

384589

酶标记免疫技术的原理、 方法和应用

(下 册)

刘锦海 夏裕珍 编著

余 滨 审阅

宁波市免疫试剂厂

宁波市免疫测试研究室

第 登 章 酶免疫微量分析技术

在医学病毒学上的应用

近年来,病毒病在临床医学中的地位显得越来越重要,据统计,在人类感染性疾病中,病毒病约占60%以上,因此,临床医学对病毒学检验技术的要求也越来越高。而常规的病毒学检验技术,如补体结合试验、中和试验、血凝抑制试验等,虽然已在临床检验中应用多年,但这些技术的操作都很繁琐,且要求又都十分严格,因此在实际应用时很麻烦,一般临床试验室不易开展。正因为如此,所以ELISA技术一经问世,就被病毒工作者所重视。1974年,ELISA技术在病毒学中的试用首先在英国获得成功,在此以后短短的几年间,ELISA技术很快被实际应用于病毒学的检验工作中,且发展极快,取得了许许多多令人振奋的成果。目前,ELISA技术已被应用于人类病毒学中的以下几个方面:

1. 病毒抗原在感染细胞中的定位;
2. 病毒的分型鉴定;
3. 病毒性疾病的病原诊断,疗效考核及预后判断;
4. 病毒性疾病发病机理的探讨;
5. 病毒性疾病的流行病学调查和人工免疫效果观察;
6. 肿瘤病毒的研究。

已被实际应用或已有报导的用ELISA法检测相应抗体的有乙型肝炎病毒,甲型肝炎病毒、乙脑病毒、狂犬病毒、流感病毒、麻疹病毒、风疹病毒腮腺炎病毒,EB病毒,轮状病毒,柯萨奇病

毒、巨细胞病毒，单纯疱疹病毒，带状疱疹病毒，灰髓炎病毒，合胞病毒，腺病毒，黄热病毒，登革热病毒及出血热病毒等。应用 ELISA 技术检测抗原的已有乙型肝炎病毒，甲型肝炎病毒，出血热病毒，轮状病毒，腺病毒，合胞病毒等。在肿瘤病毒的研究方面，应用 ELISA 技术已证实了宫颈癌和疱疹病毒 II 型之间有明显的相关性，而 EB 病毒和鼻咽癌之间也密切相关。

一、ELISA 技术在乙型肝炎病毒(HBV) 感染检验中的应用

近年来，乙型肝炎病毒在人群中感染率有逐年增高之势，据我国有关部门的初步统计，我国人口中 HBV 感染率已超过 10%；不仅如此，乙型肝炎患者中有相当一部份会演变成慢性肝炎，肝硬化等而严重损害人体健康；近年的研究还表明，HBV 和原发性肝癌密切相关。因此，乙型肝炎的防治问题已成为当务之急，对尽快建立敏感度高，特异性好，操作简便的乙型肝炎病毒的检验技术的要求尤为迫切。目前，ELISA 技术已可应用于乙型肝炎病毒相关的五项免疫学指标(ABsAg、抗-ABs、ABcAg、抗-HBe、抗-ABc)的定性和定量检测，随着酶标记试剂的商品化，国内的临床实验室已越来越普遍地应用 ELIA 技术来检测上述五项指标，这些对乙型肝炎的早期诊断，疗效考核，预后判断、流行病学调查和卫生学检查等，均有十分重要的意义。

(一) 乙型肝炎表面抗原(HBsAg)

1976 年 Wolters 等首先报导用 ELISA 方法(HRP 标记抗体、双抗体夹心法)检测 ABsAg，检出值域为 $\leq 5-10 \text{ ng/ml}$ ，(国内郭恒昌等用 AKP 标记抗体检测 ABsAg，最低检出值为 75 ng/ml ，

1977年 Halbert 等进一步用 ELISA, RZA(放射免疫)及 CEP(对流电泳)等方法 ABsAg 进行比较检测,证实 ELISA 的敏感度和 RIA 相似,而比 CEP 高 100 倍以上。欧州的 11 个医学中心分别对 5 万余份样品的 ABsAg 进行 ELISA 和 RIA 及 RPHA(反向间接血凝)检测,他们的结果也表明 ELISA 的敏感性和 RIA 相似,其阳性率和滴度均比 RPHA 显著增高。1983 年 Aendry RM 等用 ELISA 和 RZA 检测了 352 份血清标本,其中 347 份得到一致的结果,二种方法的符合率达到 98%,他们还同一份标本,用不同批号的 ELISA 试剂在不同时期测定,结果基本一致,说明该方法具有良好的重复性。近十年左右的实践证明,ELISA 法检测 ABsAg,是一种简易、特异、灵敏的好方法,目前,并已在国内普及应用,兹将几种不同的具体操作方法介绍如下:

1. 双抗体夹心法:(以宁波市免疫试剂厂试剂盒的操作常规为例)。

(1) 包被:取包被物(纯化单抗 ABs),用包被液 CPH 9.6 0.05 M 碳酸缓冲液)稀释成 100 v/ml 后用微量移液器加入 Tc 型聚苯乙烯反应板各孔,每孔 0.1 ml,置 37℃ 恒温箱 2 小时后移置 4℃ 冰箱 18 小时后备用。包被好的反应板在 4℃ 冰箱中可保存 3—6 个月以上,但需注意避免包被液蒸发干燥,一旦干燥,易出现各孔显色反应的不一致。用于包被的单抗 ABs 已经过柱层析纯化,效价达到 $\geq 1:64$ (CEP),最适包被量为 10 v/0.1 ml/孔左右。

(2) 洗涤:洗涤液为 0.01 μ pH 7.4 PBS(含吐温-20 0.5%)。先将包被液倾去后将洗液注满各孔,维持 3 分钟后倾去,如此重复 3 次。

(3) 封闭:封闭液应用 10% 小牛血清(经 56℃ 30 分钟灭活),每孔加 0.1 ml,置 37℃ 孵育 1 小时后洗涤(同 2)。

(4) 加样：被检血清标本先用 稀释液 (0.01 M pH 7.4 PBS 含 10% 小牛血清和 0.5% 吐温-20) 按 1:10 稀释：如需要测定 HBsAg 效价，则作 1:10 1:20 1:40…系列倍比稀释。然后将稀释好的血清标本加入反应板各孔，每块反应板上的最后三个孔分别加入阳性对照血清，阴性对照血清和稀释液(空白对照)。置 37℃ 孵育 2 小时后倾去，洗涤(同 2)。在进行人群体检或 HBV 感染普查时，常可采用血纸标本用以作 ABsAg 的定性检测。具体方法如下：取 0.5 cm² 左右滤纸片浸吸外周血一滴，检测时用 0.3 ml 稀释液将血纸浸泡 1 小时后取浸出液 0.1 ml 加入反应孔，余同血清标本。

(5) 加酶标记物：HRP 标记单抗—HBs，系用过碘酸钠氧化物制备，工作效价参照说明书。用稀释液(同 4)将酶标记物按规定效价稀释后加入各孔，每孔 0.1 ml，置 37℃ 孵育 1 小时后洗涤(同前)。酶标记物以临用前稀释为佳，稀释后如一次用不完，可置 4℃ 保存，但不宜超过一周。酶标记物一经稀释后，效价容易下降，故使用对一般宜作分级稀释，需保存的部份稀释度越小越好，如酶标记物的实用工作效价为 1:60，而估计全部稀释后一次又用不完，则可先作 1:6 稀释，再按需用量取出部份 1:6 稀释好的酶标记物再作 1:10 稀释后使用，需保存部份则以 1:6 的低稀释度保存。

(6) 加底物：系用 OPD 液，每孔加 0.1 ml 后置 37℃ 10 分钟，临用前取试剂盒中提供的底物一支加入一支底物液中，待充分溶解后即可使用。

(7) 终止反应：试剂盒中提供的终止液为 2 M H₂SO₄，每孔加 0.05 ml。

(8) 结果判断：取波长 = 492 nm 时测 A 值，P/N ≥ 2.1 时判为阳性(或肉眼观察呈色深于阴性对照孔时判为阳性)。效价测定

时以出现阳性结果的最高稀释孔判为该份标本的效价。

国外检测 ABsAg 的 ELISA 药盒中酶标记物常使用碱性磷酸酶 (AKP) 标记的抗—ABs, 国内也曾有报导, 下面简单介绍郭恒昌报告的使用 AKP 标记豚鼠抗—ABs 检测 ABsAg 的方法供参考:

(1) 取洁净微量反应板 (聚苯乙烯, 4×10 孔, 上塑三厂产品), 每孔加 0.1 ml 豚鼠抗—ABs (10 v/ml), 于 4°C 孵育过夜或 37°C 2 小时。

(2) 倾去包被液后各孔加入洗液 (PBS-tween-20) 洗涤四次, 每次维持 5 分钟。

(3) 血清标本用稀释液 (PBS-tween-20, 含 10% 正常兔血清) 先作 1:10 稀释后加入反应孔, 每孔 0.1 ml, 置 43°C 孵育 1 小时。

(4) 洗涤 (同 (2))

(5) 加 AKP 标记豚鼠抗—ABs (戊二醛一步法制备), 每孔 0.1 ml, 置 43°C 孵育 1 小时。

(6) 洗涤 (同前)。

(7) 取对硝基本酚氢酸盐 (上海试剂二厂产品), 临用前按 1 mg/ml 配于二乙醇胺缓冲液 (二乙醇胺 97 ml, 蒸馏水 800 ml, 叠氮钠 0.2 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 100 mg, 用 1 N HCl 调正 pH 至 9.8, 再用蒸馏水补足至 1000 ml, 4°C 保存备用) 中, 每孔加入 0.1 ml, 室温避光静置 30 分钟。

(8) 每孔加入 3 M NaOH 1 滴终止反应。

(9) 结果判断: 同上, 唯用酶标测定仪时波长应选用 405 nm。

据郭氏等报告, 该方法可检出 ABsAg 最低浓度为 75 ng/ml 。Halbert 等则报告他们用 AKP 标记抗—ABs 检测 ABsAg 的 ELISA 方法的灵敏度比对流电泳 (CEP) 高 100 倍以上, 与 RIA

近似。

2. 间接法: 郭恒昌等 1981 年报告用间接法检测 ABsAg 获得较满意的结果, 兹介绍其操作方法如下:

(1) 包被: 取纯化豚鼠抗—ABs, 用包被液(pH 9.6 15 M 碳酸盐缓冲液)稀释至 10 v/ml, 每孔加入 0.1 ml, 置 4℃过夜。

(2) 洗涤(同前)。

(3) 被检血清用稀释液(PBS-Tween 20 含 10%正常兔血清)作 1:10 稀释后加入反应孔, 每孔 0.1 ml, 43℃孵育 1 小时。

(4) 洗涤(同前)。

(5) 加单抗—HBs(10 v/ml), 每孔 0.1 ml, 置 43℃ 1 小时。

(6) 洗涤(同前)。

(7) 加酶标记物: 酶标记物为 HRP 标记兔抗单 IgG(戊二醛步法制备), 每孔加入 0.1 ml 后置 43℃ 1 小时。

(8) 洗涤(同前)。

(9) 加底物: 临用前配制 OPD 液, 每孔加入 0.1 ml, 置暗处待阳性对照充分显色后加入 2 MH₂SO₄ 0.05 ml/孔终止反应。

(10) 结果判断: 同前, 酶标比色计波长选用 492 nm。

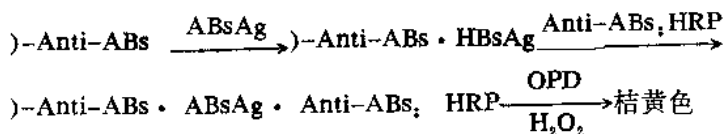
3. 酶—抗酶(PAP)法, 1974 年 Petrali 等首先用 PAP 法进行组织抗原的定位检测, 由于该方法可以避免化学标记中多种因素的影响, 所以试验结果比较稳定, 而且因为多级放大, 使灵敏度也有所提高。1981 年郭恒昌等首先报告应用 PAP 法检测血清 HBsAg 获得成功, 并与 RIA 进行了比较, 证明了该方法的灵敏度和 RIA 相似, 特异性和重复性也较满意。其操作的基本步骤如下: 豚鼠抗—HBs 包被(1 v/0.1 ml/孔)→洗涤后(洗涤液为 pH 7.4 0.02 M Tris-Tween 20 液)加入血清标本, 43℃孵育 1 小时后洗涤→加入羊抗—ABs(稀释液为 PBS-Tween 20, 含 10%正常兔血清)置 43℃ 1 小时后洗涤→加兔抗羊 IgG, 置 43℃ 1 小时后再

洗涤→加入 PAP, 43℃ 孵育 1 小时后洗涤→加入新鲜配置的 OPD 液。待阳性对照充分显色后加 2 M H_2SO_4 终止反应。结果判断方法同前。

PAP 法在灵敏度方面具有优越性, 但因反应层次多, 操作比夹心法及间接法更加烦琐, 因而目前实际上很少应用, 尚无相应的商品药盒。

4. 应用聚苯乙烯塑料珠作为固相载体的 ELISA 方法检测 ABsAg: 聚苯乙烯塑料珠是目前国外常用的 ELISA 固相载体, 具体使用方便, 容易保存, 敏感性高等优点。国外商品 ABsAg ELISA 试剂盒已大多改用这种小珠作为载体, 并予先统一包被好后再分装配制入试剂盒中。现以美国安倍 (Abbott) 公司出品的 HBsAg EIA 试验盒为例介绍其使用方法。

安倍公司使用的聚苯乙烯塑料小珠直径为 0.6 cm 左右, 无线吻合, 予先用豚鼠抗-ABs 包被, 有 100° 和 500° 二种不同分装。反应原理为双抗体夹心法:



操作方法如下:

1. 取出包被好的塑料小珠置洁净试管中, 用蒸馏水或者去离子洗涤, 每次加水 4-5 ml, 反复洗涤 3 次后吸尽所有液体。

2. 加入被检标本, 应浸没整个小珠, 置 38~41℃ 小浴 2 小时左右 (±10 分钟)。如果应用该公司配套反应池进行试验, 每次标本量仅需 200-400 μl 。

3. 充分洗涤同前。

4. 加入 HRP 标记单抗-ABs, 38-41℃ 水浴 1 小时左右 (±5

分钟)。

5. 充分洗涤同前。

6. 在加酶标记物后水浴的最后 5~10 分钟用 柠檬酸磷酸盐缓冲液(含 H_2O_2)液解 OPD。加入反应管内后 15~30℃水浴 30~35 分钟。

7. 加 1 NH_4SO_4 终止反应。

使用该公司试剂盒时应按其规定, 每次试验应有三个阴性对照和二个阳性对照。试验结果在 492 nm 波长处测定 A 值。判定结果的值域阳性对照 A 值的均值($\text{NC}\bar{x}$)加 0.05, 待检标平 A 值 $\geq$ 此值时即判为 HBsAg 阳性。当然, 用于阴性对照用的材料, 必须是试验盒内提供的阴性对照材料。

(5) 快速 ELISA: 上述几种传统的 ELISA 方法, 均有一个共同的缺点, 即实验操作时间较长, 夹心法和间接法均需 4 小时左右才能完成试验, 而 PAP 法则费时更长。许多研究室正在设法建立一种费时较短的快速 ELISA, 从理论上分析, 大大缩短了 ELISA 试验时间是完全有可能的。根据对 ELISA 试验中各反应步骤的动力学观察, 选择其亚适当反应时间, 就能明显地缩短整个试验时间。郭恒昌等 1982 年报告了他们利用不同浓度酶标记羊 IgG 包被于聚苯乙烯微量反应板, 经不同时间加入底物显色, 据此对包被过程的动力学进行观察的结果, 他们发现当蛋白质加入微量反应板的反应孔后自 1 分钟起就开始了吸附过程, 其吸附量与蛋白质浓度有关。当蛋白质浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 包被后 60 分钟出现明显吸附, 12 小时后大部分蛋白质已被吸附; 而当蛋白质浓度增加到 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 包被后 5 分钟已有 30% 蛋白质被吸附, 到 6 小时左右基本完成吸附。这一结果提示, 适当增加包被物浓度, 可以相应缩短包被所需要的时间。另外, 蛋白质与载体表面的吸附, 随着时间增长, 仍会有相当一部份重新释放到液相

中去，而可使反应灵敏度下降，缩短包被时间后，可减少这种重新释放的蛋白质量，因此尚可相应地提高试验的灵敏度。郭氏等还对抗原抗体在固相载体上的反应过程进行了动力学观察，他们发现抗原抗体在固相载体上相遇后随即发生反应，2小时后反应基本完成，而在起初的5分钟反应强度已达2小时反应强度的25%；而且，由于抗原抗体反应是一种可逆性反应，即抗原和抗体反应结合成免疫复合物的同时，也有部份免疫反应物在解离成游离抗原和抗体，如果把反应时间选择亚适合时间即5分钟，一方面已有25%左右的抗原和抗体已完成结合反应，同时由于反应时间短，其反应也相应减少，这实际上是加强了反应强度。另外，如果将包被时间和抗原抗体反应时间缩短了，则非特异吸附机会也就随之减少，因而试验过程中的洗涤时间也可缩短。郭氏等根据上述动力学原理，成功地设计了检测ABsAg的快速ELISA方法，从包被开始直至反应终末，全程仅需20分钟左右，而且其特异性、重复性和灵敏度均较满意，他们报告的具体方法如下：

(1) 包被：羊抗—ABs用0.05 M pH 9.6 碳酸盐缓冲液稀释至20 v/ml后加入反应板各孔，每孔0.1 ml，置室温($\geq 25^{\circ}\text{C}$) 5分钟。

(2) 洗涤：洗液选用0.02 M pH 7.4 Tris-Tween 20 溶液，洗涤三次，每次三十秒钟。

(3) 加被检血清标本，1:10 稀释后加入反应孔(稀释液为0.01 M pH 7.4 PBS-Tween 20 含10%正常兔血清)，每孔0.1 ml，置室温($\geq 25^{\circ}\text{C}$) 5分钟后同样洗涤三次。

(4) 加HRP标记羊抗-HBs，其工作浓度为常规ELISA的一倍左右，每孔0.1 ml，置室温($\geq 25^{\circ}\text{C}$) 5分钟再同样洗涤3次。

(5) 加OPD底物液，每孔0.1 ml，置暗处待阳性对照孔充分显色后用2 M H_2SO_4 终止反应。结果判断方法同前。

1983年 Kunitomo 等报导了用抗-HBs 单克隆抗体检测 HBsAg 的反向被动血凝试验, 进一步提高了 RPHA 法的特异性。国内郭恒昌等首先报告利用融合细胞产生抗-HBs 单克隆抗体获得成功, 并很快应用到 ELISA 检测 HBsAg 的方法中; 开始是应用抗-HBs 单克隆抗体作为包被抗体, 以后上海生物制品研究所免疫室等单位又成功地制成 HRP 标记抗-HBs 单克隆抗体, 目前已研制成用 HRP 标记抗-HBs 单克隆抗体配制的 HBsAg ELISA 测试盒, 并已有商品供应。该试剂盒用聚乙烯微量反应板(4×10 孔)作为固相载体, 豚鼠抗-HBs 提纯品作包被抗体, HRP 标记抗-HBs 单克隆抗体作酶标记物, 底物仍为 OPD, 操作方法和前述的夹心法测 HBsAg 基本相似。单克隆抗-HBs 的应用, 进一步提高了 ELISA 检测 HBsAg 方法的特异性和稳定性。

近年来, 随着方法学的成熟和试剂盒的商品化, ELISA 检测 HBsAg 的技术已逐步成为我国临床检验的常规方法, 被广泛应用于乙型肝炎的临床诊断, 健康体检, 献血员筛选, 同时由于方法操作简便而适于大批量标本的快速测定, 所以也被广泛应用于乙型肝炎的流行病学调查。

(二) 乙型肝炎表面抗体(Anti-HBsAg)

一般而言, 抗-HBs 属于低亲和力抗体, 因此很多检测其它抗体行之有效的方法(如 CEP), 用于检测抗-HBs 时往往不能达到相似的灵敏度。同样是血凝技术, RPHA 用于检测 HBsAg 时不失为一种比较敏感的方法, 而 PHA 检测抗-HBs 时, 检出率却极低。正因为缺乏比较敏感的方法, 标本中低滴度的抗-HBs 难以被检出, 故而相当一段时期里, 人们曾普遍认为机体感染 HBV 后, 抗-HBs 的产生要晚于其它病毒感染, 往往要等到 HBsAg 消失后几天~几周才能在周围血中检出抗-HBs, 并错误地把这一现

象认为是HBV感染的固有特征。不少实验室探索过试图用ELISA方法检测抗-HBs，但多由于在使用纯化HBsAg作包被时发现HBsAg难以吸附到固相载体上去，这一技术上的困难使ELISA检测抗-HBs方法的建立在ELISA检测HBsAg方法成熟之后又隔了一段时间才得以实现。Spauo等1978年报告用微量间接EIA检测抗-HBs获得成功，并证实其特异性与敏感性和RIA法相似，Spano氏还认为，EIA可检出免疫复合物中的抗-HBs，而RIA则不能检出。1980年我国张泳，刘锦海首先报导了用HRP一标记SPA(PPA)代替酶标抗人IgG建立的PPA-ELISA检测抗-HBs技术获得成功，同PHA法比较，抗-HBs的检出率提高了5倍左右。在此之后，我国许多实验室相继建立了用ELISA检测抗-HBs的方法，并逐步完善成熟，目前不少临床检验单位已将此方法列入常规方法，国内也已有相应试剂盒供应。在实际工作中应用较多的方法有以下几种：

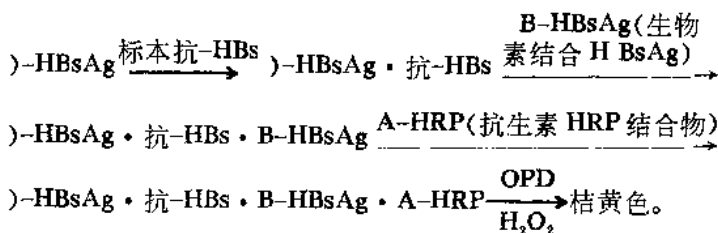
1. 双抗原夹心法：即以从HBsAg强阳性抗-HBs阴性的人血清中提取纯化的HBsAg包被，加标本适当孵育后加HRP标记HBsAg，最后以OPD呈色反应判断结果，具体操作步骤如下（以宁波免疫试剂厂出品的试剂盒为例）：①以0.75%鞣酸水溶液鞣化处理聚苯乙烯反应板，每孔加入0.1 ml，置37℃1小时后倾去并洗涤3次。②将亲和层析纯HBsAg用pH 9.6 0.05 M碳酸盐缓冲液稀释成30 v/ml，每孔加0.1 ml，置37℃2小时后移入4℃18小时后备用。③洗涤（洗涤液为含0.5%吐温-20的HCL-Tris液，pH 7.4）④血清标本稀释后（稀释液为pH 7.4 0.01 M PBS）加入反应板各孔，每孔0.1 ml，37℃孵育2小时，⑤洗涤同前。⑥酶标HBsAg按工作效价稀释后加入反应板各孔，每孔0.1 ml，37℃孵育1小时。⑦洗涤同前。⑧加OPD液，每孔0.1 ml，置37℃10分钟后每孔加入0.05 ml 2 M H₂SO₄。

终止反应。本方法的整个试验过程均在同一抗原抗体系统中进行，所以特异性十分理想，所检出的抗-HBs 包括 IgG 型和 IgM 型抗体。郭恒昌等报导的方法中用多聚赖氨酸处理反应板，也能得到满意的包被结果。为了减少操作人员的接触感染危险，郭氏还提出将纯化 HBsAg 先经 100℃15 分钟灭活处理，经过加热处理的 HBsAg 用于包被并不影响检测结果。

2. 间接法：试验过程为用纯化 HBsAg 包被→加被检标本→加酶标记羊抗人 IgG→加 OPD 呈色→终止反应。操作方法和上述夹心法基本相同。间接法的敏感性比夹心法有所提高，但特异性稍逊于夹心法。

3. PPA-ELISA 法：敏感性及特异性和间接法相似，但由于使用 PPA 代替 HRP 标记羊抗人 IgG，所以试剂的稳定性能更好，且试验时间较短。操作方法中除加酶标记物后孵育时间缩短到 30 分钟外，余均和夹心法相似。

4. BAS-ELISA(生物素抗生物素酶标免疫试验)法：美国 Abbott 公司出品的抗-HBs EIA 试剂盒应用的是 BAs-ELISA 中的 BA 法：



(具体操作步骤详见 ELISA 技术进展章节)。国内上海生物制品研究所也已试产按 BAS-ELISA 原理设计的抗-HBs 测试盒。

ELISA 检测抗-HBs 技术的建立，为临床检验提供了一种检测抗-HBs 的灵敏而简便的手段，人们对抗-HBs 的意义也有了进

一步的认识, 抗-HBs 已成为乙型肝炎诊断, 预后, 疗效考核和流行病学调查的一项重要指标。一般认为, 抗-HBs 不仅仅是一种中和抗体, 在机体清除 HBV 的过程中起着重要作用, 而且它也是 HBV 感染引起机体免疫损伤的重要病理因素。无症状携带者血清中往往不能检出抗-HBs, 于是机体既不能清除 HBV, 却又不致引起免疫损伤, 这可能就是 HBV 可以在这些个体内与机体长期共存而又无明显病理变化的主要原因。但一旦 HBsAg 转阴, 则抗-HBs 可迅速出现。如果乙型肝炎患者发病早期出现抗-HBs 的异常高滴度, HBsAg 急骤转阴, 则很可能由此引起强烈的免疫损伤, 提示患者即将发展成暴发型肝炎。患者血清抗-HBs 水平如果保持在低滴度水平或在低水平上波动, 常提示患者正发展为慢迁肝或慢活肝, 这可能是由于抗-HBs 效价太低尚不足以清除 HBV, 却对机体始终起着一定的免疫损伤作用的缘故。部份急性乙型肝炎患者, 在发病后 2 周左右可检出低滴度抗-HBs, 以后抗-HBs 效价缓慢升高, 到六个月~一年左右达高峰, 随后逐步下降, 在血清中可维持多年。HBV 感染初期, 尚未产生抗-HBs, 所以不致引起免疫损伤, 为疾病的潜伏期或前驱期, 抗-HBs 产生之后, 在体内和 HBsAg 并存和互为消长, 可引起较严重的免疫损伤, 而出现明显的临床症状; 疾病后期 HBsAg 消失, 血清中仅可检出抗-HBs, 症状逐步缓解提示机体正进入康复期。但也有相当多的急性乙型肝炎患者, 即使用敏感的 ELISA 方法检测, 也只是在 HBsAg 转阴后才能检出抗-HBs。约 10% 一过性 HBsAg 血症患者始终检不出抗-HBs。有人认为抗-HBs 出现的迟早, 还与以往曾否感染过 HBV 有关; 如患者过去曾有 HBV 的隐性感染史, 在每次感染 HBV 后 2 周左右即可检出抗-HBs, 如为初次感染 HBV, 则常需在感染后 4~5 个月才能检出抗-HBs。我国 HBV 的隐性感染率较高, 所以乙型肝炎患者常能较早地被检出抗-HBs。

过去曾认为 HBsAg 和抗-HBs 同时阳性是较罕见的现象，但自从建立了 ELISA 和 RIA 等敏感的测试方法后，HBsAg 和抗-HBs 同时阳性是 HBV 感染后一个常见的模式，且可见于各种临床类型的乙型肝炎患者。对于抗-HBs 阳性者，应从多方面分析其临床意义，不能因为抗-HBs 是一种保护性抗体而一概认定其有防止 HBV 再次感染的保护作用，应该认识到抗-HBs 尚有对机体造成免疫损伤的一面，尤其在抗-HBs、HBsAg 和抗-HBc 同时阳性时，常提示患者的预后不佳。

(三) HBsAg-IgM 循环免疫复合物

1982 年 Franco 等报导了用 RIA 检测血清中 HBsAg-IgM 循环免疫复合物的方法，作者发现 HBsAg-IgM 复合物在大多数急性乙型肝炎患者外周血清中可被检出，而其在血清中维持时间比 HBeAg 和 HBsAg 均短，一般在发病四周内即可消失，因此 Franco 等认为 HBsAg-IgM 复合物和抗-HBc(IgM 型)相似，可作为急性乙型肝炎早期血清诊断指标之一。他们的结果还表明，如果患者血清中的 HBsAg-IgM 复合物在发病四周后仍持续阳性，则提示患者病情将转为慢性肝炎。临床上一般认为 HBeAg 阳性是乙型肝炎有传染性的标志，由于 HBsAg-ZgM 复合物的提示基本上和 HBeAg 平行，故而 HBsAg-ZgM 复合物阳性也被认为是 HBV 在复制增殖并提示有传染危险性的标志之一。关于 HBsAg-IgM 复合物的检测方法，国外多用 RIA 法，国内康庸等 1984 年也报告建立了检测 HBsAg-IgM 复合物的 RIA 技术。1986 年顾士民等则报告了用 ELISA 检测 HBsAg-IgM 复合物的方法，该方法比较简便，易于在一般实验室中开展。其反应层次为：抗 μ 链单克隆抗体——HBsAg-IgM——羊抗-HBs-HRP-OPD 呈色。现将其具体操作方法介绍于下：

1. 取 Tc 型聚苯乙烯微量反应板, 每孔加 0.1 ml 抗 μ 链单克隆抗体, 置 4℃ 24 小时。包被液为 pH 9.6 0.05M 碳酸盐缓冲液。

2. 弃去包被液, 每孔加 0.1 ml BsA, 进行封闭, 置 37℃ 2 小时或 4℃ 过夜。

3. 弃去封闭液, 洗涤 5 次。洗涤液为 pH 7.4 0.02 M Tris-HCl 缓冲液(含 0.5% tween-20)。

4. 加被检血清(原倍), 每孔 0.1 ml, 每块反应板上设一个阳性对照, 二个阴性对照, 一个空白对照。置 37℃ 4 小时(或 4℃ 过夜)。

5. 弃去血清, 洗涤 5 次后加 0.1 ml 羊抗-HBs-HRP, 置 37℃ 2 小时。酶标记物的稀释液为 pH 7.4 0.05 MPBs, 含 10% 正常人血清(指乙肝五项指标及类风湿因子均为阴性的血清)及 0.5% tween-20。

6. 弃去酶标记物, 洗涤 5 次加底物 OPD 液, 每孔 0.1 ml。置 37℃ 15 分钟后每孔加 0.05 ml H_2SO_4 终止反应。

(四) e 抗原(HBeAg)

Magnius 等于 1972 年首次报告在用琼脂扩散法检测乙型肝炎抗原时, 发现一种与已知的 5 种 HBsAg 亚型和 HBeAg 均不相同的新的乙肝特异性抗原, 他们按照当时的 HBsAg 亚型各顺序 a. b. c. d 而把此新抗原暂定名为 e 抗原, 1977 年 WHO 病毒性肝炎专家委员会正式将其命名为 HBeAg。对于 HBeAg 的本质, 至今尚未十分明白, 曾有种种不同的解释, 近年来越来越多的资料表明, HBeAg 很可能是乙肝核心抗原经蛋白酶分解后的产物。由于 HBeAg 的出现和 HBV 的复制增殖密切相关, 因此是 HBV 感染后的重要指标之一。

用于检测 HBeAg 的最早的血清学方法是琼脂扩散法, 该方

法特异性好,且方法简便,但敏感性差,结果也不易观察;采用标本浓缩法(如离心浓缩或加入聚丙烯酰胺粒浓缩等)后虽然可稍稍提高其灵敏度,然而仍很不理想。Takahashi等(1977)建立了检测HBeAg的反向间接血凝技术,将灵敏度提高100倍左右,但是致敏红细胞的制备比较困难。Van der Waart(1978)报告用HRP标记e抗体建立了检测HBeAg的ELISA技术,其灵敏度约琼脂扩散法的1000~2000倍左右,但类风湿因子的存在可导致假阳性结果。目前国内许多临床实验室相继开展用ELISA检测HBeAg的方法,且已有相应试剂盒供应。

1. ABBOTT-HBeEIA试剂盒方法:该试剂盒可同时用于检测HBeAg和抗-HBe,现先介绍其检测HBeAg的方法(检测抗-HBe的方法详见后面有关章节)。

(1)包被:试剂盒内已含有包被吸附好抗-HBe的聚苯乙烯塑料小球,所以不需要再作包被处理。

(2)取200微升标本血清加入试剂盒提供的反应池中,每次试验应用时设二个阳性对照及三个阴性对照。然后在每个反应池中小心加入一个包被好的塑料小球,加盖后室温(15~30℃)置20小时左右(±2小时)。

(3)吸去血清后用蒸馏水洗涤小球三次。

(4)在每个反应池中加200微升HRP-抗HBe,加盖后在40℃中孵育2小时。在这次孵育的最后5~10分钟配制OPD液。试剂盒中提供的OPD片每片可配制5ml液体供15个反应池用。(注意:取OPD片时不能使用金属镊子夹取)。

(5)吸去HRP-抗-HBe,用蒸馏水洗涤小球3次后立即将小球移置洁净的分析管中,每管加入OPD液300微升,另外用2个洁净空分析管加入等量OPD液作对照。置室温(15~30℃)30分钟后各管加入1ml 1N H₂SO₄终止反应。