

• 论 著 •

丙型肝炎病毒核心抗原检测在丙型肝炎筛检中的应用

刘清银, 刘小庆, 李华信[△]

(中国人民解放军第一五〇中心医院检验科, 河南洛阳 471031)

摘要:目的 探讨丙型肝炎病毒核心抗原(HCV-cAg)对丙型肝炎(简称丙肝)筛查的意义。方法 收集 2014 年 10 月至 2015 年 10 月 8 000 例门诊及住院患者,用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 HCV-cAg、丙型肝炎病毒抗体(HCV-Ab),并对 HCV-cAg 或 HCV-Ab 阳性标本采用聚合酶链反应(PCR)法检测 HCV-RNA 进行确诊。结果 以 HCV-cAg 或 HCV-Ab 阳性为标准,从 8 000 例血清样本中初步筛查出阳性样本 82 例,经 HCV-RNA 确证,其中 HCV-RNA 阳性 73 例,阴性 9 例,HCV-cAg 的灵敏度及特异度分别为 45.83% 和 99.98%,HCV-Ab 的灵敏度及特异度分别为 94.44% 和 99.90%,联合检测 HCV-cAg 与 HCV-Ab 的灵敏度及特异度分别为 100.00% 和 99.86%。结论 在丙肝筛检工作中,HCV-cAg 与 HCV-Ab 二者有互补性,联合检测 HCV-cAg 与 HCV-Ab 有助于提高 HCV 筛查率。

关键词:丙型病毒性肝炎; 丙型肝炎病毒核心抗原; 筛查
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.04.014 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2017)04-0468-03

Application of hepatitis C virus core antigen detection in hepatitis C Screening

LIU Qingyin, LIU Xiaoqing, LI Huaxin[△]

(Department of Clinical Laboratory, 150 Central Hospital of PLA, Luoyang, Henan 471031, China)

Abstract: Objective To investigate the clinical significance of HCV core antigen (HCV-cAg) in hepatitis C screening. **Methods** From October 2014 to October 2015, a total of 8 000 serum samples were collected from the outpatient and inpatient. HCV-cAg and hepatitis C antibody (HCV-Ab) were detected by using ELISA. The positive samples of HCV-cAg or HCV-Ab were performed the confirmative diagnostic detection by PCR. **Results** Among 8 000 serum samples, 82 positive samples were screened out, in which 73 cases were HCV-RNA positive by elementary screening with the standard of HCV-cAg or HCV-Ab positive, among which 72 were HCV-RNA positive and 9 cases were HCV-RNA negative by HCV-RANA confirmation. The sensitivity and specificity of HCV-cAg were 45.83% and 99.98%, sensitivity and specificity of HCV-Ab were 94.44% and 99.90%, which of HCV-cAg and HCV-Ab combined detection were 100.00% and 98.86% respectively. **Conclusion** HCV-cAg and HCV-Ab play complementary role in HCV screening. Their combined detecting contributes to increase the screening rate of HCV.

Key words: viral hepatitis C; hepatitis C virus core antigen; screening

丙型肝炎病毒(HCV)是引起丙型病毒性肝炎的病原体,通过输血或血制品、血透析、肾移植、静脉注射毒品、性传播、母婴传播等传染引起,是仅次于乙型肝炎的第二大类传染病,多数病例呈亚临床型,具有隐匿型感染,常被误诊和漏诊。往往被发现时已到晚期,危害十分严重。因此对丙型肝炎(简称丙肝)的早期诊断、早治疗、阻断 HCV 传播尤为重要。本文通过检测 8 000 例血清样本丙型肝炎核心抗原(HCV-cAg),探讨 HCV-cAg 在丙型肝炎筛查中的意义,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 一般资料 收集 2014 年 10 月至 2015 年 10 月来院就诊的门诊及住院患者 8 000 例,其中男 4 130 例,女 3 870 例,年龄 8~72 岁。

1.2 方 法

1.2.1 HCV-cAg、丙型肝炎病毒抗体(HCV-Ab)检测 HCV-cAg、HCV-Ab 均采用酶联免疫吸附试验(ELISA)方法检测,仪器为郑州安图生物公司的 PHOMO 型酶标仪,试剂盒分别为湖南康润药业有限公司、郑州安图生物公司。严格按照标准操作程序进行操作阳性结果经二次复检。

1.2.2 HCV-RNA 采用美国 ABI7000 型荧光定量 PCR 仪

进行定量检测,试剂为上海科华生物有限公司,以拷贝数 $>5.0 \times 10^2$ IU/mL 为阳性结果。另配有恒温水浴箱、震荡仪各 1 台。

1.3 统计学处理 所有数据应用 SPSS16.0 统计学软件进行统计分析。配对资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HCV-cAg 或 HCV-Ab 阳性结果及其 HCV-RNA 确认 以 HCV-cAg 或 HCV-Ab 阳性为标准,在 8 000 例样本中初步筛检出可疑丙肝患者 82 例,以 HCV-RNA 阳性为标准进一步确认,结果发现 HCV-RNA 阳性 72 例、阴性 10 例。其中, HCV-cAg 阳性的 35 例样本中, HCV-RNA 阳性 33 例、阴性 2 例,与 HCV-RNA 相比,差异无统计学意义($\chi^2 = 2.395, P = 0.122$); HCV-Ab 阳性的 76 例样本中, HCV-RNA 阳性 68 例、阴性 8 例,与 HCV-RNA 相比,差异无统计学意义($\chi^2 = 2.701, P = 0.100$)。见表 1。

2.2 HCV-cAg、HCV-Ab 对丙型肝炎筛查价值的评估 HCV-cAg 与 HCV-Ab 阳性样本的比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 8.663, P = 0.003$),见表 2。经确证实验, HCV-Ab 阳性、

HCV-cAg 阴性的 47 例样本中, HCV-RNA 阳性 39 例、阴性 8 例, 而 HCV-Ab 阴性、HCV-cAg 阳性的 6 例样本中, HCV-RNA 阳性 4 例、阴性 2 例。HCV-cAg 及 HCV-Ab 筛查丙型肝炎的灵敏度、特异度等指标见表 3。

表 1HCV-cAg 或 HCV-Ab 阳性样本 HCV-RNA 检测结果 (n)

项目	n	HCV-cAg		HCV-Ab	
		+	—	+	—
HCV-RNA(+)	72	33	39	68	4
HCV-RNA(—)	10	2	8	8	2
合计	82	35	47	76	6

表 2HCV-cAg 与 HCV-Ab 阳性样本的比较 (n)

项目	HCV-cAg		合计
	+	—	
HCV-Ab(+)	29	47	76
HCV-Ab(—)	6	0	6
合计	35	47	82

表 3HCV-cAg、HCV-Ab 联合测定结果对 HCV 诊断的价值分析

项目	敏感度 (%)	特异度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)	Youden 指数
HCV-cAg	45.83	99.98	94.29	99.51	0.46
HCV-Ab	94.44	99.90	89.47	99.95	0.94
HCV-cAg+ HCV-Ab	100.00	99.86	87.80	99.87	1.00

3 讨 论

丙肝是世界性传染病之一, 据世界卫生组织统计, 全球 HCV 感染率已达 3%, 每年新发 HCV 病例约 315 例^[3], 而高度慢性化是该病的最大特征^[4]。所产生的抗-HCV 可存在于患者体内长达数年至十几年, 甚至是终身存在^[5]。与乙型肝炎 (简称乙肝) 相比, 其危害性明显大于乙肝, 因为成人感染乙型肝炎病毒后 90% 可以痊愈, 而 80% 的丙肝患者则会发展成慢性肝炎, 且有相当比例患者发展为肝硬化、肝癌^[6], 给患者及其家庭、社会带来长期痛苦和巨大的经济负担。

目前现行的筛检方法常用 ELISA 法检测 HCV-Ab。它具有简便、快速、灵敏度及特异度较好的特点, 但对灰区结果判读的可靠性通常较差^[7], 且抗体窗口期较长, 一般情况下感染 HCV 后需 70 d 甚至数月才产生抗-HCV^[8], 故不能早期诊断丙肝感染, 且 HCV-Ab 也无法区别患者为现症感染者或既往感染者, 此外, 长期使用免疫抑制剂及血液透析患者可出现 HCV-Ab 持续阴性。荧光定量 PCR 法检测 HCV-RNA, 可反映患者体内病毒复制情况, 是 HCV 感染的确证实验。检测的窗口期短, 约为 14 d^[9], 但受到实验操作繁琐、价格昂贵等诸多影响因素的影响, 难以在常规实验室或基层医院推广、普及和应用^[10]。

为阻断经血液及其他传播途径导致的 HCV 感染, 实现

HCV 感染者的早期检出是临床亟待解决的课题之一。近些年关于 HCV-cAg 的检测有越来越多的报道, 有文献报道, HCV-cAg 几乎与 HCV-RNA 同时出现, 二者检测窗口期仅差 1~2 d^[11-13], 而 HCV-Ab 检测窗口期需 40~70 d, 极大缩短了检测的窗口期, 且试验方法同 HCV-Ab 检测, 简便、快速且无需增加特殊仪器。

本研究通过检测 8 000 例血清样本, 结果发现, 在 35 例 HCV-cAg 阳性的样本中, 经 HCV-RNA 确证实验, 32 例为阳性, 阳性预测值为 94.29%, 与朱鸿等^[12]报道的 95.2% 相近, 因此可作为 HCV 感染的早期诊断。而在 82 例 HCV-cAg 或 HCV-Ab 阳性的 82 例样本中, 两者检出的差异有统计学意义。经确证实验, HCV-Ab 阴性、HCV-cAg 阳性的 6 例样本中, HCV-RNA 阳性 4 例、阴性 2 例, 即单独检测 HCV-Ab 漏诊的 4 名丙肝患者通过检测 HCV-cAg 得以诊断, 说明 HCV-cAg 和 HCV-Ab 在丙型肝炎筛查中均有一定的意义, HCV-cAg 对 HCV-Ab 有一定的互补作用, 但由于 HCV-cAg 的灵敏度较低, 在丙型肝炎的筛查中 HCV-cAg 尚不能取代 HCV-Ab 的作用, 只能作为 HCV-Ab 的补充, 联合检测 HCV-cAg 与 HCV-Ab 可以提高丙型肝炎的筛查率^[14]。

总之, HCV-cAg 检测方法简单, 价格低廉, 但有其局限性, 与 HCV-Ab 联合检测, 可相互补充, 有效减少丙肝窗口期的漏检, 有利于提高临床对 HCV 感染的早期诊断, 从而积极治疗, 而在临床输血、外科手术等治疗过程中也可以及时阻断丙型肝炎传播, 值得临床实验室普及应用。

参考文献

[1] 杨清梅, 黄志伟, 贾伟健, 等. 丙肝病毒核心抗原与丙肝抗体联合检测在丙型肝炎诊断中的应用[J]. 实用医学杂志, 2015, 32 (9): 1470-1471.

[2] 钱明, 袁君君, 傅剑钊, 等. HCV-RNA、抗-HCV 和 ALT 联合检测在丙肝中诊断的应用[J]. 中国实用医药, 2011, 5(14): 5-6.

[3] 买制刚. 丙型肝炎临床检验技术与发展[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(1): 190-192.

[4] Kim W. The burden of hepatitis C in the united state8 [J]. Hepatology, 2002, 36(5): 330-341.

[5] Li MH, Xie Y, Lu Y, et al. The predictive value of on-treat-ment virological response for sustained virological response in patients with chronic hepatitis C receiving a personalized treat-ment program [J]. Infect Internat, 2013, 20(2): 60-70.

[6] 朱世能, 陆祎. 丙型肝炎病毒与肝细胞癌关系研究进展[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(4): 356-359.

[7] 尹秀华. 丙型肝炎检测方法的研究进展[J]. 医学理论与实践, 2013, 26(2): 171-173.

[8] Irshad M, Mankotia DS, Irshad K. An insight into the di-agnosis and pathogenesis of hepatitis C virus infection [J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(44): 7896-7909.

[9] Marwaha N, Sachdev S. Current testing strategies for hepatitis C virus infection in blood donors and the way forward [J]. World J Gastroenterol, 2014, (下转第 472 页)

2.3 RT-LAMP 和 RT-PCR 方法比较分析 RT-LAMP 和 RT-PCR 方法同时检测 100 份肠道病毒标本结果见表 2, 两种方法检出率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 2 EV71 型两种方法检测结果(n)

RT-LAMP 法	RT-PCR		合计
	+	-	
+	60	3	63
-	2	35	37
合计	62	38	100

3 讨 论

引物是 LAMP 方法的关键^[12], 本研究设计了 4 套 LAMP 引物, 经筛选, 选择其中 2 套用于 HFMD EV71 型肠道病毒 LAMP 检测。由于目前的国产 HFMD 荧光 PCR 检测试剂盒质量参差不齐, 本研究选择中国疾控中心下发的《手足口病标本采集及检测技术指南》中的普通 RT-PCR 作为本研究的参照方法。比较发现, 本研究建立的 EV71 型 RT-LAMP 方法与 RT-PCR 方法检出率和敏感度相同, 但本研究建立的 EV71 型 RT-LAMP 方法无需 PCR 仪, 在普通恒温水箱内恒温 120 min 即可完成核酸扩增, 具有方便快捷的优点。

RT-LAMP 方法相比 LAMP 方法需要逆转录步骤, 逆转录酶的效率也是研究中的一个重点, 本研究中对常用的 3 种酶进行了比较, 发现 AMV 逆转录酶(Promega 公司)相比 Platinum Taq Mix 逆转录酶(Invitrogen 公司)更适合本研究中的 RT-LAMP 方法。

关于肉眼检测, 本研究尝试了使用阿拉丁和 1 000×SYBR Green I 进行肉眼观察的比较研究, 发现 1 000×SYBR Green I 显色更稳定, 但阿拉丁可以在配置反应体系时加入, 无需后续开盖加入染料染色的过程(避免了污染的可能), 但其显色表现尚不稳定, 需要进一步使用其他品牌染料进行试验(如进口阿拉丁染料)。

综上所述, 本研究建立了 HFMD EV71 型肠道病毒 LAMP 检测方法, 该方法无需昂贵的仪器设备, 仅需要 1 台普通恒温水箱即可进行 LAMP 核酸扩增, 方便快捷, 将本方法优化后有望用于 HFMD 的早期快速检测。

参考文献

[1] Schmidt NJ, Lennette EH, Ho HH. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system[J]. J Infect Dis, 1974, 129(3): 304-309.

(上接第 469 页)

20(11):2948-2954.

[10] Ansaldi F, Orsi A, Sticchi L, et al. Hepatitis C virus in the new era: perspectives in epidemiology, prevention, diagnostics and predictors of response to therapy [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(29):9633-9652.

[11] 许芳, 李晓兰, 祝琳. 丙肝病毒核心抗原检测对于丙型肝炎诊断的价值[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(5): 713-715.

[12] 朱鸿, 张韬, 范存琳, 等. 丙型肝炎病毒核心抗原检测对于丙型肝炎诊断的价值[J]. 大连医科大学学报, 2010, 32

[2] Lum LC, Wong KT, Lam SK, et al. Neurogenic pulmonary oedema and enterovirus 71 encephalomyelitis[J]. Lancet, 1998, 352(9137):1391.

[3] Lin TY, Chang LY, Hsia SH, et al. The 1998 enterovirus 71 outbreak in Taiwan: pathogenesis and management[J]. Clin Infect Dis, 2002, 34(2):52-57.

[4] 罗垵炜, 高立冬, 胡世雄, 等. 2015 年湖南省手足口病流行特征分析[J]. 热带病与寄生虫学, 2016, 14(1):6-9.

[5] Notomi T, Okayama H, Masubuchi HA, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12):63.

[6] Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex, Mavium, and M. intracellulare in sputum samples[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(6):2616-2622.

[7] Yoshikawa T, Ihira M, Akimoto S, et al. Detection of human herpesvirus 7 DNA by loop-mediated isothermal amplification[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(3):1348-1352.

[8] Mori Y, Kitao M, Tomita N, et al. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA [J]. J Biochem Biophys Methods, 2004, 59(2):145-157.

[9] Song T, Toma C, Nakasone N, et al. Sensitive and rapid detection of Shigella and enteroinvasive Escherichia coli by a loop-mediated isothermal amplification method [J]. FEMS Microbiol Lett, 2005, 243(1):259-263.

[10] Horisaka T, Fujita K, Iwata T, et al. Sensitive and specific detection of Yersinia pseudotuberculosis by loop-mediated isothermal amplification [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(11):5349-5352.

[11] Seki M, Yamashita Y, Torigoe H, et al. Loop-mediated isothermal amplification method targeting the lytA gene for detection of Streptococcus pneumoniae[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(4):1581-1586.

[12] 匡燕云, 李思光, 罗玉萍. 环介导等温扩增核酸技术及其应用[J]. 微生物学通报, 2007, 20(3):557-560.

(收稿日期:2016-11-03 修回日期:2016-12-24)



(2):211-212.

[13] Park Y, Lee JH, Kim BS, et al. New automated hepatitis C virus(HCV)core antigen assay as an alternative to real-time PCR for HCV RNA quantification [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(6):2253-2256.

[14] Calvaruso V, Craxi A. Immunological alterations in hepatitis C virus infection[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(47):8916-8923.

(收稿日期:2016-10-03 修回日期:2016-11-24)