

台灣地區市售 C 型肝炎抗體檢驗試劑之評估

柳逸照、謝榮添

第二組

摘 要

C 型肝炎抗體檢驗試劑為檢測 C 型肝炎之重要工具，目前台灣地區上市之 C 型肝炎抗體檢驗試劑已有多種，而各廠牌間之評估報告闕如，本報告即針對目前已在國內上市之該檢驗試劑作初步評估。自民國八十三年十二月至八十四年一月間，分別於台灣北、中、南區大型醫院及捐血中心抽購五種不同廠牌之 C 型肝炎抗體酵素免疫分析法檢驗試劑共六件，並依據各廠牌所附之操作手冊進行檢測。各廠牌檢驗試劑所需檢測時間分別為 45 ~ 150 分鐘，其陰性對照血清之組內再現性為 11.81% ~ 22.24%；陽性對照血清為 3.05% ~ 9.75%。在靈敏度方面有兩種廠牌較佳，但特异性方面各廠牌間並無顯著差異。

鍵語： C 型肝炎抗體、酵素免疫分析法。

前 言

病毒性肝炎檢驗試劑的開發始於 70 年代初期，經由檢驗血液中的 B 型肝炎表面抗原，來降低輸血所引起的 B 型肝炎感染率，但整體輸血後肝炎的發生率只下降約 25%。在該類患者體內無法檢測出任何 A 型或 B 型肝炎的血清標誌，Feinstone *et. al.* 提出這些不是因為 A 型或 B 型肝炎病毒所導致的輸血後肝炎 (post-transfusion hepatitis, PTH) 為「非 A 非 B 型肝炎 (non-A, non-B hepatitis (NANBH))」⁽¹⁾，而感染輸血後肝炎有將近 90% 是由非 A 非 B 型肝炎所引起⁽²⁾。目前已證實引起血液性感染 (blood-borne) 的非 A 非 B 型肝炎為 C 型肝炎病毒^(3,4)。其傳染途徑可分為經皮 (percutaneous) 和非經皮 (non-percutaneous) 兩種，前者包括輸血後感染、血液透析及血液製劑注射感染^(5,6)；後者以性接觸感染為大宗，其次為週產期感染⁽⁷⁾。患者經感染後有相當比例會漸漸地轉變為活動性肝炎，肝硬化，甚至肝癌⁽⁸⁾

。在台灣地區 C 型肝炎的盛行率雖不若 B 型肝炎高，但自 1981 年起行政院衛生署開始 B 型肝炎疫苗全面接種計畫，迄今 B 型肝炎感染已明顯的降低，而相對 C 型肝炎防治的重要性亦顯著提高⁽⁹⁾。因此，C 型肝炎的普遍篩檢是刻不容緩的，而行政院衛生署亦於民國 81 年公告供血者及血液製劑製造前所使用原料均不得呈現 C 型肝炎抗體陽性反應。目前，宿主對抗 C 型肝炎病毒所產生的抗體已為診斷該疾病的最佳血清標誌。而利用 Choo *et. al.* 發現之該病毒基因片段所表現的蛋白質抗原⁽³⁾，來檢驗血液中 C 型肝炎抗體之檢驗試劑亦已發展出來⁽¹⁰⁾。在國內目前亦有多家廠商上市 C 型肝炎抗體檢驗試劑，而各廠牌間之評估報告闕如，本調查即針對目前在國內上市之該檢驗試劑作初步評估，以期為 C 型肝炎防治上作更有利之選擇。

材料與方法

一、檢驗試劑來源及檢測方法

台灣地區市售 C 型肝炎抗體檢驗試劑之評估

自民國八十三年十二月至八十四年一月間，分別於台灣北、中、南區大型醫院及捐血中心抽購五種不同廠牌之 C 型肝炎抗體酵素免疫分析法 (enzyme immunoassay, EIA) 檢驗試劑共六件；其中一廠牌為不同批號 (表一)。並分別依據各廠牌所附操作手冊中

之檢驗步驟分別進行下述之檢測，其中 E 廠牌檢驗試劑有兩種檢驗步驟 (表二)；若為盤式 (plate form) 檢驗試劑以 SPECTRA III 儀器 (SLT Lab.) 測讀吸光度，珠式 (bead form) 檢驗試劑則以 QUANTUM II 儀器 (ABBOTT Lab.) 測讀吸光度。

表一 抽購 C 型肝炎抗體檢驗試劑之種類

廠牌	試劑型式	衛生署許可證字號	抗原來源	吸附抗原蛋白
A 廠	盤式	外盒包裝有記載	Recombinant	非結構與結構蛋白
B 廠	盤式	外盒包裝有記載	Recombinant	非結構與結構蛋白
C 廠	盤式	外盒包裝無記載	Recombinant	非結構與結構蛋白
D 廠*	珠式	外盒包裝無記載	Recombinant	非結構與結構蛋白
E 廠	盤式	外盒包裝無記載	Synthetic Peptides	非結構與結構蛋白

* 本檢驗試劑有兩種不同批號。

表二 C 型肝炎抗體檢驗試劑檢測步驟

廠牌	A 廠	B 廠	C 廠	D 廠	E 廠	
檢測方法	EIA 三明治法	EIA 三明治法	EIA 三明治法	EIA 三明治法	EIA 三明治法	
檢體量	5 μ l	15 μ l	10 μ l	10 μ l	15 μ l	
檢體稀釋液	200 μ l	150 μ l	90 μ l	400 μ l	300 μ l	
稀釋檢體試驗量	100 μ l	165 μ l	100 μ l	200 μ l	200 μ l	
檢體培育： 時間/溫度	30 min/40 $^{\circ}$ C	60 min/37-40 $^{\circ}$ C	60 min/40 \pm 1 $^{\circ}$ C	60 min/40 \pm 2 $^{\circ}$ C	15 min/37 \pm 2 $^{\circ}$ C	30 min/37 \pm 2 $^{\circ}$ C
檢體清洗次數	6 次	3 次	3 次	Automated	6 次	
偶合液量	100 μ l	100 μ l	100 μ l	200 μ l	100 μ l	
偶合液培育： 時間/溫度	30 min/40 $^{\circ}$ C	30 min/37-40 $^{\circ}$ C	60 min/40 \pm 1 $^{\circ}$ C	30 min/40 \pm 2 $^{\circ}$ C	15 min/37 \pm 2 $^{\circ}$ C	
偶合液清洗次數	6 次	5 次	4 次	Automated	6 次	
呈色受質溶液量	100 μ l	100 μ l	100 μ l	300 μ l	100 μ l	
呈色受質溶液培育： 時間/溫度	30 min/ 室溫	30 min/15-30 $^{\circ}$ C	30 min/ 室溫	30 min/ 室溫	15 min/37 \pm 2 $^{\circ}$ C	
終止反應	100 μ l 2N 硫酸	100 μ l 2N 硫酸	50 μ l 4N 硫酸	1ml 2N 硫酸	100 μ l 1M 硫酸	
判讀 (波長 nm)	492 nm	492 nm	492 nm	492 nm	492 nm	
檢測效度	PC-NC \geq 0.40	NC \leq 0.15 PC-NC \geq 0.5	NC \leq 0.20 0.90 \leq PC \leq 2.50	PC-NC \geq 0.40	NC \leq 0.10 ; 0.40 \leq PC \leq 2.00 PC-NC \geq 0.400	
篩檢值	NC+0.25(PC)	NC+0.25(PC)	0.25(PC)	NC+0.25(PC)	0.15(PC)	
檢測總計時間	90 min	120 min	150 min	120 min	45 min	60 min

二、組內 (within-run) 再現性測定

各廠牌之檢驗試劑以該試劑所附之陰性對照血清及陽性對照血清，依其檢驗步驟各測八孔 (珠)。判讀所得之陰性對照血清及陽性對照血清之平均吸光度為計算其篩檢值 (cut-off value) 之依據，並經統計分析其再現性。

三、靈敏度測定

由普生股份有限公司 (General Biological Corp.; Taiwan R.O.C.) 所提供之 200 GB 標準血清，以該公司之 C 型肝炎檢體稀釋液 (Lot. C349809DO；含胎牛血清及其他蛋白質安定劑與 0.001% gentamycin) 製備 200 GB、100 GB、50 GB、25 GB、12.5 GB、6.25 GB 及 0 GB 之靈敏度測試血清組。分別以各廠牌之檢驗試劑測試靈敏度血清組各三孔 (珠)，比較測得各項結果。

四、特異性測定

由各原廠所提供之 15 件陽性及 35 件陰性共 50 件血清樣品，分別以各廠牌之檢驗試劑檢測各血清樣品一孔 (珠)，比較測得各項結果。

結 果

組內再現性測定結果

各廠牌之檢驗試劑其陰性對照血清及陽性對照血清測定結果顯示 (表三)，各陰性對照血清及陽性對照血清平均吸光度之檢測效度均符合表一所列。經統計分析顯示各廠牌陰性對照血清之變異係數 (coefficient of variation; C.V.) 分別在 11.8% ~ 22.24% 間，均符合一般陰性對照血清所規定之變異係數值 25% 以內。而各廠牌陽性對照血清之變異係數分別在 3.05% ~ 9.75% 間，亦均符合一般陽性對照血清所規定之變異係數值 15

表三 陰性對照血清及陽性對照血清之測讀結果

廠牌	陰性對照血清		陽性對照血清		篩檢值
	Mean A _{492 nm} ± S.D.	C.V.%	Mean A _{492 nm} ± S.D.	C.V.%	
A 廠	0.085 ± 0.014	16.21	1.772 ± 0.154	8.68	0.528
B 廠	0.104 ± 0.012	11.81	1.365 ± 0.085	6.30	0.443
C 廠	0.066 ± 0.011	17.14	1.048 ± 0.040	3.79	0.262
D 廠 _a *	0.057 ± 0.009	15.78	1.256 ± 0.095	7.59	0.371
D 廠 _b *	0.093 ± 0.017	17.87	1.280 ± 0.125	9.75	0.413
E 廠 _S **	0.018 ± 0.004	22.24	1.706 ± 0.053	3.09	0.256
E 廠 _L **	0.020 ± 0.003	15.11	1.956 ± 0.073	3.74	0.293

*a,b 分別代表不同批號之檢驗試劑。

**S 代表該試劑檢體短時間培育檢測步驟，L 代表檢體長時間培育檢測步驟。

表四 靈敏度測血清組之定性測定

靈敏度血清測定組	A 廠	B 廠	C 廠	D 廠 _a	D 廠 _b	E 廠 _S	E 廠 _L
200 GB	+	+	+	+	+	+	+
100 GB	+	+	+	+	+	+	+
50 GB	+	+	+	+	+	+	+
25 GB	-	+	+	+	+	-	+
12.5 GB	-	-	+	+	+	-	-
6.25 GB	-	-	+	+	+	-	-
0 GB	-	-	-	-	-	-	-

台灣地區市售 C 型肝炎抗體檢驗試劑之評估

表五 靈敏度測試血清組之定量測定

廠牌	迴歸方程式	相關係數 (R)	篩檢值	靈敏度
A 廠	$Y = -2.667 + 103.220X$	0.991	0.528	51.80 GB
B 廠	$Y = 4.183 + 31.132X$	0.988	0.443	17.97 GB
C 廠	$Y = -2.502 + 28.094X$	0.992	0.262	4.86 GB
D 廠 a*	$Y = -1.561 + 16.334X$	0.964	0.371	4.50 GB
D 廠 b*	$Y = -5.457 + 29.671X$	0.959	0.413	6.80 GB
E 廠 S	$Y = -5.805 + 192.690X$	0.977	0.256	43.52 GB
E 廠 L	$Y = -12.991 + 126.187X$	0.983	0.293	23.98 GB

* 靈敏度測試血清組之吸光度值大於 QUANTUM II 之最大吸光度 (2.000) 之濃度不予列入計算。

% 以內。

靈敏度測定結果

將靈敏度測試血清組經各廠牌檢驗試劑檢測，經測讀吸光度後，分別由各篩檢值作定性結果判定顯示 (表四)。其靈敏度以 C 廠及 D 廠兩種廠牌最佳，均可測至靈敏度測試血清濃度 6.25 GB，B 廠及 E 廠_L 兩種廠牌次佳，A 廠及 E 廠_S 兩種廠牌再為其次。若將靈敏度測試血清組之各吸光度為 X 軸，靈敏度測試血清組為 Y 軸作直線迴歸分析，並將各檢驗試劑之篩檢值代入所得之各迴歸方程式中，以定量計算各檢驗試劑之推測靈敏度，其靈敏度定量結果亦與上述定性結果相似 (表五)。

特異性測定結果

各廠牌檢驗試劑測試 50 件血清樣品 (包括 15 件陽性樣品及 35 件陰性樣品) 結果顯示 (表六)，各廠牌檢驗試劑所測得血清樣品之結果均一致，並無顯著差異。

討 論

表六 各檢驗試劑特異性測試結果之比較

廠牌	陽性	陰性
A 廠	15(30%)	35(70%)
B 廠	15(30%)	35(70%)
C 廠	15(30%)	35(70%)
D 廠 _a	15(30%)	35(70%)
D 廠 _b	15(30%)	35(70%)
E 廠 _S	15(30%)	35(70%)
E 廠 _L	15(30%)	35(70%)

從針對偵測 C 型肝炎病毒非結構蛋白 (C100-3) 抗體發展之第一代檢驗試劑起，現在已發展至靈敏度較高之第三代 C 型肝炎抗體檢驗試劑⁽¹¹⁾。目前在國內上市產品已獲得行政院衛生署許可證者均為第一代及第二代檢驗試劑，其檢驗方法包括酵素免疫分析法及放射免疫分析法 (radioimmunoassay, RIA) 兩種。目前國內經常性之 C 型肝炎篩檢主要仍為酵素免疫分析法，而且測 C 型肝炎病毒非結構蛋白 (C100-3) 抗體之第一代檢驗試劑現已被偵測 C 型肝炎病毒非結構蛋白及結構蛋白抗體第二代檢驗試劑所取代，故本調查針對第二代酵素免疫分析法檢驗試劑進行評估。所抽購之各廠牌檢驗試劑中有三種廠牌雖獲得行政院衛生署之許可證，但其外盒包裝均無中文標示及許可證字號。由表二顯示各廠牌之檢驗試劑其所需檢體量少，為 5 ~ 15 μ L 即可進行檢測。但檢測之培育時間略有不同，最短者以 E 廠_S 需時 45 分鐘，最長者為 C 廠需時 150 分即可完成檢測；而檢測時間長短對於結果之迅速取得有決定之影響。在本調查中各廠牌檢驗試劑陽性對照血清及陰性對照血清之組內再現性均佳，顯示各檢驗試劑自身品質之一致性。由各廠牌檢驗試劑間比較之相關係數顯示，雖各檢驗試劑彼此間有良好之相關性，但在靈敏度方面卻有些差異，這種情形可歸之於各廠牌篩檢值所依據之陽性對照血清及陰性對照血清標準濃度沒有統一⁽¹²⁾，因為目前尚未有一種較客觀的篩檢值，無法判別何者所得之結

藥物食品檢驗局調查研究年報 (Ann. Rept. NLFD)

表七 特異性陽性血清樣品篩檢值比之比較

篩檢值比	A 廠	B 廠	C 廠	D 廠 a	D 廠 b	E 廠 s	E 廠 L
>5	2	6	11	7	5	5	5
4-5	0	0	1	1	0	0	0
3-4	1	3	1	5	6	0	1
2-3	3	4	0	1	2	1	3
1-2	9	2	3	1	2	9	6
合計	15	15	15	15	15	15	15

果較正確。若從在特異性測定方面觀之，各廠牌檢驗試劑測定之定性結果均一致，並無顯著性差異。但由各檢驗試劑之特異性測定 15 件陽性血清樣品其篩檢值比（樣品吸光度 ÷ 篩檢值，cut-off index），因靈敏度不同而有所差別（表七），因為靈敏度不夠者可能篩檢時漏失，造成偽陰性。而且前第二代檢驗試劑在 C 型肝炎發生率低的族群於篩檢時仍有相當高之偽陽性，必須輔以其他確認試驗來證實⁽¹³⁾，如核酸分析或肝穿刺作病理切片等方法。但單就本調查各廠牌酵素免疫分析法檢驗試劑間之初步比較結果，整體而言，除靈敏度及檢測時間略有不同外，並無顯著性差異。

目前 C 型肝炎抗體檢驗試劑已發展許多檢驗方法^(14,15)，已運用在供血者及血液製劑產品之篩檢上⁽¹⁶⁾，各種檢驗方法不論用於篩檢或確認試驗上，在操作難易、靈敏度及特異性亦截然不同。如臨床檢驗單位欲選擇使用檢驗試劑時，應配合技術員之素質及實驗室之設備，對選用品牌之檢驗試劑間，配合臨床資料進行大量血清樣品之檢測評估，以選擇適合於實驗室使用之優良檢驗試劑。對目前國內所上市者均為第二代檢驗試劑，應更積極引進靈敏度較高之第三代檢驗試劑，以期對國人健康有更大的保障。

參考文獻

1. Feinstone, A. M., Kapikian, A. Z., Purcell, R. H., Alter, H. J. and Holland, P. V. 1975. Transfusion-associated hepatitis not due to viral

hepatitis type A or B. *N. Engl. J. Med.* 292:767-770.

2. Gitinick, G. 1983. Non-A, non-B hepatitis, etiology and clinical course. *Lab. Med.* 14:721.

3. Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., and Houghton, M. 1989. Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science.* 244:359-362.

4. Choo, Q. L., Richman, K. H., Han, J. H., Berger, K., Lee, C., Dong, C., Gallegos, C., Coit, D., Medina-Selby, A., Barr, P. J., Weiner, A. J., Bradley, D. W., Kuo, G. and Houghton, M. 1991. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:2451-2455.

5. Genesca, J., Esteban, J. I. and Alter, H. J. 1991. Blood-borne non-A, non-B hepatitis: Hepatitis C. *Semin. Liver. Dis.* 11:147-164.

6. Brettler, D. B., Alter, H.J., Dienstag, J. L. Forsberg, A.D. and Levine, P. H. 1990. Prevalence of hepatitis C virus antibody in a cohort of hemophilia patient. *Blood.* 76:254-256.

7. Alter, H. J. 1994. Transmission patterns in hepatitis C virus infection. *Viral Hepatitis and Liver Disease* pp. 445-449. Springer-Verlag. Tokyo.

8. 陳嘉定、陳定信。1990。C型肝炎—過去、現在與未來。當代醫學。17:38-45。
9. Liaw, Y. F., 1994. Viral hepatitis in Taiwan: Status in the 1990s. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. pp.419-423. Springer-Verlag, Tokyo.
10. Kuo, G., Choo Q. L., Alter, H. J., Gitnick, G. L., Redeker, A. G., Purcell, R.H., Miyamura, T., Dienstag, J.L., Alter, M. J., Stevens, C.E., Tegtmeier, J.R., Bonino, F., Colombo, M., Lee, W. S., Kuo, C., Berger, K., Shuster, J.R., Overby, L. R., Bradley, D. W. and Houghton, M. 1989. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*. 244:362-364.
11. Barrera, J. M., Ercilla, M. G., Francis, B., Nelles, M. and Lee, S. R. 1994. Earlier detection of anti-HCV seroconversion in post-transfusion NANBH by a prototype HCV 3.0 ELISA. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. pp.350-351. Springer-Verlag, Tokyo.
12. Revenant, M. C. 1983. "Sandwich" enzyme immunoassay for serum ferritin with polypropylene test tubes as the solid phase. *Clin. Chem.* 29:681-683.
13. 韋玉倩。1992。C型肝炎與C型肝炎檢驗試劑之研究發展。衛生報導。2(4):10-12。
14. Furuichi, Y. and Overby, L. R. 1994. New methods for HCV diagnosis: summary for a speciality session. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. pp.337-338. Springer-Verlag, Tokyo.
15. Fujisawa, K. 1994. Current and future status of hepatitis C virus diagnosis: summary of satellite symposium. pp.339-340. Springer-Verlag, Tokyo.
16. Leslie, G., Dodd, McBride, J. H., Gitnick, G. L., Howanitz, P. J. and Rodgeron, D. O. 1992. Prevalence of non-A, non-B hepatitis/hepatitis C virus antibody in human immunoglobulins. *Am. J. Clin. Pathol.* 97:108-113.



THE EVALUATION OF commercial Anti-HCV DIAGNOSTIC KITS IN TAIWAN

YI-CHAO LIU, JUNG-TIAN HSIEH

DIVISION OF DRUG BIOLOGY

ABSTRACT

Anti-HCV diagnostic kit are routinely used to determine the prevalence of antibody to HCV in the populations of blood donors or in blood preparations. The aim of this study was to evaluate the commercial anti-HCV diagnostic kits used in Taiwan. Six representative commercial kits of five Manufacturers purchased from hospital dispensaries or blood donor centers, Antibody detection was performed according to the manufac-

turer's instructions. The process time for the commercial kits ranged from 45 minutes to 150 minutes. The within-run reproducibility of the negative control sera varied from 11.81% to 22.24% and the positive control sera ranged from 3.05% to 9.75%. Among the kits tested, the products from two manufacturers exhibited greater sensitivity, compared to the other three. However, all kits examined yielded the same specificity.