

• 论 著 •

核酸扩增及微流芯片技术在献血者 HCV 筛查中的应用*

姚仁南¹, 姚根宏², 栾建凤², 陈复兴¹, 陈玲¹, 陈娜云¹

(1. 中国人民解放军第九七医院输血科, 江苏徐州 221004;

2. 中国人民解放军南京军区南京总医院输血科 210002)

摘要:目的 应用核酸扩增和微流芯片分析方法, 用于献血者血液标本丙型肝炎病毒(HCV)的检测。方法 选取 80 份疑似 HCV 感染的血液标本, 分别采用 2 种 ELISA 法、胶体金法、化学发光免疫分析(CLIA)法和核酸扩增后微流芯片法分析。结果 经过核酸扩增的 HCV 阳性血液经分析后皆出现预期大小片段的特异性条带, 而阴性血液缺少相应的条带。特异性巢式 PCR 扩增及微流芯片法检测的阳性率与 CLIA 法差异无统计学意义($P>0.05$), 与 ELISA 法和胶体金法差异有统计学意义($P<0.01$)。结论 特异性巢式 PCR 扩增及微流芯片法结果稳定、准确, 灵敏度高于 ELISA 法, 可用于血液筛查。

关键词:肝炎病毒; 化学发光测定法; 酶联免疫吸附测定; 核酸检测; 微流芯片法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.14.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)14-1540-03

Application of HCV nucleic acid amplification and microfluidic chip technique in blood donors*

Yao Renan¹, Yao Genhong², Luan Jianfeng², Chen Fuxing¹, Chen Ling¹, Chen Nayun

(1. Department of Blood Transfusion, the 97th Hospital of PLA, Xuzhou, Jiangsu 221004, China; 2. Department of Blood Transfusion, Nanjing General Hospital of PLA Nanjing Zone, Nanjing 210002, China)

Abstract: Objective To apply nucleic acid amplification and microfluidic chip technique for detection of hepatitis C Virus (HCV) in blood donors. Methods The selected 80 blood samples, suspicious with HCV infection, were respectively analyzed with two different ELISA reagents, colloid gold reagent, chemiluminescence immunoassay (CLIA) and reverse transcriptase-polymerase chain reaction combined with microfluidic chip assay. Results Specific DNA zone was shown in HCV positive samples with 210 bp fragment. However, there was no corresponding DNA zone in the negative samples. Compared with CLIA, the positive rates of nucleic amplification and microfluidic chip assay had no significant differences ($P>0.05$). But compared with ELISA and colloid gold reagent, there are significant differences ($P<0.01$). Conclusion The nucleic amplification and microfluidic chip assay were steady and reliable, and more sensitive than ELISA, qualified for the future blood screening for HCV.

Key words: hepatitis virus; chemiluminescent measurements; enzyme-linked immunosorbent assay; nucleic acid testing; microfluidic chip assay

目前, 丙型肝炎病毒(HCV)的诊断主要应用 ELISA 法, 尽管使用的 ELISA 试剂盒均是经过国家批检的合格产品。但由于应用 ELISA 法还存在的一大缺陷, 即“窗口期”长, 约为 50 d, 所以易造成漏检^[1-2]。而核酸检测技术作为一种直接检测病毒核酸的方法, 可以使“窗口期”缩短至 4.9 d^[3-5]。笔者使用 HCV 核酸扩增及微流芯片检测方法, 对 80 份疑似 HCV 感染的血液标本进行了检测, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 核酸提取和检测试剂盒购自上海浩源生物科技有限公司。HCV 化学发光免疫分析法(CLIA)试剂购自 Ax-sym 公司。抗-HCV ELISA 诊断试剂①批号为 20091203 和 20100317, 试剂②批号为 C20090515 和 C20100315, HCV 胶体金试纸条批号为 2008100724。主要仪器: Bio-Rad PCR 扩增仪, Caliper 1000 微流芯片仪, Caliper 1000 分析软件。其余试剂皆为分析纯。

1.2 标本来源 来源于中国人民解放军第九七医院的献血者, 经试剂①和试剂②的抗-HCV ELISA 试剂 2 次检测, 挑选 2 种试剂检测均阳性或任一种试剂检测为阳性的血液标本 80

份。均为新鲜分离的血浆, 提取 RNA 后-20℃保存待用。

1.3 方法

1.3.1 核酸提取 采用盐裂解磁珠吸附法, 其基本原理是磁珠表面的硅胶层与样本裂解后溶液中的核酸特异性结合, 洗脱液将核酸从硅胶磁珠上洗脱下来, 从而获得高质量的核酸。RNA 浓度和纯度采用紫外吸收的方法确定。

1.3.2 核酸扩增的产物分析 采用巢式 PCR 法。直接吸取 10 μL RNA 模板, 加入 10 μL HCV 反应混合液 1, 混匀, 进行逆转录和第 1 次扩增, 反应条件: 42℃ 50 min; 95℃ 5 min; 94℃ 45 s, 60℃ 60 s, 20 个循环。取出 PCR 反应管, 每管中再加入 10 μL HCV 反应混合液 2, 混匀, 进行第 2 次扩增, 反应条件: 60℃ 2 min; 95℃ 5 min; 94℃ 10 s, 60℃ 45 s, 40 个循环; 扩增完成后于-20℃保存。PCR 产物采用微流芯片法分析, 每次检测均设阳性、阴性对照。

1.3.3 结果判断 按要求首先观察定位标记是否正常出峰, 定位标记共 11 个峰(15、25、50、100、150、200、250、300、400、500、600 bp), 11 个峰出峰完整才能继续分析; 接着观察样品孔中的定量标记, 每孔应出现 15 bp 的低位定量标记和 600 bp 的

* 基金项目: 南京军区医学科技创新重点课题资助项目(No. 08Z009)。

高位定量标记;然后观察阴、阳性对照孔是否正常出峰。最后根据出峰情况进行判断。HCV 特异峰位置为(210±10)bp。

1.3.4 ELISA 法、胶体金法和 CLIA 法检测 各种操作方法,结果判断严格按说明书要求。

1.4 统计学处理 数据统计学处理采用 SPSS13.0 软件进行,率的比较采用 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 80 份血清标本,经 CLIA 法、ELISA 法试剂①和试剂②胶体金法检测,阳性结果分别为 73、66、63、45 份。见表 1。

表 1 CLIA 法、ELISA 法和胶体金法结果比较					
	<i>n</i>	阳性数	阳性率(%)	χ^2	<i>P</i>
ELISA 试剂①	80	66	82.50	5.14*	<0.05
ELISA 试剂②	80	63	78.75	6.75**	<0.01
胶体金法	80	45	56.25	26.04**	<0.01
CLIA 法	80	73	91.25	—	—

* *P*<0.05,** *P*<0.01,与 CLIA 法比较。—:无数据。

表 2 4 种方法对 31 份疑似 HCV 感染标本的检测结果					
编号	CLIA 法 (S/CO)	ELISA 试剂① (S/CO)	ELISA 试剂② (S/CO)	微流芯片法 (+/-)	胶体金法 (+/-)
1	42.42	0.69	1.58	+	—
2	21.84	3.20	6.24	+	—
3	14.32	2.75	0.37	+	—
4	10.01	1.51	4.08	+	—
5	5.86	3.50	4.29	+	—
6	4.93	2.77	0.61	+	—
7	4.98	4.55	6.73	+	—
8	2.14	3.12	1.36	+	—
9	2.82	4.86	3.70	+	—
10	2.73	1.42	2.44	+	—
11	2.19	0.78	1.61	+	—
12	2.11	1.07	0.49	+	—
13	2.02	1.53	1.84	+	—
14	2.01	1.94	4.77	+	—
15	1.96	0.41	0.46	+	—
16	1.89	0.47	1.39	+	—
17	1.71	0.42	1.21	+	—
18	1.96	0.42	0.95	+	—
19	1.92	0.58	1.83	+	—
20	1.98	0.50	1.84	+	—
21	1.98	1.26	1.72	+	—
22	1.73	1.15	5.71	+	—
23	1.57	1.21	1.94	+	—
24	1.77	0.45	0.76	+	—
25	1.88	0.93	0.59	+	—
26	1.77	0.08	1.14	+	—
27	1.81	0.55	0.76	+	—
28	1.89	0.32	4.29	+	—
29	0.25	1.13	0.01	—	—
30	0.68	0.27	2.17	—	—
31	0.81	1.98	0.03	—	—

S/CO:标本与阳性对照的 OD 值之比,S/CO<1.0 为阴性,≥1.0 为阳性。

2.2 80 份疑似 HCV 感染的血清标本经 ELISA 法试剂①、试剂②、胶体金法和 CLIA 试剂检测,其中 4 种方法结果均阳性

有 45 份、结果均阴性有 4 份、结果不一致有 31 份。这份 31 标本经 CLIA 法、ELISA 法试剂①、试剂②和胶体金法检测,结果阳性份数分别为 28、21、17 和 0。见表 2。

2.3 扩增产物凝胶电泳检测 微流芯片电泳的结果(图 1)清晰显示出 11 条 DNA 片段的 DNA 标记(M),1 号为阴性对照,2 号为阳性对照;3~7 号样本结果为阴性,8~12 号样本结果为阳性,其中,11 号样本 ELISA 法结果为阴性,CLIA 法结果为阳性。核酸扩增和微流芯片分析系统的结果显示,HCV DNA 电泳扫描图和凝胶电泳图中定位标记、定量标记、内对照、阳性对照和阴性对照均很好呈现。以 10 号标本为例的微流芯片 HCV DNA 阳性电泳扫描图见图 2。

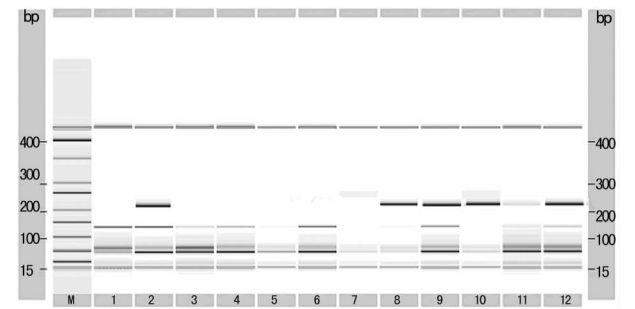


图 1 微流芯片 HCV DNA 凝胶电泳图

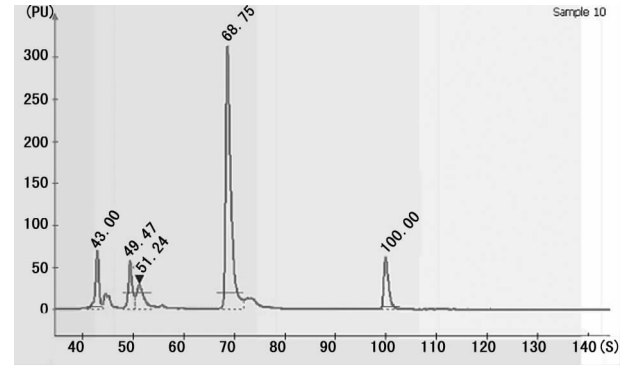


图 2 10 号标本微流芯片 HCV DNA 电泳扫描图

3 讨 论

丙型肝炎是通过血液传播的主要疾病之一。目前,国内主要使用第三代 ELISA 试剂检测,但由于厂家使用 HCV 基因重组抗原的质量和各抗原片段包被比例不同,使各厂家生产的试剂之间灵敏度和特异性存在一定的差异,从而导致检出结果的不一致^[6-7],从而产生假阴性和假阳性等情况^[8]。因此,选择敏感性高、特异性强的实验方法应用于献血者的检测,能有效减少输血引起的 HCV 感染。国外已经有多个国家先后开展了血液 HCV 的核酸检测筛查。笔者使用稳定、可靠的 HCV 核酸扩增及微流芯片检测方法进行了检测^[9]。

核酸扩增和微流芯片方法,其原理是采用微刻技术,将多种微流结构诸如阀、压力系统、测定系统、反应仓等整合在芯片结构上,液流中的分子在电极作用下,通过高压驱动流经特定的路径,通过毛细管电泳技术实现分离(该方法比传统平板凝胶方法快 50~100 倍)。通过荧光检测识别不同大小的 DNA 片段,并以数字化形式输出 PCR 产物大小等信息,这些图形直观、结果易判断,可用于献血者的定性筛查^[7]。

核酸扩增和微流芯片方法的特点是,各样品孔加入内对

照,与 HCV 在同一系统进行提取、扩增和检测,可有效监测整个体系,防止假阴性产生,相比其他同类方法,具有更大的应用推广价值。另外,采用巢式 PCR 扩增 HCV DNA,应用 2 对特异性引物序列,可很好地降低假阳性的产生。

结果表明,核酸扩增及微流芯片方法结果显示,阳性率比较 ELISA 法和胶体金法增高,且差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),与 CLIA 方法比较差异无统计学意义($P>0.05$),并且阳性份数相同(均为 73 份),核酸扩增及微流芯片方法阳性份数没有比 CLIA 方法增高,可能是由于本研究检测标本少,且标本中没有感染 HCV 在 4.9~50.9 d 的“窗口期”献血者有关。核酸扩增及微流芯片方法结果稳定、准确、灵敏度高、假阴性低、重复性好,适合无偿献血者 HCV 的筛查。但由于检测成本高及对检测环境和人员要求较高,目前尚不能作为常规筛查方法^[10]。总之,核酸扩增及微流芯片检测方法对 HCV 感染的早期诊断是有益的,它能提高 HCV 早期感染的检出率和结果的准确性,此法优于 CLIA 法和荧光定量 PCR 法^[11-12],可以作为 ELISA 法可疑标本作进一步检测的方法。

参考文献

[1] 姚仁南,陈复兴,黄晓静,等.两种试剂检测抗-HCV 在丙型肝炎诊断中的意义[J].临床输血与检验,2009,11(1):21-22.
[2] 姚仁南,张建辉,陈复兴,等.丙型病毒性肝炎核心抗原检测试剂的初步应用[J].东南国防医药,2008,10(3):168-169.
[3] Stramer SL, Glynn SA, Kleinman SH, et al. Detection of HIV and HCV infections among antibody-negative US blood donors by nucleic acid amplification testing[J]. N Engl J Med, 2004, 351(8): 760-768.
[4] Pisani G, Marino F, Cristiano K, et al. External quality assessment

for the detection of HCV RNA, HIV RNA and HBV DNA in plasma by nucleic acid amplification technology: a novel approach [J]. Vox Sang, 2008, 95(1): 8-12.

[5] Vermeulen M, Lelie N, Sykes W, et al. Impact of individual-donation nucleic acid testing on risk of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and hepatitis C virus transmission by blood transfusion in South Africa[J]. Transfusion, 2009, 49(6): 1115-1125.
[6] Gaudy-Graffin C, Lesage G, Kousignian I, et al. Use of an anti-hepatitis C virus (HCV) IgG avidity assay to identify recent HCV infection[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(9): 3281-3287.
[7] Duru MU, Aluyi H, Anukam K. Rapid screening for co-infection of HIV and HCV in pregnant women in Benin City, Edo State, Nigeria[J]. Afr Health Sci, 2009, 9(3): 137-142.
[8] 孟宪军,史志旭,祝凯捷,等. HCV 抗体酶联免疫诊断试剂的质量评价[J].临床输血与检验,2008,10(3):245-247.
[9] 姚根宏,栾建凤,朱培元,等.丙型肝炎病毒核酸扩增及微流芯片检测方法的建立[J].临床输血与检验,2010,12(4):289-291.
[10] Phikulsod S, Octa S, Tirawatnapong T, et al. One-year experience of nucleic acid technology testing for human immunodeficiency virus type 1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus in Thai blood donors[J]. Tansfusion, 2009, 49(6): 1126-1135.
[11] 姚仁南,陈复兴,陈玲,等.化学发光免疫分析法检测献血者 HCV 抗体的应用评价[J].中华全科医学,2011,9(3):450-453.
[12] 郑宏波.实时荧光定量 PCR 检测丙型肝炎病毒[J].实用全科医学,2005,3(5):460-461.

(收稿日期:2011-03-23)

(上接第 1539 页)

是慢性咳嗽的一种重要的炎性反应类型,检查诱导痰嗜酸性粒细胞是对慢性咳嗽患者进行病因诊断的重要方法。慢性咳嗽呼吸道嗜酸性粒细胞性炎性反应主要见于 CVA 患者和 EB 患者,而且表现出不同程度的呼吸道嗜酸性粒细胞性炎性反应。

参考文献

[1] 洪春霖,陈慧暖,洪敏俐.诱导痰的实验室检查及在慢性咳嗽中的应用[J].国际检验医学杂志,2009,30(9):865-866.
[2] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组.咳嗽的诊断与治疗指南(草案)[J].中华结核和呼吸杂志,2005,28(11):738-744.
[3] Irwin RS, Baumann MH, Bolser DC, et al. Diagnosis and management of cough executive summary: ACCP evidence-based clinical practice guidelines[J]. Chest, 2006, 129(1): 1-23.
[4] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组.支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗和管理方案)[J].中华结核和呼吸杂志,2008,31(3):177-185.
[5] 洪春霖,陈慧暖,洪敏俐,等.不同病因的慢性咳嗽患者诱导痰细胞学分析[J].中国医师进修杂志,2010,33(31):32-34.
[6] Parameswaran K, Pizzichini E, Pizzichini MM, et al. Clinical judgement of airway inflammation versus sputum cell counts in patients with asthma[J]. Eur Respir J, 2000, 15(3): 486-490.
[7] 陶义训.免疫学和免疫学检验[M].北京:人民卫生出版社,1989.

[8] 罗炜,赖克方,陈如冲,等.嗜酸粒细胞性支气管炎气道炎症病理特征的探讨[J].中国病理和生理学杂志,2006,22(5):943-947.
[9] Yoo Y, Koh YY, Kang H, et al. Sputum eosinophil counts and eosinophil cationic protein levels in cough-variant asthma and in classic asthma, and their relationships to airway hypersensitivity or maximal airway response to methacholine[J]. Allergy, 2004, 59(10): 1055-1062.
[10] 时翠芹,余莉,魏为利,等.气道炎症在上气道咳嗽综合征发生中的作用[J].中国呼吸与危重监护杂志,2009,8(3):256-258.
[11] 张罗,王向东,韩德明.导致慢性上气道咳嗽综合征的鼻腔鼻窦疾病[J].中国呼吸与危重监护杂志,2008,7(6):404-407.
[12] Fujimura M, Sakamoto S, Matsuda T. Bronchodilator-resistant cough in atopic patients: bronchial reversibility and hyperresponsiveness[J]. Intern Med, 1992, 31(4): 447-452.
[13] De Diego A, Martínez E, Perpiná M, et al. Airway inflammation and cough sensitivity in cough-variant asthma[J]. Allergy, 2005, 60(11): 1407-1411.
[14] National Heart, Lung, and Blood Institute. National asthma education and prevention program expert panel report 3: guidelines for the diagnosis and management of asthma[J]. Bethesda, MD: National Institutes of Health, 2007: 18.

(收稿日期:2011-02-26)