

ABC-ELISA 检测抗 HBc 的方法 及其在临床和流行病学中的初步应用

江克庆 彭钦霖[√] 鄂海春

(海军医学研究所, 上海 200433)

R446.61

提 要

应用生物素与抗生物素系统酶联免疫吸附试验建立了检测乙型病毒性肝炎患者血清中抗 HBc 的 ABC-ELISA 方法并与普通 ELISA 法进行了比较。结果表明: 本法敏感性较普通 ELISA 法高 4 倍, 阳性检出率提高了 42.42%, 且具有较好的重复性。将乙肝不同抗原、抗体进行替代试验和用纯化抗 HBc-IgG 进行抑制试验, 证明本法有较高的特异性。将本法制备成试剂盒, 并与上海市传染病院, 静华公司及科华公司生产的普通 ELISA 试剂盒进行了比较, 结果本试剂盒阳性检出率分别提高了 25.00%, 45.28% 和 30.77%。经上海市三个医院临床标本试验表明, 本法具有快速、敏感、特异及稳定等优点。从而为抗 HBc 的检测提供了一种敏感的方法。

关键词: 生物素抗生物素系统 酶联免疫吸附试验 (ABC-ELISA) 抗 HBc

酶联免疫试验; ABC-ELISA;

抗 HBc 的检测主要用于流行病学调查、临床诊断、献血员的筛选和疫苗安全性鉴定等重要指标。抗 HBc 的检测方法, 国内 1982 年建立了尸肝 HBcAg 的普通 ELISA 方法^[1]。由于尸肝制备 HBcAg 来源困难, 影响了方法的推广应用。1983 年, 国内大肠杆菌克隆化 HBcAg 问世, 并能用发酵罐大量生产, 从而为抗 HBc 检测提供了关键试剂。但至今未见国内将 ABC-ELISA 法用于抗 HBc 检测的报告。现将我们建立 ABC-ELISA 检测抗 HBc 的方法及结果介绍如下。

材 料 与 方 法

一、材料 1. 大肠杆菌克隆化 HBcAg 南京军事医学研究所提供; 2. 抗 HBc-IgG 从高效价 (1:100 万) 抗 HBc 阳性病人血清中提取, 经 DEAE-Cellulose 纯化; 3. 生物素 (Biotin) 为日本产品; 4. Biotin-抗 HBc-IgG 由本室制备; 5. 抗生物素蛋白 (Avidin) 由本室制备, 从鸡蛋清中提取, 活性为 12 u/mg; 6. 抗生物素蛋白-生物素化酶复合物 (ABC) 由本室制备。步骤如下:
(1) 生物素化酶的制备 用 0.1 mol/L NaHCO₃ 溶液将 HRP 配成 1 mg/ml 浓度, 生物素 N 羟基丁二酰亚胺酯 (BNHS) 用二甲基甲酰胺溶解, 浓度为 20 mg/ml, 在 1 ml 酶溶液中加入 25 μl BNHS 溶液, 37℃

本文于 1991 年 5 月 2 日收到, 10 月 30 日修回。

1N = 1 mol/L × 离子价数

中反应30分钟,然后在4℃中对PBS透析24小时,其间换液4次;(2)ABC复合物的制备 将Avidin与生物素化酶以1:2的比例相混合,室温中静置20分钟,即成ABC(Avidin-HRP-Biotin Complex)。在0.5ug/ml抗人IgG-Bio包被板上作两者配比浓度滴定,其S/N值最大时的Avidin和HRP-Bio浓度为两者适宜的配比浓度,实验时的两者配比浓度一般各为0.5ug/ml和1ug/ml,ABC的贮存液可配成0.25mg/ml和0.5mg/ml。

二、检测方法 在40孔反应板孔中先用抗HBc-IgG包被,每孔0.1ml,置4℃过夜,洗3次。加适当稀释的HBcAg,37℃2小时,洗3次,加被检血清(1:100稀释)每孔0.1ml,随后每孔再加入适当稀释的Biotin标记抗HBc-IgG 0.1ml,37℃30分钟,洗4次,加ABC复合物37℃10分钟,洗4次,加底物每孔0.1ml,室温60—20分钟,加2N硫酸0.05ml终止。结果用美国Dynatech公司出品的MINIREADER II型酶标比色计测读标本OD值,比值≥50%为阳性,<50%为阴性;如用肉眼观察则无色或淡黄色为阳性,棕黄色为阴性。

结 果

一、方法的特异性试验

1. 替代试验

(1)抗血清替代试验 试验中在加入HBcAg后,分别加入抗HBc阳性血清、抗HBc阴性血清、单纯抗HBs阳性血清及小牛血清。然后按本法完成试验。结果只有抗HBc阳性血清呈现阳性反应。

(2)抗原替代试验 于抗HBc-IgG包被板中,分别加入HBcAg和纯化HBsAg,37℃2小时,洗3次,加入抗HBc阴、阳性血清及Biotin-抗HBc-IgG,按本法完成试验,只有HBcAg孔显示阴、阳性结果。

2. 抑制试验 其方法是在加入HBcAg后,加入纯化抗HBc-IgG,37℃30分钟,洗涤后加入Biotin-抗HBc-IgG,接着按本法完成试验,抑制率达83.47%。

二、敏感性试验

1. 采用ABC-ELISA与普通ELISA进行敏感性比较,结果前者比后者高4倍。

2. 用本法所制备的试剂盒比上海市传染病院、静华公司及科华公司生产的普通ELISA试剂盒对抗HBc阳性检出率分别提高了25.00%、45.28%和30.77%,总符合率分别为88.13%、85.00%和95.83%。

三、方法的稳定性重复性试验

对3份滴度不同的阳性血清,在一周内重复3次进行抗HBc检测,结果批间CV为5.22—9.30%,表明本法具有较好的重复性及稳定性。

四、快速性 本法较标准普通ELISA方法出结果快24小时。

五、本法在临床及流行病学中的应用

1. 健康人群抗HBc的检测 采用本法和普通ELISA法对健康体检人群血清标本

表 1. 门诊乙肝病人抗 HBc 的检测结果
Table 1. The result of Anti-HBc assay in
HBV out-patients

组 别 Groups	例 数 Cases	1:100 抗 HBc 1:100 Anti-HBc	
HBsAg(+)	280	252	(90.00%)
HBsAg(-)	126	70	(55.55%)

$P < 0.01$

于 HBsAg 阴性病人, 见表 1。

表 2. 各种肝脏疾病患者中抗 HBc 检测结果

Table 2 The result of Anti-HBc Assay in patients with all kinds of liver diseases

临床诊断 Clinical diagnosis	检测数 Detection cases	阳性数 Positive cases	阳性率% Positive rate %
急性肝炎 Acute Hepatitis	(70)	(40)	(57.14)
急性黄疸性肝炎 Acute icterohepatitis	52	16	50.00
急性非黄疸性肝炎 Acute non-icterohepatitis	27	19	70.37
重症肝炎 Serious hepatitis	11	5	45.45
慢性肝炎 Chronic hepatitis	(161)	(158)	(98.14)
慢性迁延性肝炎 Chronic persistent hepatitis	60	59	98.33
慢性活动性肝炎 Chronic active hepatitis	49	48	97.96
肝硬化 Liver cirrhosis	30	30	100.00
原发性肝癌 Primary hepatic cancer	22	21	95.45
其他肝脏疾病 Other liver diseases	(14)	(2)	(14.28)
单纯性肝血管瘤 Simple vascular tumor in liver	6	0	0.00
其他肝占位性病变 Other hepatocous	8	2	25.00

表 2 结果表明, 在各种肝脏疾病患者血清中, 抗 HBc 的阳性检出率以慢性肝炎最高, 为 98.14%; 急性肝炎次之, 为 57.14%; 其他肝脏疾病最低, 为 14.28%。

198 份进行了对比检测 (双盲法)。结果前者抗 HBc 阳性率为 20.71%, 后者为 17.17%, 本法阳性提高率为 20.59%。

2. 乙肝病人抗 HBc 的检测

我们在长海医院传染科共收集了 HBsAg 阳性及阴性病人血清 306 份进行了抗 HBc 检测, 结果 HBsAg 阳性病人血清中抗 HBc 检出率非常显著高

3. ABC-ELISA 与普通 ELISA 临床应用结果比较: 我们用本法在长海医院、新华医院和海军411医院, 采用双盲法与普通 ELISA 进行比较测定, 结果见表3。

表3. ABC-ELISA 与普通 ELISA 对抗 HBc 在各医院的检测结果
Table 3 Comparison of anti-HBc assay using ABC-ELISA and conventional ELISA methods in hospital

单位 Units	例数 Cases	ABC-ELISA		普通-ELISA Conventional ELISA		总符合率 Total accor- dant rate %	阳性提高率 Positive raise rate %
		阳性数 Positive cases	%	阳性数 Positive cases	%		
长海医院 Changhai hospital	80	33	41.25	24	30.00	88.75	37.50
新华医院 Xinhua hospital	96	17	17.71	13	13.54	95.83	30.77
411 医院 411 hospital	80	44	55.00	29	36.25	81.25	51.72
合计 Total	256	94	36.72	66	25.28	89.06	42.42

由表3结果可见, 本法较普通 ELISA 检出阳性率平均提高了42.42%, 总符合率为89.06%。

讨 论

BAS 在免疫诊断中的应用, 一般常采用 BA 法、BAB 法及 ABC 法三种, 其中后者最佳。将其引用于 ELISA 中, 可提高方法的敏感性、特异性及重复性, 并能缩短检测时间, 达到早期快速诊断的目的。我们建立的 ABC-ELISA 检测抗 HBc 方法, 经实验证明, 本法的敏感性较普通 ELISA 高4倍。阳性检出率平均提高42.42%。究其原因, 主要由于生物素与抗生物素既可偶联抗体等一系列大分子生物活性物质, 又可被酶和多种材料所标记。因而由生物素、抗生物素及过氧化物酶所组成的 BAS 系统, 在反应体系中一端偶联大分子反应物质, 一端连接标记或支持材料产生多级放大作用使方法具有高度敏感性。

本法与普通 ELISA 的总符合率为89.06%, 表明本法有较高的敏感性和特异性。

本法特异性及重复性好, 主要由于我们在试验中采用了高效价(1:1000000)抗 HBc-IgG 及高活性大肠杆菌克隆的 HBcAg。实验证明用生物素标记抗 HBc-IgG 不影响其活性, 且标记率几乎达100%, 远较戊二醛酶标抗体法高, 因此不存在未标记抗体竞争抑制对本法敏感性和特异性的影响。

抗 HBc 包括抗 HBc-IgM 和抗 HBc-IgG, 前者于发病早期出现, 消失快, 是乙型肝炎早期的一个重要指标, 已在前文中叙述。抗 HBc-IgG 通常在发病后一个月左右升高, 持续时间较长, 甚至终身, 是既往感染的指标。抗 HBc-IgG 阳转, 表明为乙型肝炎感染, 可作为诊断指标, 但不是早期诊断的指标。

本文主要讨论抗 HBc (抗乙型肝炎核心抗原的抗体), 这种抗体在病毒感染后 12—20 周出现于血液中, 此时肝功能障碍亦已达最高峰。当 HBsAg 和抗 HBs 两者均为阴性时——即临床上称为核窗期 (Core window), 它是乙肝中唯一能检出的指标, 可用于乙肝流行率的调查。这一指标在流行病学上还可用于献血员筛选、疫苗及 HBIG 安全性的鉴定。

抗 HBc 与临床抗 HBc 阳性、HBsAg 阳性、抗 HBs 阴性, 为急性乙型肝炎病人 (较晚期) 或慢性肝炎或 HBsAg 阳性的携带者, 抗 HBc 阳性、HBsAg 阴性、抗 HBs 阳性, 为乙型肝炎病人的恢复期, 抗 HBc 阳性、抗 HBs 阴性、HBsAg 阴性, 有两种可能, 即乙型肝炎的恢复早期或体内有 HBV 繁殖, 但量较少, 所用 HBsAg 检测方法不够灵敏所致^[1]。应用抗 HBc 测定有助于诊断 HBsAg 阴性的轻型和亚临床的乙型肝炎患者。

从表 2 结果来看, 抗 HBc 在慢性乙型肝炎患者血清中的检出率非常显著高于急性乙型肝炎, 分别为 98.14% 和 57.14%。而在急性乙型肝炎中抗 HBc 检出阳性率的高低依次为急性无黄疸型肝炎、急性黄疸型肝炎和重症肝炎。然而在慢性乙型肝炎中, 检出率则无显著差别。这一结果, 提示抗 HBc 的长期存在, 可能有乙肝向慢性化转变的趋势。但亦有人认为乙肝恢复后, 仍有部分患者可检出抗 HBc。因此, 抗 HBc 临床意义必须根据其滴度高低以及区分 IgM 和 IgG 类抗体, 同时结合其他抗原抗体的存在状况来确定其价值。

参 考 文 献

- [1] 蒋伟伦等, 1982, 上海免疫学杂志, 2(6): 23。
- [1] 于公义等, 1984, 中华医学检验学杂志, 7(4): 195。
- [2] 刘锡光等, 1986, 病毒性肝炎实验诊断, 第 28 页。

A Method for Detection of Anti-HBc by ABC-ELISA and Its Epidemiological and Clinical Application

Jiang Ke-qing Peng Qin-lin Er Hai-chun

(Naval Medical Research Institute, Shanghai 200433)

The method of using ABC-ELISA to measure anti-HBc in the serum of patients with hepatitis B was developed. The experimental results indicated that the sensitivity of ABC-ELISA was five times higher than that of the conventional ELISA. On the average, the positive detection rate of anti-HBc by means of

ABC-ELISA increased by 42.42% over the one by using conventional ELISA. Repeated experiments showed good reproductivity. Alternative tests using various antigens and antibodies of HBV and blockage test using purified anti-HBc indicated that ABC-ELISA featured good specificity. ABC-ELISA kit box for detecting anti-HBc had been compared with three conventional ELISA boxes. The results indicated that the positive rate by using ABC-ELISA reagent box selectively increased by 25.00%, 45.28% and 30.77% over the one by using three boxes produced from Shanghai's Infectious Disease Hospital, Jinghua Company and Kehua Company. ABC-ELISA test with clinical serum specimens by three hospitals in Shanghai demonstrated that this method had the following features: rapidity, sensitivity, specificity and good reproductivity. ABC-ELISA had provided a reliable new method for the detection of anti-HBc.

Key words: Biotin-Avidin System ABC-ELISA Anti-HBc