

• 经验交流 •

磁珠法在 HCV RNA 定量检测中的临床应用

吴 斌¹, 李彩东¹, 段正军¹, 刘学梅¹, 李惠军¹, 李 鑫²

(1. 兰州市第二人民医院肝病研究所, 甘肃兰州 730046; 2. 甘肃省庄浪县中医医院检验科, 甘肃庄浪 744699)

摘 要:目的 探讨国产丙型肝炎病毒核酸定量检测试剂的临床应用价值, 评价其灵敏度、线性范围。方法 收集 288 例慢性丙型肝炎患者血清, 分别采用磁珠法核酸提取荧光定量 PCR 检测试剂和目前国内主流的柱提取试剂测定 HCV RNA 病毒载量、应用贝克曼 AU-680 全自动生化分析仪测定血清 ALT 水平, 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法测定抗-HCV。结果 在 288 例抗-HCV 阳性样本中, 柱提取法的阳性率为 40.63%(117/288); 磁珠法的阳性率为 41.67%(120/288); ALT 水平与 HCV RNA 载量无相关性($P>0.05$), 但 ALT 异常率与 HCV RNA 载量呈正相关。在低病毒载量组中, 柱提取法有 3 例未检出, 而磁珠法检测这 3 例丙型肝炎患者标本为阳性。结论 两种核酸提取试剂试剂在中、高病毒载量组中, 具有较好的一致性, 但在低病毒载量组中, 磁珠法灵敏度更高, 具有较高的临床应用价值。

关键词:磁珠法; 柱提取法; 灵敏度

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.15.054

文献标识码:B

文章编号:1673-4130(2014)15-2090-03

丙型肝炎病毒(HCV)为单股正链 RNA 病毒, 全球慢性 HCV 感染者超过 1.7 亿^[1-3], 超过 50% 的患者发展为慢丙肝, 其中部分发展为肝硬化和肝癌(HCC)。因此, 对 HCV 感染的流行病学监测、预防控制和治疗应高度重视^[4]。目前国内实验室用 ELISA 法检测抗-HCV, 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)法检测 HCN RNA 病毒载量, 这两种方法在确诊 HCV 感染, 临床调整治疗方案及评价治疗效果方面具有非常重要的作用^[5]。稳定性及特异性高的检测方法有助于丙型肝炎的早期诊断, 对抗病毒治疗效果的评价能够提供客观依据。HCV RNA 载量检测结果的灵敏性、特异性和稳定性对于 HCV 感染治疗具有重要意义。为此, 研究者采用目前国内主流的柱提取试剂和新型丙型肝炎病毒核酸提取试剂(磁珠法), 分别检测其丙型肝炎病毒血清标本的 HCV RNA 载量, 并对检测结果与其肝功能指标 ALT 进行比较分析, 探讨磁珠法核酸提取试剂在慢性丙肝诊断和治疗中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院 2012 年 7 月至 2013 年 8 月门诊及住院的 288 例慢性丙型肝炎患者血清, 该诊断依据我国《丙型肝炎防治指南》中的诊断标准^[7]。根据病毒载量分为高病毒载量组 34 例、中病毒载量组 58 例、低病毒载量组 26 例、小于检测限组 170 例。其中男性 136 例, 女性 152 例, 年龄 22~77 岁, 平均(49.1±13.4)岁。排除甲肝、乙肝、戊肝感染者, 排除酒精肝、脂肪肝及自身免疫性肝炎。另选取 20 例本院健康体检者作为正常对照组。

1.2 仪器与试剂 磁珠法试剂(B 试剂)购自湖南圣湘生物公司, 试剂批号 2013002, 内标批号 20121204, 试剂盒分有 4 个浓度的标准品 A、B、C、D, 最低检测限为(2.50E+01) IU/mL, 柱提取法试剂(A 试剂)购自国内某主流的生物工程有限公司, 试剂盒批号为 20130410, 内含有 4 个浓度的标准品, 最低检测限为(5.00E+02) IU/mL, 抗-HCV 检测试剂盒购自英科新创(厦门)科技有限公司, 试剂批号 201305806, ALT 试剂由贝克曼公司提供。美国应用生物系统公司生产的 ABI7300 型荧光定量分析仪, 美国 AU-680 全自动生化分析仪, 上海科华 ST-360 型酶标仪, 中科美菱 DW-HL668 型-80℃超低温冰箱, 所有操作均严格按说明书进行。

1.3 方法

1.3.1 磁珠法 在 1.5 mL 的灭菌离心管中, 加入 600 μ L 的

提取试剂 1 混合物、200 μ L 患者血清、100 μ L 提取试剂 2(充分混匀后吸取), 震荡混匀(10 s), 室温静置(30 min); 离心数秒后, 将离心管置于磁珠分离器(磁力架)上, 缓慢将溶液吸出(3 min 后), 注意不要碰到吸附于管壁的棕色物; 然后将 600 μ L RNA 提取溶液 3 和 200 μ L RNA 提取溶液 4 加入离心管中, 震荡混匀(约 5 s), 离心数秒后, 将离心管再次置于磁力架上; 3 min 后, 将吸头插入离心管底部, 从底部开始缓慢将液体完全丢弃, 将管底残余液体完全吸出丢弃(静置 1 min 后); 将 50 μ L PCR-mix 加入离心管中, 用吸头吸取 PCR-mix 洗脱吸附于离心管壁的棕色残留物, 然后将洗脱后的全部棕色混合液转移至 0.2 mL PCR 反应管中, 盖上管盖, 转移至扩增区上机检测。

1.3.2 柱提取法 在 0.5 mL 的灭菌离心管中, 加入 100 μ L 的裂解液、100 μ L 的患者血清、20 μ L 的去抑制剂, 盖上管盖, 震荡混匀, 离心数秒, 70℃反应(10 min); 离心数秒, 用带滤芯吸嘴加入无水乙醇 110 μ L, 震荡混匀, 离心数秒; 将离心管内的液体全部转移至核酸提取柱内, 开启负压, 让核酸提取柱内的液体全部抽干; 加入 500 μ L 的洗涤液 A, 负压抽干; 加入 500 μ L 的洗涤液 B, 负压抽干; 14 000 r/m 离心 1 min; 取下核酸提取柱, 放入新的 2 mL 的离心管中(确保采用无 RNA 酶的离心管), 加入 50 μ L 的洗脱液于核酸提取柱中央, 静置 1 min; 10 000 r/m 离心 1 min, 取收集液 12.5 μ L 用于 PCR 反应。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件进行 F 检验和 χ^2 检验。HCV RNA 检测结果经对数转换后检测结果对数值(Log10 IU/mL)用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本率的比较采用 χ^2 检验, 组间比较用配对样本 t 检验。

2 结 果

2.1 相关性分析 由于两种试剂盒的最低检测限不同, 柱提取法试剂最低检测限为(5.00E+02) IU/mL, 而磁珠法的最低检测限为(2.50 E+01) IU/mL, 因此研究者规定 HCV RNA 载量结果以大于(5.00E+02) IU/mL 为检测结果阳性。柱提取试剂检测 HCV RNA 载量阳性结果, 用单样本的 t 检验(数据经对数转换后分析), 其值为 $4.06 \pm 1.84, t=26.4$; 磁珠法试剂检测 HCV RNA 载量阳性结果, 用单样本的 t 检验(数据经对数转换后分析), 其值为 $4.01 \pm 2.27, t=24.1, P>0.05$ 。在 288 例样本中, 有 3 例柱提取法检测结果均小于(5.00E+02) IU/mL 的样本, 经磁珠法检测, 结果为阳性[大于(5.00E+02) IU/mL], 说明磁珠法检测灵敏度更高($P<0.01$)。研究者对

柱提取法试剂和磁珠法试剂检测病毒载量均大于(5.00E+02)IU/mL的结果,进行对数转换后做了相关性分析。回归方程 $Y=1.209\ 4X-1.711\ 3$,相关系数为 $r^2=0.958\ 3$ 。A试剂与B试剂定量结果散点图见图1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.2 两种方法试剂阴、阳性符合率 柱提取试剂检测HCV RNA载量阳性结果为117例,阳性率为40.63%(117/288),阴性率为59.37%(171/288);磁珠法试剂检测结果阳性标本120例,阳性率为41.67%(120/288),阴性率为58.33%(168/288)。阳性率的一致性为100%,阴性率的一致性为98.3%,总的一致性为99.0%。

2.3 两种核酸提取试剂定量检测结果比较 见表1。

表1 柱提取试剂与磁珠法试剂病毒载量分级检测结果

HCV RNA 载量(IU/mL)	柱提取试剂(n)	磁珠法试剂(n)	χ^2	P
1.00E+07~1.00E+08	33	28	0.29	0.59
1.00E+05~1.00E+06	58	60	0.01	0.92
5.00E+02~1.00E+04	26	32	0.48	0.49
<5.00E+02	171	168	0.03	0.87

2.4 病毒载量与ALT检测结果分析 见表2。

表2 血清ALT水平在不同载量组中的检测结果及异常率分析

组别	HCV RNA 载量(IU/mL)	ALT (IU/L)	IU/L 样本数(n)	ALT 异常率(%)
高病毒载量组	1.00E+07~1.00E+08	146.3±89.9*	34	47.1
中病毒载量组	1.00E+05~1.00E+06	158.3±119.5*	58	37.9
低病毒载量组	5.00E+02~1.00E+04	76.3±32.3*	26	30.8
小于检测限组	<5.00E+02	82.2±41.9*	170	12.9
正常对照组	—	22.7±6.5	20	0

*: $P<0.01$,与正常对照组比较;—:无数据。

3 讨 论

丙型肝炎是HCV引起的慢性肝损害,目前其具体的发病机制尚不明确。但最近研究表明,丙型肝炎发病的重要机制可能是免疫因素尤其是细胞免疫异常引起。丙型肝炎的发病过程中肝炎病毒感染使机体免疫系统活化,这些活化的细胞可与因肝炎病毒感染而改变肝细胞膜成分发生免疫应答,因而造成肝细胞的坏死和肝功能的改变^[8]。对于HCV RNA阳性的患者进行有效的抗病毒治疗是遏制疾病进展的关键,HCV RNA载量检测灵敏度和特异性高的方法有助于HCV的早期诊断,并对于抗病毒治疗效果的评价能过提供客观依据。

本研究结果显示,柱提取试剂检测HCV RNA载量阳性结果,用单样本的t检验统计分析(数据经对数转换后分析),其值为 4.06 ± 1.84 , $t=26.4$;磁珠法试剂检测HCV RNA载量阳性结果,用单样本的t检验统计分析(数据经对数转换后分析),其值为 4.01 ± 2.27 , $t=24.1$, $P>0.05$ 。在288例样本中,有3例柱提取法检测结果均小于5.00E+02 IU/mL的样本,经磁珠法检测,结果为阳性[大于(5.00E+02) IU/mL],说明磁珠法检测灵敏度更高。研究者对柱提取法试剂和磁珠法试剂检测病毒载量均大于(5.00E+02) IU/mL的结果,进行对数转换后做了相关性分析。回归方程为 $Y=1.209\ 4X-1.711\ 3$,相关系数为 $r^2=0.958\ 3$ 。柱提取试剂检测为阳性的样本117例,阳性率为40.63%(117/288),阴性率为59.37%

(171/288);磁珠法试剂检测结果阳性标本120例,阳性率为41.67%(120/288),阴性率为58.33%(168/288)。阳性率的一致性为100%,阴性率的一致性为98.3%,总的一致性为99.0%。

ALT存在于肝细胞的线粒体和胞质中,在丙型肝炎病毒损伤肝细胞时,通过细胞膜释放入外周血中,ALT是反映肝细胞损害和坏死的程度的直接证据。本研究还发现,在高病毒载量组、中病毒载量组、低病毒载量组和低于检测限组中血清ALT的水平与正常对照组比较,差异具有统计学意义($P<0.01$)。ALT水平与HCV RNA载量无相关性($P>0.05$),但ALT异常率与HCV RNA载量呈正相关,随着病毒载量的逐渐增高,ALT的异常率呈递增趋势。血清ALT是反映肝细胞损害的主要标志,ALT与HCV RNA载量之间无相关性,但抗-HCV阳性患者血清HCV RNA载量与ALT的异常率呈正相关,这与国内外报道一致^[9-10]。肝脏损伤的程度与机体的免疫功能 and 个体差异等因素有关,免疫系统越活跃肝脏损伤反而越重^[11]。HCV RNA载量不能反映肝脏的损伤程度和病毒状态,必须结合ALT水平系统了解肝脏的炎症状态和丙型肝炎病毒在体内的复制状况。

研究还发现,对HCV RNA水平进行分级发现,病毒载量在(1.00E+04)~(1.00E+07) IU/mL的样本,两种试剂的定量结果有很好的重复性和精密度;但对于(1.00E+03) IU/mL以下的样本,磁珠法的定量结果更加准确可靠,而柱提取法未能检出。在检测的288例临床样本中,对中、高病毒载量组两种核酸提取试剂定量结果基本一致($r=0.96$)。但对于低病毒载量组中,柱提取法有3例未检出,而磁珠法检测这3例丙型肝炎患者标本为阳性。

本研究采用磁珠法检测丙肝患者血清中HCV RNA载量,整个提取过程无需加热裂解,无需频繁更换离心管;简便、快速,提取的核酸纯度高并且无污染;核酸被吸附在磁珠上参与整个洗涤过程,从而去除大量的杂质,抗干扰能力强;磁珠法灵敏度更高,最低检测限为(2.50E+01) IU/mL,快速、易于自动化;PCR检测体系中含有阳性内对照(HCV内标),通过检测内标是否正常来监测待测样本中是否具有PCR抑制物,避免PCR假阴性。因此,在诊断治疗丙型肝炎时,磁珠法检测HCV RNA病毒载量依然占有无法替代的优势,具有较高的临床应用价值。

参考文献

[1] Pol S, Vallet-pichard A, Corouge M, et al. Hepatitis C: epidemiology, diagnosis, natural history and therapy[J]. Contrib Nephrol, 2012, 176(1): 1-9.

[2] Gonzalez SA, Keffe EB. Chronic viral hepatitis: epidemiology, molecular biology, and antiviral therapy[J]. Front Biosci, 2011, 16(1): 225-250.

[3] Rao HY, Sun DG, Yang RF, et al. Outcome of hepatitis C virus infection in Chinese paid plasma donors: a 12-19-year cohort study [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2012, 27(3): 526-532.

[4] 王剑, 金茜. 国产试剂与 Roche COBAS TaqMan 试剂对慢性丙型肝炎快速和早期病毒学应答的比较研究[J]. 传染病信息, 2012, 25(3): 177-179.

[5] 曹翠明, 王利丽. 丙型肝炎病毒抗体阳性者血清病毒载量与丙氨酸转氨酶相关性研究[J]. 社区医学杂志, 2013, 11(8): 37-39.

[6] 徐丹, 吴小宁. HCV RNA 定量检测试剂的临床应用[J]. 湖南师范大学学报: 医学版, 2012, 9(2): 83-87.

[7] 中华医学会肝病分会,中华医学会传染病与寄生虫病学会. 丙型肝炎防治指南[J]. 传染病信息, 2004, 17(1): 3-8.

[8] 张秀英,顾建文. 丙肝患者在治疗过程中血清 RNA 与抗 HCV 定量检测及其生化指标的相关性研究[J]. 现代诊断与治疗, 2013, 24(4): 728-731.

[9] 李颖,丁洋,王雪莲,等. 慢性丙型肝炎患者血清 HCV RNA, ALT 与肝脏病理间的关系[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(9): 916-919.

[10] Lee YS, Yoon SK, Chung ES, et al. The relationship of histological activity to serum ALT HCV genotype and HCV RNA titers in chronic hepatitis C[J]. J Korean Med Sci, 2001, 16(5): 585-591.

[11] 贾琨,邵芳. 抗-HCV 和 HCV-RNA 检测及其 ALT 的相关性分析[J]. 热带医学杂志, 2012, 12(4): 464-465.

(收稿日期:2014-02-15)

• 经验交流 •

超敏 C 反应蛋白检测对心脑血管病诊断的临床意义

李小毓

(河南省南阳市张仲景医院检验科,河南南阳 473000)

摘要:目的 探讨检测超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)对心脑血管病诊断的临床意义。方法 采用散射免疫比浊法检测脑血管病患者、心血管病患者和健康体检者 hs-CRP 的水平,并对患者治疗前后 hs-CRP 水平进行分析。结果 脑血管病患者的血清 hs-CRP(13.4 ± 3.52)mg/L 和心血管病患者的血清 hs-CRP(15.3 ± 3.46)mg/L 与正常对照组 hs-CRP(1.8 ± 1.13)mg/L 比较,差异有统计学意义($P<0.01$);各组患者治疗前后 hs-CRP 水平比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 血清 hs-CRP 水平的增高与冠心病的发生和发展显著相关,其可以作为临床诊断心脑血管疾病的一个重要参考指标。

关键词: 心血管病; 脑血管病; 超敏 C 反应蛋白
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.15.055 **文献标识码:**B **文章编号:**1673-4130(2014)15-2092-02

近年来,随着人口老龄化,心脑血管疾病的发病率呈逐年增长趋势,成为当今社会威胁人类健康的主要疾病之一。虽然心脑血管病的实验研究和临床诊断取得了一些进展,但其发病机制尚未完全清楚,目前还缺乏判断心脑血管病变的可靠性指标^[1]。文献[2-3]研究表明,心脑血管病的发生与持续存在的炎症刺激有关,炎症反应促进了心脑血管病的发生和发展。超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)是一种测量低水平炎症反应的有效方法。检测 hs-CRP 可预测心脑血管病患者病情的危险性。本研究旨在通过测定心脑血管病患者治疗前后的 hs-CRP 水平及正常对照组的 hs-CRP 水平,分析 hs-CRP 检测对心脑血管病临床诊断的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2009~2013 年本院住院和门诊血清检测 hs-CRP 异常的样本共 270 例,其中脑血管病组 143 例,分为脑梗死组 48 例,脑出血组 95 例;心血管病组 127 例,分为冠心病组 89 例,心肌梗死组 38 例。另选择本院接受健康体检人员 61 例作为正常对照组,其中男 29 例,女 32 例,平均(52 ± 7.8)岁,经体检无心脑血管、肿瘤、肝肾功能不全及其他感染性疾病等。

1.2 方法 采集脑梗死、脑出血、冠心病、和心肌梗死 4 组患者入院当日或次日空腹静脉血、治疗出院前静脉血,采集对照组体检日清晨空腹抽取的静脉血,分离血清,采用散射免疫比浊法检测各组的 hs-CRP 水平,使用德国 Nephstar™ 特定蛋白分析仪和配套试剂,正常参考范围为 0~3.0 mg/L。

1.3 统计学处理 应用 SPSS17.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。对 hs-CRP 与心脑血管病的相关性进行分析。

2 结果

2.1 检测结果 脑血管病组患者治疗前 hs-CRP(13.4 ± 3.52)mg/L、心血管病患者治疗前 hs-CRP(15.3 ± 3.46)mg/L 与正常对照组 hs-CRP(1.8 ± 1.13)mg/L 比较,差异有统计学

意义($P<0.01$)。各组患者治疗前后 hs-CRP 的变化情况见表 1。

表 1 各组患者治疗前后 hs-CRP 的变化情况				
组别	<i>n</i>	Hs-CRP(mg/L)		<i>P</i>
		治疗前	治疗后	
脑梗死组	48	11.6 ± 3.94	4.2 ± 2.03	<0.05
脑出血组	95	14.5 ± 3.16	3.7 ± 1.24	<0.01
冠心病组	89	13.3 ± 2.85	2.6 ± 1.36	<0.01
心肌梗死组	38	16.7 ± 4.08	4.5 ± 1.82	<0.01

2.2 hs-CRP 指标检测对心脑血管病的诊断价值 hs-CRP 显著升高对心血管病临床诊断敏感性为 63.17%,准确性 73.52%, $r=0.53$;hs-CRP 显著升高对脑血管病临床诊断敏感性为 71.03%,准确性 76.41%, $r=0.47$ 。

3 讨论

脑血管病是指脑血管破裂出血或血栓形成,引起的以脑部出血性或缺血性损伤症状为主要临床表现的一组疾病。心血管疾病是一系列涉及血液循环系统的疾病,循环系统主要包括心脏、血管(动脉、静脉、微血管)一般与动脉硬化有关。目前,关于心脑血管病的研究与临床治疗已取得了较大的进展,但其发病的机制尚未完全清楚,较多的研究认为炎症是导致心脑血管病发的机制之一。hs-CRP 作为心脑血管疾病的独立危险因子已经受到较广泛的关注,hs-CRP 刺激多种参与动脉粥样硬化形成的细胞因子分泌,和有关致炎因子结合后,可激活补体系统,促进单核细胞黏附和迁入内皮下层,形成巨噬细胞,促进巨噬细胞和分泌型平滑肌细胞大量摄入脂质,形成泡沫细胞,成为动脉粥样硬化的主要成分。单核细胞聚集作用,造成内皮损伤,放大炎症反应,从而启动凝血过程。流行病学调查也显示,hs-CRP 水平升高者脑梗死的几率是正常健康人的 2 倍,发生心肌梗死的几率是正常者的 3 倍。hs-CRP 检测能够测量低