

• 检验技术与方法 •

3 种检测方法在丙型肝炎诊断中的临床评价

丁 华,何维娜,陈 望,何 玥,许瑞娜,杨鸿雅,李 娟
(广州医学院附属深圳沙井医院,广东深圳 518104)

摘 要:目的 通过对丙型肝炎 3 种检测方法的比较,探讨丙型肝炎病毒抗体(抗-HCV)和 HCV-RNA 在丙型肝炎诊断中的临床价值。方法 采用酶联免疫法(ELISA)和胶体金法检测抗-HCV 特异性抗体;以荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)检测 HCV-RNA,用上述 3 种方法同时检测 206 例临床诊断丙型肝炎患者(观察组)和 175 例健康体检者(对照组),并对检测结果进行比较。结果 在观察组中,ELISA 法和胶体金法分别检出抗-HCV 阳性 179 例和 165 例,阳性率分别为 86.89%和 80.10%;FQ-PCR 法检出 HCV-RNA 阳性 128 例,阳性率为 62.14%,有 5 例抗-HCV 阴性患者 HCV-RNA 却为阳性。对照组中 HCV-RNA 均为阴性,其中 7 例抗-HCV 阳性。结论 同步检测抗-HCV 和 HCV-RNA 可提高肝病患者 HCV 感染的检出率,为其诊断和治疗提供可靠依据。

关键词:丙型肝炎; 丙型肝炎病毒核糖核酸; 聚合酶链反应; 丙型肝炎病毒抗体; 酶联免疫法; 胶体金法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.24.057

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)24-3387-01

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^[1]。据世界卫生组织统计,全球 HCV 的感染率约为 3%,估计约 1.7 亿人感染了 HCV,每年新发丙型肝炎病例几百万例^[2]。国内平均感染率为 3.2%^[3]。HCV 抗体(抗-HCV)及丙型肝炎病毒核糖核酸(HCV-RNA)是诊断 HCV 感染的主要病原学指标,抗-HCV 是检测患者血清中针对 HCV 基因组编码抗原某区域而产生的抗体,是间接反映 HCV 的感染和既往感染,但由于 HCV 核酸和蛋白变异很大,试剂的抗原包被不可能包括所有的 HCV 基因区而有可能造成漏检^[4]。而聚合酶链反应(PCR)是检测患者血清中 HCV-RNA, HCV-RNA 是反映患者血清中是否存在病毒血症。在实际检测中常会遇到两者检测结果不一致的情况,本研究对 206 例丙型肝炎患者用 3 种检测方法同时检测抗-HCV 和 HCV-RNA,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2009 年 1 月至 2012 年 10 月来本院就诊的丙型肝炎患者 206 例作为观察组,其中男性 109 例,女性 97 例,年龄 12~62 岁,平均年龄为 38.2 岁;另选择健康体检者 175 例作为对照组,其中男性 95 例,女性 80 例,年龄 10~65 岁,平均年龄为 36.4 岁;丙肝的临床诊断符合 2004 年中华医学会肝病学分会和中华医学会传染病与寄生虫病学分会发布的《丙型肝炎防治指南》的诊断标准^[5]。

1.2 方法

1.2.1 抗-HCV 抗体的检测 试剂由中山生物工程有限公司提供。采用酶联免疫法(ELISA),严格按操作说明书进行。抗-HCV 结果由芬兰进口 ASCENT 酶标仪读出吸光度(A)值,根据 $A/\text{cutoff} \geq 1$ 判断为抗-HCV 阳性。

1.2.2 抗-HCV 抗体的检测 试剂由潍坊市康华生物技术有限公司提供。采用胶体金法,快速检测患者血清中的抗-HCV 特异性抗体。取 25 μL 血清滴加于试纸条指示箭头下端的加样处,随即滴加 100 μL 样本稀释液,10~20 min 肉眼观察结果。若反应线和质控线均出现红色带为阳性,仅质控线出现红色带为阴性,均不出现红色带为无效。

1.2.3 HCV-RNA 的检测 试剂由中山医科大学达安基因股份有限公司提供。采用 FQ-PCR 法检测,严格按照说明书进行操作,样品采集后,立即分离并转移至一次性使用的无 RNA 酶的无菌微量离心管中;取血清 100 μL ,采用真空负压膜提取法进行总 RNA 提取;每次实验中均设置阴性、阳性对照品,以及经国家食品药品监督管理局验证的 4 个阳性参比品。正常参考值为: $<1\ 000$ copy/mL。

1.3 统计学处理 采用 SPSS10.0 统计软件对检测结果进行统计学处理分析^[6],计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有

统计学意义。

2 结 果

观察组 206 例分别采用 FQ-PCR 法、ELISA 法、胶体金法检测的阳性率为:62.14%(128/206)、86.89%(179/206)、80.10%(165/206),FQ-PCR 法检测结果与胶体金法、ELISA 法检测结果比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),但 ELISA 法和胶体金法检测结果比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。对照组 175 例分别采用 FQ-PCR 法、ELISA 法、胶体金法检测的阴性率为:100.00%(175/175)、96.00%(168/175)、98.29%(172/175)。FQ-PCR 法特异性为 100.00%;ELISA 法和胶体金法特异性分别为 96.00%、98.29%,假阳性率分别为 4.0%、1.71%。

3 讨 论

丙型肝炎分为急性肝炎和慢性肝炎,急性肝炎多由输血引起,患者症状不太明显,有的甚至无症状,HCV 感染慢性化的比率很高,感染过程长,存在不同程度的肝功能损害,并呈慢性进行性,耽误治疗时容易形成肝硬化甚至是肝癌^[7]。

本文采用 ELISA 法和胶体金法检测 206 例丙型肝炎患者血清中抗-HCV,并同时用 FQ-PCR 法检测病毒的核酸,ELISA 法、胶体金法和 FQ-PCR 法检测的阳性率分别为 86.89%、80.10%和 62.14%,其中 HCV-RNA 阳性率与文献报道基本相符^[8],ELISA 法和胶体金法分别与 FQ-PCR 法比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);ELISA 法和胶体金法比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。出现 PCR 法检测阳性率低于 ELISA 法的原因可能有:第 3 代 ELISA 试剂包被有 C、NS3、NS4 和 NS5 等 4 种抗原,能检出机体针对不同区域抗原产生的多种抗体;而 PCR 法检测 HCV-RNA 所用引物主要来自 5'末端序列,当该基因区段的核苷酸序列发生变化时,本法检测不出变异的 RNA;PCR 法操作复杂,影响因素多,特别是 RNA 易被自然界大量存在的 RNA 酶降解,造成 RNA 的丢失,易出现假阴性;机体内 HCV 已被清除,病情处于恢复期,HCV-RNA 为阴性,而抗体却会持续存在较长时间;HCV 处于非复制期,潜藏于肝细胞内,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 可能转为阳性,临床上发现部分患者血清中 HCV-RNA 呈间断性阳性,可能属于这种情况,有资料报道 HCV-RNA 在血液中有阶段性^[9],对检测阴性而怀疑丙肝感染的病例隔一段时间重复检查,可以得到阳性结果;PCR 灵敏度虽高,但有一定的阈值,部分患者血清中 HCV 量极少,虽处于 HCV 复制期,但仍低于 PCR 检出阈值。理论上讲 HCV-RNA 阴性是不具传染性的,但从以上分析可知,HCV-RNA 阴性,并不能排除 HCV 的存在。本研究显示,ELISA 法检测的灵(下转封 3)

(上接第 3434 页)
对结果的干扰可以忽略^[11]。

4 检验与临床间的交流沟通仍需加强

4.1 及时沟通 一旦发现检验结果与临床不符合时,临床医生需要立即沟通、趁热打铁。切忌过了很久再回溯事实,影响解决问题的效果。检测结果不符合、检验报告延迟、检验服务质量等问题发生时,除了及时与检验科沟通以外,临床医生还需要与检验人员一道,立即追溯采样、送检、检测、审核、报告发放等每一个环节^[10],以学术研究的态度对待和处理医学实践中的每一个问题,可以及时发现很多难以发现的质量缺陷,不必总是因为害怕负责任而回避问题。

4.2 相互协作 当检验数据给临床诊治或患者沟通带来困惑时,临床需主动联系检验人员,结合检验医学的数据分析会给临床医生带来豁然开朗的好感觉。检验检测是临床医生诊治手段的延伸,任何辅助检测结果须结合临床表现和症状加以分析和利用,不能仅依据一个样本的一次检测数据急着下诊断结论。发现与临床不符合的检测项目时,检验科需要记录这些信息,在多次发生、改进和评估,以及在排除设备与操作因素之后,结果仍不符合临床的项目,需要立即更换检测试剂来源或升级检测项目。

4.3 注重护理人员沟通 临床医生有必要提醒样本采集运送人员注意样本采集与运送的操作规程,告知患者采样前的必要准备,对细节问题进行关注,尽可能获得最好的样本。

总之,医学检验体已体现出快速发展和高度分化的专业性,迫切需要与临床之间有更多的互动和良好的沟通^[7]。检验科需要制度性的为临床提供主动的技术咨询;临床医生在进行报告分析和数据的临床应用时,需要结合医学检验的

方法学特性、样本采集质量的符合性要素等,才能综合评估报告的检测质量并良好地应用检验数据。

参考文献

[1] 沈霞. 现代检验医学仪器分析技术及应用[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2010.
[2] 曹瑾, 张双德, 高宏生. 卫生统计学中 *t* 检验应用的几点注记[J]. 中国现代医生, 2009, 3(30): 109-110.
[3] 孔胜利, 王玉红, 赵英剑. 影响医学检验结果的分析前因素[J]. 中外健康文摘, 2011, 8(7): 150-151.
[4] 王治国. 临床检验质量控制技术检测值[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
[5] 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, 2008.
[6] 张瑞, 李金明. 如何发挥检验医师在 HBV, HCV 检测结果临床应用中的作用[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(11): 865-867.
[7] 丛玉隆. 检验分析前质量控制存在的问题与对策[J]. 中国医学论坛报, 2005, 1(16): 524.
[8] 潘惠芬, 顾文红, 赵缙, 等. 急诊 CRP 检测方法的选择与临床应用[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(7): 849-851.
[9] 陈晓红, 程天民. C 反应蛋白的药理学作用研究进展[J]. 中国药理学通报, 1999, 15(4): 296-299.
[10] 方磊, 潘逸茹, 张行康. 浅谈 6 σ 管理和检验科全面质量管理[J]. 检验医学, 2005, 20(5): 493-493.
[11] 林昕爱. 药物对检验结果的干扰[J]. 国外医学临床生化与检验学分册, 1983, 5: 41.

(收稿日期: 2013-08-28)

(上接第 3387 页)

敏度高于胶体金法, 可能是因为胶体金法标记物不纯, 易造成漏检, 胶体金法靠肉眼鉴别弱阳性和阴性的方法本身就具有一定模糊性。

另外在观察组中, 有 5 例抗-HCV 阴性患者 HCV-RNA 却为阳性。这说明抗-HCV 阴性时仍存在病毒复制的可能性^[10-11], HCV-RNA 阳性而抗-HCV 阴性的原因可能有以下几点: 标本中病毒复制不活跃, 未产生足够检出量的抗体; 机体免疫功能低下, 不能产生相应的免疫应答^[12]; 采集的标本在血清转化期, 如抗-HCV 阳转前“窗口期”的 HCV 携带者, 抗-HCV 不产生或已消失的 HCV 携带者等, 在上述情况下用 ELISA 法和胶体金法是不能检出抗-HCV 的。本研究发现, HCV 在感染 2 周内就能检测到 HCV-RNA, 而抗-HCV 7~13 周才能检测到, 通过追踪检测, 发现 8 周后有 3 例患者抗-HCV 转为阳性。

对照组检测结果表明, FQ-PCR 检测技术对丙型肝炎的临床诊断特异性最高, 并且无假阳性, 而 ELISA 法和胶体金法假阳性率分别为 4.0% 和 1.71%。导致结果假阳性的可能原因: 抗-HCV 检测采用 ELISA 法, 而 ELISA 法检测过程中, 影响因素较多; 抗-HCV 检测的是 IgG 抗体, 自身免疫性疾病及类风湿关节炎患者体内有大量类风湿因子(RF), 可以与固相的 IgG 和酶标的 IgG 结合, 造成假阳性; 也有不少患者感染 HCV 多年, 在临床上并无明显的症状和体征, 对此类患者, HCV 感染的检测是确定诊断和治疗决策的唯一依据。

综上所述, ELISA 法和胶体金法与 FQ-PCR 法检测 HCV 各有优势, 各有不足, 只有 3 种方法联合应用, 同步检测抗-HCV 和 HCV-RNA, 才能有效提高 HCV 的检出率, 为临床诊断和治疗提供可靠性依据^[13]。

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] Craxi A, Laffi G, Zignego A L. Hepatitis C virus(HCV) infection: a systemic disease[J]. Mol Aspects Med, 2008, 29(1): 85-95.
[3] 陈坤, 张贺秋, 宋晓国, 等. 金标渗透法快速检测血清中丙型肝炎病毒抗体[J]. 现代检验医学杂志, 2002, 17(2): 1.
[4] 蒋立, 汤习锋. 同一血清检测丙型肝炎抗体结果不同的原因分析[J]. 中国检验医学与临床, 2003, 4(1): 37.
[5] 中华医学会肝病学会分会, 中华医学会传染病与寄生虫病学会. 丙型肝炎防治指南[J]. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(4): 194-198.
[6] 华建江, 黄大毛, 吴苑, 等. HSP70 在鼻咽癌中的表达及其临床意义[J]. 实用预防医学, 2008, 15(6): 1676-1678.
[7] 谭跃, 黄淑媛, 刘勇. 丙型肝炎病人在治疗过程中 HCV-RNA 含量、血清抗 HCV 抗体及其生化指标的变化[J]. 国际医药卫生导报, 2009, 15(17): 8-11.
[8] 周永香. 丙型肝炎病毒抗体与丙型肝炎抗糖核酸的关系[J]. 医学理论与实践, 2003, 16(8): 890-891.
[9] 刘拉羊, 吴修斌. 抗 HCV 及 HCV-RNA 在丙型肝炎中的变化对丙型肝炎特异性诊断的影响[J]. 临床肝胆病杂志, 1997, 13(1): 40-41.
[10] 李振才, 范淑芬, 高霞, 等. PCR 技术检测供血者血清 HCV-RNA 的意义[J]. 中国输血杂志, 1997, 10(4): 209.
[11] 雷皖秋, 胡立功, 宫芙蓉, 等. RT-PCR 技术检测抗-HCV 阴性血液结果[J]. 中国输血杂志, 1999, 12(1): 31-32.
[12] Moriishi K, Matsuura Y. Evaluation systems for anti-HCV drugs[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2007, 59(12): 1213-1221.
[13] 周涛, 袁伟华, 朱洁好, 等. 乙肝血清学标志物定量与定性检测的对比研究[J]. 国际医药卫生导报, 2009, 15(22): 84-87.

(收稿日期: 2013-08-18)