

①

血清 HBsAg 和 HBeAg 阳性乙型肝炎患者 HBsAg 浓度与 HBV 复制水平的关系

雷建华*, 杨旭, 罗红雨, 王文龙, 黄力

(中南大学湘雅二医院肝病研究中心, 长沙 410011)

[摘要] 目的:分析血清 HBsAg 和 HBeAg 阳性乙型肝炎病例的 HBsAg 浓度与 HBV 复制水平的关系,并探讨 HBsAg 浓度用于 HBeAg 阳性病例监测 HBV 复制水平的可行性。方法:随机抽取其中血清 HBsAg 和 HBeAg 阳性者共 296 例,应用荧光定量 PCR (fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR) 和时间分辨免疫荧光法 (time-resolved fluoroimmunoassay, TRIFA) 测定乙型肝炎病例的血清 HBV DNA 水平、血清 HBeAg 和 HBsAg 浓度。比较不同 DNA 复制水平病例的 HBsAg 浓度,以及不同 HBsAg 浓度病例的 DNA 水平,同时进行 HBsAg 浓度与 DNA 水平相关性分析。并根据不同浓度的 HBsAg 初步推测 HBV 复制状态的阳性预测值、阴性预测值和符合率。结果:若以血清 HBV DNA 大于或等于 10^5 拷贝/mL 为阳性,则其中 228 例为 DNA 阳性(77.03%)。血清 HBsAg 浓度与 HBV DNA 复制水平呈正相关,但不同 DNA 复制水平病例的 HBsAg 浓度差异并无统计学意义。除 HBsAg 浓度特别增高达 $180 \mu\text{g/L}$ 以上的病例 DNA 阳性率稍高外($\chi^2 = 3.998, P < 0.05$),其余不同 HBsAg 浓度的病例 DNA 阳性率及定量水平差异均无统计学意义。采用不同 HBsAg 浓度水平推测 HBV 复制状态的阳性预测值、阴性预测值及符合率差异无统计学意义。结论:血清 HBsAg 和 HBeAg 阳性乙型肝炎病例血清 HBsAg 浓度与 HBV 复制水平有一定相关性,但不宜以 HBsAg 浓度监测这些病例的 HBV 复制水平。

[关键词] 乙型肝炎病毒; 表面抗原; e 抗原; 脱氧核糖核酸; 时间分辨免疫荧光法

[中图分类号] R512.62 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2006)04-0548-04

Serum HBsAg concentration and HBV replication level in hepatitis B patients with positive serum HBsAg and HBeAg

LEI Jian-hua*, YANG Xu, LUO Hong-yu, WANG Wen-long, HUANG Li

(Liver Disease Research Center, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract: **Objective** To analyze the relationship between serum HBsAg concentration and HBV replication level in hepatitis B patients with positive serum HBsAg and HBeAg, and to explore the possibility of using serum HBsAg concentration as a marker of HBV replication level in hepatitis B patients with positive serum HBeAg. **Methods** HBV DNA level and serum HBeAg, HBsAg concentration of 296 patients with positive serum HBsAg and HBeAg were quantitatively detected by real-time fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR) and time-resolved fluoroimmunoassay (TRIFA) respectively. HBsAg concentrations were compared among patients with different HBV DNA levels, and HBV DNA levels were compared among patients with different HBsAg concentrations. The correlation between serum HBsAg concentration and DNA replication level were analyzed. The positive, negative predictive values and coincidence rates were speculated by various HBsAg concentrations. **Results** If HBV DNA positive was defined as HBV DNA levels no less than 10^5 copy/mL, then 228 (77.03%) patients were classified as HBV DNA positive. HBsAg concentration was positively corre-

①收稿日期:2005-07-13 作者简介:雷建华(1973-),男,湖南嘉禾人,主治医师,硕士,主要从事病毒性肝炎和遗传性肝病的研究。

* 通讯作者, E-mail: leijianhua73@yahoo.com.cn

lated with HBV DNA replication level, but among groups with various DNA replication levels, HBsAg concentration showed no significant statistical difference ($P > 0.05$). If the patients were divided into 2 groups, HBsAg concentration ($180 \mu\text{g/L}$) was served as the cutoff level, the DNA positive rate of the group with HBsAg concentration no less than $180 \mu\text{g/L}$ was significantly higher than that with HBsAg concentration less than $180 \mu\text{g/L}$ ($\chi^2 = 3.998, P < 0.05$). DNA positive rates and average DNA levels showed no significant statistical differences between the 2 groups, if HBsAg concentrations other than $180 \mu\text{g/L}$ were used as the cutoff level. Positive predictive values, negative predictive values and the coincidence rates speculated by various HBsAg concentrations as cutoff values did not show any significant statistical difference in estimating HBV replication levels. **Conclusion** To some extent, serum HBsAg concentration is related to HBV DNA replication level in hepatitis B patients with positive serum HBsAg and HBeAg, but it is not feasible to use HBsAg concentration to monitor their HBV replication levels.

Key words: hepatitis B virus; HBV surface antigen; HBV e antigen; deoxyribonucleic acid; time-resolved fluoroimmunoassay

[*J Cent South Univ (Med Sci)*, 2006,31(4):0548-04]

在乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染后的自然史中,特别是在抗病毒治疗的过程中,有部分 e 抗原 (HBV e antigen, HBeAg) 阳性的病例 HBV 复制水平并不高^[1]。尽管 HBV DNA 定量测定近年来被逐渐推广,但在乙肝病例的初诊、非肝炎专科接诊病例以及大规模流行病学筛查中,血清学检查仍为首选甚至唯一的病原学检查手段^[2]。因而,分析现有的血清学检查模式中表面抗原 (HBV surface antigen, HBsAg) 浓度与 HBV 复制水平的关系,探讨在 HBeAg 阳性时结合 HBsAg 浓度能否进一步提高初步推测 HBV 复制水平时符合率,或者血清 HBsAg 浓度水平在对确诊的 HBeAg 阳性乙肝患者动态监测体内 HBV 复制活跃程度的价值很有意义。

1 对象与方法

1.1 研究对象 从 2003 年至 2004 年在我中心同时定量测定血清 HBV DNA, HBsAg 和 HBeAg 的乙型肝炎病例中,以月为单位随机整群抽取 802 例,其中有血清 HBeAg 阳性的病例 296 例,分别为急性黄疸型肝炎 5 例、慢性轻度或中度肝炎 118 例、慢性重度 53 例、慢性重型 50 例、失代偿性肝硬化 64 例和急性或亚急性重型肝炎 6 例,其血清谷丙转氨酶均数分别为 977.24, 309.08, 276.36, 191.71, 80.02 和 485.48 U/L,凝血酶原时间均数分别为 14.80, 14.61, 17.93, 32.94, 24.59 和 33.35 s。全部患者的最后诊断符合 2000 年修订的病毒性肝炎防治方案^[3]。

1.2 试剂和仪器 HBV 荧光定量 PCR (fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR) 诊断试剂盒为广州达安基因诊断中心产品, GeneAmp[®] 5700 Sequence detection System 为美国 PE 公司设备。HBsAg 和 HBeAg 时间分辨免疫荧光法 (time-resolved fluoroimmunoassay, TRIFA) 定量测定试剂盒和 Anytest 2000 检测系统为上海新波生物技术公司产品。

1.3 测定方法

1.3.1 HBsAg 和 HBeAg 的测定 按试剂盒使用说明书进行 HBsAg 和 HBeAg TRIFA 测定,加入增强液后孵育 5 min, 30 min 内在 Anytest2000 检测系统中测量莹光强度,根据标准曲线读出每个测试样品的浓度^[4]。HBsAg 和 HBeAg 的检测限分别为 $0.01 \mu\text{g/L}$ 和 0.01Ncu/mL , 阳性标准分别为 $0.5 \mu\text{g/L}$ 和 0.03Ncu/mL 。

1.3.2 HBV DNA 的测定 血清 HBV DNA 的 FQ-PCR 测定按试剂盒使用说明书进行,PCR 条件为 $93 \text{ }^\circ\text{C}$ 2 min 预变性, $93 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 60 s 共 40 个循环,5700 SDS 软件系统自动处理并计算出样品 HBV 拷贝值^[5]。FQ-PCR 检测限为 10^3 拷贝/mL,参考病毒性肝炎防治方案^[3]和抗 HBV 的专家共识,以 10^5 拷贝/mL 作为 HBV DNA 复制活跃的标准。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 软件进行数据统计。在分析各组数据方差齐性后,采用方差分析 (F 值) 或秩和检验 (Kruskal-Wallis H 检验, χ^2 值) 进行均数比较,必要时进一步采用 Turkey 或 Tam-

hane's T_2 检验进行两两比较。比较应用不同水平 HBsAg 浓度初步推测 HBV 复制状态的阳性预测值、阴性预测值和符合率时,采用 χ^2 检验,多重分析采取逐级合并的组间 χ^2 检验。HBsAg 浓度与 DNA 水平相关性分析采用 Pearson 相关分析。

2 结 果

2.1 不同 HBV DNA 复制水平病例 HBsAg 浓度比较 共有 228 例(77.03%)血清 HBV DNA 大于或等于 10^5 拷贝/mL,其 ALT 水平与 DNA 小于 10^5 拷贝/mL 的病例的 ALT 水平差异无统计学意义($t = -0.678, P > 0.05$ 和 $F = 0.151, P > 0.05$),且二者血清 HBsAg 浓度差异无统计学意义($t = -1.902, P > 0.05$ 和 $\chi^2 = 9.104, P > 0.05$) (表 1 和表 2)。

表 1 HBV DNA 复制水平是否大于或等于 10^5 拷贝/mL 的两组病例 HBsAg 浓度比较

DNA 复制水平 (拷贝/mL)	例数	DNA 拷贝 数的对数值	转氨酶均值 (U/L)	HBsAg 浓度 ($\mu\text{g/L}$)
$<10^5$	68	0-	218.84	200.13 ± 54.71
$\geq 10^5$	228	≥ 5	255.63	215.02 ± 57.24

表 2 不同 HBV DNA 复制水平病例 HBsAg 浓度比较

DNA 复制水平 (拷贝/mL)	例数	DNA 拷贝 数的对数值	转氨酶均值 (U/L)	HBsAg 浓度 ($\mu\text{g/L}$)
$<10^5$	68	0-	218.84	200.13 ± 54.71
$\geq 10^5$	34	5-	263.46	182.94 ± 79.95
$\geq 10^6$	34	6-	239.28	218.13 ± 47.19
$\geq 10^7$	104	7-	250.79	219.90 ± 60.61
$\geq 10^8$	56	8-	269.95	223.56 ± 26.62

2.2 HBsAg 浓度和 HBV DNA 复制水平相关性分析 对血清 HBsAg 浓度与 DNA 复制拷贝数对数值进行 Pearson 相关分析,相关系数为 0.150 ($P < 0.05$),示二者显著相关。

2.3 不同血清 HBsAg 浓度病例 HBV DNA 复制水平比较 HBeAg 阳性病例 HBsAg 浓度较高,180 $\mu\text{g/L}$ 以上占 87.84%。除 HBsAg 浓度小于 5 $\mu\text{g/L}$ 的病例中仅 3 例病例无统计分析意义外,经逐级合并的组间 χ^2 检验分析,HBsAg 浓度小于 150 $\mu\text{g/L}$ 的病例中(HBsAg 浓度为 0.5, 5, 50 $\mu\text{g/L}$ 时)HBV DNA 大于或等于 10^5 拷贝/mL 的构成比差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。HBsAg 浓度小于 180 $\mu\text{g/L}$ 的病例(HBsAg 浓度为 0.5, 5, 50, 150 $\mu\text{g/L}$ 时)合并后与 HBsAg 180 $\mu\text{g/L}$ 以上的 260 例比较,则后者 DNA 大于或等于 10^5 拷贝/mL 的构成比显著升高($\chi^2 = 3.998, P = 0.046$)。不

同 HBsAg 浓度的病例其 DNA 复制水平总体比较差异无统计学意义($F = 1.659, P > 0.05$),其中 DNA 复制活跃病例的 DNA 水平总体比较差异有统计学意义($F = 2.657, P > 0.05$),但采用 Turkey 检验进行两两比较,结果显示各两组间差异无统计学意义(均 $P > 0.05$) (表 3)。

表 3 不同血清 HBsAg 浓度病例 HBV DNA 复制水平比较

HBsAg 浓度 ($\mu\text{g/L}$)	例数	不同 DNA 复制 水平的例数		DNA 拷贝数对数值($\bar{x} \pm s$)	
		$<10^5$	$\geq 10^5$ (%)	全部	DNA $\geq 10^5$ 拷贝/mL 者
0.5-	3	0	3(100)	6.41 ± 1.05	6.41 ± 1.05
5-	8	3	5(62.50)	3.87 ± 3.31	6.19 ± 1.08
50-	14	6	8(57.14)	4.32 ± 3.53	6.94 ± 1.36
150-	11	4	7(63.64)	5.75 ± 2.30	7.08 ± 0.73
180-	260	55	205(78.85)	5.87 ± 3.05	7.35 ± 0.98

2.4 应用不同 HBsAg 浓度水平推测 HBV 复制状态的可行性分析 根据不同 HBsAg 浓度水平推测 HBV 复制状态的阳性预测值均较高,且统计学分析表明阳性预测值、阴性预测值和符合率差异均无统计学意义(分别 $\chi^2 = 0.422, 1.098$ 和 0.481 ,均 $P > 0.05$) (见表 4 和表 5)。

表 4 应用 HBsAg 水平评估 HBeAg 阴性乙肝病例 HBV DNA 水平结果

HBsAg 水平 ($\mu\text{g/L}$)	DNA $\geq 10^5$ 拷贝/mL 的病例数	DNA $< 10^5$ 拷贝/mL 的病例数
≥ 5	225	68
< 5	3	0
≥ 50	220	65
< 50	8	3
≥ 150	212	59
< 150	16	9
≥ 180	205	55
< 180	23	13

表 5 应用 HBsAg 水平评估 HBeAg 阴性乙肝病例 HBV DNA 复制水平的可靠性

选用的 HBsAg 水平($\mu\text{g/L}$)	HBV DNA 复制水平的可靠性		
	阳性预测值(%)	阴性预测值(%)	符合率(%)
5	76.79	0	76.01
50	77.19	27.27	75.34
150	78.23	36.00	74.66
180	78.85	36.11	73.65

2.5 以 HBsAg 180 $\mu\text{g/L}$ 和低水平的阳性 HBeAg 评估 HBV DNA 复制状态的结果 分别以 HBsAg 180 $\mu\text{g/L}$ 或 HBeAg 0.03 Ncu/mL 为临界值推测 HBV DNA 复制水平(后者阳性预测值为 77.03%),结果表明两者阳性预测值差异无统计学

意义($\chi^2 = 0.266, P > 0.05$);比较以 HBeAg 0.03 Ncu/mL, HBeAg 0.15 Ncu/mL 为临界值推测 HBV DNA 复制水平(后者阳性预测值 81.82%, 阴性预测值 51.16%, 符合率 77.36%), 阳性预测值和阴性预测值差异均无统计学意义(分别 $\chi^2 = 0.716, 0.180$, 均 $P > 0.05$), 三者符合率差异无统计学意义($\chi^2 = 1.371, P > 0.05$), 说明以 HBsAg 180 $\mu\text{g/L}$ 与以各水平 HBeAg 单独推测 HBV 复制状态无优势。

3 讨 论

血清 HBeAg 和 HBV DNA 水平均可反映乙肝患者体内 HBV 复制活跃程度, 但二者变化规律不同, 在 HBV 感染后的自然史中, 特别是在抗病毒治疗的过程中, 有部分 HBeAg 阳性的病例 HBV 复制水平并不高, 对此类病例了解其 HBV 复制活跃程度只能反复进行 DNA 水平测定^[1]。

HBV DNA 水平测定是评估 HBV 复制水平的主要方法。尽管 HBV DNA 的定量测定近年来逐渐在各级医院得以推广, 但由于设备复杂和检验环境防污染条件要求严格, 在乙肝病例的初诊、非肝炎专科接诊病例及大规模流行病学筛查中, 血清学检查仍为首选甚至是唯一的病原学检查手段^[2]。

血清 HBsAg 是 HBV 感染的主要标志, 广泛应用于乙型肝炎初筛和诊断^[2], 尽管由于许多慢性 HBV 感染者的 HBsAg 浓度非常高, 无法确定 HBsAg 浓度和病毒血症的精确定量关系, 仍有不少研究报道了 HBV DNA 水平和 HBsAg 浓度的正相关关系, 并认为 HBsAg 浓度在一定程度上可用于推测 HBV 复制水平^[6,7]。

本文的 296 例 HBeAg 阳性乙型肝炎病例中有 228 例(77.03%) 血清 HBV DNA 大于或等于 10^5 拷贝/mL, 表明 HBeAg 与 HBV 复制水平具有良好的相关性, 但仍然有近 1/3 的病例血清 HBV DNA 小于 10^5 拷贝/mL。统计学分析发现, 尽管血清 HBsAg 浓度与 HBV DNA 复制水平呈正相关, 不同 DNA 复制水平病例的 HBsAg 浓度并无统计学差异。除 HBsAg 浓度特别增高达 180 $\mu\text{g/L}$ 以上的

病例中 DNA 大于或等于 10^5 拷贝/mL 的构成比稍高外, 其余不同 HBsAg 浓度的病例其 DNA 大于或等于 10^5 拷贝/mL 的构成比及 DNA 复制水平差异均无统计学意义。采用不同 HBsAg 浓度水平来推测 HBV 复制状态, 其阳性预测值、阴性预测值及符合率差异也无统计学意义。

尽管血清 HBsAg 和 HBeAg 阳性乙型肝炎病例的血清 HBsAg 浓度与 HBV 复制水平有一定相关性, 但不同 HBV DNA 复制水平的病例 HBsAg 浓度差异并无统计学意义, 结合 HBsAg 浓度并不能协助提高初步推测 HBV 复制水平的符合率。总之, 血清 HBsAg 浓度水平在确诊 HBeAg 阳性乙肝患者动态监测体内 HBV 复制活跃程度的过程中并无参考意义, 这一结论尚有待进一步确认。

参考文献:

- [1] 杨旭, 罗红雨, 张永红, 等. 乙型肝炎病毒载量与抗原抗体模式的关系[J]. 中华肝脏病杂志, 2002, 10(4): 169-271.
- [2] Wen YM. Laboratory diagnosis of hepatitis in China: the present and the future[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2001, 39(12): 1183-1189.
- [3] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝脏病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(6): 324-329.
- [4] 罗开忠, 杨旭, 苏先狮, 等. 应用时间分辨免疫荧光法检测乙型肝炎病毒标志物[J]. 中华肝脏病杂志, 2003, 11(9): 569.
- [5] 雷建华, 杨旭, 黄力. 荧光定量 PCR 与常规 PCR 检测血清乙型肝炎病毒的对比观察[J]. 临床内科杂志, 2003, 20(1): 20-21.
- [6] Deguchi M, Yamashita N, Kagita M, et al. Quantitation of hepatitis B surface antigen by an automated chemiluminescent microparticle immunoassay[J]. *J Virol Methods*, 2004, 115(2): 217-222.
- [7] Chen CH, Lee CM, Wang JH, et al. Correlation of quantitative assay of hepatitis B surface antigen and HBV DNA levels in asymptomatic hepatitis B virus carriers[J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2004, 16(11): 1213-1218.

(本文编辑 傅希文)