DOI:10.16016/j.1000-5404.1984.04.008

关于酶联法检测抗HBc-IgM时血清稀释度的探讨

吴纯清 谢 明* 李奇芬

（第一附属医院 传染病科）

提 要

本报告初步探讨酶联法检测抗HBc－IgM血清最适稀释度的结果，标本按10^{-1}—10^{-7}稀释。26份正常人血清标本有22份完全呈阴性反应；另4人是：2人10^{-1}，1人10^{-2}，1人10^{-1}—10^{-3}，均显示为阳性反应，对照孔不显色。42份各型乙肝患者标本的结果是：当血清10^{-1}稀释时，只有6例呈阳性反应，10^{-2}时20例，10^{-3}、5×10^{-3}及10^{-4}时阳性率最高，分别为88.1%，78.5%和69%，以后随血清稀释度的增高阳性数递降。为尽可能排除假阳性和假阴性反应的干扰而又能反应出患者的实际病情，血清以5×10^{-3}稀释较为适宜。

抗HBc-IgM对于乙型病毒性肝炎现症患者的诊断意义日趋明确。采用酶联法检测更具有实用价值，但目前对于本实验的阳性滴度判断尚存在一定问题。为此，我们应用ELISA对42例乙肝病人进行探讨。

材料和方法

对象 正常人26例，系本院工作人员和本校学生。肝功正常，HBsAg（－），各型乙肝患者42例（其中急肝15例，慢迁肝7例，慢活肝12例，重型肝炎5例，肝炎肝硬化3例），其他疾病3例（其中肝硬化1例，胆囊炎1例，脾大待查1例），均为临床或病理确诊病例。

试剂 纯抗人IgM抗体由成都生物制品所提供。HBcAg、酶标记抗HBc系北京军科院基础医学研究所提供。

GXM－201型酶标光度计和聚苯乙稀微孔板（55孔）为四川分析仪器九厂生产。

方法 酶联捕捉抗体法。步骤为抗人IgM抗体按100μg/ml、用pH9.6碳酸盐缓冲液稀释包被微孔板，每孔50μl，4℃过夜；倾去内容物后，用1% BSA封底，4℃过夜，Tris-HCl-T_{20}洗涤液洗三次，血清标本用含0.1% BSA的PBS-T作10^{-1}—10^{-7}稀释，分别加入实验各孔及对照孔，每孔50μl，置室温（27℃）5小时，洗涤三次，加HBcAg，每孔50μl，对照孔不加HBcAg，而加稀释液50μl，4℃过夜，洗涤三次后加酶标记抗HBc，每孔50μl，43℃一小时，洗涤三次后加底物系统，37℃30分钟，用2N H_2SO_4终止反应。酶标光度计上读取OD值（490nm）。

正常人、其他疾病患者及乙肝患者不同血清稀释度测得抗HBc-IgM的结果见附表。

从表中可见26例正常人，当血清为10^{-1}—10^{-7}稀释时，其中22例的P/N值均<2.1，而另4例分别在10^{-1}、10^{-2}和10^{-3}的P/N值为>2.1，应判为阳性，而这4名工作人员临床无任何肝炎症象，肝功正常，血清中HBsAg、HBeAg、抗HBc均为阴性，可能

* 本科研究生

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

附表　不同血清稀释度抗HBc-IgM阳性率比较

诊　断	检测数	阳性数（%）							
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	5×10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
正常人	26	3/26 (11.5)	2/26 (7.6)	1/26 (3.8)	0/26 (0)	0/26 (0)	0/26 (0)	0/19 (0)	0/19 (0)
其它病人*	3	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)
各型肝炎									
AH	15	2/15 (13.3)	5/15 (33.3)	12/15 (80)	12/15 (80)	11/15 (73.3)	5/15 (33.3)	2/13 (15.3)	1/13 (7.6)
CPH	7	1/7 (14.2)	4/7 (57.1)	5/7 (71.4)	3/7 (42.8)	3/7 (42.8)	2/7 (28.5)	2/7 (28.5)	2/7 (28.5)
CAH	12	1/12 (8.3)	6/12 (50)	12/12 (100)	10/12 (83.3)	8/12 (66.6)	4/12 (33.3)	0/8 (0)	0/8 (0)
肝炎肝硬化	3	1/3 (33.3)	2/3 (66.6)	3/3 (100)	3/3 (100)	2/3 (66.6)	1/3 (33.3)	0/3 (0)	0/3 (0)
重型肝炎	5	1/5 (20)	3/5 (60)	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)	4/5 (80)	/	/
总　数	42	6/42 (14.2)	20/42 (47.6)	37/42 (88.1)	33/42 (78.5)	29/42 (69)	16/42 (38)	4/31 (12.9)	3/31 (9.6)

*其它病人诊断依次为：肝硬化、胆囊炎、脾大待查

系假阳性反应。3例其他疾病患者均为阴性。而各型乙肝患者的抗HBc-IgM滴度，从10^{-1}—10^{-7}均有阳性，当血清稀释度为10^{-1}时，P/N值＞2.1的只有6人，10^{-2}时，增加到20例（占总病例的47.6%），当血清稀释度为10^{-3}时，各型乙肝患者的阳性率都是最高的，当血清稀释度为5×10^{-3}时，总阳性率稍有下降。但急肝患者的阳性率和10^{-3}时一样，都是80%，10^{-4}稀释时，阳性率又较5×10^{-3}时为低，只有69%，以后随血清稀释度增加，阳性数明显下降。

讨　论

（一）抗HBc-IgM由于它在乙肝现症患者中有较高的阳性率，可作为判断是否为乙肝患者的依据已日益受到重视[1][2]，国内不少实验室都相继建立了此项检测方法。但如何判断其结果，却是一个尚待统一的问题，从一般临床实验室角度看，要求实验结果有助于诊断和病情判断，方法上也应力求简便。但在当前核心抗原来源尚不充裕的条件下，一份标本多滴度检测，似不现实。因此，如能确定一适宜的血清稀释度进行本项实验将是有益的。

（二）抗HBc-IgM检测方法目前主要有放免及酶联法两大类，但都存在一个血清稀释度混乱的问题[3][4][5]，以致影响互相比较阳性率也不一致。1982年Kurt等已将RIA法血清稀释度进行了研究，并提出以5×10^{-3}为宜。酶联法尚未见到类似材料。从本文所得资料可见，当血清以10^{-1}和10^{-2}稀释时，绝大多数乙肝患者血清抗HBc-IgM为阴性，表明有明显的前带现象[6]，即假阴性；10^{-3}—10^{-4}稀释时，绝大多数乙肝患者显示抗HBc-IgM为阳性结果，与病情也较符合，其中10^{-3}阳性者37例（88.1%），5×10^{-3} 33例（78.5%），10^{-4} 29例（69%），鉴于正常人群中血清于10^{-1}--10^{-3}稀释时尚有少数假阳性反应，而在5×10^{-3}以后则全部消失的情况，为防止假阳性及假阴性的发生，从本实验结果来看，单个稀释度血清过筛似以5×10^{-3}稀释为宜。（下转358页）

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

（上接352页）

参 考 文 献

1. 张 止等：血清抗HBc-IgM临床意义的研究。《中华内科杂志》1983；22:10

2. Cappel R,et al: Significance of Persisting IgM Anti-HBc Antibodies in Hepatitis B Virus Infection. J Med Virol 1981; 8:201

3. 汪义和等：乙型肝炎IgM抗-HBc 的检测及其临床意义的研究。《中华微生物学和免疫学杂志》1984；4:120

4. Gerlish WH, et al: Diagnosis of Acute and Inapparent Hepatitis B Virus Infection by Measurement of IgM Antibody to Hepatitis B Core Antigen. J Infect Dis 1980; 142:95

5. Perrillo RP, et al: Anti-Hepatitis B Core Immunoglobulin M in the Serologic Evaluation of Hepatitis B Virus Infection and Simultaneous Infection with Type B, Delta Agent and Non-A Non-B Viruses. Gastroenterology 1983; 85:163

6. Kurt H, et al: Serodiagnosis of Recent Hepatitis B Infection by IgM Class Anti-HBc. Hepatology 1983; 3:142

Study on Serum Dilution in Detecting Anti HBc-IgM with ELISA

Wu Chunqing, Xie Ming, Li Qifen

(Department of Infectious Diseases, First Teaching Hospital, The Third Military Medical College)

A study on the optimal dilution of serum to detect anti HBc-IgM with ELISA was carried out. Samples were diluted to 10^{-1} to 10^{-7}. Among 26 samples of normal individuals, 22 were negative, but two samples of 10^{-1} dilution, one sample of 10^{-2}, and one sample of 10^{-1}—10^{-3} were positive though the control wells were all negative. 42 samples of the patients with variours types of hepatitis B were examined. It was found that when serum dilution was 10^{-1}, only 6 cases were positive; when the dilution was 10^{-2}, 20 cases were positive; when the dilutions were 10^{-3}, 5×10^{-3}, and 10^{-4}, high positive rates were obtained and they were 88.1%, 78.5%, and 69% respectively; and when the samples were further diluted, the positive rate decreased.

In order to get good results and minimize false results, either false negative or false positive, it is suggested that 5×10^{-3} be the optimal dilution.

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net