

致 力 于 人 类 的 健 康 与 幸 福

第 05 期
2017/06

华医通讯

www.hybiome.com

丙型肝炎病毒血清标志物

Serological Markers for Hepatitis
C Virus Infection



丙型肝炎病毒

1989 年，美国学者 Choo 等首次从非甲非乙肝患者中发现病毒，后命名为丙型肝炎病毒（Hepatitis C Virus, HCV），归类于黄病毒科、肝病毒属。丙型肝炎病毒是第一个在没有看到病毒颗粒的条件下确认的人类病毒。

HCV 主要经血液传播，可引起急慢性病毒性肝炎、慢性肝炎迁延不愈，常导致慢性进行性肝病，包括肝硬化、甚至肝癌。近年发现 HCV 除侵袭肝脏外，还会感染各种肝外组织和器官。目前全球约有 1.7 亿人感染 HCV，WHO 最近预测的全球 HCV 感染率约为 2%，中国有近 4 千万 HCV 感染者，感染率接近 3.2%（图 1）。未来 20 年内与 HCV 感染相关的死亡率（肝衰竭及肝细胞癌导致的死亡）将继续增加，对患者的健康和生命危害极大，已成为严重的社会和公共卫生问题。

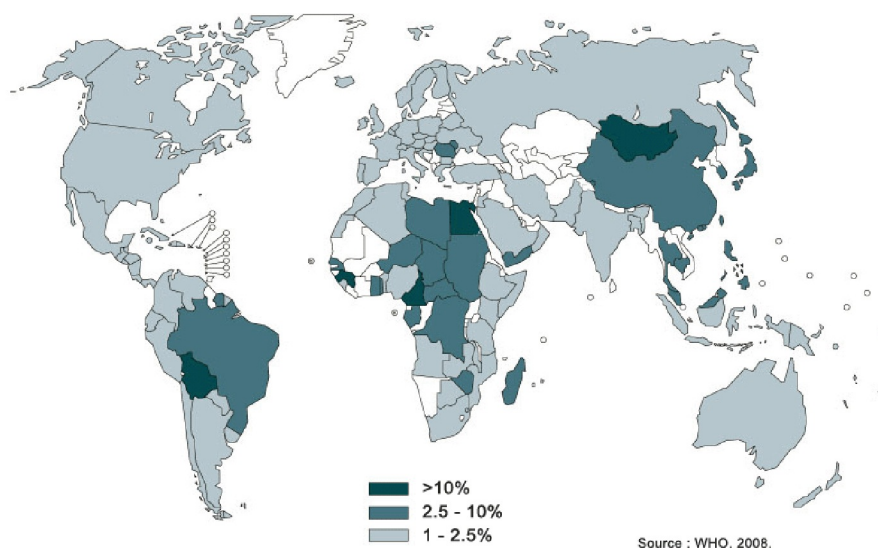


图1. HCV感染全球分布图

HCV 的生物学特征

HCV 为单股正链 RNA 病毒，直径小于 80nm（在肝细胞中为 36~40nm，在血液中为 36~62nm）（图 2）。HCV 病毒颗粒呈球形，在核衣壳外包绕含脂质的囊膜，囊膜上有刺突。HCV 主要有 6 种基因型和超过 50 种基因亚型，中国主要亚型为 1b 和 2a。HCV 仅有 Huh7、Huh7.5 和 Huh7.5.1 三种体外细胞培养系统^[1]，其病毒的载体只有人和黑猩猩。

HCV-RNA 大约有 9.6kb (图 2), 5'非编码区下游紧接一开放读码框架 (ORF), 其中基因组排列顺序为 5'-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4-NS5-3'^[2], 能编码一长度大约为 3014 个氨基酸的多聚蛋白前体, 后者可经宿主细胞和病毒自身蛋白酶作用裂解成 10 种病毒蛋白, 包括三种结构蛋白核心蛋白 Core 和糖蛋白 E1 和 E2, p7 编码一种膜内在蛋白, 其功能可能是一种离子通道。非结构蛋白部分则包括 NS2, NS3, NS4A, NS5A 和 NS5B, 对病毒的生活周期非常重要。

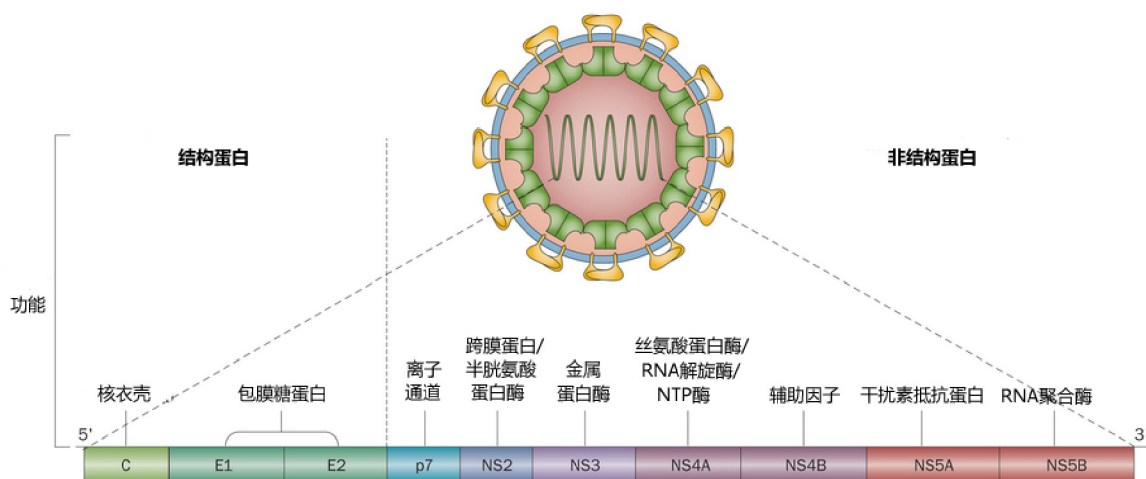


图2. HCV病毒及基因组示意图^[2]

HCV 生活史

细胞表面受体复合物与 HCV 结合并介导其进入受体细胞。在胞质, HCV 基因组 RNA 作为模板转录出病毒的前体多肽, 前体多肽经减切加工形成成熟的结构蛋白 (Core、E1 和 E2) 和功能蛋白 (NS2-NS5B)。随后在位于胞质核周网膜上的膜相关复制复合物的作用下, RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (NS5B) 进行 HCV 基因组的复制。子代基因组与结构蛋白组装形成 HCV 颗粒并随后被释放到胞外 (图 3) ^[3]。

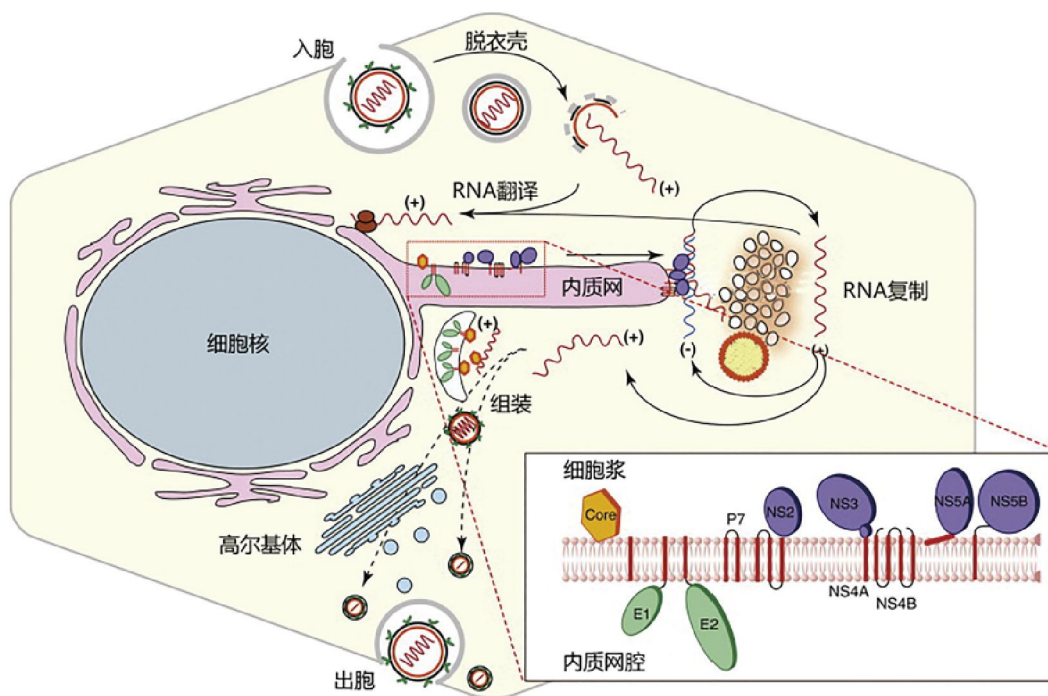


图3. HCV生命周期^[3]

HCV感染的实验诊断

目前用于 HCV 感染的实验室检测有如下三种：

HCV-RNA 检测技术：属于 HCV 的确认试验。但因 HCV 为 RNA 病毒，标本处理比较繁琐；核酸检测技术要求较高，极易造成实验室污染；实验设备以及试剂成本高昂，对实验室条件及操作人员水平要求极其严格。

HCV-Ag 检测技术：是近期刚出现的检测技术，检测 HCV 特异性抗原，可以将 HCV 检测的窗口期提前。但目前技术仍不成熟，临床应用较少。

抗-HCV 检测技术：是最早建立，也是目前临床应用最广泛的技术。临床检测主要是采用酶联免疫法、金标法、化学发光法等。根据检测使用抗原的情况，又可将抗-HCV 的检测试剂分为三代：

第一代：1989年，Chiron公司首先采用的重组表达的抗原C100用作包被原，建立了抗-HCV的检测方法，即抗-HCV IgG检测的第一代试剂盒。所用的抗原C100-3是HCV 非结构区（NS3、NS4）和人超氧化物歧化酶基因嵌合表达的融合蛋白，C100-3抗原-抗体系统只代表整个HCV抗原抗体的一部分，因此敏感性和特异性均不高，但它的使用使HCV的输血感染率下降了80%以上。

第二代：第二代试剂除上述C100抗原外又加入了HCV核心区多肽C22和非结构区抗原C33。抗-C22和抗-C33感染后出现较早（比抗C100-3早出现30-90天）^[4]，且对HCV的特异性好。与第一代试剂盒相比，第二代试剂盒对HCV抗体的检出率高20%以上，慢性肝炎的检出率高10%左右。

第三代：第三代试剂盒核心区抗原比例相对下降，非结构区的C33抗原比例相应增加，添加了NS5区抗原，可检出单独NS5抗体阳性者，使得试剂盒检测更灵敏、更特异^[5]。目前临床使用的基本都是第三代试剂。

抗-HCV检测试剂的检测原理

由于标记技术的限制，目前市场上的抗-HCV试剂主要采用间接法的原理：第一步采用捕获抗原与标本反应，如果标本中含有抗-HCV，将形成抗原抗体免疫复合物，这一步反应属于HCV特异性免疫反应；第二步，清洗后加入标记的抗人IgG抗体作为检测抗体与捕获的抗-HCV进行反应，检出标本中的抗-HCV，此步反应是HCV非特异的反应。

随着标记技术的创新，已经可以对HCV抗原进行标记，制备HCV检测抗原，现在抗-HCV双抗原夹心法的试剂已经上市。对于双抗原夹心法检测抗-HCV，捕获抗原和检测抗原与抗-HCV的反应均为特异性反应，明显提高了检测的特异性；双抗原夹心法检测的是HCV的IgG、IgM总抗体，提高了检测灵敏度，缩短了窗口期，有利于早期诊断。

免疫印迹试验是抗-HCV检测的确认试验（补充试验），由Chiron公司创立的RIBA法是抗-HCV检测的确认方法。该方法是将HCV重组的抗原转移到硝酸纤维素膜上，通过抗原和抗体的特异性结合反应检测血清中的抗HCV的抗体。该方法可以同时检测出血清中针对HCV不同抗原的抗体，提高了检测的特异性。



间接法检测抗-HCV 假阳性率高问题一直比较突出，美国疾病控制预防中心（CDC）的研究表明获美国 FDA 批准的 Abbott HCV EIA2.0 及 Ortho HCV 3.0EIA 在抗-HCV 阳性率 < 10% 的各类人群中（包括献血者），假阳性率平均为 35%^[6]。因此，美国 CDC 曾于 1998 年建议：抗-HCV 筛查阳性结果需进一步采用补充试验证实后方可报告。

- ◎ 高 IgG 血症：当血清中含有高浓度的非特异性 IgG 时，非特异性 IgG 吸附到固相载体上或包被的抗原上造成假阳性；
- ◎ 类风湿因子的干扰：类风湿性关节炎患者血清或血浆中的类风湿因子为巨球蛋白 IgM，可非特异性地吸附到固相载体上或包被的抗原上造成假阳性；
- ◎ 超氧化物歧化酶 (SOD) 的干扰：第一代 EIA 试剂所含的重组基因片段 C-100 为酵母菌产生的 SOD 融合蛋白，标本中 SOD 升高会造成抗-HCV 假阳性结果；
- ◎ 用于试剂制备的 HCV 抗原不纯^[7-8]：用于生产抗-HCV 的 HCV 抗原主要有 HCV 核心区、NS3、NS4 及 NS5 区蛋白，均为基因工程产物，如果抗原不纯，可产生非特异性反应。

临床诊断相关的检测策略及结果报告

《丙型肝炎病毒实验室检测技术规范（试行）》（2011.9.20）规定：

用筛查试剂进行初筛，结果呈阴性反应，报告“抗-HCV 阴性”；结果呈阳性反应，不能出具阳性报告，必须进入复检试验。对初筛呈阳性反应的样品用原有试剂双孔或原有试剂加另一种不同原理（或厂家）试剂进行复检试验，如均呈阴性反应，报告“抗-HCV 阴性”；如均呈阳性反应或一阴一阳反应，进行补充试验。临床诊断筛查检测流程见图 4。

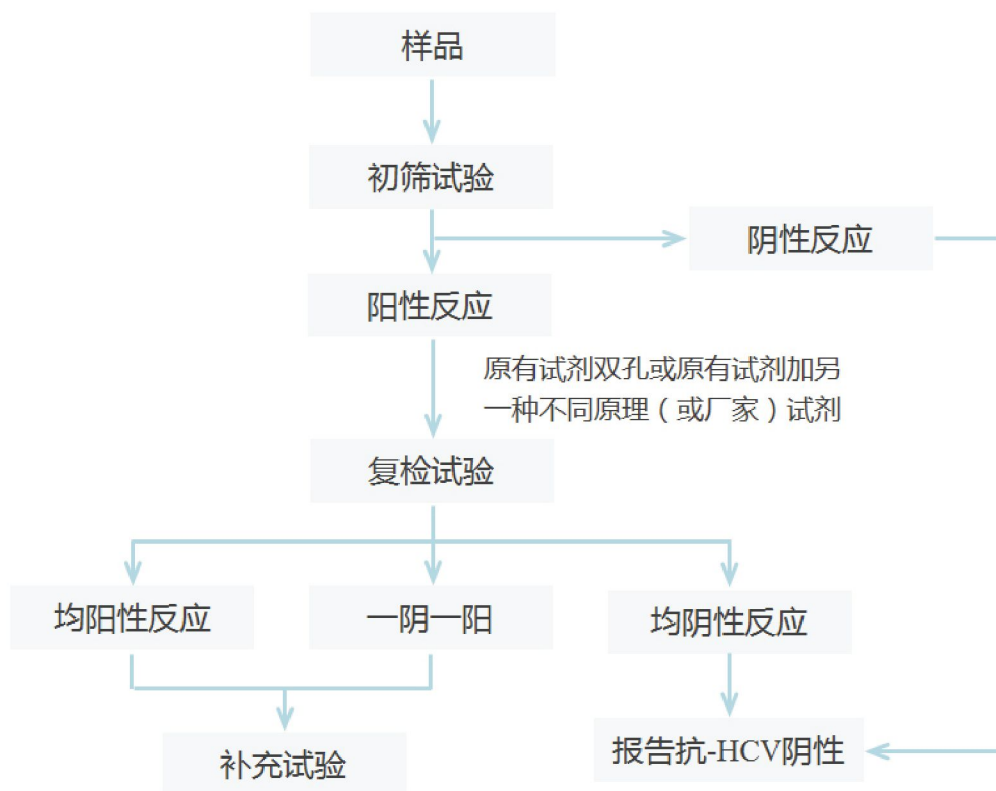


图4. HCV临床诊断筛查检测流程

案 例

某医院, 采用长光华医公司的丙型肝炎病毒抗体测定试剂盒与某进口品牌丙型肝炎病毒抗体测定试剂盒进行方法比对, 检测结果如下：

标本	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#	10#	11#	12#	13#	14#	单位
长光华医	0.17	0.08	0.09	0.09	0.08	0.08	0.09	0.07	0.09	0.08	0.1	0.08	0.08	0.07	S/CO
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
进口品牌	0.05	0.05	0.05	0.24	0.03	0.04	0.09	0.04	0.05	0.06	1.61	1.3	1.83	1.43	S/CO
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	

案例

Western blot analysis showing IgG and IgM levels. The blot is divided into two main sections: the top section is labeled "3+ IgG 反应带" (3+ IgG reaction band) and the bottom section is labeled "1+ IgG 反应带" (1+ IgG reaction band). The lanes are labeled as follows: "25", "25", "NS3-2", "NS3-1", and "NS". The lanes are further labeled at the bottom: "血清" (serum), "25 血清" (25 serum), "25 血清", "25 血清", and "25 血清". The lanes show varying intensities of bands, indicating different levels of IgG and IgM.

分析

1. 从 RIBA 确认试剂结果判别来看，因进口品牌厂家试剂检测假阳性导致两种方法比对结果符合性差；
2. 长光华医丙型肝炎病毒抗体检测试剂盒采用的是双抗原夹心法检测原理，而本次采用的进口品牌厂家为间接法检测原理；从多种文献报告以及 CDC 丙型肝炎检测规范描述来看，假阳性率高是间接法检测丙型肝炎病毒抗体的弊端。
3. 此案例也证实双抗原夹心法在降低丙型肝炎病毒抗体检测假阳性率、提高检测特异性方面优越性。

应用
问答

1.HBsAg、Anti-HIV、Anti-HCV、Anti-TP试剂为何有不同的注册管理办法？

根据《体外诊断试剂注册管理办法》（国家食品药品监督管理总局令第5号）：HBsAg、Anti-HIV、Anti-HCV、Anti-TP产品根据检验目的的不同，在注册管理上有明确的差异：

用来进行血源筛查的，按药品管理，需要批批检，执行生物制品批签发制度。
用来进行临床诊断、治疗监测、预后观察等目的，按医疗器械管理，不需要批批检。

2. 什么是“灰区”？

在 cut-off 值附近的测值，因为多种影响因素，导致临床诊断的不确定性，这部分测值，叫做灰区。

导致灰区的因素有很多种：a) 检测系统的重复性；b) cut-off 值的设置；c) 临床标本的复杂性。

灰区的设置：一般按 cut-off 值的 80% ~ 120% 作为灰区，或者按系统的精密性，按 cut-off 值 $\pm 2SD$ 范围作为灰区。

灰区结果的处理：处于灰区的标本，应重复检测 2 次；3 次结果中，如果 2 次阳性，按阳性报结果，如果 2 次阴性，按阴性报结果。

3. 检测结果为有反应性、无反应性和阳性、阴性的区别？

对于传染病检测项目来讲，存在筛查试剂和确认试剂，对于筛查试剂结果高于 cut-off 值的，结果报有反应性；结果低于 cut-off 值的，结果报无反应性。确认试剂结果，高于判读标准的，报阳性；低于判读标准的，报阴性；介于两者之间的，报不确定或可疑。

4. 校准品与标准品、质控品、参考品有什么不同？

a) 生物标准品：系指用于生物制品效价或含量测定或鉴别、检查其特性的标准物质（摘自《中国药典》2010 年版）。

b) 校准品：即校准物，具有在校准函数中用作独立变量值的参考物质；应具有定值和已知的测量不确定度，其目的应是校准某一测量系统，从而建立此系统测量结果的计量学溯源性（摘自 GB/T21415-2008、《体外诊断试剂校准品（物）、质控品（物）研究技术指导原则》）。

c) 质控品：用于体外诊断的质量控制物质（定值和非定值），是一种旨在用于医学用途的检测系统中使用的物质、材料、物品或设备，其目的是评价或验证测量精密度、测量准确度、由于试剂或分析仪器的变化检测系统可能产生的分析偏差等性能特征。质量控制物质（定值和非定值），可用于能力验证、实验室内质量控制。（摘自《体外诊断试剂校准品（物）、质控品（物）研究技术指导原则》）

d) 定值质控品：定值质控品有制造商使用合适的分析方法或过程分析的参考值，并指定参考范围；

e) 非定值质控品:非定值质控品可以在标贴上标示目标浓度(如:低、高、中),但是没有指定的参考范围,可以不用指定非定值质控品应用的分析测试系统,但需满足质量控制的系统规则。

f) 参考品:即参考物质,具有一种或多种足够均匀和很好地确定了特性,用以校准测量装置、评级测量方法或给材料赋值的一种材料或物质。(摘自GB/T21415-2008)

5.什么是筛查试剂?什么是确认试剂?

筛查试剂,又可以叫做初查试剂,一般用于某种疾病或某种标志物的初期检测,以便及早发现病情,以利于疾病的早期诊断治疗,预防疾病恶化扩散甚至传播。筛查试剂对灵敏度要求高,对假阳性要求相对较低,因为后期会进一步检查确认是否患病,所以对筛查试剂要求宁可错杀,不可漏过。

确认试剂,是对某种标志物是否存在的最终裁决。当确认试剂检查阳性时,可以确认标本中含有待测标志物。所以,对确认试剂来说,不会出现假阳性。常见的传染病确认试剂:HIV 抗体和梅毒螺旋体抗体的确认试剂方法是免疫印迹法(Western blotting, WB),丙型肝炎病毒抗体的确认试剂方法是重组免疫印迹法(Recombinant Immunoblot Assay, RIBA),乙型肝炎病毒表面抗原的确认试剂方法是中和试验法。

6.什么是阳转盘?

即阳性血清转换盘。在某个患者感染疾病的进程中,通过连续采血,不同时期的血清中,包含了这种疾病一种或一组血清标志物,从无到有,从低到高,甚至消失的转换过程。目前主要是在欧洲制作了多种传染病的血清阳转盘,用来评价诊断试剂的灵敏度。

7.什么是“窗口期”?

病毒等微生物侵入人体后,需要经过一段时间,机体才会产生相应的抗体,在此期间抗体检测呈阴性,这段时间即为窗口期。后来广义的定义是某种血清标志物在感染后,至被检出前的这段时间,统称为窗口期。

参考文献

1. Guido M, Thung SN, Fattovich G, et al. *Intrahepatic expression of hepatitis B virus antigens: effect of hepatitis C virus infection*. Mod Pathol, 1999,12(6):599-603
2. Morales JM, Fabrizi F. *Hepatitis C and its impact on renal transplantation*. Nat Rev Nephrol, 2015, 11: 172-182.
3. Syed GH, Amako Y, Siddiqui A. *Hepatitis C virus hijacks host lipid metabolism*. Trends Endocrinol Metab, 2010, 21: 33-40.
4. Alter HJ. *New kit on the block: evaluation of second- generation as-says for detection of antibody to the hepatitis C virus*. Hepatology, 1992,15:350-353.
5. Barrera JM, Francis B, Ercilla C, et al. *Improved detection of anti-HCV in post-transfusion hepatitis by a third- generation ELISA*. Vox Sang, 1995,68:15-18.
6. 任芙蓉, 庄辉. 丙型肝炎病毒抗体酶联免疫试验 S/CO 比值与补充试验阳性的相关性研究进展. 中华检验医学杂志, 2005, 28: 1096-1099.
7. Mimms L, Vallari D, Ducharme L, et al. *Specificity of anti-HCV ELISA assessed by reactivity to three immunodominant HCV regions*. Lancet, 1990, 336:1590-1591.
8. McFarlane IG, Smith HM, Johnson PJ, et al. *Hepatitis C virus antibodies in chronic active hepatitis: pathogenetic factor or false-positive result?* Lancet, 1990, 335:754-757.

有奖征集

华医通讯推出后, 受到读者的广泛赞誉。为了更好的服务客户, 解决实际工作中面临的疑问, 欢迎大家踊跃来信, 分享自己的知识经验或工作中遇到的问题。我们将给予心动的回报!
投稿邮箱: hytx@hybiome.com

有奖征答

室间质评为什么要分组呢?

下期预告

人类免疫缺陷病毒的血清标志物



苏州长光华生物医学工程有限公司

SUZHOU HYBIOME BIOMEDICAL ENGINEERING CO., LTD

地址: 苏州高新区锦峰路8号4号楼

Address: Building 4, No. 8, Jinfeng Road, Suzhou 215163, China

电话: 400 928 0111 传真: 0512-6689 7061

Email: hybiome@hybiome.com www.hybiome.com

