

· 临床论著 ·

维持性血液透析患者 HCV 检测方法的比较

龚燕飞 刘湘林 彭华

【摘要】 目的 探讨维持性血液透析(HD)患者丙型肝炎病毒(HCV)的检测方法。**方法** 对108例HD患者,采用荧光定量PCR法测定血清HCV RNA,用酶联免疫吸附实验(ELISA)检测血清HCV抗体(抗-HCV)和HCV核心抗原(HCV-cAg),并同时检测丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST),计算其变动率。**结果** HD患者荧光定量PCR HCV RNA检出率为33.3%(36/108),抗-HCV阳性率为32.4%(35/108),HCV-cAg阳性率为26.9%(29/108),HCV标志阳性患者中仅4例ALT和AST均升高。在抗-HCV阳性患者中,HCV RNA检出率为82.9%(29/35);在抗-HCV阴性患者中,HCV RNA检出率为9.6%(7/73);在HCV RNA阴性患者中,抗-HCV阳性率为8.3%(6/72),两者符合率为88%[(29+66)/108];在HCV RNA阳性患者中HCV-cAg检出率为80.6%(29/36)。**结论** ALT不能作为血液透析患者HCV诊断和反映病情的一项敏感指标,荧光定量PCR技术可弥补ELISA检测的不足,在抗-HCV阴性的血液透析患者中检测HCV RNA具有重要意义,对监测无症状的HCV携带者或新发现的感染者,应用ELISA法检测HCV-cAg将是有意义的发展方向。

【关键词】 血液透析;荧光定量PCR;丙型肝炎病毒RNA;丙型肝炎病毒核心抗原

Comparison on the detection of HCV in maintenance haemodialysis patients
GONG Yan-fei, LIU Xiang-lin, PENG Hua. The First People's Hospital of Yueyang, 414000 Yueyang, China

Corresponding author: GONG Yan-fei, Email: xinlv001@sina.com

【Abstract】 Objective To study the detection of HCV in maintenance haemodialysis (HD) patients. **Methods** Sera of 108 HD patients were tested for the level of HCV RNA by amplisensor quantitative PCR, anti-HCV and HCV-cAg detected by ELISA, ALT and AST at the same time. **Results** Positive rates of HCV RNA, anti-HCV and HCV-cAg were 33.3% (36/108), 32.4% (35/108) and 26.9% (29/108), respectively. Only 4 patients' level of ALT and AST were both high in HCV RNA or anti-HCV positive patients. Positive rates of HCV RNA in anti-HCV positive and negative patients were 82.9% (29/35) and 9.6% (7/73), respectively. Of anti-HCV negative patients, positive rate of HCV RNA was 9.6% (7/73); Of HCV

作者单位:414000 岳阳市,岳阳市第一人民医院

通讯作者:龚燕飞 Email: xinlv001@sina.com

RNA negative patients, positive rate of anti-HCV was 8.3% (6/72), the coincidence rate of two methods is 88% [(29 + 66)/108]; Of HCV RNA positive patients, positive rate of HCV-cAg was 80.6% (29/36). **Conclusions** ALT was not a sensitive marker to diagnose and reflect a state of chronic hemodialytic patients. Amplisensor quantitative PCR could make up the weakness of ELISA. It is necessary to detect HCV RNA in anti-HCV negative HD patients. For monitoring the new discoverable infection and asymptomatic taker, HCV-cAg detection by ELISA is a good developing orientation.

【Key words】 Haemodialysis; Amplisensor quantitative PCR; HCV RNA; HCV-cAg

许多研究表明, HCV 已成为急、慢性肝炎的主要病因, 是世界上非甲非乙型肝炎中肠道外传播最常见的病原体, 也是在透析单位中的一个常见问题^[1-3], 有医源性传染的可能^[4,5], 与其他 RNA 病毒一样, HCV 基因丰富的异质体导致病毒复制时容易发生突变, 使先前产生的抗原难以辨别变异的抗原, 这种遗传变异机制使感染持续存在。随着血源管理的加强, 促 RBC 生成素的广泛应用, HCV 感染有所下降。但根据多中心调查显示, 发达国家 HD 患者 HCV 感染率仍然很高^[6-10]。中国大陆地区报道的血液透析患者抗-HCV 阳性率为 25% ~ 80% 不等, 如何对该群体采用必要的预防措施, 减少 HCV 传播的机会具有重要的现实意义。本研究采用荧光定量 PCR, ELISA 检测血液透析患者 HCV 病毒标志, 以便为该群体 HCV 感染定期监测以及早期诊断提供科学依据。

材料与方法

一、研究对象

选择维持性血液透析患者共 108 例, 其中男 61 例, 女 47 例, 平均年龄 (49 ± 11.64) 岁。原发疾病: 慢性肾小球肾炎 44 例 (40.74%), 糖尿病肾病 27 例 (25%), 高血压肾病 25 例 (23.15%), 中毒性肾病 6 例 (5.56%), 间质性肾炎 3 例 (2.78%), 原因不详 3 例 (2.78%)。每例均在血液透析前采血, 分离血清后 -20℃ 保存, 在同一条件下集中检测。

二、研究方法

1. 转氨酶检测: 血液离心后, 在 OLYPUS-640 全自动生化分析仪上进行检测, 所用试剂由湖南永和阳光试剂公司提供。

2. HCV RNA 检测: 采用荧光定量方法, PCR 仪器型号为 ABI 7000, 试剂由上海科华生物技术工程公司提供, 具体操作按说明书上进行。

3. 抗-HCV 检测: 采用第三代抗-HCV ELISA 检测试剂盒, 试剂由北京万泰生物工程公司提供, 具体操作按说明书上进行。

4. HCV-cAg 检测: 试剂由强生公司提供。采用 ELISA 技术, 应用包被在酶标板固相载体上的单克隆抗体捕获待测样本中的 HCV 抗原, 然后再加入与包被抗

体识别不同抗原表位的辣根过氧化物酶标记的不同株单克隆抗体检测,反应流程:在已包被好的酶标板微孔中加入 100 μ l 待测样本及 100 μ l 样本稀释液,37℃振荡(700 r/min)孵育 90 min,洗板后加入 200 μ l 酶标记物,37℃孵育 30 min,再次洗板后加入 200 μ l 的 OPD 底物缓冲液,室温 25℃显色 30 min 后加入 50 μ l 的 2 mol/L 硫酸终止反应,在 490 nm 波长(参考波长为 610 nm)下比色测定各孔的 A 值,初检阳性的标本,双孔复检后仍为阳性者,用 HCV 核心抗原中和试剂确认。

结 果

一、HD 患者 HCV 感染率及酶学指征

108 例 HD 患者,HCV 感染标志阳性率为 38.95% (42/108),其中抗-HCV 阳性者 35 例,HCV RNA 阳性者 36 例。42 例 HCV 感染标志阳性者中,有 4 例 ALT 和 AST 值均升高,酶学指征变动率为 9.5% (4/42)。

二、两组患者 ALT 和 AST 比较

HCV 标志物阳性者为丙型肝炎组(42 例),阴性者为阴性组(66 例),比较结果见表 1。

表 1 HD 患者 ALT 和 AST 比较[例(%)]

组别	ALT 增高	AST 增高
丙型肝炎组	11(26.2)	4(9.5)
阴性组	2(3.0)	0(0.0)

注:与阴性组相比, $P < 0.05$

三、血液透析患者抗-HCV, HCV-cAg 和 HCV RNA 检出率

108 例血液透析患者,HCV 抗体阳性 35 例,阳性率为 32.4%; HCV-cAg 阳性 29 例,阳性率为 26.9%; 荧光定量 PCR 法检出 HCV RNA 36 例,检出率为 33.3%。

四、血液透析患者抗-HCV 和 HCV RNA 检测一致性分析

在抗-HCV 阳性患者中,病毒血症发生率为 82.9% (29/35),抗-HCV 阴性患者中,病毒血症发生率为 9.6% (7/73),在 HCV RNA 阴性患者中,抗-HCV 阳性率为 8.35% (6/72),两种方法检测结果符合率为 88% [(29+66)/108]。

五、血液透析患者 HCV-cAg 和 HCV RNA 检测一致性分析

在 HCV RNA 检测阳性患者中,HCV-cAg 检出率为 80.6% (29/36)。

讨 论

许多血液透析的 HCV 感染者,ALT 检测的敏感性和特异性都较差^[11],如尿毒症患者 ALT 水平较非尿毒症者低,合并 HCV 感染后升高的 ALT 经抵消仍在正常范围;慢性丙型肝炎患者有一个 ALT 多峰谷的波动过程,HCV 感染者可能 ALT 水平正常,HCV 病毒可能在肝外部位复制;透析患者 ALT 基线水平较低,用正常人的标准不能判断其升高;此外,在血液透析患者中因为药物或并发症也会经常出现 ALT 升高。本实验中血液透析患者感染丙型肝炎后对肝功能有明显影响,

但42例HCV感染标志阳性患者中仅4例ALT和AST值均升高,酶学指征变动率为9.5%,这一结果表明:ALT不能作为血液透析患者HCV诊断和反映病情的一项敏感指标。汪年松等^[12]的Logistic回归分析表明ALT增高仅可作为预测HCV感染的重要指标。

目前,HCV感染诊断主要依据抗-HCV和HCV RNA两类检测系统,抗-HCV是诊断丙型肝炎的主要病原学指标。用第三代方法检测抗-HCV敏感性和特异性均大于90%,从HCV感染到血清学转化仅需7~8周^[13]。本研究抗-HCV阳性患者中,HCV RNA检出率为82.9%,但在抗-HCV阴性的患者中,病毒血症的发生率达9.6%,可能原因是:(1)抗-HCV试剂不够敏感或特异性不强,不能检测出低滴度抗体或与所用合成肽抗原不符的抗体;(2)各种疾病或药物的免疫作用,能抑制或改变抗-HCV反应,如肾移植后免疫抑制剂可抑制抗体滴度,延缓血清学转化,选择用抗-HCV抗体来诊断HCV感染有20%的漏诊率;(3)患者可能处于“窗口期”;(4)尽管有HCV RNA存在,抗-HCV持续存在一定时间后,可能消失;(5)HCV RNA可在血液透析患者的外周血单核细胞中检测到,而血清中无抗-HCV。此外,抗-HCV不能区别现症感染或既往感染。因此,抗-HCV检测系统有一定的局限性。

HCV RNA反映病毒复制与传染性,为病毒血症的标志,是诊断HCV最直接的证据。本研究108例HD患者中,抗-HCV阳性率与HCV RNA定量PCR检出率一致性达88%,其中也检测到6例抗-HCV阳性患者,HCV RNA为阴性。其原因可能是:(1)HCV RNA数量低于检测限;(2)病毒血症可能是间断性的,HCV RNA在检测时未出现在血浆中;(3)HCV RNA消失后抗-HCV持续存在;(4)因输血被动获得抗-HCV;(5)因非特异性反应而产生的假阳性结果。目前美国疾病预防控制中心(CDC)建议,血液透析室常规的HCV监测是检测抗-HCV,对于无其他病因的血清转氨酶AST和ALT持续升高而抗-HCV阴性的血液透析患者,HCV RNA的检测也是必要的。

最新的早期检测HCV感染的突破,是在抗体出现以前检测HCV核心抗原,本研究中采用ELISA方法检测血清中HCV-cAg,检出率为26.9%,与HCV RNA符合率达80.6%。这一结果表明:用ELISA法检测HCV-cAg,此法较PCR法简单,敏感性、特异性及窗口期与PCR法相当,因此对监测无症状的HCV携带者或新发现的感染者,应用ELISA法检测HCV-cAg将是有意义的发展方向。

参 考 文 献

- 1 Scotto G, Avcella F, Panunzio M, et al. Hepatitis C virus infection in four haemodialysis units of southern Italy: epidemiological report. *Eur J Epidemiol*, 1999, 15: 217-223.
- 2 Katsoulidou A, Paraskevis D, Kalapothaki V, et al. Molecular epidemiology of a hepatitis C virus outbreak in a haemodialysis unit. Multicentre Haemodialysis Cohort Study on Viral Hepatitis. *Nephrol Dial Transplant*, 1999, 14: 1188-1194.
- 3 Cerrai T, Michelassi S, Ierpi C, et al. Universal precautions and dedicated machines as cheap and effective measures to control HCV spread. *EDTA ERCA J*, 1998, 24: 43-45, 48.

- 4 Bruchfeld A, Stähle L, Andersson J, et al. Ribavirin treatment in dialysis patients with chronic hepatitis C virus infection-a pilot study. *J Viral Hepat*, 2001, 8: 287-292.
- 5 Agarwal SK, Dash SC, Irshad M, et al. Impact of hepatitis C virus infection on renal transplant outcome in India-a single centre study. *J Assoc Physicians India*, 2000, 48: 1155-1159.
- 6 Lombardi M, Cerrai T, Geatti S, et al. Results of a national epidemiological investigation on HCV infection among dialysis patients. *J Nephrol*, 1999, 12: 322-327.
- 7 Saab S, Martin P, Brezina M, et al. Serum alanine aminotransferase in hepatitis C screening of patients on hemodialysis. *Am J Kidney Dis*, 2001, 37: 308-315.
- 8 Schneeberger PM, Keur I, van Loon AM, et al. The prevalence and incidence of hepatitis C virus infections among dialysis patients in the Netherlands: a nationwide prospective study. *J Infect Dis*, 2000, 182: 1291-1299.
- 9 Petrosillo N, Gilli P, Serraino D, et al. Prevalence of infected patients and understaffing have a role in hepatitis C virus transmission in dialysis. *Am J Kidney Dis*, 2001, 37: 1004-1010.
- 10 Salama G, Rostaing L, Sandres K, et al. Hepatitis C virus infection in French hemodialysis units: a multicenter study. *J Med Virol*, 2000, 61: 44-51.
- 11 Saab S, Brezina M, Gitnick G, et al. Hepatitis C screening strategies in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*, 2001, 38: 91-97.
- 12 汪年松, 竺艳娟, 周水森, 等. 血液透析患者感染丙型肝炎病毒因素的 Logistic 回归分析. *中华医院感染学杂志*, 2002, 12: 169-171.
- 13 Neng Lai K. Hepatitis C infection screening in hemodialysis units. *Am J Kidney Dis*, 2001, 38: 186-188.

(收稿日期: 2008-05-11)

(本文编辑: 王丹静)

龚燕飞, 刘湘林, 彭华. 维持性血液透析患者 HCV 检测方法的比较 [J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2008, 2(4): 309-313.