

• 临床检验研究论著 •

## 乙型肝炎病毒感染血清学标志物与 HBV-DNA 的关系探讨

黄洁<sup>1</sup>, 吴建华<sup>2△</sup>

(1. 湖北中医药大学检验学院, 湖北武汉 430061; 2. 湖北省中医院检验科, 湖北武汉 430061)

**摘要:**目的 探讨血清乙型肝炎病毒标志物(HBV-M)与 HBV-DNA 之间的关系。方法 分别采用增强化学发光酶联免疫分析(ECLIA)技术及实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)对 262 例血清进行 HBV-M、HBV-DNA 检测, HBV-M 包括 HBV 表面抗原(HBsAg)、抗 HBV 表面抗体(HBsAb)、HBV e 抗原(HBeAg)、抗 HBV e 抗体(HBeAb)、抗 HBV 核心抗体(HBcAb)。结果 HBeAg 阴性患者的 HBV-DNA、HBsAg、HBeAb 阳性率与 HBeAg 阳性患者比较, 差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。HBeAg 阴性患者 HBV-DNA 对数值不低于 5 的有 29 例(36.7%)。不同年龄患者 HBeAg、HBeAb 阳性率的差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。HBV-DNA 阳性标本中有 25 例 HBsAg 小于 250 IU/mL, 其中 12 例(48.0%)HBV-DNA 对数值不低于 5。HBV-DNA 阳性患者的 HBV-DNA 对数值与 HBeAg、HBeAb 呈正相关( $r$  分别为 0.542、0.607,  $P < 0.01$ )。结论 HBV-M 与 HBV-DNA 联合检测有助于判断 HBV 的感染情况。

**关键词:** 肝炎病毒, 乙型; 生物学标记; DNA; 聚合酶链反应; 增强化学发光酶联免疫分析

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.09.016

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2014)09-1126-03

## Investigation of the relationship between serological markers of hepatitis B virus infection and HBV-DNA

Huang Jie<sup>1</sup>, Wu Jianhua<sup>2△</sup>

(1. College of Laboratory, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan, Hubei 430061, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Hubei Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan, Hubei 430061, China)

**Abstract: Objective** To investigate the relationship between serum hepatitis B virus markers (HBV-M) and HBV-DNA.

**Methods** Enhanced chemiluminescence enzyme immunoassay (ECLIA) and real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR) were employed to detect HBV-M and HBV-DNA in 262 serum samples, respectively. HBV surface antigen (HBsAg), anti-HBV surface antibody (HBsAb), HBV e antigen (HBeAg), anti-HBV e antibody (HBeAb), anti-HBV core antibody (HBcAb) were included in HBV-M. **Results** Compared the positive rates of HBV-DNA, HBsAg, HBeAb in HBeAg-negative patients with those in HBeAg-positive patients, the differences were statistically significant ( $P < 0.01$ ). 29 (36.7%) patients with HBV-DNA logarithm value not less than 5 were found in HBeAg-negative patients. Differences of HBeAg, HBeAb positive rates among patients with different ages were statistically significant ( $P < 0.01$ ). 25 patients with HBsAg less than 250 IU/mL were found in HBV-DNA-positive patients, 12 (48.0%) of which showed HBV-DNA logarithm value not less than 5. HBV-DNA logarithm value of HBV-DNA-positive patients was positively correlated to HBeAg and HBeAb ( $r = 0.542, 0.607, P < 0.01$ ). **Conclusion** Combined detection of HBV-M and HBV-DNA contributes to estimating the HBV infection.

**Key words:** hepatitis B virus; biomarkers; DNA; polymerase chain reaction; enhanced chemiluminescence enzyme immunoassay

增强化学发光酶联免疫分析 (enhanced chemiluminescence enzyme immunoassay, ECLIA) 技术将高敏感性的化学发光技术与高特异性的免疫反应结合起来, 具有敏感性高、特异性强、线性范围宽、操作简便、稳定性好等优点<sup>[1-2]</sup>, 能够快速、准确定量检测血清标志物水平。实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, FQ-PCR) 技术具有高敏感性和特异性, 能准确定量检测血清乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV)-DNA<sup>[3-4]</sup>, 后者作为判断病毒复制活跃程度和是否具有传染性的直接、可靠依据, 与疾病进展密切相关。目前关于血清 HBV 标志物 (HBV marker, HBV-M) 与 HBV-DNA 关系的研究较少, 笔者对 262 例肝病科的患者血清 HBV-M 和 HBV-DNA 水平进行了定量检测, 以探讨二者的量化关系, 为临床判断 HBV 的感染情况及疗效监测提供指导。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择 2012 年 9~12 月于湖北省中医院肝病科就诊的患者 262 例, 其中, 男 156 例, 女 106 例; 年龄 17~80

岁, 平均 41 岁, 患者彼此无亲缘关系, 均符合慢性乙型肝炎诊断标准 (2010 年版)<sup>[5]</sup>。

**1.2 检测方法** 采集上述患者清晨空腹静脉血。采用 ECLIA 技术进行 HBV-M 检测, 检测仪器为瑞士罗氏 (Roche) 公司 Roche Modular E170 全自动电化学发光免疫分析仪, 检测试剂、定标液、质控品均为仪器原装配套; 采用 FQ-PCR 技术进行 HBV-DNA 检测, 检测仪器为美国 Applied Biosystems 公司 ViiA™ 7 实时荧光定量 PCR 系统, 检测试剂由上海复星医学科技发展有限公司提供, 质控品由北京康御思坦生物技术有限公司提供。操作均严格按产品说明书进行。

**1.3 判断标准** 以 HBV 表面抗原 (HBV surface antigen, HBsAg)  $\geq 0.064$  IU/mL 为阳性; 以抗 HBV 表面抗体 (anti-HBV surface antibody, HBsAb)  $\geq 10$  IU/L 为阳性; HBV e 抗原 (HBV e antigen, HBeAg)、抗 HBV e 抗体 (anti-HBV e antibody, HBeAb)、抗 HBV 核心抗体 (anti-HBV core antibody, HBcAb) 检测结果根据标本产生的光信号与临界值光信号值 (cut off index, COI) 的比值来衡量量化程度, 其中, HBeAg

COI $\geq$ 1 为阳性, HBeAb 及 HBcAb 的 COI $\leq$ 1 为阳性; 以 HBV DNA $\geq$ 1.0 $\times$ 10<sup>3</sup> 拷贝/mL 为阳性。

**1.4 统计学处理** HBV-DNA 以对数值表示, 经 Microsoft Excel 整理。采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。计量资料用  $\bar{x}\pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验和 *t'* 检验; 计数资料用率表示, 率的比较采用  $\chi^2$  检验, 相关性分析采用 Spearman 秩相关系数检验, 以  $\alpha=0.05$  为检验水准, 以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

262 例标本 HBV-M、HBV-DNA 检测结果见表 1。检出

HBV-DNA 阳性 152 例, 其中, HBeAg 阳性 73 例 (48.0%), HBeAg 阴性 79 例 (52.0%)。HBeAg 阴性患者的 HBV-DNA、HBsAg、HBeAb 阳性率与 HBeAg 阳性患者比较, 差异均有统计学意义 ( $P<0.01$ )。HBeAg 阴性患者 HBV-DNA 对数值不低于 5 的有 29 例 (36.7%)。不同年龄患者 HBV-DNA 对数值、HBsAg 阳性率的差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 但其 HBeAg、HBeAb 阳性率的差异有统计学意义 ( $P<0.01$ ), 年龄越大, HBeAg 阳性率越低, 而 HBeAb 阳性率越高, 见表 2。HBV-DNA 阳性标本中有 25 例 HBsAg 小于 250 IU/mL, 其中 12 例 (48.0%) HBV-DNA 对数值不低于 5。

表 1 HBV-M、HBV-DNA 的检测结果

HBV-M 检测	n	HBV-DNA 检测	
		阳性[n(%)]	对数值
模式 1: HBsAg(+), HBeAg(+), HBcAb(+)	71	65(91.6)	6.4 $\pm$ 1.3
模式 2: HBsAg(+), HBeAb(+), HBcAb(+)	152	71(46.7)	4.6 $\pm$ 1.2 $\Delta$
模式 3: HBsAb(+), HBeAb(+), HBcAb(+)	12	4(33.3)	5.0 $\pm$ 2.1
模式 4: HBsAg(+), HBeAg(+), HBeAb(+), HBcAb(+)	11	8(72.7)	4.8 $\pm$ 1.5*
模式 5: HBsAg(+), HBcAb(+)	6	1(16.7)	7.3
模式 6: HBsAb(+), HBcAb(+)	4	1(25.0)	3.4
模式 7: HBeAb(+), HBcAb(+)	3	1(33.3)	8.6
模式 8: HBsAg(+), HBsAb(+), HBeAb(+), 模式 1: HBcAb(+)	2	1(50.0)	4.5
模式 9: HBcAb(+)	1	0(00.0)	0.0

$\Delta$ :  $P<0.01$ , 与模式 1 比较; \*:  $P<0.05$ , 与模式 2 比较。

表 2 不同年龄患者 HBV-DNA 对数值及 HBsAg、HBeAg、HBeAb 阳性的比较[n(%)]

年龄(岁)	n	HBV DNA 对数值					HBsAg	HBeAg	HBeAb
		3~<4	4~<5	5~<6	6~<7	$\geq$ 7			
<30	32	6(18.8)	3(9.4)	5(15.6)	7(21.9)	11(34.4)	30(93.8)	25(78.1)	10(31.3)
30~<40	49	15(30.6)	6(12.2)	7(14.3)	15(30.6)	6(12.2)	48(98.0)	27(55.1)	25(51.0)
40~<50	39	11(28.2)	9(23.1)	6(15.4)	5(12.8)	8(20.5)	38(97.4)	13(33.3)	25(64.1)
50~<60	23	4(17.4)	5(21.7)	10(43.5)	4(17.4)	0(0.0)	22(95.7)	7(30.4)	17(73.9)
$\geq$ 60	9	0(0.0)	3(33.3)	2(22.2)	2(22.2)	2(22.2)	8(88.9)	1(11.1)	8(88.9)

152 例 HBV-DNA 阳性患者的 HBV-DNA 对数值与 HBeAg、HBeAb 呈显著正相关 (*r* 分别为 0.542、0.607,  $P<0.01$ ), 与 HBsAg 弱相关 ( $r=0.207$ ,  $P=0.01$ ), 与 HBsAb、HBcAb 无相关性 ( $P>0.05$ )。HBeAg 阳性患者 HBV-DNA 对数值与 HBsAg、HBeAg、HBeAb 呈显著正相关 (*r* 分别为 0.425、0.752、0.701,  $P<0.01$ ); HBeAg 阴性患者 HBV-DNA 对数值与 HBV-M 无相关性 ( $P>0.05$ )。

**3 讨 论**

HBsAg、HBsAb 同时阳性的原因可能为: (1) 抗原-抗体的动态平衡; (2) 不同亚型重叠感染; (3) 不同亚型间的转换; (4) HBV-2 感染; (5) S 基因突变; (6) 患者处于感染恢复期, 即 HBsAb 出现早期; (7) 检测敏感性的提高<sup>[6-7]</sup>。HBeAg、HBeAb 同时阳性的原因可能为: (1) HBeAg 较快转为 HBeAb; (2) HBeAb 缓慢产生(阳性), 由于 HBeAb 产生过剩, 使二者同时存在或形成的复合物结合不牢而解离; (3) 基因变异<sup>[8]</sup>。因此, 当出现 s 系统或 e 系统抗原-抗体同时阳性时, 应引起人们的高度重视。本研究显示, HBsAg、HBeAg 消失而 HBsAb、

HBeAb 出现的情况不代表乙型肝炎趋向恢复, 可能持续存在 HBV 复制和突变, 故单纯依靠血清标志物检测无法准确判断病毒复制水平及传染性大小, 还须依赖 HBV-DNA 定量检测。

相关分析显示, HBV-DNA 对数值与 HBsAg、HBeAg、HBeAb 表现出一定程度的相关性, HBeAg 阳性患者尤为明显, 这与国内、外研究报道一致<sup>[9-10]</sup>, 这进一步证实了 HBeAg 是反映 HBV 复制的指标之一。然而, 152 例 HBV-DNA 阳性标本中有 79 例 HBeAg 阴性, 其中 29 例 (36.7%) HBV-DNA 对数值不低于 5。此时, 虽然血清 HBeAg 为阴性, 但 HBV 却大量存在, 说明 HBeAg 阳性与否不能完全作为判断体内病毒复制、传染性大小及是否需要抗病毒治疗的依据<sup>[11]</sup>。HBV-DNA 与 HBsAg 相关性较小<sup>[12]</sup>, 其原因可能在于: (1) S、X 区基因突变, 基因突变影响了 HBsAg 表达及检测<sup>[8]</sup>; (2) 重叠感染, 丙、丁型肝炎病毒大量复制抑制了 HBsAg 合成<sup>[13]</sup>; (3) HBV 低水平复制, HBsAg 少量分泌而低于检测下限, 或 HBsAb 大量分泌使 HBsAg 检测呈阴性; (4) HBV 基因型的影响<sup>[14]</sup>; (5) 钩状效应对 HBsAg 检测的影响<sup>[15]</sup>。此外, 部分患

者 HBsAg 水平较低, 而 HBV-DNA 却处于高水平, 提示 HBsAg 仅能在一定程度上反映患者体内病毒复制情况, 还应结合其他检测结果综合判断。本研究未发现 HBV-DNA 与 HBsAb、HBeAb 的相关性, 这可能是样本范围和数量有限所致。

综上所述, FQ-PCR 检测 HBV-DNA 能直接、准确反映病毒在体内的复制情况, 但仅适用于体内已存在 HBV-DNA 的情况。ECLIA 技术检测 HBV-M 能反映体内抗原、抗体水平, 但不能完全反映病毒复制情况。因此, 单一检查难以对体内 HBV 感染情况作出准确判断, 需要将 HBV-M 与 HBV-DNA 联合检测, 以准确判断 HBV 在体内的存在情况。必要时, 可对 HBeAg 阴性而 HBV-DNA 高的患者进行基因变异检测, 为临床诊疗提供参考。

## 参考文献

- [1] 游媛, 陈岚, 肖鄂. 电化学发光免疫分析检测乙肝标志物的临床价值[J]. 西南国防医药, 2012, 55(7): 767-769.
- [2] Xu W, Li Y, Wang M, et al. Comparison of two immunoassays for determining hepatitis B virus serum markers[J]. Clin Chem Lab Med, 2011, 50(1): 153-157.
- [3] 黄四爽, 熊勤. 乙型肝炎病毒核酸实时荧光定量 PCR 检测在临床诊断中的价值[J]. 数理医药学杂志, 2012, 25(4): 484-485.
- [4] Wang Y, Li Y, Yang C, et al. Development and application of a universal Taqman real-time PCR for quantitation of duck hepatitis B virus DNA[J]. J Virol Methods, 2013, 191(1): 41-47.
- [5] 中华医学会肝病学会. 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎诊断标准(2010 年版)[J]. 中西医结合肝病杂志, 2011, 21(2): 121-122.

- [6] 徐俊, 王靖, 郭楠. 乙肝患者血清 HBVs 和 HBVe 系统抗原抗体同时阳性结果分析[J]. 疑难病杂志, 2010, 9(9): 714-715.
- [7] 王蕾, 刘华, 章励, 等. 乙型肝炎血清标志物 HBsAg 和 HBsAb 同时阳性模式的相关研究[J]. 检验医学, 2008, 23(5): 530-534.
- [8] 孙秀凤. 乙型肝炎病毒血清标志物特殊模式的再认识[J]. 临床肝胆病杂志, 2005, 21(1): 57-58.
- [9] 伍敏仪, 陈琳磊, 黎庆梅, 等. 血清 HBV-DNA 与 HBV 标志物定量关系的探讨[J]. 临床医学工程, 2011, 18(8): 1248-1249.
- [10] Thompson AJ, Nguyen T, Iser D, et al. Serum hepatitis B surface antigen and hepatitis B e antigen titers: disease phase influences correlation with viral load and intrahepatic hepatitis B virus markers[J]. Hepatology, 2010, 51(6): 1933-1944.
- [11] 贺岩, 罗梅, 孙艳艳. HBV DNA 载量与 HBsAg、HBeAg 和 ALT 水平的相关性[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(19): 2400-2401.
- [12] Wiegand J, Wedemeyer H, Finger A, et al. A decline in hepatitis B virus surface antigen (hbsag) predicts clearance, but does not correlate with quantitative hbeag or HBV DNA levels[J]. Antivir Ther, 2008, 13(4): 547-554.
- [13] Chu CM, Yeh CT, Liaw YF, et al. Low-level viremia and intracellular expression of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in HBsAg carriers with concurrent hepatitis C virus infection[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(7): 2084-2086.
- [14] 陈金军. 基因型对血清乙型肝炎表面抗原水平及动态变化的影响[D]. 广州: 南方医科大学, 2009: 55-61.
- [15] 单万水, 韩红星, 杨燕, 等. ECLIA 定量检测 HBsAg 及 HBeAg 与 HBV-DNA 相关分析[J]. 中国热带医学, 2006, 6(2): 213-214.

(收稿日期: 2014-02-20)

(上接第 1125 页)

- leukin 17[J]. Nat Immunol, 2005, 6(11): 1133-1141.
- [5] Du H, Chen M, Zhang Y, et al. Non-DNA-binding antibodies in patients with lupus nephritis could recognize membrane proteins of glomerular mesangial cells[J]. J Clin Immunol, 2006, 26(2): 138-144.
- [6] 曾华松, 郭仁寿, 陈重义, 等. 小儿原发性肾病综合征脂质紊乱与蛋白代谢异常的关系[J]. 广州医学院学报, 1999, 14(2): 61-62.
- [7] Seelen MA, Daha MR. The role of complement in autoimmune renal disease[J]. Autoimmunity, 2006, 39(5): 411-415.
- [8] Tipping PG, Kitching AR. Glomerulonephritis, Th1 and Th2: what's new? [J]. Clin Exp Immunol, 2005, 142(2): 207-215.
- [9] van Zaane B, Nur E, Squizzato A, et al. Systematic review on the effect of glucocorticoid use on procoagulant, anti-coagulant and fibrinolytic factors[J]. J Thromb Haemost, 2010, 8(11): 2483-2493.
- [10] 司晓芸, 贾汝汉, 黄从新, 等. 肾小球足细胞损伤在脂质肾损害发病中的作用[J]. 广西医科大学学报, 2002, 19(2): 157-160.
- [11] Trementino L, Arnaldi G, Appolloni G, et al. Coagulopathy in cushing's syndrome[J]. Neuroendocrinology, 2010, 92(Suppl 1): S55-59.
- [12] Engström G, Hedblad B, Janzon L, et al. Complement C3 and C4 in plasma and incidence of myocardial infarction and stroke: a population-based cohort study[J]. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, 2007, 14(3): 392-397.
- [13] Faurschou M, Sorensen IJ, Mellekjaer L, et al. Malignancies in Wegener's granulomatosis: incidence and relation to cyclophosphamide therapy in a cohort of 293 patients[J]. J Rheumatol, 2008, 35(1): 100-105.
- [14] 张爱华, 王海燕, 高进, 等. 低密度脂蛋白对人肾小球系膜细胞增殖的影响[J]. 中华内科杂志, 1994, 33(11): 758-762.
- [15] Chan TM, Lin AW, Tang SC, et al. Prospective controlled study on mycophenolate mofetil and prednisolone in the treatment of membranous nephropathy with nephrotic syndrome [J]. Nephrology (Carlton), 2007, 12(6): 576-581.
- [16] Suzuki T, Suda S, Ohuchi M, et al. Elevated Lp(a) levels[J]. Nihon Rinsho, 2007, 65 Suppl 7: S348-353.
- [17] Fujita T, Nakamura N, Kumasaka R, et al. Comparison of lipid and fatty acid metabolism between minimal change nephrotic syndrome and membranous nephropathy[J]. In Vivo, 2007, 20(6B): 891-893.
- [18] Becker L, Nesheim ME, Koschinsky ML. Catalysis of covalent Lp(a) assembly: evidence for an extracellular enzyme activity that enhances disulfide bond formation [J]. Biochemistry, 2006, 45(32): 9919-9928.
- [19] Zidková K, Zlatohlávek L, Ceska R. Variability in apo(a) gene regulatory sequences, compound genotypes, and association with Lp(a) plasma levels[J]. Clin Biochem, 2007, 40(11): 802-805.
- [20] Jurukovska-Nospal M, Arsova V, Levchanska J, et al. Effects of statins (atorvastatin) on serum lipoprotein levels in patients with primary hyperlipidemia and coronary heart disease[J]. Prilozi, 2007, 28(2): 137-148.

(收稿日期: 2013-12-03)