

• 经验交流 •

## 乙型肝炎病毒标志物定量检测及肝组织病理学检测应用于慢性乙型病毒性肝炎患者的临床意义

张文杰<sup>1</sup>, 毛维武<sup>1△</sup>, 田淑菊<sup>1</sup>, 李朝霞<sup>1</sup>, 屈 延<sup>1</sup>, 龚晏莹<sup>1</sup>, 杨建军<sup>1</sup>, 郭宏艳<sup>2</sup>, 金惠琴<sup>2</sup>

(甘肃省第二人民医院:1. 感染科;2. 病理科, 兰州 730000)

**摘要:**目的 探讨慢性乙型病毒性肝炎(CHB)患者肝组织 HBVcccDNA、HBsAg 和 HBeAg, 肝组织及血清 HBV DNA, 与肝组织病理学改变间的关系。方法 以 65 例 CHB 患者为研究对象, 检测其血清 HBV DNA 含量, 并行肝脏穿刺术取肝组织, 免疫组织化学染色法检测肝组织 HBsAg 和 HBeAg 的表达、荧光定量聚合酶链反应检测 HBVcccDNA 及 HBV DNA 含量、常规病理学染色分析病理学改变。结果 肝组织 HBVcccDNA 含量与肝组织 HBV DNA 含量呈正相关( $r=0.687, P<0.05$ ); 肝组织 HBVcccDNA 含量与血清 HBV DNA 含量呈正相关( $r=0.385, P<0.05$ )。HBeAg 阳性 CHB 患者肝组织 HBVcccDNA、HBV DNA 及血清 HBV DNA 含量均高于 HBeAg 阴性患者。HBVcccDNA 含量与肝组织病理学检查结果无明显相关性。肝组织 HBsAg 表达强度与肝组织 HBVcccDNA 含量呈正相关( $r=0.397, P<0.05$ ), 与肝组织炎症和纤维化程度无相关性( $r$  分别为 0.215、0.107,  $P>0.05$ ); HBeAg 表达强度与肝组织 HBVcccDNA 含量呈正相关( $r=0.732, P<0.05$ ), 与肝组织炎症和纤维化程度呈正相关( $r$  分别为 0.416、0.683,  $P<0.05$ )。结论 肝组织 HBVcccDNA 水平直接反映 CHB 患者体内 HBV 的存在和复制状态, 但不能反映肝组织实质损害程度。肝组织 HBsAg、HBeAg 的表达能够真实反映病毒复制情况, 而诱导肝组织免疫损伤的主要抗原是 HBeAg。联合血清 HBV DNA 含量和肝组织 HBsAg、HBeAg 表达作为抗病毒治疗疗效评价指标更为可靠。

**关键词:** 肝炎, 乙型; 抗原, 表面; 肝炎核心抗原, 乙型; 肝组织病理学; 免疫组织化学

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.13.051

文献标识码: B

文章编号: 1673-4130(2011)13-1507-03

本研究通过对慢性乙型病毒性肝炎(chronic viral hepatitis type B, CHB)患者肝组织中 HBV 共价闭合环状 DNA(HBVcccDNA)定量、HBsAg 和 HBeAg 与肝组织及血清 HBV DNA 定量、肝组织病理及临床之间的关系进行研究, 希望能对患临床诊断、治疗提供及时可靠的参考依据。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 2006 年 5 月至 2008 年 12 月甘肃省第二人民医院感染科收治的 CHB 患者 65 例, 男性 46 例、女性 19 例, 年龄 21~54 岁, 中位年龄 32 岁, 诊断标准参照文献[1], 并排除甲、丙、丁、戊型肝炎和其他原因所致肝损害, 且均在半年内未行抗病毒治疗。根据 HBV e 抗原(HBV e antigen, HBeAg)为阴性或阳性, 将患者分为 HBeAg 阳性组和 HBeAg 阴性组, 两组患者间年龄、性别、病程等方面的差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。

**1.2 仪器与试剂** AX-SYM 全自动电化学发光分析系统及配套 HBV 血清标志物(HBV serum marker, HBV-M)检测试剂盒(ABBOTT, 美国); DA7600 型全自动荧光定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)仪及配套血清 HBV DNA 定量检测试剂盒(达安, 广州); 肝组织 HBV DNA 及 HBVcccDNA 检测采用 SLAN 荧光定量 PCR 检测系统(宏石, 上海)及相应试剂盒(上海之江, 上海); 链霉亲和素-过氧化物酶(streptavidin-peroxydase, S-P)法 HBsAg、HBeAg 免疫组织化学染色试剂盒(长岛生物, 上海)。

**1.3 方法** 抽取患者晨起空腹静脉血 10 mL, 分离血清后进行 HBV-M, HBV DNA 定量、肝功能、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)等检测。在 B 超引导下以 16G 穿刺针, 采用 1 s 快速穿刺术抽取肝组织。每份肝组织标本长度不低于 16 mm。所有患者均行 2 点穿刺, 1 份标本置经消毒的 EP 管中后立即放入液氮中, 并于 -70 °C 保存以检测肝组织 HBV DNA 和 HBVcccDNA; 另 1 份标本经甲醛固定、石蜡包埋、连

续切片后行苏木精-伊红(hematein-eosin, HE)染色、Masson 染色、GS 网状纤维染色及 HBsAg、HBeAg 免疫组化染色。所有操作按仪器及试剂说明书要求进行。

**1.4 结果判断标准** (1)肝组织病毒抗原的检测: 用 S-P 法检测肝细胞中 HBsAg、HBeAg 表达的评价参考半定量计分法<sup>[2]</sup>, 按染色阳性细胞占整个切片肝细胞的比例为 0%, >0%~25%、>25%~50%、>50%~75% 以及 75% 以上, 分别记为(-)、(+)、(++、(+++)和(++++)。(2)肝组织炎症和纤维化检测: HE 染色及 GS 网状纤维染色, 光镜观察, 肝组织炎症、纤维化分级参照文献<sup>[3]</sup>, 分为 G0~G4 和 S0~S4 各 5 级。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS13.0 软件进行数据统计学分析。计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间计量资料的比较采用  $t$  检验; 计数资料采用  $\chi^2$  检验;  $P<0.05$  时比较差异有统计学意义。

### 2 结 果

**2.1** CHB 患者血清 HBV DNA、肝功能、PT 及肝组织 HBVcccDNA、HBV DNA 检测结果见表 1。肝组织 HBVcccDNA 与肝组织 HBV DNA 呈正相关( $r=0.687, P<0.05$ ); 肝组织 HBVcccDNA 定量与血清 HBV DNA 呈正相关( $r=0.385, P<0.05$ )。肝组织 HBVcccDNA 与肝功能指标无相关性( $r=0.114, P>0.05$ )。

**2.2** CHB 患者肝组织 HBVcccDNA 与肝组织学病理学分级的关系分析显示肝组织 HBVcccDNA 与炎症程度、纤维化程度均无明显相关性( $r$  分别为 0.257、0.121,  $P>0.05$ )。

**2.3** CHB 患者肝细胞 HBsAg、HBeAg 表达强度与血清 HBV DNA 的关系分析显示肝组织 HBsAg 表达强度与血清 HBV DNA 呈正相关( $r=0.358, P<0.05$ ), 肝组织 HBeAg 表达强度与血清 HBV DNA 呈正相关( $r=0.396, P<0.05$ )。

**2.4** CHB 患者肝细胞 HBsAg、HBeAg 表达强度与肝组织

△ 通讯作者, E-mail: maoweiwu2008@163.com.

HBVcccDNA 的关系分析显示,肝组织 HBsAg 表达强度与肝细胞 HBVcccDNA 呈正相关( $r=0.397, P<0.05$ ),肝组织

HBcAg 表达强度与肝细胞 HBVcccDNA 呈正相关( $r=0.732, P<0.05$ )。

表 1 CHB 患者血清 HBV DNA、肝功能、PT 及肝组织 HBVcccDNA、HBV DNA 检测结果

组别	n	肝组织			血清			
		HBVcccDNA (copy/mg <sup>*</sup> )	HBV DNA (copy/mg <sup>*</sup> )	HBV DNA (copy/mL <sup>*</sup> )	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBIL( $\mu$ mol/L)	PT(s)
HBeAg 阳性	35	5.14 $\pm$ 1.26 <sup>#</sup>	6.28 $\pm$ 1.37 <sup>#</sup>	6.71 $\pm$ 1.85 <sup>#</sup>	97.74 $\pm$ 47.65 <sup>△</sup>	85.67 $\pm$ 39.26 <sup>△</sup>	19.13 $\pm$ 1.50 <sup>△</sup>	14.15 $\pm$ 1.56 <sup>△</sup>
HBeAg 阴性	30	3.45 $\pm$ 1.12	4.32 $\pm$ 1.25	4.15 $\pm$ 1.43	81.65 $\pm$ 48.59	80.32 $\pm$ 41.54	18.72 $\pm$ 1.33	13.97 $\pm$ 1.25

ALT:丙氨酸氨基转移酶(下同);AST:天冬氨酸转氨酶(下同);TBIL:总胆红素(下同);\*:结果以 DNA 含量的常用对数表示;#:P<0.05,与 HBeAg 阴性组检测结果比较;△:P>0.05,与 HBeAg 阴性组检测结果比较。

2.5 肝细胞 HBsAg、HBcAg 的表达与肝脏病理学程度的关系分析显示肝细胞 HBsAg 的表达强度与肝组织炎症和纤维化程度均无相关性( $r$  分别为 0.215、0.107,  $P>0.05$ )。肝细胞 HBcAg 的表达强度与肝组织炎症和纤维化程度呈正相关( $r$  分别为 0.416、0.683,  $P<0.05$ )。

### 3 讨论

HBVcccDNA 作为 HBV 基因组复制的重要中间体和 mRNA 及前基因组 RNA 复制的原始模板,是 HBV 持续感染的关键所在,是评价 HBV 复制、持续感染、抗病毒治疗疗效或临床痊愈的最重要指标。清除 HBVcccDNA 是终止 HBV 感染的关键。HBeAg 与 HBV DNA 高度相关,HBeAg 阳性表示病毒复制活跃,而 HBeAg 转阴、HBeAb 转阳被认为是患者体内 HBV 被清除的标志<sup>[3-5]</sup>。本研究应用巢式 PCR 定量检测 CHB 患者肝组织 HBVcccDNA 含量,显示肝组织 HBVcccDNA 含量为  $1.05 \times 10^3 \sim 3.14 \times 10^6$  copy/mg,且 HBeAg 阳性患者肝组织 HBVcccDNA、HBV DNA 和血清 HBV DNA 含量均高于 HBeAg 阴性患者。HBeAg 转阴、HBeAb 转阳后,部分患者血清 HBV DNA 和肝组织 HBVcccDNA 仍为阳性,说明 CHB 患者出现 HBeAg 转阴、HBeAb 转阳后,还应继续接受抗病毒治疗,阻断 HBVcccDNA 池的补充,最终耗竭肝组织内 HBVcccDNA,以根除肝组织内 HBVcccDNA 和长期抑制病毒复制。

本研究结果显示,HBV 复制水平与血清 ALT、PT 及 TBIL 无相关性。这与刘伟等<sup>[6]</sup>报道随着 CHB 患者肝细胞炎症程度的增高,血清 HBV DNA 水平和 ALT 水平也显著升高不一致。目前多数学者认为 CHB 患者体内存在的肝细胞损害并非 HBV 的直接作用<sup>[7]</sup>。本研究结果表明,CHB 患者肝组织 HBVcccDNA 含量与肝组织损害程度无相关性,提示部分 HBVcccDNA 含量较高的 CHB 患者也可能处于免疫耐受期。CHB 患者体内的肝组织损害为多因素互相作用的结果,而非 HBV 的直接作用。国内某些研究认为,CHB 患者 HBV 复制水平与肝组织炎症和纤维化程度正相关<sup>[6,8]</sup>。本研究结果表明,CHB 患者肝组织 HBVcccDNA 含量在不同病理分组间的差异均无统计学意义,与国外文献报道一致<sup>[9]</sup>。CHB 发病机制目前仍不明确,HBV 感染所诱导的免疫反应程度决定了患者的临床特点和病情严重程度。本研究结果表明,机体的免疫反应程度与肝组织 HBVcccDNA 含量无关。

本研究结果显示,CHB 患者治疗前肝组织 HBVcccDNA 与血清 HBV DNA 含量呈正相关,提示动态监测 CHB 患者血清 HBV DNA 含量,在一定程度上能反映肝组织内 HBV 的复制程度,有助于了解肝组织 HBVcccDNA 含量的变化,可作为抗病毒治疗适应证选择和临床疗效判断的依据。但 CHB 患者

血清 HBV DNA 含量与肝组织内 HBV 的复制程度并非平行变化,有时不能真实反映肝组织内 HBV 感染及复制情况,特别在血清 HBV DNA 含量低于检测水平时,肝组织 HBVcccDNA 仍可维持一定水平,肝组织内仍存在 HBV 的复制。笔者认为动态监测肝组织 HBVcccDNA 含量,有助于了解患者肝组织内 HBV 复制情况,在抗病毒治疗疗效评价体系中应纳入治疗前、治疗过程中和治疗后肝组织 HBVcccDNA 的含量变化。

HBsAg、HBcAg 是 HBV 复制过程中产生的重要的病毒蛋白,与 HBV 的黏附、持续感染和诱导发病均有重要作用。本研究显示,肝细胞 HBsAg 的表达强度与肝组织炎症和纤维化程度无相关性,而肝细胞 HBcAg 的表达强度与肝组织炎症和纤维化程度呈正相关,即随着 HBcAg 表达阳性率的增加,肝组织炎症、纤维化程度加重,与相关报道一致<sup>[10]</sup>。由于 HBcAg 的免疫原性较强,对 T、B 细胞均有很强的抗原性,因此 HBcAg 诱导的细胞免疫有清除病毒和参与肝细胞损伤的重要作用。本研究显示,肝细胞 HBsAg、HBcAg 表达强度与血清及肝组织 HBVcccDNA 含量呈正相关,提示检测肝细胞 HBsAg、HBcAg 的表达情况有助于判断 HBV 复制状态,这对血清 HBV DNA 阴性 CHB 患者而言具有更大的临床意义,对判断抗病毒治疗疗效及停药时机选择也具有指导意义。

HBVcccDNA 在 CHB 的不同感染时期的特点各不相同,深入研究其特点及维持和清除机制,有助于了解 HBV 的清除过程和致病机制,对于 CHB 的诊断、治疗方案的确定和疗效评价具有重要临床价值和意义。当不具备 HBVcccDNA 检测条件时,血清 HBV DNA 含量和肝细胞 HBsAg、HBcAg 表达联合检测作为疗效评价指标更加可靠。

### 参考文献

- [1] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华传染病杂志, 2001, 19(1): 56-62.
- [2] Lindh M, Savage K, Rees J, et al. HBeAg immunostaining of liver tissue in various stages of chronic hepatitis B[J]. Liver, 1999, 19(4): 294-298.
- [3] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南[J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13(12): 881-890.
- [4] 王晓东, 李秀全, 李凤焕, 等. 慢性乙肝血清标志物与 HBV DNA 水平的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(12): 1070-1072.
- [5] 张金花, 肖邦, 毛黎, 等. HBV 血清学标志物与 HBV DNA 定量检测的相关性及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(3): 292-294.
- [6] 刘伟, 赵伟, 罗蝉, 等. 慢性乙型肝炎患者血清 HBV DNA 负荷与

其肝组织炎症活动度的相关性研究[J]. 临床肝胆病杂志, 2002, 18(1):26-27.

[7] Lowel JA, Howard TK, White HM, et al. Serological evidence of past hepatitis B infection in liver donor and hepatitis B infection in liver allograft[J]. Lancet, 1995, 345(8957):1084-1085.

[8] 陈然峰, 陈国军, 黄晓文, 等. HBV DNA 的表达与肝纤维化的相关性研究[J]. 临床肝胆病杂志, 2000, 18(6):354-355.

[9] Zavaglia C, Mondazii L, Maggi G, et al. Are alanine aminotransferase, hepatitis B virus DNA or IgM antibody to hepatitis B core antigen serum level predictors of histological in chronic hepatitis B [J]. Liver, 2003, 17(2):83-87.

[10] 陈乐无, 明朗, 吴洁伟, 等. 慢性乙型肝炎血清 HBcAg 与肝细胞内 HBsAg, HBcAg 表达的关系及临床意义[J]. 医学临床研究, 2006, 23(6):834-837.

收稿日期:2011-05-06)

• 经验交流 •

## 重症监护病房嗜麦芽窄食单胞菌临床感染及耐药性分析

翁秋青, 黄永青, 刘桂荣

(广东省梅州市梅县人民医院检验科 514011)

**摘要:**目的 通过了解嗜麦芽窄食单胞菌在重症监护病房的感染情况和耐药性, 为防止其感染和合理指导临床用药提供依据。**方法** 采用法国生物梅里埃 ATB 半自动细菌分析系统对该院重症监护病房 2007 年 1 月至 2010 年 12 月分离的嗜麦芽窄食单胞菌进行鉴定和手工药敏分析。**结果** 86 例嗜麦芽窄食单胞菌对氨基苄西林/舒巴坦、氟曲南、头孢唑林等多种抗菌药物耐药, 但对复方磺胺甲噁唑、左氧氟沙星、头孢哌酮/舒巴坦、氧氟沙星耐药性较低。**结论** 嗜麦芽窄食单胞菌出现多重耐药性, 且重症监护病房的感染有上升趋势。临床上应对嗜麦芽窄食单胞菌的耐药高度重视, 以减少其感染的机会。

**关键词:**嗜麦芽窄食单胞菌; 微生物敏感性试验; 抗药性

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2011.13.052

**文献标识码:**B

**文章编号:**1673-4130(2011)13-1509-02

嗜麦芽窄食单胞菌是一种需氧、非发酵阴性杆菌, 为常见的条件致病菌。特别是由于广谱抗菌药物的大量应用及各种先进诊疗技术的普遍开展, 重症监护病房嗜麦芽窄食单胞菌感染有上升的趋势。该菌对亚胺培南、妥布霉素等天然耐药, 对临床使用的多种抗菌药物都有耐药性报道<sup>[1]</sup>。本研究对重症监护病房 2007 年 1 月至 2010 年 12 月分离的嗜麦芽窄食单胞菌药敏结果进行分析, 现报道如下。

### 1 材料与方 法

**1.1 标本来源** 2007 年 1 月至 2010 年 12 月本院重症监护病房患者痰、尿、血液、分泌物等。分离培养为优势菌并经涂片革兰染色筛选为合格的标本。所有操作符合卫生部《全国临床检验操作规程》(第 3 版)<sup>[2]</sup>。

**1.2 仪器** 法国梅里埃公司 ATB 半自动微生物鉴定分析仪。

**1.3 菌株分离和鉴定** 根据《临床微生物学操作规程》将各种标本分别接种于血琼脂平板、麦康凯琼脂平板, 35℃ 培养 18~24 h, 通过平板上的菌落形态特征和氧化酶试验初筛, 并以 ATB 半自动微生物鉴定分析仪进行菌株鉴定。同一患者多次或同一患者不同类型标本检出的菌株计为 1 株。

**1.4 抗菌药物种类** 对阿米卡星(AMK)、替卡西林/克拉维酸(TCCP)、复方磺胺甲噁唑(TSU)、复方氨基苄西林(FAM)、氟曲南(AZT)、头孢唑林(CFZ)、头孢匹罗(CFE)、头孢吡肟(FEP)、头孢西丁(CFX)、头孢噻肟(CTX)、头孢他啶(CAZ)、头孢曲松(CRO)、头孢呋辛(CXM)、头孢噻吩(CFT)、环丙沙星(CIP)、庆大霉素(GEN)、哌拉西林/舒巴坦(TZPP)、哌拉西林(PIP)、头孢哌酮(CFP)、氨基苄西林/舒巴坦(AAS)耐药性由微生物分析仪检测。氧氟沙星(OFL)、左氧氟沙星(LVF)、头孢哌酮/舒巴坦(SCF)系英国 Oxoid 公司产品, 耐药性采用 K-B 法检测。

**1.5 质控菌株** 铜绿假单胞菌 ATCC27853、大肠埃希菌 ATCC25922。

### 2 结 果

**2.1 标本来源** 86 例检出阳性患者中男性 59 例、女性 27

例, 年龄 11~90 岁。痰和支气管分泌物检出 67 株、泌尿道标本 9 株、血液标本 4 株, 其他标本 6 株。

**2.2 不同年份检出情况** 2007 年检出 9 株、2008 年 15 株、2009 年 25 株、2010 年 37 株。

**2.3 药敏试验结果** 见表 1。

表 1 86 株嗜麦芽窄食单胞菌耐药率分析(%)

抗菌药物	2007 年	2008 年	2009 年	2010 年
AMK	68.5	76.5	83.6	90.3
TCCP	51.5	55.8	54.7	58.5
TSU	35.1	28.6	25.5	22.4
FAM	84.3	93.5	100.0	100.0
AZT	100.0	100.0	100.0	100.0
CFZ	100.0	100.0	100.0	100.0
CFE	54.3	56.3	69.3	73.8
FEP	67.3	75.5	83.6	90.2
CFX	80.1	78.6	74.3	89.1
CTX	61.6	79.8	83.6	90.6
CAZ	50.6	57.9	60.9	69.1
CRO	84.5	88.3	94.2	97.5
CXM	83.3	85.6	88.6	91.0
CFT	68.2	75.6	89.6	100.0
CIP	34.2	42.5	51.2	65.3
GEN	61.6	78.9	87.8	91.2
TZPP	35.1	44.1	49.5	69.6
PIP	86.3	88.2	90.6	96.3
CFP	84.5	74.9	78.2	83.6
AAS	100.0	100.0	100.0	100.0
OFL	18.6	36.2	40.3	43.3
LVF	34.5	18.6	22.3	28.6
SCF	18.6	25.6	33.6	38.9

### 3 讨 论

嗜麦芽窄食单胞菌广泛分布于自然界和人体中。当机体免疫力低下、长期不合理使用抗菌药物、长期接受化疗, 以及各