

## 荧光定量 PCR 检测 HBV-DNA 与血清 HBV 标志物关系探讨

陈继梅<sup>1</sup>, 施志农<sup>2</sup>, 田 芸<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:探讨荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)检测 HBV-DNA 与血清 HBV 标志物(HBV-M)之间的关系。方法:对 801 例患者采用 FQ-PCR 法测 HBV-DNA 含量,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 HBV-M。结果:HBV-DNA 在各种模式的 HBV 标志物中均可检出。HBsAg +、HBeAg +、抗 HBc + 组患者血清中 HBV-DNA 检出率为 97.6%,且多处在高拷贝 HBV-DNA; HBsAg +、抗 HBe +、抗 HBc + 组患者血清 HBV-DNA 检出率为 47.12%,多数是低拷贝 HBV-DNA;另发现抗 HBs + 组阳性率为 13.33%;全阴组阳性率为 11.11%。不同 HBV-M 患者血清 HBV-DNA 的检出率差异均有统计学意义( $P < 0.05 \sim P < 0.001$ )。结论:FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 对乙型肝炎的诊断、传染性的判断有临床实用意义,可反映 HBV 真实感染的各种复制状态,对于乙肝的临床诊断、治疗方案的选择和预后具有重要的指导意义。

**[关键词]** 乙型肝炎;乙型肝炎病毒;免疫学技术;荧光聚合酶链反应;酶联免疫吸附试验

**[中国图书资料分类法分类号]** R 512.62;R 373.21 **[文献标识码]** A

以往乙型肝炎病毒(HBV)感染的诊断主要依赖于血清特异性抗体,近年聚合酶链反应(PCR)法检测血清中 HBV-DNA 已应用于临床,特别是荧光定量 PCR(FQ-PCR),不仅可以避免常规 PCR 扩增产物易污染而导致的假阳性,而且还可以给出 HBV-DNA 体内复制的定量结果。为了解 FQ-PCR 检测与乙肝患者 HBV 标志物(HBV-M)之间的关系,我们对 801 份血清标本应用 FQ-PCR 检测 HBV-DNA 含量,同时用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清中 HBsAg(1)、抗-HBs(2)、HBeAg(3)、抗-HBe(4)、抗-HBc(5)对检测结果进行比较,现作报道。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 血清标本来自 2007 年 3~9 月在我院进行乙型肝炎血清标志物和 HBV-DNA 检测的病例,其中资料完整的病例 801 例。男 602 例,年龄 6~70 岁;女 199 例,年龄 12~68 岁。

**1.2 试剂与仪器** HBV-M 测定采用北京万泰生物药业有限公司的乙型肝炎诊断试剂盒 ELISA,酶标仪为 MK3 型,HBV-DNA 荧光定量测定试剂购自上海科华生物工程股份有限公司;在 SLAN Real-Time PCR Detection System 实时荧光定量 PCR 仪上测定。

**1.3 方法** HBV-M 严格按说明书操作,结果在 MK3 型酶标仪上测定,阴阳性判定按说明书标准,其中 1~5 项标志顺序分别为 HBsAg、抗 HBs、HBeAg、抗 HBe、抗 HBc。荧光定量 PCR 检测 HBV-DNA 采用浓缩裂解法,从血清中提取 HBV-DNA。扩增条件:95 °C 5 min 变性,然后按 95 °C 10 s ~

60 °C 30 s,共 40 个循环。反应结束后,由电脑自动分析计算出定量结果。每次实验设 4 个 HBV-DNA 标准品系列浓度,依次为  $10^8$  copies/ml、 $10^7$  copies/ml、 $10^6$  copies/ml 和  $10^5$  copies/ml,该仪器检测灵敏度为  $5 \times 10^2$  copies/ml,大于该浓度为阳性。

**1.4 统计学方法** 采用对数平均值的方法来计算 HBV-DNA 平均拷贝数,阴性结果不参加平均值统计。各组 HBV-DNA 含量比较采用方差分析和  $q$  检验;HBV-DNA 阳性率比较采用  $\chi^2$  检验。

### 2 结果

**2.1 HBV-M 检出结果不同进行分组与 HBV-DNA 荧光定量测定结果** HBV-DNA 在各种模式 HBV 标志物血清中均存在不同程度的病毒复制。1、3、5 阳性(大三阳)组患者 97.6% 可检出 HBV-DNA,其中 84.9% HBV-DNA 拷贝数  $10^5$  copies/ml;1、4、5 阳性(小三阳)组患者 > 47.12% 可检出 HBV-DNA,其中 66.67% HBV-DNA 拷贝数  $< 10^4$  copies/ml(见表 1)。

表 1 HBV-M 组合模式与 HBV-DNA 测定结果( $n=801$ )

分组	HBV-M 阳性模式	HBV-DNA 检出结果(copies/ml)					
		$< 5 \times 10^2$	$\geq 5 \times (10^2 \sim 10^3)$	$10^4$	$10^5$	$10^6$	$\geq 10^7$
1	1,3,5	7	14	29	36	88	118
2	1,4,5	175	65	39	22	19	11
3	2,5	36	25	21	6	12	14
4	4,5	14	2	0	0	0	0
5	2	13	2	0	0	0	0
6	2,4,5	10	1	1	0	0	0
7	2,4	2	1	1	0	0	0
8	全阴	16	1	1	0	0	0

**2.2 ELISA 结果与 HBV-DNA 检测结果比较** 不同 HBV-M 患者血清 HBV-DNA 的阳性检出率差异

[收稿日期] 2008-06-06

[作者单位] 1. 安徽省芜湖市第三人民医院 检验科, 241000; 2. 安徽省芜湖市第二人民医院 检验科, 241000

[作者简介] 陈继梅(1970-), 女, 主管检验师。

均有统计学意义( $P < 0.05 \sim P < 0.001$ ) (见表 2)。

表 2 801 例 HBV-DNA 检测结果与 ELISA 结果比较

分组	HBV-M 阳性模式	n	HBV-DNA 阳性率(%)	$\chi^2$	P	HBV-DNA 含量(copies/ml)	F	P	MS <sub>组内</sub>
1	1,3,5	292	285(97.60)*			6.38 ± 1.22			
2	1,4,5	331	156(47.12) $\Delta\Delta$			4.63 ± 1.32**			
3	1,5	114	78(68.42) $\Delta\Delta$			5.13 ± 1.61**			
4	4,5	15	2(13.33) $\Delta\Delta$			3.66 ± 0.17**			
5	2	15	2(13.33) $\Delta\Delta$	257.66	<0.005	3.06 ± 0.45**	57.02	<0.01	1.653
6	2,4,5	12	2(16.67) $\Delta\Delta$			3.67 ± 0.63**			
7	2,4	4	2(2/4) $\Delta$			4.84 ± 0.09*			
8	全阴	18	2(11.11) $\Delta\Delta$			4.25 ± 0.38**			

#表示括号内为阳性率(%);率的两两比较:与第 1 组比较 $\Delta P < 0.05$ , $\Delta\Delta P < 0.01$ ;q 检验:与第 1 组比较\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

### 3 讨论

FQ-PCR 采用完全闭管检测,不需 PCR 后处理,避免了交叉感染,同时采用实时检测技术连续检测 PCR 过程中反应体系对荧光信号的变化,荧光信号达到某一阈值时的循环次数与起始模板 DNA 量对数值之间的严格线性关系,进行起始模板定量,定量的准确率高,可相对反映外周血 HBV 的复制情况。

ELISA 是临床诊断 HBV 的传统手段,一般认为大三阳提示 HBV 复制活跃和传染性强,HBsAg、HBeAg 转阴,抗-HBs 及抗-HBe 的出现是机体清除 HBV 的标志,并且提示具有对 HBV 的免疫力。从本组的检测结果来看,大三阳 HBV-DNA 阳性率最高,达到 97.6%,与各家的报道基本一致<sup>[1,2]</sup>,84.9% 患者血清中 HBV-DNA 浓度在  $10^5$  copies/ml 以上,提示大三阳(1,3,5 阳性)时 HBV-DNA 高拷贝量与体内病毒复制活跃有关,表明 FQ-PCR 法能真实可靠地反应 HBV-DNA 的复制情况。而小三阳(1,4,5 阳性)患者血清中只有 47.12% 检出 HBV-DNA,阳性病例中 66.67% 的 HBV-DNA 浓度在  $10^4$  copies/ml 之下,但仍有部分患者 HBV-DNA 浓度很高,可见抗-HBe 的出现并不能完全代表病毒水平的降低或病毒停止复制<sup>[3]</sup>。这些患者中可能伴有 HBV 前 C 区的变异<sup>[4]</sup>,这种变异导致不能产生 HBeAg,但不影响 HBV 复制和传播。因而,HBeAg 并不能完全反映 HBV 在体内的复制状况,传统的用 HBeAg 作为判断有无传染性的指标,存在明显的不足。而以往 HBV-M 检出全阴或抗-HBs 阳性,基本上都认为是健康者,不存在 HBV-DNA 的复制。本研究用 FQ-PCR 检出的阳性率分别为 11.1% 和 13.3%,因而,随着 PCR 技术的成熟,同期国内外均有抗-HBs 阳性的病例血清中检出 HBV-DNA 的报道。一般认为乙肝患者经治疗后 HBsAg 阴性提示无 HBV 感染,而 HBsAg 阴转,特别是抗-HBs 阳转为

机体已清除 HBV 的标志。本研究全阴组中仍有 2 例患者血清中检出 HBV-DNA,经调查是我院老患者,均进行了抗病毒治疗 1~2 年,可能是 HBsAg 发生了明显的基因变异,以致 ELISA 试剂不能识别变异的 HBsAg 所致<sup>[5]</sup>。黄利华等<sup>[5]</sup>用基因测序结果发现 HBsAg“a”决定簇存在变异,导致抗-HBs 不能中和 HBsAg 而与 HBV-DNA 共存,病毒低水平复制。因此,在对患者进行抗病毒治疗时,应及时检测患者体内 HBV-DNA 浓度,仅仅 HBV-M 标志物阴转,并不完全代表患者痊愈。对乙肝患者,若 HBeAg 和抗-HBe 转阴伴 HBV-DNA 转阴,转氨酶恢复正常及组织学检查改善,则预示着患者处于病毒低复制期,并有显著临床疗效,HBV-DNA 浓度是检测慢性乙肝患者抗病毒疗效的重要检测项目<sup>[6]</sup>。

ELISA 法检测乙肝标志物与 FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 意义不完全相同,两者互有联系,前者能反映 HBV 感染的不同时期,提示疾病的转归趋势,而后者是直接检测血液中 HBV-DNA 浓度,更能反映 HBV 感染和复制的程度。因此,在乙肝的诊疗中,特别是抗病毒治疗后,应用乙肝标志物和 FQ-PCR 法共同检测,有助于观察患者的抗病毒疗效。

#### [参 考 文 献]

- [1] 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.
- [2] 丁友法,王 伟. 杂交酶联定量 PCR 检测 HBV-DNA 的初步应用[J]. 上海医学检验杂志,2002,17(3):179-180.
- [3] 邱望龙,李福元. 抗 HBe 阳性慢性乙型肝炎的治疗策略[J]. 临床肝胆病杂志,1999,15(1):9-12.
- [4] 张汉荣,刘新钰,孙 梅,等. 乙型肝炎病毒 C 基因启动子和前 C 基因变异与 HBeAg 含量和肝炎病情的临床研究[J]. 临床肝胆病杂志,2003,19(5):290-291.
- [5] 黄利华,蒋跃明,裴 浩,等. 套式 PCR 检测抗-HBs 阳性者血清 HBV-DNA 及序列分析[J]. 临床肝胆病杂志,2003,19(2):102-103.
- [6] 郭 玮,缪 怡,徐雪亮. 诊断和监测肝损伤的检验项目检测要求(II)——介绍美国临床生化学院和美国肝病研究学会的建议[J]. 上海医学检验杂志,2001,16(5):317-320.