

乙型肝炎病毒标志物及其 DNA 相关性及其联合检测临床价值

罗耀凌¹, 陈 峰², 池沛冬¹, 邝妙欢¹ (华南肿瘤学国家重点实验室, 中山大学肿瘤防治中心: 1. 检验科; 2. 病理科, 广州 510060)

【摘要】 目的 探讨乙型肝炎病毒(HBV)血清免疫标志物(HBV M)和 HBV DNA 含量的相关性及其两种指标联合检测的临床应用。**方法** 酶联免疫吸附试验检测 HBV M; 荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)检测 HBV DNA 含量。**结果** 乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)阳性的标本 HBV DNA 阳性率高, 分别为: I 组[HBsAg、HBeAg 和乙型肝炎核心抗体(抗-HBc)阳性], HBV DNA 阳性率 98.9%(181/183); IV 组(HBsAg 和 HBeAg 阳性), HBV DNA 阳性率 96.3%(26/27); VII 组[HBsAg、HBeAg、乙型肝炎 e 抗体(抗-HBe)和抗-HBc 阳性], HBV DNA 阳性率 100.0%(2/2); HBsAg 阳性、HBeAg 阴性, HBV DNA 阳性率也较高, 为 II 组(HBsAg、抗-HBe、抗-HBc 阳性) 60.4%(58/96); III 组(HBsAg、抗-HBc 阳性) 50%(10/20); HBeAg、HBsAg 阴性有一定的 HBV DNA 阳性率, 但阳性率低, 分别为: V 组(抗-HBs、抗-HBe、抗-HBc 阳性) 13.3%(2/15); VI 组(抗-HBs、抗-HBc 阳性) 8.3%(1/12); VIII 组(抗-HBs 阳性) 0(0/26); IX 组(HBV M 全阴性) 6.7%(1/15)。**结论** 血清 HBV DNA 水平与 HBV M 表现模式有关, 与 HBsAg、HBeAg 有良好的相关性, 而 HBV M 阴性的患者也可能有 HBV DNA 阳性, 因此 HBV M 和 HBV DNA 联合检测, 可有效提高乙型肝炎的检出率, 为临床提供 HBV 感染、复制及传染性判断以及指导治疗的实验室依据。

【关键词】 乙型肝炎病毒; 乙型肝炎病毒标志物; 荧光定量聚合酶链反应; 酶联免疫吸附试验

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.07.009 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)07-0788-03

Correlation of hepatitis B viral markers with HBV DNA and clinical value of combined detection LUO Yao-ling¹, CHEN Feng², CHI Pei-dong¹, KUANG Miao-huan¹ (State Key Laboratory of Oncology in South China; 1. Cancer Center, Sun Yat-sen University; 2. Department of Pathology, Guangzhou, Guangdong, 510060, China)

【Abstract】 Objective To investigate the correlation of hepatitis B virus (HBV) serum immune markers (HBV-M) with HBV DNA level and clinical applications of joint detection of two indicators. **Methods** Enzyme-linked immunosorbent adsorption method (ELISA) was used to detect HBV serum immunization markers, and fluorescence quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR) was used to test the content of HBV-DNA. **Results** The positive rate of HBV-DNA in the positive samples of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and e antigen (HBeAg) was high: I group (HBsAg, HBeAg and HBcAb positive), HBV-DNA positive rate of 98.9%(181/183); IV group (HBsAg and HBeAg positive), HBV-DNA positive rate of 96.3%(26/27); VII group (HBsAg, HBeAg, HBeAb and HBcAb positive), HBV-DNA positive rate of 100.0%(2/2); HBsAg positive, HBeAg negative, HBV-DNA positive rate was also higher for the group II (HBsAg, HBeAb, HBcAb positive) 60.4%(58/96); III group (HBsAg, HBcAb positive) 50%(10/20); HBeAg, HBsAg-negative had a positive rate of HBV-DNA, but the positive rate was low, namely: V group 13.3%(2/15); VI group 8.3%(1/12); VIII group 0(0/26); IX group 6.7%(1/15). **Conclusion** Serum HBV-DNA level is related with HBV M expression patterns and has a good correlation with HBsAg and HBeAg. The HBV-M-negative patients may have HBV-DNA positive. Therefore, the joint detection of HBV M and HBV DNA can effectively improve the detection rate of hepatitis B and provide the experimental basis for clinical infection and replication of HBV, infectivity judge and treatment guidance.

【Key words】 hepatitis B virus; HBV markers; fluorescence quantitative polymerase chain reaction; enzyme-linked immunosorbent adsorption method

乙型肝炎病毒(HBV)在全世界范围内广泛流行,是当今流行最广泛,危害最严重的病毒性肝炎之一。据世界卫生组织报道,全球约 20 亿人曾感染 HBV,其中 3.5 亿人为慢性感染者,我国属高流行区,一般人群乙型肝炎表面抗原(HBsAg)阳性率为 9.09%^[1]。乙型肝炎病毒血清学标志物(HBV M)检测仍作为目前临床诊断、治疗、分析和判断 HBV 感染者病程及传染性的重要指标之一^[2]。但是由于 HBV M 组合模式多样且复杂,这样导致临床上部分患者的 HBV 感染复制状况难以判断,甚至漏检。荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)在进行 HBV DNA 检测的同时,可以对其进行相对的量化,这使医务

工作者对于乙型肝炎患者体内的 HBV 存在、活动性、复制、传染性有更加直接、深刻的认识,亦更有利于临床 HBV 感染的诊断,治疗方案的制订及疗效判定。本文对 396 例标本血清通过酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 HBV M 和 FQ-PCR 法检测 HBV DNA,并对结果进行对比分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 396 例标本血清均取自 2010 年 7 月至 2011 年 4 月本院门诊及住院患者。其中男 284 例,女 112 例,年龄 5~79 岁,平均 49.3 岁,根据其 HBV M 不同模式分为 9 组,所有标本均为随机抽样。

1.2 仪器 TECAN Evolyzer 150-8 和 7900 型荧光定量 PCR 仪。

1.3 试剂

1.3.1 ELISA 法 试剂由上海科华生物工程股份有限公司提供。

1.3.2 FQ-PCR 法 DNA 提取试剂由天根生化科技(北京)有限公司(Tiangen)提供,FQ-PCR 试剂由宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa)提供。

1.4 方法

1.4.1 HBV M 的检测 采用 ELISA 法,操作及结果判断均严格按试剂盒说明书进行。

1.4.2 HBV DNA 定量检测 采用 FQ-PCR 法,采用 Tap-Man 探针,扩增条件为:95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,40 个循环。反应结束后,由电脑自动分析计算出定量结果。阳性判定标准为大于或等于 1.0×10^3 copy/mL,操作步骤以及结果判定均严格按照试剂盒说明书进行。

1.5 统计学处理 应用 SPSS18.0 软件分析,HBV DNA 阴性时不参加平均值统计,平均拷贝数采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

HBV M 和 HBV DNA 的检测结果见表 1。

表 1 不同模式 HBV M 与 HBV DNA 定量结果比较

组别	ELISA 阳性	<i>n</i>	HBV DNA 阳性	
			例数(%)	平均拷贝数(copy/mL)
I	HBsAg、HBeAg、抗-HBc	183	181(98.9)	4.63×10^6 ^{ab}
II	HBsAg、抗-HBe、抗-HBc	96	58(60.4)	2.53×10^4 ^c
III	HBsAg、抗-HBc	20	10(50.0)	2.11×10^3
IV	HBsAg、HBeAg	27	26(96.3)	4.58×10^5
V	抗-HBs、抗-HBe、抗-HBc	15	2(13.3)	1.56×10^3
VI	抗-HBs、抗-HBc	12	1(8.3)	1.31×10^3
VII	HBsAg、HBeAg、抗-HBe、抗-HBc	2	2(100.0)	2.13×10^4
VIII	抗-HBs	26	0(0.0)	0
IX	5 项全阴性	15	1(6.7)	1.25×10^3

注:与Ⅱ组比较,^a $P < 0.01$;与Ⅲ组比较,^b $P < 0.01$,^c $P < 0.05$ 。

3 讨 论

乙型肝炎是目前危害人民健康最严重的传染病之一。多年来,临床对乙型肝炎的诊断多依靠 HBV M 结果,ELISA 则是主要的检测手段,但 HBV M 结果反映机体感染 HBV 后的免疫状态,只提供 HBV 感染的间接依据,加之抗原、抗体蛋白的变性,窗口期的存在等等因素,因此已不是最为可靠的检测方法。而 FQ-PCR 采用实时荧光检测技术,通过实时捕捉反应体系在扩增过程中荧光信号的变化,利用荧光信号达到某一阈值时的循环次数与起始模板 DNA 量的对数值之间存在严格的线性关系,即可对起始模板进行定量,该法检测的是 HBV 本身,因此是反映 HBV 复制最直接、最可靠的证据。

I 组 HBV DNA 阳性率高达 98.9%(181/183),平均拷贝数为 4.63×10^6 copy/mL,明显高于其他组,说明这种 HBV M 模式阳性者具有很强的传染性。经统计学检验,I 组的拷贝数比Ⅱ组高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。说明这些患者具有较高的复制水平,是具有传染性的重要标志。而且 I 组和Ⅱ组血清 HBV DNA 载量不同,反映体内 HBV 复制的活跃程度不同,因而 HBV DNA 的含量变化与 HBV M 的变化基本一致^[3-4]。本组中有 2 例 HBsAg、HBeAg、抗-HBc 阳性,但 HBV DNA 结果为 0,主要与近年来一些抗病毒药物的应用,HBV 本身发生变异有关^[5];同时亦与检测方法和灵敏度有关,导致某些 HBsAg 阳性的乙型肝炎患者,HBV DNA 却呈现阴性结果。

Ⅱ组 HBV DNA 阳性率为 60.4%(58/96),平均拷贝数为 2.53×10^4 copy/mL。阳性率虽然小于 I 组,但该组患者仍然具有很高的病毒复制,传染性强,说明抗-HBe 阳性并不表示患

者体内没有病毒复制。此种情况可能是前 C 区变异,前 C 区产物的氨基端是非结构的信号肽,使后继的结构部分转移至内质网,形成 HBeAg 的前体蛋白(P₂₅),解脱信号肽和羧基端的一些残基后,形成相对分子质量不等的 HBeAg,而前 C 区变异则信号肽的解脱后只留 10 个残基的短肽,不产生 HBeAg,由于 HBeAg 与 HBcAg 有交叉免疫原性,因而 HBeAg 阴性,仍可引起宿主持续应答^[6],抗-HBe 阳性。因此,Ⅱ组患者也具有很强的病毒复制能力,有较强的传染性。Ⅲ组 HBV DNA 阳性率为 50%(10/20),平均拷贝数为 2.11×10^3 copy/mL,提示该组患者仍具有很强的病毒复制,传染性强,此情况可能为血清转换期或前 C 区突变。

HBV DNA 的水平经统计学检验,I 组与Ⅱ组($P < 0.01$),I 组与Ⅲ组($P < 0.01$),及Ⅱ组与Ⅲ组($P < 0.05$)相比差异均有统计学意义。从而可知 HBV DNA 的水平与 HBeAg 的存在显著的关系,与 HBsAg 也存在明显的关系。Ⅳ组 HBV DNA 阳性率高达 96.3%(26/27),平均拷贝数为 4.58×10^5 copy/mL。说明该组患者体内病毒复制能力很强,有很强的传染性。HBV DNA 与 HBeAg 存在明显正相关,提示病毒复制活跃,传染性强,这也同样说明 HBeAg 存在是 HBV 病毒复制活跃的标志^[7]。

V 组和Ⅵ组 HBV DNA 检出率分别为 13.3%(2/15)和 8.3%(1/12),平均拷贝数分别为 1.56×10^3 copy/mL 和 1.31×10^3 copy/mL,说明患者虽然有抗体,但仍有小部分患者存在 HBV DNA 复制,可能因为 ELISA 测定的敏感性低,使低浓度的 HBsAg 漏检或者患者免疫功能低下,不产生免疫应答或患者出现免疫耐受现象,ELISA 无法测定出相应的抗原、

抗体。

Ⅶ组 HBV DNA 的阳性检出率为 100%(2/2),平均拷贝数为 2.13×10^4 copy/mL,说明患者虽然出现了抗-HBs 阳性,但体内仍有病毒在复制。抗-HBs 阳性和 HBeAg 转阴并不意味着病毒的复制停止或减弱。有学者认为,此现象可能与 HBV DNA 前 C 区发生突变有关,出现“免疫逃避”或不同亚型的 HBV 重叠感染。

Ⅸ组 15 例患者仍有 1 例 HBV DNA 阳性,定量结果为 1.25×10^3 copy/mL,阳性率为 6.7%。国内外研究证明,HBV DNA 出现早于其他血清学标志物,故该例受检者可能处于感染早期^[8]。HBV M 全阴性的患者不能排除 HBV 的感染。因此 PCR 的高灵敏度可为早期诊断 HBV 感染提供依据,提示在临床上对 HBV M 均阴性者,应进一步进行 HBV DNA PCR 的检测,以确定有无 HBV 感染。Ⅷ组 26 例抗-HBs 阳性的血清无 1 例 HBV DNA 阳性,表明抗-HBs 阳性者提示体内血清中 HBV 已被清除。

从表 1 可以看出,多种血清学标志物模式都有一定的 HBV DNA 检出率,两者符合率高。由于 HBV DNA 阳性表示 HBV 在体内复制,那么仅以 HBV M 的检测结果作为判断 HBV 感染、传染性及 HBV 是否在体内复制有一定的局限性,因此同时进行 HBV M 及 HBV DNA 定量检测对临床 HBV 感染的诊断、指导治疗、疗效观察、传染性判断及预后具有非常重要的意义。

综上所述,FQ-PCR 定量检测 HBV DNA 客观地反映了 HBV 感染、复制及病程变化,修正或补充了对 ELISA 测定结果的解释,特别是在病毒感染早期,ELISA 不能检测到低滴度的病毒抗原时,FQ-PCR 即可检测到 HBV DNA 的复制,有利于乙型肝炎的早期诊断。对于干扰素等药物治疗的患者,测定治疗前后病毒核酸的拷贝数,有利于疗效观察及预后判断。为了临床更好判断 HBV 感染、复制及传染性,在选择 HBV M 检测的同时,应做 HBV DNA 的 PCR 定量检测^[9-10]。

(上接第 787 页)

古霉素金黄色葡萄球菌(VRSA)[J]. 中国感染控制杂志, 2003,2(1):78.

[3] 任南,文细毛,吴安华. 全国医院感染监控网对医院内金黄色葡萄球菌感染及耐药性监测报告[J]. 中国医学工程,2007,5(15):228.

[4] 李欣华,陈丽珠. 泌尿系感染肠球菌耐药性检测及分析[J]. 华北煤炭医学院学报,2001,7(3):129.

[5] Rhomberg PR, Jones RN; MYSTIC Program (USA) Study Group. Antimicrobial spectrum of activity for meropenem and nine broad spectrum antimicrobials: report from the MYSTIC Program (2002) in North America[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2003,47(1):365-372.

[6] Pfaller MA, Jones RN; MYSTIC Study Group (Europe). Antimicrobial susceptibility of inducible AmpC beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae from the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) Programme, Europe 1997-2000 [J]. Ont J Antimicrob A-

参考文献

[1] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学会. 慢性乙型肝炎防治指南[J]. 肝脏,2005,10(4):348-357.

[2] 中华医学会儿科学分会感染消化学组. 巨细胞病毒感染诊断方案[J]. 中华儿科杂志,1999,37(7):441.

[3] 尤平涛,王宁红. 乙肝两对半模式与乙肝 DNA 关系的探讨[J]. 医学动物防治,2006,22(9):680-682.

[4] 何印蕾. 实时荧光 PCR 检测乙肝病毒 DNA 的临床意义[J]. 实用医技杂志,2006,13(22):3954-3955.

[5] 刘传苗,张欣欣,张东升,等. 实时荧光聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒聚合酶基因变异[J]. 中华检验医学杂志, 2003,26(1):37.

[6] 骆抗先. 乙型肝炎——基础和临床[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2006:44-45.

[7] 中华医学会传染病与寄生虫病学会,肝病学会. 病毒性肝炎防治方案(试行)[J]. 中华传染病杂志,1995,13(4):214-227.

[8] Krogsgaard K, Mathiesen LR, Aldeshvile J, et al. Delta infection and hepatitis B virus replication in Danish Patients with fulminant hepatitis B[J]. Scand J Infect Dis, 1988,20(2):127-132.

[9] 谢建红,肖奇志,田芬,等. HBV 血清学标志物结合 HBV DNA 定量检测的临床意义[J]. 临床和实验医学杂志, 2011,10(3):192-193.

[10] 胡淑芬,梁嘉琪,高慧,等. 荧光定量聚合酶链反应定量检测乙型肝炎病毒-DNA 与酶联免疫吸附试验定性检测乙型肝炎病毒血清标志物的对比分析[J]. 实用医技杂志, 2010,17(11):1012-1014.

(收稿日期:2011-09-07)

gents,2002,19(5):383-388.

[7] Sader HS, Biedenbach DJ, Jones RN. Global patterns of susceptibility for 21 commonly utilized antimicrobial agents tested against 48, 440 Enterobacteriaceae in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001)[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2003,47(1):361-364.

[8] Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program[J]. Braz J Infect Dis, 2001,5(4):200-214.

[9] 马均宝, 欧志彬, 吴智刚, 等. 产超广谱内酰胺酶的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的耐药性监测分析[J]. 国际检验医学杂志,2007,28(4):304-306.

(收稿日期:2011-10-23)