数 (mL ⁻¹)	测量范围 (copy/mL)
1	+	-	-	-	+	71	56 (78.9)	6.01 ± 1.48	6.08×10^7	$1.42 \times 10^3 \sim 1.52 \times 10^9$
2	+	-	-	+	+	239	214 (89.5)	$5.53 \pm 1.94^\#$	2.68×10^8	$1.34 \times 10^3 \sim 7.39 \times 10^9$
3	+	-	+	-	+	183	178 (97.3)	$7.16 \pm 1.79^*$	3.55×10^8	$1.30 \times 10^4 \sim 8.68 \times 10^{10}$

注: HBV DNA 含量以对数表示, 模式 2、3 与模式 1 比较, $^\# P < 0.01$, 模式 2 与模式 3 比较, $^* P < 0.05$ 。

3 讨论

本文结果显示, 乙型肝炎患者 3 种血清学标志物模式均表现出一定的 HBV DNA 水平, 尤以模式 3 HBV DNA 含量最高, 为 $10^{7.16\pm 1.79}$, 且明显高于模式 1 ($P < 0.01$) 和模式 2 ($P < 0.05$), 表明 HBeAg 阳性的乙型肝炎患者 HBV DNA 处于高水平复制。随着 HBeAg 的转阴, 抗-HBe 的出现 HBV DNA

含量也有所下降, 本文中 HBsAg 阳性、抗-HBe、抗-HBc 阳性组的 HBV DNA 含量明显低于模式 3 ($P < 0.05$), 但其含量仍为 $10^{5.53\pm 1.94}$ 。表明 HBeAg 向抗-HBe 转换时, 虽然 HBV DNA 含量有所下降, 但不能说明 HBV 停止复制, 而只是 HBV 复制水平低而已。因此 HBV DNA 含量对反映 HBV 感染情况和监测乙型肝炎病毒优于 HBV 血清学检测指标。

HBsAg、HBeAg、抗-HBc 阳性俗称“大三阳”，是具有高传染性血清标志物模式，其 HBV DNA 含量 ($10^{7.16 \pm 1.79}$) 较高。而 HBsAg、抗-HBe、抗-HBc 阳性俗称“小三阳”，是 e 系统转化后的模式，其传染性也较之前者弱，HBV DNA 含量 ($10^{5.53 \pm 1.94}$) 也明显低于前者 ($P < 0.05$)。HBsAg、抗-HBc 阳性组是 HBeAg 消失后，抗-HBe 尚未出现前的模式，其阳性往往表示患者为急性乙型肝炎或乙型肝炎携带者，传染性较弱。本组 HBV DNA 含量低于模式 3 ($P < 0.01$) 和模式 2 ($P < 0.01$)，但有个别阳性 HBV DNA 含量较高，达 10^9 copy/mL。表明 HBeAg 是与 HBV DNA 含量相关性较好的一个指标。因此，作者认为应用定量 PCR 法检测 HBV DNA 含量对反映 HBV 复制以及传染性强弱的情况也优于 HBV 血清学检测指标，对用于临床治疗方案选择和疗效监控将有较高的应用价值。

HBV 是由外壳 (HBsAg) 和核心组成的 DNA 病毒，其核心由 DNA、DNA 多聚酶、抗-HBc 和抗-HBe 组成^[3]。标志 HBV 感染、病毒复制一般有 HBV DNA-P(乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸聚合酶)，HBeAg、HBeAg，但这些标志物是病毒存在和复制的间接指标，而且受病毒基因型变异或“窗口期”或患者免疫状态等因素影响，且用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测乙型肝炎病毒表面抗原又受多种因素的影响^[4-6]。而 PCR 方法则检测 HBV DNA 含量，更能准确灵敏地反映 HBV 的感染和治疗恢复情况^[7]。因而 HBV DNA 含量是乙型肝炎患者体内

病毒复制活动情况的最直接证据，也是其是否具有传染性的有效证据，对于决定是否接受治疗以及采取何种治疗方案有及其重要参考价值。

参考文献

- [1] 倪语星, 洪秀华, 姜昌斌. 现代病原学检验与临床实践 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1998: 143-149.
- [2] 郑志红, 张立伟, 孙睿, 等. 聚合酶链反应凝胶成像技术检测乙型肝炎病毒 [J]. 中华医学检验杂志, 1999, 22(3): 139-141.
- [3] 陈灏珠. 实用内科学 [M]. 10 版. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 263-276.
- [4] Kaneko S. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by polymerase chain. Application for clinical diagnosis [J]. Gastroenterology, 1990, 99: 799.
- [5] 彭文伟. 传染病学 [M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 14-30.
- [6] 王颖. 酶联免疫吸附试验检测乙型肝炎病毒表面抗原的影响因素 [J]. 检验医学与临床, 2009, 6(1): 58.
- [7] 程钢, 何蕴韶, 周新宇. 荧光定量聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒 [J]. 中华医学检验杂志, 1999, 22(3): 135-138.

(收稿日期: 2010-04-10)

临床研究

102 例丙型肝炎病毒基因分型结果分析

黄永建, 刘剑荣, 夏洪娇, 李凤中, 杨 剑 (江西省萍乡市人民医院 337055)

【摘要】 目的 分析了解萍乡地区慢性丙型肝炎患者的丙型肝炎病毒 (HCV) 基因分型情况, 为 HCV 诊断和治疗提供有力的依据。方法 利用门诊及住院患者血清 HCV 抗体阳性标本, 经荧光定量 PCR 检测 HCV RNA 阳性的 102 例标本用基因芯片进行不同基因分型检测。结果 检测 HCV 感染标本 102 例, 共检出 7 种基因亚型, 分别为 1b、6 型、2a、1b+2a、1b+3a、3a 和 3b, 其中 1b 占 72.6%, 6 型占 8.8%, 2a 占 7.8%, 1b+2a 占 5.9%, 1b+3a 占 2.9%, 3a 占 1.0%, 3b 占 1.0%。结论 萍乡地区 HCV 基因型主要为 1b 与中国南方地区 HCV 基因型分布比较一致。按照年龄分组 20 岁以下 4 例, 占 3.9%, 20~30 岁 33 例, 占 32.4%, 30~40 岁 39 例, 占 38.2%, 40~50 岁 11 例, 占 10.8%, 50~60 岁 4 例, 占 3.9%, 60 岁以上 11 例, 占 10.8%。青壮年和有吸毒史、外伤手术史、输注血液制品史的人群阳性率较高。

【关键词】 丙型肝炎病毒; 基因芯片; 基因分型

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2010.19.030

中图分类号: R512.63

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2010)19-2101-03

丙型肝炎病毒是一种广泛传播的疾病, 是导致慢性病毒性肝炎、肝硬化、肝细胞癌的主要病因之一, 而这些病变的形成与其病原丙型肝炎病毒 (HCV) 的某些重要生物学特性有关。我国感染丙型肝炎病毒及新发患者数众多。大部分 HCV 患者会逐步演变为慢性感染, 并根据病程轻重发展为肝硬化或肝癌。HCV 病毒基因有较强的变异性, 变异位点可以发生在基因组的各个区域, 根据变异位点的不同将 HCV 分为不同型别。由于 HCV 基因型别不仅与疾病严重性存在相关性, 而且与抗病毒治疗和肝细胞癌的发生也密切相关。本研究拟通过分析部分萍乡地区的慢性丙型肝炎患者体内 HCV 病毒基因分型情况, 为萍乡地区丙型肝炎的临床诊断和疾病预防提供一定实验依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本院 2005~2009 年门诊及住院患者血清 HCV 抗体阳性标本, 荧光定量 PCR 检测 HCV RNA 阳性的 102 例标本 (其中男 77 例, 女 25 例, 年龄 8~81 岁) 进行基因分型检测。阴性对照为 10 例健康体检者血清。

1.2 仪器 ABI7300 型全自动 PCR 扩增仪, 美国 1285REL # 6 生物安全柜, 日本三洋 VIP SERIES -86 °C 超低温冰箱。

1.3 试剂 丙型肝炎病毒 HCV RNA 荧光定量检测试剂盒购于中山大学达安基因股份有限公司, 丙型肝炎病毒基因芯片检测技术由中科院上海微系统与信息技术研究所和瑞芯生物科技有限公司提供。

1.4 方法