

• 论 著 •

化学发光微粒子免疫测定技术对低风险人群 HCV 感染确证的应用价值*

邬林枫, 曾劲峰, 孙元璋, 龙洁萍, 王立林[△]

(深圳市血液中心, 广东深圳 518035)

摘要:目的 应用化学发光微粒子免疫测定(CMIA)技术检测一种酶联免疫吸附试验(ELISA1)反应性样本,通过 HCV 核酸和蛋白检测参考标准分析 CMIA 在献血者 HCV 感染确证中的应用价值。方法 102 例 ELISA1 反应性献血者血液样本补充核酸 3 项联检、另一种酶联免疫吸附试验(ELISA2)、丙型肝炎病毒抗体补充试验(Western Blot 法)和 CMIA 试验。结果 102 例抗-HCV 阳性献血者中,32 例(31.37%, 32/102)HCV RNA 反应性样本,50 例(49.02%, 50/102)ELISA2 及 Western Blot 均为反应性。以 HCV 核酸检测结果为参考标准,CMIA 与之低度相关(Spearman 相关系数 $r_s=0.395, P<0.01$),Kappa 检验两者一致性弱(Kappa=0.270, $P<0.01$)。以 ELISA2 及 Western Blot 蛋白检测结果为参考标准,CMIA 与之结果高度相关(Spearman 相关系数 $r_s=0.713, P<0.01$),Kappa 检验两者高度一致性(Kappa=0.674, $P<0.01$)。结论 CMIA 作为 HCV 感染后蛋白标记物的检测方法,对低风险人群 HCV 病毒感染的确证有较大的应用价值。

关键词:化学发光微粒子免疫测定; 重组免疫印迹试验; 免疫吸附试验; 丙型肝炎病毒; 确证感染

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.10.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)10-1301-03

Application value of CMIA in HCV infection validation in low risk population*

WU Linfeng, ZENG Jinfeng, SUN Yuanzhang, LONG Jieping, WANG Lilin[△]

(Shenzhen Municipal Blood Center, Shenzhen, Guangdong 518035, China)

Abstract: Objective To detect the reactive samples of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA1) by chemiluminescence microparticle immunoassay (CMIA), and to analyze the application value of CMIA in HCV infection validation of blood donors.

Methods Nucleic acid 3-item combined testing (NAT), another ELISA2, HCV antibody supplementary test (Western Blot test, WB) and CMIA test supplemented in blood samples of 102 ELISA1 anti-HCV reactive blood donors were retrospectively analysed.

Results Among 102 blood donors of anti-HCV positive, 32 cases (31.37%, 32/102) were HCV RNA reactive samples, 50 cases (49.02%, 50/102) were ELISA2/WB reactive simultaneously. With CMIA NAT results as the reference standard, CMIA was poorly correlated with HCV RNA (Spearman correlation coefficient $r_s=0.395, P<0.01$), and the consistency between them was weak by Kappa test (Kappa=0.270, $P<0.01$). With ELISA2/WB detection results as the reference standard, CMIA was highly correlated with the results (Spearman correlation coefficient $r_s=0.713, P<0.01$), and which showed high consistency by Kappa test (Kappa=0.674, $P<0.01$). **Conclusion** CMIA as a detection method of protein label after HCV infection has great value in the HCV infection confirmation in low-risk population.

Key words: chemiluminescence microparticle immunoassay; recombinant immunoblotting assay; immunosorbent assay; hepatitis C virus; confirmation of infection

丙型肝炎病毒(HCV)感染占总献血者 0.38%^[1],远低于普通人群 3.2% 阳性率^[2],在这类低风险献血人群抗-HCV 血液筛查假阳性率一直居高不下^[3]。目前 HCV 感染确证尚缺乏统一明确的金标准,给抗-HCV 阳性献血者结果解释、假阳性者归队带来技术难题,对献血者的身心和名誉造成伤害。化学发光微粒子免疫测定技术(CMIA)结合化学发光技术与磁性微粒子分离技术,具有高灵敏度、高特异性及检测快速等优点,显著减少漏诊及误诊^[4-6]。本文在抗-HCV 阳性献血人群中,应用 HCV 核酸和蛋白检测参考标准分析 CMIA 对 HCV 感染确证的应用价值,为献血者血液 HCV 感染确证提供更加灵敏可信的实验室方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本中心 2013 年 9 月至 2014 年 6 月无偿

献血者进口酶联免疫吸附试验(ELISA1)抗-HCV 阳性血液标本 102 例,其中男 65 例,女 37 例,年龄 19~51 岁,平均年龄 32 岁。血浆分装冻存于-80 °C 冰箱。

1.2 方法

1.2.1 血清学检测 常规标本检测使用进口意大利 SORIN HBsAg ELISA 检测试剂(批号:D188810, D166710)、美国强生 ORTHO 抗-HCV V 3.0 ELISA 检测试剂(批号:EXE228、EXE233,文中称 ELISA1)、意大利 SORIN 抗-HCV ELISA 检测试剂(批号:U925610,文中称 ELISA2)、美国伯乐 Genscreen ULTRA 抗-HIV ELISA 检测试剂(批号:3B0249, 3K0272)、新加坡 MP Biomedicals Asia Pacific Pte Ltd 公司丙型肝炎病毒抗体补充试剂盒(批号:AD4009、AD5007)、美国雅培贸易上海有限公司 HCV 抗体测定试剂盒(批号:64414LI00)。雅培 Ar-

* 基金项目:广东省深圳市科技创新委员会项目(JCYJ20140403093211510);广东省深圳市科卫生计生系统科研项目(201401074)。

作者简介:邬林枫,男,检验技师,主要从事输血安全研究。△ 通信作者, E-mail:lilywang0724@163.com。

chitech i2000 全自动化学发光免疫分析仪(美国雅培贸易上海有限公司); FAME24/30 酶免疫检测仪器(瑞士 HAMILTON); TECAN RSP/200 酶免疫加样仪器(瑞士 TECAN)。

1.2.2 核酸 3 项联检及 HCV RNA 定性检测 采用西班牙 Grifols(原美国诺华公司)全自动核酸检测平台: Procleix Tigris 核酸检测系统(Procleix Tigris System, 西班牙 Grifols), 血浆 HBV/HCV/HIV 核酸 3 项联检试剂盒 Procleix Ultrio Assay(批号 036074961509132、036247751509149)。核酸鉴别试剂盒 Discriminatory Assay(批号 036074961509132、036247751509149)。

1.2.3 结果判定 抗-HCV 检测 COI 比值大于 1.0 样本经双孔复试, 复试中有 1 孔阳性则判为阳性, 复试均为阴性则判定为阴性。RIBA 试验、CMIA 的操作、判断标准参考说明书。

1.3 统计学处理 应用 SPSS19.0 软件, 采用 Kappa 检验比较 2 种试剂盒检测结果一致性, Spearman 系数进行相关性分析, χ^2 检验分析差异性, Fisher 确切概率法计算概率, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 以 HCV RNA 检测结果为参考标准, 评价 CMIA 检测结果的符合情况 CMIA 试剂检测结果与 HCV RNA 结果符合情况见表 1。CMIA 与 HCV RNA 反应性结果低度相关(Spearman 相关系数 $r_s = 0.395, P < 0.01$), Kappa 检验两者一致性弱(Kappa = 0.270, $P < 0.01$)。

2.2 以 ELISA2 及 Western Blot 蛋白检测结果为参考标准, 评价 CMIA 检测结果的符合情况 CMIA 试剂检测结果与 ELISA2 及 Western Blot 蛋白检测结果符合情况见表 2。

CMIA 与 ELISA1/ELISA2 结果高度相关(Spearman 相关系数 $r_s = 0.713, P < 0.01$), Kappa 检验两者高低一致性(Kappa = 0.674, $P < 0.01$)。

表 1 CMIA 试剂检测结果与 HCV RNA 结果符合情况(n)

CMIA	HCV RNA		合计
	阳性	阴性	
阳性	32	44	76
阴性	0	26	26
合计	32	70	102

表 2 CMIA 试剂检测结果与 ELISA2 及 Western Blot 蛋白检测结果符合情况(n)

CMIA	ELISA2/Western Blot		合计
	阳性	阴性	
阳性	50	11	61
阴性	0	18	18
合计	50	29	79

2.3 与不同参照标准相比, CMIA 灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值、正确指数、误诊率、漏诊率、假阳性率、假阴性率、诊断符合率等参数比较见表 3。

表 3 不同参照标准评价 CMIA 的参数比较

参考标准	灵敏度 (%)	特异度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)	正确指数	误诊率 (%)	漏诊率 (%)	假阳性率 (%)	假阴性率 (%)	诊断符合率 (%)
ELISA2/Western Blot	100.00	62.07	81.97	100.00	62.07	37.93	0.00	37.93	0.00	86.08
HCV RNA	100.00	37.14	42.11	100.00	0.37	62.86	0.00	62.86	0.00	56.86

3 讨论

根据 2015 版《血站技术操作规程》, 我国对包括 HCV 在内的输血相关传染病检测策略在实施核酸检测试剂批签发之前或之后是有所不同的。实施核酸检测试剂批签发之前, HIV、HBV 和 HCV 感染标志物应采用 2 遍血清学检测和 1 遍核酸检测, 血清学检测应采用 2 个不同生产厂家的试剂; 实施核酸检测试剂批签发之后, HIV、HBV 和 HCV 感染标志物应采用核酸和血清学检测 2 种方法各进行 1 次检测。对于酶免检测阳性的标本可不再进行核酸检测, 直接视为该项目检测结果不合格。由此可见, 酶免检测结果对献血者是否会被屏蔽至关重要, HCV 感染后抗体的检测也是 HCV 既往感染的标志。献血者属于 HCV 流行低风险人群, ELISA 抗-HCV 检测结果假阳性率一直居高不下^[3]。如何判定抗-HCV 是否假阳性, 降低抗-HCV 假阳性导致的血液报废和献血者流失, 一直是困扰血站工作者的一大难题。

HCV 感染确证标记物选择是判断抗-HCV 是否假阳性的关键。本文抗-HCV 样本采集期间检测策略为 1 遍酶免加 1 遍核酸, 因此评价 CMIA 对 HCV 感染确证的参照标准做有以下 3 种选择: (1) ELISA1 阳性样本已做 HCV RNA 检测, 以

HCV RNA 检测结果为参照; (2) ELISA1 阳性样本补充 ELISA2 检测, 以 ELISA1/ELISA2 检测结果为参照; (3) 以 2003 年美国疾病预防控制中心(CDC)建议的 RIBA 检测结果为参照^[7]。多角度的比对也是一个互相验证的过程。本文选择 Procleix Tigris 核酸检测系统核酸 3 项联检结果作为 HCV RNA 检测参考标准, 考察 CMIA 对献血者 HCV 现症感染的确证价值, 以 ELISA1/ELISA2/Western Blot 实验结果作为蛋白检测参考标准, 考察 CMIA 对 HCV 既往感染的确证价值。

抗-HCV 阳性样本中有 31.37% HCV RNA 反应性, 是 3 种参照标准中最低的, 它反映了献血者中病毒血症的比例, 是慢性 HCV 感染。CMIA 与 HCV RNA 反应性结果低度相关, Kappa 检验两者一致性弱, 因为前者为血清学检测, 后者为核酸检测, 2 种方法检测的对象性质不同, 这样的结果很容易理解。从 HCV 感染自然史也可以解释, 出现症状后的 12 周内, 最高约 50% 的急性 HCV 感染者可自发清除病毒^[8]。病毒清除后, 抗-HCV 仍可阳性。

虽然 HCV RNA 检测是临床 HCV 感染诊断的金标准, 但在 2015 年更新版的《丙型肝炎防治指南》中对于献血者的屏蔽规则却更多, 如下: (1) 2 种抗-HCV ELISA 均反应性, 献血者

永久屏蔽；(2)2 种抗-HCV ELISA 均无反应性、核酸 3 项联检反应性而鉴别试验阳性，献血者永久屏蔽；(3)1 种抗-HCV ELISA 反应性另 1 种无反应性、核酸 3 项联检反应性而鉴别试验阳性，献血者永久屏蔽；(4)如使用 ORTHO 抗-HCV V 3.0 试剂，其 S/CO 平均值 ≥ 3.8 时，献血者永久屏蔽。所以，血清学检测结果假阳性导致献血者屏蔽更需要有确切的确证方法。CMIA 的原理检测原理与 ELISA 中的双抗体夹心法和竞争法相类似^[9]。与普通 ELISA 所不同的是包被载体为具有更大表面积的磁性颗粒。磁性微粒的核心是三氧化二铁，能够在磁场的作用中很快下沉，便于洗涤和分离，缩短反应周期，提高了分离效果，达到最大发光信号峰值的时间更短，灵敏度更高。这一方法已在医院取代了传统的 ELISA 法。文中以 ELISA1、ELISA2、Western Blot 3 种血清学检测方法共同的检测结果判断低风险人群 HCV 真实感染状况，结果显示 CMIA 法与之相关性、一致性都很高，提示 CMIA 检测结果也可以作为献血者屏蔽的参考标准。

尽管 CMIA 可以在一定程度上担当 HCV 感染的确证标记物，但 HCV 最终的感染状态还是应当结合追踪资料。本课题组对部分抗-HCV ELISA1 阳性献血者进行追踪随访，并补充所有检测项目，由于人数较少，尚缺乏统计学意义，在今后的工作中，继续完善追踪资料，动态观察不同参照标准和 CMIA 检测结果，更有利于选择可靠稳定的 HCV 感染确证方法。

参考文献

[1] 秦伟斐,李小红,田耘博,等. TMA 技术检测 HCV-RNA 和 ELISA 法检测抗-HCV 的比较[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(11):1426-1428.
 [2] Cui Y, Jia J. Update on epidemiology of hepatitis B and C in China[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2013, Suppl 1:7-10.
 [3] Agyeman AA, Ofori-Asenso R, Mprah A. Epidemiology

of hepatitis C virus in Ghana: a systematic review and meta-analysis[J]. BMC Infect Dis, 2016, 16(1):391.

[4] Kiely P, Wilson D. Results of HCV screening of volunteer blood donors with a chemiluminescent immunoassay and a second- or third-generation EIA: overlap of false-reactive reactivity and its impact on donor management[J]. Transfusion, 2000, 40(5):580-584.
 [5] Chiamchanya N. The prevalence of transfusion-transmissible infection in blood donors in Thammasat University Hospital between 2007 - 2012[J]. J Med Assoc Thai, 2014, 97(10):1055-1063.
 [6] Wang L, Chen W, Yu Y. The performance of the abbott i2000 for measuring serum markers of infectious diseases [J/OL]. J Clin Lab Anal. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcla.22015/abstract>, 2017-01.
 [7] Alter MJ, Kuhnert WL, Finelli L. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. Centers for disease control and prevention[J]. MMWR Recomm Rep, 2003, 52(RR-3):1-13.
 [8] Corey KE, Mendez-Navarro J, Gorospe EC, et al. Early treatment improves outcomes in acute hepatitis C virus infection; a meta-analysis[J]. J Viral Hepat, 2010, 17(3):201-207.
 [9] Brate EM, Finley DM, Grote J, et al. Development of an Abbott ARCHITECT cyclosporine immunoassay without metabolite cross-reactivity[J]. Clin Biochem, 2010, 43(13/14):1152-1157.

(收稿日期:2017-01-18 修回日期:2017-03-11)

(上接第 1300 页)

为终身携带，双试剂反应性者的真阳性比例较高^[5-7]，故再次归队献血不合格的概率大。对于 ELISA 单试剂(+) / NAT(-) 者再次不合格，可能与献血者体内持续存在如补体、免疫球蛋白、风湿因子等免疫干扰因素有关。所以严格控制双试剂反应性和保留后再次献血不合格的献血者归队，向他们做好解释工作，但在献血者强烈要求献血的情况下，为了避免献血纠纷，也允许其归队。

378 份归队标本经当地血站常规检测合格后，省血液中心用确认方法再次进行检测时，仍有 19 份被淘汰，由于各地血站使用的常规试剂不完全相同，人员、仪器等也存在差异，故统一进行确认可最大限度地减少漏检率的发生，保证归队献血者的血液安全性。359 例成功归队献血者中 332 例献血，且血液检测均合格，表明归队者献血意愿较高，现行归队策略合理可行。

江苏省血液信息管理系统已实现了全省联网，在江苏任何一地被屏蔽者则被全省屏蔽，因此，反应性献血者的屏蔽和归队工作在全省统一开展势在必行，但随着此项工作的不断推进，仍需不断完善和持续改进。

参考文献

[1] 周国平,谢云峥,王迅,等. 做好假反应性献血者归队是血

站的责任[J]. 中国输血杂志, 2014, 27(10):1079-1082.

[2] 李玲,刘忠. 初筛反应性献血者确证方案与归队策略分析[J]. 中国输血杂志, 2016, 29(1):1-2.
 [3] 庞栋,申卫东,张翔,等. ELISA 筛查单试剂反应献血者追踪检测[J]. 中国输血杂志, 2014, 27(4):381-383.
 [4] 曾劲峰,陈云龙,郑欣,等. HBsAg、抗-HCV 反应性无偿献血者归队检测模式探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(23):3207-3209.
 [5] 程卫芳,李玲,崔伟娅,等. 合肥地区 HBsAg、梅毒抗体阳性献血者追踪情况分析[J]. 中国输血杂志, 2016, 29(1):9-11.
 [6] 李雪梅,张在臻,张兰兰,等. 抗-TP ELISA 两步法检测反应性与确证结果对比研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(15):3083-3088.
 [7] 秦伟斐,田耘博,李小红,等. 献血者乙型肝炎病毒筛查结果分析[J]. 中国输血杂志, 2015, 28(6):679-683.

(收稿日期:2016-12-25 修回日期:2017-02-18)