

附件

# 《丙型肝炎病毒实验室检测技术规范》 (2023 年修订版)



中国疾病预防控制中心

二〇二三年十月

# 目 录

|                          |    |
|--------------------------|----|
| 前 言.....                 | 1  |
| 第一章 丙型肝炎病毒感染.....        | 4  |
| 1. HCV 病毒学特点.....        | 4  |
| 2. HCV 传播途径和致病机制.....    | 7  |
| 3. HCV 感染分期和临床表现.....    | 8  |
| 4. HCV 感染检测标志物.....      | 9  |
| 5. HCV 感染的治疗.....        | 11 |
| 参考文献.....                | 12 |
| 第二章 样品的采集、保存和运输.....     | 16 |
| 1. 样品采集.....             | 16 |
| 2. 样品的接收、保存和运输.....      | 17 |
| 参考文献.....                | 19 |
| 第三章 HCV 抗体检测.....        | 20 |
| 1. HCV 抗体检测方法.....       | 20 |
| 2. HCV 抗体检测方法的选择和应用..... | 24 |
| 参考文献.....                | 25 |
| 第四章 HCV 核酸检测.....        | 27 |
| 1. HCV 核酸检测方法.....       | 27 |
| 2. HCV 核酸检测方法的选择和应用..... | 28 |
| 参考文献.....                | 31 |

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| 第五章 HCV 抗原检测.....                  | 32 |
| 1. HCV 抗原检测方法.....                 | 32 |
| 2. HCV 抗原检测方法的选择和应用.....           | 34 |
| 参考文献.....                          | 35 |
| 第六章 HCV 感染检测流程.....                | 37 |
| 1. 个体诊断相关检测流程及结果报告.....            | 37 |
| 2. 血液筛查相关检测流程及结果报告.....            | 41 |
| 3. 流行病学调查相关检测流程及结果报告.....          | 44 |
| 参考文献.....                          | 45 |
| 第七章 HCV 基因序列分析.....                | 47 |
| 1. HCV 基因分型检测方法和应用.....            | 47 |
| 2. HCV 耐药检测方法和应用.....              | 50 |
| 3. HCV 分子溯源检测方法和应用.....            | 52 |
| 参考文献.....                          | 54 |
| 第八章 HCV 细胞培养和中和抗体检测.....           | 57 |
| 1. HCV 细胞培养方法.....                 | 58 |
| 2. HCV 细胞培养方法在 HCV 中和抗体检测中的应用..... | 60 |
| 参考文献.....                          | 61 |
| 第九章 HCV 检测实验室的室内质量控制.....          | 64 |
| 1. 质控品.....                        | 64 |
| 2. 质控品的检测频次和位置.....                | 65 |
| 3. 质控规则和质控图.....                   | 66 |
| 4. 失控原因分析和处理.....                  | 68 |

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| 参考文献.....                   | 70 |
| 第十章 HCV 检测实验室生物安全和职业暴露..... | 71 |
| 1. HCV 检测实验室生物安全注意事项.....   | 71 |
| 2. HCV 职业暴露及处理措施.....       | 73 |
| 参考文献.....                   | 75 |

# 前 言

丙型肝炎是由丙型肝炎病毒（HCV）引起的一种主要经血液传播的疾病，HCV 慢性感染可导致肝脏慢性炎症和纤维化，部分患者可发展为肝硬化甚至肝细胞癌，对患者的健康和生命产生危害。据世界卫生组织统计，截至 2019 年全球约有 5800 万人患有慢性丙型肝炎，2019 年丙型肝炎新发感染约 150 万人，约有 29 万人死于 HCV 感染，其中大部分由肝硬化或肝细胞癌引起。2019 年仅有 21% 的慢性丙型肝炎患者得到诊断。世界卫生组织在 2016 年发布的《2016-2021 年全球卫生部门病毒性肝炎战略》中提出“到 2030 年消除作为主要公共卫生危害的病毒性肝炎”的目标，其中一个指标是到 2030 年 90% 以上的 HCV 感染者得到诊断。我国在 2021 年发布的《消除丙型肝炎公共卫生危害行动工作方案（2021-2030 年）》中要求加大丙型肝炎检测力度，提高检测发现率，实施医疗机构和重点人群“应检尽检”、大众人群“愿检尽检”策略、抗体阳性者“核酸检测全覆盖”策略。

HCV 感染的实验室检测为丙型肝炎患者的检测发现和诊断提供关键依据，并在评估抗病毒治疗效果以及鉴定病毒亚型和耐药性等工作中具有不可或缺的重要作用。自 2011 年发布《丙型肝炎病毒实验室检测技术规范（试行）》以来，HCV 感染检测技术不断发展，检测试剂性能显著提高，新的检测服务策略不断出现

并逐步推广应用。同时，丙型肝炎防治工作的推进对 HCV 检测提出了新的要求。

为实现 2030 年消除病毒性肝炎的目标,进一步加强我国 HCV 感染检测的规范性,提高实验室检测质量,中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心组织专家对《丙型肝炎病毒实验室检测技术规范》进行了修订。近年来由于直接抗病毒药物(DAAs)可使 95%以上的丙型肝炎患者得到治愈,世界卫生组织大力倡导简化 HCV 感染检测和诊断流程,缩短检测和诊断时间,以使丙型肝炎患者尽快得到治疗。本次修订工作参考了世界卫生组织以及国内外对 HCV 感染检测的最新指南和技术指导文件,充分考虑了 HCV 感染检测技术和检测策略的进步,广泛征集了丙型肝炎检测和防治等领域专家的修订建议,并结合了我国丙型肝炎防治工作的需求。修订后的《丙型肝炎病毒实验室检测技术规范(2023 版)》(以下简称《规范》)共分十章,包括:丙型肝炎病毒感染,样品的采集、保存和运输,HCV 抗体检测,HCV 核酸检测,HCV 抗原检测,HCV 感染检测流程,HCV 基因序列分析,HCV 细胞培养和中和抗体检测,HCV 检测实验室的室内质量控制及 HCV 检测实验室生物安全和职业暴露。新版《规范》将对进一步规范和提升我国 HCV 检测工作质量起到重要推动作用。

本《规范》参加编写和审核的单位:中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心、中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所、中国食品药品检定研究院、军事科学院军事医学研究院、

北京大学医学部、北京大学人民医院、北京地坛医院、北京友谊医院、上海市疾病预防控制中心、中国科学院上海巴斯德研究所、北京清华长庚医院、北京佑安医院、北京市红十字血液中心、中国医学科学院病原生物学研究所、中国医科大学第一临床学院。

本《规范》编写学术顾问：庄辉、蒋岩

本《规范》编写主持人：金聪

本《规范》编写人员：金聪、邢文革、沈立萍、饶慧瑛、贾继东、鲁凤民、王雅杰、周诚、钟劲、钟平、邱茂锋、李敬云

本《规范》审核人员：魏来、韩孟杰、刘中夫、葛利荣、吴昊、葛红卫、何玉先、姜拥军、李健、马丽英

本《规范》自发布之日起施行，同时终止《丙型肝炎病毒实验室检测技术规范（2011年版）》

本《规范》适用于全国所有的丙型肝炎病毒检测实验室。

本《规范》解释权属于中国疾病预防控制中心。

# 第一章 丙型肝炎病毒感染

丙型肝炎病毒 (Hepatitis C virus, HCV) 于 1989 年被正式命名, 之前曾称为肠道外传播的非甲非乙型肝炎病毒, 1991 年被归为黄病毒科 (Flaviviridae)。丙型肝炎是由 HCV 感染引起的一种肝脏炎症, 其严重程度从轻微病症到终身严重疾病, 包括肝硬化和肝癌。目前尚无针对丙型肝炎的有效疫苗, HCV 感染的预防主要依赖于在医疗卫生机构以及在高危人群中减少暴露风险。本章主要介绍了 HCV 的病毒学特点、传播途径和致病机制、感染分期和临床表现、感染检测标志物以及治疗方案。

## 1. HCV 病毒学特点

### 1.1 HCV 的病毒形态、基因组结构及复制周期

HCV 属于黄病毒科 (Flaviviridae) 的丙型肝炎病毒属 (Hepacivirus)。HCV 是有包膜的单股正链 RNA 病毒, 病毒体为球状颗粒, 直径约为 40~60nm, 去除包膜后暴露其中的核衣壳, 直径约为 33nm。

HCV 基因组长度约为 9.6kb, 编码单一的开放读码框 (open reading frame, ORF)。HCV 的 ORF 两侧分别为 5' 非编码区和 3' 非编码区, HCV 前体蛋白翻译起始于 5' 非编码区的内部核糖体位点 (internal ribosome entry site, IRES)。翻译启动后首先产生一个约 3000 个氨基酸的 HCV 前体蛋白。前体蛋白可被宿主蛋白酶加工成为组成病毒颗粒的三个结构蛋白 Core、E1 和 E2,

同时被 HCV 自身编码的蛋白酶和宿主蛋白酶共同加工，成为七个非结构蛋白 P7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B（图 1）。

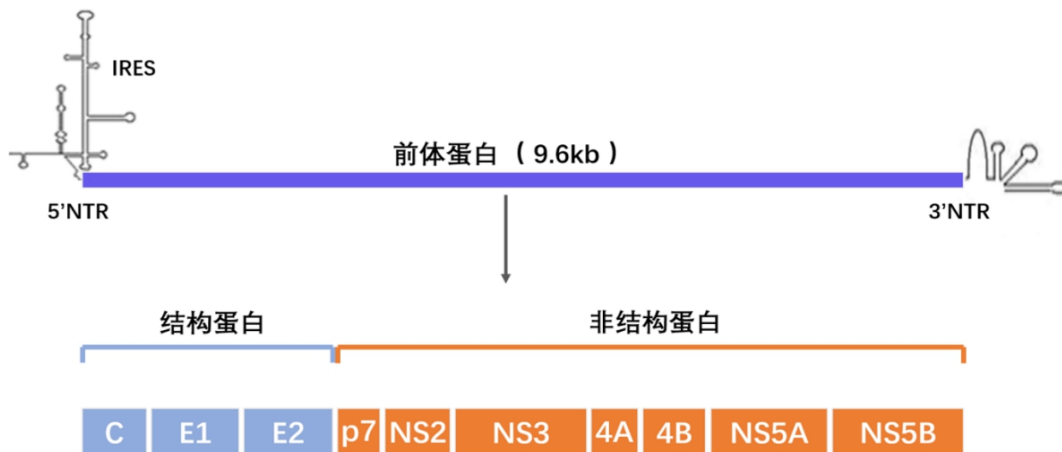


图 1 HCV 基因组结构

C：核衣壳；E1/E2：包膜糖蛋白；P7：离子通道；NS2：自身蛋白酶；NS3：丝氨酸蛋白酶（N 端 1/3）、解旋酶（C 端 2/3）；NS4A：丝氨酸蛋白酶辅助因子；NS4B：膜整合蛋白；NS5A：调节病毒复制和组装的因子；NS5B：RNA 依赖的 RNA 聚合酶

HCV 感染宿主肝细胞后经过病毒颗粒入胞、基因组翻译、RNA 复制以及成熟病毒颗粒的组装和释放完成整个复制周期，具体为：HCV 附着于肝细胞表面并与相关受体结合，通过内吞作用进入细胞并被转运到胞内体；胞内体的低 PH 环境促使 HCV 包膜与胞内体膜融合，触发了 HCV RNA 的脱壳和释放；HCV RNA 释放后由基因组中的 IRES 开始翻译生成前体蛋白，前体蛋白经蛋白酶切割为成熟的结构蛋白和非结构蛋白并与内质网膜紧密结合，其中 NS3/4A、NS4B、NS5A 和 NS5B 与病毒 RNA 及宿主细胞中参与复制

的蛋白组装成复制复合体，在 NS5B 聚合酶的催化下，以 HCV 正链 RNA 为模板启动负链 RNA 的合成，再以负链 RNA 为模板合成大量的正链 RNA；正链 RNA 和核心蛋白相接触并被包裹为核心颗粒，从内质网以出芽方式形成病毒颗粒，病毒颗粒经高尔基体由分泌途径出胞（图 2）。HCV 复制效率很高，每日复制的病毒颗粒可高达  $10^{12}$  个拷贝。

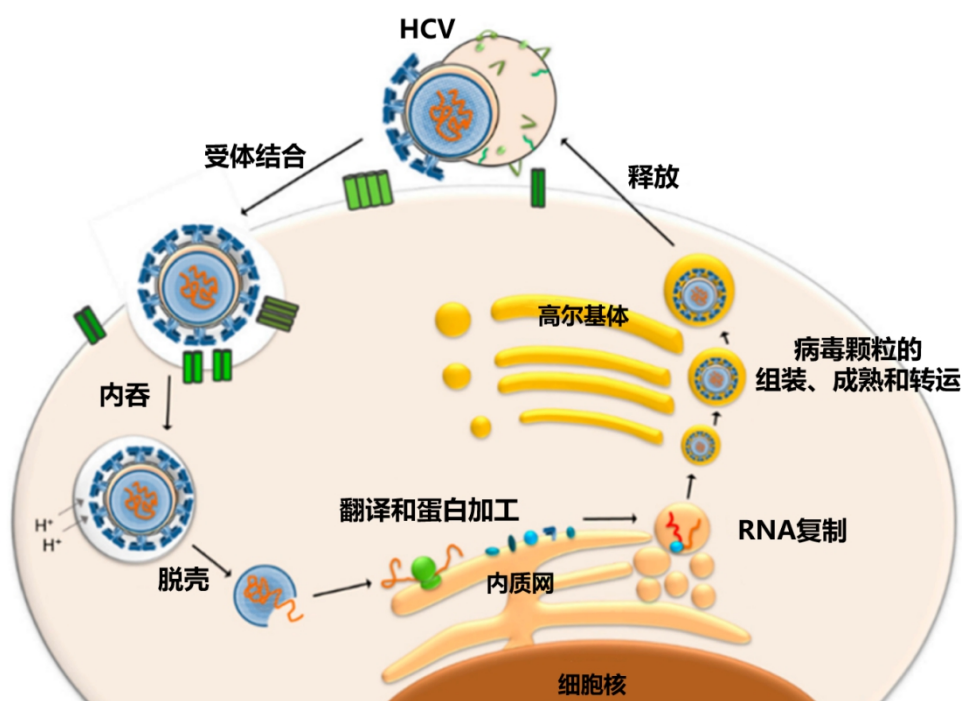


图 2 HCV 复制周期示意图

## 1.2 HCV 的分型

依据 HCV 基因组序列的同源性和进化距离大小，HCV 分为基因型和亚型，按照国际惯例以阿拉伯数字表示 HCV 基因型，以小写英文字母表示基因亚型，如 1a、2b、3c 等。HCV 主要分为 6

个基因型,HCV 基因型和亚型存在明显的地域分布差异。基因 1-3 型最普遍,呈全球性分布,其中 1a 和 1b 占有所有 HCV 感染的 60% 以上。1 型和 2 型主要流行于欧洲、美洲和亚洲;3 型主要流行于南亚地区;4 型主要流行于中非和中东地区;5 型主要流行于南非;6 型主要流行于东南亚地区。我国流行的 HCV 以 1b 和 2a 基因型较为常见,其中以 1b 型为主,约占 60%以上;其次为 2 型、3 型和 6 型,4 型和 5 型非常少见。

## **2. HCV 传播途径和致病机制**

HCV 的传播途径主要有三种,即血液传播,性接触传播和母婴垂直传播,血液传播是最主要的传播途径。我国自 1993 年对献血员筛查 HCV 抗体,2015 年开始对 HCV 抗体阴性的献血员实行 HCV RNA 筛查,目前通过输血或血液制品传播的现象较为少见。近年来我国 HCV 最主要的传播方式包括:使用被 HCV 污染的医疗器械进行侵袭性操作,以共享注射器具方式注射毒品等。HCV 不会通过母乳、食品或水源传播,也不会通过与感染者拥抱、握手、共用餐具等方式传播。

研究认为 HCV 感染的致病机制主要分为两个方面,一是细胞免疫介导的肝脏免疫损伤,即 HCV 感染肝细胞后诱发人体免疫反应,淋巴细胞、自然杀伤细胞等免疫细胞攻击肝细胞造成肝脏病理损害;二是 HCV 感染的直接致病作用,HCV 在肝细胞内复制干扰了肝细胞蛋白合成,引起肝细胞结构和功能改变,造成肝细胞变性和坏死,直接损害肝脏。

### 3. HCV 感染分期和临床表现

HCV 可引起急性或慢性感染。急性 HCV 感染者通常没有症状或症状轻微，约有 30%（15 - 45%）的感染者不经任何治疗即可在感染 6 个月之内（其中多数在出现症状后的 3 个月内）自行清除病毒，这一比例因地区和人群而异。其余 70%（55% - 85%）的急性 HCV 感染者会进展到慢性 HCV 感染，即感染持续 6 个月以上。如果不经有效治疗，部分慢性丙型肝炎患者可进展为肝硬化和肝细胞肝癌。

#### 3.1 急性丙型肝炎

约 80% 的急性 HCV 感染者在临床上通常表现为症状轻微或没有症状的亚临床感染。约 20%-25% 的患者表现为急性肝炎，通常为无黄疸型（约占 75%），仅有不到 1% 的患者可发生急性肝衰竭。部分急性 HCV 感染者可能出现乏力、食欲减退、恶心、腹胀和右季肋部不适或疼痛、尿色深、粪便苍白、关节疼痛，少数可伴有低热和黄疸等症状。

#### 3.2 慢性丙型肝炎

慢性丙型肝炎患者大多数无症状或仅有轻微症状，最常见的表现是乏力。部分患者有肝病面容、黄疸、肝掌、蜘蛛痣、以及轻度肝脾肿大。大多数慢性丙型肝炎患者的血清转氨酶（ALT）水平轻度升高，大约 1/3 的患者 ALT 水平正常。

#### 3.3 丙型肝炎肝硬化

慢性丙型肝炎患者中约 5-15% 可在 20 年内进展为肝硬化。代

偿期肝硬化的定义是有肝硬化的病理或影像、内镜、生化及临床证据，但没有发生腹水、食管胃静脉曲张破裂出血或肝性脑病等严重并发症者。丙型肝炎肝硬化患者大多数无明显症状，或仅有乏力、腹胀、食欲降低等非特异症状；部分患者可见肝病面容、黄疸、肝掌、蜘蛛痣、腹壁静脉曲张。实验室检查可见不同程度血清氨基转移酶升高、胆红素升高、白蛋白降低和血小板减少。内镜检查可见食管胃静脉曲张。影像学检查可见肝脏缩小、表面不光滑、裂隙增宽，肝实质呈颗粒样或结节样，门静脉增宽、脾脏增大、门体侧枝循环形成；肝脏弹性测定显示硬度增加。代偿期肝硬化每年有3-4%进展为失代偿期肝硬化，其定义是肝硬化患者发生腹水、食管胃静脉曲张破裂出血、肝性脑病等严重并发症。

### 3.4 HCV 相关肝细胞肝癌

绝大多数丙型肝炎所致的肝细胞肝癌（hepatocellular carcinoma, HCC）发生在肝硬化基础之上。在丙型肝炎肝硬化患者中，每年约有 2% - 4%可进展为 HCC。其诊断主要靠影像学检查，甲胎蛋白及其他肿瘤标志物可作为辅助指标。

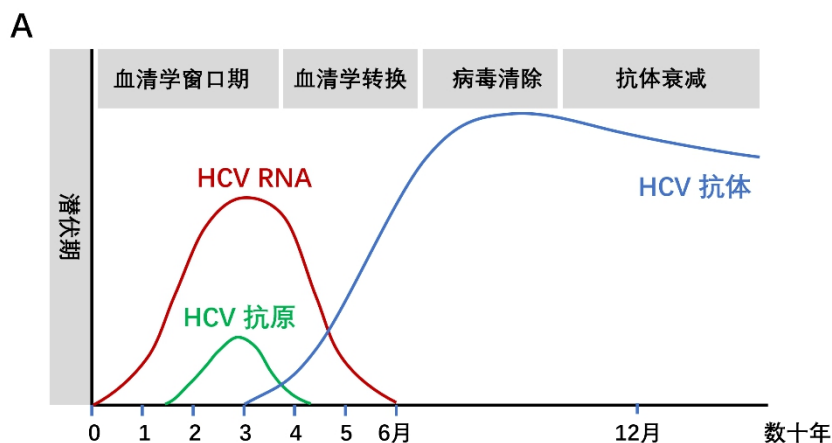
## 4. HCV 感染检测标志物

HCV 暴露后首先引起急性感染，即在暴露于 HCV 后 6 个月内出现 HCV 感染的标志物（先出现 HCV RNA 和 HCV 核心抗原 p22，随后出现 HCV 抗体）。在无抗病毒治疗的情况下，一部分 HCV 感染者通常在感染后 6 个月内自发清除 HCV 感染（图 3A），其余感染者因在 6 个月内未能清除病毒感染，转为慢性 HCV 感染，即

慢性丙型肝炎（图 3B）。感染过 HCV 后，HCV 抗体可持续存在，但其并非中和抗体，不能提供持久保护。无论感染者是自发清除病毒，还是在抗病毒治疗后治愈，可再次被同种基因型或不同基因型的 HCV 感染。

在 HCV 暴露 1-2 周后可检测到 HCV RNA，HCV RNA 达到高峰（ $10^5 \sim 10^7$  IU/mL）的时间略早于血清丙氨酸氨基转移酶（ALT）水平达到峰值和临床症状出现。以游离形式存在的 HCV 核心抗原 p22 与 RNA 水平呈正相关，使用灵敏的试剂也可较早被检测到。之后的 6-10 周可能仍无 HCV 抗体应答产生，这个时期被称作血清学检测“窗口期”，在此期间抗体无法被检测到。HCV 感染检测标志物的动态变化如图 3 所示。

近年来的一些报告提示存在隐匿性 HCV 感染，即在没有任何血清学标记物的情况下检测到 HCV RNA。隐匿性 HCV 感染可能是由于个体具有潜在的免疫抑制，例如艾滋病毒感染的人群。



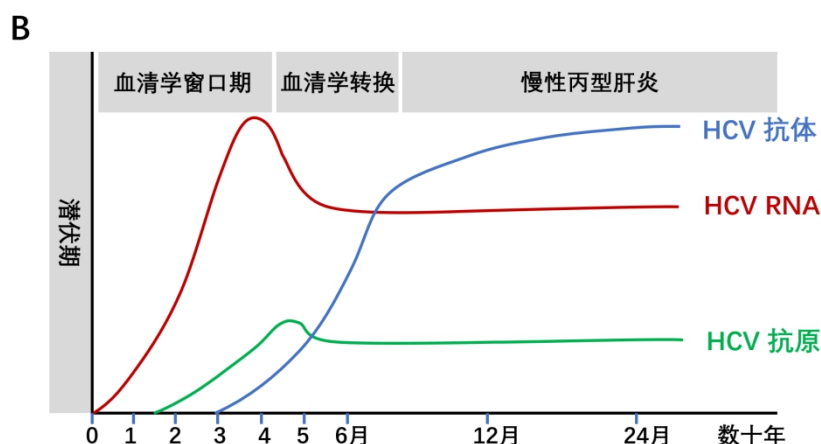


图3 HCV 感染检测标志物的动态变化

(A) 自限性 HCV 感染； (B) 慢性 HCV 感染

## 5. HCV 感染的治疗

聚乙二醇干扰素- $\alpha$  (Peg-IFN- $\alpha$ ) 联合利巴韦林方案 (PR) 曾是治疗慢性丙型肝炎的标准抗病毒方案。其 1 年疗程的总体持续病毒学应答率 (sustained virologic response, SVR) 为 60% 左右，对 HCV 基因型 1、4 型疗效较差 (SVR 为 44%~53%)，对 2、3 型疗效较好 (73%)。但是其副作用较大，而且不适用于失代偿期肝硬化患者，现临床上已经不再应用。

目前临床抗病毒治疗方案应用直接抗病毒药物 (direct acting antiviral agents, DAAs) 有效阻断 HCV 在肝内的复制。DAAs 是一类小分子化合物，通过抑制 HCV 生命周期中特异性的蛋白或酶，例如 HCV 非结构蛋白 NS3/4A、NS5A 和 NS5B 等，发挥抗病毒作用。DAAs 主要包括 NS3/4A 蛋白酶抑制剂、NS5A 蛋白抑制剂和 NS5B 聚合酶抑制剂等。NS3/4A 蛋白酶抑制剂类包括

有：格拉瑞韦、格卡瑞韦、达诺瑞韦、伏西瑞韦等，NS5A 蛋白抑制剂包括有：达拉他韦、维帕他韦、可洛派韦、哌仑他韦、艾尔巴韦、来迪派韦、依米他韦、拉维达韦等，NS5B 聚合酶抑制剂包括有索磷布韦等。世界卫生组织指南推荐的 DAAs 方案为：索磷布韦/维帕他韦、格卡瑞韦/哌仑他韦、索磷布韦联合达拉他韦，均是泛基因型方案。我国《丙型肝炎防治指南》（2022 版）首先推荐泛基因型方案。根据药物的疗效、安全性以及可及性，我国推荐的泛基因型 DAAs 方案为：索磷布韦/维帕他韦、可洛派韦联合索磷布韦，泛基因型方案针对 HCV 各型均有效（不论是否有肝硬化，包括干扰素初治和经治）。针对 HCV 基因 1b 型的治疗，我国推荐的方案包括：艾尔巴韦/格拉瑞韦、来迪派韦/索磷布韦、依米他韦联合索磷布韦、达诺瑞韦/利托那韦联合拉维达韦及利巴韦林。95%以上的慢性丙型肝炎患者经过 12 周 DAAs 治疗后可获得 SVR，获得 SVR 后可改善肝功能、逆转肝纤维化、降低肝硬化失代偿以及 HCC 的发生率，改善预后以及提高生活质量。

## 参考文献

1. Steven Roger, Alexandra Ducancelle, H é l è n e Le Guillou-Guillemette, et al. HCV virology and diagnosis. Clinics and research in hepatology and gastroenterology 2021;45(3):101626.
2. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, et al. Structural biology

- of hepatitis C virus. *Hepatology*, 2004, 39(1): 5–19
- Moradpour, D, Penin, F, Rice MF. Replication of Hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(6):453–63.
3. Moradpour, D, Penin, F, Rice MF. Replication of Hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(6):453–63.
  4. Gerresheim GK, Roeb E, Michel AM, et al. Hepatitis C Virus Downregulates Core Subunits of Oxidative Phosphorylation, Reminiscent of the Warburg Effect in Cancer Cells. *Cells*. 2019 Nov 8;8(11):1410.
  5. Borgia SM, Hedskog C, Parhy B, et al. Identification of a novel hepatitis C virus genotype from Punjab, India: expanding classification of hepatitis C virus into 8 genotypes. *J. Infect. Dis.*, 2018, 218 (11):1722–1729
  6. Shah R, Ahoegbe L, Niebel M, et al. Non-epidemic HCV genotypes in low- and middle-income countries and the risk of resistance to current direct-acting antiviral regimens [J]. *Journal of hepatology*, 2021, 75(2): 462–73.
  7. Lu L, Nakano T, He Y, et al. Hepatitis C virus genotype distribution in China: predominance of closely related subtype 1b isolates and existence of new genotype 6

- variants [J]. Journal of medical virology, 2005, 75(4): 538-49.
8. WHO. Hepatitis C[EB/OL]. [2023-06-7]  
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>.
  9. WHO. Guidelines on Hepatitis B and C Testing[M]. Geneva: World Health Organization, 2017.
  10. AASLD-IDSA HCV Guidance Panel. Hepatitis C Guidance 2018 Update: AASLD-IDSA Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C Virus Infection. Clin Infect Dis. 2018;67(10):1477-1492.
  11. Kanwal F, Singal AG. Surveillance for Hepatocellular Carcinoma: Current Best Practice and Future Direction. Gastroenterology. 2019;157(1):54-64.
  12. Lucia Parlati, Clémence Hollande, Stanislas Pol. Treatment of hepatitis C virus infection. Clinics and research in hepatology and gastroenterology 2021 Jul; 45(4): 101578.
  13. Yee BE, Nguyen NH, Zhang B, et al. Sustained virological response and its treatment predictors in hepatitis C virus genotype 4 compared to genotypes 1,

- 2, and 3: a meta-analysis. *BMJ Open Gastroenterol.* 2015;2(1):e000049.
14. Rockey DC, Friedman SL. Fibrosis Regression After Eradication of Hepatitis C Virus: From Bench to Bedside. *Gastroenterology.* 2021;160(5):1502–1520.
15. Calvaruso V, Cabibbo G, Cacciola I, et al. Incidence of Hepatocellular Carcinoma in Patients With HCV-Associated Cirrhosis Treated With Direct-Acting Antiviral Agents. *Gastroenterology.* 2018;155(2):411–421.
16. European Association for the Study of the Liver. EASL recommendations on treatment of hepatitis C: final update of the series. *J Hepatol* 2020; 73(5): 1170–218.
17. 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学会. 丙型肝炎防治指南 (2022 年版) [J]. *中华肝脏病杂志*, 2022, 30(12): 1332–1348.

## 第二章 样品的采集、保存和运输

本章介绍了用于 HCV 感染检测的全血、血清、血浆、干血斑等样品的采集和处理方法，适用于 HCV 抗体、抗原、核酸和基因型检测。样品采集按照试剂盒说明书及临床样品采集标准操作规程进行。样品采集后的保存、运输条件应参照不同检测系统对样品保存、运输的要求执行。

### 1. 样品采集

#### 1.1 采样前准备

根据检测项目的具体要求，在样品采集前应制定详细的样本采集方案，比如确定采集样品的种类，保存及运输的时限和方法，确认样品储存条件。采样前应检查所需物品，比如采血用具、皮肤消毒用品、采血管和废弃物容器等是否已备齐，是否在有效期内。尤其关注受检者信息与样品容器表面的标记是否一致，并注明样品采集时间及唯一编码，保证检验样品的记录可追溯。

#### 1.2 血液样品采集

采集血液样品宜选择适宜的室内（外）空间，患者取卧位或坐位，按照临床采血技术要求操作。

静脉血：静脉血采集按照卫生行业标准，消毒局部皮肤，用加有抗凝剂的真空采血管抽取适量静脉血，或用一次性注射器抽取静脉血转移至加有抗凝剂的试管中，轻轻颠倒混匀 10-15 次，

以防止血液凝固。

末梢全血：将采血部位局部消毒后，采用无菌采血针穿刺取血，成人采血部位以左手无名指为宜，1岁及以下婴幼儿通常自拇指或足跟两侧采血，应该尽量避免从耳垂处取血。

干血斑：穿刺采集的末梢血或抽取的静脉血约 50-100 $\mu$ l 滴加在滤纸上，注意不要让血液滴落在其它物体表面造成污染。置 50℃烘箱中干燥 15 分钟或在常温放置 5 小时以上，待血样干燥后即制成干血斑，包装好后送检。

血清：将采集的静脉血在室温自然放置 1-2 小时，待血液凝固和血块收缩后离心，即可得到血清。

血浆：将采集的抗凝静脉血进行离心即可分离得到血浆。用于核酸 RNA 检测的血浆样品，要求使用不含抗凝剂或含 EDTA 或 ACD 抗凝剂的无菌真空采血管及配套采血器静脉采血。如进行 PCR 检测，不能使用含肝素抗凝剂的采血管，避免 PCR 反应受到抑制。

## 2. 样品的接收、保存和运输

### 2.1 样品接收

2.1.1 样品接收前应检查送检样品的完整性，运送是否符合要求，查看样品送检登记表填写情况，核对样品与化验单是否符合，检查样品管有无破损和溢漏、干血斑样品包装是否完整等情况。如发现溢漏应立即将尚存留的样品移出，对样品管和容器消毒。

2.1.2 查看样品的质量，如血液样品有无严重溶血、微生物污染、乳糜血、黄疸等，记录并明确样品状况对相应的检测是否造成影响。对于不合格样品，实验室需通知临床重新采集并进行记录。

2.1.3 及时登记有关参数，包括样品试管上的相关资料如受检者代号、试管编号、性别、年龄以及送检单位和送检日期等。

## 2.2 样品保存

静脉血液标本采集后应及时送检，在 4-6 小时内完成送检及离心分离血清/血浆。用于 HCV RNA 检测的样品建议在 4 小时内送至实验室。

用于抗体或抗原检测的血清或血浆样品如在 1 周内进行检测，可存放于 2-8℃。用于 HCV RNA 检测的血清或血浆样品如在 72 小时内进行检测，可存放于 2-8℃。所有样品长期保存超过 2 周时，应置于-80℃保存。

## 2.3 样品运输

2.3.1 全血样品在短时间可送达时，如 10 分钟左右，可在室温下运送；如需长途运输或气温较高时，需在 2℃-10℃的冷藏条件下运送，固定冰点材料应放置在血液的最上层，并且不得与血液直接接触。运输全血时，不得使用-65℃或以下温度条件下制备的固定冰点材料或干冰。

2.3.2 冻存的血清或血浆样品应使用-18℃或以下温度条件下制备的固定冰点材料或干冰在冰冻条件下运送。

### 2.3.3 样品运送必须有记录并符合生物安全要求。

#### 参考文献

1. 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 静脉血液标本采集指南: WS/T 661- 2020[S]. 北京: 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 2020.
2. 国家标准化管理委员会. 人类血液样本采集与处理: GB/T 38576-2020[S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2020.
3. WHO. Guidelines on Hepatitis B and C Testing[M]. Geneva: World Health Organization, 2017.
4. 中国合格评定国家认可委员会. 医学实验室质量和能力认可准则的应用要求: CNAS-CL02-A001[S]. 北京: 中国合格评定国家认可委员会, 2021.

## 第三章 HCV 抗体检测

本章介绍了 HCV 抗体的检测方法、检测方法的选择和应用等。

### 1. HCV 抗体检测方法

HCV 抗体检测方法主要分为酶联免疫吸附试验、化学发光免疫分析试验、快速检测试验、和免疫印迹试验等。

#### 1.1 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)

间接法酶联免疫吸附试验检测 HCV 抗体的基本原理是以 HCV 抗原包被固相载体,用辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG 与被检样品中的 HCV 抗体反应,以邻苯二胺(OPD)或 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)等底物显色后,利用酶标仪等仪器进行定性结果判断。其主要反应过程如下:加入经样品稀释液稀释的被检样品,样品中的 HCV 抗体与抗原结合,形成固相抗原抗体复合物;其他免疫球蛋白及样品中的杂质由于不能与固相抗原结合,在洗涤过程中被洗去;加酶标抗人 IgG 与固相复合物中的抗体结合;洗涤后,固相载体上的酶量相应显示特异性抗体的量;加底物显色后加入终止液,利用酶标仪等仪器分析结果。

双抗原夹心法酶联免疫吸附试验也应用于 HCV 抗体的检测,使用 HCV 抗原包被固相载体,加入生物素化 HCV 抗原与被检样品中 HCV 抗体的混合物进行反应,形成“包被抗原-抗体-生物素抗

原”结构的免疫复合物，并结合在固相载体上。通过洗涤去除未结合的生物素抗原和抗体，再加入辣根过氧化物酶标记的亲合素，形成“包被抗原-抗体-生物素抗原-酶标记亲合素”结构的免疫复合物，加底物显色后加入终止液，利用酶标仪等仪器分析结果。

## 1.2 化学发光免疫分析试验 (chemiluminescence immunoassay, CLIA)

化学发光免疫分析试验是将具有高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫反应相结合，用于各种抗原、半抗原、抗体等的检测分析技术。HCV 抗体的化学发光免疫分析试验与酶联免疫吸附试验原理相同，采用间接法或双抗原夹心法原理检测 HCV 抗体，通过自动化程度较高的化学发光仪分析结果。化学发光免疫分析试验根据不同的标记方法分为两种：

1.2.1 化学发光标记免疫分析试验：化学发光标记免疫分析试验又称化学发光免疫分析试验 (CLIA)，是一种用化学发光剂直接标记抗原或抗体的免疫分析方法。常用于标记的化学发光物质有吖啶酯类化合物—acridiniumester (AE)，是有效的发光标记物，通过启动发光试剂而发光，强烈的直接发光可在一秒钟内完成，为快速的闪烁发光。吖啶酯作为标记物用于免疫分析，其化学反应简单、快速、无须催化剂。检测小分子抗原采用竞争法，检测大分子抗原则采用夹心法，非特异性结合少，本底低；与大分子的结合不会减小所产生的光量，从而增加灵敏度。

1.2.2 化学发光酶免疫分析试验：从标记免疫分析角度，

化学发光酶免疫分析试验 (chemiluminescent enzyme immunoassay, CLEIA) 应属于酶免疫分析, 只是反应的底物是发光剂, 操作步骤与酶联免疫吸附试验完全相同。以酶标记抗原或抗体进行免疫反应, 免疫反应复合物上的酶再作用于发光底物。该方法又分为如下三类:

1.2.2.1 HRP 标记的 CLEIA: 常用的底物为鲁米诺或其衍生物如异鲁米诺, 是一类重要的发光试剂。鲁米诺的氧化反应在碱性缓冲液中进行, 在过氧化物酶及活性氧 (过氧化阴离子  $O_2^-$ , 单线态氧  $O_2$ , 羟自由基  $OH\cdot$ , 过氧化氢  $H_2O_2$ ) 存在下生成激发态中间体, 当其回到基态时发光, 其波长为 425nm。早期用鲁米诺直接标记抗原或抗体, 但标记后发光强度降低而使灵敏度受到影响。近来用过氧化物酶标记抗体, 进行免疫反应后利用鲁米诺作为发光底物, 在过氧化物酶和启动发光试剂 ( $NaOH/H_2O_2$ ) 作用下, 鲁米诺发光, 发光强度依赖于酶免疫反应物中酶的浓度。

1.2.2.2 增强发光酶免疫分析 (enhanced luminescence enzyme immunoassay, ELEIA): 在发光系统中加入增强发光剂以增强发光信号, 并在较长时间内保持稳定, 便于重复测量, 从而提高分析灵敏度和准确性。

1.2.2.3 ALP 标记的 CLEIA: 所用底物为环 1, 22 二氧乙烷衍生物, 用于化学发光酶免分析底物而设计的分子结构中包含起稳定作用的基团—金刚烷基, 其分子中发光基团为芳香基团和酶作用的基团, 在酶及启动发光试剂作用下引起化学发光。

### 1.3 快速检测试验 (rapid diagnostic tests, RDTs)

快速检测试验是一种简便的检测方法，可在 30 分钟内通过人工肉眼判读得到定性结果。快速检测试验主要使用免疫胶体金技术，主要分为以下两类：

1.3.1 免疫渗滤试验 (immunofiltration test)：以硝酸纤维膜为载体，HCV 抗原以点状固定在膜上，加待检样品。阳性结果在膜上抗原部位显示出有色斑点。有效试验的质控点必须显色。

1.3.2 免疫层析试验 (immunochromatographic test)：以硝酸纤维膜为载体，HCV 抗原以线状固定在膜上，待检样品沿着固相载体迁移，阳性结果在膜上抗原部位显示出有色条带。有效试验的质控线必须显色。

### 1.4 免疫印迹试验 (western blot, WB)

免疫印迹试验一般将HCV的多种抗原成分喷涂在硝酸纤维薄膜条上，并设置了两种不同浓度的人IgG对照带和一条hSOD对照带，用于内部对照和结果判断。其诊断HCV感染的敏感性高、特异性强，可检测针对HCV不同抗原的抗体，且不需要特殊的仪器设备。但这类检测方法比其他血清学检测方法的成本更高，而且有较高比例的不确定结果。

### 1.5 HCV 抗体抗原联合检测试验

近年来一类可以同时检测HCV抗体和核心抗原的HCV抗体抗原联合检测试验（包括酶免法及发光法）在国内外应用，我国也

有产品获得了注册。HCV抗原和HCV抗体联检试验的原理是基于双抗体夹心法检测HCV核心抗原，或基于双抗原夹心法检测HCV抗体。

## 2. HCV 抗体检测方法的选择和应用

HCV 抗体检测广泛应用于个体的筛查检测和临床诊断、献血员筛查和原料血浆筛查、流行病学监测等。酶联免疫吸附试验、化学发光试验和快速试验多用于 HCV 感染的血清学筛查检测，免疫印迹试验可用于确认血清学抗体筛查检测试验的阳性结果。基于抗体的检测不能用于诊断 HCV 现症感染。

在具备实验室检测条件或每天承担大量检测的情况下，建议采用基于实验室的检测方法，比如酶联免疫吸附试验和化学发光免疫分析试验，进行筛查检测，具有更高的成本效益。

快速检测试剂的操作简单、反应时间快（30 分钟之内），可在检测当天获得结果。大多数快速检测试剂使用指尖血，可由经过培训的基层卫生工作人员操作。因此在不具备实验室检测条件的资源有限环境中或者外展检测中建议使用快速检测试剂，可以极大促进 HCV 检测的可及性，加强转介和减少感染者随访过程中的流失。与基于实验室的筛查检测试剂相比，HCV 抗体的快速检测试剂具有可接受的敏感性和特异性。但快速检测试剂的局限性是一般不适用于检测大量血液样品，结果读取依赖于主观判断，原始检测结果不能永久保存等。

世界卫生组织在 2021 年提出 HCV 筛查检测可以由个体使用 HCV 抗体快速检测试剂进行自我检测。自我检测是个体为了解感

染状况，在私密环境下自己收集样品进行测试并读取结果的过程。目前，丙型肝炎自我检测的应用经验还非常有限，但这是未来扩大检测的一种潜在的重要方法。

HCV抗体抗原联合检测主要用于HCV感染的筛查检测，因为HCV抗原可以比HCV抗体更早被检测到，加入抗原可以提高早期感染检测的敏感性，并缩短抗体检测试剂的检测窗口期，但不能区分既往感染和现症感染，也不能区分急性和慢性丙型肝炎病毒感染。

需要注意的是，仅进行抗体检测，可能出现假阳性或假阴性的结果。在一些自身免疫性疾病患者中，可出现HCV抗体检测结果的假阳性。如怀疑HCV抗体检测结果假阳性，可使用另一种抗体检测试剂再次检测确认抗体阳性结果。此外，在存在免疫功能抑制的患者中，比如存在艾滋病、恶性肿瘤化学治疗、造血干细胞移植、实体器官移植、血液透析、低 $\gamma$ -球蛋白血症、全身使用糖皮质激素等情况下，HCV抗体检测结果可能出现假阴性。对于近6个月内暴露于HCV的急性HCV感染者，也可出现HCV抗体检测结果的假阴性。如怀疑HCV抗体检测结果假阴性，应进行HCV核酸检测以确认感染情况。

## 参考文献

1. 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 丙型肝炎诊断: WS213-2018[S]. 北京: 中华人民共和国国家卫生和计划生育

- 委员会, 2018.
2. WHO. Guidelines on Hepatitis B and C Testing[M]. Geneva: World Health Organization, 2017.
  3. Chevaliez S. Strategies for the improvement of HCV testing and diagnosis. Expert Rev Anti Infect Ther. 2019;17(5):341-347.
  4. Chevaliez S, Pawlotsky JM. New virological tools for screening, diagnosis and monitoring of hepatitis B and C in resource-limited settings. J Hepatol. 2018;69(4):916-926.
  5. WHO. Accelerating access to hepatitis C diagnostics and treatment[M]. Geneva: World Health Organization, 2021.
  6. Manns MP, Buti M, Gane E, et al. Hepatitis C virus infection. Nat Rev Dis Primers. 2017;3:17006.
  7. Forns X, Costa J. HCV virological assessment. J Hepatol. 2006;44(1 Suppl):S35-S39.
  8. WHO. Recommendations and guidance on hepatitis C virus self-testing[M]. Geneva: World Health Organization, 2021.

## 第四章 HCV 核酸检测

本章介绍了 HCV 核酸检测的方法，检测方法的选择和应用等。

### 1. HCV 核酸检测方法

HCV 核酸检测包括 HCV RNA 的定性检测和定量检测。目前商业化 HCV RNA 检测试剂的主要实验原理基于聚合酶链式反应（polymerase chain reaction, PCR）技术，在我国临床实验室以荧光定量 PCR 技术为主，其他检测技术原理还包括转录介导的扩增技术等。

#### 1.1 实时荧光定量 PCR 技术

实时荧光定量 PCR 技术是在传统逆转录 PCR（RT-PCR）基础上，应用结合荧光共振能量转移（fluorescence resonance energy transfer, FRET）原理设计不同的荧光探针，对扩增核酸片段进行定量检测。主要包括三个步骤：① 提取样品中的 HCV RNA；② 对提取的 HCV RNA 进行逆转录和 PCR 扩增；③ 实时荧光检测 PCR 扩增产物。

#### 1.2 转录介导的扩增技术（transcription-mediated amplification, TMA）

TMA 的原理是利用 MMLV 逆转录酶和 T7 RNA 聚合酶的共同作用，在恒温条件下扩增 RNA。TMA 使用的引物含有 T7 RNA 聚合酶结合位点，使得反转录合成的 cDNA 可以作为 T7 RNA 聚合酶的模板，在 T7 RNA 聚合酶的作用下合成大量的 RNA 拷贝。扩增出来的 RNA 重新进入 TMA 循环，成为下一轮复制的模板。TMA 优点包

括特异性强、灵敏度高、检测用时较短、反应条件简单、扩增在恒温进行，无需专门的热循环仪器。

## 2. HCV 核酸检测方法的选择和应用

HCV 核酸定性检测能够快速和灵敏地检测出病毒核酸，可应用于临床诊断和献血员筛查。HCV 核酸定量检测可应用于临床诊断及治疗效果评估。目前，HCV 核酸定量检测试剂的最低定量限可以达到 15 IU/mL，与核酸定性检测试剂的最低检测限相近。

### 2.1 HCV 感染诊断

对于成年人和 18 月龄以上儿童、青少年，如果血清学筛查检测结果为阳性，HCV RNA 的定性和定量检测均可作为确认病毒感染的首选策略。对 HCV 感染高风险人群，或者近期有明确流行病学史、临床表现呈急性丙型肝炎特征且排除免疫抑制状态的个体，若血清学筛查检测为阴性，也可直接进行 HCV RNA 检测，以及时发现急性期感染和窗口期感染。

HCV 感染者自愈或经过治疗清除病毒后，虽然 HCV 抗体可以长期在体内存在并被检测到，但没有保护效果，个体仍可再次被 HCV 感染。对于曾经感染过 HCV 的个体，如果怀疑自己再次感染了 HCV，需要进行 HCV RNA 检测以确认再次感染。

HCV 感染的母婴传播率约为 5%，约 25%至 50%的 HCV 感染儿童可在 4 岁前自愈。由于母体的 HCV 抗体可以通过胎盘进入胎儿体内并可存在 18 个月，18 月龄以下儿童的 HCV 抗体阳性并不一定代表 HCV 感染。对于 18 月龄以下儿童，HCV 感染只能通过 HCV

RNA 检测进行确认。新生儿如在母亲分娩时发生 HCV 感染，在出生后 1-2 周可在血清中检测到 HCV RNA。由于对 2 个月至 6 个月的 HCV 暴露儿童进行 HCV RNA 检测能得到可靠的阳性和阴性结果，并且与 18 个月时的最终检测结果相关，美国肝病协会（AASLD）在 2021 年发布的指南中建议最早可在 2 个月时进行 HCV RNA 检测。我国丙型肝炎诊断行标建议 6 个月后复查 HCV RNA 仍为阳性者，可确诊为慢性 HCV 感染。

近年来，HCV 核酸即时检测（point-of-care testing, POCT）商业化试剂的发展扩大了 HCV 感染检测服务可及性，特别是在社区可以诊断 HCV 现症感染以及监测治疗效果。POCT 能够在现场环境中进行实验室定性和定量核酸检测，可避免样品长途运输导致的质量下降，并且比基于实验室的核酸检测方法更加容易使用。POCT 核酸检测通常可在 1-2 小时内提供结果。HCV 抗体快速检测可与 HCV RNA 即时检测联合使用，在当天诊断 HCV 现症感染。

## 2.2 血液筛查

HCV RNA 定性检测可用于血液筛查。采用单份样品或多样品集合的方法，对采供血机构的献血员血液及单采血浆站的原料血浆进行核酸检测，降低输血残余危险度。

## 2.3 抗病毒治疗监测及疗效评估

检测 HCV 病毒血症对评估治疗效果很重要。在引入治疗性口服 DAAs 治疗方案之前，基于干扰素（IFN）的治疗方案需要在治疗过程中频繁监测 HCV 病毒载量水平，以决定是否应该停止治疗，

或缩短治疗时间。此前，这些检测包括在治疗第 4 周检测病毒载量以帮助预测治疗的效果，然后在第 12 周再次检测病毒载量以监测早期病毒反应（EVR），最后在治疗完成后的第 12 和 24 周通过检测病毒载量评价治愈效果（即持续病毒学应答 SVR12 或 SVR24）。

引入新的 DAAs 治疗方案后，已不再进行这些系列检测，因为病毒突破的几率相对较低，而且病毒载量下降的速度与 SVR 无关。大多数接受 DAAs 治疗的人，在开始治疗 4 周后就无法检测到病毒载量。对于所有基于 DAA 治疗方案的临床研究，治疗后 12 周采用高灵敏核酸检测方法（检测下限低于 15 IU/mL）检测不到 HCV RNA 是评估治疗结果和治愈的终点（SVR12）。如果 SVR12 无法实现，可以考虑以治疗后 24 周作为替代的 SVR 时间点（SVR24）评估治愈。HCV RNA 的定性或定量检测均可用于在抗病毒治疗结束后的 12 周或 24 周评估治愈情况。HCV RNA 定量检测还可应用于基线病毒载量检测以及判断抗病毒治疗疗效，指导抗病毒治疗方案。HCV RNA 的 POCT 检测可用于在就诊当天及时评估治愈情况。

#### 2.4 应用于干血斑样品的检测

一些 HCV 核酸检测试剂可以对干血斑（dried blood spot, DBS）样品进行检测，检测结果与血清、血浆样品的检测结果相近。因此，在基础设施不足或无法及时运送样品到核酸检测实验室的地区，可使用干血斑样本进行 HCV 核酸检测。

## 参考文献

1. 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 丙型肝炎诊断: WS213-2018[S]. 北京: 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 2018.
2. WHO. Accelerating access to hepatitis C diagnostics and treatment[M]. Geneva: World Health Organization, 2021.
3. WHO. Updated recommendations on simplified service delivery and diagnostics for hepatitis C infection[M]. Geneva: World Health Organization, 2022.
4. WHO. Guidelines on Hepatitis B and C Testing[M]. Geneva: World Health Organization, 2017.
5. Michael P Manns, et al. Hepatitis C virus infection. Nat Rev Dis Primers. 2017,2;3:17006。
6. Bhattacharya D, Aronsohn A, Price J, et al. AASLD-IDSA HCV Guidance Panel . Hepatitis C Guidance 2023 Update: AASLD-IDSA Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C Virus Infection [published online ahead of print, 2023 May 25]. Clin Infect Dis. 2023; ciad319.
7. Maheshwari A, Ray S, Thuluvath PJ. Acute hepatitis C. Lancet. 2008;372(9635):321-332.

8. Forns X, Costa J. HCV virological assessment. J Hepatol. 2006;44(1 Suppl):S35-S39.
9. 体外诊断试剂注册与备案管理办法[J]. 中华人民共和国国务院公报, 2021, No. 1752(33): 76-88.

## 第五章 HCV 抗原检测

本章介绍了 HCV 抗原检测的方法、检测方法的选择和应用等。

### 1. HCV 抗原检测方法

HCV 核心抗原 (HCV cAg) p22 是 HCV 的一种核衣壳多肽, 在病毒组装过程中释放到血浆中, 可以在 HCV 感染早期和整个 HCV 感染过程中检测到。已有的商业化检测试剂可用于 HCV 核心抗原的独立检测。

#### 1.1 基于酶联免疫法的 HCV 抗原检测

抗原检测 ELISA 试剂采用双抗体夹心法定性或定量检测样品中游离的 HCV 核心抗原或总核心抗原 (包括游离核心抗原和核心抗原-抗体复合物)。其基本实验原理是: 以核心抗原免疫小鼠后获得的 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 HCV 核心抗原单克隆抗体作为辣根过氧化物酶标记物, 与样品中游离的或总的 HCV 核心抗原反应, 通过

OPD显色进行定性或定量测定。

大部分 HCV 抗原检测试剂检测的是样品中游离核心抗原以及和 HCV 抗体结合的核心抗原,因此在进行检测之前需要加入尿素、盐酸及去垢剂等,以解离样品中的核心抗原-抗体免疫复合物。其它操作程序与一般的 ELISA 或发光技术操作基本相同,即:加入待测样品孵育后,洗去未结合的成分;加入酶标记或发光物质标记的核心抗原二抗,孵育后显色,再加入终止液终止显色;用酶标仪计读取 S/CO 值进行阴性和阳性反应的判断。

将 HCV 抗原的标准物质稀释成不同浓度的系列标准,还可进行 HCV 抗原的定量检测。以横坐标为 HCV 抗原浓度 (pg/ml),纵坐标为 OD 值,绘制出标准曲线。检测得到待测样品的 OD 值后,通过标准曲线计算抗原浓度。如果待测样品的 OD 值超出标准曲线上最高抗原浓度的 OD 值,则需用阴性血清或血浆将样品稀释后再进行检测。

## 1.2 基于化学发光法的HCV抗原检测

化学发光法应用于 HCV 抗原检测,其原理与 ELISA 方法相同,微粒子作为固相载体使用增强了试剂的检测灵敏度,通过预激发液和激发液产生化学发光反应,测量的相对发光单位 (RLU) 与样品中 HCV 核心抗原成正比,通过四参数 Logistic 曲线拟合定量检测,具有线性范围较广的优势。高敏感的试剂对检测样品也提出严格要求,不能使用热灭活样品、严重溶血样品、受微生物污染样品,含纤维蛋白、红细胞或其他颗粒物质血清和血浆样

品需离心处理,尸体样品或除人血清和血浆之外的其他体液样品的检测尚不明确。

## 2. HCV 抗原检测方法的选择和应用

### 2.1 作为HCV RNA检测的替代方法用于诊断HCV现症感染

在无法进行核酸检测时,可以考虑选择与核酸检测技术具有相似临床敏感性的 HCV 核心抗原检测作为替代方法,用于诊断 HCV 现症感染。因为 HCV 核心抗原检测可以利用现有的血清学检测平台,检测 HCV 核心抗原的血清学方法比核酸检测具有更低的成本,更适于在基层检测实验室使用。

尽管 HCV 核心抗原检测试剂的灵敏度不如 HCV 核酸检测,一些性能良好的 HCV 核心抗原检测试剂具有较高灵敏度,有研究显示最灵敏的 HCV 核心抗原检测试剂的检测限为 3 fmol/L 或 0.06 pg/mL,相当于 HCV 核酸检测限约 1000-3000 IU/mL,可检测出 95%以上的慢性 HCV 感染,但阴性的结果并不能排除 HCV 现症感染的可能。有荟萃研究显示当病毒载量超过 3000 IU/mL 时,HCV 核心抗原和 HCV RNA 之间存在高度相关性。但有研究显示不同 HCV 核心抗原检测试剂的灵敏度和特异性存在较大差异。

### 2.2 急性丙型肝炎的辅助诊断

HCV核心抗原检测还可应用于HCV血清阳转前的早期急性丙型肝炎辅助诊断,尤其有助于检测处于窗口期的HCV感染者。

### 2.3 其他潜在的应用

HCV核心抗原检测可用于HCV阳性母亲所生婴儿是否罹患丙型肝炎的辅助诊断。关于HCV核心抗原检测是否可以替代HCV RNA检测用作评估HCV抗病毒治疗效果和评估治愈的工具，仍然存在争议，主要由于HCV核心抗原作为治疗评估工具的研究结果有限，比如DAAs治疗后HCV核心抗原的动力学，以及使用HCV核心抗原监测DAAs方案治愈效果的最佳检测时间点仍不明确等。

由于HCV核心抗原检测比HCV抗体出现得早（在HCV RNA出现后1-2天），未来HCV核心抗原检测也有可能被应用于筛查检测，但有研究显示这种策略只有在发病率非常高的情况下才具有成本效益。在免疫受损或先天性免疫缺陷群体如HIV感染者、长期透析的肾病患者、器官移植患者或先天性免疫功能缺陷患者等HCV感染者中由于抗体的生成可能受到影响，可使用HCV抗原进行筛查。

## 参考文献

1. WHO. Updated recommendations on simplified service delivery and diagnostics for hepatitis C infection[M]. Geneva: World Health Organization, 2022.
2. WHO. Guidelines on Hepatitis B and C Testing[M]. Geneva: World Health Organization, 2017.
3. Wang Y, Jie W, Ling J, et al. HCV core antigen plays an important role in the fight against HCV as an alternative

- to HCV-RNA detection. J Clin Lab Anal. 2021;35(6):e23755.
4. Spearman CW, Dusheiko GM, Hellard M, et al. Hepatitis C. Lancet. 2019;394(10207):1451-1466.
  5. Fan Z, Liu J, Wang F, et al. HCV core antigen is a useful predictor during pegylated-interferon/ribavirin therapy in patients with hepatitis C virus genotype 1b. Medicine (Baltimore). 2019; 98(10):e14795.
  6. Freiman JM, Tran TM, Schumacher SG, et al. Hepatitis C Core Antigen Testing for Diagnosis of Hepatitis C Virus Infection: A Systematic Review and Meta-analysis. Ann Intern Med. 2016;165(5):345-355.

## 第六章 HCV 感染检测流程

本章介绍了丙型肝炎病毒感染在个体诊断、血液筛查、和流行病学监测等应用中的检测流程、结果报告、和结果解释。检测试剂应为国家药品监督管理局注册的产品。

### 1. 个体诊断相关检测流程及结果报告

#### 1.1 成人、青少年和大于 18 月龄儿童的 HCV 感染检测

##### 1.1.1 常规检测流程

HCV 感染的筛查检测使用 HCV 抗体检测。首选基于实验室的抗体检测方法，在实验室基础设施和检测条件有限的环境中，或者在通过快速检测可促进后续治疗的人群中，建议进行快速检测。如 HCV 抗体检测结果为阴性，报告“HCV 抗体阴性”。如检测结果为阳性，报告“HCV 抗体阳性”，应进一步进行 HCV 核酸检测。

HCV 核酸检测可使用 HCV RNA 定性或定量检测。如 HCV RNA 定性或定量检测结果为阳性，报告“HCV RNA 阳性”，表明具有 HCV 现症感染。如检测结果为阴性，报告“HCV RNA 阴性”，表明 HCV 非现症感染。若受检者在近 6 个月内具有 HCV 暴露、出现临床症状、或出现生化指标异常等临床感染证据，须重新采样检测 HCV RNA 或追踪观察。当 HCV RNA 检测不可及时，也可使用 HCV 抗原检测，高灵敏的 HCV 抗原检测可以替代 HCV RNA 用于诊断急性或慢性 HCV 感染。

对于 HCV 感染高风险人群，应考虑自愈或经治疗病毒清除后

再次感染 HCV 的可能性，建议定期检测 HCV RNA。具有持续高风险行为的注射吸毒人群，建议至少每年检测一次 HCV RNA。

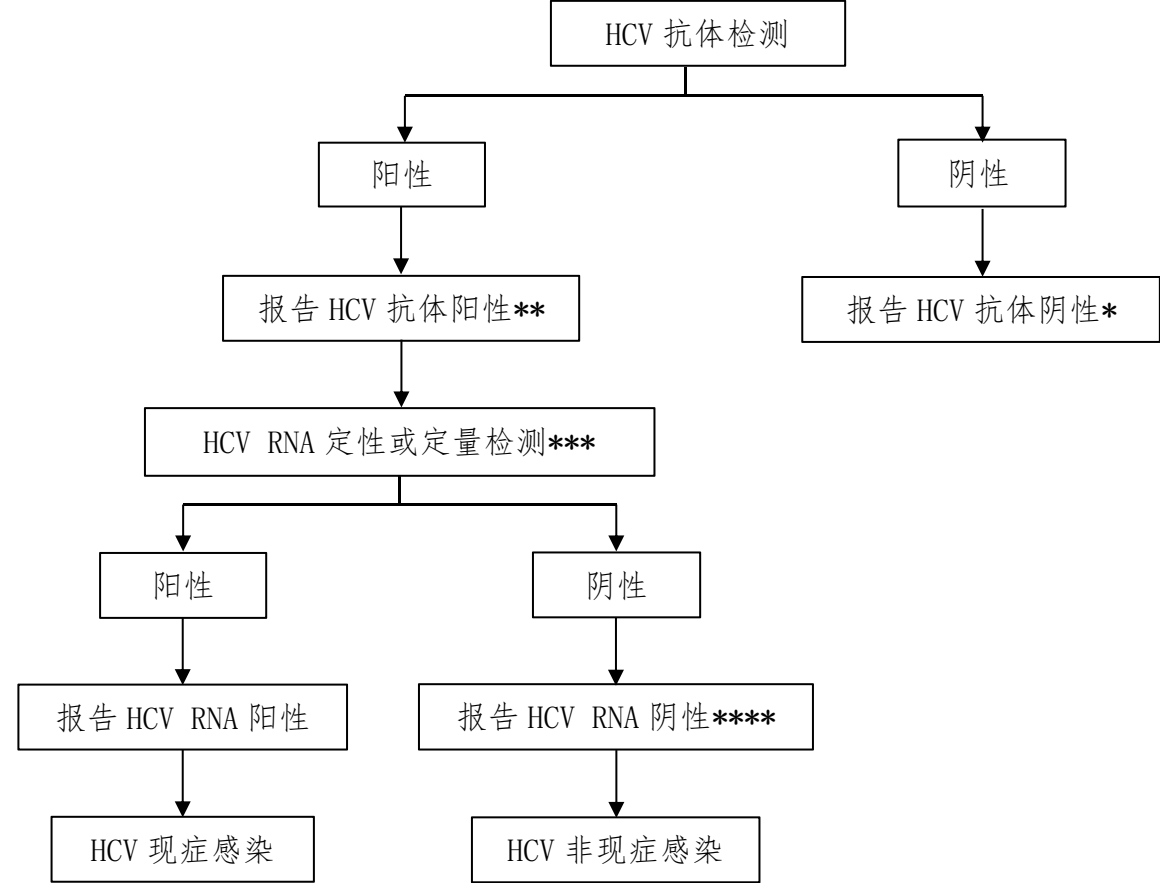


图 4 HCV 常规检测流程

**\***：对过去 6 个月内可能有 HCV 暴露的个体，建议进行 HCV RNA 检测或后续随访检测 HCV 抗体。对于免疫功能缺陷的个体，可以考虑进行 HCV RNA 检测。

**\*\***：若怀疑抗体检测假阳性，可使用另一种 HCV 抗体检测方法进行检测。

**\*\*\***：HCV RNA 检测可使用基于实验室的核酸检测，也可使用即

时核酸检测。当无法进行 HCV RNA 检测时，也可使用 HCV 抗原检测。

**\*\*\*\***：对过去 6 个月内可能有 HCV 暴露的个体，或者有 HCV 感染的临床证据，或者担心样本质量有问题，可以重复进行 HCV RNA 检测或追踪观察。

### 1.1.2 触发检测（reflex test）流程

为加快 HCV 感染的诊断，迅速启动治疗，世界卫生组织最新推荐在 HCV 抗体检测阳性后立即进行 HCV RNA 检测，称作触发检测流程。触发检测流程的特点是个体通过一次临床就诊就可完成 HCV 感染诊断，分为基于实验室的触发检测流程和基于基层诊所的触发检测流程。

（1）基于实验室的触发检测流程：个体需要进行一次临床就诊和一次采血。如果实验室进行 HCV 抗体检测结果为阳性，即使用剩余样本（或采血后分装的样本）自动进行后续 HCV RNA 或 HCV 抗原检测。如果 HCV 抗体检测结果为阳性，同时返回 HCV RNA 或 HCV 抗原检测结果，不需要进一步的随访或采血。

（2）基于基层诊所的触发检测流程：个体需要进行一次临床就诊和两次采血。基层诊所首先采集末梢全血样本进行 HCV 抗体快检，如检测结果为阳性（通常需要等待约 15 分钟），即进行第二次采血（静脉血或末梢全血）。第二份血样可以送到实验室进行 HCV RNA 或 HCV 抗原检测，也可在基层诊所进行 HCV RNA 即时核酸检测。

### 1.1.3 检测结果解释

表 1 检测结果解释和进一步行动

| 检测结果                   | 结果解释                    | 进一步行动                                                                                                                                            |
|------------------------|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HCV 抗体阳性               | 提示 HCV 现症感染或既往感染        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 应进一步检测 HCV RNA 确定感染状态。</li> <li>• 如果怀疑 HCV 抗体假阳性，可选用另一种抗体检测试剂进行检测。</li> </ul>                           |
| HCV 抗体阴性               | 没有 HCV 感染的血清学证据         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 报告“HCV 抗体阴性”，无需采取进一步行动。</li> <li>• 如果怀疑受试者最近暴露于 HCV 或受试者免疫功能缺陷，应进一步进行 HCV RNA 检测*。</li> </ul>           |
| HCV 抗体阳性<br>HCV RNA 阳性 | HCV 现症感染                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 提供咨询和治疗护理服务<sup>†</sup>。</li> </ul>                                                                     |
| HCV 抗体阳性<br>HCV RNA 阴性 | 提示 HCV 非现症感染或治疗后 HCV 清除 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 大多数情况下无需进一步行动，某些情况下可后续进行 HCV RNA 检测<sup>‡</sup>。</li> <li>• 如果怀疑 HCV 抗体假阳性，可选用另一种抗体检测试剂进行检测。</li> </ul> |
| HCV 抗体阴性               | 急性期感染或                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 提供咨询和治疗护理服务。</li> </ul>                                                                                 |

|                        |                       |              |
|------------------------|-----------------------|--------------|
| HCV RNA 阳性             | 各种原因导致免疫功能不全的 HCV 感染者 |              |
| HCV 抗体阴性<br>HCV RNA 阴性 | 未感染 HCV               | • 无需采取进一步行动。 |

\*: 当无法进行 HCV RNA 检测时，如受试者没有免疫功能缺陷，也可后续随访检测 HCV 抗体观察是否出现血清学阳转。

†: 建议在启动抗病毒治疗之前重新采血检测 HCV RNA 以确认 HCV RNA 阳性。

‡: 怀疑受试者在过去 6 个月内暴露于 HCV，或有 HCV 感染的临床证据，或怀疑检测样本的处理和保存等导致质量问题。

## 1.2 18 月龄以下儿童的 HCV 感染检测

在婴儿出生 2-6 个月期间进行 HCV RNA 检测，如检测结果为阴性，报告“HCV RNA 阴性”，表明没有 HCV 感染。如检测结果为阳性，报告“HCV RNA 阳性”，表明具有 HCV 感染。在出生 6 个月后再进行一次 HCV RNA 检测，若此次仍检出 HCV RNA，表明为慢性 HCV 感染；若此次未检出 HCV RNA，随访至 18 月龄，按 HCV 常规检测流程进行检测。

## 2. 血液筛查相关检测流程及结果报告

对献血者捐献血液进行 HCV 感染筛查的流程，依据现行版《血站技术操作规程》的相关规定执行。对供血浆者进行 HCV 感染筛查流程依据现行版《单采血浆站技术操作规程》的相关规定

执行。HCV 血液筛查应至少采用抗体和核酸检测试剂各进行 1 次检测。

2.1 HCV 血液筛查的抗体筛查检测流程

如果检测样品的初次 HCV 抗体检测结果无反应，报告 HCV 抗体检测合格；如果检测样品的初次 HCV 抗体结果有反应，后续可采取两种处理方案（图 5）：

方案 1：以同一试验对原血样做双孔复检。

方案 2：不做重复试验，初次血清学试验结论即为检测最终结论。

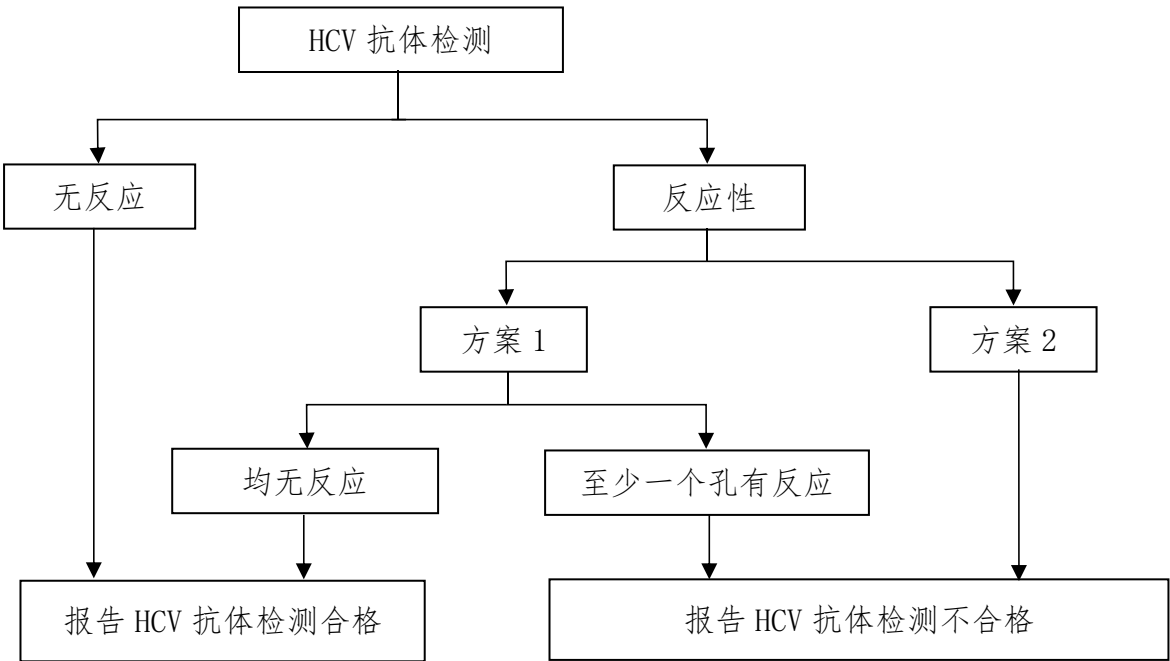


图 5 HCV 血液筛查的抗体筛查检测流程

2.2 HCV 血液筛查的核酸检测流程

HCV 血液筛查的核酸检测流程分为单人份联合检测和混样分项检测两种方案（图 6）。

单人份 HBV/HCV/HIV 核酸联合检测：检测结果无反应，报告血液核酸检测合格；检测结果有反应，报告血液核酸检测不合格，并同时对接酸检测不合格的样品进行 HBV、HCV、HIV 鉴别检测。

混合样品的 HBV/HCV/HIV 核酸分项检测：检测结果无反应，报告血液核酸检测合格；检测结果有反应，应拆分为单人份样品进行分项检测。

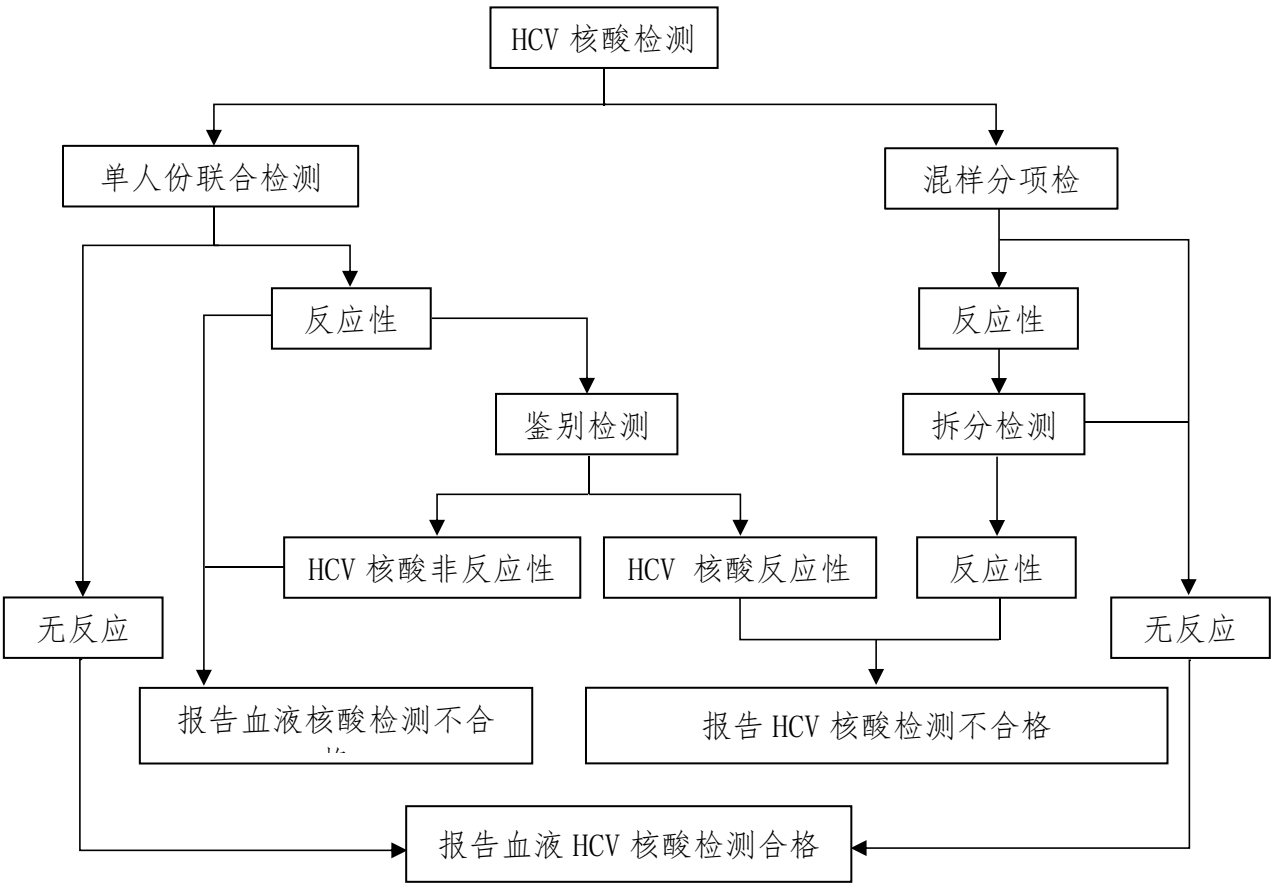


图 6 HCV 血液筛查的核酸检测流程

结合 HCV 血清学检测和核酸检测判定血筛结果的流程有两种，HCV 血清学与核酸顺序检测结果判定流程和 HCV 血清学与核酸并行检测结果判定流程（图 7）。

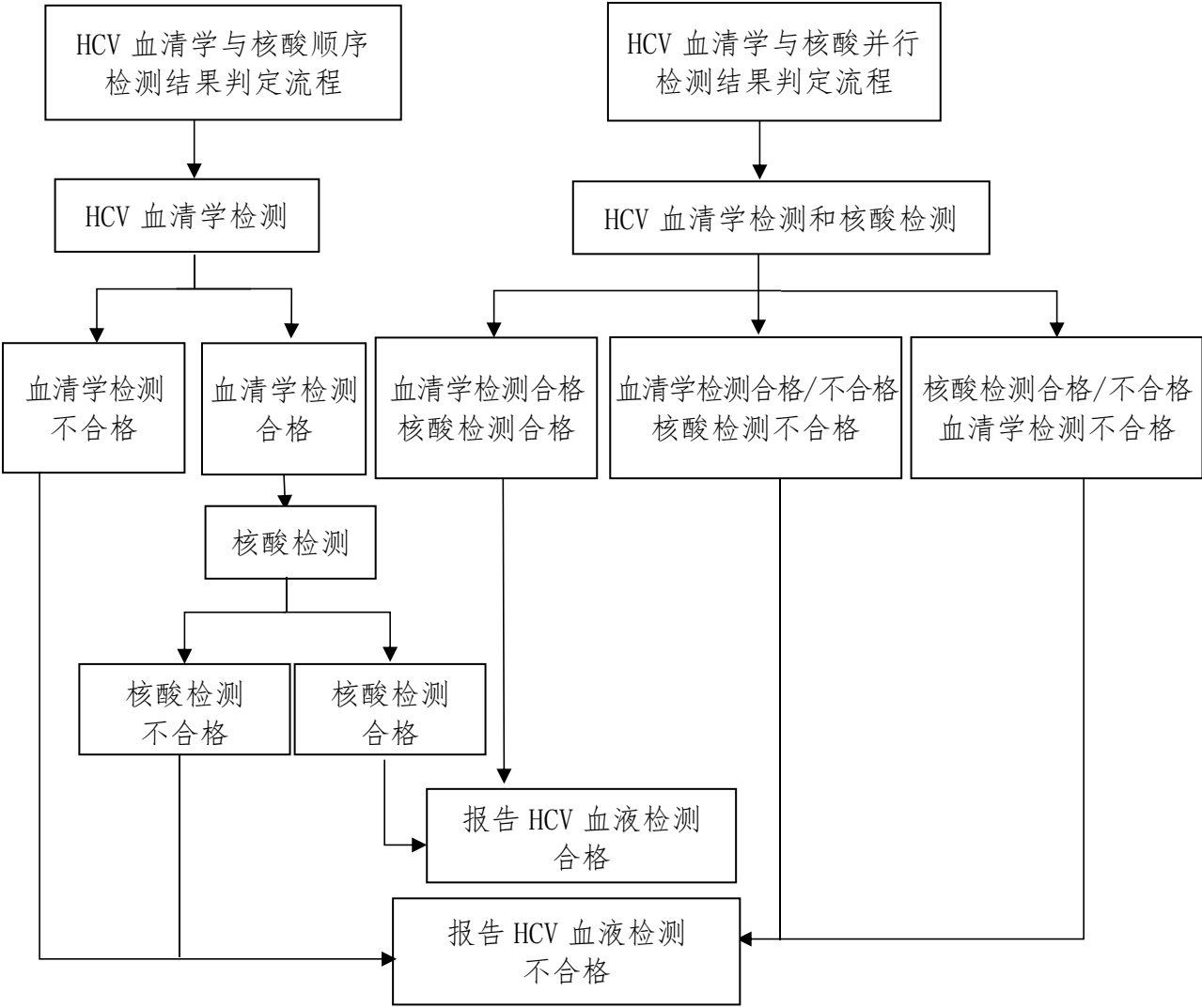


图 7 HCV 血液筛查的血清学与核酸顺序检测和并行检测流程

3. 流行病学调查相关检测流程及结果报告

匿名无关联 HCV 感染流行病学监测的检测流程包括初检和复检（图 8）。先用一种 ELISA 抗体检测试剂进行初检，如无反

应，报告“HCV 抗体阴性”，不再进行复检试验；如有反应，进入复检。使用第二种 ELISA 抗体检测试剂进行复检，如无反应，报告“HCV 抗体阴性”；如有反应，报告“HCV 抗体阳性”。

匿名关联的 HCV 感染流行病学监测采用 HCV 常规检测流程（图 4）。

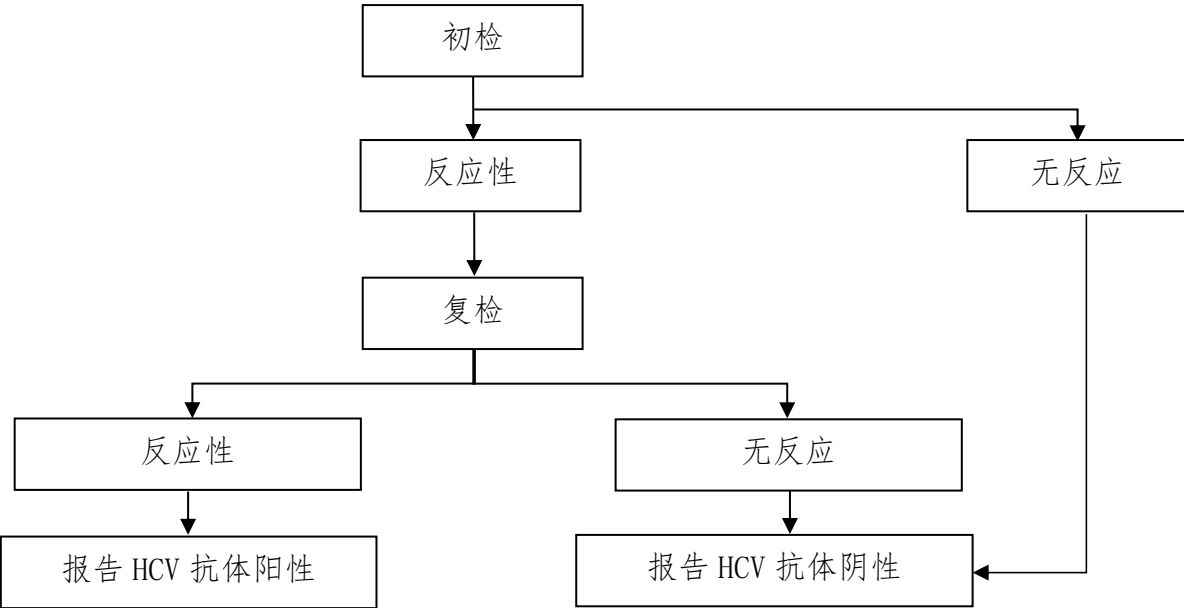


图 8 HCV 感染流行病学调查相关的检测流程

参考文献

1. WHO. Guidelines on Hepatitis B and C Testing[M]. Geneva: World Health Organization, 2017.
2. WHO. Updated recommendations on simplified service delivery and diagnostics for hepatitis C infection[M].

- Geneva: World Health Organization, 2022.
3. Testing for HCV infection: An update of guidance for clinicians and laboratorians. MMWR 2013;62(18).
  4. Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines, 2021. MMWR Recomm Rep 2021;70 (No. 4):[187].
  5. AASLD. HCV Guidance: Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C[M]. America: American Association for the Study of Liver Diseases and the Infectious Disease Society of America, 2021.
  6. 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 丙型肝炎诊断: WS213-2018[S]. 北京: 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 2018.
  7. 中华人民共和国国家健康卫生委员会. 血站技术操作规程 (2019 版) [Z]. 2019.

## 第七章 HCV 基因序列分析

本章介绍了 HCV 的基因序列分析方法，以及在基因分型、耐药检测、和分子溯源中的应用。HCV 基因分型常用于流行病学研究，另外在接受治疗前进行 HCV 分型检测可用于指导临床治疗。HCV 耐药检测用于了解病毒的耐药特性，指导合理的药物治疗方案。基于 HCV 基因序列的分子溯源可用于 HCV 感染暴发调查、职业暴露感染鉴定和医源性感染调查等。

### 1. HCV 基因分型检测方法和应用

HCV 基因分型检测包括基因型和基因亚型检测，广泛应用的基因分型检测方法包括操作简便的特异性探针杂交法和结果可靠的基因测序法。

#### 1.1 特异性探针杂交法

对 HCV 的 NS5、Core 和 E1 等基因区进行特异性探针的互补杂交检测是 HCV 基因分型的最常用方法。基于特异性探针杂交检测的方法包括反向线性探针杂交法 (line probe hybridization, LiPA)、PCR 荧光探针法、PCR 反向点杂交法 (polymerase chain reaction-reverse dot blot, PCR-RDB) 等。目前已有多种基于特异性探针杂交法的商品化 HCV 基因分型检测试剂盒获得国家药品监督管理局注册。在临床进行 HCV 基因分型时，建议使用已获批的商品化 HCV 基因分型检测试剂盒并严格按照试剂说明书

操作及解释。

## 1.2 基因测序法

目前，基因测序方法仍是鉴定 HCV 基因型/亚型的金标准。在不同基因型和亚型间，NS5B、Core 和 E1 区的核苷酸序列异质性较大，常作为基于基因测序分型的靶区。通过套式 RT-PCR 扩增方法对 NS5B、Core 和 E1 区的一个或多个基因片段进行扩增，对扩增的基因片段进行测序，分析基因序列的系统进化距离判断基因型别。在 HCV 基因分型不明确、需要进行病毒重组鉴定、以及了解病毒基因进化史和研究病毒致病性 etc 情况下，可对 HCV 全长基因序列（或近全长基因序列）进行测序分析。

（1）在采用实验室自建的 HCV 基因分型方法时，建议选择两个及以上的基因区域（如 NS5B 和 Core）进行 RT-PCR 扩增和测序分型检测。推荐使用国内外文献中已报道的基因扩增引物。

（2）推荐的基因序列编辑软件包括：BioEdit、CLUSTAL X 和 Sequencher 等。

（3）推荐的 HCV 基因分型工具包括以下数据库分析网站：

A. <https://hcv.lanl.gov/content/sequence/HCV/ToolsOutline.html>

B. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

C. <https://www.genomedetective.com/app/typingtool/hcv>

D. <http://dbpartners.stanford.edu/RegaSubtyping/html/indexhcv.html>

E. <https://hcv.geno2pheno.org>

(4) 推荐的系统进化树分析软件包括：MEGA、Phylip、PhyML、FastTree, MrBayes 和 BEAST 等。

(5) 可使用贝叶斯分子进化分析方法进行贝叶斯合并模型分析，以重建 HCV 基因型或基因亚型的流行史，推荐的分析网站如：<https://www.beast2.org>。

目前已有基于基因测序法的商品化 HCV 基因分型检测试剂盒获得国家药品监督管理局注册。在实际防控工作中，可以根据具体需求将商品化检测试剂盒和实验室自建方法联合使用。

### 1.3 HCV 基因分型检测的应用

目前优先推荐的无干扰素的泛基因型 DAAs 方案对多种主要基因型和基因亚型的 HCV 感染者都能达到 90%以上的 SVR，在启动治疗前可无需进行 HCV 基因分型检测。但是，目前无干扰素的泛基因型方案并不是全基因型方案，对一些未经过临床试验或已有临床试验未获得 90%以上 SVR 的少见基因型或基因亚型以及一些特殊 HCV 感染者可能并不适用。并且 HCV 基因型和基因亚型的鉴定有助于了解影响治疗应答率的病毒学危险因素，从而指导临床制定更加科学有效的治疗方案。因此《丙型肝炎防治指南(2022 年版)》建议在一段时间内仍然推荐基因型特异性方案用于临床，主要考虑其在中国的可负担性优于泛基因型方案，以及一些特殊人群（如肾损伤、失代偿期肝硬化、或过去丙型肝炎治疗不成功的患者）。如采用基因型特异性 DAAs 方案，需要先检测基因型

和基因亚型。此外，由于基因 3 型在各型别中较难治，在基因 3b 亚型流行率高于 5% 的地区，需要进行基因分型检测。

此外，HCV 基因分型检测在流行病学调查尤其是对聚集性爆发传播的疫情监测有着重要的意义，基于 HCV 基因分型的分子流行病学研究可以从基因分子水平阐明疾病传播关系及其流行趋势，有助于采取针对性的防治策略和措施。

## 2. HCV 耐药检测方法和应用

直接抗病毒药物 DAAs 通过抑制 HCV 生命周期中特异性的蛋白或酶，阻断 HCV 肝内复制，进而发挥抗病毒作用，其主要作用的靶位是 HCV 非结构蛋白 NS3/4A、NS5A 和 NS5B（图 9）。DAAs 发展初期，由于 HCV 缺乏相关药物的选择压力，HCV 耐药相关替代（resistance associated substitution, RASs）主要与 HCV 的天然多态性有关。对感染不同基因型的 HCV 感染者，相同方案治疗效果的差异可能与基因型特异性的 RASs 有关，RASs 可能影响 DAAs 治疗的敏感性，进而导致治疗过程中出现病毒学突破或者复发。

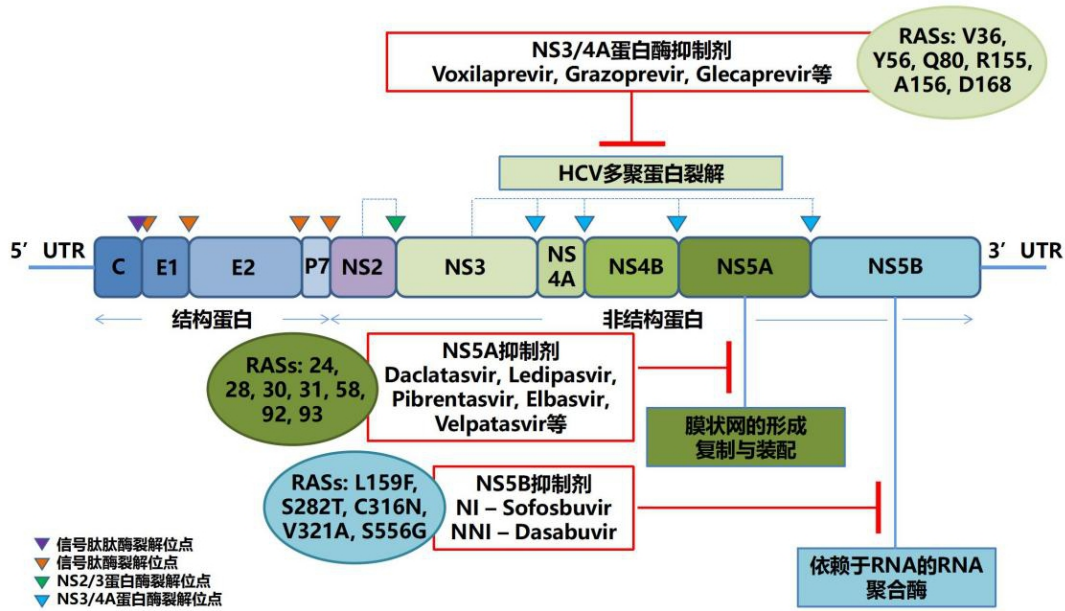


图9 DAAs耐药机制和常见RASs位点

## 2.1 HCV耐药检测方法

HCV耐药检测方法分为表型耐药检测和基因型耐药检测。表型耐药检测作为HCV耐药检测的金标准，对解释耐药突变模式具有重要作用，但因检测操作复杂且耗时耗力，仅用于药物研发等相关研究。目前HCV耐药检测和监测工作中最常用的是基于NS3/4A、NS5A、NS5B区进行测序的基因型耐药检测，通过套式RT-PCR扩增和基因测序，并将测得序列与参考序列（HCV标准株AF009606）进行比对，判断是否存在RASs。

近年来，基因测序技术的快速进展有力推动了耐药检测技术发展。第一代Sanger测序技术由于操作简单、准确性高，一直是HCV耐药检测的主要技术平台。二代测序技术（next generation sequencing, NGS）可提供更多的序列数据信息，发现新的变异

位点，包括一些少见的突变形式及突变的确切类型。若使用NGS技术，建议使用15%阈值解释突变，较低频率的RASs对SVR影响较小。

## 2.2 HCV 耐药检测的应用

对于未经治疗的丙型肝炎患者，HCV 耐药检测结果可以指导部分 DAAs 治疗方案的制定和优化，对于提高治愈率和减少治疗失败率具有一定的临床意义。但是，HCV RASs 与现在指南推荐治疗方案的疗效关系不大。目前使用的泛基因型 DAAs 治疗方案不推荐在治疗前进行 HCV RASs 检测。

对于治疗失败的丙型肝炎患者，HCV 耐药检测结果可以帮助判断病毒是否发生耐药、现行治疗方案是否需要调整及合理用药。对于治疗失败的丙型肝炎患者，还可以结合治疗前和复发后的 HCV RASs，动态监测 HCV RASs 的动态变化。针对 DAAs 治疗失败的患者，建议首选索磷布韦/维帕他韦/伏西瑞韦，HCV RASs 对再次选择 DAAs 治疗方案影响较小。

## 3. HCV 分子溯源检测方法和应用

HCV具有高度变异性，在感染者体内同时存在着多个在遗传上相关联但又有差异的准种。在传播过程中，HCV以多个准种“混合感染”的形式输入新个体。随着感染时间、药物史、免疫系统压力等因素的综合作用，感染者体内的HCV基因序列和准种群构成会发生改变。具有传播关系的HCV感染者所携带准种群的基因序列之间具有较高遗传相似性。

### 3.1 HCV 分子溯源检测方法

HCV 分子溯源检测方法的基本原理是：对疑似有传播关系的 HCV 感染者，利用分子生物学技术，获得每个感染者体内多个准种的高可变区基因序列，进行系统进化分析。若某两个或多个感染者之间的 HCV 基因序列具有较近的遗传进化距离，则提示这些感染者之间存在传播关系。

获得感染者体内多个准种的高可变区基因序列的检测方法主要有以下四种：①巢式 PCR 产物克隆后测序。优点是可以同时识别优势和弱势毒株；缺点是在 PCR 扩增中可能出现碱基错配，交叉污染风险较大，操作较繁琐。②终点有限稀释巢式 PCR 产物测序。优点是克服了 PCR 扩增中可能存在的碱基错配；缺点是工作量大，操作繁琐。③终点有限稀释荧光定量 PCR 产物测序。优点是不需要 PCR 后的电泳步骤，减少交叉污染；可通过高分辨率熔解曲线分析对扩增产物进行选择性的测序，减少因重复测序引起的浪费；缺点是工作量较大，操作繁琐。④巢式 PCR 产物 NGS 测序。优点是通量高，操作相对简便，成本较低；缺点是在 PCR 扩增中可能出现碱基错配，数据处理技术要求较高。综合考虑，目前巢式 PCR 产物 NGS 测序方法的实用价值较大。

### 3.2 HCV 分子溯源检测的应用

HCV 分子溯源检测可应用于丙型肝炎疫情爆发调查、HCV 职业暴露感染调查和医源性感染调查等。分子溯源检测的工作流程大致如下：①根据流行病学调查结果确定病例和对照样品；②鉴

定样品中 HCV 的基因型/亚型,基因型/亚型不同的感染者之间即可排除传播关系,而基因型/亚型相同的感染者需进一步进行准种分析;③对高可变区基因序列进行扩增和测序;④进行生物信息学分析,包括计算基因距离、构建系统进化树等,确定不同感染者体内病毒的遗传进化距离;⑤结合流行病学调查资料,推断传播关系。

在丙型肝炎疫情爆发调查、HCV 职业暴露感染调查和医源性感染调查中,HCV 分子溯源检测使用较多的靶基因片段为 E2 区的 HVR1。也有使用其他基因区(如 Core/E1、NS3/4A、NS5A、NS5B)片段的,两个基因区片段的分析和相互验证可以提高结果的可靠性,NGS 测序在同步进行多个基因区片段检测时具有独特的优势。

## 参考文献

1. Lu L, Nakano T, He Y, et al. Hepatitis C virus genotype distribution in China: predominance of closely related subtype 1b isolates and existence of new genotype 6 variants [J]. Journal of medical virology, 2005, 75(4): 538-49.
2. 刘静,杨洋,宫菊丽等.HIV-1/HCV 合并感染者中 HCV 基因亚型流行情况调查[J]. 中华流行病学杂志,2009(07):663-667.
3. Cai Q, Zhao Z, Liu Y, et al. Comparison of three different HCV genotyping methods: core, NS5B sequence analysis and

- line probe assay. *Int J Mol Med*. 2013;31(2):347–352.
4. Tagnouokam–Ngoupo PA, Ngoufack MN, Kenmoe S, et al. Hepatitis C virus genotyping based on Core and NS5B regions in Cameroonian patients. *Virol J*. 2019;16(1):101.
  5. Christophe Rodriguez, Alexandre Soulier, Vanessa Demontant, et al. A novel standardized deep sequencing-based assay for hepatitis C virus genotype determination. 2018 Mar 8;8(1):4180.
  6. Reilly Hostager, Manon Ragonnet–Cronin, Ben Murrell, et al. Hepatitis C virus genotype 1 and 2 recombinant genomes and the phylogeographic history of the 2k/1b lineage. *Virus Evol*. 2019 Oct 9;5(2):vez041.
  7. Bagaglio S, Uberti–Foppa C, Morsica G. Resistance Mechanisms in Hepatitis C Virus: implications for Direct–Acting Antiviral Use. *Drugs* 2017, 77(10): 1043–1055.
  8. Sorbo MC, Cento V, Di Maio VC, et al. Hepatitis C virus drug resistance associated substitutions and their clinical relevance: Update 2018. *Drug Resist Updat* 2018, 37: 17–39.
  9. Patiño–galindo J, Salvatierra K, Gonz á lez–candelas F,

- et al. Comprehensive Screening for Naturally Occurring Hepatitis C Virus Resistance to Direct-Acting Antivirals in the NS3, NS5A, and NS5B Genes in Worldwide Isolates of Viral Genotypes 1 to 6 [J]. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2016, 60(4): 2402-16.
10. Bradshaw D, Mbisa J L, Geretti A M, et al. Consensus recommendations for resistance testing in the management of chronic hepatitis C virus infection: Public Health England HCV Resistance Group [J]. *The Journal of infection*, 2019, 79(6): 503-12.
  11. Forbi J C, Campo D S, Purdy M A, et al. Intra-host diversity and evolution of hepatitis C virus endemic to Côte d'Ivoire [J]. *Journal of medical virology*, 2014, 86(5): 765-71.
  12. Li H, Stoddard MB, Wang S, et al. Elucidation of hepatitis C virus transmission and early diversification by single genome sequencing. *Plos Pathog*, 2012, 8 (8) : e1002880.
  13. Ramachandran S, Xia G, Ganova-Raeva LM, et al. End-point limiting-dilution real-time PCR assay for evaluation of hepatitis C virus quasispecies in serum: performance under optimal and suboptimal conditions. *J Virol Methods*,

- 2008, 151(2): 217-224.
14. Saludes V, Esteve M, Casas I, et al. Hepatitis C virus transmission during colonoscopy evidenced by phylogenetic analysis. *J Clin Virol*, 2013, 57(3): 263-266.
  15. Zhao Q, Wen Y, Jiang Y, et al. Next generation sequencing-based investigation of potential patient-to-patient hepatitis C virus transmission during hemodialytic treatment. *PLoS ONE*, 2016, 11(1): e0147566
  16. Longmire AG, Sims S, Rytsareva I, et al. GHOST: global hepatitis outbreak and surveillance technology. *BMC Genomics*. 2017, 18 (Suppl 10): 916.
  17. Mane A, Kasibhatla SM, Vidhate P, et al. Phylogenetic Analysis of Spread of Hepatitis C Virus Identified during HIV Outbreak Investigation, Unnao, India. *Emerg Infect Dis*. 2022;28(4):725-733.

## **第八章 HCV 细胞培养和中和抗体检测**

本章介绍了丙型肝炎病毒的细胞培养方法和病毒滴定方法，以及检测 HCV 中和抗体等应用。病毒的体外细胞培养是病毒检测的一个重要手段。由于病毒在细胞中经过了培养扩增，与直接检测临床样品相比，无论对病毒蛋白还是核酸成分的检测灵敏度均会提高。目前已有多种针对 HCV 的细胞培养模型，如复制子模型，假病毒感染模型和真病毒细胞感染模型。这些体外细胞培养模型对于 HCV 的病毒学研究、抗 HCV 中和抗体检测、抗病毒药物和疫苗研发等应用提供了重要的工具。但是由于临床样品来源的 HCV 在体外细胞上的感染效率较低，目前细胞培养模型在丙型肝炎的临床检测应用中还比较有限。

## 1. HCV 细胞培养方法

### 1.1 丙型肝炎病毒的体外细胞培养模型

#### 1.1.1 HCV 复制子模型

HCV 复制子模型分为亚基因组复制子和全基因组复制子模型。其特点是在 HCV 基因组里插入一个药物抗性筛选标记，通过药物筛选来获得一个能稳定复制 HCV RNA 基因组的细胞系。HCV 复制子模型是研究 HCV 基因组复制机制及靶向 HCV 复制的药物研发的重要工具，也是研究 HCV 针对 DAA 药物耐药突变的关键工具。

#### 1.1.2 HCV 的假病毒感染模型

HCV 假病毒 (HCV pseudotyped particles, HCVpp) 是由 HCV 的包膜蛋白包装其它病毒基因组 (如 HIV 或其它逆转录病毒) 形成的嵌合病毒：病毒的外部由 HCV 的包膜蛋白 E1 和 E2 组成，而

病毒的内部由其它病毒组成。HCVpp 能特异性地感染肝细胞，是研究 HCV 侵入宿主细胞的重要工具，也可用于检测 HCV 中和抗体。

### 1.1.3 HCV 的细胞感染模型

HCV 的细胞感染模型 (cell culture-derived HCV, HCVcc) 来源于从爆发性丙型肝炎患者体内分离得到的一个 2a 基因型的 HCV 病毒株 JFH-1，当转染 JFH-1 全长基因组 RNA 到肝癌细胞系 (Huh-7) 后，可以产生有感染性的病毒颗粒，而且产生的病毒能够稳定传代和扩增繁殖。HCVcc 能够再现包括病毒进入、复制、组装、释放在内的病毒感染周期全过程以及从单个病毒接种到感染所有细胞的病毒增殖过程。使用干扰素信号通路缺陷型的 Huh-7 衍生细胞系 (Huh-7.5.1 或 Huh-7.5) 时，HCVcc 的滴度最高可达  $10^6$  感染单位/毫升 (IU/ml)。HCVcc 一般较为稳定，分装后可在  $-80^{\circ}\text{C}$  下保存至少 1 年以上。由其它基因型毒株 (包括 1a, 1b, 2a, 3a, 4a, 5 和 6 基因型) 的结构蛋白和 JFH-1 的非结构蛋白组成的嵌合 HCVcc 细胞感染模型也陆续构建成功。HCVcc 模型可用于抗病毒复制的药物研发和病毒耐药性研究，也可用于检测 HCV 中和抗体。

## 1.2 HCV 体外细胞培养的病毒滴度检测方法

### 1.2.1 基于病毒阳性细胞集落形成的滴定法

该方法一般使用 Huh-7 肝癌细胞系及其干扰素信号通路缺陷型的衍生细胞系 (Huh-7.5.1 或 Huh-7.5)。将待检测的 HCVcc 细胞培养上清进行梯度稀释后接种细胞，经过一段时间培养形成

HCV 阳性的细胞集落，通过对 HCV 蛋白进行免疫荧光染色可以检测细胞集落数目，最终计算出接种上清中 HCVcc 的滴度。病毒滴度的计量单位为群落形成单位/毫升（focus-forming unit/ml, FFU/ml）。

### 1.2.2 基于组织细胞半数感染剂量（TCID<sub>50</sub>）的滴定方法

该方法测定的是接种细胞出现感染阳性几率为 50% 的病毒稀释度，实验操作与基于病毒阳性细胞集落形成的滴定法基本一致，但是阳性的判断依据和病毒滴度计算方法有所不同。由于需要测定细胞出现感染阳性的几率，一般每个稀释度的病毒都会接种约 10 组细胞复孔以保证数据可靠性。对感染后的细胞进行免疫染色，通过荧光显微镜观察统计免疫荧光阳性细胞组数目占接种细胞组总数的百分比。例如，如果 10 组细胞接种病毒出现 6 组阳性，百分比即为 60%。TCID<sub>50</sub> 计算的公式为：TCID<sub>50</sub> 的对数 = 大于 50% 的阳性百分比的稀释倍数的对数 + 距离比例常数，其中距离比例常数 = (大于 50% 的阳性百分比 - 50%) / (大于 50% 的阳性百分比 - 小于 50% 的阳性百分比)。病毒滴度的计量单位为组织细胞半数感染剂量/毫升（TCID<sub>50</sub>/ml）。TCID<sub>50</sub> 计算的依据是每组细胞接种后是否出现阳性，不需要计数准确的阳性细胞数目，与基于病毒阳性细胞集落形成的滴定法相比，该方法受到判定病毒阳性细胞集落的主观性影响较小，因此结果重复性更好。

## 2. HCV 细胞培养方法在 HCV 中和抗体检测中的应用

HCVpp 假病毒感染模型和 HCVcc 细胞感染模型均能模拟 HCV

进入细胞的过程，可应用于检测 HCV 中和抗体。HCVcc 的生物学和病毒结构特征比 HCVpp 更接近病毒的真实状态，因此 HCVcc 细胞感染模型在检测 HCV 中和抗体的应用中具有更为重要的价值。基于 HCVcc 细胞感染模型的 HCV 中和抗体检测流程如下：将 Huh-7 或衍生细胞接种到 96 孔平底细胞培养板，培养 12 小时。含有 HCV 抗体的血清样品在 56° C 热灭活 1 小时后，在 DMEM 完全培养基中进行 2 倍的梯度稀释。HCVcc 在 DMEM 完全培养基中稀释至合适浓度，与等体积稀释的血清样品混合，孵育 2 小时。将 HCVcc-血清混合物转移到 96 孔板，孵育 4-6 小时后，移出 HCVcc-血清混合物，替换为 DMEM 完全培养基。培养 72 小时后，固定细胞并使用 HCV 蛋白特异性抗体和荧光基团标记二抗进行免疫染色，在荧光显微镜下计数荧光阳性细胞群落，通过统计测试组相比于对照组阳性细胞群落数目的减少计算抗体的中和百分比。

## 参考文献

1. Lohmann V, Körner F, Koch J, et al. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*. 1999, 285: 110-113.
2. Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science*. 2000, 290: 1972-1974.

3. Hsu M, Zhang J, Flint M, et al. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003, 100: 7271–7276.
4. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*. 2005, 11: 791–796.
5. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*. 2005, 309: 623–626.
6. Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, et al. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005, 102: 9294–9299.
7. Gottwein JM, Jensen TB, Mathiesen CK, et al. Development and Application of Hepatitis C Reporter Viruses with Genotype 1 to 7 Core–Nonstructural Protein 2 (NS2) Expressing Fluorescent Proteins or Luciferase in Modified JFH1 NS5A. *J. Virol*, 2011, 85(17): 8913 – 8928.
8. Lu J, Xiang Y, Tao W, et al. A novel strategy to develop robust infectious hepatitis C virus cell culture system directly from a clinical isolate. *J. Virol*, 2014, 88: 1484–1491.

9. Wang X, Yan Y, Gan T, et al. A trivalent HCV vaccine elicits broad and synergistic polyclonal antibody response in mice and rhesus monkey. *Gut*, 2019, 68(1):140–149.
10. Tong Y, Li Q, Li R, et al. A Novel Approach To Display Structural Proteins of Hepatitis C Virus Quasispecies in Patients Reveals a Key Role of E2 HVR1 in Viral Evolution. *J. Virol*, 2020, 94(17):e00622–20
11. Leumi S, Guo M, Lu J, et al. Identification of a novel replication-competent hepatitis C virus variant that confers the sofosbuvir resistance. *Antiviral Research*, 2022,197: 105224.

## 第九章 HCV 检测实验室的室内质量控制

本章介绍了 HCV 检测实验室的室内质量控制方法,以了解实验条件是否正常、实验结果是否有效、以及连续评价实验室工作及实验结果的可靠程度。

### 1. 质控品

#### 1.1 质控品的种类

##### 1.1.1 内部对照质控品

内部对照质控品指试剂盒内提供的阳性和阴性对照。实验室使用的检测试剂盒应为国家药品监督管理局注册,并在有效期内的产品。试剂盒内部对照用于判断每次实验的有效性。每一次检测临床样品时,必须有试剂盒内部对照,而且只能在同批号的试剂盒中使用。若内部对照结果无效,必须重新试验。

##### 1.1.2 外部对照质控品

外部对照质控品是为了监控检测的重复性和稳定性以及试剂盒批间差异而由实验室设置的对照,为非试剂盒组份的外部质控品。每一次实验(每批次)必须使用外部对照质控品。外部对照质控品应有与其检测过程相适应的特征,成分应与待测临床样品具有相似或相同的基质。外部对照质控品应有可靠的来源,且具有较好的均一性和稳定性。如果没有商品化的质控品,实验室可以自制质控品。

外部对照质控品的制备可使用灭活的 HCV 抗体阳性血清或血浆。弱阳性对照可以用 HCV 抗体阴性血清或血浆梯度稀释 HCV 抗体强阳性血清或血浆得到。如条件允许，可按一年或以上的使用量配制（可加入不影响检测结果的防腐剂）。按一周实验用量分装、分类、标记、封口，于-20℃冻存。外部对照质控品不可反复冻融，一旦融化后应存放于 2-8℃，一周内使用。质控品的管间或瓶间变异必须小于检测系统预期的变异。

## 1.2 质控品中分析物的浓度

质控品的浓度应位于临床有意义的浓度范围内。若使用定值质控品，使用说明书上的原有标定值只能作参考，必须由实验室作重复测定来确定暂定和常用均值以及标准差。

对于定性检测项目，每次实验应设置阴性、弱阳性和/或阳性质控品。如为基因突变或基因分型检测，则应包括最能反映检测情况的突变或基因型样品，每批检测的质控中至少应有一种基因突变或基因型。对于定量检测项目，每次实验应设置阴性、弱阳性和阳性质控品。

## 2. 质控品的检测频次和位置

质控品的检测频次和位置应反映检测系统的性能。原则是在每一个分析批内至少对质控品做一次检测，在报告一批样品的检测结果前对质控结果作出评价。确定质控品的位置须考虑分析方法的类型及可能产生的误差类型，质控品固定放在样品前或后可监测漂移；质控品在样品中随机放置可检出随机误差。

### 3. 质控规则和质控图

质控规则是解释质控数据和判断分析批控制状态的标准,即具有高的检出分析误差的能力,同时应具有较低的假失控概率。

#### 3.1 血清学检测项目

(1) 肉眼判断结果的规则: 阴性、阳性质控品的检测结果分别为阴性和阳性即表明在控,相反则为失控。

(2) 数值或量值判定结果的规则: 可以使用肉眼判断结果的规则;也可以使用统计学质控规则,至少利用一个随机误差及一个系统误差规则。阴性、阳性质控物的检测结果必须分别为阴性和阳性。

#### 3.2 核酸检测项目

(1) 核酸定性检测项目: 阴性、弱阳性和/或阳性质控品的检测结果分别符合即表明在控,相反则为失控。

(2) 核酸定量检测项目: 可绘制质控图,质控图应包括质控结果、质控图的中心线和控制界线、每个数据点的日期和时间、质控品名称、浓度、批号和有效期、分析仪器名称、方法学名称、试剂和校准物批号等。

### 3.3 常用的质控规则和质控图

#### 3.3.1 常用的质控规则表示方法

常用的质控规则有六条( $\bar{X}$ : 平均数;  $s$ : 标准差):

①  $1_{2s}$ : 一个质控结果超过  $\bar{X} \pm 2s$ , 提示警告。

②  $1_{3s}$ : 一个质控结果超过  $\bar{X} \pm 3s$ , 发现随机误差(可能也

有系统误差），该批测试失控。

③  $2_{2s}$ ：在批内测试中，若有两个浓度质控品的测定结果（或三个浓度质控品的测定结果中有两个同时超过了  $X+2s$  或  $X-2s$ ，为违背此规则；在批间测试中，当某一浓度的质控品在此批和前一一批中的测定结果同时超过了  $X+2s$  或  $X-2s$ ，为违背此规则，表示存在系统误差。

④  $R_{4s}$ ：同批两个质控结果之差值超过  $4s$ ，为违背此规则，表示存在随机误差。

⑤  $4_{1s}$ ：一个质控品连续的四次测定结果都超过  $X+1s$  或  $X-1s$ ，为违背此规则，表示存在系统误差。

⑥  $10X$ ：十个连续的质控结果在平均数一侧，为违背此规则，表示存在系统误差。

### 3.3.2 质控规则的使用要点

出现一次  $2s$  范围的变化时，系统处于告警状态，应予注意，是否可以继续检测需要进一步观察。

出现下列情况时，应暂停检测查找原因：出现一次  $3s$  范围的变化；连续两次出现同一方向  $2s$  范围的变化；连续四次出现同一方向的  $1s$  范围的变化；连续十次结果都在  $1s$  范围内，但落在均值线的同一侧。

### 3.3.3 质控图

质控图（control chart）是对过程质量加以测定、记录，从而评估过程是否处于控制状态的一种统计方法设计的图。图上

有中心线(central line, CL)、上控制界限(upper control limit, UCL)和下控制界限(lower control limit, LCL), 并有按时间顺序抽取的样本统计量值的描点序列。UCL、CL 与 LCL 统称为质控限(control lines)。若控制图中的描点落在 UCL 与 LCL 之外或描点在 UCL 与 LCL 之间的排列不随机, 则表明过程异常。最常用的质控图是 Levey - Jennings 质控图。

重新绘制质控图的情形包括: 更换不同厂家的试剂盒、改用新批号的试剂盒、使用新批次的外部对照质控品。拟更换新批号的质控品时, 应在旧批号质控品使用结束前, 新批号的质控品应与旧批号质控品一起测定, 设立新的均值和质控限。

#### 4. 失控原因分析和处理

##### 4.1 失控原因的种类

质量控制的核心问题在于分清误差类型。检验误差类型包括:

(1) 随机误差: 应严密监测和控制, 使其限制在临床允许的范围之内, 并逐步使之缩小。

(2) 系统误差: 应尽快发现, 及时校正。

(3) 过失误差: 应尽量消灭。

##### 4.2 失控原因的分析

出现失控时, 必须找出原因和解决方法, 防止将来出现同样的问题。

###### 4.2.1 初步查找和估计失控原因

失控原因的查找过程并无固定模式, 一般是由易到难, 由近

到远地查找。通过回顾性分析检测过程，判断失控原因。

#### 4.2.2 通过检测数据分析失控原因

(1) 原始数据分析：原始数据包括空白对照、阴性对照、阳性对照、标准品等检测数据。

a. 一致：表明无明显系统误差，失控原因在质控品或该管操作造成的可能性较大。分析同一瓶质控品的其他项目测定是否也有结果异常，若有异常，说明质控品本身有问题；若无异常，说明该管操作有问题。

b. 不一致：表明该批检测中可能存在系统误差，失控原因来自试剂、仪器或操作等的可能性较大。观察仪器检测其他项目的结果有无异常。若有异常，说明仪器原因；若无异常，说明试剂或操作等原因。

(2) 质控图分析：进一步从质控图上观察失控是否发生在渐变的基础上。若为渐变，则由渐变的误差因素造成；否则由突然发生的误差因素造成。

引起位移的原因有：a. 使用一批新批号试剂；b. 更换了新试剂；c. 反应条件改变；d. 新技术人员；e. 仪器改变。

引起趋势的原因有：a. 试剂失效；b. 仪器有问题。

发生位移和趋势的最常见原因是试剂或质控品的失效。另外，试剂的运输和贮存条件不当时也容易失效。

#### 4.3 失控后的处理

实验人员在测定质控时，如发现质控数据违背了质控规则，

应分析原因并做出是否发出报告的决定。通过分析，当判断失控信号为真失控时，应在重做质控结果之后对所有失控样本重新进行检测；当判断失控信号为假失控时，常规检验报告可以按原先检测结果发出。

### 参考文献

1. 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 临床检验定量测定室内质量控制：WS/T 641- 2018[S]. 北京：中华人民共和国国家卫生健康委员会，2018.
2. 中国合格评定国家认可委员会. 医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明：CNAS-CL02-A009[S]. 北京：中国合格评定国家认可委员会，2018.
3. 中国合格评定国家认可委员会. 医学实验室质量和能力认可准则在临床免疫学定性检验领域的应用说明：CNAS-CL02-A004[S]. 北京：中国合格评定国家认可委员会，2018.

## 第十章 HCV 检测实验室生物安全和职业暴露

在《人间传染的病原微生物目录》中，HCV 的危害程度分类属于第三类，不属于高致病性病原微生物。病毒培养、动物感染实验、未经培养的感染性材料操作需要在 BSL-2 级实验室进行，灭活材料的操作可在 BSL-1 级实验室进行。本章介绍了 HCV 检测实验室生物安全操作的注意事项，以及职业暴露预防和处理措施。

### 1. HCV 检测实验室生物安全注意事项

#### 1.1 实验操作

1.1.1 常规处理血液、体液样品可在工作台上进行，如估计样品有可能溅出，则应戴手套、口罩和防护眼镜，在生物安全柜中操作。

1.1.2 离心样品时要使用密闭的离心管和转子，防止液体溢出以及在超/高速离心时形成气溶胶。

1.1.3 被污染或可能被污染的实验材料在带出实验室前应进行消毒。

#### 1.2 利器使用

1.2.1 采血时应使用一次性注射器及安全型采血针具，如蝶形真空针，自毁型针具等，以降低直接接触血液和刺伤的危险。采血时应戴手套，谨慎操作，防止血液污染手部皮肤，并防止被针头刺伤。

1.2.2 应尽量避免在实验室使用针头、刀片等利器和玻璃

器皿，以防止刺伤或划伤。如果必须使用，应采取防止刺伤或划伤的措​​施，并对用过的物品进行消毒。

1.2.3 应加强对锐器的管理，应将用过的针头等锐器直接放入耐穿透、防渗漏的锐器盒中，消毒后废弃。锐器盒应一次性使用，使用容积不宜超过 3/4。

1.2.4 禁止将使用过的一次性针头重新套上针头套，不应弯曲、折断、剪断针头，也不应将其从注射器上卸下。禁止用手直接接触使用过的针头、刀片等利器。

### 1.3 废弃物处理

实验室产生的所有废弃物，包括不再需要的样品和其它物品，均应视为具有感染性。应置于专用的密封防漏容器中，安全运至消毒室，经高压蒸汽消毒后再进行处理或废弃。具体措施和要求遵循《医疗卫生机构医疗废物管理办法》。

### 1.4 常用的消毒方法

HCV 属于对消毒剂较敏感的亲脂病毒，对常用的消毒剂较为敏感，然而在对含有 HCV 的血液污染物品进行消毒时，有机物的干扰可能导致低效消毒剂消毒无效或效果不佳。为确保消毒效果，《医疗机构消毒技术规范》规定，对经血传播病原体污染的物品应使用高水平消毒或灭菌方法。

物理消毒方法：（1）压力蒸汽灭菌，121℃，102.9kPa，保持 15-30 分钟。（2）干热灭菌器灭菌，140℃，保持 2 小时；150℃，保持 150 分钟；160℃，保持 120 分钟；170℃，保持 60 分钟；

180℃,保持 30 分钟。(3)紫外线消毒:使用紫外线灯( $\geq 70 \mu W/m^3$ )直接照射 ( $\geq 30$  分钟)。(4)低温甲醛蒸汽消毒:采用复方甲醛溶液(2%)或福尔马林溶液(35-40%甲醛)在 55-80℃z 消毒 30-60 分钟。

化学消毒方法: (1) 含氯消毒剂(次氯酸钠,含有效氯 2000-5000mg/L)擦拭物品表面作用 30 分钟以上;浸泡待消毒物品 30 分钟以上;或均匀喷洒作用 60 分钟以上。(2)乙醇溶液(70-80%)擦拭物品表面 2 遍,作用 3 分钟;或浸没待消毒物品 30 分钟以上。(3)过氧化氢溶液(30g/L),按照 20-30mL/m<sup>3</sup>用量使用气溶胶喷雾器消毒,作用 60 分钟。(4)戊二醛(2%)浸泡待消毒物品作用 10 小时。(5)过氧乙酸溶液(1000-2000mg/L)擦拭物品表面消毒,作用 30 分钟;浸泡待消毒物品作用 30 分钟。

## 2. HCV 职业暴露及处理措施

HCV职业暴露指医疗卫生及其他相关行业人员在从事职业活动中意外被丙型肝炎病人的血液、体液污染了皮肤或者粘膜,或者被含有HCV的血液、体液污染了的针头及其他锐器刺破皮肤,有可能被HCV感染的情况。

职业暴露发生后,通常应遵循四条原则:及时处理原则,报告原则,保密原则,知情同意原则。作为常见的血源性病原体之一,HCV职业暴露的局部急救处理和报告等要求与其他血源性病原体(乙型肝炎病毒、人免疫缺陷病毒等)基本相同,但检测、暴露后感染风险评估、暴露后预防和治疗措施有所不同。具体如

下：

## 2.1 局部急救处理

发生 HCV 职业暴露后，应立即实施以下局部处理措施：

（1）皮肤暴露：用肥皂液和流动水清洗污染的皮肤。如皮肤有伤口，应当在伤口旁端轻轻挤压（从近心端向远心端方向挤压），避免挤压伤口局部，尽可能挤出损伤处的血液，再用肥皂液和流动水进行冲洗 10-15 分钟；随后用消毒液（如 75%酒精或 0.5%碘伏）进行消毒，并包扎伤口。

（2）粘膜暴露：用生理盐水或流动水冲洗粘膜 10-15 分钟。

## 2.2 检测和暴露后感染风险评估

2.2.1 发生 HCV 职业暴露后，应尽快（最好 48 小时以内）对暴露源和暴露人进行基线检测。

2.2.2 暴露源是指其血液或其他潜在感染性材料是暴露源头的人。对暴露源的基线检测首选 HCV RNA 检测（特别是已知或疑似其近期有 HCV 感染高危行为时）；也可先检测 HCV 抗体，结果为阳性的再检测 HCV RNA。如果暴露源的基线检测结果为 HCV RNA 阴性，或者 HCV 抗体阴性，可排除暴露后 HCV 感染风险，不用对暴露人进行随访检测。如果检测结果为 HCV RNA 阳性，或者 HCV 抗体阳性但无条件检测 HCV RNA，有暴露后感染 HCV 风险，应考虑对暴露人进行随访检测。

2.2.3 对暴露人的基线检测首选 HCV 抗体检测，结果为阳性的再检测 HCV RNA；也可以与暴露源一起，直接检测 HCV RNA。

如果暴露人的基线检测结果为 HCV RNA 阳性，视为暴露前感染，不进行随访检测。如果检测结果为 HCV 抗体阴性，或者 HCV 抗体阳性但 HCV RNA 阴性，当符合 2.2.2 中的随访检测条件时，应对暴露人进行随访检测。

2.2.4 随访检测：对需要进行随访检测的暴露人，在暴露后 3-6 周进行 HCV RNA 检测。如果 HCV RNA 检测结果为阴性或未检测，在暴露后 4-6 月进行最后一次 HCV 抗体检测。HCV 抗体检测结果为阴性时，终止随访。HCV 抗体检测结果为阳性时，再进行 HCV RNA 检测。在随访期内，当暴露人出现急性丙型肝炎症状时，应及时检测 HCV RNA。

### 2.3 暴露后预防和治疗措施

2.3.1 发生 HCV 职业暴露后，不推荐服用暴露后预防药物。

2.3.2 如果检测发现暴露源或暴露人 HCV RNA 阳性，应及时转介治疗。

### 2.4 报告

2.4.1 有可能发生 HCV 职业暴露的医疗卫生等机构应当按照卫生健康行政部门的要求建立 HCV 等血源性病原体职业暴露的预防、处置及上报制度。

2.4.2 HCV 职业暴露记录表可参考使用《血源性病原体职业接触防护导则》附录中的“血源性病原体职业接触登记表”。

## 参考文献

1. 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 病原微生物实验室生物安全通用准则: WS 233-2017[S]. 北京: 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 2017.
2. 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 医疗机构消毒技术规范: WS/T 367-2012[S]. 北京: 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 2012.
3. 医疗卫生机构医疗废物管理办法[J]. 中华人民共和国卫生部公报, 2003(04): 8-11.
4. 中华人民共和国卫生部. 医务人员艾滋病病毒职业暴露防护工作指导原则(试行)[J]. 中国生育健康杂志, 2004, 015(004):196-197.
5. 中华人民共和国卫生部. 血源性病原体职业接触防护导则: GBZ/T 213-2008[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2008.
6. 中华人民共和国国家健康卫生委员会. 医疗机构感染预防与控制基本制度(试行)[Z]. 2019.
7. Peng H, Bilal M, Iqbal HMN. Improved Biosafety and Biosecurity Measures and/or Strategies to Tackle Laboratory-Acquired Infections and Related Risks. Int J Environ Res Public Health. 2018;15(12):2697.
8. Boyce JM. Modern technologies for improving cleaning and disinfection of environmental surfaces in hospitals. Antimicrob Resist Infect Control. 2016;5:10.

9. Protano C, Cammalleri V, Romano Spica V, et al. Hospital environment as a reservoir for cross transmission: cleaning and disinfection procedures. *Ann Ig.* 2019;31(5):436–448.
10. Moorman AC, de Perio MA, Goldschmidt R, et al. Testing and clinical management of health care personnel potentially exposed to hepatitis C virus — CDC guidance, United States, 2020 [J]. *MMWR Recomm Rep*, 2020, 69(6): 1 – 8.