

• 检验技术与方法 •

# RT-PCR 检测 HCV-RNA 在丙肝流行病学研究中的应用

刘广印<sup>1</sup>, 咎丽娜<sup>1</sup>, 孙峰<sup>1</sup>, 周光庭<sup>1</sup>, 王祥英<sup>2</sup>, 张峰<sup>3</sup>

(1. 安徽省亳州市医院检验科 236800; 2. 安徽省亳州市疾控中心 236800;  
3. 安徽省亳州市中心血站 236800)

**摘要:**目的 分析丙型肝炎病毒(HCV)IgG 抗体和 HCV-RNA 核酸检测结果的相关性,为丙肝流行病学研究提供实验依据。方法 对 5 385 例血液样本采取 ELISA 法检测 HCV-IgG 抗体,实时荧光定量 RT-PCR 方法检测 HCV-IgG 抗体阳性样 HCV 核酸。同时检测 51 例医院门诊送检样本 HCV-IgG 抗体和 HCV-RNA。结果 5 385 例检出 HCV-IgG 抗体阳性 47 例,阳性率 0.87%; 47 例 HCV-IgG 抗体阳性样本经核酸检测 14 例阳性;阳性检出率 0.26%。51 例门诊样本中 HCV-IgG 抗体阳性 44 例,阳性率 86.27%,HCV 核酸阳性 28 例,阳性率 54.90%;两者阳性率比较, $\chi^2=9.877, P<0.01$  差异有统计学意义。结论 ELISA 方法检测 HCV 抗体操作简便,可作为 HCV 感染筛查方法,RT-PCR 检测 HCV-RNA 是判断丙肝感染最准确方法。

**关键词:**肝炎病毒,丙型; 逆转录聚合酶链反应; RNA,病毒

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.15.029

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)15-1859-02

丙型肝炎病毒(HCV)是含脂类蛋白包膜的单股正链 RNA 病毒,为黄病毒科丙型肝炎病毒属。HCV 主要经血和血制品传播,也可通过性传播。急性和慢性丙型肝炎病毒及 HCV 无症状携带者为 HCV 主要传染源<sup>[1-2]</sup>。2011 年 10 月,亳州市涡阳县发生因医源性感染丙肝疫情,按照卫生部专家组制订的《丙肝疫情调查方案》,在涡阳县丹城镇开展了分层整群抽样调查,共送样检测 5 385 例,采用 ELISA 方法检测 HCV-IgG 抗体筛查 HCV 感染,对抗体阳性者进一步检测病毒核酸以确认病毒感染。同时检测了 51 例涡阳县医院门诊送检样本 HCV-IgG 抗体和 HCV-RNA。现就相关检测结果及相关性分析报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 5 385 例血液样本(EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝)来自涡阳县丹城镇抽样调查行政村村民,由涡阳县疾病预防控制中心送样。采用 ELISA 法筛查 HCV-IgG 抗体;进一步采用 RT-PCR 技术检测 HCV-RNA。51 例涡阳县医院门诊样本由也涡阳县疾病预防控制中心送样。

**1.2 仪器与试剂** (1)HCV-IgG 抗体检测试剂盒购自珠海丽珠试剂股份有限公司;RT-PCR 试剂盒购自达安基因股份公司(灵敏度为  $1.0 \times 10^3$  IU/mL)。(2)全自动酶标仪为 Tecan Freedom EVOlyzer 150 型全自动酶免分析仪;PCR 仪为 ABI PRISM 7300。

**1.3 方法** (1)HCV-IgG 抗体检测:按试剂说明书进行操作,由 Tecan Freedom EVOlyzer 150 型全自动酶免分析仪完成检测。(2)RT-PCR 检测:标本 RNA 提取和逆转录严格按试剂说明书操作。PCR 扩增:93 ℃ 30 s 预变性,然后按 93 ℃ 45 s, 55 ℃ 60 s,反应 10 个循环,93 ℃ 30 s,55 ℃ 45 s,反应 30 个循环。结果分析:结果判定(ABI7300),如果扩增曲线呈 S 型且 Ct 值小于 30 则为阳性,如果增长曲线不呈 S 型或 Ct 值等于 30 则为阴性。

**1.4 统计学处理** 统计资料为计数资料,其相关性比较采用配对  $\chi^2$  检验的 Pearson 检验,采用 SPSS 17.0 软件进行处理,  $P<0.01$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1** 5 385 例血液样本(EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝)ELISA 筛查 HCV-IgG 抗体阳性 47 例,抗体阳性检出率 0.87%; 47 例 HCV-

IgG 抗体阳性样本经核酸检测 14 例阳性,核酸阳性检出率 0.26%。

**2.2** 51 例门诊样本中 HCV-IgG 抗体阳性 44 例,阳性率 86.27%,HCV 核酸阳性 28 例,阳性率 54.90%,差异有统计学意义( $\chi^2=9.877, P<0.01$ ),见表 1。

表 1 51 例门诊样本中 HCV-IgG 抗体和 HCV RNA 结果比较

ELISA	RT-PCR		合计
	+	-	
+	28	16	44
-	0	7	7
合计	28	23	51

## 3 讨论

HCV 感染呈世界性分布,全世界至少有 2 亿 HCV 感染者。国外丙肝病毒的感染率在 1%~1.4%;由于对血液制品的严格筛选和相关危险行为矫正,近年呈流行下降趋势<sup>[3]</sup>。根据我国卫生部公布的传染病疫情显示,近年我国丙肝的发病率在病毒性肝炎中有明显上升的趋势。2009 年流行病学调查显示,我国自然人群丙肝病毒的感染率为 0.43%。本次流行病学调查样本阳性检出率 0.87%,明显高于国内感染水平;说明本地区存在感染播散问题。

HCV 感染的一个重要特点就是慢性化的概率很高,感染过程长,存在不同程度的肝组织病变,并呈慢性进行性。丙型肝炎目前尚无有效疫苗,也没有有效的治愈方法。早期准确诊断和合理治疗,并及时防控丙型肝炎传染源、阻断传播途径具有重要的临床意义。目前检测 HCV 感染的技术主要有:抗 HCV 抗体检测及 HCV-RNA 检测<sup>[2,4]</sup>。检测抗 HCV 抗体最常用方法为 ELISA 法,该试验是 HCV 感染的筛查方法。重组免疫印迹试验(recombinant immunoblot assaym, RIBA)是一种特异性、敏感性均高的抗 HCV 抗体确认试验<sup>[5]</sup>,主要用于 ELISA 筛查实验阳性样品的抗 HCV 抗体确认。HCV-RNA 是 HCV 感染的确诊标志;新颁布的《丙型肝炎防治指南》已将 HCV-RNA 检测列入实验室诊断方法<sup>[6-7]</sup>。分析 ELISA 试验阳性但 PCR 检测 RNA 阴性现象,有研究者认为可能原因

是<sup>[8-9]</sup>:(1)患者为继往感染,HCV-IgG 为一免疫学指标,在体内可以持续一段时间方渐消除或长期存在,但目前无病毒复制或 HCV-RNA 拷贝数低于检测下限而未检测出来。(2)引物及探针设计的原因,部分变异株没检出。(3)操作过程中受 RNA 酶降解出现假阴性。本次丙肝聚集性感染实验室检测采用了 ELISA 方法筛查 HCV 抗体,对抗体筛查阳性样本进一步检测 HCV-RNA 的流行病学调查方法。同时对市医院门诊样本检测 HCV 抗体和 HCV-RNA,51 例门诊样本中 HCV-IgG 抗体阳性 44 例,阳性率 86.27%,而 HCV 核酸阳性只有 28 例,阳性率仅 54.90%,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。本次流行病学研究以 HCV-RNA 作为 HCV 感染的确诊标志。由于门诊样本来源为此次聚集性感染者,51 例样本中只有 7 例 HCV-IgG 抗体阴性,未检测到抗体阴性者中 HCV RNA 阳性病例,是此次研究与以往报道不一致的地方<sup>[9-10]</sup>。

由于 HCV-RNA 的 PCR 检测需要逆转录,在试验时除常规 PCR 注意事项外,还应特别注意样本采集和处理时防止 RNA 酶的污染,所有实验用品均需为 DEPC 处理后不含 RNA 酶;在吸弃乙醇步骤应尽量吸干并不碰到沉淀,以缩短开盖烘干时间。尤为要注意消除由于样本污染引起的假阳性结果;此次应急检测出现 18 例抗体筛查阳性样本 HCV-RNA 全阳性现象,经进一步复查后只有 4 例 HCV-RNA 阳性,考虑为样本处理过程受到污染。在加乙醇沉淀时加样枪悬于样品处理管上方,连续加入乙醇没有更换加样枪吸头,为污染重要原因。作者建议在乙醇沉淀步骤用加样枪混匀沉淀(每次均更换吸头),不要震荡混匀,防止 RNA 丢失(沉淀经震荡后可能粘附在管口)造成实验结果误差。

• 检验技术与方法 •

## 痰标本中结核分枝杆菌培养及药敏检测结果分析\*

陈爱蓉<sup>1</sup>,李建武<sup>1</sup>,温贵华<sup>2</sup>

(1. 北京大学深圳医院,广东深圳 518035;2. 广东深圳宝安区慢病防治院 518036)

**摘要:**目的 探讨结核分枝杆菌在变色液体培养基中快速培养及药敏试验可靠性。方法 分别采用新型变色液体培养基和改良罗氏培养基对 198 例痰标本进行分枝杆菌培养及药敏试验,对比分析试验结果。结果 变色液体培养基及改良罗氏培养基检出阳性率分别是 37.9%和 37.4%。变色液体培养基试验结果平均时间为 28 d,耐药率分别为链霉素 8.00%、异烟肼 5.33%、利福平 4.00%和乙胺丁醇 4.00%;改良罗氏培养基试验结果平均时间为 62 天,耐药率分别为链霉素 8.11%、异烟肼 5.41%、利福平 4.05%和乙胺丁醇 4.05%;两者结果差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。多重耐药结果分别为 5.33%和 5.41%。结论 变色液体培养基是一种适合在基层实验室推广应用的结核分枝杆菌辅助诊断方法,具有快速、简单、灵敏度高的优点。

**关键词:**分枝杆菌,结核; 培养基; 抗药性,细菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.15.030

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)15-1860-03

结核病是由结核分枝杆菌引起的慢性传染病,可侵及许多脏器,以肺部受累形成肺结核最为常见<sup>[1]</sup>。检出痰液中结核分枝杆菌一直是临床诊断肺结核或鉴别肺结核与其他肺病的主要依据。涂片找抗酸杆菌是最普及、经济的方法,但敏感性低、特异性差。改良罗氏培养法虽为金标准,但耗时长且阳性率低,不易标准化,均难以满足临床需要。缩短培养及药敏试验时间是世界防痨工作中亟待解决的研究课题之一。我国是结核病高发区,且近年结核病发病率有逐年增加的趋势<sup>[2]</sup>。近年来,一些针对结核分枝杆菌快速检测方法陆续报道。本研究采

### 参考文献

- [1] 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,2006:621-623.
- [2] Wang CC, Krantz E, Klarquist J, et al. Acute hepatitis C in a contemporary US cohort: modes of acquisition and factors influencing viral clearance[J]. J Infect Dis, 2007, 196(10):1474-1482.
- [3] Kondili LA, Chionne P, Costantino A, et al. Infection rate and spontaneous seroreversion of anti-hepatitis C virus during the natural course of hepatitis C virus infection in the general population [J]. Gut, 2002, 50(5):693-696.
- [4] 王春艳,王凯,冯冬梅. PCR 法与 ELISA 法检测丙型肝炎病毒及乙型肝炎病毒比较[J]. 郑州大学学报(医学版),2002,37(4):493-494.
- [5] 何长辉. 丙型肝炎病毒检测方法的应用评价[J]. 临床和实验医学杂志,2010,9(10):753,755.
- [6] 冯国钢. 抗-HCV 抗体与 HCV-RNA 定量检测相关性分析[J]. 吉林医学,2011,32(2):244-245.
- [7] 陈开慧. 探讨三种检测方法在丙型肝炎诊断中的应用价值[J]. 免疫学杂志,2011,27(4):319-321.
- [8] 雷秀霞,徐邦牢,明凯华,等. 两种荧光定量法检测 HCV-RNA 结果的比较[J]. 国际检验医学杂志,2008,29(9):777-779.
- [9] 张瑞,李金明. 丙型肝炎病毒感染临床检测程序的建立及结果报告与解释[J]. 中华检验医学杂志,2010,33(10):990-992.
- [10] 陈兴智,谭庆芬,黄雁,等. 多民族无偿献血者 HCV 感染状况调查研究[J]. 重庆医学,2009,38(12):1443-1444.

(收稿日期:2011-12-12)

用变色液体培养基快速一步法和改良罗氏培养基同步试验,并对结果进行分析比较,探讨不同培养方法阳性结果的检出时间和阳性检出率,为临床疾病的准确快速诊断提供理论依据,现将结果报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 198 例标本来自 2010 年宝安区慢性病防治院结控项目,门诊有慢性咳嗽、咳痰 3 周以上或有咯血等症状,胸透有阴影的门诊初诊患者。痰标本要求抗结核治疗前采集,痰涂片及痰培养工作严格按照卫生部制订的标准工作手册要

\* 基金项目:深圳市科技计划项目(201003376)。