

甲型病毒性肝炎的早期诊断

ELISA法检测特异性IgM抗体的研究

杭州市传染病医院

汪义和 刘如星 邵芯仪 张新萍 陆群英 潘荫华

甲型病毒性肝炎IgM抗体 (IgM抗-HAV) 出现早, 高峰来得快, 消失也快^[1~3], 因此患者急性期单份血清中特异性IgM抗-HAV的检出即可作为甲型肝炎早期诊断的可靠指标。

本文报道一种酶联免疫试验 (ELISA) 检测IgM抗-HAV, 并对其应用于甲型肝炎早期诊断进行评价。

材料和方法

一、血清标本

1. 1981年杭州市传染病医院收治的部分急性黄疸型肝炎病人血清。
2. 对杭州市郊区某甲肝流行点52例病人定期收集的血清。
3. 1981年本院收治的70例非肝炎病人血清 (乙脑49例, 腮腺炎9例, 麻疹10例, 出血热和脊髓灰质炎各1例)。
4. 33份脐带血清由建德县人民医院提供。
5. 无近期肝炎史RF阳性的类风湿性关节炎病人血清18份。

二、试剂

1. 甲型肝炎病毒抗原的提取

基本按Seig1氏提取方法^[4]而略加改变, 并经免疫电镜检查证实富含甲肝病毒颗粒, 并由Abbott甲肝试盒进一步核实 (未发表资料)。

2. 马抗人IgM酶结合物的制备

卫生部北京生物制品研究所制备的马抗人IgM血清分别经50%和33%饱和硫酸铵沉淀, 沉淀物用生理盐水溶解, 并经透析除去铵离子,

然后通过DEAE纤维素32柱层析, 收集第一蛋白峰, 经浓缩后测定蛋白含量为10毫克/毫升。国产辣根过氧化物酶-马抗人IgM结合物制备采用骆加里改进的戊二醛二步法^[5]。

3. 甲、乙肝其它标志的检测 1. 固相放射免疫试验 (RIA) 检测IgM抗-HAV由美国Abbott实验室赠送的HAVAB-M试盒检测, 方法按其说明书; 2. HBsAg由日本Green Gross公司赠送的AntihecellTM试盒检测, 方法按其说明书; 3. IgM抗-HBc由作者等报告的双抗体夹心法检测^[13]。

4. RF由上海市医学化验研究所制备的免疫乳胶试剂检测, 滴度以 $\geq 1:20$ 判为阳性。

三、ELISA检测IgM抗-HAV方法

1. 粗提甲肝抗原以pH9.6碳酸盐缓冲液作1:50稀释, 含10微克/毫升, 加0.1毫克/孔, 置4℃过夜。

2. 加10%小牛血清0.2毫升/孔, 4℃过夜。

3. 待检血清用含1%脐血 (抗-HAV阴性的混合血清) pH7.4PBS作1:1000稀释, 加0.1毫升/孔, 每份血清作双孔, 置30℃6小时。

4. 马抗人IgM酶结合物用含1%牛血清白蛋白pH7.4PBS作1:100稀释, 加0.2毫升/孔, 45℃2小时。

5. 加邻苯二胺底物0.2毫升/孔, 置室温20分钟后加2M H₂SO₄一小滴终止反应。

用751型分光光度计测定OD值 (492nm) 每次实验设阳性和阴性对照血清 (均经Abbott

试盒确定)各2份,阳性对照血清OD值应在 1.0 ± 0.2 ,否则应重试。结果以待检血清OD值(P)与阴性对照血清平均OD值(N)之比值表示, $P/N \geq 2.1$ 判为阳性。

结 果

一、特异性和敏感性

1.取经Abbott RIA法检测IgM抗-HAV阳性和阴性血清各1份分别:1.经2-ME处理(即与1:20 2-ME等量混合,37°C作用半小时)后作为待检血清加入本ELISA系统中;2.上述阳性和阴性血清与包被抗原结合后,用羊抗人IgM进行阻断试验。结果表明,未经2-ME处理或抗人IgM阻断,阳性血清OD值为0.890,而经处理或阻断后,OD值分别为0.200和0.195,均较前下降约78%。而阴性血清则变化不大,表明本ELISA法检测的IgM抗-HAV是特异的。

2.用本文的ELISA法与Abbott RIA法同时检测急性黄疸型肝炎病人血清43份,结果见表1。二法IgM抗-HAV阳性率均72.0%(31/43),但ELISA法阳性的31份血清中,RIA法阳性者28份,阴性3份;ELISA法阴性的12份中,RIA法阴性9份,阳性3份。两者总符合率为86.0%。若以Abbott RIA法检测结果为标准,则ELISA法阳性的31份中3份为假阳性(9.6%);阴性的12份中3份为假阴性(25.0%);其敏感性和特异性分别为91.2%和80.0%。但对ELISA法产生假阳性的3份血清作1:4,000稀释均可使其转为阴性,而假阴性的3份血清作1:500稀释时亦均可转为阳性。

表1 本法与Abbott RIA法对43份血清检测结果比较

ELISA	RIA		合计
	+	-	
+	28	3	31
-	3	9	12

二、重复性

取上述IgM抗-HAV阳性和阴性对照血清各1份,按ELISA法进行7次重复试验,结果基本一致,阳性和阴性血清OD值分别变动于1.050~1.300和0.062~0.101,变异系数分别为9.65%和14.3%,说明本试验结果稳定,重复性良好。

三、IgM抗-HAV动态变化

对甲肝流行点52例病人,于发病后不同时间(病后2天至1年),共收集128份血清。经ELISA法检测,IgM抗-HAV以P/N值列入图1。显示随着发病后时间的推移,其P/N

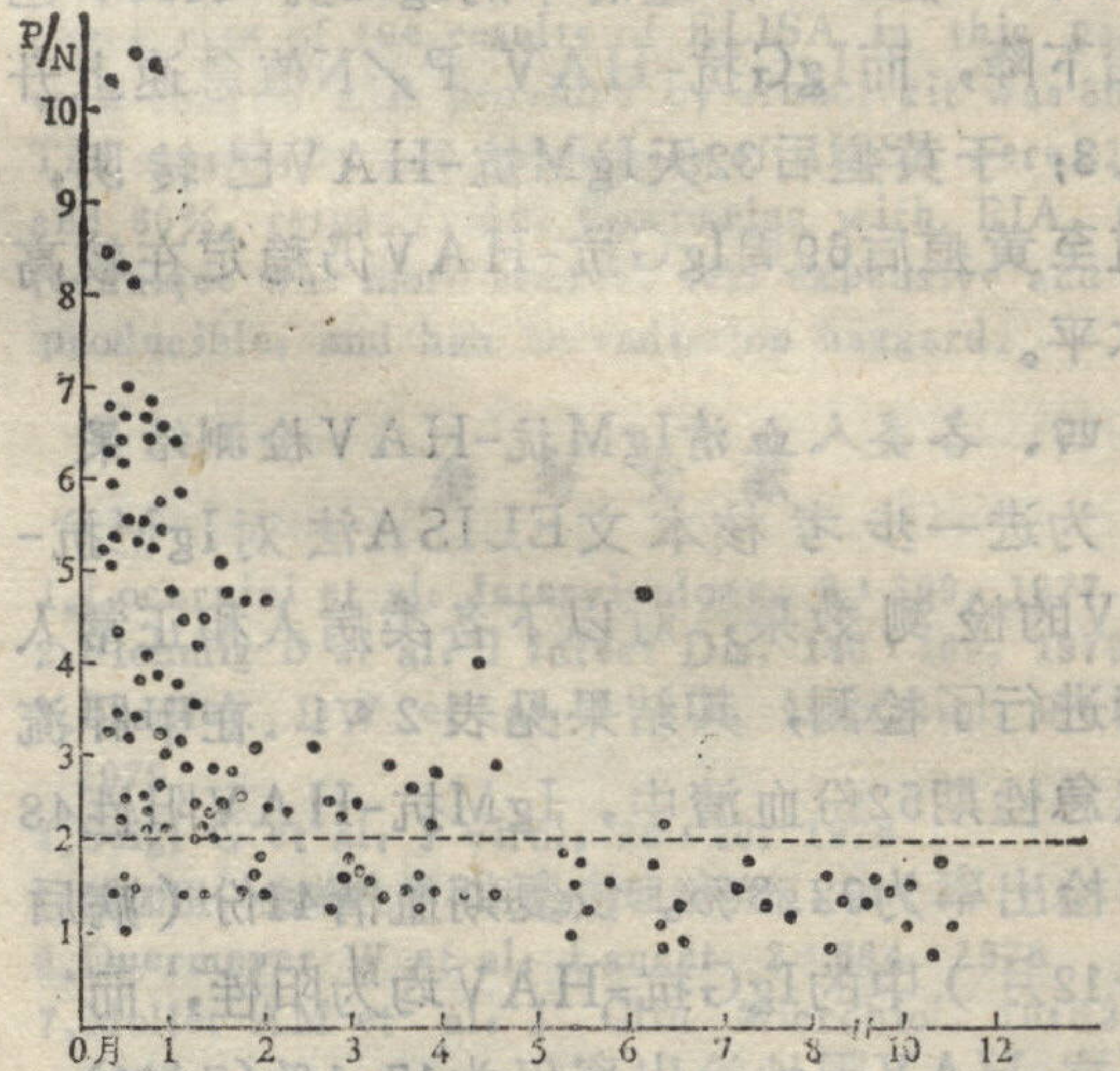


图1 对甲肝流行点52例病人黄疸后不同时间收集的128份血清IgM抗-HAV检测

值分布明显降低。于发病后一个月内的52份血清中,除4份外,其余血清的P/N值均在2.1以上;病后第2个月的26份血清中,6份阴性(虚线以下),其余20份P/N值亦都在5以下;病后2~4个月的19份血清P/N值均已降至3.1以下;4~7月16份血清中除4份P/N值 ≥ 2.1 外,其余均在阴性和阳性临界水平之下;7~15个月的15份血清,全部转阴。

此外,对急性黄疸型甲肝患者沈××收集黄疸后一系列(7份)血清同时进行IgG和IgM抗-HAV动态检测。图2显示该患者出现黄疸后10天的第一份血清中IgM抗-HAV的

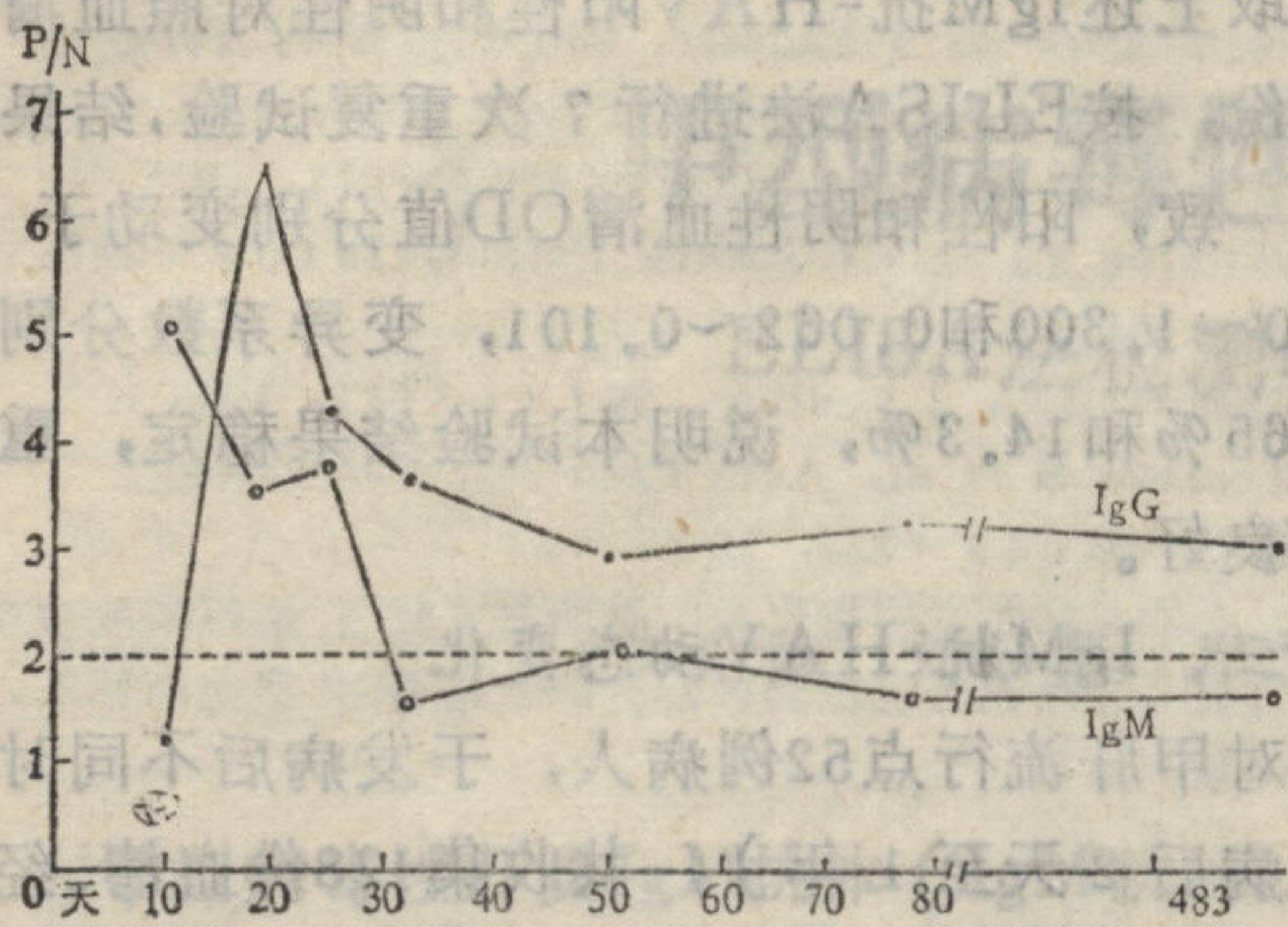


图2 甲肝患者沈×× IgM和IgG动态变化

P/N值已高达5.0, 但IgG抗-HAV P/N值 < 2.1; 黄疸后18天血清中的IgM抗-HAV已开始下降, 而IgG抗-HAV P/N值急速上升至6.8; 于黄疸后32天IgM抗-HAV已转阴, 但直至黄疸后69天IgG抗-HAV仍稳定在较高的水平。

四、各类人血清IgM抗-HAV检测结果

为进一步考核本文ELISA法对IgM抗-HAV的检测效果, 对以下各类病人和正常人血清进行了检测, 其结果见表2: 1. 在甲肝流行点急性期52份血清中, IgM抗-HAV阳性48份, 检出率为92.3%。恢复期血清41份(病后3~12月)中的IgG抗-HAV均为阳性, 而IgM抗-HAV阳性检出率仅为17.1%(7/41)。表明发病3个月后大部分甲肝患者血清的IgM抗-HAV可呈阴性。2. 11例急性乙肝病人(IgM抗-HBc阳性, 且HBsAg于发病后3个月内已转为阴性)的IgM抗-HAV均为阴性。3. 其它病毒性疾病患者70份血清, 其中66份IgM抗-HAV阴性(94.3%)。4. RF阳性18份血清的IgM抗-HAV均为阴性。但将血清作1:100稀释时, 其中16份出现假阳性, 说明RF阳性血清的稀释度可影响本ELISA的检出结果。为进一步探讨RF与本实验系统产生假阳性反应的关系, 对表2中所有IgM抗-HAV阳性的59份血清, 用免疫乳胶凝集试验检测RF, 结果仅2份阳性, 其中1例患者HBsAg持续阳性一年以上, 另一例抗-HBs阳性,

提示与乙肝病毒感染有关。5. 33份脐血IgM抗-HAV均为阴性。以上结果进一步说明本ELISA法检测抗-HAV具有较高的特异性。

表2 几组人血清IgM抗-HAV的检测

血清分组 (份数)	阴性			阳性		
	例数 %	平均 P/N	SD	例数 %	平均 P/N	SD
甲肝流行点病人 急性期血清 (52)	48 7.7	1.5	0.27	4 92.3	5.31	2.20
甲肝流行点病人 恢复期血清 (41)	7 83.0	1.48	0.29	34 17.1	3.10	0.95
急性乙肝 HBsAg(+)->(-) (11)	11 100	1.54	0.33	—	—	—
其它病毒性疾病 (70)	66 94.3	1.23	0.37	4 5.7	2.98	0.37
RF(+)类风湿 性关节炎 (18)	18 100	1.03	0.29	—	—	—
脐血 (33)	33 100	0.41	0.32	—	—	—

讨 论

1978年Duermeyer等^[6]首先采用ELISA双抗体夹心法检测了IgM抗-HAV, 以后又陆续见有报道^[7, 8]。本文报告一种检测IgM抗-HAV的ELISA方法。该法已广泛应用于其它病毒性疾病如风疹^[9]、CMV^[10]及腮腺炎^[11]等IgM抗体的检测。

在本文ELISA法检测IgM抗-HAV中, 当加入2-ME处理的阳性血清, 或阳性血清结合后再用羊抗人IgM进行阻断试验。结果均可使IgM抗-HAV阳性血清OD值下降78%; 甲肝流行点急性期血清IgM抗-HAV检出率高达92.3%, 而恢复期血清检出率仅达17.1%; 急性乙肝患者和脐血检测结果均阴性; 其检测结果与Abbott HAVAB-M试盒具有较高的符合率; 表明本ELISA法对检出IgM抗-HAV具有较高的特异性, 且重复性良好, 操作简便, 成本低, 无放射性危害, 值得推广应用。

在HAV实验感染黑猩猩等动物中, 发现IgM抗-HAV一般出现于潜伏期末和SGPT

异常以前^[12]。有人观察到^[1]，这种抗体于黄疸后1周内出现，一周后达高峰，继之逐步下降，于发病后第60~80天，血清中尚能检出低滴度抗体，但在黄疸出现后115天已消失。我们的结果也显示，黄疸出现后IgM抗-HAV即已达高峰，并迅速降低，多数患者在黄疸后4个月内转阴，有个别直至黄疸后6个月才转阴者。

由于本实验系统采用抗原包被抗体，血清中特异性IgG抗体将与IgM抗体竞争抗原结合点，当IgG抗体浓度高时，就会影响IgM的检出，从而降低本实验的灵敏度，并可能出现假阴性反应。

为避免RF对ELISA检测IgM抗-HAV的干扰，本文血清标本除采用脐血作为稀释剂外，并将血清作高倍稀释(1:1,000)。18份RF阳性血清IgM抗-HAV全为阴性，而将血清作低倍稀释时，则其中16份产生假阳性反应。这与Ukkonen等^[11]观察到血清经1:500稀释可避免RF引起的假阳性反应的报告相符合。

摘 要

本文采用一种ELISA法检测IgM抗-HAV。当在本实验系统中加入2-ME处理的阳性血清或阳性血清结合后再用羊抗人IgM进行阻断试验，结果均可使其OD值下降约78%；甲肝流行点急性期血清IgM抗-HAV检出率高达92.3%(48/52)，而恢复期血清仅达17.1%(7/41)；11份急性乙肝和33份脐血清检测结果均为阴性；本法与Abbott HAVAB-M试剂盒检

测结果符合率达86%；若以Abbott RIA法为标准，本法的敏感性和特异性分别为91.2%和80%，且重复性良好，操作简便，成本低和无放射性危害等优点。

ABSTRACT

An enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for the detection of IgM anti-HAV was described. For determining the specificity of ELISA, the positive sera were treated by 2-ME or blocked by goat antiserum to human IgM, and the optical density readings of all sera declined about 78%. 52 sera from acute patients in epidemic areas of hepatitis A were tested. 48 of them (92.3%) showed positive, whereas only 7 of 41(17.1%) sera from convalescent patients showed positive. 11 sera from patients of acute hepatitis B and 33 sera from umbilical cords all gave negative results. The coincidence rate of the results of ELISA in this paper with that of RIA provided by Abbottkit was 86%. The sensitivity and specificity of ELISA were 91.2% and 80%, respectively. Comparing with RIA, this technique was more simple, less expensive and reproducible, and had no radiation hazard.

参 考 文 献

1. Locarnini et al: Intervirology, 8: 309, 1977
2. Flehmig B et al: J Infect Dis, 140: 169, 1979
3. Bradley DW et al: J Clin Microbiol, 9: 120, 1979
4. Seigl G et al: J virol, 26: 40, 1978
5. 骆加里: 生物化学和生物物理学学报, 13(1): 1, 1981
6. Duermeyer W et al: Lancet, 2: 684, 1978
7. Moller AM et al: J Clin Microbiol, 10: 628, 1979
8. 徐志一: 上海医学, 5(7): 406, 1982
9. Vejtorp M et al: Acta Pathol Microbiol Scand Sect B, 87: 155, 1979
10. Krishna RV et al: J Clin Microbiol, 12: 46, 1980
11. Ukkonen P et al: J Clin Microbiol, 11: 319, 1980
12. Bengt G et al: Scand J Inf Dis, 13: 5, 1981

秦皇岛市空肠弯曲菌肠炎的病原学调查

河北省秦皇岛市卫生防疫站

王锡莲 马丽媛

为了解我市是否有由于空肠弯曲菌引起的腹泻流行，我们于1983年9月份，取市医院肠道门诊腹泻病人粪便100份作空肠弯曲菌分离培养，按常规法接种在Campylo-BAP平板，经48小时培养后，检出空

肠弯曲菌3株，检出率3%，均系小儿之粘液便(2/46)和稀便(1/28)，脓血便及脓便未检出。3株菌经生化鉴定为：弯曲菌属、胎儿弯曲菌空肠亚种、(Campylobacter fetus Subsp jejuni)。