

· 论 著 ·

乙型肝炎血清学标志物与 HBV DNA 的相关性分析

李 云, 夏正武, 瞿 良

(成都军区昆明总医院检验科, 昆明 650032)

摘要:目的 探讨乙型肝炎 HBV DNA 与乙型肝炎病毒血清标志物(HBV-M)之间的相关性。方法 将 400 例血清标本采用荧光定量聚合酶链式反应(FQ-PCR)检测 HBV DNA,并同时采用 ELISA 法检测 HBV-M,按照不同的 HBV-M 模式分组进行分析。结果 131 例 HBeAg 阳性标本中 HBV DNA 阳性率为 100.0%,与 HBeAg 阴性标本的阳性率比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);HBsAg 阳性标本和 HBsAg 阴性标本比较,HBV DNA 检测结果差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 HBV DNA 检测在各种模式的 HBV-M 阳性血清中检出率相差较大,HBeAg 和 HBsAg 阳性者 HBV DNA 阳性率较高。说明仅仅依靠 HBV-M 进行早期诊断以及判断患者是否具有传染性是不够的,同时检测 HBV DNA 和 HBV-M 有助于乙型肝炎的早期诊断、疗效观察和预后判断。

关键词:肝炎,乙型; 生物学标记; 聚合酶链式反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.04.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)04-0442-02

The relation of immune markers of hepatitis B virus patients and HBV DNA in serum

Li Yun, Xia Zhengwu, Qu Liang

(Department of Medical Laboratory, Kunming General Hospital of the PLA, Kunming, Yunnan 650032, China)

Abstract: Objective To investigate the relation of hepatitis B virus immune markers (HBV-M) in different models and HBV DNA in serum. **Methods** HBV-M and HBV DNA were detected in 400 cases of hepatitis B virus by ELISA and fluorescence quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR). **Results** The positive rate of HBV DNA was 100.0% in the group of HBeAg+. There was significant difference of it between the group HBeAg+ and HBeAg- ($P < 0.01$). The positive rate was also significantly different between the group HBsAg+ and HBsAg- ($P < 0.01$). **Conclusion** The positive rate of HBV DNA is various in the different immune markers of HBV models. It is very high in the group HBeAg+ and HBsAg+. To detect HBV-M and HBV DNA together is better for the early diagnosis of infection, therapy project choice and prognosis definition in hepatitis B virus patients.

Key words: hepatitis B; biological immune markers; polymerase chain reaction

实验室检测乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)标志物的技术手段较多,其中最常采用 ELISA 法检测乙型肝炎血清学标志物(HBV-M),它具有快速、价廉、简便的特点,可用于乙型肝炎的大批量筛查,但此方法只能定性分析,常导致临床诊断困难。荧光定量聚合酶链式反应(fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR)具有较高的特异性和灵敏度,可用于监测血清中乙型肝炎病毒核酸(HBV DNA)的复制情况,能区别诊断乙型肝炎的早期感染、现症感染、恢复期感染,也能对 HBV 的突变株进行诊断^[1-2]。不同的 HBV-M 模式提示不同的临床意义,HBV DNA 是判定 HBV 感染者病毒是否复制和当前有无传染性的主要指标,了解免疫学和分子生物学标志物间的关系对临床诊断和治疗很有价值^[3]。本研究采用 FQ-PCR 法对 400 例乙型肝炎患者血清标本进行了 HBV DNA 定量检测,同时进行 HBV-M 检测,并对结果进行比较分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象 400 例标本均为自本院 2007 年 1 月至 2008 年 12 月门诊和住院乙型肝炎患者的空腹血清,及时分离检验。其中男 214 例,女 186 例,年龄 18~72 岁,平均年龄(39.1±8.6)岁;均经临床及实验室检查排除甲、丙、丁、戊、庚型肝炎的重叠感染。

1.2 方法

1.2.1 HBV-DNA 定量检测 采用 FQ-PCR 法,实时、动态检测病毒载量。使用广州中山大学达安基因股份有限公司提供的 DAAN7600 型荧光定量 PCR 检测仪及配套试剂。检测范围为 $5 \times 10^2 \sim 5 \times 10^8$ copy/mL,操作人员为持有卫生部 PCR 实

验室上岗证的专业人员,实验室是通过卫生部 PCR 实验室认证的基因诊断实验室。采用碱裂解法提取血清 HBV DNA,加入到已配制好的 PCR 反应管中,将已加样的各反应管放入仪器反应槽内,按对应顺序设置标本、阴性对照、阳性对照、空白对照以及各梯度定量标准品。

1.2.2 HBV-M 检测 ELISA 法测定 HBV-M,试剂购自北京万泰生物药业股份有限公司,严格按试剂盒说明书操作。用 DYNEX(MRX)酶标仪读取和记录结果。

1.2.3 质量控制 FQ-PCR 法每次设阴性、阳性、空白对照,定量标准品放置 $10^4 \sim 10^7$ 4 个浓度级。室内质控采用购自卫生部临床检验中心的 HBV DNA 标准品。ELISA 法每次设阴性、阳性、空白对照,室内质控购自云南省临床检验中心。

1.3 统计学处理 采用 χ^2 检验进行组间 HBV DNA 阳性率显著性检验,采用两样本均数的 t 检验比较病毒拷贝数,阴性结果不纳入平均值的统计。

2 结果

400 例标本的 HBV-M 模式和 HBV DNA FQ-PCR 检测结果见表 1。血清学模式排序为:HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb。HBeAg(+)标本(第 1~2 组)HBV DNA 阳性率为 100.0%(131/131),与 HBeAg(-)标本(第 3~12 组)HBV DNA 阳性率 45.0%(121/269)比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),二者 HBV DNA 的平均含量差异也有统计学意义($P < 0.01$)。HBsAg(-)标本(第 1~5 组)HBV DNA 阳性率为 70.4%(250/355),与 HBsAg(+)标本(第 6~12 组)HBV DNA 阳性率 4.4%(2/45)比较,差异有统计学意义($P <$

0.01), 二者 HBV DNA 的平均含量差异也有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 1 血清 HBV-M 模式和 HBV DNA FQ-PCR 检测结果

组别	HBV-M 模式	n	HBV DNA		
			阳性例数(n)	阳性率(%)	平均病毒含量 (copy/mL)
1	+ - + - +	106	106	100.0	$(3.55 \pm 1.48) \times 10^7$
2	+ - + - -	25	25	100.0	$(2.33 \pm 1.18) \times 10^7$
3	+ - - + +	151	85	56.3	$(4.85 \pm 2.15) \times 10^5$
4	+ - - - +	65	31	47.7	$(3.21 \pm 1.22) \times 10^5$
5	+ - - - -	8	3	37.5	$(4.18 \pm 1.87) \times 10^5$
6	- + - + +	10	1	10.0	2.15×10^3
7	- + - - +	10	1	10.0	3.04×10^3
8	- + - + -	5	0	0.0	0.00
9	- + - - -	5	0	0.0	0.00
10	- - - + +	5	0	0.0	0.00
11	- - - - +	5	0	0.0	0.00
12	- - - - -	5	0	0.0	0.00
合计	-	400	252	63.0	-

- : 无数据。

3 讨论

HBV-M 定性检测是目前诊断乙型肝炎最常用的指标, 主要反映人体对 HBV 的免疫反应状态^[4-5], 由于 HBV 的表达和机体免疫反应的强弱受多种因素的影响, 因此反映患者体内病毒复制情况时只提供定性报告的信息有一定局限性。随着分子生物学的发展, 病毒感染的临床诊断技术已从定性检测发展到定量检测定量 PCR 技术检测 HBV DNA 的灵敏度和特异性不断提高, 能更直接、准确地反映患者体内 HBV 的复制水平, 可认为 PCR 法定量检测 HBV DNA 是诊断病毒是否复制的金标准^[6], 且在研究病毒感染量与临床病情的关系、评价和监测抗病毒药物疗效等方面具有重要指导作用。

本文 HBeAg 阳性的 355 例感染者中, HBV DNA 总阳性率为 70.4%, 由此可见 HBeAg 依然是诊断 HBV 感染最灵敏、最常用的血清学标志物^[3]。HBeAg 阳性的 131 例 HBV 感染者中, HBV DNA 阳性率为 100.0%, 平均 HBV DNA 拷贝大于 10^7 copy/mL, 说明 HBeAg 与 HBV DNA 具有非常高的相关性, 是判断 HBV 复制的良好指标, 但随着 HBeAg/HBeAb 的阳性转换, 并不是所有的感染者 HBV DNA 都随着转阴, 相当一部分 HBeAb 阳性的所谓小三阳患者 HBV DNA 持续阳性, 其病毒复制的原因可能是 HBV 前 C 区基因变异, 该变异有助于 HBV 逃避免疫攻击而形成慢性感染状态^[7]; HBeAg 阳性而 HBeAg/HBeAb 阴性的 HBV 感染者中, HBV DNA 阳性却不表达 HBeAg 的原因可能是 HBV 前 C 信号肽裂解位点变异后可能影响 HBeAg 的翻译后加工, 导致大量的 HBeAg 前体在细胞中蓄积, 这可能导致 HBV 感染者血清 HBeAg 阴性, 并改变病毒致病力^[8]。第 6 组和第 7 组 2 种模式表明曾感染过 HBV, 现处于恢复期, HBV 的复制受到较大程度的抑制, 无传染性。但 2 组中都有 10.0% 的 HBV DNA 阳性, 表明仍有少数患者 HBV 呈低水平复制、肝细胞内仍有 HBV 增殖, 仍具有一定的传染性或者说具有一定的潜在传染性, 在机体抵抗力低时, 有复发的可能。在第 5 组只有 HBeAg 阳性的 8 例患者中有 3 例 HBV DNA 阳性, 检出率为 37.5%, 这可能是

HBV 活跃的早期, 血清中其他标志物还没有出现, 因此也有传染的可能性。有学者证明, HBV-M 各种表现形式均可能存在不同程度的 HBV 复制, 但因时间短, 有些表现形式 (如第 8~12 组) 可能由于样本数量较小或检测方法、检测试剂的差异等原因, 从而导致这些表现模式的检出率低^[9]。

综上所述, 大部分乙型肝炎患者定量 PCR 检测 HBV DNA 的结果与 HBV-M 检测结果一致, 但由于受到 HBV 基因包括 S 区、前 C 区等发生变异的影响, 可引起 HBV 呈低水平复制, 血清中 HBsAg 未能被检出或 HBsAb 不能有效清除血清中 HBV, 血清中 HBV DNA 载量处于很低水平等, 造成少数患者 2 种检测结果的不一致^[10-11]。HBV 感染人体后, HBV DNA 定量测定是反映机体病毒复制状况的最敏感、特异的指标, 而 HBV-M 则反映病毒感染后引起机体免疫应答的状况及转归过程^[12]。本组结果表明, 定量 PCR 检测 HBV DNA 在判断体内 HBV 是否复制、复制的程度、HBV 是否被清除, 以及对 HBV-M 阴性肝炎患者的诊断等方面, 均优于 HBV-M 的检测, 值得临床应用。

参考文献

- [1] Lorient MA, Marcellin P, Bismuth E, et al. Demonstration of hepatitis B virus DNA by polymerase chain reaction in serum and the liver after spontaneous or the therapeutic induced HbeAg to anti-Hbe or HbeAg to anti-HBs, seroconversion in patients with chronic hepatitis B[J]. *Hepatology*, 1992, 15(1): 32-36.
- [2] 孙午, 熊莺. 荧光定量 PCR 检测 HBV DNA 和 ELISA 法检测乙肝六项的一致性分析[J]. *实验与检验医学*, 2009, 27(3): 253-254, 262.
- [3] 王晓东, 李秀全, 李凤焕, 等. 慢性乙肝血清标志物与 HBV DNA 水平的关系[J]. *国际检验医学杂志*, 2006, 27(12): 1070-1072.
- [4] 赵辉, 李凤英. HBV 血清标志物与前 S1 抗原、HBV DNA 的相关性研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2007, 28(12): 1129-1130.
- [5] 黄长武, 谢礼琼, 张明. 乙肝血清学标志物定量检测的临床意义[J]. *吉林医学*, 2010, 31(18): 2814.
- [6] 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 357.
- [7] 郑宇, 阮冰, 肖敏, 等. 乙肝病毒前 C 基因/C 启动子变异与不同症状乙肝患者的相关性[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2003, 23(2): 95-96.
- [8] Honda A, Yokosuka O, Suzuki K, et al. Detection of mutations in hepatitis B virus enhancer 2/core promoter and X protein regions in patients with fatal hepatitis B virus infection[J]. *J Med Virol*, 2000, 62(2): 167-176.
- [9] 陈平. 1252 例乙肝血清标志物与 HBV DNA 检测结果分析[J]. *青海医药杂志*, 2006, 36(12): 54-55.
- [10] 任红. 乙型肝炎病毒表面抗原免疫逃逸突变基因在人肝癌细胞的表达[J]. *中华医学杂志*, 1995, 75(7): 396-398.
- [11] 黄象艳, 沈茜. 乙型肝炎病毒基因突变研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2009, 30(5): 472-473, 476.
- [12] 成军, 孙长贵, 王国政, 等. HBeAg 阳性血清 HBV DNA 与 HBV 标志物定量测定的相关性特征[J]. *国际检验医学杂志*, 2007, 28(5): 385-387.

(收稿日期: 2010-05-10)