

应用套式PCR 检测抗-HCV 阴性献血员血清中HCV RNA

陈友纯 赖进祥 蔡庆 林万明

我们采用敏感特异的套式PCR法,检测经ELISA试剂筛选后抗-HCV阴性的献血员血清中HCV RNA,以了解抗-HCV阴性献血员HCV的感染情况。

一、材料和方法:

1.血清来源及其HCV RNA的提取:60例经ELISA法检测抗-HCV阴性(检测试剂为美国UBI公司产品,珠海亚丽生物工程公司提供)的献血员,静脉采血,分离血清作为标本, -70°C 冻存储存。用已知HCV RNA阴性和阳性血清各一份分别作阴阳性对照。血清中HCV RNA的提取用SDS-蛋白酶K裂解法。

2.PCR引物:在HCV RNA的5'末端非编码区内选择内、外引物,由本室ABI 391型DNA合成仪合成并纯化。

3.逆转录和套式PCR反应:在样品RNA中加入逆转录反应混合液(含 $10\times$ 反应液,4种dNTP,HCV外引物反意义链,AMV逆转录酶), 37°C 反应45min, 95°C 5min,为逆转录产物cDNA。第一次PCR用 $50\mu\text{l}$ 反应体系,引物为外引物,模板为逆转录产物cDNA,反应条件为 94°C 1min, 55°C 1min, 72°C 1.5min,循环30次。第二次PCR引物为内引物,模板为第一次PCR产物 $5\mu\text{l}$,反应条件同上。

4.反应产物检测:扩增产物用2%琼脂糖凝胶电泳。用 $\phi\text{X}174/\text{Hae III}$ 作分子量标准,第二次PCR产物长度应为145bp,出现145bp区带者为阳性血清。

二、结果与讨论:用套式PCR检测60例抗-HCV阴性献血员血清中HCV RNA,结果6例阳性,阳性率10%。

目前,排除献血员HCV感染的常用方法是用ELISA法检测抗-HCV,但临床常见使用抗-HCV阴性的血液而导致受血者丙型肝炎的发生。我们用套式PCR检测抗-HCV阴性献血员的血清中HCV RNA的结果表明,部分抗-HCV阴性的献血员血清中存在HCV RNA。用套式PCR检测HCV是将cDNA进行两次扩增,第二次是在第一次的基础上,在第一次PCR扩增产物的片段内,再次进行部分靶片段扩增,以提高敏感性和特异性。另外,我们所应用引物在HCV RNA的5'末端非编码区,分子生物学研究表明,HCV RNA容易发生变异,但在各基因组中以5'末端非编码区核苷酸序列保守性最强,因而应用此区域内的引物能提高敏感性。而用ELISA检测抗-HCV,则由于抗-HCV抗体在感染早期尚未产生或浓度较低,或由于抗体检测时所用抗原片段具有局限性,或被感染的个体缺乏产生特异性的能力,而导致假阴性结果。因此用PCR检测HCV RNA,比检测抗体更直接,更早期,阳性则能说明体内有HCV RNA存在,具有传染性。PCR法在确定献血员HCV RNA感染上较ELISA法检测抗-HCV能起更重要的作用。

(收稿:1993-12-22 修回:1994-04-03)

本文作者单位:空军总医院 100036 北京市

一起伤寒水型爆发的调查报告

刘朋香¹ 王付宾²

邯郸某县棉厂,距县城约20公里,位于农村。全厂1023人,临时工较多(均来自农村)。居住条件简陋、拥挤,大部分员工素质较差,缺乏个人卫生知识,有喝生水习惯。厂内有厂办自来水站一座,1993年8月3~30日,该厂突然发生一批持续发热病人,病人总数达116人,罹患率为11.3%,无病人死亡。经流行病学调查及检测结果分析,确定本次是由于饮用被

污染水所致的一起伤寒爆发。

一、流行特征:

1.时间分布:8月3日发生首例病人,以后逐日增加,至20日形成高峰,8月底终止。共发生116例伤寒

1 河北省邯郸市卫生防疫站 056001

2 邯郸市第一医院