

HCV 核心抗原测定用于丙型肝炎 早期诊断临床价值的评估

洪俊¹ 饶永彩² 李艳¹

¹ 武汉大学人民医院检验科 武汉 430060

² 武汉生物制品研究所 武汉 430060

摘要 目的:评估 HCV 核心抗原 ELISA 测定法用于 HCV 早期诊断的临床价值。方法:采用 HCV 抗体、HC-cAg 测定法及荧光定量 PCR 对 1 948 份未感染 HCV 阴性血样(1 500 份供血者的血样、400 份体检的血样及 48 份非 HCV 患者血样)进行了 HCV 血清学及分子生物学检测。结果:对非 HCV 感染标本测定结果表明,1 500 份血库标本中有 8 份在初次 HCV 核心抗原测定时出现阳性(0.53%) 400 份体检血样 HCV 核心抗原测定结果全阴;48 例住院非 HCV 患者 HCV 核心抗原检测结果只有 1 例阳性(2.08%),上述抗原阳性血样的 HCV PCR 均为阴性,特异性为 99.94%;我们对 96 份 HCV 感染的血样(55 例来自我院传染科 HCV 患者病人;41 份来自 9 套 HCV 血清 panel)进行了 HCV 核心抗原测定及 HCVRNA 测定,结果表明有 91 份 HCV 核心抗原测定阳性,敏感性为 94.79%;对 9 套 HCV 血清 panel 测定结果表明,与 Anti-HCV 方法相比,HCV 抗原测定及 HCV 荧光定量 PCR 都能显著地将 HCV 窗口期平均缩短至 36 天;方法内及方间精密度的 CV 值均小于 10%;结论:HCV 核心抗原 ELISA 测定法具有与传统 HCV-RT-PCR 相比的高度敏感性 & 特异性,可以明显的缩短 HCV 早期感染窗口期;它应用将会显著地降低 HCV 感染。

关键词 肝炎病毒,丙型;核心抗原;聚合酶链反应

中图分类号 R987.7 文献标识码 A 文章编号 1671-8852(2005)01-0000-00

Clinical Value of HCV Core Antigen Enzyme Immunoassay in Early Diagnosis

Hong Jun, Rao Yongcai, Li Yan, et al

Department of Clinical Lab, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China

Abstract

Objective: To assess the performance of a newly developed ELISA for the detection of HCV core antigen and its suitability for use in the screening of blood units in order to identify infecting samples that do not contain specific antibodies. **Methods:** 1 500 sera from blood donors, 400 general population samples, 48 patient samples (without HCV infection), 55 HCV patient samples (HCV RNA-positive, and anti-HCV-negative), 3 natural seroconversion panels, and 6 commercial seroconversion panels were tested with HCV IgG anti-body test, core antigen test and RNA PCR test. **Results:** Eight (0.53%) blood donor samples, 0(0%) general population samples, and 1 (2.08%) patient samples (without HCV infection) were initially reactive; 1 sera samples was positive on repetition. These 9 samples tested by reverse transcription-PCR were negative. The specificity and sensitivity of HCV core antigen test were 99.94% and 94.79%. The reduction in diagnostic window period resulting from use of HCV Core antigen test and RNA PCR in

课题来源:

作者简介:洪俊,男,1973~,医学硕士生,主要从事临床免疫学及肝炎病毒方面的研究

the 9 panels was equal on average to 36 days. The intra- and inter-assay precision of HCV core antigen assay was less than 10%. **Conclusion:** The HCV core antigen assay showed high sensitivity and specificity and could obviously reduce the windows period of HCV.

Key Words hepatitis C virus; core antigen; polymerase chain reaction

临床上诊断 HCV 感染主要依赖 HCV 抗体测定法^[1];但由于体内抗体产生周期长达数月^[4];处在窗口期 HCV 患者是丙型肝炎传播的重要来源^[2,5]。虽然,PCR 等技术能有效 HCV 携带者窗口期^[6],但该技术存在着操作复杂、费用昂贵等问题^[7],显然目前,PCR 不适用于 HCV 普查。HCV 核心抗原是由 HCV 基因组保守序列 C 区部分编码而来,近年来研究表明:在丙肝患者中 HCV 核心抗原的出现与 HCV RNA 水平具有良好的相关性^[3];因此,HCV 核心抗原的测定是当前用于 HCV 早期诊断比较理想方法。目前,检测 HCV 核心抗原,在国内临床上实际应用还比较少,缺乏相关的应用数据;本研究目的就是评估 HCV 核心抗原测定用于 HCV 早期诊断的特异性、敏感性以及在缩短 HCV 窗口期诊断时间上的可行性及临床价值;为该方法用于临床提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 血清学检测方法 HCV 核心抗原测定系统采用的是美国 Ortho Diagnostics 公司的 HCV 核心蛋白 ELISA 试剂盒^[3],其反应原理是采用的双抗体夹心法;;具体操作方法见 Ortho Diagnostics 试剂盒说明;结果判断:反应结束后用酶联免疫测定仪于 492nm 波长处读取测定孔的 OD 值;;凡测定标本 OD 值小于临界值(CO)的为阴性($CO = 0.04 + 3$ 个阴性对照孔 OD 均值);OD 在 $80\% \times$ 临界值(CO)~ $1 \times$ 临界值(CO)之间为可疑;OD 在 $120\% \times$ 临界值~ $1 \times$ 临界值为弱阳性,OD 大于 $120\% \times$ 临界值为强阳性。HCV 抗体(IgG)测定系统采用的是北京万泰药业公司及深圳月亮弯公司的 HCV 抗体 ELISA 试剂盒,具体操做方法见试剂盒说明。

1.2 分子生物学检测方法 HCV RNA 的检测采用的是瑞士 Roche 公司 LightCycler 荧光定量 PCR 仪及其相应试剂盒,其测定最大灵敏度为 500 拷贝/ml,结果判断, $>1 \times 10^3$ 为阳性, $<1 \times 10^3$ 为阴性;具体操作见试剂合说明。

1.3 采用质控品对 HCV 抗体和 RNA 测定进行质量控制 (质控品均来源于卫生部临检中心的 HCV 质控血清)。

1.4 血样 未感染 HCV 血样:2001 年 8 月~2001 年 10 月间我院血库供血样 1 500 份;2002 年 3 月~9 月间我院的体检人群血样 400 份;以及 2001 年 9 月~2002 年 11 月于我院住院的非 HCV 患者血样 48 份,(其中 5 例为 HAV 抗体阳性,20 例为 HBV 抗原阳性,8 例为自身免疫性肝炎;4 例为 HBV 抗原及 HDV 抗体阳性;6 例 RF 因子阳性,5 例抗核抗体阳性)。HCV 感染血样:55 例 2001 年 7 月~2002 年 10 月我院传染科住院 HCV 患者(HCV RNA 定量 PCR 阳性、抗 HCV 阴性血样);9 套 HCV 血清 panel(每套 panel 包含从 HCV RNA,到 anti-HCV 阳性的系列血样),其中商业途径获得有 6 套(6227, 6225, 9041 购自 bioclinical Partners; PHV903, 904, 919 购自 Boston Biomedica;),自己收集 3 套(N01、N02、N03;采集自我院 HCV 患者)。

1.5 实验的设计及结果的分析

1.5.1 特异性评估 为评估 HCV 核心抗原测定方法的特异性,我们对 1 948 份未感染 HCV 阴性血样(1 500 份血库供血者的血样、400 份我院体检的血样及 48 份非 HCV 患者血样)进行了 HCV 血清学及分子生物学检测;首先采用两种 ELISA 方法对 HCV 抗体进行了测定,所有标本全部阴性;然后将上述标本全部进行 HCV 核心抗原测定,凡初次阳性的标本再复查一次;并用定量 PCR 进行确证。

1.5.2 敏感性及 HCV 早期诊断应用价值评估 我们应用 HCV 核心抗原测定方法及 HCV 荧光定量 PCR 对 55 例我院传染科住院病人(HCV 定量 PCR 阳性、抗 HCV 阴性血样)及 9 套 HCV 血清 panel 进行了测定。

1.5.3 核心抗原方法内及方法间精密度评估

1.5.3.1 方法内精密度评估 选取 HCV 感染血清中 HCV 核心抗原测定结果强阳性的标本 A(S/CO = 1.8),进行 HCV 抗原检测,10 孔/次;结果以 S/CO 值表示,计算其均数及 CV 值。

1.5.3.2 方法间精密度评估 选取两份 HCV 感染血清中 HCV 核心抗原测定结果强阳性的标本 A(与方法内精密度测定使用的血清相同),B(B 血清为重新选取的 HCV 核心抗原强反应血样 S/CO = 3);对上述血清分别进行 5 次 HCV 抗原重复检测,

2 孔/每次;上述结果以 S/CO 值表示,并计算其均数及 CV 值。

1.6 统计学方法采用 SAS 分析软件计算均数和 CV 值,并参考特异性和敏感性公式计算特异性和敏感性,以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 特异性 表 1、表 2 表明 1 500 份血库标本中有 8 份在初次 HCV 核心抗原测定时出现阳性(0.53%)其中弱阳性标本 3 份;S/CO 值的分布表明;在 1 500 份血样中有 1492 份 HCV 核心抗原阴性,S/CO 值小于 0.5 有 1 467 份(98.32%);S/CO 值在 0.5~ 0.79 之间的有 21 份(1.4%),S/CO 值在 0.8

~ 0.99 的有 4 份(0.27%),对 8 例初次阳性反应的标本进行 HCV 核心抗原复查,结果表明有 1 例阳性(0.07%),用 HCV RT-PCR 对上述 8 例标本进行确证,结果全为阴性。400 份体检血样 HCV 核心抗原测定结果全阴,S/CO 值均小于 0.5;其 HCV RT-PCR 均为阴性;48 例住院非 HCV 患者 HCV 核心抗原检测结果只有 1 例阳性(2.08%),该标本复查后 S/CO 小于 0.5;HCV RT-PCR 确证结果为阴性。

表 1 特异性评估中的 HCV 核心抗原测定结果(%)

样本	HCV 核心抗原初次	复查阳	HCV RT-
	检阳性查结果	性结果	PCR 阳性结果
血库血样(1 500 份)	8(0.53%)	1(0.07%)	0
体检血样(400)	0	0	0
住院病人血样(48)	1(2.08%)	0	0

表 2 特异性评估中的 HCV 核心抗原初次测定结果 S/CO 值分布表(%)

样本	HCV 核心抗原初次检阴性查果		可疑结果	弱阳性结果	强阳性结果
	<0.5	0.5~ 0.79	0.8~ 0.99	1~ 1.2	>1.2
血库血样(1 500 份)	1467(98.32%)	21(1.4%)	4(0.27%)	3(0.2%)	5(0.33%)
体检血样(400)	400(100%)	0	0	0	0
住院病人血样(48)	47(97.92%)	0	0	1(2.08%)	0

2.2 敏感性 55 例我院传染科 HCV 患者血样(HCV 定量 PCR 阳性、抗 HCV 阴性血样)HCV 核心抗原测定结果中,有 52 例出现阳性(94.55%),S/CO 值均大于 1.2;有 3 例(P01、P02、P03)出现阴性,其中有一例结果在可疑范围内(具体结果见表 3),复查后 S/CO 值小于 0.5;

(见表 4);9 套血清中有 7 套 HCV 血清 panel 的 HCV-核心抗原,HCV-RNA 初次出现阳性结果时间完全一致;有 2 套不一致,编号 N03 血清 panel 的 HCV RNA 血清初次阳性结果时间比 HCV-核心抗原结果提前 3 d,编号 6227 商业血清 panel 的 HCV RNA 血清初次阳性结果时间比 HCV-核心抗原结果提前 1 d.应用 HCV-核心抗原与 HCV-RNA 测定分别使 HCV 窗口期缩短的平均时间分别是 35.8(21~ 78) d 和 36.6(22~ 78) d;上述 9 套血清 panel 中总共有 41 份 HCVRNA 阳性,抗 HCV 抗体阴性血清,其中 39 份 HCV 核心抗原测定阳性(95.12%)。

表 3 55 例传染科 HCV 患者血样中 3 例 HCV 核心抗原检测结果阴性样本的 S/CO 值及 HCVRNA 拷贝数

样本	S/CO 值	RNA(拷贝/ml)
P01	0.27	0.1× 10 ³
P02	0.12	ND*
P03	0.87	0.9× 10 ³

* ND= 未检测到 HCV 血清 panel 的 HCV-核心抗原,HCV-RNA 及抗 HCV 抗体测定结果表明

表 4 HCV-核心抗原、HCV-RNA、ANTI-HCV 检测在缩短 HCV 窗口期的时间对比表

血清 panel	采用以下方法检测结果初次阳性的时间(Days)			核心抗原测定使 HCV 窗口期缩短的时间(Days)	荧光定量 PCR 使 HCV 窗口期缩短的时间(Days)
	HCV 核心抗原测定	HCV 荧光定量 PCR	Anti-HCV-test		
No1	0	0	34	34	34
N02	35	35	67	32	32
N03	56	53	88	32	35
6227	17	16	38	21	22
6225	13	13	47	34	34
9041	23	23	62	39	39
PHV903	73	73	105	32	32
PHV904	3	0	23	20	23
PHV919	18	18	96	78	78

2.4 方法内及方间精密度 如表 5 所示方法内及方法间离散指数 CV 值均小于 10%。

表 5 方法内及方法间精密度评结果

血清	方法内精密度		方法间精密度	
	S/CO 均值及范围	% CV	S/CO 均值及范围	% CV
A	1.83(1.47~ 2.01)	9.1	2.15(1.84~ 2.31)	9.9
B			2.98(2.75~ 3.49)	9.3

3 讨论

20 世纪 90 年代以来,临床上诊断 HCV 感染主要利用基因工程表达 HCV 抗原构成的 ELISA 法来测定抗 HCV 抗体;但由于 HCV 感染患者体内抗 HCV 抗体的产生需一定的时间周期,此时间在普通人最长可至 2 个月,免疫缺陷患者则可高达 12 个月^[4],此间,HCV 病毒可大量存在于病毒携带者的外周血中而不被查觉,因此,处在窗口期的 HCV 患者是目前输血性肝炎传播的一个重要来源^[5]。虽然,一些分子生物学技术如 RT-PCR、bDNA-PCR 能有效地将 HCV 携带者的窗口期缩短至 15 到 20 d^[6],然而上述技术存在着操作复杂、对人员及设备要求高及费用昂贵等问题^[7],在现阶段,PCR 不适用于 HCV 普查,因此,当前急需一种,简单快捷、费用低、具有高度敏感及特异性的方法用于 HCV 抗体阴性的血源筛查。

HCV 核心抗原测定是近年来国际上出现的一种新的测定方法,国外的研资料表明它与 HCVRNA 存在着很好的相关性,可用于 HCV 早期诊断^[3],但国内对于该法的应用还处于初始阶段,缺乏支持这种方大规模应用的较为完整临床实验数据还比较,因此,在国内对该法的临床应用价值作了全面考查.以为临床应用提供完整的实验依据。

特异性,对 1 948(1 500 + 400 + 48)例非 HCV 感染的血样的测定表明,在非 HCV 标本中有 1 946 例 HCV 核心抗原结果阴性(99.94%),有 9 份的血样出现阳性(0.46%), 特异性为 99.94%;完全达到目前公认的一些用于筛查输血感染疾病 ELISA 方法的要求^[8,9];对 9 份血 HCV 核心抗原阳性的血样进行 HCV 核心抗原复查及 HCV 荧光定量 PCR 测定,结果 HCV 核心抗原复查仍有 1 份血样为阳性;而 HCV 荧光定量 PCR 结果均为阴性;分析原因可能是 HCV 核心抗原测定假阳性,及 PCR 的假阴性所致(血样中 HCVRNA 低于 500 拷贝);此外,在核心抗原方法测定阴性的结果中有 1 914 份(98.35%)血样 S/CO 小于 0.5,仅有 4 例(2.05%)结果出现可疑范围;显示出良好的结果判别能力。

在敏感性,我们对 96 份 HCV 感染的血样

(HCV 定量 PCR 阳性、抗 HCV 抗体阴性,55 例来自我院传染科 HCV 患者病人;41 份来自 9 套 HCV 血清 panel)进行了 HCV 核心抗原测定及 HCVRNA 测定,结果表明有 91 份 HCV 核心抗原测定阳性,敏感性为 94.79%,1 份结果可凝(1.04%);对 9 套 HCV 血清 panel 测定,结果表明,与抗 HCV 抗体方法相比,HCV 抗原测定及 HCV 荧光定量 PCR 都能显著地将 HCV 窗口期平均缩短至 36 d(HCV 核心抗原测定:35.8 d; HCV-RT-PCR:36.6 d);本研究结果显示 HCV-核心抗原 ELISA 方法的敏感性达到 PCR 方法的水平。

在综上所述,HCcAg ELISA 测定法具高度敏感性 & 特异性,可以明显缩短 HCV 窗口期,适用于 HCV 普查。

参考文献

1 郝飞,余宙耀.丙型肝炎的基础与临床.北京:人民卫生出版社,1998,241~ 248

2 Van der Poel C L. Hepatitis C virus and blood transfusion: past and present risk. J Hepatol, 1999,31:101

3 Nubling CM, Unger G, Chudy M, et al. Sensitivity of HCV core antigen and HCV RNA detection in the early infection phase. Transfusion, 2002,42(8):1 037

4 Van der Poel CL, Cuypers HT, Reesink HW. Hepatitis C virus six years on. Lancet,1994,344:1 475

5 Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ. The risk of trasfusion trasmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study N Engl J Med, 1996, 334:1 685

6 Muller-Breitkreutz K, Baylis SA, Allain J. Nucleic acid amplification tests for the detection of blood-borne viruses. Vox Sang, 1999,76: 194

7 Poljak M, Seme K, Koren S. Evaluation of the automated hepatitis C virus PCR system. J Clin Microbiol, 1997,35:2 983~ 2 988

8 Decker RH, Zuckermann AJ, Thomas HC. Viral hepatitis: Scientific basis and clinical management. New York : Churchill Livingstone, 1993,165~ 184

9 World Health Organization. Operational characteristics of commercially available assays to determine antibodies to HIV-1 and/or HIV-2 in human sera Report 3 Global Programme on AIDS/RES/DIA/91. 1. Geneva: WHO, 1991,356~ 358

