

固相酶标记双夹心法检测抗HBc-IgM

徐志一¹ 法金生² 任世玲¹ 刘春荣³

HBsAg与抗HBc两项指标常用于乙型肝炎诊断。但这两项指标在我国正常人群中阳性率较高，往往不能成为判定急性乙肝的标准。抗HBs大多于发病3个月后出现；转为HBsAg携带者或迁慢肝者，则始终为阴性，亦不能成为早期诊断或确诊的依据。抗HBc-IgM于急性乙肝感染初期急剧升高，随病程而下降。本文的目的在于探讨抗HBc-IgM作为乙型肝炎诊断指标的实用价值。

材料与方 法

一、血样来源：1.上海南市区113例急性肝炎住院病人发病1个月内与6个月后的双份血清。2.上海某工厂体检中用Abbott药盒查出的HBsAg阳性血清以及抗HBc与抗HBs阳性而HBsAg阴性血清各10份。3.中山医院提供的类风湿因子强阳性血清6份。4.华山医院送验的迁慢肝病人血清11份。

二、主要试剂：兔抗人IgM(抗 μ 链)与羊抗人IgG(抗 γ 链)为丹麦Dako产品。HBcAg来自1名HBsAg携带者死后的尸肝，制成匀浆后冻融3次，加0.1Pronase反复消化、离心后弃沉渣备用(HBcAg系南京医学院流行病学教研室惠赠)。抗HBc-IgG由乙肝患者血清提取，用过碘酸钠法与辣根过氧化物酶接合^[1]。聚苯乙烯板为上海塑料制品3厂出品。洗涤液为0.01M、pH7.2、Tris-Tw(含0.05% Tween-20)。被检血清稀释液为0.01M、pH7.2、PBS-Tw。基质内包括：0.2M Na₂HPO₄ 25.7毫升、0.1M枸橼酸24.3毫升、蒸馏水50毫升、邻苯二胺40毫克、30% H₂O₂ 0.15毫升。

三、操作方法：已有报道^[2]大致如下：

兔抗人IgM包被聚苯乙烯微孔板，4°C过夜后弃去；加入含1%牛血清白蛋白0.01M、pH7.2PBS，37°C放置1小时后弃去；用洗涤液洗3次，加被检血清，常规检测中稀释为10⁻⁴，25°C放置6小时弃去并洗3次；加入抗HBc-IgG与过氧化物酶接合物和内含抗HBc、抗HBs、HBsAg均阴性的10%正常人血清，37°C放置2小时，洗4次；加基质20分钟后再加3N硫酸。在492nm波长下，光密度等于或大于阴性对照2.1倍时判为阳性。

血样HBsAg与抗HBc用ELISA检测，抗HBs用Abbott公司提供的试剂检测。

结 果

一、试验方法的特异性：10⁻³抗HBc-IgM阳性血清滴入事先用抗人IgM包被的塑料板微孔中，孵育并洗去后加入10⁻²抗人IgM进行阻断，并以10⁻²抗人IgG为对照。37°C放置1小时洗去，依次加入HBcIg，抗HBc-IgG与过氧化物酶接合物。结果：加入抗人IgM阻断的1孔光密度值为0.135，加入抗人IgG的对照孔为1.20，抑制率为89%，说明检测系统是特异的。

10份抗HBc与抗HBs阳性而HBsAg阴性的血清，稀释至10⁻²，抗HBc-IgM为阴性。10份HBsAg阳性血清稀释至10⁻⁴，有4份阳性。类风湿因子阳性血清6份均为阴性。

7例急性乙肝病人抗HBc-IgM滴度于发病1个月内 $\geq 10^{-5}$ ，3个月时 $\leq 10^{-3}$ ，符

1 上海第一医学院

2 上海市卫生防疫站

3 苏州市卫生防疫站

合特异性IgM于感染初期升高以后逐步下降的规律。

113例中抗HAV-IgM阳性51例、抗HBc-IgM阳性42例(附表)。抗HAV-IgM阳性者,抗HBc-IgM阴性;抗HBc-IgM阳性者,抗HAV-IgM阴性^[3];分别诊断为甲、乙型肝炎。两种IgM均阴性者20例,除1例后期血抗HBs阳转判为乙肝,另19例判为非甲非乙型。

二、试验方法的灵敏度:在7例乙肝病人发病1个月内的血样中,6份抗HBc-IgM滴度 $\geq 10^{-6}$,1份为 10^{-5} 。

113例中17例6个月后血清抗HBs阳转(附表)。其中15例抗HAV-IgM阴性而抗HBc-

IgM阳性者,诊断为乙肝。1例抗HBc-IgM阴性而抗HAV-IgM阳性,其双份血清HBsAg均阴性,判为甲肝。此人抗HBs阳转可能表示重复感染乙肝后引起的回忆性抗体反应。最后1例两种IgM均阴性,双份血清抗HBs均阳转,判为乙肝,此例抗HBc-IgM的检测结果可能为假阴性。

42例抗HBc-IgM阳性病例中,41例HBsAg阳性,1例阴性。该例后期抗HBs阳转,判为乙肝。少数病例可在发病早期清除HBsAg。11例迁延肝病史都在1年以上者,首次与本次发病时HBsAg与抗HBc都是阳性。11例中10例抗HBc-IgM阳性。

附表

113例急性病毒性肝炎各项血清学指标检测结果与病原分型

型别判定	人数	%	抗HAV-IgM		抗HBc-IgM		HBsAg		抗HBc		抗HBc阳转	
			阳性数	%	阳性数	%	阳性数	%	阳性数	%	人数	%
甲	51	45.1	51	100.0	0	0	8	15.7	33	64.7	1	2.0
乙	43	38.1	0	0	42	97.7	42	97.7	43	100.0	16	37.2
非甲非乙	19	16.8	0	0	0	0	2	10.5	11	57.9	0	0
合计	113	100.0	51	45.1	42	37.2	52	46.0	87	77.0	17	15.0

注:①1例抗HAV-IgM阳性,抗HBc-IgM阴性而抗HBs阳转。此例双份血清HBsAg均阴性,可能为甲、乙两型混合感染,而乙肝感染为回忆性反应。

②判为乙肝的43例中,1例抗HBc-IgM阴性但HBsAg阳性、抗HBs阳转;另1例HBsAg阴性但抗HBs阳转、抗HBc-IgM阳性。

三、抗HBc-IgM滴度动态:对2例急性与1例转为慢性的乙肝病人分别于发病1个月以内、3个月、8~10个月、18~20个月检测抗HBc-IgM、HBsAg与抗HBs。第一例HBsAg很快转阴,抗HBs早期出现,病情迅速恢复。抗HBc-IgM滴度初期为 10^{-6} ,后下降至 10^{-2} ,维持不退(图1),抗HBc(IgG+IgM)由 10^{-3} 降至 10^{-2} 。第二例临床痊愈,HBsAg始终阳性,抗HBs一直阴性,抗HBc-IgM由 10^{-5} 降至 10^{-3} ,最后降至 10^{-2} ,抗HBc于病初10个月内维持于 10^{-4} (图2)。

1例慢性肝炎病人,急性发病4个月后病情缓解,抗HBc-IgM下降为 10^{-4} ,9~10个月时病情恶化,SGPT上升,抗HBc-IgM于复发前一周上升为 10^{-6} 。在阻断试验中,阳性

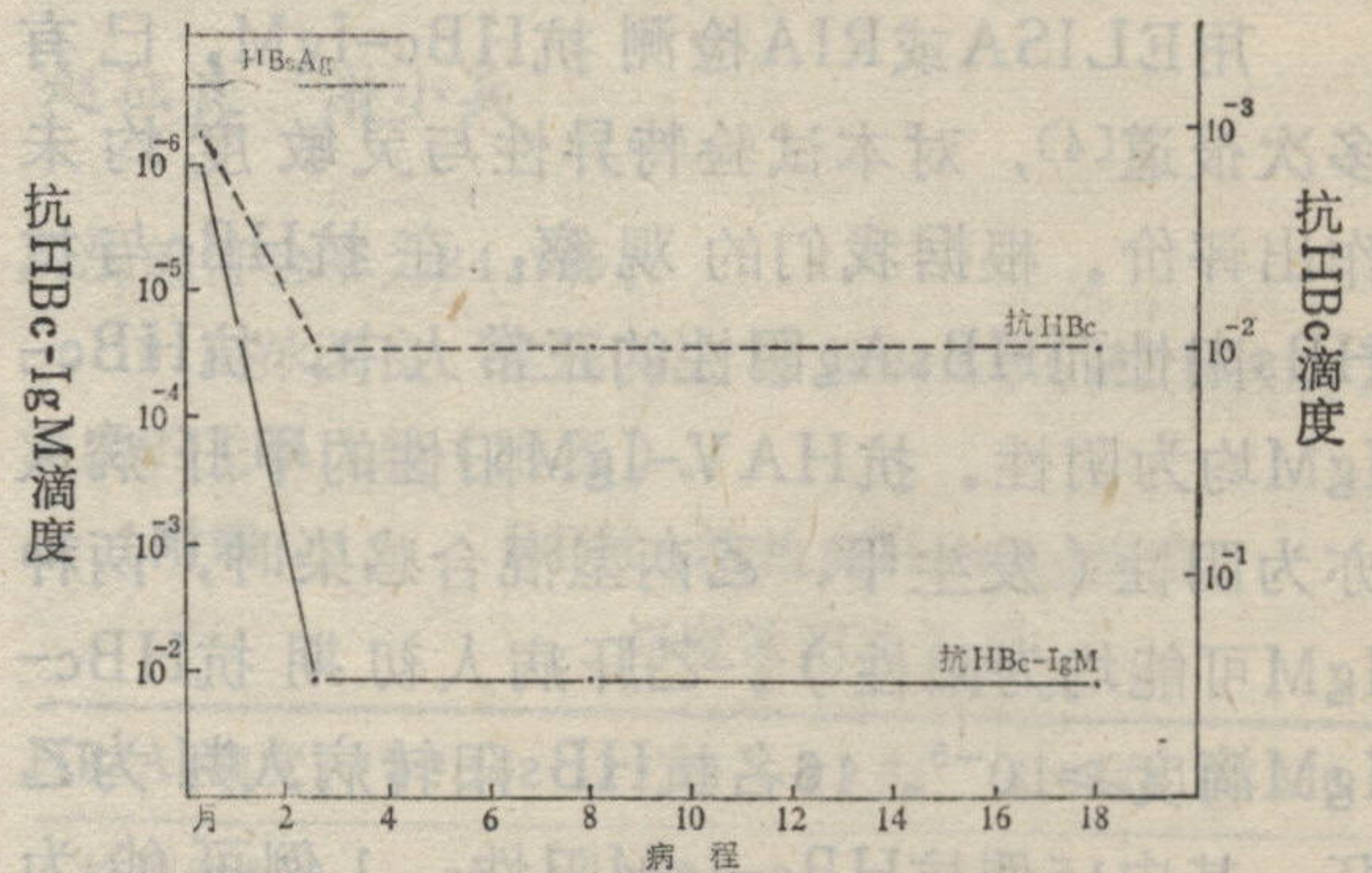


图1 1例康复的急性乙肝病人病后抗HBc-IgM、抗HBc与HBsAg动态

结果可用抗人IgM阻断。抗HBc的滴度波动同抗HBc-IgM吻合,表示其滴度消长亦同HBc-IgM有关(图3)。

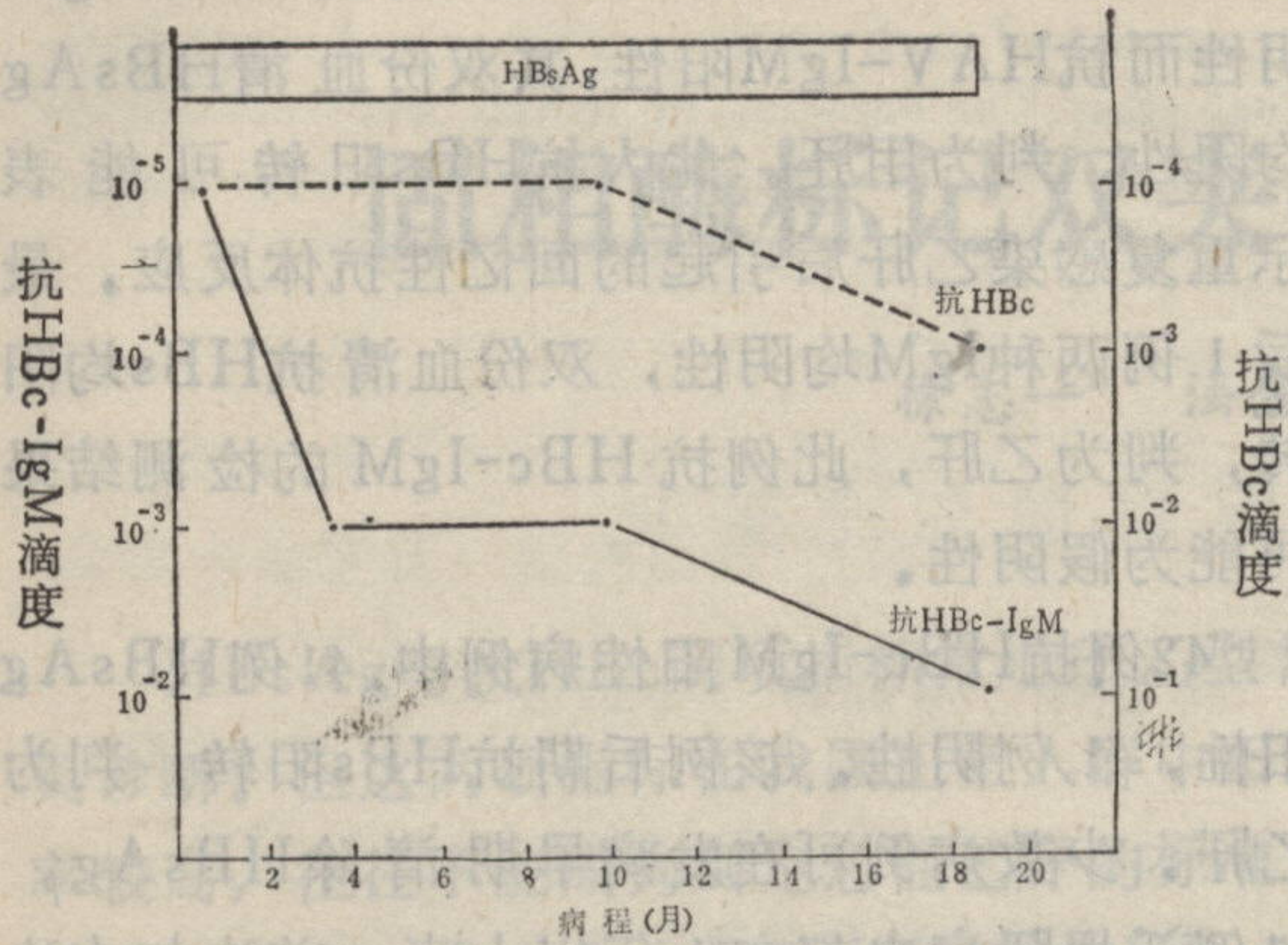


图2 1例临床痊愈急性乙肝病人病后抗HBc-IgM、抗HBc与HBsAg的动态

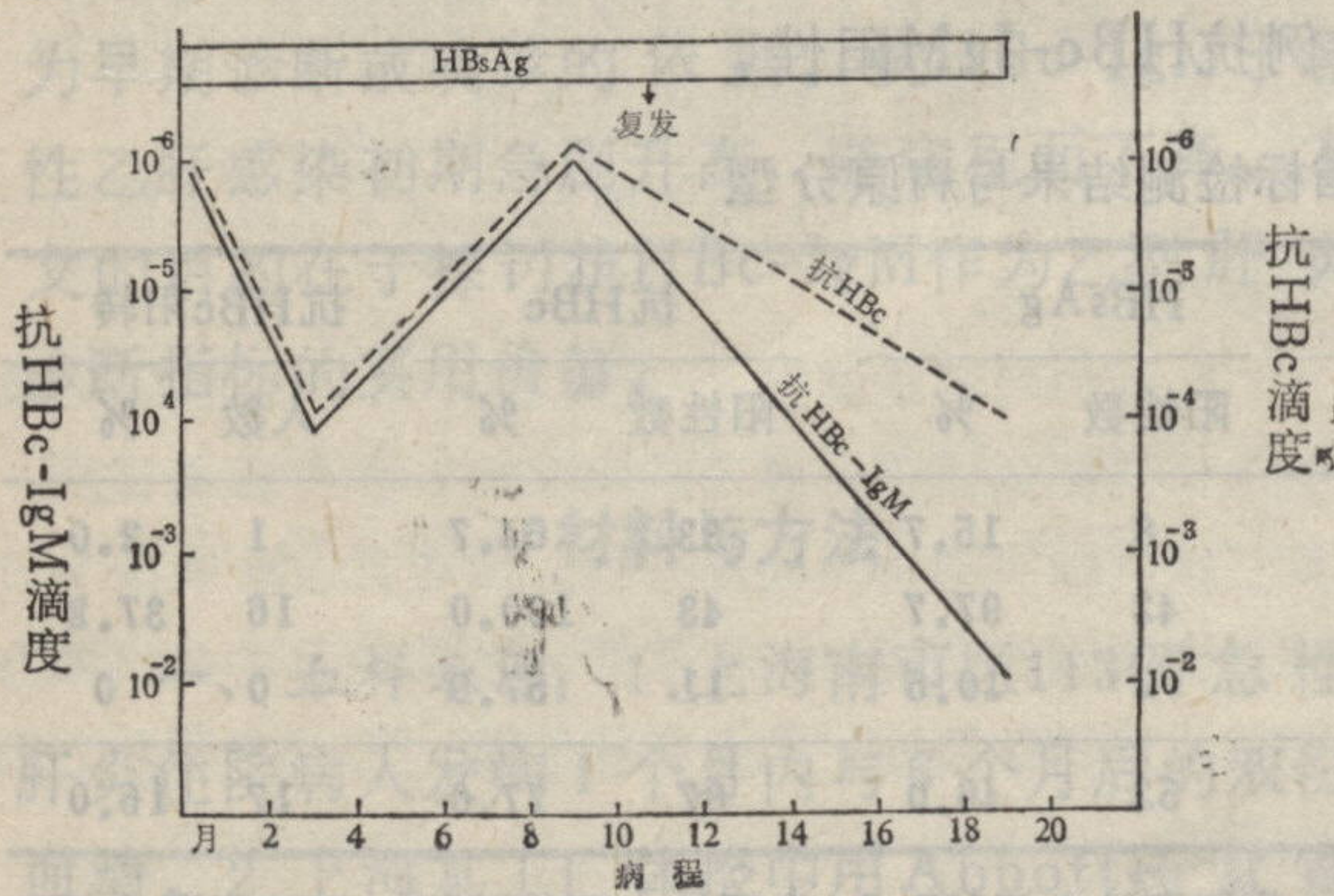


图3 1例急性乙肝转为慢性病例病后与复发前后抗HBc-IgM、抗HBc与HBsAg动态

讨 论

用ELISA或RIA检测抗HBc-IgM, 已有多次报道^[4], 对本试验特异性与灵敏度均未作出评价。根据我们的观察: 在抗HBc与抗HBs阳性而HBsAg阴性的正常人中, 抗HBc-IgM均为阴性。抗HAV-IgM阳性的甲肝病人亦为阴性(发生甲、乙两型混合感染时, 两种IgM可能均为阳性)。乙肝病人初期抗HBc-IgM滴度 $\geq 10^{-5}$ 。16名抗HBs阳转病人判为乙肝, 其中15例抗HBc-IgM阳性, 1例可能为假阴性。但也不能排除其为非甲非乙型, 其抗HBs阳转可能为合并乙肝重复感染所致的回忆性抗体反应。本检测系统的特异性和灵敏度是较好的。

HBsAg阳性不一定是乙型肝炎。51名抗HAV-IgM阳性的甲肝病例中8例为HBsAg携

带者(附表), 其抗HBc-IgM均阴性。HBsAg阴性病例也不能排除其为乙肝, 因为少数病人可在病初清除HBsAg。我国为乙肝高发区, 人群感染率高, 反复感染机会多, 抗HBc-IgM作为乙肝诊断指标比HBsAg更为重要。但两项指标最好同时检测。

10名HBsAg携带者中4人抗HBc-IgM阳性。本试验不能准确鉴别乙肝发病与携带状态, 51例甲肝病人中8例HBsAg携带者以及19例非甲非乙型病人中2例HBsAg携带者, 何以抗HBc-IgM均为阴性尚不能解释。有人报道, 在黑猩猩人工感染中非甲非乙型肝炎病毒可干扰甲型或乙型肝炎病毒。这种干扰作用能否解释上述问题, 值得进一步研究。

有人认为, 迁慢性肝炎抗HBc-IgM阳性率与滴度均低^[5]我们发现, 迁慢性肝炎本试验阳性率并不低, 其滴度在复发前后还有上升。本试验不能鉴别急性与慢性乙肝。

抗HBc-IgM滴度在病后1个月内为高峰, 3个月左右迅速下降, 但持续很久, 多数作者认为可持续1~2年^[5~7]。我们随访7例, 经过18~20个月, 滴度仍在 $10^{-2} \sim 10^{-3}$ 之间。

根据抗HBc-IgM滴度动态, 需对发病初期血样阳性滴度作出规定, 在某滴度以上时判为阳性。Roggendorf将此滴度规定为1:100^[5], Overby定为1:5000, Mortimer定为1:10000。由于早期乙肝病人抗HBc-IgM滴度大多 $\geq 10^{-5}$, 病后HBsAg携带者又可保持抗HBc-IgM于 10^{-3} , 因此, 在我们的检测系统中将阳性滴度定为 10^{-4} 。今后, 应研究发病后不同时期抗HBc-IgM与抗HBc-IgG比值, 也许可提供更为确切的诊断依据。

摘 要

本文报告一种酶联免疫法, 用抗 μ 包被的聚苯乙烯微孔塑料板检测抗HBc-IgM。10份抗HBc阳性正常人血清与6份类风湿阳性血清均未显示假阳性。113例急性肝炎中, 42例抗HBc-IgM阳性, 51例抗HAV-IgM阳性, 分别判为甲、乙型肝炎。20例两种

IgM均阴性, 其中19例判为非甲非乙型, 1例抗HBs阳转判为乙肝。两种IgM检测的阳性结果未发现交叉。10名HBsAg携带者中有4人以及11例慢性肝炎中有10例显示抗HBc-IgM阳性。1例慢活肝病人抗HBc-IgM于复发前一周由 10^{-4} 上升至 10^{-6} , 乙肝病人抗HBc-IgM滴度于病初即达 10^{-6} 。本试验灵敏度与特异性均佳; 可区别近期感染和既往感染, 但不能区别急性与慢性乙肝感染。早期清除HBsAg的乙肝病人及重叠感染甲型或非甲非乙型肝炎的HBsAg携带者, 不能用HBsAg的指标来诊断, 而只能用本试验来确定。

ABSTRACT

An enzyme-immunoassay was developed using the IgM capture procedure with anti- μ coated polystyrene microplates. No false-positive results were detected in 10 normal human sera positive for anti-HBc and 6 sera positive for RF. Among 113 acute hepatitis cases, anti-HBc IgM was detected in 42 cases, anti-HAV IgM was detected in 51 cases and they were identified as hepatitis A and B, respectively. No specific IgM to HAV or to HBcAg were detected in the other 20 cases. Nineteen of them were identified as non-A non-B with one anti-HBs conversion later considered to be hepatitis B. No cross positivity was observed between tests for the two specific IgM. In the tests, 4 out of 10 HBsAg carriers

and 10 out of 11 patients with chronic hepatitis showed anti-HBc IgM. The titer of anti-HBc IgM reached 10^{-6} in the early stage of acute hepatitis B. In one case with chronic active hepatitis, the titer rised from 10^{-4} to 10^{-6} in one week, preceding the recurrence of hepatitis. The test is highly sensitive and specific. It is useful for differentiating the recent past and current hepatitis B infections from remote infection, but it can not be used in differentiating the carrier state and chronic hepatitis B from the acute one. Patients with acute hepatitis B who cleared HBsAg at an early stage, and HBsAg carriers with superimposed hepatitis A or non-A non-B infection might be misdiagnosed by the test for HBsAg alone. The patients and carriers can be correctly defined only by the tests for specific IgM to HAV and to HBcAg.

参 考 文 献

1. Nakane PD et al: J Histochem-cytochem, 22: 1084, 1974.
2. 徐志一: 上海医学, 5: 406, 1982.
3. 徐志一: 急性病毒性肝炎病原分型的初步研究, 内部资料, 1982.
4. Gerlich W et al: J Inf Dis, 142: 95, 1980.
5. Roggendorf M et al: J Clin Microbiol, 13: 618, 1981.
6. Hawkes RA et al: J Clin Microbiol, 11: 581, 1980.
7. Cappel R et al: J Med Virol, 8: 201, 1981.

改良对流免疫电泳的琼脂检测乙肝表面抗原提高了阳性率

岳阳地区防疫站 周祖岳 赵征良 谢小兵

为了增强对流免疫电泳的敏感性, 我们改用鱼精蛋白琼脂, 提高了阳性率。兹报告如下:

一、材料和方法: 缓冲液、打孔、加样、电泳与常规法相同, 唯制板有所改革: 将Tris缓冲液稀释5倍, 配成1%琼脂100毫升, 加热溶化待冷至约 50°C 时加入1%鱼精蛋白5毫升, 板厚同常规法。

二、结果:

1. 用改良法和常规法同时检测560名献血员HBsAg携带情况, 结果改良法阳性率为6.4%, 常规法为4.5%。

2. RIA法HBsAg阳性血清286份, 以电泳常法和改良法同时检测, 结果是: 两法共同阳性111份, 共同阴性155份; 其余的20份常规法为阴性, 而改良法为阳性。两法比较有显著差异, $\chi^2=18.05$, $P<0.005$,

两法的符合率为84.7%。

3. 电泳改良、常规两法与HBsAg (RPHA法) 滴度的关系比较 (附表)。

附表 RPHA法检测HBsAg滴度与电泳阳性关系

HBsAg滴度	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
检测例数	38	36	39	44	56
常规法阳性%	0	0	28.2	95.5	100
改良法阳性%	0	22.2	71.8	100	100

从附表看出, 电泳改良法较常规法显著敏感, 当滴度1:64时改良法阳性率比常法高1倍以上; 在1:32时, 常法已测不出阳性, 而改良法却测得22.2%的阳性率。