

- renal failure in type 2 diabetes [J]. *Kidney Int*, 2011, 80 (1): 68-78.
- [20] Olzinski R, Turner GH, Bernard RE, et al. Pharmacological Inhibition of C-C Chemokine Receptor 2 Decreases Macrophage Infiltration in the Aortic Root of the Human C-C Chemokine Receptor 2/Apolipoprotein E^{-/-} Mouse: Magnetic Resonance Imaging Assessment/Hypercholesterolemic [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(2): 253-259.
- [21] Uchida Y, Maezawa Y, Tabata T, et al. Migration of mononuclear cells expressing β -actin through the adventitia into media and intima in coronary arteriogenesis and venogenesis in ischemic myocardium[J]. *Int Heart J*, 2012, 53(1): 54-63.
- [22] Zhang S, Wang X, Zhang L, et al. Characterization of monocyte chemoattractant proteins and CC chemokine receptor 2 expression during atherogenesis in apolipoprotein E-null mice[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2011, 18(10): 846-856.
- [23] 徐艳, 刘喜平, 李琴山, 等. CCR2 介导 MCP 诱导的人内皮细胞凋亡[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2010, 26 (4): 356-361.
- [24] Saederup N, Chan L, Liras A, et al. Fractalkine deficiency markedly reduces macrophage accumulation and atherosclerotic lesion formation in CCR2^{-/-} mice; evidence for independent chemokine functions in atherogenesis [J]. *Circulation*, 2008, 117 (13): 1642-1648.
- [25] Koenen RR, Weber C. Therapeutic targeting of chemokine interactions in atherosclerosis[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9 (2): 141-153.
- [26] Laborde E, Macsata RW, Meng F, et al. Discovery, optimization, and pharmacological characterization of novel heteroarylphenylureas antagonists of C-C chemokine ligand 2 function [J]. *Med Chem*, 2011, 54(6): 1667-1681.
- [27] Tabas I. The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2010, 107 (7): 839-850.
- [28] Aiello RJ, Perry BD, Bourassa P-A, et al. CCR2 receptor blockade alters blood monocyte subpopulations but does not affect atherosclerotic lesions in apoE^{-/-} mice[J]. *Atherosclerosis*, 2010, 208 (2): 370-375.
- [29] Ley K, Miller YI, Hedrick CC. Monocyte and Macrophage dynamics during atherogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(7): 1506-1516.
- [30] Meisner JK, Price RJ. Spatial and temporal coordination of bone marrow-derived cell activity during arteriogenesis; regulation of the endogenous response and therapeutic implications[J]. *Microcirculation*, 2010, 17(8): 583-599.
- [31] Jerath MR, Liu P, Struthers M, et al. Dual targeting of CCR2 and CX3CR1 in an arterial injury model of vascular inflammation [J]. *Thromb J*, 2010, 8(5): 14-15.
- [32] Anzinger JJ, Chang J, Xu Q, et al. Native low-density lipoprotein uptake by macrophage colony-stimulating factor-differentiated human macrophages is mediated by macropinocytosis and micropinocytosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30 (10): 2022-2031.
- [33] Okamoto M, Fuchigami M, Suzuki T, et al. A novel C-C chemokine receptor 2 antagonist prevents progression of albuminuria and atherosclerosis in mouse models[J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35 (11) 2069-2074.

(收稿日期: 2013-06-08)

• 综 述 •

甲型肝炎的实验室诊断检测方法研究进展

杨璐 综述, 杨红英 审校

(昆明医科大学第二附属医院检验科, 云南昆明 650101)

关键词: 甲型病毒性肝炎; 检测方法; 免疫机制

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 07. 037

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)07-0885-03

甲型病毒性肝炎简称甲肝, 是一种由甲型肝炎病毒(HAV)感染引起的以肝脏炎症病变为主的传染病, 主要通过粪-口途径传播。其病程呈自限性, 引起急性重型肝炎者极为少见, 随着灭活疫苗在全世界的使用, 甲型肝炎的流行已得到有效的控制^[1-2]。

1 病原学

甲肝是一种急性病毒感染性肝炎。1974 年 Feinstone 等^[3]通过免疫电泳技术在甲肝患者粪便中发现甲肝病毒(HAV)。甲肝病毒是直径为 27~32 nm 的小 RNA 病毒, 其结构含有 VP1~VP4 四种多肽, 基因组为单股正链 RNA, 约 7 500 个核苷酸。HAV 对酸、热(60 ℃ 1 h), 以及乙醚、氯仿等有机溶液作用稳定, 但加热 100 ℃ 5 min 可使其灭活。

2 甲肝的公共卫生管理

HAV 的传播途径为粪-口途径, 主要在发展中国家流行。通过对公共卫生环境的管理和自我保健意识的改善提高, 在过

去的几十年中西方国家 HAV 的感染率得到有效的控制^[4-5]。提高人群的免疫水平是预防甲肝的主要措施, 随着甲肝灭活疫苗应用覆盖面不断扩大, 甲肝地区流行强度逐年明显减弱, 甲肝疫苗应用于控制甲肝流行在实践中得到许多专家的认可。

3 甲肝的免疫机制

在甲肝急性期患者血清中可以查出抗-HAV IgM 及 IgG, 患者患病后 2 周抗-HAV IgM 阳性率为 100%, 持续 2~3 周, 然后迅速下降。因此, 检测抗-HAV IgM 可作为急性期的诊断指标。抗-HAV IgG 是甲肝的主要中和抗体, 一般可从病人血清中查出, 此种抗体存在于患者体内很长时间甚至终身^[6]。

4 甲肝的实验室诊断方法

4.1 甲肝抗原的实验室检测方法

4.1.1 RT-PCR 法 该方法灵敏度高, 特异性强。但需专门的仪器设备, 操作过程复杂, 操作需经专业培训的人员, 且由于 RNA 容易降解, 所以 RNA 的提取过程要求较严格。目前对

该技术的应用主要是利用 RT-PCR 技术检测甲肝减毒活疫苗的病毒滴度,其重复性好,省时快捷,较组织培养法节约了大量时间^[7-8]。

4.1.2 RT-PCR-ELISA 法 该方法为半定量的检测方法。方法先通过 RT-PCR 扩增甲肝病毒 RNA,再用 ELISA 法检测扩增产物。该方法的引物和探针均为特异性,保证了此方法的特异性,而联合利用 ELISA 方法则提高了检测的灵敏度。结果判断客观,同时也避免了凝胶电泳和溴化乙锭等化学有毒物质的应用。有试验结果表明,用 ELISA 方法检测 PCR 产物与凝胶电泳法相比,灵敏度可提高 10 倍。该方法稳定性高,重复性好。其缺点在于试验必须建立在 RT-PCR 的基础上,所以检测成本高^[9]。

4.1.3 间接 ELISA 法 其原理为在已包被抗人 μ 链的酶标板中,加入已知的 HAV-IgM 阳性血清后,若待检血清中含 HAV-Ag,则被其吸附,HAV-Ag 再与经酶标记的甲肝抗体结合,底物显色后,根据颜色判断待检血清中是否含有 HAV-Ag。试验操作简单,可作为常规检测甲肝减毒活疫苗感染性滴度的方法^[10]。

4.1.4 SPA 协同凝集试验 利用金黄色葡萄球菌细胞壁中的 A 蛋白(SPA)能特异性的与单克隆甲肝 IgG 的 Fc 段结合(IgG3 除外),抗体的 Fab 2 段暴露在葡萄球菌的表面,仍保持与相应抗原特异性结合的特性,使之成为抗体致敏的载体颗粒,当待检样本中含有 HAV-Ag 时,即出现反向间接凝集反应。该试验灵敏度和特异性较前几种方法低,结果判断人为影响因素大,但是试验操作简单省时,设备要求低,可作为设备受限时的初步检测方法^[11]。

4.2 甲肝抗体的实验室检测方法 抗 HAV-IgM 在急性 HAV 感染时出现早,上升快,高峰滴度高,故检测抗 HAV-IgM 可作为诊断急性 HAV 感染指标^[12-13]。

4.2.1 ELISA 利用固相载体(如聚苯乙烯)有吸附免疫活性蛋白的特性,将抗人 IgM 特异性 μ 链抗体包被在聚苯乙烯微量滴定板上,并保持其免疫活性,其对血清中 IgM 有特异性选择作用,加入 HAV-Ag 和辣根过氧化物酶标记的抗-HAV-IgG,顺序反应后,再加入酶底物显色,用分光光度计在 492 nm 波长上测量。结果以样品 OD 值与 Cut off 值比较来判断^[14]。

ELISA 法简单方便经济实惠不需要特殊设备,操作方便快捷,在一般实验室即可开展,适于大批量人群抗原抗体筛查,但是 ELISA 法在测定中影响因素较多^[15]。样本处理时稀释倍数较高会影响检测结果的准确性。在定量检测时,由于 ELISA 法本身的原因敏感度为 57.57 mIU/mL,因此对抗体浓度的血清不能检出^[16]。

4.2.2 放射免疫法(RIA) 直接固相放射免疫测定法(SPRIA)检测甲肝病毒特异性 IgM 抗体时,在稀释的待检血清中,加入被抗人 IgM- μ 链包被的聚苯乙烯珠,孵育后,血清中甲肝 IgM 抗体与之特异性结合形成抗原抗体复合物,此时加入甲肝病毒抗原,就形成抗 IgM 抗体-甲肝 IgM-甲肝抗原复合物。加入 125I 标记的甲肝抗体,就形成了一个抗 IgM 抗体-甲肝 IgM-甲肝抗原-125I 标记甲肝抗体的复合物。用 γ 射线闪烁计数器测量小珠每分钟的脉冲数,即可知血清中是否存在甲肝 IgM 抗体。该试验操作复杂,但准确性好,灵敏度高,可超微量测定血清中的甲肝病毒 IgM 抗体^[17-18]。

4.2.3 化学发光法(CLIA) 利用了免疫反应和化学发光本身的信号特异性,无放射性危害,避免人为误差,被誉为目前免

疫检测的金标准^[19]。

4.2.3.1 化学发光微粒子免疫法(CMIA) 该方法是一项新的化学发光技术,具有特异性强灵敏度高结果稳定可靠的特点。其检测甲肝抗体的原理是以顺磁性微珠作为包被载体包被甲肝抗原(HAV-Ag)后,与标本中的 HAV-IgM 发生免疫反应与之结合为抗原抗体复合物,此时加入吖啶酯标记的抗 HAV-IgM 抗体后形成包被抗原-待测抗体-吖啶酯标记的抗 HAV-IgM 抗体复合物,在特定的磁场区发生沉积,经反复洗涤使游离抗体与抗原抗体复合物分离,加入预激发液与激发液后,测定其激发光强度即可定量判定标本中的 HAV-IgM 浓度。CMIA 法自动仪器及配套试剂,使人为因素减至最低,该法测定敏感性高,吖啶酯直接标记抗体,结合稳定,不影响抗体的生物学活性和理化特性,所以提高了稳定性和结果的可重复性,使批内差异与批间差异都较小^[20]。

4.2.3.2 微粒子酶免疫分析法(MEIA) 该方法以包被有抗-(人)IgM 的微粒子与样本 HAV-IgM 结合。随后加入甲肝病毒抗原,使其与结合到该包被微粒子上的抗-HAV-IgM 反应。接着加入大鼠单克隆的抗-HAV-碱性磷酸酶结合物,与抗-HAV-IgM 和 HAV 抗原形成的免疫复合物形成结合物。最后加入底物 4-甲基磷酸伞形酮。碱性磷酸酶标记的结合物将催化该底物的磷酸基团被移除,从而生成荧光产物 4-甲基伞型酮。此时通过比较荧光产物比率与平均指数校准品比率,即可测定该样本中的 HAV-IgM 抗体。该法普遍用于定量检测人血清或血浆中的 HAV-IgM 抗体^[21]。与 CMIA 相比,其样本检测及抗干扰能力具有等效性,加上其自动化操作,能满足临床实验室检测需要^[22]。

4.2.4 斑点金免疫结合试验(DIGFA) 该方法是 20 世纪 80 年代发展起来的一种简便快速的床旁免疫检测新技术,1996 年,肖乐义等^[23]建立了胶体金免疫渗滤试验用于快速检测抗甲肝 IgM 抗体的方法。DIGFA 法的优点是操作快捷,结果直观可靠,利用细胞单克隆培养的 HAV-Ag,抗原直接固相在硝酸微孔膜滤上,活性时间更长。胶体金试剂保质长期,保存时间至少为一年。操作步骤简单,不需要仪器,人员培训简单,技术操作容易掌握。DIGFA 法对于急诊来说,是一种优化的方法,其优点就是速度快,取得血清的情况下,10 min 可判读结果,但只能做定性检测,阳性率低于 ELISA 法,且对于弱阳性的表现度较差,容易造成弱阳性标本的漏读和误读,有试验表明该方法检测甲肝抗体的灵敏度是 92.8%,特异度是 92.98%,性价比和准确度方面都逊于 ELISA 法^[24]。

4.2.5 间接免疫荧光技术 该方法用于检测抗 HAV-IgM。从甲肝患者的粪便中分离到的甲肝病毒(BJ-1),此病毒能够感染 A549 细胞并产生细胞病变。以感染此病毒的 A549 细胞制成抗原加上病人待检血清,再加上羊抗人 μ 链荧光血清,即可用荧光显微镜检查^[25]。这一检测方法的特异性及灵敏性均较高。但免疫荧光技术容易产生非特异性反应,因此,要求稳定的实验条件,熟练、有经验的操作人员来判读阴性和弱阳性结果。

5 小结与展望

甲肝是与公共环境卫生有关的世界范围内的急性恶性传染病之一^[26]。我国是甲肝的高流行国家。1988 年 1 月,上海地区曾暴发大规模甲肝流行,感染者 31 万余例,死亡 11 人^[27]。随着甲肝疫苗的推广,使甲肝的暴发流行得到有效的控制。因其临床表现与其他肝炎相似,因此甲肝的实验室诊断

结果就显得尤为重要。近年来出现了关于用基因芯片诊断甲肝病毒的报道^[28]。因基因芯片对病原体的检测有高特异性和高效率性,其应用前景越来越受到广泛的关注和重视。进一步对这一芯片探针进行操作程序的规范和大样本量的复合检测将使基因芯片在疾病筛查和病毒性传染病的预防和控制中发挥重要的作用。

参考文献

[1] Martin A, Lemon SM. Hepatitis a virus; from discovery to vaccines[J]. Hepatology, 2006, 43(2 Suppl 1): S164-S172.

[2] Franco E, Meleleo C, Serino L, et al. Hepatitis a: epidemiology and prevention in developing countries[J]. World J Hepatol, 2012, 4(3): 68-73.

[3] Feinstone SM, Kapikian AZ, Gerin JL, et al. Buoyant density of the hepatitis A virus-like particle in Cesium chloride[J]. J Virol, 1974, 13(6): 1412-1414.

[4] Wasley A, Samandari T, Bell BP. Incidence of hepatitis A in the United States in the era of vaccination[J]. JAMA, 2005, 294(2): 194-201.

[5] 刘燕敏, 陈园生, 崔富强, 等. 中国 2004~2009 年甲型病毒性肝炎流行病学特征分析[J]. 中国疫苗和免疫, 2010, 16(5): 453-456.

[6] Roque-Afonso AM, Grangeot-Keros L, Roquebert B, et al. Diagnostic relevance of immunoglobulin G avidity for hepatitis A virus[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(11): 5121-5124.

[7] 李淑焱, 刘大维, 田旺, 等. RT-PCR 一步法检测甲型肝炎活病毒方法的建立[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(4): 28-31.

[8] 许春海, 李兆申, 代俊英, 等. 乙型肝炎病毒 cccDNA 巢式-实时荧光定量 PCR 法的建立及应用[J]. 临床肝胆病杂志, 2011, 27(3): 2683-2685.

[9] 吴星, 毛群颖, 张华远. 甲型肝炎病毒的 RT-PCR-ELISA 检测法[J]. 中国生物制品学杂志, 2006, 19(6): 639-640.

[10] 龙润乡, 熊秋霞, 李华, 等. 甲肝 IgM 抗体诊断试剂盒在甲肝病毒抗原检测中的应用[J]. 标记免疫分析与临床, 2004, 11(3): 173-176.

[11] 岳启安, 赵淑梅, 李在连, 等. 用单抗标记 SPA 对甲型肝炎的诊断价值[J]. 潍坊医学院学报, 1993, 15(4): 262-264.

[12] 姜立民, 周康凤, 陈悦青, 等. 酶联免疫吸附试验和微粒子酶免疫分析法检测血清甲型肝炎总抗体的比较研究[J]. 中国计划免疫, 2007, 13(1): 63-65.

[13] Chakvetadze C, Mallet V, Gaussec L, et al. Acute hepatitis A virus infection without IgM antibodies to hepatitis A virus[J]. Ann In-

tern Med, 2011, 154(7): 507-508.

[14] Hyun JJ, Seo YS, An H, et al. Optimal time for repeating the IgM anti-hepatitis A virus antibody test in acute hepatitis A patients with a negative initial test[J]. Korean J Hepatol, 2012, 18(1): 56-62.

[15] 王克波, 杨俊, 杨志俊. ELISA 试验的质量控制[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(1): 111-112.

[16] 王红旗, 金晶, 成军, 等. 美国 Abbott Axsym 免疫分析仪性能初步评价[J]. 现代检验医学杂志, 2003, 18(2): 20-21.

[17] 王兰兰, 吴健民, 李双庆. 临床免疫学与检验[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 71.

[18] 江砚芳, 刘素芳, 谢勇, 等. 人免疫球蛋白类制品甲肝抗体效价检测方法的探讨[J]. 中国输血杂志, 2010, 23(6): 451-452.

[19] 刘冀珑, 乔惠理, 邓泽沛. 化学发光免疫技术[J]. 化学通报, 2000(7): 49-53.

[20] 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.

[21] 马芳芳, 陈云, 谢则金, 等. HAV-IgM3 种方法检测结果比较[J]. 临床军医杂志, 2011, 39(4): 774-775.

[22] 金燕萍, 贾莉, 邵小霞, 等. 微粒子酶联免疫分析法与化学发光微粒子免疫法在检测甲肝病毒抗体 IgM 中的比较[J]. 现代检验医学杂志, 2010, 25(1): 56-57.

[23] 肖乐义, 阎小君, 徐德忠, 等. 斑点金免疫渗滤试验快速检测抗甲型肝炎病毒 IgM 抗体[J]. 第四军医大学学报, 1996, 17(6): 46-48.

[24] 刘瑛, 高红丽, 徐德忠, 等. 斑点金免疫渗滤试验检测血清中抗-HAV 抗体[J]. 第四军医大学学报, 2000, 21(11): S232-233.

[25] 田庚善. 甲型病毒性肝炎的诊断[J]. 临床肝胆病杂志, 1985, 1(1): 10-12.

[26] Dontsenko I, Kerbo N, Pullmann J, et al. Preliminary report on an ongoing outbreak of hepatitis A in Estonia, 2011[J]. Euro Surveill, 2011, 16(42): 19996.

[27] 张莹珍, 谢忠杭, 陈彩鄰, 等. 福建省 2004-2009 年甲型病毒性肝炎流行病学特征分析[J]. 海峡预防医学杂志, 2011, 17(2): 48-49.

[28] 陈建明, 韩俊, 董辰方, 等. 通用型病毒检测芯片在三种人类致病病毒属检测中的应用[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2006, 20(4): 327-330.

(收稿日期: 2014-01-08)

(上接第 870 页)

[3] 刘世平, 坤霞, 姜泓, 等. 孕妇血清微量元素与胎儿宫内发育迟缓关系的探讨[J]. 延安大学学报: 医学版, 2009, 10(7): 83-84.

[4] 于晶艳. 755 例早孕妇女微量元素的检测及结果分析[J]. 中国医药指南, 2011, 9(18): 134-135.

[5] 张兰梅, 王杨凯, 沙金燕, 等. L-型钙离子通道阻断剂——硝苯地平及硫酸镁对人足月妊娠子宫平滑肌收缩功能的抑制作用[J]. 第二军医大学学报, 2008, 29(4): 357-360.

[6] Lin S, Wang X, Yu IT, et al. Environmental lead pollution and elevated blood lead levels among children in a rural area of China[J]. Am J public Health, 2011, 101(5): 834-841.

[7] Taylor Mp, Schniering C. The public minimization of the risks associated with environmental lead exposure and elevated blood lead

levels in children, Mount Isa, Queensland Australia [J]. Arch Environ Occup Health, 2010, 65(1): 45-48.

[8] 范昕. 西安幼儿园 827 名儿童血中微量元素含量分析[J]. 现代检验医学杂志, 2008, 23(4): 36-37.

[9] 沈晓明, 颜崇淮, 吴胜虎, 等. 健康教育对轻中度儿童铅中毒干预作用的随机对照研究[J]. 中华儿科杂志, 2004, 42(12): 892-897.

[10] 陈惠文, 陈燕妮, 陈建华, 等. 儿童血铅水平与 5 种微量元素相互关系的研究分析[J]. 中国医药导刊, 2011, 13(6): 1051-1052.

[11] 刘慧芳, 孙鹏, 华春珍, 等. 儿童血铅水平与 5 种微量元素相互关系的研究[J]. 中国妇幼保健, 2007, 22(1): 62-63.

(收稿日期: 2013-11-15)