

HCV 与 HBV 重叠感染者 CMSC 及 IIPC 实验与临床研究

郭素珍¹ 常永超² 范会兴³ 王建军⁴ 崔全有¹ 段东杰³ 司雅洁¹

(1. 洛阳出入境检验检疫局, 洛阳 471003; 2. 河南科技大学第一附属医院, 洛阳 471003;

3. 汝州市第一人民医院, 汝州 467500; 4. 河南科技大学, 洛阳 471003)

摘要 [目的] 探讨丙型与乙型肝炎病毒(HCV 与 HBV)重叠感染者补体介导免疫复合物溶解能力(CMSC)及补体对免疫沉淀的抑制作用(IIPC)2种新功能低下在丙型与乙型肝炎病毒重叠感染发病中的作用。[方法] 采用PEG沉淀法测定患者血清循环免疫复合物(CIC);以PO和抗-PO制备免疫复合物(IC),加入补体(血清)使其裂解,或同时加PO、抗-PO及血清抑制IC的形成,并测定上清中PO的光密度(OD),确定CMSC及IIPC功能;同时用免疫散射浊度法测定C3、C4。[结果] 患者组CIC检出阳性率为42.1%~80.2%,均显著高于正常组($P < 0.05, 0.01$);正常组CMSC后上清液OD值为 0.614 ± 0.106 ,各种重叠感染组均明显低于正常对照组($P < 0.05, 0.001$);IIPC后上清中OD值为 0.512 ± 0.071 ,各种重叠感染组均明显低于正常对照组($P < 0.05, 0.01$);补体C3、C4在患者组除急性肝炎外均有不同程度的降低。[结论] HCV与HBV重叠感染者血清中存在IC,患者CMSC及IIPC明显降低,在HCV与HBV重叠感染的发病中有一定作用,补体成分的减少与CMSC和IIPC的降低有一定关系。

关键词 补体;肝炎,乙型;肝炎,丙型;重叠感染;免疫复合物

[中国分类号] R512.6 [文献标识码] B

1975年 Miller 和 Nussenzweig^[1]首次将补体介导的免疫复合物溶解能力(complement mediated solubilizing capacity, CMSC)作为补体的一种新功能进行了报道,认为补体可导致免疫复合物(IC)溶解,减弱其致病作用。1980年, Schifferli 等^[2]又报道了补体对免疫沉淀的抑制作用(inhibition of immune precipitation by complement, IIPC)。因为 IC 的致病作用主要是其在组织中的沉积,故 CMSC 及 IIPC 均可抑制 IC 的致病作用。由于 IC 的原位形成和局部沉积是其致病的关键,故当补体功能正常时,通过 CMSC 和 IIPC 可抑制与 IC 有关疾病的发生和发展。CMSC 及 IIPC 目前已被公认为补体的 2 种新功能。在许多疾病的发生过程中可能有 IC 的参与。有报道表明,在丙型肝炎病毒(HCV)与乙型肝炎病毒(HBV)重叠感染患者的肝细胞中,IgG、IgM、IgA 和补体成分可同时出现,认为免疫复合物诱发的Ⅲ型变态反应导致的组织损伤是 HCV 与 HBV 重叠感染的发病机理之一。HCV 与 HBV 造成的肝外损伤亦与Ⅲ型变态反应有密切关系^[3-4]。本文采用 PO-抗 PO 抗原抗体复合物对 CMSC 及 IIPC 进行研究,以了解 HCV 与 HBV 重叠感染患者 CMSC 及 IIPC 的低下情况,证明 CMSC 及 IIPC 低下在 HCV 与 HBV 重叠感染发病

中的作用,现将研究结果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 研究对象 经 HCV 与 HBV 标志物检测阳性的重叠感染者共 111 例,其中急性肝炎 19 例,男 10 例、女 9 例,年龄 12~55 岁(28.5 ± 14.9);慢性迁延性肝炎 27 例,男 16 例、女 11 例,年龄 24~61 岁(38.2 ± 11.7);慢性活动性肝炎 41 例,男 22 例、女 19 例,年龄 25~68 岁(40.6 ± 10.1);肝硬化 16 例,男 9 例、女 7 例,年龄 41~69 岁(49.7 ± 11.8);重症肝炎 8 例,男 4 例、女 4 例,年龄 15~46 岁(30.3 ± 9.6);HCV 与 HBV 标志物检测阳性病毒携带者 35 例,男 18 例,女 17 例,年龄 13~52 岁(31.5 ± 10.8);正常对照 26 例,均为健康体检者,无肝炎病史,男 14 例、女 12 例,年龄 20~53 岁(33.2 ± 12.2)。

1.2 主要试剂 辣根过氧化物酶(PO),美国 Sigma 化学公司生产;抗-PO IgG,武汉生物制品研究所制备兔抗-PO 抗血清,并提取抗-PO IgG,蛋白质含量为 1.9mg/ml;底物,邻苯二胺;PBS-Ca²⁺Mg²⁺,pH7.4, 0.02mol 磷酸盐缓冲液,内含 0.15mmol CaCl₂、0.5mmol MgCl₂;底物液,pH5.0 的磷酸-柠檬酸缓冲

液;C3、C4 免疫散射浊度法试剂由德国 Dade Behring Marburg GmbH 公司生产。

1.3 检测方法

(1)CIC 的检测:取 0.2ml 血清加 0.1molpH8.4 的硼酸盐缓冲液 2.8ml,以含 EDTA 的 7%PEG 4℃条件下沉淀 17h,3000r/min 离心 15min,在以 3.5%PEG 同样条件下洗涤 1 次,以 0.1mol NaOH 沉淀后,测其光密度(OD)。

(2)IIPC 检测法:取 PO 0.1ml(0.25mg/ml),抗-PO 0.1ml(0.5mg/ml),加入 0.1ml 待检血清,37℃孵育 30min,加 PBS 1.0ml,3000r/min 离心 30min,取上清液 0.5ml,加底物 0.5ml(含 0.016% H_2O_2),避光 6min,加 1mol H_2SO_4 0.25ml 终止反应,加 PBS1.5ml,721 分光光度计测定 492nm 处 OD 值。结果计算:待检血清(OD)-灭活待检血清(OD)=IIPC。

(3)CSMC 检测法:取 PO-抗-PO 复合物 0.1ml(0.5mg/ml),加入 0.1ml 待检血清,37℃孵育 30min,加 PBS 1.0ml,3000r/min 离心 30min,取上清液 0.5ml,加底物 0.5ml(含 0.016% H_2O_2),避光 6min,加 1mol H_2SO_4 0.25ml 终止反应,加 PBS1.5ml,721 分光光度计测定 492nm 处 OD 值。结果计算:待检血清(OD)-灭活待检血清(OD)=CSMC。

(4)C3、C4 的检测用德国生产的 Behring Nephelometer 100 自动特种蛋白仪,采用免疫散射浊度法。

2 结果

2.1 CIC 检测结果 各种 HCV 与 HBV 重叠感染肝炎患者与正常对照者比较,急性肝炎组、慢性活动性肝炎、慢性迁延性肝炎、重症肝炎、肝硬化组 CIC 均降低 ($P < 0.01, 0.05$),而与病毒携带者无差别 ($P > 0.05$),结果详见表 1。

表 1 HCV 与 HBV 重叠感染者补体免疫沉淀作用检测结果

分 组	检测数 (例/人)	CIC(OD)	阳性率 (%)	P 值
急性肝炎	19	0.142±0.057	78.3	<0.01
慢性迁延性肝炎	27	0.211±0.074	80.2	<0.01
慢性活动性肝炎	41	0.201±0.051	74.7	<0.01
肝硬化	16	0.146±0.081	70.2	<0.05
重症肝炎	8	0.192±0.053	63.4	<0.01
病毒携带者	35	0.102±0.064	42.1	>0.05
正常对照者	26	0.094±0.041		

2.2 CMSC、IIPC 检测结果 各种 HCV 与 HBV 重叠感染肝炎患者与正常对照者比较,急性肝炎、慢性活动性肝炎、慢性迁延性肝炎、重症肝炎、肝硬化组 CMSC、IIPC 均降低 ($P < 0.01, 0.05$),而与病毒携带者无差别 ($P > 0.05$);结果详见表 2。

表 2 HCV 与 HBV 重叠感染者及对照组 CMSC、IIPC 检测结果

分 组	检测数 (例/人)	CMSC(OD)	P 值	IIPC(OD)	P 值
急性肝炎	19	0.512±0.163	<0.05	0.459±0.102	<0.05
慢性迁延性肝炎	27	0.278±0.136	<0.01	0.133±0.116	<0.01
慢性活动性肝炎	41	0.325±0.124	<0.01	0.225±0.056	<0.01
肝硬化	16	0.502±0.142	<0.05	0.430±0.081	<0.01
重症肝炎	8	0.205±0.096	<0.01	0.175±0.131	<0.01
病毒携带者	35	0.585±0.112	>0.05	0.495±0.068	>0.05
正常对照者	26	0.614±0.106		0.512±0.071	

2.3 补体 C3、C4 检测结果 HCV 与 HBV 重叠感染肝炎患者与正常对照者比较,急性肝炎、慢性活动性肝炎、慢性迁延性肝炎、重症肝炎、肝硬化组 C3、C4 均降低 ($P < 0.01, 0.05$),而与病毒携带者无差别 ($P > 0.05$),结果详见表 3。

表 3 HCV 与 HBV 重叠感染患者及对照组 C3、C4 检测结果

分 组	检测数 (例/人)	C3(g/L)	P 值	IIPC(OD)	P 值
急性肝炎	19	1.098±0.261	<0.05	0.251±0.118	<0.05
慢性迁延性肝炎	27	0.657±0.112	<0.01	0.180±0.097	<0.01
慢性活动性肝炎	41	0.836±0.183	<0.01	0.201±0.112	<0.01
肝硬化	16	0.702±0.229	<0.01	0.163±0.099	<0.01
重症肝炎	8	0.461±0.102	<0.01	0.193±0.059	<0.01
病毒携带者	35	0.971±0.221	>0.05	0.251±0.071	>0.05
正常对照者	26	1.061±0.188		0.271±0.064	

3 讨论

HCV 与 HBV 侵入肝细胞内增值可使受感染细胞膜表面表达病毒标志,并能被机体识别,引起一系列的免疫应答,病毒抗体致敏的 T 细胞表面带有病毒抗原的靶细胞可起杀伤效应以清除病毒。细胞毒性 T 细胞(CTL)效应有双重性,即可清除病毒,同时也造成对肝细胞的损伤。有人认为细胞免疫应答的强弱与临床过程的轻重和转归有密切关系。当病毒感染波及的肝细胞数量不多,免疫应答处于正常范围,产生的 CTL,可摧毁病毒感染的细胞,细胞外释放的 HCV 和 HBV 则可能被抗体中和而被清除,临床表现为急性肝炎,并可以恢复而痊愈。相反,若受病

毒感染的肝细胞为数众多,机体的细胞免疫应答超过正常范围,迅速引起大量细胞坏死,肝功能衰竭,可表现为重症肝炎。当机体免疫功能低下,病毒在感染细胞内复制,受到功能低下 CTL 分杀伤作用,病毒可不断释放,但又无有效的抗体中和病毒,病毒则持续存在并再感染其他肝细胞,形成慢性肝炎。慢性肝炎造成的肝病又可促进成纤维细胞增生,引起肝硬化。在肝炎病毒的免疫研究中,细胞免疫已肯定参与肝细胞损伤和肝脏病变,但体液免疫的研究也有不少资料。

HBV 具有较为复杂的抗原组成,感染机体后,能刺激机体产生一系列相应的抗体,包括抗-HBs、抗-HBe、抗-HBc、抗-Dane 和抗-Pre-s2 等。同时,HBV 感染肝细胞后,还会引起肝细胞表面自身抗原发生改变。暴露出的肝脂蛋白和肝细胞膜抗原等自身抗原成分,也能诱导机体产生相应抗体。在疾病过程中,所有的抗原抗体系统都形成对应的免疫复合物而且出现于患者体内。从抗体方面来看,免疫复合物中的免疫球蛋白已发现有 IgM、IgA,理论上推测,也可能有 IgD、IgE。因而,某种抗原形成的抗原抗体双特异免疫复合物有 3 类或 3 类以上。因此,乙型肝炎病毒感染患者体内可以存在几十类与 HBV 感染有关的抗原抗体复合物。而且,其他疾病患者和正常人体内也存在着有关免疫复合物。这些免疫复合物也可能存在于某些乙型肝炎病毒感染患者体内。所有出现于乙型肝炎病毒感染患者体内与 HBV 感染有关和无关的免疫复合物,无论是从疾病角度对乙型肝炎病毒感染的深入探讨,还是从免疫学角度对免疫复合物病理生理意义的进一步研究,都具有极重要意义^[3,4]。

HCV 感染人体肝细胞后除病毒对肝细胞的直接损害外,与人体的免疫机制有关。关于细胞免疫在丙型肝炎肝损伤中的作用,有研究发现慢性丙肝 CD4/CD8 比率增加^[5],HLA 在肝细胞、淋巴细胞、巨噬细胞表达增加,CD8 阳性细胞在肝细胞坏死区占明显优势,均提示细胞免疫在丙型肝炎发病机制中起重要作用^[6]。关于体液免疫研究则相对较少,国内有人发现丙型肝炎患者 CIC、免疫球蛋白升高而补体及红细胞免疫功能下降。陈悦等^[7]采用敏感性特异性均较好的 C1q-ELISA 法对丙型肝炎患者 CIC 进行定量和定性分析亦证实了其结果。通过对其补体测定,丙型肝炎患者存在体液免疫功能亢进和补体含量下降,说明 III 型变态反应可能在其发病机制中起一定作用。

由于补体能引起免疫病理反应,在 IC 的致病中

起一定作用,故对其检测具有一定临床意义。过去对于补体系统的检测限于溶血活性和补体成分,在 1975 年和 1980 年,Miller、Nussenzweig 和 Schifferli 发现 CMSC 和 IIPC 之后,人们对补体在 IC 致病过程中的作用有了重新认识,CMSC 和 IIPC 目前已被公认为补体的 2 种新功能。III 型变态反应和自身免疫病中一定伴有 CMSC 和 IIPC 的低下,而对 CMSC 和 IIPC 的检测可更直接、更客观反映补体的功能。关于 CIC、CMSC 及 IIPC 的检测国内外已有不少报道,常用辣根过氧化物酶和抗辣根过氧化物酶 IgG、牛血清蛋白和抗牛血清蛋白 IgG、破伤风类毒素和抗破伤风外毒素 IgG、卵清蛋白和抗卵清蛋白 IgG 等作为 IC 进行测定。本课题采用辣根过氧化物酶和抗辣根过氧化物酶 IgG 形成的 IC 作为研究中的免疫复合物,对 HCV 与 HBV 重叠感染者的补体新功能进行测定。本文检测结果:

(1)丙型与乙型肝炎病毒重叠感染者血清 CIC 测定结果:正常对照组 CIC 水平为 0.094 ± 0.041 ,患者各组均显著高于正常对照组 ($P < 0.05 \sim 0.01$)。CIC 检出阳性率为 42.10%~80.2%。而病毒携带者差别不明显 ($P > 0.05$),表明 HCV 与 HBV 重叠感染者大多数存在 CIC 升高现象,特别是有肝炎症状时,IC 在致肝细胞病变中有其重要意义。与文献报道的结果基本一致。

(2)CMSC 检测结果:正常对照组血清裂解 IC 后上清液 OD 值为 0.614 ± 0.106 ,HCV 与 HBV 重叠感染肝病患者为 $0.205 \pm 0.096 \sim 0.512 \pm 0.163$,均显著低于对照组 ($P < 0.05, 0.01$),表明补体可裂解已形成的 IC,使上清中 OD 值降低。

(3)IIPC 检测结果:正常对照液中 OD 值为 0.512 ± 0.071 ,HCV 与 HBV 重叠感染肝病患者为 $0.133 \pm 0.116 \sim 0.459 \pm 0.102$,均显著低于对照组 ($P < 0.05, 0.01$),是由于正常补体可抑制 IC 的形成和沉淀,故上清液中 OD 降低。

(4)C3、C4 检测结果:C3 正常对照组为 $1.061 \pm 0.188 \text{g/L}$,除 HCV 与 HBV 携带者组及急性肝炎组与正常对照组相比无差别 ($P > 0.05$)外,其余肝病组低于正常对照 ($P < 0.05, 0.001$);C4 正常对照组为 $0.271 \pm 0.064 \text{g/L}$,病毒携带者及急性肝炎组与正常对照无差别 ($P > 0.05$),其余各组明显降低 ($P < 0.05, 0.01$),与文献报道一致。表明补体成分与 CMSC 及 IIPC 有一定关联。

本文结果及文献报道表明,HCV 与 HBV 重叠感染者血清中确实存在大量的 IC。患者 C3、C4 成分的降低可能是由于 IC 增加而导致的消耗,不管 CIC 或病灶局部沉积的 IC 或肝外组织的 IC 均可激活补

酶联免疫吸附法检测 HBsAg 的假阳性和解决方法

杨寿旺 李睿 黄建可

(温州国际旅行卫生保健中心,温州 325000)

摘要 [目的] 避免酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 HBsAg 假阳性报告的发生。[方法] 对 ELISA 法检测 HBsAg 结果为阳性而金标法为阴性的 69 份血液标本,用 ELISA 法和 Abbott 免疫发光法检测乙型肝炎 3 系 5 项免疫指标,并对结果进行分析。[结果] ELISA 法检测 HBsAg 的假阳性率为 1.19%,而用同样方法复检后,其假阳性率降至 0.06%。[结论] ELISA 法检测 HBsAg 的假阳性大多可通过用同样方法复检并结合乙型肝炎 3 系的其他免疫指标发现并予以纠正,对少数复检结果仍难以确定者,可用 Abbott 免疫发光法检测乙肝 3 系 5 项免疫指标予以确认。

关键词: 肝炎表面抗原,乙型;酶联免疫吸附法;假阳性;弱阳性

[中图分类号] R512.6 [文献标识码] B

The False Positive of HBsAg Detected by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) and the Solution. Yang Shouwang, Li Rui, Huang Jianke Wenzhou International Travel Health Care center, Wenzhou 325000, China

[Abstract] **Objective** To avoid the false positive of HBsAg detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Methods** The 69 blood specimens of which HBsAg were positive detected by ELISA and negative by immunogold histochemistry technique were selected. Their HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb and HBeAb were detected by ELISA and Abbott luminescence immunoassay repeatedly, then the results were analyzed. **Results** The ratio of false positive of HBsAg detected by ELISA was 1.19%, however it reduced to 0.06% after detected by ELISA again. **Conclusion** Most of the false positive of HBsAg detected by ELISA could be corrected by ELISA again, and combine with the analysis of their HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb and HBeAb. Some uncertain results could be confirmed by Abbott luminescence immunoassay.

[Key words] HBsAg; ELISA; False positive; Weak positive

乙型肝炎表面抗原(HBsAg)的检测大多使用酶联免疫吸附试验(ELISA)法,该试验灵敏度高,特异性强,已被广泛使用。目前 ELISA 法检测 HBsAg 的阳性判断标准为 OD/CO \geq 1,但 ELISA 法影响因素诸多,如果盲目地按此标准来判断检测结果的阳性与否,势必造成假阳性报告的发生。本文对 ELISA 法检测结果为阳性,而金标法为阴性的 69 例标本的复

检结果进行了分析,现将分析结果报告如下:

1 材料与方 法

1.1 标本来源 2005 年 3 月 4 日~2005 年 8 月 15 日,到温州国际旅行卫生保健中心进行健康体检的出入境人员血清标本共 5 154 份。

1.2 仪器及试剂

体,造成补体成分降低。补体成分的减少又影响 CMSC 及 IIPC。IC 是导致 HCV 与 HBV 重叠感染者肝细胞损伤和肝外组织损伤的重要原因之一。本结果对研究 HCV 与 HBV 感染者发病机理具有一定的意义,对了解 HCV 与 HBV 病毒感染活动性、严重程度及肝外损伤的实验与临床诊断有重要参考价值,对疗效的断定亦可作为主要依据。

参考文献

1 Miller GW, Nussenzweig V. A new complement function of antigen-antibody aggregates. Proc Natl Acad Sci USA, 1975, 72: 418

2 Sdufferi JA, Bartolotti SR, Peters DK. Inhibition of immune precipitation by complement. Clin Exp Immunol, 1980, 42: 387
3 彭宣亮. 乙型肝炎免疫复合物的研究进展. 见: 张建营. 病毒性肝炎研究进展. 北京: 中国科学技术出版社, 1992: 10-30
4 赵耀基, 邬祥惠, 杨佩珍, 等. 病毒性肝炎血清循环免疫复合物和 C3、C4 的检测及其意义. 中华传染病杂志, 1983, 1(1): 9
5 Hino K, Okuda M, Konishi T, et al. Analysis of Lymphoid follicles in liver of patients with Chronic hepatitis C. Liver, 1992, 12: 387
6 陈悦, 余柏林, 邱兴兰, 等. 丙型肝炎患者循环免疫复合物的检测及意义. 邵阳医学院学报, 1996, 15(2): 76

[收稿日期: 2006-10-23]