

• 临床研究 •

HAV-RNA 与 HAV-IgM 检测结果的相关性分析

王海霞

(四川省成都市金牛区疾控中心检验科 610036)

摘要:**目的** 研究甲型肝炎病毒(HAV)感染者血清病毒甲型肝炎核糖核酸(HAV-RNA)与抗甲型肝炎病毒抗体(HAV-IgM)的关系,探讨本地区 HAV 感染的流行病学特征。**方法** 特异性 TaqMan 探针荧光定量 PCR 法检测 189 例 HAV 疑似感染者,比较不同病毒载量患者血清 HAV-IgM 阳性率,分析 RNA 病毒载量与 HAV-IgM 的相关性。**结果** HAV-RNA 与 HAV-IgM 阳性率呈正相关($r=0.923\ 2, P=0.025\ 2$);189 例 HAV 疑似感染者检出年份分布:2013 年检出 74 例(39.1%),2014 年检出 64 例(33.9%),2015 年检出 51 例(27.0%)。季节性分布:春季检出 43 例(22.8%),夏季检出 29 例(15.3%),秋季检出 63 例(33.3%),冬季检出 54 例(28.6%)。性别分布:男 125 例(66.1%),女 64 例(33.9%),男女比例 1.95:1。年龄分布:0~15 岁 78 例(41.3%),16~30 岁 36 例(19.1%),31~45 岁 29 例(15.3%),46~60 岁 24 例(12.7%),60 岁以上 22 例(11.6%)。**结论** 特异性 TaqMan 探针荧光定量 PCR 法检测 HAV 感染有重要的临床应用价值。

关键词:TaqMan 探针; 聚合酶链反应; 甲型肝炎病毒; 病毒载量; 血清学指标
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.10.058 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2017)10-1434-02

甲型肝炎病毒(HAV)为正链 RNA 病毒属微小 RNA 病毒科肝病属,可引发急性感染性肝炎,粪-口途径传播,呈全世界分布,暴发流行。近年随着公共卫生环境的管理及 HAV 灭活疫苗的使用,疫情已得到有效控制,但我国仍属 HAV 高发区域之一,HAV 感染常见显性感染以及隐性感染^[1]。特异性 TaqMan 探针荧光定量 PCR 法为一种结合分子标记、荧光共振能量转移的分子生物学检测技术,具有良好的灵敏度及特异性。本研究回顾性分析了本地区 2013 年 1 月至 2016 年 12 月间 189 例 HAV 疑似感染者资料,旨在探讨 HAV 感染者血清病毒甲型肝炎核糖核酸(HAV-RNA)与抗甲型肝炎病毒抗体(HAV-IgM)的关系,研究 HAV 感染流行病学资料,为 HAV 感染的防治提供研究资料。

1 资料与方法

1.1 一般资料 189 例 HAV 疑似感染者来源于 2013 年 1 月至 2016 年 1 月间本地区医院 HAV 感染上报资料,其中,男 108 例,女 81 例,年龄 13~46 岁,平均(28.6±4.2)岁,研究对象均排除乙型、丙型及戊型肝炎病毒复合感染。

1.2 方法 189 例研究对象清晨空腹取血行 HAV-RNA、HAV-IgM 检测,比较不同 HAV 病毒载量患者 HAV-IgM 阳性率,研究 HAV 病毒载量与 HAV-IgM 阳性率,并研究本地区 HAV 感染流行病学特征。

1.2.1 HAV-RNA 检测 HAV-RNA 检测采用特异性 Taq-Man 探针荧光定量 PCR 法,全自动基因扩增仪为 ABI7300(美国 ABI 公司),试剂使用中山大学达安基因有限公司产品,严格按试剂说明书操作,使用试剂盒自带标准与样本同批次扩增。反应条件:42℃ 30 min,95℃ 1 min,95℃ 10 s→55℃ 20 s→72℃ 30 s(5 个循环),95℃ 5 s→60℃ 30 s(40 个循环)。反应体系设置为 50 μL,HAV 上游引物序列为 5'-GAA GAG ATG CCT FGG ATA GGG TAA-3',下游引物序列为 5'-AAA ACC ATT CAA CGC CGG-3';探针序列为 5'-FAM-AGC GGC GGA TAT IGG TGA GTT GTT AAG AC-TAMRA-3'。根据标准扩增 Ct 值仪器生成标准曲线, $r>0.97$,样本根据标准曲线生成病毒载量结果,检出限 $<1\times 10^3$ U/L。

1.2.2 HAV-IgM 检测 HAV-IgM 检测采用 ELISA 法,酶

标仪为 MK3 型酶标仪,试剂购自北京现代高达生物技术有限责任公司,严格按试剂说明书操作,检测波长 450 nm,结果判定满足阳性对照吸光度(OD)值平均值大于 1.20,OD 值阴性对照平均值小于 0.10,且阳性、阴性对照 OD 值之差应大于 1.20,样品 OD ≥ 2.1 ,判断为阳性。

1.3 统计学处理 采用统计学软件 SPSS19.0 对数据进行分析处理,组间率的比较采用 χ^2 检验,相关性检验采用 Spearman 相关分析,以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 不同 HAV 病毒载量患者 HAV-IgM 阳性率 不同 HAV 病毒载量患者 HAV-IgM 阳性率,两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$),随着 HAV 病毒载量的升高,HAV-IgM 阳性率升高,相关性分析经 Spearman 等级相关分析,病毒载量与 HAV-IgM 阳性率呈正相关($r=0.923\ 2, P=0.025\ 2$),见表 1。

表 1 不同 HAV 病毒载量患者 HAV-IgM 阳性率

病毒载量(U/L)	<i>n</i>	HAV-IgM 阳性(<i>n</i>)	HAV-IgM 阳性率(%)
$<10^3$	25	0	0.0
$10^3\sim 10^4$	35	21	60.0
$>10^4\sim 10^5$	39	29	74.4
$>10^5\sim 10^6$	46	40	87.0
$>10^6\sim 10^7$	24	23	95.8
$>10^7$	20	20	100.0

2.2 189 例疑似 HAV 感染患者流行病学特征 189 例疑似 HAV 感染患者检出年份分布:2013 年检出 74 例(39.1%),2014 年检出 64 例(33.9%),2015 年检出 51 例(27.0%)。检出季节性分布:春季检出 43 例(22.8%),夏季检出 29 例(15.3%),秋季检出 63 例(33.3%),冬季检出 54 例(28.6%)。性别分布:男 125 例(66.1%),女 64 例(33.9%),男女比例 1.95:1。年龄分布:0~15 岁 78 例(41.3%),16~30 岁 36 例(19.1%),31~45 岁 29 例(15.3%),46~60 岁 24 例

(12.7%), 60 岁以上 22 例(11.6%)。

3 讨 论

甲型肝炎为 HAV 引起的肠道传染病, HAV 为嗜肝 RNA 病毒属, 经粪-口途径传播, 以儿童及青少年高发, 但成人的临床症状相对更为严重。据统计资料显示, 每年我国甲型肝炎的发病率高达 21.4/100 000, 占病毒性肝炎的 50% 左右, 在感染各类肝炎病毒中位居首位^[2-3]。HAV 感染大多表现为亚临床或隐性感染, 仅少数人表现为急性甲型肝炎, 一般潜伏期 2~7 周, 排毒期可达 5 周, 该疾病具有自愈性, 多数患者可数周内痊愈。人类对 HAV 普遍易感, 既往临床对于该疾病重视程度相对不够, 极易造成甲型肝炎的暴发性流行。HAV 寄生于细胞内繁殖, 具有嗜肝性特征, 侵犯的主要器官为肝脏, 其引起肝细胞损伤的机制目前尚未明确, 部分学者认为, HAV 并不直接引起肝细胞病变, 机体肝脏损害主要为 HAV 感染肝细胞的免疫病理反应所引起的^[4-5]。

HAV 早期诊断对甲型肝炎的防治尤为重要, 血清学指标诊断在临床应用较为广泛, HAV-IgM 检测多采用 ELISA 法, 其在感染早期产生, 为新近感染的证据, 也是早期诊断甲型肝炎最简便而可靠的血清学标志^[6]。特异性 TaqMan 探针荧光定量 PCR 法为近年发展较快的一种分子诊断方法, 为病原学诊断检测病毒 RNA, 为 HAV 感染直接的病原学证据。其通过荧光染料或荧光标记的特异性 TaqMan 探针, 对 PCR 产物进行标记跟踪, 实时在线监控反应过程, 实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步而达到定量功能。本研究对两种方法检测结果进行了比较, 在研究中随 HAV 病毒载量的升高, HAV-IgM 阳性率出现了升高, 两者呈正相关($r=0.923\ 2$, $P=0.025\ 2$), HAV 感染人体后, 可出现抗 HAV-IgM、抗 HAV-IgA、抗 HAV-IgG 3 种抗体。其中抗 HAV-IgM 和抗 HAV-IgA 出现较早, 抗 HAV-IgG 出现较晚, 对于 HAV 多为急性感染, 抗 HAV-IgM 出现时间与 HAV-RNA 检出的时间相对于其他抗体更为接近, 临床上检出抗 HAV-IgM 是 HAV 早期感染的依据。数据说明病毒血症患者的荧光定量 PCR 法检测结果与 HAV-IgM 抗体 ELISA 检测结果具有较强的一致性, 荧光定量 PCR 法更为敏感。数据显示, 荧光定量 PCR 法检测阳性患者, HAV-IgM 阳性患者均低于特异性 TaqMan 探针荧光定量 PCR 法检测结果。分析可能原因: 其一, HAV-IgM 抗体的存在一般持续 8~12 周, 窗口期 HAV-IgM 检测可为阴性, 荧光定量 PCR 法检测可较好地避免窗口期的假阳性出现^[7-8]; 其二, 感染 HAV 发生变异, 或患者免疫力低下, 血清 HAV-IgM 浓度低于检测下限^[9]。

根据流行病学的最新调查结果, 目前, 甲型肝炎的流行模式在我国有了明显变化, 发病率和感染率逐年下降, 流行周期和季节性日趋不明显, 感染年龄和高发年龄出现后移^[10]。本地区 2013—2016 年上送的 189 例疑似 HAV 感染病例分布呈现逐年降低趋势, 这与甲型肝炎疫苗的临床广泛应用有关。研究发现, 即使在暴露于 HAV 或密切接触甲型肝炎患者的 1 周内接种, 疫苗仍能提供保护, 甲型肝炎疫苗能快速阻断已发生的甲型肝炎暴发流行^[11]。随着灭活甲型肝炎疫苗在全世界的应用, 甲型肝炎的流行已得到有效的控制。本地区甲型肝炎感染季节分布以春、秋、冬季多见, 甲型肝炎流行性与病毒在环境

中的存活能力相关, 尤其在低温环境下 HAV 在水生贝类里能存活 3 个月左右, 有研究显示, 吃生贝类为引起甲型肝炎暴发性流行的独立危险因素^[12]。本研究数据显示, 男性检出率高于女性, 儿童检出率高于其他年龄段人群。对于甲型肝炎流行的阻断传染源的控制尤为重要, 急性患者应消化道隔离至病后 3 周。托幼机构的患者须隔离至肝功能正常, 病原学标志阴性。患者的粪便及排泄物应严格消毒, 搞好环境卫生加强水源卫生管理。

综上所述, 特异性 TaqMan 探针荧光定量 PCR 法具有高度的敏感性, 特异性 TaqMan 探针荧光定量 PCR 法检测 HAV-RNA 有重要的临床应用价值。

参考文献

- [1] 刘燕敏, 陈园生, 崔富强, 等. 中国 2004—2009 年甲型病毒性肝炎流行病学特征分析[J]. 中国疫苗和免疫, 2010, 16(5): 453-456.
- [2] 张磊, 鲁淑婷, 李玉龙, 等. 甲型肝炎病毒和戊型肝炎病毒双重荧光定量 PCR 方法的建立及应用[J]. 中国实验诊断学, 2015, 19(12): 2063-2066.
- [3] 龙润乡, 杨蓉, 李华, 等. 两种甲型肝炎病毒抗原快速检测方法的建立[J]. 微生物学免疫学进展, 2013, 41(1): 39-41.
- [4] Franco E, Meleleo C, Serino L, et al. Hepatitis A: Epidemiology and prevention in developing countries[J]. World J Hepatol, 2012, 4(3): 68-73.
- [5] 张爱民, 辛绍杰. 病毒感染与肝功能衰竭[J]. 临床肝胆病杂志, 2012, 28(10): 729-731.
- [6] Zaratti L, Meleleo C, Serino L, et al. Epidemiology and prevention of hepatitis A and B in developing countries [J]. Igiene E Sanità Pubblica, 2011, 67(1): 119-128.
- [7] 孔祥沙, 季颖, 张海莹, 等. 甲型肝炎病毒抗体室内质控血清制备及评价[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(12): 1146-1147.
- [8] 金燕萍, 贾莉, 部小霞, 等. 微粒子酶联免疫分析法与化学发光微粒子免疫法在检测甲肝病毒抗体 IgM 中的比较[J]. 现代检验医学杂志, 2010, 25(1): 56-57.
- [9] Hyun JJ, Seo YS, An H, et al. Optimal time for repeating the IgM anti-hepatitis A virus antibody test in acute hepatitis A patients with a negative initial test[J]. Korean J Hepatol, 2012, 18(1): 56-62.
- [10] 姚科, 余芳雪, 李黎, 等. 甲肝免疫策略长期效果预测研究[J]. 四川大学学报(医学版), 2012, 43(2): 200-205.
- [11] 秦莎莎, 廖贵蓉, 裴小琴, 等. 我国甲肝免疫水平现状分析—基于多水平 Meta 分析结果[J]. 现代预防医学, 2010; 37(6): 1020-1022.
- [12] 刘燕敏, 陈园生, 崔富强, 等. 中国 2004—2009 年甲型病毒性肝炎流行病学特征分析[J]. 中国疫苗和免疫, 2010, 16(5): 453-455.