

血清 HBV-NRAg 的检测及与 HBV DNA 的相关性分析

黄建炜¹, 袁权², 葛胜祥², 牛建军¹

摘要: [目的] 了解 HBV 携带者血清 HBV-NRAg 的检出情况, 探讨 HBV 感染后 HBV-NRAg 与 HBVM、HBVDNA 载量的相关性。[方法] 连续收集了从业人员的体检标本 (n=4 968), ELISA 法检测血清 HBV-NRAg 和 HBVM, 同时以 FQ-PCR 检测核酸指标并辅以分区套式 PCR 和 DNA 测序作为证实检测, 统计分析 HBV-NRAg 与 HBVM、HBVDNA 的相关性。[结果] HBV-NRAg 的阳性率 7.5%, 略低于 HBsAg 的 8.3%, 略高于 HBV DNA 的 6.8%。在 HBV 携带者中 HBV-NRAg 检测与 HBV DNA 的符合率 87.4%, 高于 HBsAg 或 HBeAg, 其 S/CO 值与 HBV DNA 载量线性相关 ($R^2=0.927$)。通过 HBV-NRAg 的检测筛选到 6 例 HBV 隐匿性感染, 其中 3 例存在 S 区 "a" 基因突变。[结论] 对于 HBV 感染后病毒复制状态和传染性的评价, HBV-NRAg 可以替代 HBV DNA 作为良好的评判指标, 而且可以用于变异毒株的筛选。

关键词: 乙型肝炎病毒; 核酸相关抗原; 相关性分析; 变异毒株

ANALYSIS OF DETECTION OF HBV-NRAg IN SERUM AND ITS CORRELATION WITH HBV DNA HUANG Jian-wei, YUAN Quan, GE Sheng-xiang, et al. (Xiamen Center for Disease Control and Prevention, Xiamen 361012, China)

Abstract: [Objective] To investigate detection situation of HBV-NRAg in serum from HBV carriers, and discuss the correlation of the HBV-NRAg with HBVM and HBVDNA loads, respectively. [Methods] 4968 serum samples were consecutively collected from the health examination of service workers, and HBV-NRAg and HBVM were detected by using ELISA. At the same time, the nucleic acid index of HBV DNA was examined by FQ-PCR, supplemented with detecting nested-PCR and DNA sequencing as certified tests. Statistical analyses were performed to analysis the correlation of HBV-NRAg with HBVM and HBVDNA, respectively. [Results] The total positive rate of HBV-NRAg was 7.5%, which was lower than HBsAg (8.3%) but higher than HBV DNA (6.8%). A good conformability was observed between the test results of HBV-NRAg and HBV DNA. Meanwhile the S/CO values was closely correlated with HBV DNA loads ($R^2=0.927$). Furthermore, 6 cases of concealed HBV infection were screened out by HBV-NRAg test, in which HBV genome had a point mutation in the 'a' epitope of S region. [Conclusion] As a replacement of HBV DNA, HBV-NRAg can be seen as a good evaluation index in terms of the evaluation on replicating phase HBV and its infectivity after being infected. Moreover, it also can be applied to effective screening of HBV mutation.

Key words: HBV-NRAg; HBVDNA; Analysis of Correlation; HBV mutation

人体感染 HBV 后, PreS1 蛋白是最早出现在血清中的游离抗原蛋白。在 HBV 的复制过程中, cccDNA 转录的前基因组 RNA 编码合成核心蛋白并在核心颗粒中逆转录为 HBVDNA。PreS1 蛋白和 HBcAg 与 HBV 的感染复制密切相关^[1-3], 称之为 HBV 核酸相关抗原 (HBV Nucleic acid Related Antigen, HBV-NRAg)。血清中 HBcAg 以 Dane 颗粒的形式存在, 需在裂解之后才能检测到。本文通过在酶联反应微孔内裂解血清标本的方式联合检测 PreS1 和 HBcAg, 探讨 HBV 感染后 HBV-NRAg 与 HBVDNA 载量和 HBV 血清学标志 (HBV Maker, HBVM) 的关系, 为评判乙型肝炎病毒感染复制、发展和传染源筛选提供新的检测方案。

基金项目: 厦门市重大疾病科攻关项目 (WKZ0501)

作者简介: 黄建炜 (1969-), 男, 硕士, 副主任技师, 研究方向: 微生物检验

作者单位: 1. 厦门市疾病预防控制中心, 厦门, 361012; 2. 厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心

1 材料与方法

1.1 标本来源

2006 年 4~5 月, 连续收集厦门市服务行业从业人员体检的静脉血, 常规方法分离血清, 合计 4 968 份。所有血清分成两份, 1 份进行 HBV 相关血清免疫学指标检测, 1 份进行 HBV DNA 检测。

1.2 主要仪器与试剂

Taq DNA 聚合酶、dNTP 为 Takara 公司产品, 各种生化试剂购自 Sigma 公司或国产分析纯。PCR 仪为德国 Biometra T3 型, 荧光定量 PCR 仪为 Rotorgene3000, 酶标仪及洗板机为瑞士 Tecan Sunrise 型, 血清 DNA 提取试剂为 QIAGEN 公司产品。

1.3 血清免疫学指标检测

HBV 感染的血清学指标 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb、HBV-NRAg 的酶联免疫检测试剂购自北京万泰生物药业有限公司, 以 Murex 公司 HBsAg 酶联免疫检测试剂

剂盒作为对照, 检测程序及结果判定严格按照说明书进行。

1.4 HBV DNA 检测

HBV FQ-PCR 试剂购自英科新创(厦门)科技有限公司(PCR 试剂 A)及深圳匹基生物工程有限公司(PCR 试剂 B), 检测程序及结果判定严格按照说明书进行。标本首先以 PCR 试剂 A 进行检测, 结果阴性的标本群中, 如其他 HBV 相关指标中任何一项阳性, 分别用 PCR 试剂 B 复检和进行前 C 区、S 区套式 PCR 检测; 两个或两个以上区段 PCR 扩增阳性的标本判定为分区 PCR 阳性, 单一引物 PCR 阳性应进行扩增片段序列测定, 如属 HBV 序列则判定为分区 PCR 阳性。所有荧光定量 PCR 阳性及分区巢式 PCR 阳性的标本判定为 HBV DNA 阳性, 其余标本判定为 HBV DNA 阴性。套式 PCR 方法如下: 血清 DNA 以蛋白酶 K 法提取, 分别采用适当引物进行套式 PCR, PCR 反应程序均为 95 10 min 变性后, 95 40 s、55 40 s、72 40 s, 35 个循环(第 2 轮 25 个循环), 72

10 min; 所用引物序列及结果判定标准见文献^[4], 引物合成及序列测定均交由引物均由上海英骏公司完成。

1.5 HBV 携带者判断标准和数据统计与分析

HBV 携带者判断标准: 血清中 HBV DNA、HBsAg 或 HBeAg 任一指标阳性的归类为 HBV 携带者, 其余标本归类为非 HBV 携带者。

所有结果经审核无误后在 Microsoft EXCEL 中录入, 经核对无误后在 EPI Info 2000 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 服务行业从业人员中 HBV 相关血清学指标的阳性率

在 4 968 份血清标本的 HBV 感染相关指标检测完毕之后, 对 HBV-NRAg、HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb、HBV DNA 检测结果进行分类统计, 见表 1。

表 1 4 968 份血清 HBV 相关血清学指标的阳性率 ($\times 10^{-2}$)

检测指标	HBV-NRAg	HBsAg	HBsAb	HBeAg	HBeAb	HBcAb	HBV DNA
阳性指标数	370	411	2893	94	1349	2990	338
阳性率	7.5	8.3	58.2	1.9	27.2	60.2	6.8
95%CI	6.7-8.2	7.5-9.1	56.9-59.6	1.5-2.3	25.9-28.4	58.8-61.6	6.1-7.5

2.2 HBV 携带者 HBV-NRAg 检测的敏感度和特异性

4 968 份血清标本的 HBV-NRAg 检测结果如表 2。依据 HBV 感染的 3 个指标(HBsAg、HBeAg、HBV DNA)对本群进行分类, 任一指标阳性者判定为 HBV 携带者($n=420$); 在 420 例 HBV 携带者中, HBV-NRAg 阳性 363 份, 敏感度为 86.4% (95%可信限: 82.8%~89.6%); 在 4 548 例非 HBV 携带者中, HBV-NRAg 检出 7 份阳性, 特异性为 99.9% (95%可信限: 99.7%~99.9%)。

表 2 HBV-NRAg 在 HBV 携带者和非 HBV 携带者中的阳性率

HBV-NRAg	HBV		合计
	携带者	非携带者	
+	363	7	370
-	57	4541	4598
合计	420	4548	4968

2.3 HBV-NRAg 检测与 HBV DNA、不同血清学指标模式的相关性

表 3 显示了 HBV 携带者中各种 HBVM 模式中 HBV-NRAg 检测结果和 HBV DNA 的阳性率及平均载量, “大三阳”(group A)、“小三阳”(group B)和其他模式(group C~K)的携带者分别占 20.7%、57.1%和 22.2%。“小三阳”人群的 HBV-NRAg 阳性率高于其 HBV DNA 阳性率($P < 0.05$), 但比“大三阳”人群低, 而且 HBV DNA 平均载量也低了 10^4 倍以上。group C~J 的 HBV-NRAg 和 HBV DNA 总阳性率分别为 68.7%和 60.2%, 无统计学差异($P > 0.05$), 除了一例 HBsAb+ 的“大三阳”携带者外, HBV DNA 载量 10^{2-5} copies/ml, 与“小三阳”相当。此外还有 3 例仅 HBeAg 阳性的携带者血清 HBV-NRAg、HBV DNA 都为阴性; 6 例 HBsAg-/HBeAg-/HBV DNA+ 的血清标本, HBV-NRAg 显示阳性结果, 属于隐匿性感染, 具体模式分析见表 5。

表 3 不同 HBVM 模式中 HBV-NRAg 和 HBV DNA 的检测结果 ($\times 10^{-2}$)

模式级别	n	HBV-M					HBV-NRAg		HBV DNA		平均核酸载量 log copies/ml
		HBsAg	HBsAb	HBeAg	HBeAb	HBcAb	阳性数	阳性率	阳性数	阳性率	
A	87	+	-	+	-	+	87	100	87	100	7.64 ± 0.73
B	240	+	-	-	+	+	213	88.8	195	81.3	3.31 ± 1.07
C	53	+	-	-	-	+	44	83.1	37	69.8	3.56 ± 1.21
D	6	+	-	-	-	-	3	50.0	3	50.0	4.59 ± 1.71
E	9	+	+	-	+	+	4	44.4	3	33.3	2.67 ± 0.92
F	8	+	+	-	-	+	3	37.5	4	50.0	2.90 ± 0.94
G	3	+	+	+	-	+	2	66.7	1	33.3	9.66
H	3	+	+	-	-	-	0	0	1	33.3	2.00
I	1	+	-	+	+	+	1	-	1	-	2.30
J	1	+	+	-	+	-	0	0	0	0	-
K	3	-	-	+	-	-	0	0	0	0	-
合计	414						357		332		

2.4 血清 HBV-NRAg 与 HBV DNA 检测的相关性

在 420 份可疑的 HBV 携带者中, 比较 HBV-NRAg、HBsAg、HBeAg、PCR 试剂 A 与 HBV DNA (由两种商品化试剂及 Nest-PCR 检测确认) 检测结果符合率, 见表 4。HBV-NRAg 与 HBV DNA 的相关性 (87.4%; 95%CI: 83.4%~90.4%) 优于 HBsAg (79.8%; 95%CI: 75.6%~83.5%) 及 HBeAg (39.5%; 95%CI: 34.8%~44.4%) (P < 0.05)。HBV DNA 的检测以 PCR 试剂-A 的检测辅以 PCR 试剂-B 和分区套式 PCR 作为

复检, 因此方法 PCR 试剂-A 与 HBV DNA 的相关性优于免疫学检测指标, 符合率 92.6% (95%CI: 89.7~94.9), 但其灵敏度 (73.1%) 不如 HBsAg (97.9%) 和 HBV-NRAg (86.4%)。计算 NRAg ELISA 检测各个 S/CO 值范围内的 DNA 阳性标本平均基因组拷贝数, 两者呈线性正相关, 见图 1。若对于全部标本而言, HBV-NRAg、HBsAg、HBeAg 和 qPCR-A 与 HBV-DNA 的相关性分别为 98.9%、98.3%、94.9%和 99.4%, 4 者之间差异显著 (P < 0.05)。

表 4 不同检测指标与 HBV DNA 的相关性 (x10⁻²)

HBV 感染指标		HBV DNA		携带者检测符合率 (95% CI)	4968 份标本检测符合率 (95% CI)
		+(n=338)	-(n=82)		
NRAg	+	324	39	87.4 (83.4-90.4)	98.9 (98.5-99.1)
	-	14	43		
HBsAg	+	332	79	79.8 (75.6-83.5)	98.3 (97.9-98.6)
	-	6	3		
HBeAg	+	89	5	39.5 (34.8-44.4)	94.9 (94.2-95.5)
	-	249	77		
PCR-A	+	307	0	92.6 (89.7-94.9)	99.4 (99.1-99.6)
	-	31	82		

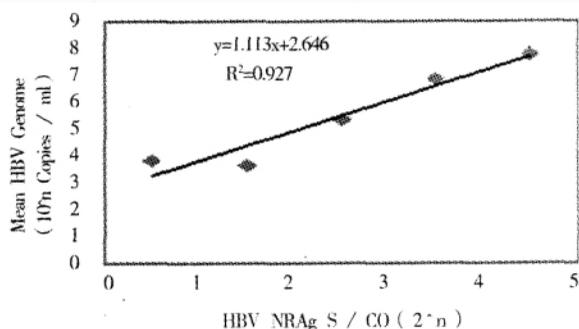


图 1 HBV-NRAg ELISA S/CO 值与 HBV DNA 含量的相关性

本, 经过反复 PCR 验证, 确认了其中 6 份为 HBV DNA 阳性。对此 6 份标本使用 Murex HBsAg (Abbott.Inc) 酶联免疫检测, 仅 1 份阳性 (C3157); 对其中 3 份标本 (另外 3 份标本因样本不足, 无法进一步实验) 进行 S 区 “a” 表位序列分析 (aa110-155), 扩增和测序引物 “A”: AF2: TGC CCG TTT GTC CTC T 及 AR2: AGA AAC GGR CTG AGG C。序列测定显示, 其中 1 份标本 (编号为 C511) 为 adr 血清型, 发生 G145R 突变; 另外两份标本 (编号分别为 C1110, C1710) 为 adw2 血清型, 均发生 T131N 突变。推测可能由于氨基酸替换而导致 HBsAg 抗原性发生变化造成 HBsAg 检测阴性 (表 4)。C1110 和 C3206 两份标本 HBVM 所有指标阴性, 推测可能处于感染早期、或者宿主免疫耐受状态、或者由于 HBV X 区基因变异^[5]等原因。

2.5 HBV-NRAg 的检测与隐匿性 HBV 携带者

在检测实验中, 13 例 HBsAg- /HBeAg- /HBV-NRAg+ 的标

表 5 6 份隐匿性 HBV 感染者标志模式

编号	HBV NRAg	Murex HBsAg	HBsAg	HBsAb	HBeAg	HBeAb	HBcAb	qPCR cp / ml	Nest-PCR	A-mut
C511	+	-	-	-	-	-	+	-	+	G145R
C1110	+	-	-	-	-	-	-	-	+	T131N
C1710	+	-	-	+	-	-	-	-	+	T131N
C3157	+	+	-	-	-	+	+	-	+	ND
C3206	+	-	-	-	-	-	-	500	+	ND
C4236	+	-	-	+	-	-	+	300	+	ND

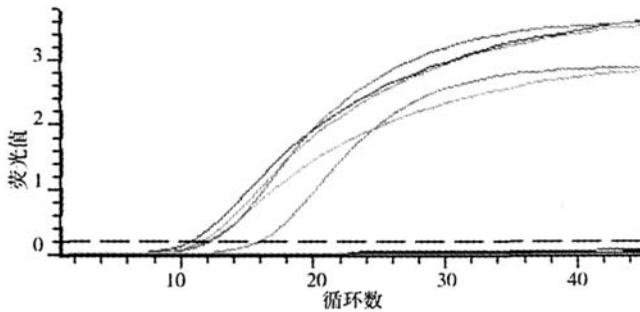
3 讨论

HBV-NRAg ELISA 检测方法选用了针对 PreS1 高保守区肽段和包裹于 Dane 颗粒内部 HbcAg (可避免机体免疫压力) 的单克隆抗体, 用于联合检测这两种核酸相关抗原, 比其中单一指标的检测方法具有更高的灵敏度, 与数种 PreS1 商品试剂盒的检测结果相比, 对于 HBV 感染标志的检测灵敏度可高出 20 多倍^[6]。由于该方法检测高保守区编码的抗原位点, 也可有效检测因 HBV 基因组 S/C/X 编码区的变异而产生的特殊 HBVM 模式和某些 PCR 法阴性的病毒感染。因此 HBV-NRAg 更合适作为 HBV 感染和复制包括低水平复制、变异毒株感染等的评判指标。

本次服务业从业人员健康体检人群 (可视同健康人群) HBV-NRAg 阳性率 7.5%, 与 HBV-DNA (6.8%) 无统计学差异 (P > 0.05), 而 HBsAg 的阳性率 8.3%, 显著高于 HBV DNA (P < 0.01)。“大三阳”组的 HBV-NRAg、HBV DNA 的检出率 100%, “小三阳”组次之, 其余各种 HBVM 模式组更低一些; “大三阳”组 HBV DNA 载量比其他各组高出 10⁴ 倍以上, 这说明 HBeAg 阳性标志着 HBV 的高水平复制, 但 HBeAg 阳性者仅占 HBV 携带者总数的 21.7%, 与 HBV DNA 阳性符合率 39.5%, 低于 HBsAg (79.8%); HBV-NRAg 与 HBV DNA 阳性符合率最高 (87.4%), 其 S/CO 值与 HBV DNA 载量线性相关 (下转第 4636 页)

2.2 鸡胚分离培养

26 份标本经鸡胚培养 3 代后, 共鉴定出流感病毒 A 型 4 份, B 型 3 份, 阳性率为 26.9%。



A 型流感病毒荧光 PCR 检测结果

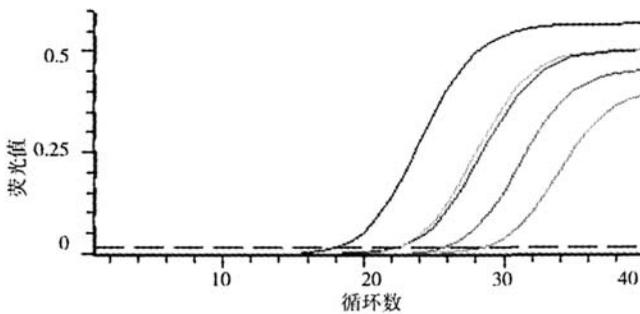


图 2 B 型流感病毒荧光 PCR 检测结果

3 讨论

根据国家流行性感冒诊断标准及处理原则 (GB15994-1995) 的标准^[2], 流行性感冒病原学的检测方法有常规的病毒培养法 (9~11 d 龄鸡胚培养法与 MDCK 细胞培养法) 和快速诊断方法 (间接免疫荧光法和间接免疫酶联免疫试验)。该经

典的试验方法虽然准确, 可靠, 稳定, 但对标本中的病毒含量要求高, 必需达到鸡胚或 MDCK 培养法所需要的病毒含量, 而且对标本的采集, 运输, 保存的条件要求高, 试验繁琐, 费时, 要确诊至少要 10~15 d。有关流感病毒 RT-PCR 检测方法, 国内外已有报道, 它具有灵敏度高, 特异性强, 所需时间短的优点, 目前已在流感病毒的核酸检测中得到应用^[3], 但其检测时间仍需 6~7 h, 且容易由于 PCR 扩增产物污染而产生假阳性的可能, 近几年发展起来的以特异性荧光探针为特点的荧光定量 PCR 技术, 实行完全闭管式操作, 不仅能大大减少扩增产物污染的机会, 而且较常规 RT-PCR 技术, 无论从敏感性, 特异性与速度上都更具有优势, 当然它对引物和探针的设计也提出了更高的要求^[4]。

从本次研究结果可得: 即时 RT-PCR 检测结果阳性率为 57.7%, 而鸡胚培养法阳性率为 26.9%, 经统计学处理, $\chi^2=5.04, P < 0.05$, 两者有统计学差异, 提示荧光 RT-PCR 的敏感性高于鸡胚的分离培养。同时荧光 RT-PCR 方法检测流感病毒能够在 2~4 h 内得到结果, 而且操作简便, 不易污染, 特异性和敏感度高。因此, 荧光定量 RT-PCR 方法可作为一种快速的流感病毒检测方法, 值得推广应用。

参考文献:

[1] 郭元吉, 程小雯. 流行感冒病毒及其实验技术 [M] 北京: 中国三峡出版社, 1997.

[2] 中华人民共和国国家标准 [S] GB15994-1995.

[3] Poddar SK, Espina R, Schnurr DP. Evaluation of a single-step multiplex RT-PCR for influenza virus type and subtype detection in respiratory sample [J] J Clin Lab Anal, 2002, 16 (3): 163-166.

[4] Stone B, Burrows J, Schepetiuk S, et al. Rapid detection and simultaneous subtype differentiation of influenza A viruses by real time PCR [J] J Virol Methods, 2004, 117 (2): 103-112.

(收稿日期: 2006-10-24)

(上接第 4634 页)

($R^2=0.927$)。因此从 HBV DNA 作为 HBV 感染后的病毒复制状态和传染性评价而言, 与 HBsAg 或 HBeAg 相比较, HBV-NRag 可以作为良好的替代评判指标, 而且其检测技术条件要求比 HBV DNA 载量要简单得多, 检测成本较为低廉, 易于在一般实验室开展。

本次调查筛选到 HBsAg-/HBeAg- 但 HBV DNA+ 的 6 例 HBV 隐匿性感染, 其中 2 例 HBV DNA 含量低, 只有 10^2 copies/ml, 另 4 例 qPCR 方法阴性, 但 S 区和前 C 区套式 PCR 扩增片段经序列测定确认为 HBV 感染, 并且发现了 3 例存在 S 区 "a" 簇编码基因 G145R 和 T131N 突变。HBV 的复制存在逆转录的步骤, S 区、前 C/C 区以及 X 区等结构基因区的突变较为常见。S 区高突变位点 "a" 簇 AA121~147 肽段编码基因的突变引起氨基酸残基的替换, HBsAg 分子构象改变、抗原性降低或改变, 从而导致血清 HBsAg 检测阴性, G145R 突变被认为是最典型的免疫逃避株^[6,7]; 前 C/C 区 1 896 位 ntc a 的突变产生终止密码子而导致 HBeAg 不能产生, 乙肝病人中近 50% 因发生这种突变而 HBeAg 检测阴性, HBVM 模式属于 "小三阳", 但 HBV DNA 载量与未变异组无明显差异^[8]; X 区或 P 区的变异则可导致 HBVM 全为阴性的非典型 HBV 感染, 临床上属于非甲~非戊型肝炎, 可能与重症肝炎相关^[9]。本次调查中证实了 6 例 (占 HBV 携带者 1.43%) 由于感染后的突变或者突变株的感染而造成的 HBV 隐匿性感染, 这种感染模式对于临床诊断、治疗和预防、流行病学的解释, 尤其是血源筛选, 都是较为棘手的问题, HBV-NRag 检测无疑是比当前其他检测指标更为有效的筛检方法。

参考文献:

[1] Tatsuji K, Akinori R, Akihiro M, et al. New Enzyme Immunoassay for Detection of Hepatitis B Virus Core Antigen (HBcAg) and Relation between Levels of HBcAg and HBV DNA [J] J Clin Microbiol, 2003, 41: 1901-1906.

[2] Guillou D B, Duclos-Vallee J C, Eberle F, et al. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection and quantification of hepatitis B virus PreS1 envelope antigen in serum samples: comparison with two commercial assays for monitoring hepatitis B virus DNA [J] J Viral Hepat, 2000, 7: 387-392.

[3] Theilmann L, Klinkert M Q, Gmelin K, et al. Detection of PreS1 proteins in serum and liver of HBsAg-positive patients: a new marker for hepatitis B virus infection [J] Hepatology, 1986, 6: 186-190.

[4] 袁权, 葛胜祥, 闫强, 等. 一种联合检测乙型肝炎病毒前 S1 抗原与核心抗原的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.

[5] 黄利华. HBV 血清标志物特殊模式的再认识 [J] 国外医学流行病学与传染病分册, 2002, 29 (2): 84-86.

[6] 丁海明, 庄俊华. 乙型肝炎病毒研究进展 [J] 国际医药卫生导报, 2007, 13 (07): 110-114.

[7] 候金林, 廖慧钰, 王战会, 等. 在中国发现的几种乙型肝炎病毒外膜基因变异株 [J] 中华医学杂志, 1997, 77 (8): 608-609.

[8] 奚华新, 蒋跃明. HBV 变异对乙肝病毒标志物和 DNA 定量的影响 [J] 江苏大学学报, 2006, 16 (2): 148-150.

(收稿日期: 2007-08-11)