

# 固相免疫吸附血凝抑制试验快速检测 甲型肝炎IgM抗体

第四军医大学流行病学教研室\*

肖乐义 王珊珊 徐德忠 李远贵 周 华 陈友绩

**提要** 本文报告一种新建立的快速检测抗-HAV IgM的固相免疫吸附血凝抑制试验。本试验与ELISA对比检测血清标本336份,总符合率为99.4%。被检的甲肝感染者血清抗-HAV IgM滴度范围为1:20~1:327 680。阻断试验、2-ME破坏试验及非甲肝病人血清检测结果表明本试验具有良好的特异性。本试验不需标记抗体,不受类风湿因子的干扰,不需要特殊仪器,且经济简便,能在3小时内得出结果,可用作甲肝的早期诊断和流行病学监测,尤其适于基层单位应用。

**关键词** 甲型肝炎病毒 免疫吸附技术 血凝抑制试验

检测甲肝病人血清中抗-HAV IgM,国内外常用的方法为ELISA和RIA。1990年我们应用甲肝病毒具有血凝素和甲肝病人血清中含有血凝素抗体的特性<sup>[1,2]</sup>,建立了快速检测抗-HAV IgM的固相免疫吸附血凝抑制试验(SPISHAI)<sup>[3]</sup>,现将结果报告如下。

## 材料与方法

### 一、试剂与标本:

1. 抗人IgM:羊抗人IgM为卫生部上海生物制品研究所生产。抗人IgM( $\mu$ 链)为美国Sigma公司产品。

2. 甲肝病毒血凝素的制备:粪便中甲肝病毒血凝素按文献<sup>[4]</sup>提取。简要步骤为:粪便2g加0.01mol/L pH7.4 PBS8ml和氯仿4ml,振摇3分钟后3000转/分离心30分钟,上清液即为甲肝病毒血凝素,保存于-20℃备用。血凝素的检测滴定见文献<sup>[5]</sup>,临用时以0.01mol/L pH5.8 PBS稀释成8单位血凝素。

3. 鹅红细胞的制备:从鹅翅静脉无菌采血,用Alsevers液抗凝和保存,用前洗涤3次,最后用0.01mol/L pH5.8 PBS配成4%细胞悬液。

4. 血清标本:①甲肝病人(按1984年南宁会议诊断标准)血清53例59份;②甲肝病人恢复期血清20份;③儿童甲肝亚临床感染者血清24例72份;④流行性出血热病人血清42份;⑤乙肝病人急性期血清10份;⑥正常人血清133份;⑦类风湿因子(RF)阳性血清18份。

5. 抗-HAV IgM诊断药盒(ELISA):购自南京军区军事医学研究所。

### 二、方法:

1. 固相免疫吸附血凝抑制试验<sup>[6]</sup>:

①原理:SPISHAI不同于经典的血凝试验。原理为用抗人IgM(或抗人IgM $\mu$ 链)包被载体,从而特异性地捕捉待检血清中的抗-HAV IgM,被捕捉的抗-HAV IgM与加入的甲肝血凝素结合后,再加入含有该病毒血凝素受体的鹅红细胞,因无游离的甲肝血凝素与之结合而产生血凝抑制反应;如待检血清不含抗HAV IgM,鹅红细胞将与游离的血凝素结合而出现血细胞凝集。

②程序:将抗人IgM用0.05mol/L pH9.6碳酸盐缓冲液1:400稀释,100 $\mu$ l/孔包被96孔V型PVC血凝软板(浙江玉环芦浦塑化器厂产

\*西安, 邮政编码 710032

品), 4℃过夜后用含0.05%吐温-20的0.01 mol/L pH7.4 PBS(简称 PBS-T)洗涤3次。除第一排孔加PBS-T200μl外, 余孔均加PBS-T 100μl, 将待检血清加于第一排孔后用进样器倍比稀释, 放湿盒内置 22℃ 水浴箱1小时, PBS-T 洗涤3次。加8单位甲肝血凝素 25μl, 22℃ 1小时。加4%鹅红细胞悬液50μl, 混匀1分钟, 置 4℃ 35 分钟后观察结果。同时设阳性对照、阴性对照、血清对照、血球对照和血凝素对照。结果以被检血清显示血凝抑制且滴度 ≥ 1:20 为抗-HAV IgM 阳性。

2. ELISA 捕捉法检测抗-HAV IgM: 按操作说明书进行。

3. 阻断试验: 将已知血清用 PBS-T 1:9 稀释后取 90μl 加抗人 IgM 原液 10μl 混匀, 同时设 PBS-T 血清试验对照, 37℃ 水浴 1 小时后作 SPISHAI。

4. 2-巯基乙醇 (2-ME) 破坏试验: 参见文献[11]。

### 结 果

一、SPISHAI 最佳实验条件的选择: 经方阵点滴选定为: 待检血清与抗人 IgM 反应为 22℃ 1 小时, 溶液 pH7.4; 血凝素与待检血清反应亦为 22℃ 1 小时, 溶液 pH5.8; 鹅红细胞与血凝素反应为 4℃ 35 分钟, 溶液 pH5.8。

#### 二、敏感性:

1. 与 ELISA 的符合率: 用本法与 ELISA 对比检测血清标本 336 份, 其中 334 份结果相符, 符合率为 99.4%。若以 ELISA 为标准, 本法的灵敏度为 98.9%, 特异度为 99.6%

(表1)。

表1 SPISHAI与ELISA检测结果的比较\*

		ELISA		合计
		+	-	
SPISHAI	+	97	1	98
	-	1	237	238
合计		98	238	336

\*两份不相符合的标本为严重溶血, 多次冻融且呈胶冻状的血清

2. 与 ELISA 比较检测滴度: 将 4 份抗-HAV IgM 阳性血清从 1:25 开始倍比稀释, ELISA 的滴度分别为 1:51 200、1:120 400 1:409 600、1:102 400; 而本法与其相应的滴度为 1:25 600、1:51 200、1:102 400、1:51 200。

3. ELISA 吸光值低的阳性血清 SPISHAI 检测结果: 8 份恢复期血清 ELISA 阳性, 但吸光值仅在 0.108~0.233, 用本法检测的滴度亦为 1:20~1:160。

4. SPISHAI 检测抗-HAV IgM 阳性血清的滴度: SPISHAI 检测的 98 份抗-HAV IgM 阳性血清的滴度范围为 1:20~1:327 680, 甲肝病人中的 46 份急性期血清滴度为 1:10 240~1:327 680; 发病 2~3 天就高达 1:20 480~81 980; 恢复期血清滴度在 1:2 560 以下。

#### 三、特异性:

1. 阻断试验与 2-ME 破坏试验: 选用 8 份抗-HAV IgM 阳性血清同时作阻断试验、2-ME 破坏试验及 PBS-T 血清对照, 以证明检测的是否确系特异性 IgM, 结果见表 2。

表 2 阻断试验与 2-ME 破坏试验

方 法	血清 SPISHAI 滴度							
	105*	107	109	112	127	134	221	225
PBST-血清对照	20 480	5 120	5 120	10 240	>40 960	2 560	10 240	20 480
阻断试验	320 (64)**	320 (16)	160 (32)	640 (16)	1 280 (>32)	40 (64)	80 (128)	160 (128)
2-ME 破坏试验	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

\*血清号, \*\*阻断后 SPISHAI 滴度下降倍数

2. 非甲肝病人血清检测结果: 133份正常人血清, 42份流行性出血热病人血清, 10份乙肝急性期血清, 本法检测均阴性。

四、RF因子阳性血清的检测: 18份RF因子阳性血清, SPISHAI测定均为阴性。

五、重复性试验: 5份抗-HAV IgM阳性血清和2份阴性血清用SPISHAI重复检测5次, 阴阳性结果完全一致, 阳性血清滴度孔的变异系数 $<5.5\%$ 。

## 讨 论

固相免疫吸附血凝试验<sup>[7,8]</sup>是1979年后发展起来的一种检测技术。它既具有固相免疫吸附试验捕捉法的高特异性, 又有血凝法简便快速的优点。本文用SPISHAI与ELISA对比检测血清标本336份, 总符合率为99.4%。若以ELISA为标准, 本法的灵敏度为98.9%, 特异度为99.6%。本法检测滴度虽较ELISA低, 但阳性界值的稀释度前者为1:20, 后者为1:1000, 因而检测滴度就会有高低, 但其阳性检出率应该是一致的。本文甲肝发病2~3天时 SPISHAI滴度就高达20 480~81 980, 表明本法符合甲肝早期诊断的要求。SPISHAI检测的抗-HAV IgM阳性血清, 急性期滴度在 $10^{-4}$ ~ $10^{-5}$ , 恢复期在 $10^{-3}$ 以下, 虽较徐志一<sup>[9]</sup>的ELISA略低, 但与俞翠珠<sup>[10]</sup>的结果基本一致。阻断试验与2-ME破坏试验证明本法检测的确系抗-HAV IgM。非甲肝病人血清本法检测全为阴性, 表明此法具有良好的特异性。RF因子阳性血清本法检测均为阴性, 提示此法因无标记抗体参与, 且采用捕捉法, 因而不受RF因子的干扰。

本实验与ELISA相比有以下优点: ①不需纯化和标记抗体; ②不受RF因子干扰; ③不需特殊仪器; ④操作简便快速; ⑤既可用于大批标本的检测, 又可用于单个及少量标本检测, 尤其适于作效价测定; ⑥经济。本方法稳定, 重复性好, 可在任何实验室进行, 特别值

得基层单位应用。

**Rapid Detection of Anti-HAV IgM by Solid-phase Immunosorbent Hemagglutination Inhibition Test** Xian Leyi, et al., Department of Epidemiology, Fourth Military Medical University, Xian

A solid-phase immunosorbent hemagglutination inhibition test (SPISHAI) was developed for hepatitis A virus-specific immunoglobulin M (IgM) antibody

Three hundred thirty and six sera were comparatively detected with both SPISHAI and ELISA. Among them 97 sera were positive and 237 were negative with both method. The crude agreement rate was 99.4%. With SPISHAI the titers of anti-HAV IgM ranged from 1:20 to 1:327 680 among tested sera from infected individuals by HAV. The specificity of SPISHAI was confirmed by 2-ME treatment method and blocking test. The patients with non-A hepatitis all got negative results.

The SPISHAI does not require conjugated antibody and sophisticated equipment, and is not interfered with rheumatoid factor in sera. Furthermore, the result of the test can be got within 3 hours. Therefore, the SPISHAI is a cheap and simple, and could be applied for early diagnosis and epidemiological surveillance of hepatitis A in the community and in primary health care.

**Key words** Hepatitis A virus Immunosorbent technics Hemagglutination inhibition test

## 参 考 文 献

1. Eckles, et al. Hepatitis A virus hemagglutination and a test for hemagglutination inhibition antibodies. J Clin Microbiol 1989; 27:1375.
2. 肖乐义, 等. 血凝试验直接检测粪便中甲型肝炎病毒抗原的初步研究. 第四军医大学学报1991; 12(3): 233.
3. 肖乐义, 等. 固相免疫吸附血凝抑制试验快速检测甲型肝炎病毒IgM. 第四军医大学学报1991; 12(3): 232.
4. 徐德忠, 等. ELISA检测粪便中甲型肝炎抗原的研究. 中华医学检验杂志1984; 7: 179.
5. 杜平. 医学实验病毒学. 第1版. 北京人民出版社, 1985:

65~78.

6. Soliman AK, et al. Solid-phase immunosorbent technique for rapid detection of rift valley fever virus immunoglobulin M bp hemagglutination inhibition. *J Clin Microbiol* 1988, 26: 1913.

7. 倪若愚. 固相免疫吸附血凝技术. 国外医学(微生物学分册) 1988; 11: 114.

8. Krech U, et al. A solid-phase immunosorbent technique for the rapid detection of rubella

IgM by hemagglutination inhibition. *J Gen Virol* 1979, 44: 218.

9. 徐志一. 固相酶标记双夹心法检测甲型肝炎IgM抗体. 上海医学 1982; 5: 406.

10. 俞翠珠, 等. 15例甲型肝炎病人抗HAV-IgM和抗HAV-IgG的动态观察. 上海医学 1991; 14: 26.

11. 耿贯一主编. 流行病学(续编). 实验室方法在流行病学中的应用. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1984: 7~9.

(1991年12月13日收稿, 1992年2月1日修回)

## 从一例牙周脓肿病人的脓液中培养分离出两株专性厌氧菌

广东省佛山市第一人民医院\* 欧阳耀昌 陈琦媛 王维焕 刁均民  
 中山医科大学第一附属医院 陈菊香

据国内外文献报道, 口腔和颌面部厌氧菌感染率很高, 在牙周脓肿中可高达100%。我们于1991年11月, 从本院牙周脓肿之脓液中培养分离出两株专性厌氧菌, 现将结果报告如下。

**一、标本采取:** 挑选牙周脓肿未破溃且未经用药治疗的病人, 用无菌注射器抽取脓液, 立即送实验室培养。

**二、培养分离:** 采用GAM高层琼脂柱作初代培养。应用厌氧缸加混合气体(80% N<sub>2</sub>、10% H<sub>2</sub>和10% CO<sub>2</sub>)法作次代培养分离。即经厌氧培养后的平板, 挑取7~9个菌落, 分别接种GAM平板和羊血平板各1个, 分别作需氧和厌氧试验, 凡在无氧和有氧环境中均生长者, 为兼性厌氧菌。仅在无氧环境中生长者为专性厌氧菌。

**三、厌氧菌鉴定结果:** 从牙周脓肿之脓液中分离

的两株专性厌氧菌, 在GAM平板上可见到两种菌落形态, 一种是产生消化链球菌, 其菌落形态呈圆形、光滑、半透明、不溶血, 革兰氏染色镜检为革兰氏阳性球菌, 排列成双或短链状。生化反应结果能发酵葡萄糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、纤维二糖, 七叶苷阳性。但对硝酸盐还原和靛基质以及触酶试验为阴性。另一种是麦氏放线菌, 在GAM平板上菌落呈圆形、稍扁、光滑、边缘整齐, 有草绿色溶血。革兰氏染色镜检为革兰氏阳性短杆菌。其生化反应能发酵葡萄糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、木糖和阿拉伯糖, 但对七叶苷、硝酸盐还原和靛基质试验均为阴性。

为提高厌氧菌的检出率, 应选择能抑制需氧菌生长而又有利于厌氧菌生长繁殖的培养基, 可直接用厌氧缸加混合气体法进行培养, 省时、省力, 效果良好。

\* 邮政编码 528000

## 欢迎各级卫生防病单位订阅《预防医学文献索引》

《预防医学文献索引》创办于1985年。是由中华预防医学会主管, 山东省卫生防疫站在各省市聘请专家和专业人员编辑的集大成式的检索预防医学文献的工具性刊物。每年编辑一卷, 由中国科技出版社出版, 在全国公开发行。本《索引》从国内外近千种医学及其相关期刊、学术会议和资料汇编中选择重要预防医学文献万余篇, 包括流行病学、“五大卫生”、卫生检验等18个学科, 基本概括了预防医学文献的全貌。适合各级卫生防疫和卫生研究机构的科技人员应用, 也具有重要的馆藏价值。欢迎各级卫生防病单位订阅。每册定价35元, 1989年本45元。订阅办法: 开户银行: 济南历山路分理处, 帐号: 03308802280, 山东省卫生防疫站, 邮政编码: 250014。地址: 济南市经十路72号。邮局汇款孙晓黎收。