

RIA法及ELISA法检测血清中HB_cAg

黄华芳 金慰鄂 姚梦玲 熊开钧

王心禾 代家珠 范红梅 曾令兰

(同济医科大学附属协和医院传染病学教研组, 武汉)

提 要

HB_cAg是Dane颗粒的核心部分的组成成分,为乙肝病毒复制的重要指标。我科先后应用RIA及ELISA法检测HB_cAg阳性的乙型肝炎患者94例,其中28例血清HB_cAg阳性,检出率为29.8%,同时以HB_eAg、DNAP、抗-HB_e等感染指标进行比较,显示出一定的敏感性 & 特异性,并可应用于临床作为估计传染性、预后及抗病毒药物疗效观察的较好指标,特别是ELISA法不要特殊的仪器设备更适于推广应用。

乙型肝炎(简称“乙肝”)的检测方法近年来进展很快,但均着重于乙肝表面抗原(HB_sAg),乙肝表面抗体(抗-HB_s),乙肝核心抗体(抗-HB_c),乙肝e抗原(HB_eAg)及乙肝e抗体(抗-HB_e)检测。因乙肝核心抗原(HB_cAg)存在于肝细胞核内,血清中无游离的HB_cAg,故检测有很大的困难,然而HB_cAg在发病机制,病程转归以及传染性观察方面都比HB_eAg重要,且为乙肝病毒的复制指标。因此,学者们都对HB_cAg的检测十分重视。如在1976年Takahashi等¹⁾报道用免疫粘附血凝试验(IAHA法)检测血清HB_cAg成功,但因影响结果的因素很多,未能推广。1978年Sagnelli报道²⁾以超速离心机及1%NP-40来剥离Dane颗粒蛋白外壳,使用固相放射免疫法(RIA法)检测游离出的HB_cAg,但此法需超速离心机,在实际应用中受到一定限制。1980年我国北医附属人民医院肝病研究室等¹⁾首先采用抗原抗体复合物的原理,在待检标本内加入过量的抗-HB_s,使其成为免疫复合物。然后加入适量的NP-40脱去Dane颗粒外壳,使游离出HB_cAg,再以固相放射免疫法,检测血清中HB_cAg。作者认为特异性好,敏感度高。我们曾用此法检测了乙肝病人血中的HB_cAg。但此法需要r-射线定标器等特殊设备,不宜在一般实验室开展。故又创用酶联免疫吸附试验(ELISA法)检测血中HB_cAg。现将RIA法及ELISA法检测血清中HB_cAg的结果如下:

材 料 与 方 法

一、病例选择:

HB_sAg阳性的乙肝患者94例,并以HB_sAg阴性的肝炎患者10例作对照。

二、检测方法 & 步骤:

1、RIA法:按北医附属人民医院报道的方法¹⁾:

本文1986年9月6日收到。

2、ELISA法：（1）待检血清HB_eAg提取：含Dane颗粒的血清中加入特异性抗-HB_e形成HB_eAg₂，抗-HB_e复合物，离心沉淀，洗净沉淀物中之抗-HB_e，再加NP-40，使Dane颗粒脱壳裂解，释放出HB_eAg。（2）ELISA（夹心法）：将抗-HB_e包被到聚苯乙烯固相载体上，形成固相免疫吸附剂。然后加入已提取HB_eAg的待检标本，再于其中加入抗-HB_e辣根过氧化物酶结合物，37℃水浴2小时后，冲洗剩余之抗-HB_e辣根过氧化物酶结合物。各孔中再加入底物溶液，室温显色30分钟。此时阳性对照应显色，阴性对照无色。（3）结果判断：孔内色泽深度与阳性对照（标准的HB_eAg试剂）相同的为4+，无色为一；色泽深度在4+与一之间，据颜色深浅分别定3+、2+和1+；凡显色1+或2+以上定为阳性，无色为阴性。

检测 结 果

一、总结果：HB_sAg阳性的乙肝患者94例中检出HB_eAg 28例，检出率为29.8%，详见表一：

表一：HB_sAg阳性的乙肝患者HB_eAg检出率
Table 1. The Positive Rate of HB_eAg in HB_sAg Positive Hepatitis B Patients

检测方法	检测例数	HB _e Ag阳性例数	HB _e Ag检出率
RIA法	43	16	37.2%
ELISA法	51	12	23.5%
合 计	94	28	29.8%

由上可见，无论RIA法或ELISA法均可检出一定例数的HB_eAg，而ELISA法较易掌握，同时10例HB_sAg阴性者均未检出HB_eAg，说明二法均有特异性。

二、HB_eAg检出率与HB_sAg滴度的关系，见表二：

表二：HB_eAg检出率与HB_sAg滴度的关系
Table 2. The Relationship between HB_eAg Positive Rate and HB_sAg Titer

HB _s Ag 滴 度	RIA法		ELISA法		合 计		HB _e Ag检出率	
	阳性 例数	阴性 例数	阳性 例数	阴性 例数	阳性 例数	阴性 例数	阳性例数 总例数	检出率(%)
1:512	1	0	3	1	4	1	4/5	80.0
1:256	0	1	2	6	2	7	2/9	22.2
1:128	2	2	4	7	6	9	6/15	40.0
1:64	8	7	2	10	10	17	10/27	37.0
1:32	4	6	1	10	5	16	6/21	23.8
1:16	1	11	0	5	1	16	1/17	5.8
合 计	16	27	12	39	28	66	28/94	29.8

由表二可见, 除1:256外, HB_eAg检出率与HB_sAg滴度高低基本成正比关系。

三、HB_eAg检出率与HB_sAg关系: 同时检测HB_eAg及HB_sAg者计77例二者关系, 详见表三:

表三: HB_eAg检出率与HB_sAg关系

Table 3. The Relationship between HB_eAg Positive Rate and HB_sAg

HB _e Ag	HB _s Ag	RIA法检测例数	ELISA法检测例数	总例数	HB _e Ag检出率
+	+	8	7	15	15/29(56.7%)
+	-	2	12	14	
-	+	4	4	8	8/48(16.7%)
-	-	20	20	40	
合	计	34	43	77	23/77 (29.8%)

} P<0.05

由表三可见HB_eAg与HB_sAg检出总的符合率为71.3% (55/77)。其中HB_eAg阳性者HB_sAg检出率为56.7%, HB_sAg阴性者HB_eAg检出率仅为16.7%。前者检出率显著高于后者 (P<0.05)。

四、HB_eAg与DNA多聚酶 (简称DNAP) 关系, 同时检测HB_eAg (ELISA法) 及DNA多聚酶10例, 二者关系见表四:

表四: HB_eAg与DNAP关系

Table 4. The Relationship between HB_eAg and DNAP

DNAP检测结果 \ HB _e Ag检测结果		HB _e Ag		合 计
		+	-	
DNAP	+	5	3	8
	-	0	2	2
合 计		5	5	10

由上表可见10例中7例一致, 3例则为HB_eAg阴性, DNAP阳性。

五、HB_eAg与抗-HB_e滴度关系: 同时检测HB_eAg (ELISA法) 及抗-HB_e51例, 二者关系详见表五:

由上可见HB_eAg检出率与抗-HB_e滴度之间并不成正比关系, 即使抗-HB_e处于低滴度也可检出HB_eAg提示乙肝病毒可能在复制。

六、HB_eAg与抗-HB_s关系:

RIA法: HB_eAg阳性组有16例同时检测抗-HB_s, 均为阴性。

HB_eAg阴性组有27例同时检测抗-HB_s, 仅一例阳性。该例HB_eAg (1:32) 同时阳性, 说明病毒处于HB_eAg与抗-HB_s消长阶段, 故HB_eAg不一定可测到。

ELISA法: HB_eAg阳性组有6例同时检测抗-HB_s均为阴性。HB_eAg阴性组有22例同

表五: HB_eAg检出率(ELISA法)与抗-HB_c滴度关系
 Table 5. The Relationship between HB_eAg Positive Rate and Anti-HB_c Titer

抗-HB _c	HB _e Ag		HB _e Ag检出率	
	阳性例数	阴性例数	阳性例数 总例数	检出率
1:10000	2	6	2/8	25%
1:1000	5	21	5/26	19.2%
1:100	5	12	5/17	29.4%
合计	12	39	12/51	23.5%

时检测抗-HB_c仅一例阳性, 该例 HB_eAg (1:128) 及 HB_sAg 同时阳性, 原因待进一步探讨。

七、HB_eAg与抗-HB_c关系:

RIA法: HB_eAg阳性组中11例及阴性组22例同时检测抗-HB_c均为阴性。

ELISA法: HB_eAg阳性组有10例同时查抗-HB_c, 则有2例阳性。

HB_eAg阴性组, 有32例同时检测抗-HB_c, 则有2例阳性, 这2例HB_eAg滴度分别为1:32及1:16, 滴度虽然不高, 但当抗-HB_c出现时, 病毒已失去活力, 故HB_eAg阴性, 符合一般规律。

讨 论

HB_eAg是Dane颗粒的核心部分组成成分, 是标志感染的重要指标。它只存在肝组织中, 在血清中无游离的HB_eAg存在。过去HB_eAg的测定均需用肝组织进行, 采用免疫荧光法或肝组织匀浆法, 对临床普及受到限制。1976年以来TaKahashi, Sagnelli⁽²⁾及国内陶其敏⁽¹⁾等用NP-40剥离Dane颗粒蛋白外壳, 使HB_eAg游离出来, 再以IAHA或RIA加以测定。1981年Rizztto⁽³⁾并将RIA法测得血清中HB_eAg与DNA多聚酶, 荧光免疫法(IF)在肝组织中检出HB_eAg进行对比, 认为RIA测出血清中HB_eAg表示有HBV感染, 是比DNAP更敏感及特异的指标, 其与用IF法从肝组织中测得HB_eAg符合率达85%。但RIA法还需要r-射线定标器等特殊设备, 不能在一般实验室进行, 故使用ELISA法检测血清中HB_eAg。我科先后用RIA法及ELISA法检测HB_eAg阳性乙肝病例共94例, 其中28例血HB_eAg阳性, 检出率为29.8%, 虽检出率不够高, 但从HB_sAg、HB_eAg、DNAP、抗-HB_c等HBV感染指标及抗-HB_s、抗-HB_e对比中显示出一定的敏感性和特异性, 并可供临床应用来观察预后, 考核抗病毒药物疗效。

一、敏感性及特异性方面:

1、无论RIA法或ELISA法检测HB_eAg, 其检出率高低与HB_eAg滴度基本一致。见表二, 仅1:256时稍低, 可能与病例数较少有关, 而且HB_eAg阴性10例也均未检出HB_eAg。

2、HB_eAg检出率与HB_sAg阳性呈正相关关系(表三),二者总的符合率为71.3%,其中HB_sAg阳性组HB_eAg检出率56.7%,阴性组检出率仅16.7%,两者具有显著性差异($P < 0.05$)。

3、用ELISA法检测HB_eAg 10例与DNAP符合率达70%。

4、用ELISA法检测HB_eAg与抗-HB_e滴度高低无相关关系(表五),即使抗-HB_e处于低滴度也能检出HB_eAg,提示有乙肝病毒仍可能在复制。

5、无论RIA法或ELISA法中HB_eAg阳性22例同时查抗-HB_e均为阴性,与Sagnelli^[2]报告相符。

从以上五点来看血中检出HB_eAg具有一定的敏感性及特异性。代表着病毒还在复制,对临床预后估计及病原传染性方面均可作重要参考。但还存在一些问题,如HB_eAg与DNAP关系方面,凡有Dane颗粒存在一定能检出HB_eAg,但DNAP不一定均能检出。现有3例结果相反, DNAP阳性而HB_eAg阴性,如何解释有待进一步研究,可能现用检测DNAP法有非特异性之处。还有一点,用ELISA法HB_eAg阳性组有10例同时查抗-HB_e则有2例阳性,正如Hadziyannis所指出,抗-HB_e阳性有二种情况:一是无病毒复制;二是病毒复制存在,这2例情况属于后者。可见抗-HB_e阳性仍可能有病毒在复制,并有一定传染性。

二、HB_eAg检测的临床意义:

1、估计传染性方面:如上所述HB_eAg检出率与HB_sAg滴度高低相一致。但滴度之间HB_eAg检出率相差不远,因此,如检测HB_sAg同时测HB_eAg二者均为阳性则说明传染性更大。陶氏报告^[1]中也提及HB_eAg的检测比HB_sAg更能说明问题。尤其对无症状携带者鉴别有无传染性将是一个较好的指标。在没有电镜条件下,对判定血清内有无Dane颗粒也是一项可靠的指标。

2、估计预后方面:Sagnelli^[2]一文中用RIA法测定61例HB_eAg阳性慢性肝炎患者血中HB_eAg检出率为61%,并进行 2 ± 1.6 年观察,认为HB_eAg阳性的慢活肝预后较差,而HB_eAg阴性者常常有一个较满意的临床经过($P < 0.001$),并观察到HB_eAg阳性者48%及HB_eAg阴性者21%发生死亡。二者之间也有较大差别。因此,HB_eAg也可作为观察预后的指标。本文虽未进行这方面观察,但Sagnelli^[2]的结果可作为今后临床工作的借镜。

3、在抗病毒药物的疗效考核方面:

我科对应用抗病毒药物的慢性乙肝患者进行治疗前后乙肝六项指标及DNAP检测。本文有2例患者应用抗病毒药物治疗,随着病情的好转HB_sAg滴度下降DNAP消失,血HB_eAg也转阴,其中一例HB_eAg也消失;一例HB_sAg滴度下降后又有所上升,但HB_eAg仍阴性。看来HB_eAg检测可作为本病抗病毒药物考核疗效的较好指标。但病例数较少,还不能反映全貌,只是一个苗头,有待进一步观察。

参 考 资 料

- [1] 北医附属人民医院肝病研究室等, 1980, 北京医学院附属人民医院年刊, 第七页。
- [2] Sagnelli et al, 1978, *Gastroenterology* 75: 864.
- [3] Rizzetto H. J. et al, 1981, *Gastroenterology* 80: 1429.
- [4] Hadziyannis S. J. et al, 1983, *Hepatology* 3(5): 656.
- [5] 陈渊卿等, 1984, 中华传染病杂志 2(4): 264.

THE STUDY OF DETERMINATION OF HBcAg IN PERIPHERAL BLOOD WITH RIA AND ELISA

Hwang Wua-fang Jin Wei-e Yao Meng-ling Xiong Kai-jun

Wuang Xin-he Dai Jia-jhu Fan Hong-mei Zhin Ling-lan

*(Department of infectious disease, Xianhu Hospital, Wuhan Medical
College, Wuhan)*

HBcAg is the constructional protein antigen of core component of HBV. It's presence in peripheral blood has been used as an important marker of replication of HBV. We had studied the detection of HBcAg in 94 HBsAg positive cases of viral hepatitis with the methods of RIA and ELISA, and compared with the survey of HBeAg, anti-HBc and HBV-DNAp. HBcAg was found to be positive in sera of 28 cases (29.8%). The results suggested that the determination of HBcAg with the method of ELISA and RIA is comparatively sensitive and specific in observing the presence of HBV of replicating type. It can be used as a criterion to estimate the infectivity, Prognosis or to evaluate the effectiveness of anti-HBV drugs. Since there is no special equipment needed, the ELISA method is particularly feasible to be popularized for routine clinical use.