

网络出版时间: 2019-5-9 10:21 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190506.1438.026.html>

超敏 HBV DNA 检测在慢性 HBV 感染者中的动态监测价值

王同同¹, 郝玉峰¹, 曹雯君², 叶 郡², 邹桂舟², 李绪桐¹, 孔雪杰¹

摘要 目的 探讨超敏检测技术对传统 PCR 法检测 HBV DNA 阴性的慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染者的临床应用价值。方法 收集 370 例传统 PCR 法检测 HBV DNA ≤ 500 IU/ml 的慢性 HBV 感染者的血清标本,同时检测对应的超敏 HBV DNA 水平,并分析与谷丙转氨酶(ALT)、乙型肝炎病毒 E 抗原(HBeAg)以及肝功能其他指标的相关性。结果

超敏检测法(-)和超敏检测法(+)两组中 ALT 异常率比较差异有统计学意义($\chi^2 = 3.905$, $P = 0.048$), HBeAg 阳性率比较差异有统计学意义($\chi^2 = 14.264$, $P < 0.05$);按抗病毒治疗时间不同,超敏 HBV DNA 阳性率趋势检验结果显示负相关($\chi^2 = 39.823$, $P < 0.001$),而 ALT 异常中超敏 HBV DNA 阳性率比较差异有统计学意义($\chi^2 = 18.922$, $P = 0.001$),其中两两比较采用 Bonferroni 法调整 α 水平,显示未治疗组与治疗两年、三年差异有统计学意义($P = 0.002$, $P = 0.001$)。结论 超敏定量检测技术对传统法检测 HBV DNA 阴性的患者,可以更加准确了解病毒复制情况,帮助选择最佳治疗方案,预测预后。

关键词 乙型肝炎病毒;超敏检测;传统 PCR 法;谷丙转氨酶

中图分类号 R 512.6+2; R 446.11

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)05-0785-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.05.026

慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是全球性的公共卫生问题,可导致严重的感染后果,包括肝硬化和肝癌,DNA 作为病毒复制最重要的指标,可反映肝炎病毒的复制活性,能够对慢性 HBV 感染患者进行病情评估和疗效监测^[1-2]。慢性乙型肝炎防治指南(2015 版)指出慢性 HBV 感染治疗目标是最大限度长期抑制 HBV 复制,HBV DNA 检测不到^[3]。但目前临床上采用的传统荧光定量 PCR 法,对于病毒载量 ≤ 500 IU/ml 的标本,无法准确的反映病毒复制情况,允许病毒在低水平的

复制,造成肝脏持续的炎症损伤,肝功能的异常不能及时找出原因,给临床工作带来一定困扰,同时指南已指出对于 HBV DNA 的检测建议采用灵敏度和精确度高的检测方法。该文利用超敏 HBV DNA 的检测技术试图从病毒学的角度给出部分解释;同时结合乙型肝炎病毒 E 抗原(hepatitis B e antigen, HBeAg)、谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)以及肝功能其他主要指标进一步探讨超敏 HBV DNA 的临床应用价值^[4-5]。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2017 年 1 月~2018 年 1 月就诊于安徽医科大学第二附属医院感染科 370 例传统 PCR 法检测 HBV DNA 阴性的门诊患者,男女比例为 4.67(182/39),年龄 19~74(44.36 $\pm$ 12.12)岁,其中未治疗的 149 例,治疗组 221 例;治疗组按照超敏结果分为超敏阴性组、超敏阳性组;按照治疗时间又分为治疗半年、1 年、2 年、3 年,分别为 47 例、63 例、41 例、56 例。入组标准:① 诊断均符合中国慢性乙型肝炎防治指南(2015 版)的诊断标准,既往有乙肝病史或 HBsAg 阳性超过 6 个月;② 排除酒精性肝病、脂肪肝、自身免疫性肝病、其他嗜肝病毒以及环境因素引起的肝功能异常;③ 排除合并其他系统疾病,如心血管疾病、风湿免疫系统疾病、代谢性疾病等;④ 排除梅毒、艾滋病等感染性疾病。所有入组的研究对象均签署知情同意书。

1.2 检测方法

1.2.1 HBV DNA 两种方法的血清水平检测 收取患者空腹静脉血标本,3 500 r/min 离心 5 min,分离血清,-80℃低温保存,避免反复冻融。超敏 HBV DNA 水平检测采用德国进口 QIA-symphony 磁珠吸附法全自动核酸检测仪及其配套试剂,正常范围 ≤ 20 IU/ml;传统 HBV DNA 检测采用美国 Agilent Mx3000P 检测仪,试剂盒为上海复星长征医学科学有限公司的乙型肝炎病毒核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法),正常范围 ≤ 500 IU/ml。

1.2.2 其他临床指标检测 乙肝五项定量采用雅培化学发光检测;肝功能采用美国 Beckman 公司全

2019-01-30 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1608085MH164)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院感染科,合肥 230022

²安徽医科大学第二附属医院感染科,合肥 230601

作者简介:王同同,女,硕士研究生;

郝玉峰,男,主任医师,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: aygyf@126.com

自动生化检测仪及配套试剂分别检测,其中包括 ALT(正常范围: 9 ~ 50 U/L)、谷草转氨酶(aspartate transaminase ,AST) (正常范围: 15 ~ 40 U/L)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase ,ALP) (正常范围: 35 ~ 135 U/L)、谷氨酰转肽酶(glutamyltranspeptidase ,GGT) (正常范围: 7 ~ 45 U/L)、总胆红素(total bilirubin ,TBIL) (正常范围: 3.4 ~ 17.1 $\mu\text{mol/L}$)、直接胆红素(direct bilirubin ,DBIL) (正常范围: 0.0 ~ 3.4 $\mu\text{mol/L}$)、白蛋白(albumin ,ALB) (正常范围: 40 ~ 55 g/L)、球蛋白(globulin ,GLB) (正常范围: 20 ~ 40 g/L)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0、GraphPad Prism 5.0 软件进行统计分析。正态分布统计描述以 $\bar{x} \pm s$ 表示,非正态分布以中位数(四分位间距) [$M(P_{25}, P_{75})$] 描述,定量资料组间数据比较采用 Mann-Whitney U(两独立样本)非参数检验,用于观察超敏 HBV DNA ≤ 20 IU/ml 和 > 20 IU/ml 两组中肝功能各指标血清学水平差异;定性资料组间比较采用 χ^2 检验以及 Fisher 精确检验,前者以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,后者采用 Bonferroni 法调整 α 水平为 0.005;采用 Cochran-Armitage 检验判断超敏 HBV DNA、ALT 与治疗时间是否存在线性趋势。

2 结果

2.1 超敏 HBV DNA 与 ALT、HbeAg 相关性 入组 221 例核酸初治且传统法检测 HBV DNA 阴性的乙肝病毒感染者作为研究对象,超敏阳性率为 44.34%;传统检测法(-)超敏检测法(-)组 123 例,传统检测法(-)超敏检测法(+)组 98 例,两组中 ALT 异常率分别为 23.58% (29/123)、35.71% (35/98), χ^2 检验两组比较差异有统计学意义($\chi^2 = 3.905$, $P = 0.048$);AST 异常率分别为 26.82% (33/123)、28.57% (28/98),两组比较差异无统计学意义($\chi^2 = 0.083$, $P = 0.773$);HbeAg 阳性率分别为

21.95%、45.91%,两组比较差异有统计学意义($\chi^2 = 14.264$, $P < 0.05$)。

2.2 肝功能中主要指标在两组中的统计描述 两组中肝功能主要指标统计描述见图 1、表 1。肝功能各指标血清学水平比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

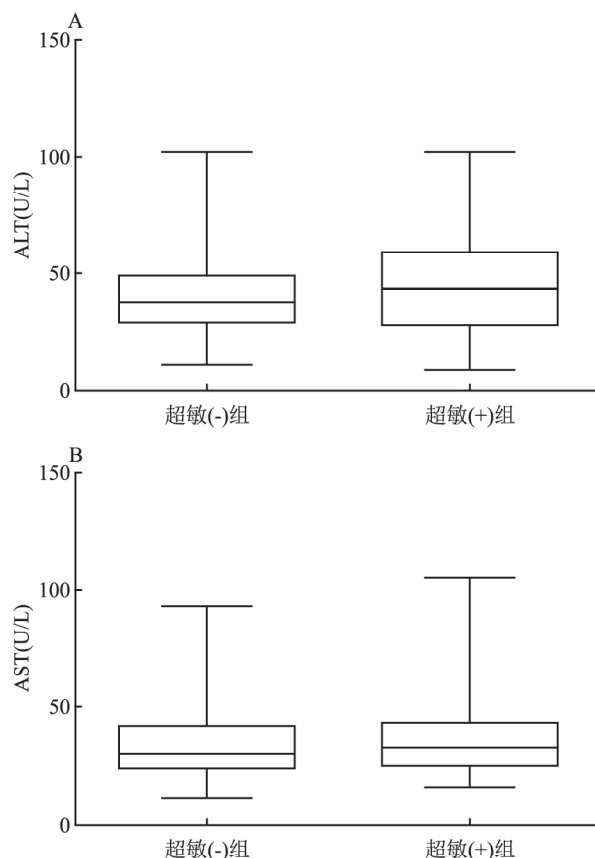


图1 超敏(-)组与超敏(+)组两组中 ALT、AST 血清水平比较
A: 两组中 ALT 血清水平的比较; B: 两组中 AST 血清水平的比较

2.3 治疗时间与超敏 HBV DNA 和 ALT 之间的趋势关系 进一步将所有患者按照治疗时间长短分为未治疗、半年、1 年、2 年、3 年,超敏 HBV DNA 阳性率分别为 74.49%、61.70%、52.38%、29.26%、

表1 两组中各肝功能指标统计描述

项目	$M(P_{25}, P_{75}) / \bar{x} \pm s$		最小值 ~ 最大值	
	超敏(-)	超敏(+)	超敏(-)	超敏(+)
ALT(U/L)	38.00(29.00 ,49.00)	43.50(28.00 ,59.25)	11.00 ~ 102.00	9.00 ~ 121.00
AST(U/L)	30.00(24.00 ,42.00)	32.50(24.75 ,43.25)	11.00 ~ 93.00	16.00 ~ 105.00
GGT(U/L)	36.00(25.00 ,60.00)	33.00(21.00 ,59.50)	7.00 ~ 377.00	11.00 ~ 325.00
ALP(U/L)	83.00(68.00 ,112.00)	85.50(69.75 ,104.25)	36.00 ~ 572.00	19.00 ~ 831.00
TBIL($\mu\text{mol/L}$)	17.20(11.20 ,22.30)	14.65(11.67 ,21.32)	5.20 ~ 450.20	6.00 ~ 296.80
DBIL($\mu\text{mol/L}$)	3.90(2.60 ,5.30)	3.60(2.77 ,4.95)	0.80 ~ 300.70	1.10 ~ 134.20
ALB(g/L)	41.20(36.10 ,43.40)	41.65(37.06 ~ 43.63)	17.00 ~ 50.40	17.20 ~ 48.80
GLB(g/L)	32.60 $\pm$ 5.70	31.94 $\pm$ 5.01	19.40 ~ 54.70	20.80 ~ 45.20

33.93%, ALT 异常率分别为 41.61%、27.65%、34.92%、29.26%、26.78%。二者均采用 Cochran-Armitage 趋势检验判断与治疗时间是否存在线性趋势, 检验结果显示超敏 HBV DNA 与治疗时间存在明显的负性相关 ($\chi^2 = 39.823, P < 0.001$), 即患者治疗时间越长, 超敏 HBV DNA 阳性率降低, 而 ALT 也有一定的趋势关系 ($\chi^2 = 4.029, P = 0.045$)。另外结果显示抗病毒治疗半年、1 年、2 年, 超敏 HBV DNA 阳性率均大于 50%。

2.4 传统 PCR 法检测 HBV DNA 阴性的 CHB 患者其 ALT 异常中超敏 HBV DNA 阳性率 ALT 异常中超敏 HBV DNA 阳性率分别为 77.41%、76.92%、59.09%、30.77%、31.25%。采用 Fisher 精确检验 ($2 \times C$) 结果显示 5 组差异有统计学意义 ($\chi^2 = 18.922, P = 0.001$); 两两比较采用 Bonferroni 法调整 α 水平, 结果显示未治疗组与治疗 2 年、3 年差异有统计学意义 ($P = 0.002, P = 0.001$)。

3 讨论

HBV DNA 定量检测主要用于判断患者体内病毒的复制情况, 指导治疗方案的选择和疗效的判断。现临床上应用较多的是传统荧光 PCR 检测技术, 采用热裂解法人工进行血清核酸提取纯化, 项目价格低, 故临床应用较广, 但对于病毒载量 ≤ 500 IU/ml 的患者无法精确定量分析, 从而造成漏检, 而超敏 HBV DNA 检测技术定量线性范围宽, 降低了漏检率, 采用磁珠吸附法全自动核酸提取系统对血清标本进行核酸提取纯化, 回收率高, 重复性好, 定量方法采用内源性内参, 定量分析更加准确, 对于低病毒载量的患者更具优势^[6-7]。

戎国栋等^[8]研究结果显示超敏法阳性检出率高于传统 PCR 法, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。本研究入组 221 例抗病毒治疗且传统法检测 HBV DNA 阴性的乙肝病毒感染者, 超敏阳性率为 44.34%, 灵敏度相较于传统法检测的 HBV DNA 更高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 与上述报道观点一致, 同时研究结果也表明传统法检测 HBV DNA 阴性的患者, 超敏 HBV DNA 可能为阳性, 而 HBV DNA 能直接反映患者体内病毒量的多少, 也是病毒复制活跃程度的直接指标, 因此不容忽视。

HbeAg 是由 HBV 核心基因(前 C 区)编码的可溶性蛋白, 是病毒复制、传染的主要指标, 与血清 HBV DNA 水平变化有很好的一致性; ALT 主要存在于肝细胞质中, 是反映肝细胞早期损害极为敏感的

指标^[9-10]。本研究按照超敏结果分为两组, 结果显示超敏检测组(+) 中 ALT 异常率和 HbeAg 阳性率较超敏检测组(-) 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 与张玥等^[11]报道的结果一致。本研究两组中肝功能各指标血清学水平比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 这与石玉如等^[12]人的报道并不一致, 考虑可能为超敏检测法(+) 组较报道中高浓度组 HBV DNA 水平低有关, 但研究结果显示超敏检测组(+) 中 ALT、AST、ALP 和 ALB 血清学水平均略高于超敏检测组(-)。故超敏 HBV DNA 同时结合乙型肝炎五项与肝功能联合诊断, 能更好地了解病毒复制情况和肝细胞损害程度, 为治疗提供可靠的临床依据^[13]。

实际临床工作中, 部分抗病毒治疗的慢性 HBV 感染患者 HBV DNA ≤ 500 IU/ml, 但 ALT 和(或) AST 显示异常, 排除其他原因导致的肝功能异常, 病毒导致肝脏炎症性损伤仍是重点考虑因素。本研究结果显示 ALT 异常中超敏 DNA 的阳性率与抗病毒治疗时间成反比, 但在接受治疗 2 年后阳性率仍高达 59.09%, 说明病毒低水平复制造成肝脏持续炎症反应可能为 ALT 异常的主要原因。值得注意的是随着治疗时间的增加, ALT 异常率并没有明显的下降趋势, 未治疗、半年、1 年的异常率分别为 41.61%、27.65%、34.92%, 目前暂考虑与入组样本量少有关。另外, 抗病毒治疗 2 年、3 年的超敏 HBV DNA 阳性率分别为 29.26%、33.93%, 而 ALT 异常患者中超敏 HBV DNA 阳性率分别为 30.77%、31.25%, 二者都存在一定程度的升高, 具有一致性, 这表明患者对药物的应答率下降, 超敏 HBV DNA 的定量检测对药效评估、耐药预测有一定价值^[14]。

综上所述, 超敏 HBV DNA 定量检测对传统法检测 HBV DNA 阴性, 尤其是肝功能异常的患者有较高的临床监测价值。有关超敏 HBV DNA 的定量结果与肝脏硬度测量值、乙肝五项定量结果等乙肝相关指标需要进一步探索分析。

参考文献

- [1] Zhu H Y, Zhang X S. Relationship between HBV DNA load and levels of serum HBsAg in patients with chronic hepatitis B [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(10): 2061-4.
- [2] Salpini R, Piermatteo L, Gill U, et al. Quantification of intrahepatic total HBV DNA in liver biopsies of HBV-infected patients by a modified version of COBAS, Ampliprep/COBAS® TaqMan HBV test v2.0 [J]. Med Microbiol Immunol, 2017, 206(4): 295-9.
- [3] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学会. 慢性乙型

- 肝炎防治指南(2015 年更新版) [J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 31(12): 1941-60.
- [4] Shimakawa Y, Njie R, Ndow G, et al. Development of a simple score based on HBeAg and ALT for selecting patients for HBV treatment in Africa [J]. *J Hepatol*, 2018, 69(4): 776-84.
- [5] 朱礼尧, 周建, 朱农, 等. HBeAg 阴性慢性乙型肝炎患者血清 HBV-DNA 病毒载量与 ALT 水平相关性探讨 [J]. *现代仪器与医疗*, 2013, 19(2): 45-7.
- [6] 郑志远. 超敏和普敏两种方法在血清 HBV-DNA 定量检测中的比较研究 [J]. *中国现代药物应用*, 2017, 11(12): 10-2.
- [7] 陈建仁, 李驰, 关惠恒. 超敏荧光定量 PCR 法核酸检测与乙肝两对半联用在乙肝防控中的临床应用 [J]. *中国实用医药*, 2018, 13(9): 83-5.
- [8] 戎国栋, 徐婷, 赵鸿, 等. 超敏 HBV DNA 定量检测系统的临床应用研究 [J]. *临床与病理杂志*, 2015, 35(8): 1537-41.
- [9] 戴小波, 唐文志. 慢性乙型肝炎患者 HBsAg、HBeAg 及 HBV-DNA 定量结果的临床意义与相关性分析 [J]. *中国输血杂志*, 2015, 28(12): 1498-502.
- [10] 邵玉峰, 邹桂舟, 叶珺, 等. 431 例慢性乙型肝炎病毒感染者临床指标与肝脏病理分析 [J]. *中华疾病控制杂志*, 2014, 18(10): 964-7.
- [11] 张玥, 鞠瑛, 田文君, 等. 超敏系统检测低拷贝 HBV DNA 定量的临床意义 [J]. *检验医学与临床*, 2017, 14(4): 461-2.
- [12] 石玉如, 戚应杰, 岳莉, 等. 乙型肝炎病毒低病毒载量与血清标志物表达研究 [J]. *安徽医药*, 2016, 20(2): 346-8.
- [13] Zeng D W, Liu Y R, Dong J, et al. Serum HBsAg and HBeAg levels are associated with liver pathological stages in the immune clearance phase of hepatitis B virus chronic infection [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(5): 3465-72.
- [14] 杨娜, 袁涛, 张囡囡. 超敏乙肝 DNA 检测对 HBeAg 阴性 HBV 感染者的诊治意义 [J]. *中外女性健康研究*, 2018(4): 82.

Value of hypersensitive HBV DNA detection in dynamic monitoring of chronic HBV infection

Wang Tongtong¹, Gao Yufeng¹, Cao Wenjun², et al

(¹Dept of Infectious Disease, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Infectious Disease, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To explore the clinical application value of hypersensitivity detection technology in patients with chronic hepatitis B virus (HBV) infection with HBV DNA negative by traditional PCR assay. **Methods** The serum samples of 370 patients with chronic HBV infection with HBV DNA ≤ 500 IU/ml were collected by traditional PCR assay. Meanwhile, the corresponding hypersensitive HBV DNA level were detected, and the correlation with alanine aminotransferase (ALT), hepatitis B virus E antigen (HBeAg) and other indicators of liver function were analyzed. **Results** Hypersensitive detection assay (-) and hypersensitive detection assay (+) showed a statistically significant difference in the ALT anomaly rate between the two groups ($\chi^2 = 3.905$, $P = 0.048$), and the difference in positive rate of HBeAg was statistically significant ($\chi^2 = 14.264$, $P < 0.05$). According to the different antiviral treatment time, the trend test results of hypersensitive HBV DNA positive rate showed a negative correlation ($\chi^2 = 39.823$, $P < 0.001$), and the difference of hypersensitive HBV DNA positive rate in ALT abnormality was statistically significant ($\chi^2 = 18.922$, $P = 0.001$). Bonferroni method was used to pairwise comparison and adjusted the level of alpha. The results showed that there was significant difference between untreated group and the treated group for two years ($P = 0.002$) and three years ($P = 0.001$). **Conclusion** Hypersensitive quantitative detection technology can provide a more accurate understanding of virus replication in patients with HBV DNA negative by traditional assay, and contribute to select the best treatment plan and predict the prognosis.

Key words hepatitis B virus; hypersensitivity detection; traditional PCR assay; alanine transaminase