维普资讯 http://www.cqvip.com

264—267 6850(12)

第11卷第3期 中国病毒学 Vol.11 No.3
1996年9月 VIROLOGICA SINICA Sep. 1996

丙肝病毒IgM抗体检测方法的初步研究

何红霞 洪世雯 貌盼勇 白雁平

(解放军302医院病毒研究室,北京 100039)

R373·21

A

提要 选择东燃公司的重组结构区和非结构区抗原建立的抗HCV－IgM检测方法,简便、快速、特异性强、重复性好、敏感性高。只在丙肝病人组检出而健康献血员均为阴性,与抗HAV、HBV的IgM抗体无交叉反应,且排除了RF干扰和IgG占位引起的假阳性和假阴性,适用于抗HCV－IgM的临床检测。对24例丙肝病人的抗HCV－IgM检测结果显示,急性丙肝病人血清抗HCV－IgM检出率较高(75%,6/8),且随ALT正常而消失或滴度下降。慢性病人抗HCV－IgM检出率为56.3%(9/16),其中7例IgM持续阳性者为慢性活动性丙肝,说明慢性病人抗HCV－IgM与疾病的活动性密切相关。结果提示抗HCV－IgM的检测在急性肝炎的诊断及慢性丙肝的预后和转归上具有临床意义。

关键词 丙肝病毒,IgM抗体,ELISA 丙型肝炎病毒,

丙型肝炎是由丙肝病毒(HCV)经血源引起的非甲非乙型肝炎,近年来随着HCV分子克隆的成功,丙肝的研究取得了迅速进展,推动了HCV标志物的研究和广泛应用。目前血液和血制品普遍进行抗HCV－IgG的检测,大大地降低了输血后肝炎的发生率。由于抗HCV－IgG的存在不一定反映HCV处于复制状态,其效价也不反映HCV感染的进展,不能区别急性或慢性丙型肝炎,也不能作为HCV感染的预后指标。然而,急性丙型肝炎的诊断和确定慢性丙型肝炎的病情活动,对治疗病人尤为重要,因此抗HCV－IgM的检测日益受到重视。国内外已有报道[1－4]抗HCV－IgM可作为HCV急性感染的一个指标,并指示慢性感染的活动及药物抗病毒效果。但抗HCV－IgM的检测有不同模式,导致抗HCV－IgM检测的临床意义也不尽相同。我们旨在建立一个稳定可靠的方法,研究其在急慢性肝炎中出现的规律及抗病毒治疗前后的变化规律,为临床丙肝的诊断治疗及预后提供参考。

材料和方法

1 HCV包被抗原

分别采用日本东燃(Tonen)公司结构区和非结构区2段重组抗原(C11、C7,包被量均为0.1μg/孔)与UBI公司结构区1段(包被量0.15μg/孔)和非结构区2段(包被量分别为0.05μg/孔和0.025μg/孔)合成肽抗原。两组抗原均能达到卫生部药品与生物制品检定所抗HCV－IgG质控标准(198份参比血清)。

2 HRP－鼠抗人IgM

由中国医学科学院基础医学研究所提供,效价为1:2000。

本文于1996年与1月2日收到,3月29日修回

维普资讯 http://www.cqvip.com

3　操作步骤

采用间接 ELISA 方法。用常规方法包被酶标板(丹麦产 NUNC 板)。将血清标本用稀释液(含 10% 羊抗人 IgG)以 1:200 稀释,置 37 ℃ 1 h 或室温过夜;取 100 μg 加入包被板,置 37 ℃ 孵育 30 min,洗板 5 次;每孔加入 HRP－鼠抗人 IgM 工作液 100 μL,37 ℃ 孵育 30 min,洗板 5 次;每孔加底物液和 TMB 各 50 μL,37 ℃ 显色 10 min;每孔加终止液 50 μL 终止反应;在 450 nm 处测吸光度 A 值,大于或等于 cut off 值为阳性,反之为阴性。根据对 75 例健康献血员抗 HCV－IgM 的检测结果,A 值在 0.06±0.05,故 cut off 值(X+3SD)为 0.21。

4　方法学实验

4.1　血清 IgG 清除实验　取抗 HCV－IgG 和 IgM 阳性的血清,将羊抗人 IgG(由兰州生物制品研究所提供,单扩效价为 1:160)加入到含 10% 小牛血清的 PBST 中作为标本稀释液,将待检血清 1:200 加入样品稀释液,37 ℃ 孵育 1h,然后检测抗 HCV－IgG 和 IgM。

4.2　β－巯基乙醇破坏实验　将检测为抗 HCV－IgM 阳性的血清 1:10 稀释,加入等量 0.1 mol/L β－巯基乙醇,37 ℃ 作用 1 h,用该方法检 HCV－IgM。

5　血清标本

来自本院病人和健康献血员。

结　果

1　抗 HCV－IgM 检测的特异性

1.1　血清 IgG 清除实验。取 10 份抗 HCV－IgG 阳性血清,用含 1、2、5 和 10% 羊抗人 IgG 的标本稀释液处理,结果以 10% 效果最好,清除率为 90%(9/10),剩余 1 份亦被部分清除。

1.2　抗 HCV－IgM 和 IgG 阳性的血清用含 10% 羊抗人 IgG 的标本稀释液处理,抗 HCV－IgG 转阴而 5 份标本 IgM 仍阳性,说明特异性 IgM 不受血清 IgG 清除的影响。

1.3　抗 HCV－IgM 和 RF 阳性血清用样品稀释液处理,结果抗 HCV－IgM 阳性组抗 HCV－IgM 仍阳性,说明本方法检测的抗 HCV－IgM 阳性血清不受 RF 的影响。

1.4　β－巯基乙醇实验。取 5 份抗 HCV－IgM 阳性标本经 β－巯基乙醇处理后,测定抗 HCV－IgM 均为阴性,说明该 ELISA 法检测的 IgM 阳性反应是特异性 IgM 作用的结果。

1.5　标本最适稀释度的选择。用 3 份抗 HCV－IgM 阴性标本和 3 份阳性标本,以 1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640 稀释标本后,作抗 HCV－IgM 检测,发现标本经 1:160－1:320稀释时阴性与阳性值相差最大,故取中间值 1:200 为最佳血清稀释度。

2　东燃重组与 UBI 合成肽抗原检测抗 HCV－IgM 的比较

东燃重组抗原抗 HCV－IgM 检出率及特异性均高于 UBI 合成抗原,结果见表 1。

3　重复性实验

取 1 份抗 HCV－IgM 阳性血清,用同一批试剂反复检测 5 次,批内变异系数为 7.6%,用不同试剂反复检测 5 次,批间变异系数为 11.3%。

4　丙肝病人抗 HCV－IgM 检测

共检测 24 例丙肝病人,其中 8 例急性病人抗 HCV－IgM 检出率为 75%(6/8),且随着 ALT 的正常,5 例转阴,另 1 例抗体滴度下降;16 例慢性病人抗 HCV－IgM 检出率为 56.3%(9/16),9 例中 7 例 ALT 异常,为慢性活动性肝炎。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 两组抗原检测临床病人和健康献血员标本抗 HCV－IgM 的比较

Table 1 Comparison of Two Sets of HCV Antigen for Detecting the Specimens of Patients and Healthy Donors

标本分类 Specimens	样品数 Number	抗 HCV－IgM 阳性数(%) Anti－HCV IgM Positove(%)	
		重组抗原 Recombinant	合成抗原 Synthetic
抗 HCV－IgG 阳性 Anti－HCV IgG＋	57	30(52.6)	27(47.4)
甲肝 IgM 抗体阳性 Anti－HAV IgM＋	20	0(0.0)	1(5.0)
乙肝 HBcIgM 阳性 Anti－HBc IgM＋	20	0(0.0)	0(0.0)
RF 阳性 RF＋	13	0(0.0)	0(0.0)
健康献血员 Healthy Donors	75	0(0.0)	3(4.0)

讨 论

我们选择了东燃重组抗原作包被抗原，结果显示其特异及敏感性均高于 UBI 合成肽抗原。可能与 IgM 抗体分子大有关，检测 IgM 抗体的抗原需用较大的抗原片段才能有较好的效果。用间接 ELISA 法检测 IgM 抗体时，待检血清中的特异性 IgG 可与 IgM 竞争 HCV 抗原结合位点，造成假阴性结果；RF 型 IgM 可和抗原结合的特异性 IgG 结合，酶标抗人 IgM 则与 RF IgM 结合，形成假阳性结果。去除特异性 IgG 的方法有多种，如抗人 IgG 阻断法、血清样品层析、SPA 吸附等。用抗人 IgG 阻断法，提高了方法的特异性和敏感性，清除率可达 90%。抗 HCV－IgM 只在丙肝病人组检出而健康献血员均为阴性，与抗 HAV、HBV 的 IgM 抗体无交叉反应，且排除了 RF 的干扰。表明我们建立的间接 ELISA 检测抗 HCV－IgM 的方法特异性强、敏感性高、简便、快速、重复性好，适用于临床检测。

本研究观察了 24 例丙肝病人的抗 HCV－IgM，其中急性丙肝病人血清抗 HCV－IgM 检测率较高，为 75%(6/8)，且随 ALT 正常而消失或滴度下降，与 Clemens 报道[1]结果一致。慢性病人检出率为 56.3%(9/16)，9 例中 7 例为慢性活动性肝炎，表明慢性活动性丙肝病人中 IgM 可持续阳性，文献报道[2,3]慢性丙肝抗 HCV－IgM 阳性率为 51～82%，本研究结果为 56.3%，阳性率稍低，可能与 16 例慢性丙肝中 8 例病情稳定有关，提示抗 HCV－IgM 的检测在急性丙型肝炎的早期诊断及慢性丙肝的预后和转归上具有临床意义。也有文献报道结果与之相反，如 Qiroga[2]用 ELISA 法检测 IgM 抗 HCV(C100)，结果慢性丙肝的病情活动在 IgM 抗 HCV 阳性和阴性之间没有差异。由于所用方法和抗原以及观测病例数不同，结果亦有所不同。随着研究的深入，IgM 抗 HCV 检出率和效价与慢性丙肝的病情活动和抗病毒疗效的确切关系将被不断阐明。

参 考 文 献

1 Clemens JH, Taskar S, Chau K, *et al*, IgM antibody response in acute hepatitis C virus. Blood, 1992, 2:169－172

2 Qiroga JA, Campillo L, Catillo L, *et al*, IgM antibody to hepatitis C virus in acute and chronic hepatitis C, Hepatology, 1991,

维普资讯 http://www.cqvip.com

14:38－43

3 Brillanti S, Macsi C, Ricci P, *et al*. Significance of IgM antibody to hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C. Hepatology, 1992, 15:998－1001

4 Chen PJ, Wang JT, Hwang LH *et al*. Transient immunoglublin M antibody response to hepatitis C virus capsid antigen in post-transfusion hepatitis C: putative serological marker for acute viral infection. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89:5971－5975

Preliminary Study on the Method for Detecting IgM Antibody to Hepatitis C Virus

He Hongxia Hong Shiwen Mao Panyong Bai Yangping

(*Dept. of Virology*, 302 *Hospital*, *PLA*, *Beijing* 100039)

Indirect ELISA for detecting IgM antibody to HCV was established based on recombinant antigens of HCV structural and nonstructural regions. The result showed it is easy, rapid, reproducible, specific and sensitive. Anti－HCV IgM was positive only in the sera of patients with hepatitis C, and all negative in healthy donors. There were no cross－reactions with IgM antibody to HAV and HBV. The false positive and negative caused by RF and specific IgG were removed. It is suitable for the clinical detection of IgM antibody to HCV. The sera of 24 patients with hepatitis C were assayed for anti－HCV IgM. The data indicated that the positive rate is 75% in the patients with acute hepatitis C. As ALT being normal, anti－HCV IgM became undetectable or its level dropped. Anti－HCV IgM was detected in 9 of 16(56.3%)patients with chronic hepatitis. Among these 9 patients with anti－HCV IgM, 7 were with abnormal ALT and 2 with normal ALT. Anti－HCV IgM may persist in chronic active patients. The results suggested that Anti－HCV IgM is a useful marker in diagnosis of acute hepatitis C, indicating the activity of chronic hepatitis C and guiding the antiviral therapy.

Key words Hepatitis C Virus, IgM, ELISA