

丙型肝炎病毒抗体联合核酸定量检测对丙型肝炎患者的早期诊断价值研究^{*}

杨 平, 毕永春, 胡 伟, 张 葵[△] (南京大学医学院附属鼓楼医院检验科, 南京 210008)

【摘要】 目的 探讨在丙型肝炎患者早期诊断中丙型肝炎病毒抗体联合丙型肝炎病毒核酸(HCV RNA)检测的临床价值。**方法** 对 116 例鼓楼医院住院及门诊丙型肝炎患者采用实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)测定 HCV RNA, 酶联免疫吸附试验(ELISA)和金标法测 HCV 抗体、速率法测丙氨酸氨基转移酶(ALT)。**结果** 116 例丙型肝炎患者中, ELISA HCV 抗体阳性 97 例(占 83.6%), HCV RNA 阳性 85 例(占 73.3%), HCV 金标阳性 77 例(占 66.4%), ALT 阳性 69 例(占 59.5%), HCV 抗体和 HCV RNA 联合检测总阳性率(指任一指标阳性即为阳性)为 100.0%。**结论** HCV 抗体和 HCV RNA 联合检测扩大了丙型肝炎检测范围, 降低了丙型肝炎的漏诊率, 有利于丙型肝炎的早期诊断。

【关键词】 丙型肝炎诊断; 丙型肝炎病毒抗体; 丙型肝炎病毒核酸

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.08.006 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)08-1020-03

Clinical value of HCV Ab and HCV RNA titers for the early diagnosis of hepatitis C^{*} YANG Ping, BI Yong-chun, HU Wei, ZHANG Kui[△] (Department of Clinical Laboratory, Affiliated Drum Tower Hospital of Medical School of Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210008, China)

【Abstract】 Objective To explore the value of hepatitis C virus antibody (HCV Ab) and hepatitis C virus nucleic acid (HCV RNA) for the diagnosis of hepatitis C. **Methods** Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR) was used to detect HCV RNA, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and colloidal gold labeled method was used to detect HCV Ab, and the rate method was used to detect alanine aminotransferase (ALT) in 116 patients with hepatitis C. **Results** The positive ratios of HCV Ab detected by ELISA, HCV RNA, HCV Ab detected by colloidal gold labeled method and ALT were respectively 83.6%, 73.3%, 66.4% and 59.5%. Positive rated of joint determination of HCV Ab and HCV RNA was 100.0%. **Conclusion** Combined detection of HCV Ab and HCV RNA could be conducive to the diagnosis of hepatitis C.

【Key words】 diagnosis of hepatitis C; HCV antibody; HCV RNA

丙型肝炎病毒以经血液或体液为主要传播途径, 发病隐匿, 症状不典型, 目前尚无有效的疫苗可以预防, 如果不能及早诊断, 容易错过治疗的最佳时机。慢性感染可导致肝脏慢性炎症、坏死, 约 20% 的慢性丙型肝炎患者会发展为肝纤维化和肝硬化; 而在这些肝硬化患者当中, 超过 20% 最终将发展为肝癌, 对人民群众的健康构成严重威胁^[1-5]。因此, 早期及时诊断显得尤为必要。然而作为传染性疾病, 实验室诊断水平对于丙型肝炎的预防、诊断和治疗具有不可替代的作用。高特异性、高灵敏度的早期病原学检测试验, 是丙型肝炎早诊断、早治疗的依据和前提^[6]。本文重点关注丙型肝炎病毒抗体联合丙型肝炎病毒核酸(HCV RNA)以及丙型肝炎金标试纸条检测对诊断丙型肝炎的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2012 年 1~12 月本院住院及门诊丙型肝炎患者血清及血浆样本 116 份, 其中男 74 份, 女 42 份, 年龄 13~86 岁, 平均 45.8 岁。所有病例选择均符合 2004 年中华医学会传染病与寄生虫病学分会制定的病毒性肝炎防治方案中的诊断标准^[7]; 并排除合并感染其他病毒性肝炎, 排除心、脑、肾、肺等器官疾病及高血压、糖尿病等。

1.2 实验方法 HCV RNA 定量检测采用实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR), 仪器为 Agilent 公司的 Stratagene MX3000, 定量试剂由中山大学达安基因股份有限公司提供, 由分子室操作人员严格按操作说明进行检测。检测结果大于 500 IU/mL 为阳性。

HCV 抗体检测采用酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒, 由北京万泰生物药业股份有限公司提供, 操作人员严格按操作说明进行检测。临界值(cut off)=阴性对照孔 A 均值+0.12 (不足 0.02 按 0.02 计算)。阳性对照孔 A>0.50, 阴性对照孔 A<0.08 时, 实验测定结果有效。结果判定: 待检测样品的 A 值大于临界值判定为 HCV 抗体阳性, 待检测样品的 A 值小于临界值判定为 HCV 抗体阴性。初试阳性标本均重新取样双孔复试。

HCV 抗体诊断试剂盒(胶体金法)源于英科新创(厦门)科技有限公司, 由操作人员严格按操作说明书进行检测。阳性结果: 对照线和检测线均出现紫红色条带为阳性; 阴性结果: 只在对照线位置出现一条紫红色条带; 失效: 对照线未出现紫红色条带。

丙氨酸氨基转移酶(ALT)定量检测采用速率法, 仪器为

^{*} 基金项目: 江苏省南京市医学科技发展基金资助项目(YKK09113)。

作者简介: 杨平, 男, 本科学士, 技师, 主要从事临床检验工作。 [△] 通讯作者, E-mail: zhangkui@yahoo.com.cn。

美国贝克曼 AU5400 全自动生化分析仪流水线,试剂购自四川迈克生物科技股份有限公司,由持有大型生化分析仪上岗证人员严格按操作说明进行检测,参考范围:5~40 U/L(37℃)。ALT>40 U/L 为阳性,ALT<40 U/L 为阴性。

1.3 统计学处理 实验数据采用 SPSS18.0 统计软件进行统计学处理,计数资料比较采用四格表的配对 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

116 例丙型肝炎患者中, HCV 抗体阳性 97 例(占 83.6%), HCV RNA 阳性 85 例(占 73.3%), 两者总阳性率(指两者之间任一指标阳性即为阳性)为 100.0%, 两者差异无统计学意义($\chi^2=3.671, P>0.05$)。116 例丙型肝炎患者中, HCV 抗体阳性 97 例(占 83.6%), HCV 金标阳性 77 例(占 66.4%), 两者总阳性率为 83.6%, 两者差异有统计学意义($\chi^2=9.195, P<0.01$)。116 例丙型肝炎患者中, HCV 抗体阳性 97 例(占 83.6%), ALT 阳性 69 例(占 59.5%), 两者总阳性率为 90.5%, 两者差异有统计学意义($\chi^2=16.60, P<0.01$)。见表 1、2。

表 1 HCV 抗体、HCV RNA、ALT 及丙型肝炎金标 试纸条阳性率之间的关系(n)							
HCV 抗体	n	HCV RNA		金标法		ALT	
		-	+	-	+	-	+
+	97	31	66	20	77	36	61
-	19	0	19	19	0	11	8
P		>0.05		<0.01		<0.01	

表 2 116 例丙型肝炎患者 HCV 抗体、HCV RNA、ALT 及丙型肝炎金标试纸条联合检测结果[n(%)]			
方法	阳性	方法	阳性
HCV 抗体	97(83.6)	HCV 抗体+HCV RNA	66(56.9)
HCV RNA	85(73.3)	HCV 抗体+金标法	77(66.4)
ALT	69(59.5)	HCV 抗体/金标法	97(83.6)
金标法	77(66.4)	HCV 抗体/HCV RNA	116(100.0)

注:“+”代表同时阳性,“-”代表其中任一种阳性;前 4 行为单个标志物阳性。

3 讨 论

PCR 应用于检测 HCV RNA,具有高灵敏度和特异性,可以极大地缩短窗口期^[8]。血清中的 HCV RNA 是病毒复制和肝炎进程的确切标志,被称为诊断 HCV 感染的“黄金标准”^[9]。

作者在 19 例抗体阴性的血清中检出其 HCV RNA 均为阳性,考虑原因有:(1)可能是处于感染早期,机体自身产生的抗体较少,ELISA 敏感性不够,以至于无法及时检出 HCV 抗体^[10]。(2)处于血清抗体阴性的病毒血症期,该期内 HCV 在体内复制活跃,并有较强的传染性。这可能与方法学敏感性、病毒感染所处的临床阶段、基因的突变及抗病毒药物的应用有关^[11-12]。(3)由于免疫耐受人群未发生血清转化,标本中病毒复制低下,产生的抗体不足以达到试剂盒方法的检测限。因此,临床上这类患者如果仅仅进行单一的抗体检测,就会造成漏诊,不仅耽误了病毒检验的最佳时间,更为重要的是延误了

患者抗病毒治疗的最佳时机,更为甚者在流行病学上会产生诸如献血污染等公共卫生安全问题。

在 97 例 HCV 抗体阳性患者中有 31 例 HCV RNA 阴性,从以下 5 方面原因去考虑:(1)PCR 操作复杂,受较多影响因素制约,导致 RNA 降解,出现检测的假阴性^[13]。(2)HCV 抗体阳性仅提示感染过 HCV,当体内病毒被清除而不再复制, HCV RNA 为阴性,而抗体仍会持续阳性。(3)部分患者血清中 HCV RNA 量很少,低于 PCR 方法检出阈值。(4)HCV 处于非复制期,潜藏于干细胞内,血中无 HCV,而机体抵抗力降低时, HCV 进入复制期,从肝细胞释放到血液中,这时 HCV RNA 呈间断性阳性^[14]。(5)可能与 HCV 基因变异等因素有关^[15-17]。

在 97 例 HCV 抗体阳性血清中有 20 例金标阴性,其原因可能是处于 HCV 感染的“窗口期”或者感染初期,机体产生的抗体较少,此时 ELISA 检测 S/CO 值(标本的测定值与临界值之间的比值)较低,而胶体金法对于 S/CO 值较低的 HCV 抗体血清标本敏感性不够,易造成假阴性结果^[18]。然而,胶体金法的效用仍然值得肯定,在 97 例 HCV 抗体阳性血清有 77 例金标阳性,同时胶体金法具有 ELISA 所不具有的简便、快捷、标本用量少、不需仪器设备等优点,所以仍然是临床检验中快速筛查 HCV 抗体的重要手段。

有研究表明,丙型肝炎发病过程中肝炎病毒感染使机体免疫系统活化,这些活化的细胞可与因肝炎病毒感染而改变的肝细胞膜成分发生免疫应答,从而造成肝功能的衰退以及肝细胞的坏死^[19]。ALT 是临床最常规的肝功能检查项目,当肝细胞受损时,肝细胞膜通透性增加,ALT 升高,是肝细胞损伤最敏感的指标之一。本研究结果显示,97 例 HCV 抗体阳性血清有 36 例 ALT 未升高,这可能是机体免疫力较强,产生较多的抗体而病毒并没有对肝细胞造成损伤,机体处于一种应答平衡状态所致^[20];或者可能是患者服用了一些保肝类药物,使体内 ALT 下降而抗体仍持续阳性。19 例 HCV 抗体阴性中有 8 例 ALT 升高可能是急性丙型肝炎初期,机体产生的抗体很少,但病毒已经对肝细胞造成损伤。这也与有研究得出的,ALT 水平与 HCV 感染引起的肝组织炎性反应程度和病情的严重程度不一定平行结论相一致^[21]。

本研究中 116 例丙型肝炎患者, HCV 抗体阳性 97 例(占 83.6%), HCV RNA 阳性 85 例(占 73.3%), HCV 金标阳性 77 例(占 66.4%), ALT 阳性 69 例(占 59.5%), HCV 抗体和 HCV RNA 联合检测总阳性率(指任一指标阳性即为阳性)为 100%,表明仅仅依靠单一抗体检测来筛查诊断丙型肝炎患者存在一定的漏诊率,不利于丙型肝炎患者的早期诊断与治疗。

综上所述, HCV 抗体联合 HCV RNA 共同检测扩大了丙型肝炎检测范围,降低了丙型肝炎的漏诊率,有利于丙型肝炎的早期诊断。

参考文献

[1] Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection[J]. N Eng J Med, 2001, 345(1): 41-52.

[2] Maylin S, Laouénan C, Martinot-Peignoux M, et al. Role of hepatic HCV-RNA level on the severity of chronic hepatitis C and response to antiviral therapy[J]. J Clin Virol, 2012, 53(1): 43-47.

[3] Kowala-Piaskowska A, Figlerowicz M, Mozer-Lisewska I,

- et al. Vertical transmission of hepatitis C virus infection. [J]. *Hepatology*, 2004, 39(3): 137-140.
- [4] Zeuzem S, Heathcote EJ, Shiffman ML, et al. Twelve weeks of follow-up is sufficient for the determination of sustained virologic response in patients treated with interferon alpha for chronic hepatitis C [J]. *J Hepatol*, 2003, 39(1): 106-111.
 - [5] Neumann UP, Berg T, Bahra M, et al. Fibrosis progression after liver transplantation in patients with recurrent hepatitis C [J]. *J Hepatol*, 2004, 41(5): 830-836.
 - [6] 赵秀丽, 单祥年, 张建琼, 等. 树状 DNA 杂交技术在 HCV 检测中的应用 [J]. *临床检验杂志*, 2003, 21(1): 27-30.
 - [7] 中华医学会肝病学分会, 中华医学会传染病与寄生虫病学分会. 丙型肝炎防治指南 [J]. *中华流行病学杂志*, 2004, 25(5): 369-375.
 - [8] 杨瑞锋, 魏来. 丙型肝炎病毒感染的检测 [J]. *临床肝胆病杂志* 2011, 27(1): 1-7.
 - [9] 杨东亮. 丙型肝炎的病毒学检测指标及其临床意义 [J]. *中华肝病杂志*, 2004, 12(2): 104.
 - [10] Echevarría JM, Avellón A, Jonas G, et al. Sensitivity of a modified version of the ARCHITECT Anti-HCV test in detecting samples with immunoblot-confirmed, low-level antibody to hepatitis C virus [J]. *J Clin Virol*, 2006, 35(4): 368-372.
 - [11] 郑怀亮. 献血者丙型肝炎病毒“窗口期”感染的筛查技术展望 [J]. *中华肝病杂志*, 2002, 10(2): 159-160.
 - [12] 李桂珍, 梅秀珍, 刘兴祥, 等. 丙肝抗 HCV 与 HCV RNA 定性、荧光定量之间的关系 [J]. *江西医学检验*, 2003, 21(6): 508.
 - [13] 徐明忠, 王赤林. 抗-HCV 阳性反应血清的 HCV 核酸检测分析 [J]. *中国输血杂志*, 2006, 19(5): 393-394.
 - [14] 蔡红军, 袁克宇, 丁玉美, 等. 荧光定量 PCR 检测 HCV-RNA 和 ELISA 检测抗-HCV 的比较 [J]. *临床输血与检验*, 2008, 10(1): 54-55.
 - [15] Gretsch D, Corey L, Wilson J. Assessment of HCV RNA levels by QC-PCR: high titer viremia correlates with advanced stage of disease [J]. *J Infect Dis*, 1994, 169(17): 1219-1225.
 - [16] Kumar U, Thomas HC, Monjardino J. Serum HCV RNA levels in chronic HCV hepatitis measured by quantitative PCR assay; correlation with serum AST [J]. *J Virol Methods*, 1994, 47(1/2): 95-102.
 - [17] 季阳, 庄文, 杨翠, 等. 丙型肝炎病毒感染的献血者 10 年追踪观察 [J]. *中国输血杂志*, 2004, 17(6): 399-403.
 - [18] 吴超良. 胶体金法与酶联免疫法检测丙型肝炎病毒抗体的比较 [J]. *临床医学工程*, 2011, 18(5): 701-702.
 - [19] 王志明, 谭复明, 陈伟华, 等. 输血后丙型肝炎病毒感染的血清病毒定量研究 [J]. *中华传染病杂志*, 2000, 18(1): 37-38.
 - [20] 宿振国, 刘义庆, 卢志明, 等. 多指标联合检测在丙型肝炎诊断中的应用 [J]. *中国实验诊断学*, 2009, 13(10): 1455-1456.
 - [21] Puoti C, Guarisco R, Bellis L, et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C [J]. *Hepatology*, 2009, 50(1): 322-325.

(收稿日期: 2013-10-05 修回日期: 2013-12-11)

(上接第 1019 页)

参考文献

- [1] 第二次残疾人抽样调查办公室. 全国第二次残疾人抽样调查主要数据手册 [M]. 北京: 华夏出版社, 2007: 2-38.
- [2] Van Camp G, Willems PJ, Smith RJ. Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity [J]. *Am J Hum Genet*, 1997, 60(4): 758-764.
- [3] Bitner-Glindzicz M. Hereditary deafness and phenotyping in humans [J]. *Br Med Bull*, 2002, 63(4): 73-94.
- [4] 韩明显, 戴朴. 我国耳聋基因诊断的临床应用进展 [J]. *北京医学*, 2011, 33(5): 419-421.
- [5] 戴朴, 刘新, 于飞, 等. 18 个省市聋校学生非综合征性聋病分子流行病学研究 (I)-GJB2 235delC 和线粒体 DNA 12SrRNA A1555G 突变筛查报告 [J]. *中华耳科学杂志*, 2006, 1(1): 1-5.
- [6] Iatzis V, Petit C. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss [J]. *Hum Mol Genet*, 1998, 7(10): 1589-1597.
- [7] Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness [J]. *Nature*, 1997, 387(6628): 80-83.
- [8] Zelante L, Gasparini P, Estivill X, et al. Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans [J]. *Hum Mol Genet*, 1997, 6(9): 1605-1609.
- [9] 于飞, 韩东一, 戴朴, 等. 1190 例非综合征性耳聋患者 GJB2 基因突变序列分析 [J]. *中华医学杂志*, 2007, 87(40): 2814-2819.
- [10] 郑文波, 罗建红, 郦云, 等. 中国人语前非综合征性耳聋患者 GJB2 基因的突变分析 [J]. *中华儿科杂志*, 2000, 38(10): 610-613.
- [11] Prezant TR, Agopian JV, Bohlman MC, et al. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness [J]. *Nat Genet*, 1993, 4(3): 289-294.
- [12] 王革, 赵佳, 于姝媛, 等. 应用耳聋基因芯片探讨聋哑夫妇的生育风险 [J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2011, 46(6): 475-479.

(收稿日期: 2013-09-28 修回日期: 2013-12-05)