

## • 检验技术与方法 •

## 丙型肝炎病毒核酸和抗体检测方法在人群筛查中的比较及应用\*

朱红艳<sup>1</sup>, 毕胜<sup>1</sup>, 杨曦<sup>1</sup>, 李峥<sup>1△</sup>, 徐永敏<sup>2</sup>

(1. 云南省第一人民医院检验科, 云南昆明 650032; 2. 昆明理工大学生命科学院, 云南昆明 650032)

**摘要:**目的 探讨丙型肝炎病毒核酸和抗体检测方法在人群筛查中的应用。方法 采用胶体金快速试验法和酶联免疫吸附试验(ELISA)检测丙型肝炎病毒(HCV)抗体, 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测 HCV-RNA 病毒载量。结果 (1)539 份样本中, 其中 266 例抗体阴性, 263 例抗体阳性。(2)在 67 例 HCV-RNA 病毒载量小于  $10^3$  IU/mL 组中, ELISA 法检测 HCV 抗体阳性有 60 例, 胶体金快速试验法检测抗体阳性有 30 例。208 例 HCV-RNA 病毒载量大于或等于  $10^3$  IU/mL 组中, ELISA 法检测的抗体阳性有 199 例, 胶体金快速法检测阳性的有 181 例, 另外有 6 例两种抗体检测均为阴性患者 RNA 病毒载量大于或等于  $10^3$  IU/mL。(3)对 208 例 HCV-RNA 病毒载量大于或等于  $10^3$  IU/mL 样本分成 4 个组。GGT、ALT 及 AST 在 4 组间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ), 而 ALB 及 S/CO 值在 4 组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 在人群筛查中为了减少漏诊率, 尽早诊断丙型肝炎, 要联合运用以上各实验室检测方法, 综合分析。

**关键词:**丙型肝炎病毒抗体; 丙型肝炎病毒 RNA; 酶联免疫吸附试验; 实时荧光定量 PCR

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.20.039

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)20-2811-03

## Comparison of hepatitis C virus RNA and antibody detection method in population screening and its application\*

Zhu Hongyan<sup>1</sup>, Bi Sheng<sup>1</sup>, Yang Xi<sup>1</sup>, Li Zheng<sup>1△</sup>, Xu Yunmin<sup>2</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Yunnan Provincial First People's Hospital, Kunming, Yunnan 650032, China;

2. College of Life Science, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650032, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the application of hepatitis C virus RNA and antibody detection method in population screening. **Methods** The colloidal gold rapid test method and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were adopted to detect hepatitis C virus (HCV) antibodies, and the real-time quantitative PCR (RT-PCR) was adopted to detect HCV-RNA viral load. **Results** (1) Among 539 samples, 266 cases were antibody negative and 263 cases were antibody positive. (2) Among 67 cases in the HCV-RNA viral load  $< 10^3$  IU/mL group, 60 cases were HCV antibody positive by ELISA and 30 cases were HCV antibody positive by colloidal gold rapid test. Among 208 cases in the HCV-RNA viral load  $\geq 10^3$  IU/mL, 199 cases were antibody positive by ELISA, but only 181 cases were antibody positive by the colloidal gold rapid method. Other 6 cases of were 2 kinds of antibody negative had the HCV-RNA viral load  $\geq 10^3$  IU/mL. (3) 208 cases of HCV-RNA viral load  $\geq 10^3$  IU/mL sample were divided into four groups. GGT, ALT and AST were statistically significantly different  $P < 0.05$ , while ALB and S/CO values had no statistical difference ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** In order to reduce the missed diagnosis rate and diagnose hepatitis C as early as possible, the above laboratory detection methods should be jointly applied and the comprehensive analysis should be conducted in population screening.

**Key words:** hepatitis C virus antibodies; hepatitis C virus RNA; enzyme-linked immunosorbent assay; real-time PCR

丙型肝炎由丙型肝炎病毒(HCV)感染引起, 是一种主要经血液传播的疾病, 对患者的健康和生命危害极大, 已成为严重的社会和公共卫生问题。中国病毒性肝炎的发病人数一直位于所有传染病的前列, 而丙型肝炎报告发病率在病毒性肝炎中也呈现上升趋势。本文对对云南省某地区人群进行 HCV 抗体筛查、核酸及肝酶检测, 并探讨三者丙型肝炎诊治中的应用。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 对云南省某地区人群进行病毒性肝炎标志物筛查, 共筛查 539 例, 其中男性 182 例, 女性 347 例。

## 1.2 方法

**1.2.1 筛查方法** 采集空腹静脉血, 离心, 取血清进行 HCV 抗体检测采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法和胶体金法。 $\gamma$

谷氨酰基转氨酶(GGT)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)和清蛋白(ALB)测定进行初筛, 然后对 ELISA 法和胶体金法检测抗体均阳性、一种方法阳性及两种方法均为阴性但肝酶明显异常的标本做 HCV-RNA 定量检测。共有 275 例标本进行了 2 种方法检测。

**1.2.2 HCV 抗体检测(ELISA 法)** 采用 ELISA 法, 酶标仪判读, 试剂为北京万泰生物药业股份有限公司生产, 操作及结果判读按试剂说明书。临界值计算: 阴性对照孔均值(不足 0.02 按 0.02 计算) + 0.12。

**1.2.3 HCV 抗体检测(胶体金法)** 试剂为英科新创(厦门)科技有限公司生产, 操作及结果判读按试剂说明书。

**1.2.4 HCV-RNA 定量检测** 提取病毒核酸, 采用实时荧光定量聚合酶链反应技术(RT-PCR)检测, 试剂为中山大学达安

基因股份有限公司(YZB/国 0371-2009)生产,操作严格按照试剂盒说明书进行。HCV-RNA 检出下线为 HCV-RNA 等于  $10^3$  IU/mL。以上 3 种试剂均在有效期内并有试剂盒内、外质控。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析,因部分数据呈偏态分布,丙型肝炎病毒 RNA  $\geq 10^3$  IU/mL 组 ALT、AST、GGT 及 ALB 检测值,S/CO 值,均采用秩和检验。

**2 结 果**

**2.1 HCV 抗体检测结果** 对 539 份标本用 ELISA 法和胶体金法进行检测,其中 266 例 ELISA 法与胶体金法检测 HCV 抗体均为阴性,263 例 ELISA 法与胶体金法检测 HCV 抗体双阳或单阳。HCV 抗体阳性和肝酶增高的患者共有 275 例进行 HCV-RNA 定量检测,见表 1。

表 1 275 份血清样本三种方法阳性结果(n)

检测方法	ELISA	胶体金法	RNA
阳性	259	211	208
阴性	16	64	67
合计	275	275	275

**2.2 HCV-RNA 定量检测结果** 在 67 例 HCV-RNA 病毒载量小于  $10^3$  IU/mL 组中,有 29 例是两种方法检测 HCV 抗体均为阳性,60 例 ELISA 法 HCV 抗体阳性,而胶体金法检测有

30 例阳性。208 例 HCV-RNA 病毒载量大于或等于  $10^3$  IU/mL 组中,ELISA 法检测的抗体阳性有 199 例,胶体金法检测阳性的有 181 例,另外有 6 例两种抗体检测均为阴性患者 RNA 病毒载量检测为阳性,见表 2。

表 2 208 例 HCV-RNA 定量检测结果与 HCV 抗体检测结果比较表(n)

HCV-RNA 组别	检测方法	ELISA 法		合计
		阳性(+)	阴性(-)	
RNA < $10^3$ IU/mL 组	胶体金法阳性(+)	29	1	30
	阴性(-)	31	6	37
	合计	60	7	67
RNA $\geq 10^3$ IU/mL 组	胶体金法阳性(+)	178	3	181
	阴性(-)	21	6	27
	合计	199	9	208

**2.3 HCV-RNA 载量与肝脏指标及 S/CO 值关系** 对 208 例 HCV-RNA 病毒载量大于或等于  $10^3$  IU/mL 样本分成 4 个组。比较 HCV-RNA 病毒载量与肝功酶学和清蛋白之间的关系,经统计学分析可见,GGT、ALT 及 AST 在 4 个组间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),而 ALB 及 S/CO 值在 4 个组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 3。

表 3 HCV-RNA 载量与肝指标比较

病毒载量(IU/mL)	n	GGT(U/L)	GGT 异常	ALT(U/L)	ALT 异常	AST(U/L)	AST 异常	ALB(g/L)	ELISA 法 S/CO
		P <sub>50</sub> (P <sub>25</sub> )	[n(%)]	P <sub>50</sub> (P <sub>25</sub> )	[n(%)]	P <sub>50</sub> (P <sub>25</sub> )	[n(%)]	( $\bar{x} \pm s$ )	( $\bar{x} \pm s$ )
$1 \times 10^3 \leq \text{HCV-RNA} < 1 \times 10^4$	56	25.5(66.25)*	22(39.3)	32.0(44.25)*	24(42.9)	34.5(25.75)*	23(41.1)	45.79 $\pm$ 2.93	10.73 $\pm$ 5.89
$1 \times 10^4 \leq \text{HCV-RNA} < 1 \times 10^5$	54	50.5(69.75)*	32(59.3)	55.0(57.75)*	34(63.0)	54.0(46.25)*	41(75.9)	44.50 $\pm$ 3.42	11.15 $\pm$ 5.38
$1 \times 10^5 \leq \text{HCV-RNA} < 1 \times 10^6$	79	43.0(71.00)*	43(54.4)	59.0(86.00)*	57(72.2)	62.0(39.00)*	66(83.5)	45.31 $\pm$ 2.21	11.50 $\pm$ 3.70
HCV-RNA $\geq 1 \times 10^6$	19	31.0(56.00)*	8(42.1)	38.0(32.00)*	8(42.1)	47.0(30.00)*	13(68.4)	44.84 $\pm$ 7.96	11.50 $\pm$ 3.96

\*:  $P < 0.05$ ,各组间两两比较。

**3 讨 论**

目前,对丙型肝炎的实验室诊断主要是通过对 HCV 抗体及 HCV-RNA 的检测来进行判断。HCV 抗体检测分为筛查试验(ELISA 法、胶体金法、化学发光法及免疫荧光试验法)和补充试验法(免疫印迹试验法)。抗体检测存在的缺陷是“窗口期”长,且存在漏检现象<sup>[1]</sup>。HCV-RNA 检测是 HCV 感染的可靠依据,其灵敏度能达到 98%~99%,通过定量检测可知治疗中病毒载量的动力学变化,更可以通过治疗前和治疗中病毒载量的改变形式,预测和早期判断治疗效果,以便及时选择和改变治疗方案<sup>[2]</sup>。

HCV 抗体检测阳性患者,需做 HCV-RNA 检测,如血清中有 HCV-RNA 存在,进一步证明感染 HCV,且能为抗病毒治疗提供疗效判断指标。HCV 抗体检测阳性患者,而 HCV-RNA 检测低于检测下限时,可能的原因:血液中存在高浓度非特异性 IgG 或类风湿因子吸附于固相载体或包被的抗原;受检样本中超氧化物歧化酶的干扰;用于制备试剂的 HCV 抗原不纯<sup>[3]</sup>。此外,可能某些 HCV 感染者 RNA 病毒载量低,但是 HCV 抗体存在。值得注意的是,208 例患者血清 HCV-RNA 载量高于 1 000 copies/mL,但 ELISA 法检测有 9 例抗体阴性,胶体金法检测抗体有 27 例阴性,其中 6 例是两种抗体检测法

都是阴性。这 6 例患者均有以上 3 种肝酶中的一种或两种酶超过正常上限两倍,且平均 S/CO 值是 0.304,最小值是 0.064,最大值是 0.686。这可能是因为:(1)这些患者还处于感染的“窗口期”,因为患者感染 HCV 后“窗口期”可达 3 个月之久,而感染两周内就可以检测到 HCV-RNA,较 HCV 抗体检测可提前约 60 d;(2)机体免疫功能低下,不能产生相应抗体<sup>[4]</sup>。因此,当患者有肝损伤时,抗体检测阴性,应进一步检测是否有病毒的存在或进行抗体补充试验(免疫印迹试验)。RNA 小于  $10^3$  IU/mL 组中有 20 例患者肝酶异常,但 HCV-RNA 载量低于检测下限,14 例 ELISA 法检测抗体阳性,6 例抗体阴性,对这部分患者临床上应该进行抗体补充试验确定是否存在 HCV 感染。

本文对 208 例患者 HCV-RNA 按病毒载量进行分组,4 个组间肝酶 GGT、AST 及 ALT 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),肝酶增高与 RNA 病毒载量变化基本一致,这与国内相关报道相同<sup>[5-6]</sup>。但有报道认为 HCV-RNA 病毒载量高低与 ALT、AST 异常率正相关,但与两酶水平无关<sup>[7]</sup>。在本文中,当病毒载量较高(HCV-RNA  $\geq 1 \times 10^6$  IU/mL)组肝酶反而偏低,可能与该组病例数偏少或者是该组患者病毒载量高,或者已经治疗有关,或者与机体免疫状态及治疗预后有关,(下转第 2815 页)

同,主要与 ANA 的靶抗原在细胞中的部位有关,核均质型多为抗 dsDNA 抗体、抗组蛋白抗体、抗核小体抗体,核颗粒型多为抗 SSA 抗体、抗 Ro-52 抗体、抗 SSB 抗体,核仁型多为抗 Ro-52 抗体、抗 PM-Scl 抗体,着丝点型常见抗 CENPB 抗体,胞浆颗粒型常见抗 AMA-M2,进一步表明 IIF 与 LIA 有一定相关性。这与文献[6]报道基本一致。

IIF 与 LIA 检测结果并不完全一致,表 2 数据显示,249 例 IIF 阳性病例中 LIA 阴性 50 例,符合率 79.9%,与胡朝军等<sup>[7]</sup>的研究一致,对于这种 IIF 阳性而 LIA 阴性的情况可能是方法不同所致,IIF 法玻片上包含的抗核抗原种类较多,而 LIA 法条带上只包被 15 种特异性抗核抗原,这可能是造成 IIF 阳性而 LIA 阴性的主要原因<sup>[8]</sup>。而在 725 例 IIF 阴性病例中 LIA 阳性 38 例,符合率 94.8%,与胡朝军等<sup>[7]</sup>的研究不一致,可能与病例组成有关,也可能是本院就诊病例 AID 患病率较低所致,关于病例组成与本文无关未做统计分析。这种 IIF 阴性但是 LIA 阳性的情况可能是由于 LIA 法的条带所包被的抗原纯度高特异性强,IIF 法检测所用的玻片基质中抗原分布不均匀、含量少或者固定方法对特定抗核抗原存在破坏的因素引起<sup>[8-10]</sup>,也可能是两种方法使用的抗原处理方法不同导致的。也有学者认为这种 IIF 阴性而 LIA 阳性的情况,尤其是系统性红斑狼疮(SLE)的患者,可能因为用过治疗药物或处于发病早期或者大量蛋白经尿排出<sup>[11]</sup>。也有研究显示目前应用的 IIF 底物 Hep-2 会使部分 SLE 患者血清 ANA 呈阴性<sup>[12]</sup>。分析表明两者联合检测的阳性率与只检测其中一种的阳性率相比差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。如果只用 IIF 或 LIA 一种方法检测,将导致一部分患者的漏检,两者联合检测将提高检出率。

综上所述,ANA 核型与 ANA 谱有一定相关性,但并不完全一致,IIF 法检测 ANA 核型具有检测 ANA 的全面性,LIA 法检测 ANA 谱具有检测的特异性,二者联合检测能避免漏检,提高检出率,对 AID 的诊断、鉴别诊断、疗效观察及预后判

断等具有重要意义。

## 参考文献

- [1] 宁小晓,王蕾.间接免疫荧光及免疫印迹法检测抗核抗体的回顾性分析[J].现代免疫学,2012,32(2):159-163.
- [2] 李艳,孙家祥,鄂建飞.1725 例血清抗核抗体及抗核抗体谱检测结果分析[J].西部医学,2012,24(3):584-586.
- [3] 吴东海,王国春.临床风湿病学[M].北京:人民卫生出版社,2008.
- [4] Meroni PL,Schur PH. ANA screening:an old test with new recommendations[J]. Ann Rheum Dis,2010,69(8):1420-1422.
- [5] 李晔,孙艳艳.1000 例临床标本抗核抗体检测结果分析[J].国际检验医学杂志,2011,32(18):2072-2073.
- [6] 郭大文,张英辉,单娜,等.抗核抗体核型与条带免疫抗体谱相关性分析[J].中华实用诊断与治疗杂志,2012,26(6):560-562.
- [7] 胡朝军,李俊,张道强,等.间接免疫荧光法筛查抗核抗体与特异度抗体检测的相互关系[J].中华临床免疫和变态反应杂志,2011,5(3):179-185.
- [8] 朱蓉,孙明忠,居会祥,等.2771 例抗核抗体谱检测结果分析[J].检验医学与临床,2013,2(10):13-16.
- [9] Tanaka N,Muro Y,Sugiura K, et al. Anti-SS-A/Ro antibody determination by indirect immunofluorescence and comparison of different methods of anti-nuclear antibody screening: evaluation of the utility of HEp-2 cells transfected with the 60 kDa SS-A/Ro as a substrate[J]. Mod Rheumatol,2008,18(6):585-592.
- [10] Bossuyt X,Luyckx A. Antibodies to extractable nuclear antigens in antinuclear antibody-negative samples[J]. Clin Chem,2005,51(12):2426-2427.
- [11] 叶冬青.红斑狼疮[M].北京:人民卫生出版社,2006:263.
- [12] 孙家祥,李艳.652 例抗核抗体阴性病例的抗核抗体谱的检测分析[J].海南医学,2011,22(7):113-114.

(收稿日期:2014-03-20)

(上接第 2812 页)

还有待研究。而清蛋白水平在 4 个组患者间差异不大,ALB 不是反应急性肝细胞损伤的指标,而是常常用来反应肝脏合成功能的指标。此外,4 个组中 ELISA 法的 S/CO 值差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),但国内有报道显示 HCV-RNA 阳性率与 S/CO 值呈正相关,S/CO 值越高,HCV-RNA 阳性率越高<sup>[8]</sup>。从以上数据分析可知,HCV 抗体检测是丙肝感染筛选实验,存在假阳性和漏检,HCV-RNA 检测能进一步证实 HCV 感染,且 RNA 病毒载量与反应肝细胞损伤酶谱相关,因此,HCV-RNA 病毒载量检测也是丙型肝炎治疗中疗效观察的一个重要指标。

综上所述,要做到尽早诊断丙型肝炎,减少漏诊率,要联合运用以上各实验室检测方法,综合分析,并且要不断改进丙型肝炎实验室检查方法,缩短“窗口期”,提高特异性和灵敏度。

## 参考文献

- [1] 中华医学会传染病与寄生虫病分会,肝病学会.病毒性肝炎防治方案[J].中华肝病杂志,2000,5(4):257-263.

- [2] 李明慧,邱国华,路遥,等.丙型肝炎实验室诊断研究进展[J].中华实验和临床病毒学杂志,2010,24(5):394-396.
- [3] 任芙蓉,庄辉.丙型肝炎病毒抗体酶联免疫试验 S/CO 比值与补充试验阳性的相关性研究进展[J].中华检验医学杂志,2005,28(2):1096-1099.
- [4] Kohji Moriishi, Yoshiharu Matsuura. Evaluation systems for anti HCV drugs[J]. Adv Drug Del Rev,2007,59(23):1213-1221.
- [5] 罗娜,张劲丰,苏荣. HCV-RNA 载量与抗 HCV 阳性率及 ALT 异常率的相关分析[J].现代预防医学,2012,39(13):3334-3335.
- [6] 陈馨.血清 HCV-RNA、抗 HCV 抗体及肝脏酶谱联合诊断治疗丙型肝炎的临床意义[J].国际检验医学杂志,2014,35(7):903-904.
- [7] 戚应杰,岳莉,朱义媛.丙型肝炎患者病毒载量与 ALT、AST 的相关性研究[J].国际检验医学杂志,2012,33(9):1134-1135.
- [8] 王茉莉,姜涛,潘煜,等. HCV 感染患者 436 例丙型肝炎病毒载量与抗-HCV 及 ALT 异常的关系[J].中国老年学杂志,2011,31(5):770-772.

(收稿日期:2014-05-12)