论著

文章编号:1000-5404(2011)19-2058-03

乙型肝炎病毒核酸相关抗原在评价病毒复制中的应用价值

王 强[1,2],汪光蓉[1,2],凡瞿明[2],赵明才[1,2],唐 中[1,2],何 兰[2],张国元[1,2] (637000 四川 南充,川北医学院:医学检验系[1],附属医院检验科[2])

[摘要] **目的** 通过对乙型肝炎病毒核酸相关抗原(hepatitis B virus nucleic acid related antigen, HBV NRAg)与HBeAg和乙型肝炎病毒DNA(hepatitis B virus DNA, HBV DNA)之间的比较,探讨HBV NRAg在评价病毒复制中的应用价值。**方法** 收集157例HBsAg阳性血清,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)、化学发光微粒子免疫测定(CMIA)和荧光定量PCR法分别对血清进行HBV NRAg、HBeAg和HBV DNA含量检测。同时对188例HBsAg阴性血清进行HBV NRAg特异性检测。**结果** 157例HBsAg阳性血清中,HBV NRAg, HBeAg和HBV DNA阳性率分别为75.79%(119/157)、37.57%(59/157)和51.59%(81/157),HBV NRAg与HBeAg和HBV DNA比较,差别有统计学意义($\chi^2=19.88$, $P=0.000$; $\chi^2=46.69$, $P=0.000$)。分别在HBeAg和HBV DNA阳性病例中,HBV NRAg S/CO值与HBeAg S/CO值和HBV DNA基因组拷贝数呈正相关($r=0.506$, $P=0.000$; $r=0.499$, $P=0.000$)。在一致性评价中,HBV NRAg同HBeAg和HBV DNA两个指标联合用于评价病毒复制的一致性较好(Kappa=0.52),其阳性符合率为94.79%,总符合率为78.98%。HBV NRAg ELISA检测特异性为99.40%。**结论** HBV NRAg可作为临床评价HBV复制以及乙肝治疗效果监测的初筛指标,适合在各个层次的医院开展检测。

[关键词] 乙型肝炎病毒核酸相关抗原;HBeAg;HBV DNA;HBV复制

[中图法分类号] R373.21; R446.6 [文献标志码] A

Value of hepatitis B virus nucleic acid related antigen in evaluating hepatitis B virus replication

Wang Qiang[1,2], Wang Guangrong[1,2], Fan Quming[2], Zhao Mingcai[1,2], Tang Zhong[1,2], He Lan[2], Zhang Guoyuan[1,2] ([1]Faculty of Laboratory Medicine, [2]Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital, North Sichuan Medical college, Nanchong, Sichuan Province, 637000, China)

[**Abstract**] **Objective** To evaluate the correlations of hepatitis B virus nucleic acid related antigen (HBV NRAg), HBeAg and HBV DNA in HBsAg positive patients and to investigate the value of HBV NRAg in evaluating HBV replication. **Methods** A total of 157 serum samples were collected from HBsAg positive patients, and the levels of HBV NRAg, HBeAg and HBV DNA were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) and real-time PCR respectively. ELISA detection of HBV NRAg was also performed in 188 HBsAg-negative serum samples. **Results** In HBsAg-positive serum, the positive rates of HBV NRAg, HBeAg, and HBV DNA were 75.79% (119/157), 37.57% (59/157), and 51.59% (81/157) respectively. HBV NRAg positive rate was significantly different as compared with HBeAg and HBV DNA (Chi square = 19.88, $P=0.000$; Chi square = 46.69, $P=0.000$). HBV NRAg S/CO value was positively correlated with HBeAg S/CO value and HBV DNA genomic copy number in HBeAg positive cases and HBV DNA positive cases, respectively ($r=0.506$, $P=0.000$; $r=0.499$, $P=0.000$). HBV NRAg as an evaluation index for virus replication was in good concordance with the combined indices of HBeAg and HBV DNA (Kappa = 0.52). The positive coincidence rate was 94.79%, and the total coincidence rate was 78.98%. Test specificity of HBV NRAg ELISA was 99.40%. **Conclusion** HBV NRAg can be used as a preliminary screening index for clinical evaluation of HBV replication and monitoring of hepatitis B treatment outcome for hospitals at all levels.

[**Key words**] HBV nucleic acids related antigen; HBeAg; HBV DNA; HBV replication

Corresponding author: Zhang Guoyuan, E-mail: zhangguoyuan9826@126.com

[通信作者] 张国元,E-mail: zhangguoyuan9826@126.com

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是引起乙型肝炎的病原体。据统计,全世界大约有4亿HBV慢性感染者,每年死亡人数超过50万,而我国大约有超过1.2亿的HBV感染者,人群HBV慢性感染率接近10%[1-4]。HBV自身不具有细胞溶解能力,但其持续性的感染常引起免疫介导的肝细胞损伤,并影响着疾病的进程,而感染者体内HBV的持续性感染与HBV的复制有关[5]。因此临床常运用HBeAg和HBV DNA来评价HBV复制情况,然而长期的临床观察发现,在许多的HBeAg阴性患者血清中仍能检测出高拷贝数的HBV基因组。而HBV DNA通常采用PCR的方法,其对操作环境和技术人员的素质要求较高,不利于在基层医院开展检测[6]。因此寻找一种有效的、简便的判断HBV复制的检测指标,从而达到控制病毒复制的目的就显得尤为重要。HBV核酸相关抗原(hepatitis B virus nucleic acid related antigen, HBV NRAg)是HBV前S_1抗原与HBcAg的总称,本试验将通过对HBV NRAg与临床常规运用于评价HBV复制的2个指标(HBeAg和HBV DNA)的比较,以评价HBV NRAg在临床检测中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 主要器材

HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb和HBcAb定量检测试剂盒购于美国ABBOTT公司,检测仪器为Architect i2000 SR全自动化学发光免疫分析仪;HBV NRAg ELISA检测试剂盒购于北京万泰生物药业股份有限公司;HBV DNA定量检测试剂盒购于上海科华生物工程股份有限公司,检测仪器为科华Fluo Cycle型荧光定量PCR仪。

1.2 试验方法

收集乙型肝炎血清标志物定量检测者血清,用无菌吸头将其分装为2管:一管血清保存于-20 ℃冰箱内。然后运用CMIA对另一管血清进行HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb和HBcAb的定量检测。阳性判断标准严格按照试剂盒说明书进行,其中HBsAg > 0.05 IU/ml时判定为HBsAg阳性;HBeAg S/CO≥1.000时判定为HBeAg阳性。

其中的157例HBsAg阳性冷藏血清,先运用荧光定量PCR法对HBV DNA进行定量检测,然后运用ELISA法检测HBV NRAg。同时对188例HBsAg阴性血清进行HBV NRAg检测。以上操作步骤及阳性判断标准均严格按照试剂盒说明书进行,以基因拷贝数 > 10^3copies/ml判定HBV DNA阳性,HBV NRAg S/CO≥1.000时判定为HBV NRAg阳性。

1.3 统计学分析

运用SPSS 12.0统计软件进行统计学处理。阳性率比较采用Pearson卡方检验,相关性分析用Pearson相关系数表示。运用Kappa值进行一致性判断:Kappa≤0.40表明一致性较差,0.40 < Kappa≤0.60表明一致性较好,0.60 < Kappa≤0.80表明有较高的一致性,Kappa > 0.80表明一致性极好。

2 结果

2.1 HBV NRAg与HBeAg和HBV DNA阳性率比较

157例HBsAg阳性血清中,HBV NRAg, HBeAg和HBV DNA阳性例数分别为119例、59例和81例,阳性率分别为75.79%、37.57%和51.59%,HBV NRAg与HBeAg和HBV DNA比较,差别有统计学意义($\chi^2 = 19.88$, $P = 0.000$; $\chi^2 = 46.69$, $P = 0.000$)。188例HBsAg阴性血清中,HBV NRAg阳性1例(S/CO = 1.38),HBV NRAg ELISA检测特异性为99.4%。见表1。

表1 157例HBsAg阳性人群不同检测指标阳性率比较[例数(%)]

检测指标	阳性	阴性
HBV NRAg	119(75.79%)[ab]	38(24.21%)
HBeAg	59(37.57%)	98(62.43%)
HBV DNA	81(51.59%)	76(48.41%)

a: $P < 0.01$, 与HBeAg比较; b: $P < 0.01$, 与HBV DNA比较

2.2 HBV NRAg与HBeAg和HBV DNA的相关性分析

在59例HBeAg阳性病例中,HBV NRAg的S/CO值与HBeAg的S/CO值呈正相关($r = 0.506$, $P = 0.000$);在81例HBV DNA阳性病例中,HBV NRAg的S/CO值和HBV DNA基因组拷贝数呈正相关($r = 0.499$, $P = 0.000$)。

2.3 HBV NRAg与HBeAg和HBV DNA的符合情况

HBV NRAg与HBeAg的阳性符合率为100%(59/59),总符合率为61.78%(97/157),一致性较差(Kappa = 0.33);HBV NRAg与HBV DNA阳性符合率为92.59%(75/81),总符合率为68.15%(107/157),一致性较差(Kappa = 0.35);而HBV NRAg同HBeAg和HBV DNA两个指标联合用于评价病毒复制的一致性较好(Kappa = 0.52),其阳性符合率为94.79%(91/96),总符合率为78.98%(124/157)。见表2。

表2 HBV NRAg与HBeAg和HBV DNA的结果比较

HBV NRAg	HBeAg +	HBeAg −	Kappa	HBV DNA +	HBV DNA −	Kappa	HBeAg + 和(或) HBV DNA +	HBeAg − 和 HBV DNA −	Kappa
阳性	59	60	0.33	75	44	0.35	91	28	0.52
阴性	0	38		6	32		5	33	

3 讨论

在HBV复制的过程中,病毒抗原成分HBsAg, HBeAg和HBcAg在肝细胞内表达,然后随Dane颗粒一起释放入外周血,HBcAg在乙型肝炎病毒的装配、释放、清除过程中起着重要作用[7-8]。由于HBcAg在细胞外只存在于Dane颗粒中,被病毒外膜所包裹,无

法检出。因此临床常运用HBeAg和HBV DNA来评价HBV复制情况。然而长期的临床观察发现,HBeAg并不是一个非常灵敏的指标,在许多的HBeAg阴性患者血清中仍能检测出高拷贝数的HBV基因组。而HBV DNA通常采用PCR的方法,其对操作环境和技术人员的素质要求较高,不利于在基层医院开展检测。近年来,前S_1抗原检测越来越受到重视,然而袁权等[6]通过比较2种在国内运用较为广泛的前S_1抗原试剂盒,发现在HBV DNA $>10^3$ copies/ml的患者中,存在着较高的漏检率(10%和36%)。因此寻找一种有效的判断HBV复制,同时对其检测要求不高,适合在各个层次医院开展的检测指标就显得非常重要。

HBV NRAg是HBV前S_1抗原与HBcAg的总称,HBV NRAg ELISA检测试剂盒是由厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心与北京万泰生物药业有限公司联合开发的一种用于评价HBV复制的新方法。然而关于该指标应用于临床评价HBV复制的价值少有报道。通过试验,我们发现在HBsAg阳性血清中,HBV NRAg阳性率明显高于HBeAg和HBV DNA。对HBsAg阴性血清进行检测,发现188例血清仅1例血清HBV NRAg阳性,HBV NRAg ELISA检测特异性为99.4%,这与袁权等[6]报道的99.7%基本一致,同时我们对该血清进行HBV DNA检测,发现HBV DNA阴性,因此我们认为这可能是由于洗涤不彻底造成的非特异性显色而引起的假阳性。以上结果表明HBV NRAg在诊断HBV复制方面具有很好的灵敏度和特异性。

对于HBV NRAg与HBV DNA的总符合率仅为68.15%,两者之间一致性较差的原因,我们分析除了由于HBV NRAg ELISA检测方法的灵敏度较高,HBV NRAg用于评价HBV复制时可能会存在一定的假阳性之外,还与采用的HBV DNA临界值有关,以$>10^3$ copies/ml判定HBV DNA阳性有可能造成一定低拷贝数患者血清的漏检。而对于张华等[9]报道HBV NRAg与HBV DNA之间的总符合率为90.70%,与本试验的68.15%明显不符,关于两者之间的差异,我们分析主要是由于选择的试验对象不同造成,同时我们认为,与文献中的HBsAg阳性和阴性人群作为试验对象相比,仅以HBsAg阳性人群作为试验对象,也许能更好地说明HBV NRAg与HBV DNA之间的符合程度。通过试验,我们发现HBV NRAg与HBeAg和HBV DNA两个指标联合用于评价病毒复制的一致性较好(Kappa = 0.52),HBV NRAg S/CO值与HBeAg S/CO值和HBV DNA基因组拷贝数呈正相关,表明HBV NRAg可作为评价HBV复制情况,判断乙肝抗病毒治疗效果的指标。在HBV DNA阳性患者血清中,有6例血清HBV NRAg阴性,其中4例基因拷贝数$<10^4$ copies/ml,2例基因拷贝数$<10^5$ copies/ml,因此我们无法判断是PCR操作过程中存在污染造成HBV DNA的假阳性还是由于HBV NRAg的漏检造成,这或许可以在以后更为严格的PCR操作中获得答案。

综上所述,HBV NRAg存在能够表明HBV的复制,并且与常规评价HBV复制的指标之间的一致性较好,结果之间存在明显的正相关。同时HBV NRAg ELISA实验操作简单,对实验环境和技术人员的要求不高,因此HBV NRAg可作为临床评价HBV复制以及乙肝治疗效果监测的初筛指标,适合在各个层次的医院开展检测。

参考文献:

[1] Guo Y, Liu J, Meng L, *et al*. Survey of HBsAg-positive pregnant women and their infants regarding measures to prevent maternal-infantile transmission[J]. BMC Infect Dis, 2010, 10: 26.

[2] Tessema B, Yismaw G, Kassu A, *et al*. Seroprevalence of HIV, HBV, HCV and syphilis infections among blood donors at Gondar University Teaching Hospital, Northwest Ethiopia: declining trends over a period of five years[J]. BMC Infect Dis, 2010, 10: 111.

[3] Lee M J, Jin Y H, Kim K, *et al*. Expression of hepatitis B virus x protein in hepatocytes suppresses CD8 T cell activity[J]. Immune Netw, 2010, 10(4): 126-134.

[4] Mumtaz K, Ahmed U S, Memon S, *et al*. Virological and clinical characteristics of hepatitis delta virus in South Asia[J]. Virol J, 2011, 8(1): 312.

[5] Zhang J Y, Zou Z S, Huang A, *et al*. Hyper-Activated Pro-Inflammatory CD16$^+$ Monocytes Correlate with the Severity of Liver Injury and Fibrosis in Patients with Chronic Hepatitis B[J]. PLoS One, 2011, 6(3): e17484.

[6] 袁权, 葛胜祥, 闫强, 等. 一种联合检测乙型肝炎病毒前S1抗原与核心抗原方法的建立及其与病毒核酸检测结果的一致性[J]. 病毒学报, 2007, 23(4): 252-257.

[7] Alvarez-Suárez B, de-la-Revilla-Negro J, Ruiz-Antorán B, *et al*. Hepatitis B reactivation and current clinical impact[J]. Rev Esp Enferm Dig, 2010, 102(9): 542-552.

[8] 陆荫英, 杨永平, 王琳, 等. 乙型肝炎病毒核心抗原肝细胞结合新蛋白的功能研究[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(13): 1413-1416.

[9] 张华, 罗振元, 黄圣文, 等. 血清HBV NRAg的临床应用探讨[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(8): 930-932.

(**收稿**:2011-04-23;**修回**:2011-07-09)

(编辑 邓强庭)