

## • 检验技术与方法 •

## HBV-DNA 和 ALT、TBA 水平与 HBV 感染模式的相关性研究

林 晖, 彭素媚, 陈振杰

(南京军区福州总医院第一附属医院检验科, 福建莆田 351100)

**摘要:**目的 探讨乙型肝炎病毒(HBV)患者血清 HBV-DNA 和丙氨酸转氨酶(ALT)、总胆汁酸(TBA)与 HBV 感染模式的关系以评价 HBV 感染性。方法 对 308 例患者采用荧光定量 PCR 法检测血清 HBV-DNA, 用 ELISA 方法检测血清乙肝标志物, 用连续监测法检测血清 ALT, 用循环酶法检测血清 TBA。结果 大三阳(HBsAg、HBeAg、HBcAb 阳性者)、小三阳(HBsAg、HBeAb、HBcAb 阳性者)和 1,5(HBsAg、HBcAb)阳性 3 种感染模式间 HBV-DNA 水平和血清 ALT 活性差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 部分 HBeAg 阴性患者体内仍存在活跃的病毒复制; 在 HBeAg 阴性患者中 HBV-DNA 拷贝数与血清 ALT 水平存在显著正相关关系( $P < 0.05$ ); 3 种感染模式间血清 TBA 水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 血清 HBV-DNA 水平和 ALT 活性与不同 HBV 感染模式存在相关性, 它们可在一定程度上反映 HBV 复制及传染性强弱。

**关键词:** 肝炎病毒, 乙型; 丙氨酸转氨酶; 总胆汁酸

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.14.046

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)14-1925-03

## Correlation of HBV-DNA load, ALT and TBA levels with hepatitis B virus infection pattern

Lin Hui, Peng Sumei, Chen Zhenjie

(Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Region, Putian, Fujian 351100, China)

**Abstract: Objective** To explore the correlation of serum HBV-DNA load, transaminase(ALT) and total bile acid (TBA) levels with hepatitis B virus (HBV) infection patterns to assess HBV infectivity. **Methods** The fluorescent quantitative PCR was used to detect serum HBV-DNA in 308 patients with HBV infection. ELISA was adopted to detect the HBV markers. The continuous monitoring method was adopted to detect serum ALT and the cycling enzymatic method was adopted to detect serum TBA. **Results** The HBV-DNA content and serum ALT level had statistical differences among the 3 infection patterns of HBsAb, HBeAg and HBcAb positive, HBsAg, HBsAb, and HBcAb positive and 1,5 positive ( $P < 0.05$ ), the partial patients with HBeAg negative had the active HBV replication in vivo; HBV-DNA copy number in the patients with HBeAg negative was positively correlated with ALT level ( $P < 0.05$ ). Serum TBA level had no statistical difference among three kinds of HBV infection patterns ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Serum HBV-DNA content and ALT activity have the correlation with the different HBV infection patterns, which could reflect the HBV replication and the infectivity intensity in some extent.

**Key words:** hepatitis B virus; alanine transaminase; total bileacid

中国是感染乙型肝炎病毒人数最多的国家, 全球共约 3.5 亿的 HBV 感染者中有超过 1/3 在中国, 近 20% 的慢性乙肝患者将发展成肝硬化甚至原发性肝癌。ELISA 方法是目前临床上诊断 HBV 最基础的检验方法, 而 PCR 方法可以了解体内乙肝病毒复制的活跃程度<sup>[1]</sup>。传统观点认为 HBV 标志物中的可溶性 HBeAg 是 HBV 复制及传染性强的指标。随着近年来对 HBV 研究的深入, 发现部分 HBeAg 阴性的患者体内也存在较活跃的 HBV 病毒复制。HBV 感染的临床表现多样, 给疾病的诊断和治疗带来困难。本研究通过对 308 例 HBV 感染者血清标志物、HBV-DNA、丙氨酸转氨酶(ALT)和总胆汁酸(TBA)进行检测, 分析临床最常见的 3 种 HBV 感染模式与乙肝病毒复制情况和肝脏损害程度之间的关系; 探讨 HBV-DNA 和 ALT、TBA 在 HBeAg 阴性患者临床应用中的价值。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 回顾性选择 2013 年 5~9 月在本院门诊检测 HBV 血清免疫学标志物 HBsAg 阳性者 308 例, 年龄 15~80 岁, 平均 35.2 岁。其中 HBsAg、HBeAg、HBcAb 阳性者(即大

三阳)111 例, HBsAg、HBeAb、HBcAb 阳性者(即小三阳)133 例, HBsAg 与 HBcAb 阳性者(即 1,5 阳性)64 例。所有研究对象均于空腹 8 h 后静脉采血分离血清进行检测。

**1.2 仪器与试剂** HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb 和 HBcAb 检测试剂盒购自珠海丽珠生物有限公司。DNA 检测试剂盒购自安普利公司。TBA 与 ALT 检测试剂盒购自奥的特生物有限公司。实时荧光定量 PCR 仪为美国 Bio-Rad C1000。生化仪为东芝 7060 全自动生化仪。

**1.3 检测方法** 所有研究对象均采用 ELISA 方法检测乙肝“HBsAg、HBsAb、HBcAb、HBeAb、HBeAg”血清标志物。采用实时荧光定量 PCR 方法对血清 HBV-DNA 拷贝数进行检测。ALT 与 TBA 分别采用连续监测法和循环酶法检测。上述所有检测的操作步骤和结果判读严格按照试剂盒说明书要求进行。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计学分析。正态分布资料采用  $\bar{x} \pm s$  描述, 偏态分布资料采用中位数和四分位数  $M$  描述。来自正态分布且方差齐的资料比较采用

方差分析,来自偏态分布或方差不齐的资料比较采用 Kruskal-Wallis H 检验。分析两个变量之间是否存在相关关系采用双变量相关分析,相关系数  $r$  值为正表示正相关,为负表示负相关, $r=0$  表示零相关, $r$  的绝对值等于 1 表示完全相关。 $P<0.05$  则认为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 HBV-DNA 拷贝数与 HBV 感染模式关系的分析** 在 111 例大三阳患者中 HBV-DNA 阳性率为 92.8%,小三阳患者 HBV-DNA 阳性率为 47.4%,1,5 阳性患者 HBV-DNA 阳性率为 43.8%。3 种感染模式间 HBV-DNA 拷贝数差异有统计学意义( $\chi^2=133.459, P<0.01$ )。认为不同感染模式间 HBV-DNA 水平差异有统计学意义( $P<0.05$ ),根据平均秩次进一步推断,大三阳患者 HBV-DNA 水平显著高于小三阳和 1,5 阳性患者。见表 1。

**表 1 HBV-DNA 拷贝数与 3 种常见 HBV 模式的关系**

项目	HBV-DNA 拷贝数	平均秩次
大三阳	$2 \times 107(6.84 \times 10^5, 1 \times 10^8)$	229.93
小三阳	500(500, 8 485)	110.24
1,5 阳性	$500(500, 2.99 \times 10^4)$	113.23
$P$	$<0.01$	

**2.2 TBA 与 HBV 感染模式关系的分析** 大三阳患者、小三阳患者与 1,5 阳性患者血清 TBA 水平如表 2 所示,3 种感染模式间血清总胆汁酸含量差异无统计学意义( $\chi^2=0.145, P=0.93$ )。

**表 2 TBA 与 3 种常见 HBV 模式的关系( $\mu\text{mol/L}$ )**

项目	TBA	平均秩次
大三阳	4.15(2.35, 7.43)	155.89
小三阳	4.00(2.20, 7.50)	151.80
1,5 阳性	4.45(2.43, 7.48)	155.32
$P$	0.930	

**2.3 ALT 与 HBV 感染模式关系的分析** 大三阳患者、小三阳患者与 1,5 阳性患者血清 ALT 活性如表 3 所示,3 种感染模式间血清 ALT 活性差异有统计学意义( $\chi^2=8.597, P=0.014$ )。根据平均秩次进一步推断,以大三阳患者血清 ALT 活性最高,小三阳患者次之,1,5 阳性患者最低。

**表 3 ALT 与 3 种常见 HBV 模式的关系**

项目	ALT(IU/L)	平均秩次
大三阳	37.0(20.60, 81.00)	171.98
小三阳	30.0(19.75, 43.90)	149.45
1,5 阳性	26.5(16.25, 40.00)	132.56
$P$	0.014	

**2.4 不同 HBV 感染模式 DNA 拷贝数与 TBA、ALT 的相关性** 3 种不同 HBV 感染模式 DNA 拷贝数与 TBA、ALT 的相关性分析如表 4 所示。在 3 种不同乙肝感染模式中 DNA 拷贝数与 TBA 水平不存在相关关系( $P>0.05$ )。在大三阳患者中

DNA 拷贝数与 ALT 水平不存在相关关系( $P>0.05$ )。在小三阳患者和 1,5 阳性患者中, DNA 拷贝数与 ALT 水平存在显著正相关关系( $r=0.232, P=0.007; r=0.339, P=0.006$ )。

**表 4 3 种常见 HBV 模式 DNA 拷贝数与 TBA、ALT 的关系**

项目	DNA 与 TBA	DNA 与 ALT
大三阳患者		
$r$ 值	0.014	0.086
$P$ 值	0.883	0.373
小三阳患者		
$r$ 值	0.056	0.232
$P$ 值	0.521	0.007
1,5 阳性患者		
$r$ 值	0.049	0.339
$P$ 值	0.702	0.006

**3 讨 论**

近 10 年来 PCR 方法检测 HBV 的敏感性不断提高,但 ELISA 依然是最重要的检验手段<sup>[2]</sup>。隐匿性 HBV 感染在 HCV 感染者中非常普遍,在不明原因的慢性肝脏疾病或肝癌中也较常见,特点是血清中检测不到 HBsAg。其机制可能与下述原因有关:HBV 病毒复制和基因表达的强烈抑制或 HBV 基因组调控序列的突变;HBsAg 与免疫球蛋白结合以及被感染的肝细胞分泌 HBsAg 受限。在这种情况下检测 HBV-DNA 是十分必要的<sup>[3]</sup>。血清 HBV 标志物阳性者经 PCR 检测 HBV-DNA 拷贝数后可判断其是否处于 HBV 感染的活动期,联合检测两对半和 HBV-DNA 可有效弥补各自不足。

本研究对 308 例 HBV 感染者 HBV-DNA 进行检测,分析 HBV 病毒拷贝数与感染模式的关系表明,大三阳组 HBV-DNA 含量显著高于小三阳组和 1,5 阳性组( $P<0.01$ )。传统观点认为 HBeAg 转阴意味着病毒复制趋于静止,本研究中部分小三阳组和 1,5 阳性组患者体内仍存在较高的病毒复制量。在 HBV 感染的自然进程中,由 HBeAg 阳性到 HBeAg 阴性/HBeAb 阳性的血清学转变导致 HBV 病毒复制量减低和 ALT 水平恢复正常。这些指标的变化长久以来在临床上被认为是向慢性肝炎的转化。HBeAg 是 HBV 复制及传染性强的指标,一般 HBeAg 阳性持续时间不会超过 10 周,若超过则提示 HBV 慢性感染。抗-HBe 出现于 HBeAg 转阴后,提示病毒复制水平低。然而临床上存在着两种形式的 HBeAg 阴性的乙肝模式:一种是“非活动性乙肝携带状态”即 HBeAg 阴性,无症状,ALT 正常,HBV-DNA 低于检测限或小于  $10^5$  copies/mL;另一种是“HBeAg 阴性的慢性乙肝”即 HBeAg 阴性,有症状,ALT 水平升高,HBV-DNA 高于  $10^5$  copies/mL<sup>[4]</sup>。在本研究中,HBeAg 阴性感染者共 197 例,其中有 26 例 HBV-DNA 含量高于  $10^5$  copies/mL,占 13.20%。这两种 HBeAg 阴性的乙肝模式在临床上不易区分,尤其当 HBV-DNA 水平在  $(10^4 \sim 10^5)$  copies/mL 时,只能依赖 ALT 水平的连续监测进行鉴别。但是有 20%~30% 的 HBeAg 阴性慢性乙肝患者血清 ALT 水平是正常的,因此,这部分患者易被误诊处于非活动性

乙肝携带状态而不接受治疗。

TBA 和 ALT 是反映肝损伤的有效指标,在常规实验室检测中,升高的 ALT 水平提示肝细胞损伤,并与乙肝感染患者发生肝硬化的风险息息相关。国内许多学者已开展相关研究<sup>[5-7]</sup>,本研究中分析了 TBA、ALT 水平与 HBV 感染模式的关系,患者血清 TBA 水平与 HBV 感染模式无关( $P>0.05$ )。而血清 ALT 水平以大三阳活性最高,小三阳次之,1,5 阳性组最低( $P<0.05$ ),可见 ALT 活性可在一定程度上反映 HBV 复制及传染性强弱。本研究同时分析了 3 种不同乙肝感染模式中 DNA 拷贝数分别与 TBA、ALT 的相关性,结果显示在 HBeAg 阴性患者中 HBV-DNA 拷贝数与血清 ALT 水平存在显著正相关关系( $P<0.05$ ),即随着 DNA 拷贝数的增加,血清 ALT 水平增高。在大三阳患者中 HBV-DNA 与血清 ALT 都处于较高水平,而在小三阳和 1,5 阳性的患者中 HBV-DNA 检测不仅可以直观反映病毒复制状态,而且与肝脏损害程度呈正相关关系。国外有研究认为在 HBeAg 阴性的感染者中 ALT 水平高于正常值上限的 0.5 倍与进展性肝纤维化相关,并且男性 ALT $>30$  IU/L 或女性 ALT $>19$  IU/L 加上 HBV-DNA 高于  $10^5$  copies/mL 说明患者为活动性慢性乙肝患者<sup>[8]</sup>。HBV 感染的临床表现众多,若在国内同样建立起 HBV-DNA 和 ALT 的临界值将对乙肝患者病情的综合判断以及长期管理具有重要意义。

参考文献

[1] Anna S, Lok F, Brian J, et al. Chronic Hepatitis B[J]. Hepatolo-

gy, 2007, 45(2): 507-539.

- [2] Kuhns MC, Busch MP. New strategies for blood donor screening for hepatitis B virus; nucleic acid testing versus immunoassay methods[J]. Mol Diagn Ther, 2007, 10(2): 77-91.
- [3] YS Kim. Definition, diagnosis, and prevalence of occult hepatitis B virus infection[J]. Korean J Gastroenterol, 2013, 62(3): 143-147.
- [4] Assy N, Beniashvili Z, Djibre A, et al. Lower baseline ALT cut-off values and HBV-DNA levels better differentiate HBeAg(-) chronic hepatitis B patients from inactive chronic carriers[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(24): 3025-3031.
- [5] 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): 2015-2017.
- [6] 姜伟超. 650 例慢性乙肝患者 HBV-M, HBV-DNA 同步检测分析[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2013, 22(2): 210-213.
- [7] 王治兰, 刘卫平, 王贵强. 慢性 HBV 感染肝脏病理变化和生化 ALT 及病毒学关系[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2008, 22(5): 457-459.
- [8] Ijaz B, Ahmad W, Javed FT, et al. Revised cutoff values of ALT and HBV-DNA level can better differentiate HBeAg(-) chronic inactive HBV patients from active carriers[J]. Virology Journal, 2011, 86(8): 765-768.

(收稿日期: 2014-01-08)

(上接第 1924 页)

2、P53、Ki67 染色成功的关键。乳腺癌的抗原修复,一般采用高压热修复法,操作过程中要注意修复的压力和时间的控制;取出细胞学涂片前,要等待缓冲液冷却后方可进行后续的操作过程,否则容易造成脱片;柠檬酸盐缓冲液的量必须保证所有细胞学涂片都能浸泡到,用过的缓冲液应弃掉,不能重复使用。(4)做好显色反应过程的质量控制,也是确保检测结果可靠性的重要环节。DAB 显色时间长短,由于不同的标本,细胞的分化程度的差异化,细胞抗原含量不尽相同,其显色的时间不可能完全一致。对于抗原含量较多的标本,应防止显色时间过长而导致的背景着色和非特异性染色。此外,注意 PBS 冲洗要充分,滴加试剂要足量等环节的控制。(5)、做好乳腺癌标本的免疫细胞化学染色各项的阳性对照和阴性对照,包括内、外对照试验。此外,新购进的试剂一定要做预试验,找出最理想的抗体效价。做好检测试剂保存条件(如温度)的管理工作,杜绝使用过期试剂。

总之,乳腺癌免疫细胞化学质量控制是多方面的,应从标本的采集、制作、固定、抗原修复、染色反应以及试剂的管理等工作入手,注重细节管理,操作力求做到标准化、规范化。加强全过程的质量管理工作,才能确保检测结果的准确性和可靠性。

参考文献

[1] 陈灿铭, 陈小松, 马传栋, 等. 乳腺癌分子分型与预后关系的研究

[J]. 中华外科杂志, 2008, 46(18): 1400-1403.

- [2] 宋安辉, 王镇美. 免疫组化两步法在乳腺癌细胞学诊断中的应用[J]. 广州医药, 2007, 38(4): 50-52.
- [3] Vetto J, Pommier R, Schmidt W, et al. Accurate and cost-effective evaluation of breast wasses in males[J] Am, J Surg, 2011, 169(5): 519-522.
- [4] Green B, Dowley A, Turnbull LS, et al. Impact of fine-needle aspiration cytology, ultrasonography and mammography on open biopsy rate in patients with benign breast disease[J]. Br J Surg, 2012, 82(11): 1509-1511.
- [5] 陈婉娴, 王念黎. 乳腺肿块针吸细胞学 HE 染色涂片的免疫细胞化学染色[J]. 临床与实践病理学杂志, 2002, 18(5): 570-571.
- [6] 王焱, 马榕, 康俊升, 等. 乳腺癌术前性激素受体和 C-erbB-2 检测的临床意义[J]. 实用医药杂志, 2004, 21(8): 681-683.
- [7] 王崇杰, 王建丽, 牟洁, 等. 乳腺癌术前核芯针穿刺检测 ER、PR、C-erbB-2、Ki-67 的临床研究[J]. 中国现代普外科进展, 2011, 14(7): 517-520.
- [8] Bozzetti C, Nizzoli R, Naldi N, et al. Breast cancer res treat, 2010, 32(2): 221-228.
- [9] 刘岩, 王珩, 赵银环. 细胞学涂片免疫细胞化学染色技术的质量控制[J]. 医学信息, 2013, 26(3): 447.

(收稿日期: 2013-12-28)