

## 丙型肝炎病毒检测方法的研究进展及其临床意义

谢立, 吴晓东

谢立, 首都医科大学附属北京佑安医院, 中国科学院研究生院  
北京市 100054

吴晓东, 中国科学院研究生院 北京市 100039

首都医学发展科研基金资助项目, No. 2002-3068

首都医科大学基础临床合作基金资助项目, No. 02JL20

通讯作者: 谢立, 100054, 北京市, 首都医科大学附属北京佑安医院, 中国科学院研究生院, xl811cn@163.com

电话: 010-63292211-2276

收稿日期: 2005-01-29 接受日期: 2005-03-03

### 摘要

丙型肝炎病毒(HCV)为嗜肝性慢性病毒.HCV感染后, 患者的起病和临床症状极不典型, 以亚临床感染为多见, 容易造成漏诊.HCV感染的慢性化发生率明显高于乙型肝炎, 较乙型肝炎易早期出现肝硬化、肝癌, 死亡率较高.因此HCV的检测对丙型肝炎病毒感染的早期诊断和指导临床治疗有重大的意义.目前用于HCV感染诊断的两项主要指标为抗-HCV和HCV RNA, 现多采用的第三代检测抗-HCV EIA试剂增加了HCV基因组NS5区表达的蛋白作为抗原, 进一步提高了试剂的敏感性, 但还存在“窗口期”漏检的问题.HCV RNA检测灵敏度高、特异性强, 具有早期诊断的意义, 但检出率较低, 检测复杂, 也可出现假阳性.作为抗-HCV检验的补充试验, HCV核心抗原的检测对处于HCV感染“窗口期”的个体检测有很大价值.

谢立, 吴晓东. 丙型肝炎病毒检测方法的研究进展及其临床意义. 世界华人消化杂志 2005;13(7):884-886

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/884.asp>

### 0 引言

丙型肝炎病毒是单股正链RNA病毒.1991年, 国际病毒命名委员会(ICTV)将其归为黄病毒科丙型肝炎病毒属<sup>[1]</sup>, 其基因组含有一个大约9033个核苷酸构成的大开放读码框(ORF), 可编码3010-3033个氨基酸的多蛋白前体, 多蛋白N端的1/4依次为核心蛋白(C)和包膜蛋白(E1和E2)等结构蛋白, 其余依次为NS2、NS3、NS4和NS5等非结构蛋白<sup>[2]</sup>, 膜蛋白分布于病毒表面, NS3蛋白具有蛋白酶的功能, NS5蛋白为一依赖于RNA的RNA多聚酶.

与其他RNA病毒一样, HCV基因组有很大的变异性, 可能会引起其分子生物学行为、感染性、临床致病性及对药物治疗的反应等诸方面的不同<sup>[3-4]</sup>.现已证实, 90%非肠道传播的非甲非乙型肝炎(NANBH)为HCV感染所致<sup>[1]</sup>, 35-50%的非甲非乙型肝炎发展为慢性肝炎, 与肝癌的发生相关<sup>[2]</sup>.

自从1978年Shirachi *et al*首先报道用双向免疫扩散法在输血后肝炎患者急性期和恢复期血清中找到了丙型肝炎病毒特异性的抗原和抗体, 而后不少学者利用放射

免疫(RIA)和酶联免疫(ELISA)等方法都曾找到了特异性的丙型肝炎病毒抗原和抗体<sup>[5-6]</sup>.1989年, Choo *et al*从大量有高度传染性的黑猩猩血浆中提取核酸, 经逆转录和分子克隆并进行筛选, 获得了部分HCVcDNA序列, 并表达重组抗原, 建立了特异性抗-HCV血清学的检测方法<sup>[7-8]</sup>, 使丙型肝炎的研究成为近年来非常活跃的研究领域, 并取得了重大进展.我们就HCV血清学检测方法的研究进展进行了综述.

### 1 丙型肝炎病毒抗-HCV的检测

随着血液制品在世界范围的流通, HCV感染呈世界性分布, 为了控制丙型肝炎病毒的血液传播, 世界各国均开展了对献血员抗-HCV的检测.常用的抗-HCV诊断试剂采用间接酶联免疫法(ELISA), 其基本原理是以HCV抗原包被酶标板, 用辣根过氧化物酶标记的抗人IgG与被检血清中的抗-HCV反应, 邻苯二胺(OPD)或3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺(TMB)显色后, 根据颜色的深浅进行阴阳性判断.该方法中包被抗原的组成和质量是关键因素.第一代抗-HCV ELISA采用的抗原C<sub>100-3</sub>是HCV非结构基因(NS3/NS4)和人超氧化物歧化酶基因嵌合后表达的融合蛋白, 灵敏度低, 漏检率较高;第二代抗-HCV ELISA在第一代基础上增加了核心区重组蛋白C<sub>22</sub>和NS3区重组蛋白C<sub>33c</sub>, 虽然在灵敏度和特异性上有很大改善, 但仍不能排除由于重组融合蛋白带来的少数假阳性和极少数的漏检<sup>[9]</sup>.目前我国多采用第三代抗-HCV ELISA试剂, 其包被抗原为HCV核心抗原、NS3、NS4和NS5抗原, 特异性超过99%, 虽然目前缺乏判断其敏感性的金标准, 但对于免疫功能正常的HCV RNA阳性感染者, 抗-HCV检出率也高于99%<sup>[10]</sup>.

### 2 丙型肝炎病毒核酸RNA的检测

HCV感染后一般到抗体转阳有一个较长的窗口期, 平均为70 d, 有的患者窗口期可延长至6-9 mo或更长, 约1-3%的患者抗-HCV可持续阴性, 而基因组的复制出现得很早, 感染后数天即出现病毒血症.已有输血后即有丙型肝炎病毒感染发生的报道, 这表明抗-HCV阴性的献血员中有少数存在丙型肝炎病毒输血传播的可能性<sup>[11]</sup>;另外, 美国已报道了1例抗-HCV阴性的器官捐赠者对接受移植者造成丙型肝炎病毒感染急性感染<sup>[12]</sup>;Willems *et al*<sup>[13]</sup>检测克罗地亚不同地区输血中心的2718份抗-HCV阴性血浆中2.1%为HCV RNA阳性.因此直接检测HCV RNA对于筛查窗口期HCV感染的献血者, 降低输血后HCV感染的发病率是必要的.

外周血中检出HCV RNA是HCV复制活跃的可靠指标,

在感染 1-2 wk 内血清中可检测到 HCV RNA, 在感染自然恢复前血清中 HCV RNA 将达到一个高峰, 但 HCV RNA 在达到峰值或重新出现前数天或数周内偶尔也可能检测不到. 在大多数向慢性转化的感染者中, HCV RNA 含量降低速度逐渐减慢, 最后趋于稳定, 晚期肝病患者的 HCV RNA 水平很低, 甚至无法测出<sup>[14]</sup>.

HCV RNA 检测包括定性和定量两种方法, 其基本原理就是逆转录聚合酶链反应(RT-PCR): 首先经逆转录酶作用, 在特异性引物存在下, 将 HCV RNA 逆转录为单链的 cDNA, 再通过 PCR 将 cDNA 扩增. 定性 PCR 的灵敏度高于定量 PCR, 例如罗氏公司试剂, 定性 PCR 的灵敏度为 50 kIU/L, 定量 PCR 为 600 kIU/L; 拜尔公司的定性 PCR (转率介导扩增法, TMA) 试剂的灵敏度为 10 kIU/L, 其定量 PCR 为 615 kIU/L, 因此定性 PCR 主要用于急性慢性丙型肝炎诊断, 而定量 PCR 则用于疗效监测<sup>[15]</sup>. 不同定量分析方法中的检测单位与临床标本的 HCV RNA 实际水平的关系不完全一致, 世界卫生组织制定了 HCV RNA 定量分析单位的国际标准 (IU), 目前分析方法检测的下限值范围为 30-615 kIU/L, 上限值范围为  $5 \times 10^5$ - $7.7 \times 10^5$  kIU/L, 特异性为 98-99%, 且不受基因型的影响<sup>[10]</sup>.

尽管 RT-PCR 检测 HCV RNA 具有早期、敏感和特异等特点, 但该方法在技术和设备上要求较高, 且费时, 检出率较低, 主要原因是: HCV 在血液和肝组织中的感染滴度很低, 且有一定波动; HCV RNA 易被血细胞中的 RNA 酶降解, 因此如果被检标本保存不当 (例如反复冻融) 将影响检测结果; HCV RNA 还受进食的影响, 易与血中脂质及脂蛋白结合, 降低检出率; 另外, RT-PCR 的多步骤实验中任何步骤的问题均易影响其检出. 该方法也容易因污染而出现假阳性. 因此 RT-PCR 方法难以在常规工作或基层实验室推广, 限制了普遍应用<sup>[16]</sup>. 为了使 HCV RNA 的检测规范化, 应采取以下相应措施: 对患者在空腹条件下抽血, 及早分离血清和进行检测, 避免对标本反复冻融, PCR 的整个过程应避免 RNA 酶及 DNA 酶对标本的降解和对模板的污染<sup>[17]</sup>.

### 3 一种新的 HCV 检测方法: 血清中 HCV 核心抗原的检测

丙肝病毒核心蛋白约含 190 aa, 其氨基酸序列十分保守, 比较已有的 HCV 各分离株的氨基酸序列, 其同源性超过 95%, 在病毒增殖及发病机制中起重要作用, 是 HCV 感染的重要标志.

自从 1989 年建立了丙肝病毒抗-HCV 检测方法以来, 一些学者也曾经试图建立血清中 HCV 抗原的检测方法, 但由于血液中 HCV 抗原含量太低, 用常规方法无法检出. 近年来由于 HCV 单克隆抗体的研制成功, 已有国内外学者发表了肝组织及分泌物中 HCV 抗原检测成功的报道. 例如: 国外已有学者报道应用 HCV 基因组 C 区、E 区和 NS3 区表达抗原制备单克隆抗体检测肝组织中 HCV 相关抗原获得成功<sup>[18]</sup>; Pasquier *et al* 报道了应用重组 HCV 抗原所获动物抗体测定 NANBH 患者精液中 HCV 抗原的技术<sup>[19]</sup>. 国内陈佩兰 *et al* 也报道了应用 HCV 核心区 and NS3 区单克隆抗体对患者外周血单个核细胞内 HCV 抗原的

免疫组化检测<sup>[20]</sup>. 对于血清中 HCV 抗原的检测, 1996 年 Kashiwakuma *et al*<sup>[21]</sup> 报道了用荧光酶免疫分析法 (FEIA) 检测血清中的 HCV 抗原, 该方法对重组核心抗原的检测灵敏度可达 20 ng/L, 对血清中 HCV 核心抗原的检出与 HCV RNA 呈正相关, 在慢性丙肝患者中的检测率为 92.3% (70/76); 1999 年 Aoyagi *et al*<sup>[22]</sup> 建立了一种不需要特殊仪器设备的简单、高灵敏度的酶免分析法用于检测血清中的 HCV 核心抗原, 在该方法中先用三种去垢剂 (TritonX-100, CHAPS 和 SDS) 预处理被检标本, 即有效灭活标本中的抗核心抗原抗体, 检测结果不受血清样品中的抗凝剂或血液因子的影响, 125 名健康人群和 50 例乙肝患者的 HCV 核心抗原检测均为阴性, 而 73 例抗-HCV 阳性患者中 HCV 核心抗原检出率为 78.1% (57/73), 与 HCV RNA 也有很好的相关性 ( $r = 0.8$ ,  $P < 0.001$ ). 国内孟淑芳<sup>[23]</sup>、李保全 *et al*<sup>[24]</sup> 也相继报道了血清中 HCV 抗原的检测.

血清中 HCV 抗原的检测还有利于 HCV 感染患者的早期发现, 特别是某些免疫功能紊乱、免疫功能低下的患者和某些不产生抗体的携带者<sup>[25]</sup>. Courouce<sup>[26]</sup> 和 Lee *et al*<sup>[27]</sup> 对血清转换前的患者进行了血清中 HCV 抗原的检测, 结果表明 HCV 抗原的检出比 HCV RNA 平均晚 1-2 d, 而且与 HCV RNA 的动力学变化密切相关, 可以作为 HCV 复制的标志<sup>[28]</sup>.

目前美国 Ortho 公司已推出了用双抗体夹心法定性或定量检测血清样品中总的或游离的 HCV 核心抗原 ELISA 试剂, 其基本原理是: 以基因工程核心抗原免疫小鼠后所获得的纯化抗 HCV 核心抗原单克隆抗体作为固相包被物, 用与固相包被物有不同抗原决定簇的抗-HCV 核心抗原单克隆抗体作为辣根过氧化物酶标记物, 与血清中总的或游离的 HCV 核心抗原反应, OPD 显色后进行定性或定量测定. 该法不受被测样品中抗-HCV 的干扰, 检测结果准确可靠, 与 RT-PCR 方法相比具有方法简单、时间短、对环境要求低以及假阳性率低的特点, 在临床上可用于 HCV 血清学转换前的早期急性丙型肝炎诊断、抗-HCV 阳性感染者的病毒血症分析以及 HCV 感染者治疗前后病毒血症追踪分析等<sup>[29-30]</sup>. 2003-03 在法国巴黎召开的关于 HCV 核心抗原检测技术的第一届专题会议认为: 该试剂对 HCV 核心抗原的检出比抗-HCV 的检出约早 49 d, 可用于供血员的筛查, 这将显著提高输血的安全性. 但是由于方法敏感性的限制, HCV RNA 水平低于 20 000 kIU/L 时不宜采用检测 HCV 核心抗原的方法. Ortho 公司的该试剂已于 2004-04 在欧洲上市, 目前主要处于临床对比实验和评价阶段, 还没有通过美国食品和药物管理局 (FDA) 的批准.

HCV 核心抗原是 HCV 结构区抗原的一部分, 这可能是检出率低的原因之一, 若能对非结构区抗原进行联合检测, 可能将提高检出率. 血清中可存在游离的非结构蛋白 NS3, 其保守性相对较高<sup>[31]</sup>, 可用于血清学诊断. 国内已有关于献血者血清中 HCV NS3 和核心蛋白抗原检测的报道<sup>[32]</sup>.

总之, 丙型肝炎病毒抗原、抗体和 RNA 的联合检测已成为 HCV 感染诊断的主要指标, 扩大了检测范围, 缩

短了窗口期,有利于早期诊断,同时对这些指标的出现与消退规律、及其与临床病理演变关系的追踪观察分析将对HCV感染情况、治疗方案的选择和预后判断等提供依据,有更直接的意义。尽管我国近几年对HCV实验室诊断方法的研究获得了突破和发展,但目前常用的国产试剂仍有一定的漏检率,因此只有提高国产抗-HCV试剂的敏感性和特异性,规范HCV RNA的检测,才能提高实验室检测结果的可信度;同时作为HCV抗体检验的补充试验,应发展HCV抗原的检测方法,提高对窗口期感染者的检出率<sup>[33]</sup>。所以研制特异性好、灵敏度高、价格合理的HCV诊断试剂,尤其是HCV抗原检测试剂仍是当前我国HCV研究的重要课题之一。

#### 4 参考文献

- Wengler G. Properties of the virus particle. *Arch Virol* 1991; Supp 12:223-233
- Alter HJ. New kit on the block: evaluation of second-generation assays for detection of antibody to the hepatitis C virus. *Hepatology* 1992;15:350-353
- Yoshioka K, Kakumu S, Wakita T, Ishikawa T, Itoh Y, Takayanagi M, Higashi Y, Shibata M, Morishima T. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon-alpha therapy:relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 1992;16:293-299
- Kumar D, Farrell GC, George J. Sustained viral response improves hepatic steatosis in patients with chronic hepatitis C due to genotype 3, but not genotype 1. *Hepatology* 2002; 36(Pt 2):267A
- Shirachi R, Shiraishi H, Tateda A, Kikuchi K, Ishida N. Hepatitis "C" antigen in non-A, non-B post-transfusion hepatitis. *Lancet* 1978;2:853-856
- Tateda A, Kikuchi K, Numazaki Y, Shirachi R, Ishida N. Non-B hepatitis in Japanese recipients of blood transfusions:clinical and serologic studies after the introduction of laboratory screening of donor blood for hepatitis B surface antigen. *J Infect Dis* 1979;139:511-518
- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-362
- Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362-364
- Kotwal GJ, Baroudy BM, Kuramoto IK, McDonald FF, Schiff GM, Holland PV, Zeldis JB. Detection of acute hepatitis C virus infection by ELISA using a synthetic peptide comprising a structural epitope. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4486-4489
- 杨东亮. 丙型肝炎的病毒学检测指标及其临床意义. *中华肝脏病杂志* 2004;12:104
- 王乐斌, 赵久法. 抗-HCV 阴性献血员丙肝病毒感染及意义. *临床医学* 2000;25:442
- Centers for Disease Control and Prevention(CDC). Hepatitis C virus transmission from an antibody-negative organ and tissue donor- United States, 2000 to 2002. *Morb Mortal Wkly Rep* 2003;52:273-274
- Willems M, Metselaar HJ, Tilanus HW, Schalm SW, de Man RA. Liver transplantation and hepatitis C. *Transpl Int* 2002; 15:61-72
- Pawlotsky JM. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:S65-S73
- 庄辉. 重视丙型肝炎的研究. *中华肝脏病杂志* 2004;12:65-66
- 邢文革, 郑怀竟. 必须提高丙型肝炎病毒实验室检验结果的可信度. *中华肝脏病杂志* 2004;12:170-171
- 王宇明. 重视我国丙型肝炎的研究. *中华肝脏病杂志* 2004;12: 106-107
- Ballardini G, Groff P, Giostra F, Francesconi R, Miniero R, Ghetti S, Zauli D, Bianchi FB. Hepatocellular codistribution of c100, c33, c22, and NS5 hepatitis C virus antigens detected by using immunopurified polyclonal spontaneous human antibodies. *Hepatology* 1995;21:730-734
- Pasquier C, Bujan L, Daudin M, Righi L, Berges L, Thauvin L, Berrebi A, Massip P, Puel J, Izopet J. Intermittent detection of hepatitis C virus(HCV)in semen from men with human immunodeficiency virus type 1(HIV-1)and HCV. *J Med Virol* 2003;69:344-349
- 陈佩兰, 李琳, 田惠英, 陈良标. 丙型肝炎患者外周血单个核细胞 HCV 和 Fas 抗原检测. *军医进修学院学报* 2000;21:215-217
- Kashiwakuma T, Hasegawa A, Kajita T, Takata A, Mori H, Ohta Y, Tanaka E, Kiyosawa K, Tanaka T, Tanaka S, Hattori N, Kohara M. Detection of hepatitis C virus specific core protein in serum of patients by a sensitive fluorescence enzyme immunoassay (FEIA). *J Immunol Methods* 1996;190:79-89
- Aoyagi K, Ohue C, Iida K, Kimura T, Tanaka E, Kiyosawa K, Yagi S. Development of a simple and highly sensitive enzyme immunoassay for hepatitis C virus core antigen. *J Clin Microbiol* 1999;37:1802-1808
- 孟淑芳, 李秀华, 尹红章, 李德富. 血浆或血清样本中丙型肝炎病毒抗原的检测. *中华微生物学和免疫学杂志* 1999;19:80
- 李保全, 杨毓华, 马勇, 邵海枫, 熊华, 赵权, 张小卫, 武建国. 丙型肝炎病毒核心抗原 C33 的测定. *中华实验和临床病毒学杂志* 1999;13:68-70
- Kurtz JB, Boxall E, Qusir N, Shirley J, Coleman D, Chandler C. The diagnostic significance of an assay for 'total' hepatitis C core antigen. *J Virol Methods* 2001;96:127-132
- Courouce AM, Le Marrec N, Bouchardeau F, Razer A, Maniez M, Laperche S, Simon N. Efficacy of HCV core antigen detection during the preseroconversion period. *Transfusion* 2000; 40:1198-1202
- Lee SR, Peterson J, Niven P, Bahl C, Page E, Deleys R, Giordano-Schmidt D, Baggett D, Green G. Efficacy of a hepatitis C virus core antigen enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of 'window-phase' blood donations. *Vox Sanguinis* 2001;80:19-23
- Bouvier-Alias M, Patel K, Dahari H, Beaucourt S, Larderie P, Blatt L, Hezode C, Picchio G, Dhumeaux D, Neumann AU, McHutchison JG, Pawlotsky JM. Clinical utility of total HCV core antigen quantification:a new indirect marker of HCV replication. *Hepatology* 2002;36:211-218
- Lunel F, Veillon P, Payan C. Evaluation of the Ortho total HCV core antigen assay in comparison to methods of detection and quantification for HCV RNA. *Hepatology* 2002;36(Pt 2):353A
- Maynard M, Buti M, Esteban JI, Tillmann H, Wiegand J, Manns M, Martinot M, Marcellin P, Berthillon P, Pradat P, Trepo C. High clinical relevance of total HCV core antigen testing for monitoring and predicting response to PEG-IFN/ribavirin combination therapy. *Hepatology* 2002;36(Pt 2):353A
- Darius M, Takaji W, Tokushige K, Carlson RI, Krawczynski K, Wands JR. Characterization of three novel monoclonal antibodies against hepatitis C virus core protein. *J Med Virol* 1996;48:234-241
- 郭满盈, 李谋深, 李保全, 杨毓华. 献血者血清中 HCV NS3 和核心蛋白抗原的检测及临床意义. *中国输血杂志* 2001;14:78-79
- 中华医学会肝病学分会, 中华医学会传染病与寄生虫病学分会. 丙型肝炎防治指南. *中华肝脏病杂志* 2004;12:194-198