

HCV 抗体阳性样品核酸及核心抗原检测分析

龙润乡 杨 蓉 白慧珠 李 华 王晶晶 廖 芸 谭振国 谢忠平

摘 要 目的 对 90 份临床检测为丙型肝炎病毒抗体(HCV - Ab)阳性样品检测其核心抗原(HCV - cAg)、荧光定量 PCR, 观察 3 者间的相关性。**方法** 采集临床诊断为 HCV - Ab 阳性样品 90 份, 分别用市售的 HCV - cAg 检测试剂盒、荧光定量 PCR 检测试剂盒、HCV - Ab 检测试剂盒进行 3 种指标的检测复核。**结果** 90 份临床 HCV - Ab 阳性样品, 检出 HCV - cAg 阳性 25 份(27.8%), 荧光定量 PCR 检出 67 份阳性(74.4%), 抗体复核阳性的 75 份(83.33%); 检出率 HCV - Ab(83.33%) > 荧光定量(74.4%) > HCV - cAg(27.8%)。**结论** 丙肝的 3 种标志物之间存在一定的联系, 但不同试剂的检测结果间存在明显差异。

关键词 丙型肝炎病毒核心抗原 丙型肝炎病毒核酸 丙型肝炎病毒抗体 检测

HCV RNA and Core Antigen (HCV - cAg) Analysis in HCV - Ab Positive Samples. Long Runxiang, Yang Rong, Bai Huizhu, et al. Institute of Medical Biology Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Yunnan 650118, China

Abstract Objective Clinical samples of 90 confirmed HCV - Ab positive cases were detected for core antigen (HCV - cAg) and HCV RNA by fluorescence quantitative PCR (FQ - PCR), and the relativity of the three was observed. **Methods** 90 samples diagnosed as HCV - Ab positive cases were collected, and the three indicators was detected and rechecked with HCV - cAg ELISA kit, HCV - Ab ELISA Kit and quantitative hepatitis C virus(HCV) PCR Fluorescence Diagnostic kit for sale in market separately. **Results** Among 90 clinical samples of HCV - Ab positive cases, HCV - cAg was positive in 25 cases (27.8%), FQ - PCR was positive in 67 cases (74.4%), and antibody rechecking was positive in 75 cases (83.33%). As regards to the positive rate, HCV - Ab was the highest and florescence quantitative took the second place, and HCV - cAg was the lowest. **Conclusion** It had some relations among the three makers of HCV, but there were significant differences in detection results of different agents.

Key words HCV core antigen (HCV - cAg); HCV - RNA; HCV - Ab; Detection

丙型肝炎病毒感染的常规诊断指标有 HCV - Ag、HCV - Ab、核酸等, 核酸检测是目前能最早检测出丙肝病毒的方法, 其次是抗原, 再是抗体。但由于丙型肝炎病毒感染早期血液中病毒含量较少, RT - PCR 虽然检测灵敏度较高, 但价格昂贵, 操作繁琐, 对样本要求高。因此, 目前临床上主要以抗体作为感染的主要检测指标, 再辅助 RT - PCR 复核。HCV - Ab 检测试剂已经发展到第 3 代, 包被重组抗原多达 4 种, 检测灵敏度较前两代提高, 方法也较成熟。而 HCV - Ag 检测, 则有两种方法: 一为 HCV 核心抗原检测, 如美国强生公司、湖南景达等, 均已上市销售; 另有报道的多表位 HCV - Ag 检测试剂盒, 目前正在研究间段^[1,2]。本试验通过对 90 份临床特别采集的抗体阳性样品分别用核心抗原检测试剂盒、核酸荧光

定量检测试剂盒及另一抗体检测试剂盒进行复核检测, 对市售的 3 种 HCV 标志物(核心抗原、抗体、核酸)检测试剂在实际应用中的相互关系报道如下:

材料与方法

1. 血清来源: HAV - Ab 阳性血清来自昆明医学院第一附属医院、昆明医学院第二附属医院和云南省第一人民医院, 为临床 HCV - Ab 检测阳性样品, 留样收集。

2. 试剂: (1) 丙型肝炎病毒核酸扩增荧光定量检测试剂盒: 深圳匹基公司, 批号: 20080702。(2) 丙型肝炎病毒核心抗原检测试剂盒(ELISA 法): 市售国产(湖南景达)丙型肝炎病毒核心抗原检测试剂盒, 批号: 20081001, 试剂盒为使用两株抗丙型肝炎病毒核心抗原(HCV - cAg)的单克隆抗体包被酶标板、另 2 株单克隆抗体标记辣根过氧化物酶建立的 ELISA 检测法。(3) 英科新创 HCV - Ab 检测试剂, 批号: 2008075808。

3. 方法: (1) 荧光定量 PCR 检测: 按说明书操作, 用样品裂解液试剂盒处理完毕样品后用 ABI7500 荧光 PCR 仪器进行 RT - PCR 反应, 反应条件 42℃ 30min; 95℃ 30min; 95℃ 10s, 55℃ 30s, 72℃ 60s, 5 个循环; 95℃ 5s, 60℃ 30s, 40 个循环。反应体系为 50μl。1~4 定量标准曲线拟和度大于 0.98, 阴阳性对照符合要求时试验成立且定量结果有效。(2) 丙型

基金项目: 国家“863”资助项目(2007AA02Z480); 云南省联合支持国家计划资助项目(2008GA008)

作者单位: 650118 昆明, 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所

通讯作者: 谢忠平, 电子信箱: XZP218@126.com

肝炎病毒核心抗原检测:将样品及试剂盒于室温平衡 30min 后进行试验,在酶标板中每孔加入样品稀释液 100μl,再加入 100μl 样品;分别加入阴、阳性对照各两孔,100 微升/孔,设空白孔 1 孔,加入 200μl 样品稀释液,37℃90min;洗板 5 次,加入酶结合物 200μl,37℃30min,TMB 37℃显色 10min,终止液终止反应,450nm 测定 OD 值。CUTOFF 值计算:阴性对照平均值 + 0.06(阴性对照 OD 值 ≤ 0.06 时按 0.06 计算),大于 CUTOFF 值的为阳性。(3)HCV Ab 复核:将 90 份医院检测 HCVAb 阳性血清用英科新创 HCV - Ab 检测试剂进行复核,将样品及试剂盒于室温平衡 30min 后进行试验,在酶标板中每孔加入样品稀释液 100μl,再加入 10μl 样品同时设阴、阳性对照各两孔,37℃25min;洗板 5 次,加入酶结合物 100μl,37℃25min;洗板 5 次,加入显色液 37℃显色 10min,终止液终止反应,450/630nm 双波长测定 OD 值。CUTOFF 值计算:阴性对照平均值 × 2.8(阴性对照 OD 值 ≤ 0.05 时按 0.05 计算),样品 OD 值 S/CO ≥ 1 者为 HCV 抗体反应阳性,反之则为阴性。

表 1 90 份临床 HCV - Ab 阳性血清 HCV 核酸、核心抗原及抗体复检结果比较 [n(%)]

复核结果 复核方法	HCV RT - PCR				合计
	> 10 ⁴	10 ³ ~ 10 ⁴	< 10 ³	阴性	
HCV RT - PCR	53(58.9)	14(15.5)	16(17.8)	7(7.8)	90
HCV - cAg +	23(25.6)	2(2.2)	0	0	25(27.8)
HCV - Ab 复检 +	35(38.9)	24(26.7)	11(12.2)	5(5.6)	75(83.33)

4. 15 份抗体复核阴性的样品中,PCR 检测阳性 8 份,核心抗原检测全阴,见表 2。核心抗原阳性样品的抗体检测平均 OD 为 2.62,检测 A 值期间在 1.02 ~ 3.24。结果显示临床和复核用试剂的两种抗体检测试剂之间存在一定差异。

表 2 15 份临床抗体阳性复核抗体阴性样品与 RT - PCR 及 HCV - cAg 之间的关系

复核方法	复核结果		合计
	阳性	阴性	
RT - PCR	8	7	15
HCV - cAg	0	15	

5. 23 份 RT - PCR 阴性样品中的其他指标复核结果见表 3。从表 3 中可以看出在 RT - PCR 阴性的 23 份样品中仍有 16 份是抗体复核阳性,另外 7 份虽

表 3 23 份 RT - PCR 阴性样品中 HCV 抗体及 HCV 核心抗原复核检测结果

复核方法	复核结果		合计
	阳性	阴性	
HCV - Ab	16	7	23
HCV - cAg	0	23	

结 果

1. 90 份 HCV - Ab 抗体阳性样品,荧光定量 PCR 检测 10³ 以上(阳性)67 份(74.4%),10⁴ 以上(强阳性)53 份(58.9%),可疑跟踪样品 16 份(17.8%),阴性 7 份(7.8%),出现核酸循环的占总数的 92.2%。

2. 用 HCV - cAg 检测试剂盒检测 90 份样品,检出核心抗原阳性 25 份,为 27.8%。核心抗原检测 A 值区间在 0.129 ~ 0.816,阳性平均 OD 在 0.313,以弱阳性居多。

3. 90 份医院临床抗体阳性血清用英科新创的 HCV 抗体检测试剂进行复核,其中 75 份复核抗体阳性,平均 OD 值在 2.34,检测 A 值期间在 0.025 ~ 3.624。3 种指标复核结果与核酸检测区间分布如表 1 所示。

然抗体复核阴性,但临床检测也为抗体阳性,鉴于核酸检测的灵敏度和操作的复杂性,抗体阳性而核酸检测阴性的原因应为操作和样本保存的原因导致。

6. 65 份核心抗原阴性样品中其他两项指标复核结果见表 4。在 65 份核心抗原阴性的样品中,抗体复核阳性的 50 份,核酸复核阳性的有 42 份,即绝大部分 HCV 感染阳性未能检出,原因不明,也可能与试剂盒灵敏度有关或与试剂盒只检核心抗原有关。

表 4 65 份核心抗原阴性样品中抗体及 RT - PCR 复核检测结果

复核方法	复核结果		合计
	阳性	阴性	
HCV - Ab	50	15	65
RT - PCR	42	23	65

7. 3 种标志物在抗体 S/CO 值区间分布情况见表 5。90 份样品抗体检测强阳性的有 60 份(S/CO ≥ 10),同时在强阳性部分中包含了大部分的核心抗原阳性样品和核酸阳性样品,提示三者的关联明显。

表 5 90 份临床抗体阳性血清抗体复核 S/CO 值与其他检测指标的区间分布关系

检测指标	S/CO				合计
	≥10	≥5	≥1	<1	
HCV - Ab	60	4	11	15	90
HCV - cAg +	24	1	0	0	25
RT - PCR +	53	3	3	8	67

讨 论

90 份临床 HCV - Ab 阳性血清,用市售 HCV - Ab 检测试剂盒进行复核,75 份复核阳性,占总样品量的 83.33%;但在抗体复核阴性的 15 份样品中有 8 份核酸检测阳性,结果提示在市售的 HCV 抗体检测试剂盒之间存在一定的差异,可能是各厂家使用的包被和酶标抗体不同造成的。如果只使用抗体检测试剂盒进行诊断,需要两个厂家的试剂互相映证。根据荧光定量 PCR 结果判定标准,当检测样品中 HCV RNA $\geq 1.0 \times 10^3$ U/ml,可按测得值报告相应效价,我们视为阳性。当检测样品中 HCV RNA $< 1.0 \times 10^3$ U/ml 时,表明病毒载量较低,该病毒效价仅供考,应对此标本谨慎跟踪,我们视为可疑。HCV RNA 为 0 时,为阴性。90 份 HCV - Ab 阳性血清样品,用荧光定量 PCR 复核阳性 67 份(74.4%),可疑 16 份(17.8%),出现核酸扩增循环的 83 份,占总样品量的 92.2%,阴性 7 份(7.8%)。在 15 份抗体复核阴性的样品有 8 份核酸阳性,而在 75 份抗体复核阳性的样品中仍然有 16 份核酸检测阴性或可疑,结果提示两种检测方法之间存在一定的互补关系。荧光定量 PCR 可疑样品中存在大量抗体阳性样品,提示我们对荧光定量低循环(HCV RNA $< 1.0 \times 10^3$ U/ml)的标本跟踪是有意义的。HCV 核心抗原试剂盒检测 90 份临床 HCV - Ab 阳性血清,核心抗原阳性样品为 25 份,荧光定量 PCR 复核为阳性;25 份核心抗原阳性样品的 S/CO 均大于 5,在抗体强阳性区域,显示试剂盒特异性较好。在抗体,核酸阴性样品中均未有核心抗原检出,相反在核心抗原阴性的样本中有大量的核酸、抗体阳性存在,在 3 种标志物检测试剂中,核心抗原的阳性检出率最低。

本次试验样品均为 HCV - Ab 阳性样品,我们设定其为丙肝感染,理论上丙肝抗原检测和核酸检测都应阳性,实际检测结果为,荧光定量 PCR 阳性 67 份,出现核酸扩增循环的占总样品量的 83 份,核心抗原阳性 25 份;抗体复核阳性 75 份,检测阳性率抗体

>核酸>核心抗原。核酸阳性检出率高但并不与抗体完全吻合,分析原因可能有:由于本次试验样品在本所核酸检测前至少经过了 2 次冻融,在医院时期的冻融次数不明,虽然我们有 5 次冻融样品核酸检测阳性的记录,但开盖次数增加,带入 RNA 降解物的概率就增加,也有可能导致荧光定量低循环或假阴性的结果^[3]。在核酸检测过程中,通过 RNA 的提取、扩增过程,已经充分去除了抗体的影响,因此 HCV - Ab 的存在对核酸检测影响不大。而在采用 ELISA 法的核心抗原检测试剂在 HCV - Ab 阳性样品中,核心抗原检出率明显较低,25 份核心抗原阳性样品均在抗体强阳性区域,证明抗体对其影响不大,应与试剂盒灵敏度或与试剂盒只检核心抗原有关。

目前已发文献多以 HCV 抗原检测阳性后用 RT - PCR 复核,或再进行抗体跟踪检测来进行抗原检测试剂盒的检测效果评价,3 者符合率都较高。而本试验因使用样品的不同,角度不同而有不同分析,HCV 抗体是在丙型肝炎病毒感染一定时间后才能测到,存在窗口期^[4-6]。核酸检测的优势是在于窗口期的抗原检出,有利于早期诊断,由于本次试验样品采用的是抗体阳性样品,加做其他检测。抗原检测试剂盒及核酸检测的窗口期诊断优势未体现出来。综上所述,在丙型肝炎病毒感染的临床诊断中,既要考虑抗体检测试剂存在较长窗口区,用核酸检测试剂进行诊断以防漏诊,同时还要考虑由于样本和操作的因素影响核酸结果,需用 HCV 抗体检测试剂进行复检。在应用诊断试剂盒进行丙肝临床诊断时,需要考虑至少两种方法联合检测,才不会造成漏诊。

参考文献

- 1 谢忠平,龙润乡,宋霞,等.抗 - HCV 多表位抗体在检测 HCV 抗原中的应用中国生物制品学杂志,2006,19(4):411 - 413
- 2 谢忠平,崔萍芳,宋霞,等.利用 HCV 多表位复合抗原制备高效价抗体中国生物制品学杂志,2005,18(4):313 - 315
- 3 龙润乡,谢忠平,李华,等.丙型肝炎病毒三种标志物的稳定型.中国生物制品学杂志,2009,22(5):468 - 469
- 4 杨秀华,黄山,邓小林,等.HCV 核心抗原检测技术的临床应用 实用医技杂志,2008,15(18):2334 - 2336
- 5 陈建明,樊斌,蔡丹,等.丙型肝炎病毒核酸、核心抗原和抗体联合检测的临床意义.中国医疗前沿,2008,3(15):89 - 90
- 6 张贺秋,李少波,刘劭钢,等.血清转换样本丙型肝炎病毒核酸、核心抗原及抗体检测对比研究.中国输血杂志,2006,19(3):177 - 180

(收稿:2010 - 07 - 13)