

丙型肝炎患者尿液特异标志物的检测及其临床意义

肖杰生^① 高志良 陈文思
陈青 江元森 俞洪林

(中山医科大学附属第三医院传染病科,广州,510630)

摘要 对54例丙型肝炎患者尿液特异指标检测,结果:抗-HCV阳性5/54例(9.2%),HCV RNA阳性9/54例(16.7%)。急性HCV感染者,尿中抗-HCV检出率为2/6例(33%),较慢性者3/38例(7.9%)为高($P<0.05$)。尿液HCV RNA全部出现在未经 α -干扰素治疗的慢性患者中,故可用作判断干扰素疗效的指标之一。本文在尿中检出HCV RNA,提示HCV可经尿液污染环境。

关键词 丙型肝炎病毒; 尿液; 抗体; 核糖核酸; 多聚酶链反应

中图分类号 R512.63

丙型肝炎病毒(HCV)感染后,患者血清中可以检到其特异的核酸序列(HCV RNA)和抗-HCV等。HCV RNA被检出不仅确定感染体内有病原体存在,而且反映其复制程度。抗-HCV目前尚不能确定其属性,说明HCV感染或仅为以往感染。在感染者的分泌物(如唾液、尿液、精液等)中很难查到HCV RNA^[1],仅有部分可测出抗-HCV^[2],而尿中抗-HCV检出率仅次于血清检出率^[3]。本文介绍用多聚酶链反应(PCR)技术检测尿液中HCV RNA及用ELISA法测抗-HCV,结合被检者临床资料进行分析。

1 材料与方 法

1.1 病例选择和分组

本科病房住院及门诊病人共64例,实验组54例,对照组10例。按病例分4组。第1组:急性丙型肝炎病者6例。诊断标准为:既往无“肝炎”病史,因输血或输血浆后2个月左右起病,丙氨酸转氨酶(ALT) $>200\text{U/L}$,血清中HCV RNA阳性,抗-HCV阳性,其它肝炎指标如:HBsAg、抗-HBc IgM、HBV DNA(PCR),抗-HAV IgM,抗-HEV IgM、IgG,HDAG、抗-HDV等检查全部阴性。第2

组:未经 α -干扰素治疗的慢性丙型肝炎患者38例。该组患者病程大于6个月,有慢性肝炎体征及血清 γ -球蛋白升高,HCV指标阳性,其它肝炎病毒指标阴性。第3组:经 α -干扰素治疗的慢性丙型肝炎10例。诊断标准同第2组, α -干扰素(美国“先灵”公司产品)治疗用300万U/每次,隔日1次,连用3个月以上。第4组:为对照组10例。即乙型肝炎8例,甲型肝炎2例,均无输血史,血清HCV指标阴性。

1.2 标本收集

用预先处理无菌管收集晨尿5ml,立即1900r/min,离心15min,小心吸上液0.5ml分5管,全放置于 -40°C 保存备检,于收集后14d内检测完毕。所有尿标本均作尿常规镜检,未发现红细胞。血清同时收集,按常规处理。

1.3 抗-HCV检测

采用上海科华试剂,所用包被抗原为合成肽(含HCV病毒结构区核心抗原和非结构区抗原)。血清标本以1:20稀释后使用,检测结果在酶标阅读仪($\Sigma 960$,Metertech INC)中读出光吸收值(A值),截止值(cut off)为0.16,如大于此值判为血清抗-HCV阳性。尿

^① 第一作者,55岁,男,主任医师

液标本用1:2稀释后使用,结果按下公式算出判断值。

$$\frac{\text{尿标本 A 值} - \text{空白对照 A 值}}{\text{尿阴性对照 A 值} - \text{空白对照 A 值}} = \text{判断值}$$

如判断值 ≥ 2.1 ,判为尿标本抗-HCV阳性。

1.4 HCV RNA 检测

采用热变性直接法(另文有详述)^[4]多聚酶链反应(PCR)检测。引物采用HCV序列5'端非编码区片段。血清、尿标本各50 μ l加裂解液(含0.5% 2-巯基乙醇等),95 $^{\circ}$ C 15min, 11 000r/min离心5min后,取上清5 μ l进行逆转录及套式PCR。将PCR产物10 μ l在含0.5 μ g/ml溴化乙锭(EB)的1.5%琼脂糖上电泳1h,在2 357 \AA 的紫外光上观察结果,以同步电泳的123bp(BRL)DNA分子量标准作参照。预扩增产物为144bp。

2 结 果

2.1 尿标本HCV标志物检测重复性试验

54份HCV感染者尿标本,抗HCV阳性5例,检出率为5/54(9.2%),HCV RNA阳性9例,检出率9/54(16.7%)。5份抗-HCV阳性尿标本复检3次,其变异系数为2.6%。9例HCV RNA阳性标本用PCR法重复2次检测,其中有6份3次均阳性,3份2次阳性。将以上9份HCV RNA阳性尿标本放置室温24h后检测结果全部阴性。10份对照的尿标本,抗-HCV及HCV RNA全部阴性。

2.2 急性、慢性HCV感染者及 α -干扰素治疗者尿液、血液中HCV标本物检测

实验3组的尿、血中抗-HCV、HCV RNA检测结果如附表。

表中数字经统计学处理,用 χ^2 检验作比较,1、2、3组中抗-HCV及HCV RNA检测,所有血标本的检出率显著高于尿标本。尿抗-HCV阳性率在1、2组及2、3组之间有差异($P < 0.05$)。尿HCV RNA仅2组有23%可检出,1组急性期及3组干扰素治疗组均未检出。

附表 尿液、血液中HCV指标检测

分 组	病例数 (n)	抗-HCV 阳性		HCV RNA 阳性	
		尿	血	尿	血
1 组	6	2	5	0	6
2 组	38	3	38	9	30
3 组	10	0	10	0	7

注:1组,急性丙肝;2组,未经干扰素治疗的慢性丙肝;3组,干扰素治疗的慢性丙肝

2.3 尿标本HCV RNA与抗-HCV之间关系

9份被检出HCV RNA阳性的尿标本中有2份抗-HCV阳性,阳性率为2/9(22%),占尿抗-HCV总阳性的2/5(40%)。

3 讨 论

有关尿液中HCV感染指标的检测及意义,相关的报道不多。本文结果,血标本与尿标本抗-HCV与HCV RNA同时检测,血标本检出率明显高于尿标本检出率。其中急性HCV感染组(1组)及 α -干扰素治疗组(3组)尿中HCV RNA不能测出。而未经 α -干扰素治疗的2组慢性丙型肝炎中检出尿HCV RNA阳性9例。尿液中有病毒核酸(RNA)的检出,说明HCV RNA可以部分从血中经肾小球滤过,且排除了因尿液中有血液污染的情况,因所有被检者的尿常规低倍镜下无红细胞,对照组乙肝与甲肝患者尿中无一例检出抗-HCV与HCV RNA。是否本身肾脏有感染,目前尚无更多的证据说明,须进一步深入研究。

本文检测HCV RNA方法,采用直接热变性处理尿标本,用低浓度2-巯基乙醇作裂解液,然后在94 $^{\circ}$ C以上热变性,使标本中可能存在的核酸酶灭活,减少对RNA的降解。与传统的异硫氰酸胍结合酚,氯仿等抽提^[5],乙醇沉淀有较大的优势,使检测标本在最快的时间内完成,且重复性达89%以上。

尿中抗-HCV的检测,Niel^[3]等以1:2稀释检测,其结果报道有近似于血标本的检

出率。本文所测尿标本,如用血标本相同的稀释度(1:20)则检测抗-HCV全部阴性,用1:2稀释仅检出5份,检出率为5/54,远低于血标本检出率。经多次重复,变异系数为2.6%,结果稳定。

检测尿液 HCV 标志有以下几个意义:(1)本文结果显示 HCV 感染者可以通过尿液向外界释放病原体,但尿液放置常温下 24h,则测不出病毒核酸,说明 HCV RNA 在尿中传播意义可能不大。(2)本文资料显示 10 例用 α -干扰素治疗期间,血清 HCV RNA 阳性率为 7/10,与非干扰素治疗组的 30/39 (76.8%)相比无差异,但其尿液中无 1 份可检出 HCV RNA,而非治疗组尿液为 9/38 (23%),差异显著($P < 0.01$)。目前对干扰素治疗丙型肝炎疗效观察除了视其肝功能以外,主要视血中 HCV RNA 是否消失^[6],因而尿液中 HCV RNA 的检测可作为又一判断药物治疗疗效的指标。(3)尿抗-HCV 阳性在本文显示,急性感染者为 33%,慢性者为 7.9%,差异明显。部分急性感染者尿抗-HCV 阳性,而血中抗-HCV 尚未出现,但可检测得到 HCV RNA,提示有部分抗-HCV 出现在感染者初期尿液之中。(4)尿中 HCV RNA 与抗-HCV 的检出有无相关关系,必须通过

更多的病例观察来反映。

参 考 文 献

- 1 Hsu H, Wright T, Luba D, et al. Failure to detect hepatitis C virus genome in human secretions with the polymerase chain reaction. *Hepatology*, 1991, 14: 763
- 2 Nakano I, Imoto M, Fukuda Y, et al. Hepatitis C virus RNA in urine, saliva, and sweat. *AM J Gastroenterol*, 1992, 87: 1522
- 3 Niel T, Tsuda F, Machida A, et al. Detection of antibodies to hepatitis C virus in urine. *Lancet*, 1992, 339: 1607
- 4 高志良,姚集鲁. 热变性处理 HCV RNA 模板直接扩增. *中山医科大学学报*, 1994, 15(3): 225
- 5 Okamoto H, Munekata E, Tsuda F, et al. Detection of hepatitis C virus of primers deduced from the 5'-noncoding region. *JPN J EXP Med*, 1990, 60: 216
- 6 Shindo M, Bisceglie A, Hoofnagle T, et al. Long-term follow-up of patients with chronic hepatitis C treated with α -interferon. *Hepatology*, 1992, 15: 1013

(1993-10-18 收稿 1994-03-18 修回)

SIGNIFICANCE OF DETECTING ANTI-HCV AND HCV RNA IN URINE IN PATIENTS WITH HCV INFECTION

Xiao Jiasheng Cao Zhiliang Chen Wensi
Chen Qing Jiang Yuanssen Yu Honglin

(Department of Infectious Diseases, The Third Affiliated Hospital Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510630)

Anti-HCV and HCV RNA were detected in urine of HCV infectious patients with EIA and polymerase chain reaction techniques. In 54 cases, it was found that 5 (9.2%) were positive for anti-HCV and 9 (16.7%) were positive for HCV RNA. Anti-HCV positivity was higher in patients with acute HCV infection (33%) than in patients with chronic HCV infection.

(下转第 199 页)