

• 论 著 •

# 抗原抗体联合检测在提高血液透析患者丙肝感染检出率中的应用\*

徐炜新<sup>1</sup>, 李 峰<sup>2</sup>, 孙 杰<sup>1</sup>

(上海市嘉定区中心医院:1. 检验科, 2. 肾内科, 上海 201800)

**摘要:**目的 探讨开展抗原抗体联合检测在提升血液透析治疗患者丙肝感染检出率中的应用价值。方法 收集 100 例血液透析患者的临床资料, 分别采用以下方法测定相关参数: ELISA 法检测 HCV 核心抗原、化学发光法检测抗 HCV 抗体、RT-PCR 法检测 HCV-RNA; 统计各检测项目在同一标本中的阳性表达情况, 比较单测抗原、抗体与联合检测 3 个检测方案对于 RNA 阳性标本的检出率; 同时对抗原阳性标本的抗原水平与其 RNA 拷贝数进行相关性分析并比较抗体阳性标本中其 RNA 阳性与阴性组间抗体水平的区别。结果 单测抗原或抗体均会造成血透患者丙肝感染的漏检, 对于 RNA 阳性标本的检测中抗原抗体联合检测的检出率最高( $P < 0.05$ ), 抗原阳性标本的抗原水平与其对应标本的 RNA 拷贝数呈正相关关系( $r = 0.85, P < 0.05$ ), 而抗体阳性标本中其 RNA 阳性与阴性组的组间抗体水平的差异不具有统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 HCV 抗原抗体联合检测能有效提高血液透析治疗患者丙肝感染的检出率, 同时 HCV 核心抗原检测也可作为抗体阳性患者 HCV 再次感染的监测指标之一。

**关键词:** 丙型肝炎病毒; 抗原; 抗体; 联合检测; 血液透析

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.07.024

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)07-0920-03

## Application of antigen-antibody joint detection in increasing detection rate of HCV infection in patients with hemodialysis\*

Xu Weixin<sup>1</sup>, Li Feng<sup>2</sup>, Sun Jie<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Nephrology,

Jiading District Central Hospital, Shanghai 201800, China)

**Abstract: Objective** To investigate the application value of antigen-antibody joint detection in increasing the detection rate of hepatitis C infection in the patients with hemodialysis. **Methods** The clinical data of 100 cases of hemodialysis were collected. Hepatitis C virus(HCV) core antigen, HCV antibody and HCV-RNA were detected by adopting ELISA, Chemiluminescence and RT-PCR respectively. The positive expression situation of each detection item in the same specimen was performed statistics. The detection rates of RNA positive specimen were compared among the single antigen detection, single antibody detection and joint detection schemes; at the same time the antigen level of antigen positive specimens and its RNA copy number were performed the correlation analysis. The antibody levels in the positive antibody specimens were compared between the RNA positive group and the RNA negative group. **Results** The single antigen or single antibody detection could cause the missed detection of HCV infection in hemodialysis patients. For the specimens of positive RNA, the joint detection had the highest detection rate( $P < 0.05$ ), the antigen level in the antigen positive specimens was positively correlated with the RNA copy number in the corresponding specimens( $r = 0.85, P < 0.05$ ), while the antibody level in the antibody positive specimens had no statistical difference between the RNA positive group and the RNA negative group( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The joint detection of HCV antigen antibody can effectively increase the detection rate of hepatitis C infection in hemodialysis patients. At the same time the HCV core antigen detection also can be used as one of monitoring indicators for the HCV re-infection in the patients with antibody positive.

**Key words:** hepatitis C; antigen; antibody; joint detection; hemodialysis

根据有关研究显示,在丙型肝炎病毒(HCV)感染者中会有 20%~30% 的患者将发展为肝硬化或肝细胞肝癌<sup>[1]</sup>,是欧美及日本等国家终末期肝病的最主要原因之一<sup>[2]</sup>。我国丙型肝炎病毒性肝炎的报告病例数也呈现出逐年上升的趋势<sup>[3]</sup>,尤其是在 2009 年发生了安徽霍山“丙肝事件”出现了大量血液透析患者暴发性感染丙肝。由于目前尚无针对 HCV 的有效疫苗可供临床使用,因此对于丙肝感染的及早检出并通过一系列有效措施阻断其在易感人群间的传播就显得尤为重要,这对于血透患者而言更是如此。

国内血液透析中心按常规主要通过检测 HCV 抗体进行 HCV 感染的筛查与监测。但由于肾衰患者常伴有免疫功能低下, HCV 感染后抗体血清转化延迟,其检测“窗口期”势必将出

现延长,极有可能出现 HCV 感染的漏检。所以在一些条件较好的医院开展了 HCV-RNA 的检测以防止漏检,但由于核酸的检测需要的条件严苛,难以在普通实验室常规开展。因而寻找一个简单易行的检测方案以提升血透患者的丙肝感染检出率成为了必须面对的一个问题。近年来,陆续出现了一些关于 HCV 核心抗原检测进入临床应用的报道<sup>[4,5]</sup>,并被认为有望缩短检测“窗口期”,提高感染检出率。本研究就是旨在评价 HCV 核心抗原检测在提升血液透析患者丙肝感染检出率中的应用价值,并探讨开展抗原抗体联合检测的可行性。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集本院血液透析室 2013 年 1 月至 2014 年 4 月 HCV 抗体检测阳性标本 58 例,其中男 30 例,年龄 32~78

\* 基金项目:嘉定区中心医院院级课题基金资助(2012-12-03)。 作者简介:徐炜新,男,主管技师,主要从事临床免疫与微生物检验研究。

岁,平均 52.5 岁,女 28 例,年龄 34~82 岁,平均 54.6 岁。同时收集抗体阴性而 ALT 异常血透患者标本 42 例,并排除其他类型肝炎感染者以及由肿瘤、药物、酒精、高脂血症等明确原因的肝功能损伤者,其中男 22 例,平均年龄 50.3 岁,女 20 例,平均年龄 56.3 岁。

**1.2 仪器与试剂** HCV 抗体(Ab)的检测使用罗氏公司生产的 E601 全自动化学发光检测仪及其配套试剂,HCV 核心抗原的检测使用莱博生物科技有限公司生产的丙肝核心抗原(Ag)检测试剂盒和美国伯腾仪器公司生产的 EXL800 酶标仪,HCV-RNA 的检测使用罗氏公司生产的 LightCycler480 荧光定量 PCR 仪及其配套试剂,ALT 的检测使用罗氏公司生产的 MODULAR P 全自动生化检测仪及其配套试剂。

**1.3 方法** 所有对象均在清晨空腹无菌采集静脉血,采集 5 mL 放入促凝管,1 h 后以 16.5 cm 的离心半径,3 000 r/min,离心 10 min,采集血清,分别检测丙肝抗体、核心抗原、RNA 和 ALT。抗体采用化学发光法,核心抗原采用 ELISA 法,两者均使用 S/CO 值作为其定量检测结果,大于 1.0 即为阳性,结果处于 1.0 与 3.0 之间则须复检,如两次结果均大于 1.0 即为阳性,如有一次结果小于 1.0 即判为阴性;RNA 使用 RT-PCR 法,其拷贝数大于  $10^3$  即为阳性;ALT 使用速率法,其结果大于 40 U/L 即为异常<sup>[6]</sup>。各项指标的检测均严格按照操作规程进行,并使用上海市临床检验中心提供的质控品每天进行 2 次室内质控的检测(除核心抗原以外),结果均符合室内质控要求。核心抗原的检测也严格按照试剂盒的操作说明书进行。

**1.4 统计学处理** 运用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。计量资料两组间比较用 *t* 检验,率的比较用  $\chi^2$  检验;RNA 检测结果经对数转换后与核心抗原 S/CO 值进行相关分析,再进行相关系数(*r*)的假设检验;以 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Ab 阴性组与阳性组 Ag 和 RNA 检测结果的比较** 结果显示在同一标本中 Ab、Ag 以及 RNA 的阳性表达均出现了不一致的情况,由此可以认为单测 Ab 或 Ag 均会出现 HCV 感染的漏检,见表 1。

表 1 Ab 阴性组与阳性组 Ag 和 RNA 检测结果的比较

项目	n	Ag		RNA	
		阳性标本数	阴性标本数	阳性标本数	阴性标本数
Ab 阳性	58	16	42	29	29
Ab 阴性	42	3	39	4	38
总计	100	19	81	33	67

**2.2 RNA 阳性标本各检测方案检出率的比较** 根据 RNA 检测结果共计产生 33 例 RNA 阳性标本,对 Ab、Ag、Ab+Ag (非双阴性即判为阳性结果) 3 种检测方案的检出率进行了比较,结果显示联合检测的方案检出率显著高于单项检测的方案,见表 2。

表 2 3 种检测方案阳性检出率的比较

项目	Ab	Ag	Ab+Ag
阳性标本数	28	19	32
阳性检出率	84.8%*	57.6%*	97.0%*

\*: *P* < 0.05, 组间率比较。

**2.3 Ag 阳性标本 S/CO 值与其 RNA 拷贝数(经对数转换)间的相关性分析** 结果显示,二者之间呈显著正相关关系(*r* = 0.85, *P* < 0.05),见图 1。

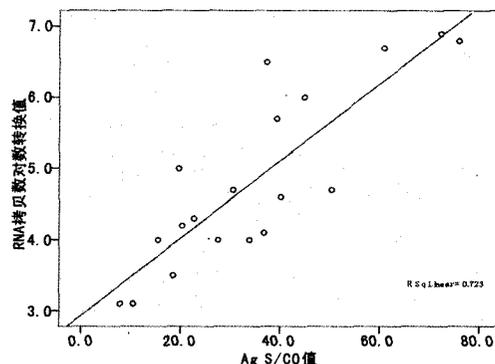


图 1 Ag 阳性标本 S/CO 值与其 RNA 拷贝数(经对数转换)间的相关性分析

**2.4 Ab 阳性标本中 RNA 阳性与阴性组间 Ab S/CO 值的比较** 结果显示其均值分别为  $41.16 \pm 16.61$  和  $38.17 \pm 13.74$ , 两组之间比较差异无统计学意义(*P* > 0.05),见图 2。

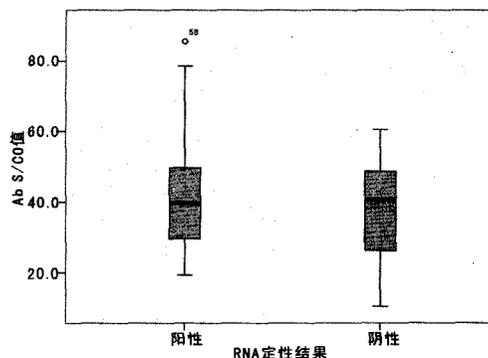


图 2 RNA 阳性与阴性组间 Ab S/CO 值的比较

## 3 讨论

急性丙型肝炎数据库资料显示:15%的急性 HCV 感染是由医疗操作所导致,另外的 13%则因针刺而引起<sup>[7]</sup>。可见对于血液透析患者而言,一方面因自身免疫力低下而成为易感人群,另一方面由于其长期反复开放静脉通道以及共用血透设备更是增加了感染的机会,有资料显示中国该人群 anti-HCV 阳性率为 13.6%~67.6%<sup>[8-9]</sup>。对于该类患者而言,HCV 感染的早期发现并采取及时有效地干预措施阻断患者之间的传播以降低 HCV 的院内感染率具有极为重要的意义。

目前,对于血透患者丙肝感染的筛查主要是 HCV-Ab 的检测方案,然而抗体检测存在较长时间的窗口期,平均约 70 天,所以 HCV 抗体阴性并不能排除 HCV 感染<sup>[11]</sup>。而具体到血透患者而言其窗口期可能进一步延长<sup>[12]</sup>,因此单测 Ab 的检测方案使得 HCV 感染的漏检率会因此而增加。此外,抗体检测的另外一个不足就是无法区分其是现症感染还是既往感染,也就无法评估抗体阳性表达患者是否具有传染能力。HCV-RNA 检测是确定 HCV 感染的可靠依据,可以准确地评估患者的感染情况及传染能力,但也存在操作复杂、试剂昂贵,基层医院难以开展的问题。而根据近年来的有关报道,HCV 核心抗原的检测可将窗口期缩短<sup>[12]</sup>,而且其检测方法简单,易于操作,设备投入不高,当然其在 HCV 感染的血清学转换过程中表达的时间较短,不适于单独开展。但如果将抗原与抗体的检测联合开展,一方面可以避免血透患者抗体检测窗口期延长的

问题,另一方面也可弥补游离核心抗原表达时间短的固有缺陷,这对于血透患者而言显然具有独特的应用价值。

根据本研究的结果显示,在抗体阴性组中发现了 3 例抗原阳性标本和 4 例 RNA 阳性标本,可以推断这种情况的出现还是因为血透患者抗体检测窗口期延长所造成的;而在对于 RNA 阳性标本的 Ab、Ag、Ab+Ag 3 种检测方案的检出率比较中显示联合检测的方案检出率最高,说明联合检测可提高 HCV 感染的检出率,其中有 1 例的漏检,可能其对于 RNA 低拷贝数的标本还有检出能力缺陷。在对 Ag 阳性标本 S/CO 值与 RNA 拷贝数的相关性分析中,发现二者存在显著的正相关关系,说明 HCV-Ag 的检测在一定程度上具备了用于早期现症感染诊断的临床价值,可作为 Ab 已表达阳性血透患者 HCV 再次感染的监测指标,当然检测的频率应相应增加。在将 58 例 Ab 阳性标本分为 RNA 阳性与阴性组后,进行 S/CO 值的组间均数比较时未发现显著差异,其量值变化无规律可循,也证实了 Ab 水平的高低无法区分 HCV 现症感染还是既往感染。

综上所述,对于免疫力低下或被抑制的血透患者而言,在使用 HCV 抗原抗体联合检测时可有效弥补在单测抗体时因其抗体检测窗口期延长造成漏检的不足,有助于提高 HCV 感染的检出率并缩短窗口期,降低患者之间的交互感染的潜在风险,同时对于已检出抗体阳性的患者可作为监测其再次感染 HCV 的指标之一。我们认为,这些发现对于没有条件开展核酸检测的基层医院来说具有显著的临床应用价值。

参考文献

[1] Masao O, Tatsuo K, Ming-Lung Y, et al. APASL Consensus Statements and Management Algorithms for Hepatitis C Virus Infection[J]. *Hepatology*, 2012, 6(4): 409-435.

[2] 中华医学会肝病学会, 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]. *中华内科杂志*, 2004, 43(5): 551-555.

[3] 中华人民共和国卫生部. 卫生部发布 2012 年 1 月及 2011 年度全国法定传染病疫情概况[EB/OL]. 2012. <http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/mohjbyfkzj/s3578/201202/54106.htm>

[4] Cano H, Candela MJ, Lozano ML, et al. Application of a new enzyme-linked immunosorbent assay for detection of total hepatitis C Virus core antigen in blood donors[J]. *Transfus Med*, 2003, 13(2): 259-266.

[5] Raker CA, Tabor E, Okayama A, et al. HCV core antigen as an alternative to NAT to detect HCV viremia[J]. *Transfusion*, 2004, 44(2): 307-308.

[6] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 406-408.

[7] Deterding K, Wiegand J, Gruner N, et al. The German Hep-Net acute hepatitis C cohort: impact of viral and host factors on the initial presentation of acute hepatitis C virus infection[J]. *Z Gastroenterol*, 2009, 47(5): 531-540.

[8] 李行勇. 血液透析患者 HCV 感染率与输血的关系[J]. *实用医技杂志*, 2005, 12(1): 69-71.

[9] 杨朝国, 陈川. 丙型病毒性肝炎感染的实验室检测及临床应用[J]. *国外医学临床生物化学与检验医学分册*, 2004, 25(4): 379-381.

[10] 朱阳泉, 徐长根, 李浩. 丙型肝炎病毒及其检测的实验研究进展[J]. *中国输血杂志*, 2007, 20(5): 427-429.

[11] Moreiral RC, Lemos ME, Longui CA, et al. Hepatitis C and Hemodialysis: A Review[J]. *Braz J Infect Dis*, 2005, 9(3): 269-275.

[12] 许方, 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.

(收稿日期: 2014-12-08)

(上接第 919 页)

等,结果显示其灵敏度高于传统方法,同时节省时间,极大提高了诊断效率。另有研究显示,采用基因芯片技术检测水中常见致病菌,其敏感性可高达  $5.6 \times 10^5$  个/mL。但是,基因芯片仍有诸多需要改进的地方,包括简化样品制备过程、提高检测特异性和建立标准化程序等。

本研究结果显示基因芯片技术可以同时检测多种病原菌,操作简便,特异性强。细菌纯培养物灵敏度为  $5.0 \times 10^2$  CFU/mL, DNA 检测灵敏度为 0.1 pg。优化了多重 PCR 检测体系,确定了  $Mg^{2+}$  浓度和退火温度  $T_m$  值为 1.5 mmol/L 和 56 °C, 检测灵敏度达到 10 pg, 此灵敏度下可扩增出全部特异性引物条带。 $Mg^{2+}$  浓度为 1.5 和 2.0 mmol/L 时, 均可得到一条清晰的扩增条带, 为防止出现非特异性扩增条带, 选用低值 1.5 mmol/L。除引物浓度、 $Mg^{2+}$  浓度和模板浓度外, 退火温度也十分重要, 决定着 PCR 的特异性和产量, 本研究确定 56 °C 时得到的目的片段最为理想。但是, 在今后实际样品检测时还应根据样品情况适当调整反应条件。综上所述, 多重 PCR 技术和基因芯片技术可有效检测食源性致病菌, 为高通量筛查检测病原菌提供了新思路。

参考文献

[1] 徐君飞, 张居作. 2001~2010 年中国食源性疾病暴发情况分析

[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(2): 313-316.

[2] 樊永祥, 刘秀梅, 鲍一丹. 餐饮业引发食源性疾病的主要危险因素[J]. *中华预防医学杂志*, 2011, 45(6): 543-546.

[3] 姜侃, 张东雷, 金燕飞, 等. 四种食源性致病菌多重 PCR 检测方法的建立[J]. *卫生研究*, 2011, 40(6): 761-764.

[4] 李宁, 杨大进, 郭云昌, 等. 我国食品安全风险监测制度与落实现状分析[J]. *中国食品学报*, 2011, 11(1): 5-8.

[5] 封莉, 黄继超, 刘欣, 等. 食源性致病菌快速检测技术研究进展[J]. *食品科学*, 2012, 33(2): 332-339.

[6] 宋艳, 李建林, 郑铁松. 食源性致病菌 PCR 检测中常用的靶基因及其参考引物[J]. *食品工业科技*, 2011, 3(1): 97-99.

[7] 王如景, 王羽, 李英军, 等. 双正交优化多重 PCR 检测食源性致病菌的研究[J]. *食品科技*, 2012, 28(3): 308-313.

[8] 高兴, 曲险峰, 孙伟, 等. 多种食源性致病菌的基因芯片检测技术[J]. *解放军医学杂志*, 2012, 37(8): 765-769.

[9] 任莉莉, 从彦丽. 用于食源性疾病病原菌诊断的基因芯片研究及评价[J]. *食品科学*, 2011, 32(2): 208-211.

[10] 魏子淇, 李汴生. 食源性致病微生物的快速检测方法及其研究现状[J]. *现代食品科技*, 2013, 29(4): 438-442.

(收稿日期: 2014-11-18)