

化学发光法检测 HCV 核心抗原在丙型肝炎初期筛查中的应用研究^{*}

孟繁君¹, 焦婷婷¹, 杨秀莲¹, 王利新¹, 王琦^{2△}

(1. 宁夏医科大学总医院心脑血管病医院, 宁夏银川 750002; 2. 宁夏医科大学, 宁夏银川 750001)

摘要:目的 探讨采用化学发光法(CLIA)检测丙型肝炎病毒核心抗原(HCV-cAg)、抗体(HCV-Ab)及 HCV-RNA 在丙型肝炎初期筛查中的价值。方法 应用 CLIA 分别检测 HCV-cAg 和 HCV-Ab, 以 HCV-RNA 定量检测结果作为参照, 分别对 220 例标本进行检测, 并对结果进行统计分析。结果 75 例疑似人群的筛查标本中 HCV-Ab 阳性 15 例(20%)、HCV-cAg 阳性 6 例(8.0%)、HCV-RNA 阳性 7 例(9.3%)。70 例确诊组标本中 HCV-Ab 阳性 66 例(94.3%)、HCV-cAg 阳性 62 例(88.6%)、HCV-RNA 阳性 60 例(85.7%)。75 例健康人群的筛查标本中 HCV-Ab 阳性 5 例(6.7%)、HCV-cAg 阳性 2 例(2.7%)、HCV-RNA 阳性 0 例。HCV-Ab 和 HCV-cAg 联合检测与 HCV-RNA 检测阳性率比较, 差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 在使用 CLIA 进行丙型肝炎早期筛查时, 建议进行 HCV-cAg 与 HCV-Ab 联合检测。若需要确诊建议结合临床表现和作进一步的 HCV-RNA 定量检测。

关键词:化学发光法; 丙型肝炎病毒; 丙型肝炎病毒核心抗原

中图分类号:R446.1 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2019)05-0588-04

Application of chemiluminescence for detecting HCV core antigen in hepatitis C initial screening^{*}

MENG Fanjun¹, JIAO Tingting¹, YANG Xiulian¹, WANG Lixin¹, WANG Qi^{2△}

(1. Cerebrovascular Diseases Hospital, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750001, China; 2. Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750001, China)

Abstract: Objective To explore the value of adopting chemiluminescent immunoassay (CLIA) to detect hepatitis C virus (HCV) core antigen (HCV-cAg), antibody (HCV-Ab) and HCV-RNA in the initial screening of hepatitis C. Methods HCV-cAg and HCV-Ab were detected by using CLIA, with the results of HCV-RNA quantitative detection as reference, 220 samples were detected. Then the detection results were statistically analyzed. Results In the screening samples of 75 suspected cases, 15 cases (20%) were HCV-Ab positive, 6 cases (8.0%) were HCV-cAg positive, and 7 cases (9.3%) were HCV-RNA positive. Among the 70 confirmed samples, 66 cases (94.3%) were HCV-Ab positive, 62 cases (88.6%) were HCV-cAg positive and 60 cases (85.7%) were HCV-RNA positive. Among the screening samples from 75 healthy people, 5 cases (6.7%) were HCV-Ab positive, 2 cases (2.7%) were HCV-cAg positive and 0 case was HCV-RNA positive. The positive rate had statistical difference between HCV-Ab and HCV-cAg combined detection with HCV-RNA detection ($P<0.05$). Conclusion In the early screening of hepatitis C by using the CLIA method, it is suggested to conduct the combined detection of HCV-cAg and HCV-Ab. If the definite diagnosis is needed, it is recommended to combine with clinical manifestations and further conduct HCV-RNA quantitative detection.

Key words: chemiluminescence; hepatitis C; HCV core antigen.

丙型肝炎病毒(HCV)已呈全球性流行。据世界卫生组织统计,全球 HCV 的感染率约为 3%,估计约 1.7 亿人感染 HCV,每年新发丙型肝炎病例约 3.5 万例^[1]。在我国,病毒性肝炎的发病人数始终位于所有传染病的前列,而丙型肝炎的发病率在病毒性肝炎中呈现逐年上升趋势^[2]。在目前还没有疫苗的情况下,早期发现、早期治疗至关重要。化学发光法(CLIA)检测丙型肝炎病毒核心抗原(HCV-cAg)可将窗口期缩短至 35.8 d,并且抗原量与 RNA 水平呈平行变化

趋势^[3]。CLIA 检测 HCV-cAg 采用全自动预处理步骤裂解病毒颗粒,并接力抗原抗体复合物,消除检测 HCV-cAg 时 HCV 抗体(HCV-Ab)的干扰^[4]。HCV-cAg 检测能对 HCV 感染进行诊断并能监测感染者的病情变化。本文对收集的标本进行 HCV-cAg、HCV-Ab 和 HCV-RNA 检测,以了解 HCV-cAg 在筛查 HCV 感染时的有效性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2016 年 1 月至 2018 年 2 月来

^{*} 基金项目:宁夏医科大学校级课题(XZ2016096)。

作者简介:孟繁君,女,主管技师,主要从事免疫学检验方面的研究。△ 通信作者,E-mail:wqmxm@126.com。

宁夏医科大学总医院就诊、体检的人员以及银川市疾控中心确诊的部分患者,将其分为 3 组。疑似 HCV 感染组(75 例):标本采集按照《丙型肝炎防治指南(2015 年更新版)》^[5]进行。丙型肝炎确诊组(70 例):宁夏医科大学总医院感染科丙型肝炎确诊患者、总医院肾脏内科丙型肝炎确诊患者、银川市疾控中心确诊患者。符合下列任何一项即可诊断为临床感染 HCV 病例:(1)符合血清 HCV-Ab 阳性和流行病学史;(2)符合血清 HCV-Ab 阳性和临床表现;(3)符合血清 HCV-Ab 阳性和血清丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶升高。确诊组纳入标准:(1)年龄 1~78 岁,性别不限;(2)符合丙型肝炎的诊断标准。确诊组排除标准:肝硬化、重叠 HBV 感染、自身免疫性肝炎。第 3 组阴性对照组(75 例)为同期体检的健康人。对 3 组研究对象分别进行 HCV-Ab、HCV-cAg、HCV-RNA 检测。

1.2 方法 抽取研究对象静脉血检测标本,采用分离胶专用试管抽取 3 mL 血液标本,离心取血清,并放置在冰箱中-70℃保存。(1)HCV-cAg 检测:采用 HCV-cAg 微粒子 CLIA 检测试剂盒进行 HCV-cAg 检测,试剂盒由美国雅培公司提供。(2)HCV-Ab 检

测:采用 HCV-Ab 微粒子 CLIA 检测试剂盒进行 HCV-Ab 检测,试剂由美国雅培公司提供。(3)HCV-RNA 检测:采用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR),测定范围在 10³~10⁷ copy/mL,HCV-RNA 阴性判定标准:<10³ copy/mL。HCV-RNA 检测试剂由中山大学达安基因股份有限公司提供。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 进行数据处理分析,计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验,采用 kappa 检验分析结果的一致性,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 组标本 HCV-Ab、HCV-cAg、HCV-RNA 检测结果比较 结果见表 1。疑似 HCV 感染组中 HCV-cAg 和 HCV-RNA 的阳性率结果相似,分别为 8.0%和 9.3%。确诊组中,HCV-cAg 和 HCV-RNA 的阳性率结果相近,分别为 88.6%和 85.7%,其中 HCV-Ab 的阳性率达到 94.3%。阴性对照组中,HCV-Ab 检测阳性率高于 HCV-cAg 的阳性率,分别为 6.7%和 2.7%;HCV-Ab 的阳性检出率高于 HCV-cAg,但灵敏度较低。

表 1 3 组标本 HCV-Ab、HCV-cAg、HCV-RNA 检测结果[n(%)]

组别	n	HCV-cAg		HCV-Ab		HCV-RNA	
		无反应性	有反应性	无反应性	有反应性	阴性	阳性
疑似 HCV 感染组	75	69(92.0)	6(8.0)	60(80.0)	15(20.0)	68(90.7)	7(9.3)
确诊组	70	8(11.4)	62(88.6)	4(5.7)	66(94.3)	10(14.3)	60(85.7)
阴性对照组	75	73(97.3)	2(2.7)	70(93.3)	5(6.7)	75(100.0)	0(0.0)
合计	220	156(70.9)	64(29.1)	130(59.1)	90(40.9)	157(71.4)	63(28.6)

2.2 疑似 HCV 感染组的 HCV-Ab、HCV-cAg 联合检测结果和 HCV-RNA 检测结果比较 以 HCV-RNA 为金标准,具体分析不同组合模式下 HCV-RNA 检测的阳性率和符合率。HCV-Ab(+) + HCV-cAg(-)检测的阳性率为 46.7%,HCV-RNA 检测的阳性率为 20.0%,两者差异有统计学意义($P<0.05$);HCV-Ab(+) + HCV-cAg(-)检测与 HCV-RNA 检测的阳性符合率为 42.9%,阴性符合率为 100.0%。HCV-Ab(+) + HCV-cAg(+)检测的阳性率为 100.0%,HCV-RNA 检测的阳性率为 66.7%,两者差异有统计学意义($P<0.05$);HCV-Ab(+) + HCV-cAg(+)检测与 HCV-RNA 检测的阳性符合率为 66.7%。HCV-Ab(-) + HCV-cAg(-)检测的阴性率为 100.0%,HCV-RNA 检测的阴性率为 100.0%,HCV-Ab(-) + HCV-cAg(-)检测与 HCV-RNA 检测的阴性符合率为 100.0%。HCV-Ab(-) + HCV-cAg(+)检测的阳性率为 66.7%,HCV-RNA 检测的阳性率为 66.7%,HCV-Ab(-) + HCV-cAg(+)检测与 HCV-RNA 检测的阳性符合率为

100.0%,阴性符合率为 100.0%。见表 2。

表 2 疑似 HCV 感染组 HCV-Ab、HCV-cAg 联合检测结果与 HCV-RNA 检测结果的比较(n)

组别	n	结果	HCV-RNA 检测		合计
			阳性	阴性	
HCV-Ab(+) + HCV-cAg(-)	15	阳性	3	4	7
		阴性	0	8	8
		合计	3	12	15
HCV-Ab(+) + HCV-cAg(+)	3	阳性	2	1	3
		阴性	0	0	0
		合计	2	1	3
HCV-Ab(-) + HCV-cAg(-)	51	阳性	0	0	0
		阴性	0	51	51
		合计	0	51	51
HCV-Ab(-) + HCV-cAg(+)	6	阳性	4	0	4
		阴性	0	2	2
		合计	4	2	6

2.3 确诊组的 HCV-Ab、HCV-cAg 联合检测结果和

HCV-RNA 检测结果对比 以 HCV-RNA 为金标准,具体分析不同组合模式下 HCV-RNA 检测的阳性率和符合率。HCV-Ab(+) + HCV-cAg(-)检测的阳性率为 86.4%,HCV-RNA 检测的阳性率为 72.7%,两者差异有统计学意义($P<0.05$);HCV-Ab(+) + HCV-cAg(-)检测与 HCV-RNA 检测的阳性符合率为 84.2%,阴性符合率为 100.0%。HCV-Ab(+) + HCV-cAg(+)检测的阳性率为 89.3%,HCV-RNA 检测的阳性率为 92.8%,HCV-Ab(+) + HCV-cAg(+)检测与 HCV-RNA 检测的阳性符合率为 96.0%,阴性符合率为 33.3%。HCV-Ab(-) + HCV-cAg(-)检测的阴性率为 100.0%,HCV-RNA 检测的阴性率为 100.0%,HCV-Ab(-) + HCV-cAg(-)检测与 HCV-RNA 检测的阴性符合率为 100.0%。HCV-Ab(-) + HCV-cAg(+)检测的阳性率为 87.5%,HCV-RNA 检测的阳性率为 75.0%,HCV-Ab(-) + HCV-cAg(+)检测与 HCV-RNA 检测的阳性符合率为 85.7%,阴性符合率为 100.0%。见表 3。

表 3 确诊组 HCV-Ab、HCV-cAg 联合检测结果与 HCV-RNA 检测结果比较(n)

项目	n	结果	HCV-RNA 检测		合计
			阳性	阴性	
HCV-Ab(+) + HCV-cAg(-)	22	阳性	16	3	19
		阴性	0	3	3
		合计	16	6	22
HCV-Ab(+) + HCV-cAg(+)	28	阳性	24	1	25
		阴性	2	1	3
		合计	26	2	28
HCV-Ab(-) + HCV-cAg(-)	4	阳性	0	0	0
		阴性	0	4	4
		合计	0	4	4
HCV-Ab(-) + HCV-cAg(+)	16	阳性	12	2	14
		阴性	0	2	2
		合计	12	4	16

3 讨 论

血清 HCV-RNA 检测目前已成为诊断 HCV 感染的金标准^[2],其定量分析法的特异度为 98%~99%,高灵敏度的病毒核酸扩增技术甚至可以在 HCV 感染后 6 d 内检测到 HCV-RNA。病毒核酸扩增技术准确、敏感^[6],但试剂成本较高、操作繁琐、实验室各项条件要求极高,影响了此方法在 HCV 感染常规筛查中的应用。

检测 HCV 感染最初推荐用 HCV-Ab^[7]。在临床上,针对大部分患有肝脏疾病的患者来说,检测的灵敏度和特异度均较高,HCV-Ab 假阳性情况较为少见。然而,在 HCV 感染率低的人群中(如无偿献血

员、现役或退役军人、普通人群、卫生保健从业人员、性病门诊就诊者),假阳性率较高,阳性预期值较低^[8]。HCV-Ab 产生假阳性的主要原因有 IgG 血症、类风湿因子的干扰、超氧化物歧化酶的干扰、用于试剂制备的 HCV-cAg 不纯等^[9]。由于以上原因,不能仅仅依靠筛查试验阳性反应结果来诊断一个人是否感染 HCV。因此,研究者需要应用具有更高特异度的补充试验进行确证分析筛查。HCV-cAg 作为一种新的 HCV 感染诊断指标,可用于献血人员的筛查,且因其检测时间段为感染后 14~70 d,窗口期比 HCV-Ab 短,可明显增强输血安全,亦能监测抗病毒治疗疗效。因此,HCV-cAg 的检测对 HCV 的早期感染诊断以及免疫功能紊乱和一些不产生 HCV-Ab 的患者的筛查很有价值^[10]。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 HCV 感染的筛查中 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^[11]。有资料显示,伴随病毒血症的发生,在大多数 HCV 感染的患者血清中可检测到 HCV-cAg,其滴度水平和 RNA 水平十分相关,HCV-cAg 在血清中的数量也可作为病程进展的指示指标,或成为抗体阳性慢性感染患者抗病毒治疗的监控指标^[2,12]。目前现行的筛检方法常用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 HCV-cAg。它具有简便、快速,灵敏度及特异度较高的特点,但对灰区结果判读的可靠性通常较差^[2]。CLIA 的优势主要体现在具有发光反应的高灵敏度,具有免疫反应的特异度^[13];与 ELISA 比较,该方法的最大好处为全自动化操作,比较节省时间且具有较强的重复性,定量测定最小可测值达 pg 水平^[14]。荧光定量 PCR 检测 HCV-RNA,可反映患者体内病毒复制情况,是 HCV 感染的确证试验。检测的窗口期短,约为 14 d^[15],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^[16]。本试验采用微粒子 CLIA 定量检测人血清或血浆中 HCV-cAg 水平,能够诊断 HCV 感染及监测患者病情,并且该操作实现全面自动化,整个操作在雅培 Architect i2000 进行,从而大大减少了对实验者的操作要求,也提高了检测的精密密度。HCV-cAg 在血液中比 HCV-Ab 出现早,HCV 感染后,检测 HCV-Ab 窗口期长达 70 d,因此在感染的早期,HCV-Ab 阴性不能排除未感染 HCV;急、慢性活动性 HCV 感染的标志是 HCV-cAg 的存在,类似于 HBsAg 在活动性 HBV 感染诊断中的意义。

本研究表明,3 组人群中,CLIA 检测 HCV-Ab 的阳性率高于 HCV-cAg 和 HCV-RNA 检测的阳性率。HCV-cAg 阳性率与 HCV-RNA 阳性率高度一致。通过对疑似 HCV 感染组和确诊组进一步分析,以 HCV-RNA 检测为金标准,可看出 HCV-Ab 和 HCV-

cAg 联合检测阳性率总体高于单独检测 HCV-RNA, CLIA 检测 HCV-cAg 与 HCV-RNA 检测灵敏度相近。CLIA 检测 HCV-cAg 能缩短 HCV 感染检测的窗口期,并且抗原量与 RNA 水平呈平行变化趋势。CLIA 联合检测 HCV-Ab 和 HCV-cAg,能够提高丙型肝炎检出率和诊断可靠性。

参考文献

[1] WU C C, HSU C S. Rescue for interferon failures in HCV genotype 1/HBV dually infection[J]. J Formos Med Assoc, 2018, 117(9): 859-860.

[2] XIANG Y, LAI X F, CHEN P, et al. The correlation of HCV RNA and HCV core antigen in different genotypes of HCV[J/OL]. J Clin Lab Anal, 2018: e22632[2018-07-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30069909>.

[3] MORIMOTO R, ONO Y, TEZUKA Y, et al. Rapid screening of primary aldosteronism by a novel chemiluminescent immunoassay[J]. Hypertension, 2017, 70(2): 334-341.

[4] 曾艳华, 孟存仁, 张朝霞. 化学发光法检测 HCV 抗体诊断丙型肝炎价值的 Meta 分析[J]. 中国循证医学杂志, 2014, 14(6): 707-715.

[5] 陈红松, 都晓光, 段钟平, 等. 丙型肝炎防治指南(2015 年更新版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 19(4): 1961-1979.

[6] PAPADOPOULOS N, GRIVEAS I, SVERONI E, et al. HCV viraemia in anti-HCV-negative haemodialysis patients: do we need HCV RNA detection test[J]. Int J Artif Organs, 2018, 41(3): 168-170.

[7] 侯健. 丙型肝炎病毒抗体与核心抗原联合检测的诊断效能研究[J]. 标记免疫分析与临床, 2015, 22(9): 853-855.

[8] 黄鹏. 抗原加工递呈相关基因多态性与 HCV 感染转归的关系研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2016.

[9] 莫平征. 人类免疫缺陷病毒与分枝杆菌合并感染的临床研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2014.

[10] 周珍娟. HCV 抗原、HCV 抗体及 HCV-RNA 联合检测与 ALT 的相关性分析[J]. 泰山医学院学报, 2016, 37(4): 380-382.

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

[12] CETINER S, CETIN DURAN A, KIBAR F, et al. Performance comparison of new generation HCV core antigen test versus HCV RNA test in management of hepatitis C virus infection[J]. Transfus Apher Sci, 2017, 56(3): 362-366.

[13] SALMA N, JULIE L, BOUTAHAR B, et al. Thrombotic risk assessment and analytical performance of the chemiluminescent analyzer IDS-iSYS for the detection of anti-cardiolipin and anti-beta 2 glycoprotein I autoantibodies[J]. Clin Immunol, 2018, 194: 92-99.

[14] GLORIA A, CONTRI A, CARLUCCIO A, et al. Blood periovulatory progesterone quantification using different techniques in the dog[J]. Anim Reprod Sci, 2018, 192: 179-184.

[15] 陆绍花, 李娅. 酶联免疫法测抗-HCV-IgG 的 S/CO 比值与 HCV-RNA 及肝功能的相关性研究[J]. 中国民族民间医药, 2016, 25(9): 82-83.

[16] 葛咏梅, 冯晓朦, 周劲松, 等. 荧光定量 PCR 检测 HBV-DNA、HCV-RNA 室内质控物的制备及评估[J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(12): 2024-2026.

(收稿日期: 2018-07-29 修回日期: 2018-10-31)

(上接第 587 页)

patterns of Klebsiella pneumoniae strains isolated from different clinical specimens [J]. Pathol Biol (Paris), 2013, 61(5): 209-216.

[6] DU X X, WANG J F, FU Y, et al. Genetic characteristics of bla(NDM-1)-positive plasmid in Citrobacter freundii isolate separated from a clinical infectious patient [J]. J Med Microbiol, 2013, 62(9): 1332-1337.

[7] POIREL L, WALSH T R, CUVILLIER V, et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 70(1): 119-123.

[8] 侯渊博, 张亚培, 吴庆, 等. 肺炎克雷伯菌生物膜形成能力及其与多黏菌素 B 耐药相关性研究[J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(6): 473-477.

[9] CHICUREL M. Bacterial biofilms and infections. Slime-busters[J]. Nature, 2000, 408(6810): 284-286.

[10] 杨朵, 张正. 两种检测肺炎克雷伯菌生物膜方法的比较

[J]. 中国实验诊断学, 2008, 12(10): 1297-1298

[11] KABHA K, NISSIMOV L, ATHAMNA A, et al. Relationships among capsular structure, phagocytosis and mouse virulence in Klebsiella pneumonia [J]. Infect Immun, 1995, 63(3): 847-852.

[12] NAPARSTEK L, CARMELI Y, NAVON-VENEZIA S, et al. Biofilm formation and susceptibility to gentamicin and colistin of extremely drug-resistant KPC-producing Klebsiella pneumoniae [J]. J Antimicrob Chemother, 2014, 69(4): 1027-1034.

[13] ZHANG L, MAH T F. Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics [J]. J Bacteriol, 2008, 190(13): 4447-4452.

[14] 徐丽, 李蓓. 肺炎克雷伯菌生物膜形成机制的研究进展 [J]. 中国病原生物学杂志, 2016, 11(11): 1056-1059.

(收稿日期: 2018-08-19 修回日期: 2018-12-23)