DOI:10.16016/j.1000-5404.1983.04.005

急性乙型病毒性肝炎血清中HBsAg/IgM复合物检测的初步报告

李奇芬 李巧芝 吴纯清 叶宝珍

（第一附属医院 传染科）

摘 要

本文初步报告用国内较易推广的ELISA法检测急性乙型病毒性肝炎血清中HBsAg/IgM复合物的结果。简要介绍实验方法。系列检测35例乙肝患者的标本（包括急肝29例，急性亚急性重症2例，慢活肝4例），全部被检患者均于入院后1～2周内检测到HBsAg/IgM复合物，24例急肝痊愈者（包括随访3～6月以上的10例）都在住院的4周内转阴，远较血清HBsAg和其他生化指标恢复为早；5例有慢性倾向的急肝和亚急性重症及慢活肝患者的HBsAg/IgM复合物迟迟不消失，甚至长达半年以上。28例正常人群全阴性。结合文献初步讨论本实验的临床意义，认为本实验不但可早期判断急性乙肝患者的转归，而且还可考虑作为确定乙肝现症患者的指征。

为了尽早地判断急性乙型病毒性肝炎的预后，1981年Palla[1]介绍了一种能早在住院第四周就可预测患者转归的方法——血清HBsAg/IgM复合物的测定。Palla等是用RIA法来进行这项检测的。为使HBsAg/IgM复合物的检测能在国内推广应用，我们采用了无需特殊仪器、方法简单、敏感性和特异性均较高的ELISA法，获得较为满意的结果。现将该实验方法和我们初步用于临床的结果报告于后。

对 象

乙型病毒性肝炎35例。其中急性29例，亚急性重症2例，慢性活动性4例（诊断标准参照1978年杭州会议制定的方案，后两类患者并经肝活检证实。）。全部系本科1982年9月以来住院患者。多数于入院时静脉抽血留标本一次，以后每周一次留检系列标本至出院。少数患者出院后一月、三月、半年来院随访并留验标本。血标本经分离后于－20℃保存。

健康体检者28例。系同期×工厂体检正常的职工。血清HBsAg和抗HBc均阴性。

所有肝炎患者的每份标本，都做了以下几项与乙肝抗原有关的血清指标：（1）HBsAg（ELISA双抗夹心法，试剂由成都生研所赠送，原倍血清检测，酶标光度计测O.D值，P/N值≥2.1为阳性。同时用上海生研所提供的试剂作R-PHA法）。（2）抗HBs（PHA法，上海医化所试剂，每份标本同时做吸收试验，≥2^3判为阳性）。（3）抗HBc（ELISA竞争抑制法。试剂由上海市传染病院提供，并参照该院方法检测）。（4）抗HBc-IgM（ELISA法，抗μ链抗体系成都生研所提供，核心抗原和酶-抗HBc系上海市传染病院免疫室提供并参照该室介绍的ELISA法，≥10^4为阳性）。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.ne

材料和试剂

GXM-201型酶标光度计（四川分析仪器厂产）。

聚苯乙稀微量滴定板（四川分析仪器厂用美国DOW厂生产的原料压制而成）。使用前用2%洗衣粉溶液浸泡12小时，洗净、蒸馏水冲洗、晾干。

纯抗IgM抗体（成都生物制品研究所提供）羊抗人IgM血清先经硫酸铵盐析，再过DEAE-32纤维素柱提取IgG。蛋白含量为55mg/ml，效价1:64（ID）。

酶—抗HBs（成都生物制品研究所提供）使用浓度1:800。

包被缓冲液：pH9.6，0.01M碳酸钠-碳酸氢钠溶液（简称C.B），Na_2CO_3 1.59克，$NaHCO_3$ 2.93克，加水至1000ml，4℃保存。

Tris-HCl缓冲液（洗涤液）：0.2M Tris 250ml，0.1M HCl 375ml，加水至1000ml。

1%牛血清白蛋白：牛血清白蛋白100mg＋C·B缓冲液10ml。

PBS-T（含0.1%牛血清白蛋白）作为稀释液：NaCl 8克，KH_2PO_4 0.2克，KCl 0.2克，$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 2.9克，$Tween_{20}$ 0.5ml，加水至1000ml，4℃保存。使用前加1:100牛血清白蛋白。

邻苯二胺底物溶液：邻苯二胺10mg溶于24ml磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液（pH5.0）中。使用前加入3%H_2O_2 0.12ml。

磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液：0.2M Na_2HPO_4 25.7ml，0.1M柠檬酸24.3ml，水50ml。

终止剂：2 M H_2SO_4。

方　法

1. 包被抗IgM：纯抗IgM抗体按100μg/ml的浓度用C.B稀释后，加入微孔板的孔内，每孔0.1ml，4℃，24小时。

2. 封底：倾去包被液，每孔加入0.1ml 1%牛血清白蛋白。4℃，过夜。

3. 洗涤：倾去孔内溶液，用洗涤液灌洗微孔3次，每次保留5分钟，甩干。

4. 加被检血清：标本用稀释液按1:100进行稀释，每份标本加两孔，每孔0.1ml，每块微孔板均设阳性、阴性及空白对照孔。4℃、48小时或37℃、4小时。

5. 重复第3步：洗去多余血清。

6. 加入标记抗体：酶-抗HBs用稀释液稀释后，每孔0.1ml，43℃，1小时。

7. 重复第3步：洗去过多酶标记抗体。

8. 加入底物系统：每孔0.2ml，37℃，30′。

9. 每孔加2M H_2SO_4一滴，终止反应。

10. 测O.D值（光紧度490nm）。

11. 判读结果：P/N值≥2.1为阳性，<2.1为阴性（P代表被检标本O·D值，N为阴性对照O·D值）。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.ne

结　　果

1．抗IgM最适包被浓度　纯抗IgM抗体按100μg/ml、50μg/ml、25μg/ml、12.5μg/ml、6.25μg/ml稀释后包被微孔，用已知阳性（慢活肝）和阴性（正常人）血清滴方阵进行测定。结果阳性标本在包被抗IgM抗体25μg/ml以上的各孔的P/N值都大于2.1。但以100μg/ml之值最高，平均O.D值＞0.8，P/N值＞7；而阴性标本的O.D值都＜0.1，P/N值＜2.1。

2．健康体检者　28例健康体检者的HBsAg/IgM复合物的P/N值全部小于2.1，都为阴性。

3．急性乙肝患者　经临床和实验室确诊的急性乙肝患者29例，于入院后1～2周内检测HBsAg/IgM复合物，其P/N值≥2.1，都为阳性。系统观察血清中HBsAg/IgM复合物的消长和临床表现的关系，发现24例临床痊愈患者的HBsAg/IgM复合物都在入院第四周以前（平均20.75天）转为阴性，其转阴时间远较HB_sAg消失时间和其它生化指标恢复到正常为早（临床痊愈时间平均为33.4天）。而另外5例临床有慢性倾向的急性肝炎患者，其HBsAg/IgM复合物在血清中可检测到的时间，都超过了住院的第四周，持续阳性达3～6月以上。

4．亚急性重症和慢活肝　2例亚急性重症肝炎和4例慢性活动性肝炎的HBsAg/IgM复合物的表现和有慢性倾向的急性肝炎相似，都是长期阳性，超过住院四周以上。

5．HBV指标阴性的急肝标本5份，在加入微孔，4℃，48小时后，再与纯HBsAg共孵其P/N值未见增高，结果仍为阴性。

6．典型病例　介绍两例不同转归的急肝患者的HBsAg/IgM复合物的变化和临床生化改变以及其它抗原系统的消长情况（表1）。

表1　典　型　病　例

			例1	女	性，	23	岁，	急肝→自限			
				主诉：	乏力9天、		纳差、	厌油、	眼黄6天		
HBsAg/IgM复合物	(+)	(+)	/	/	(−)	(−)	(−)	(−)			
HBsAg	(+)	(+)	/	/	(+)	(+)	(+)	(−)	(−)	(−)	
抗HBc	(+)	(+)	/	/	(+)	(+)	(+)	(+)			
抗HBc-IgM	(+)	(+)	/	/	(+)	(+)	(+)	(+)			
SB(mg/dl)	2.2	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	
SGPT(m/dl)	290	158	54	＜40	＜40	＜40	＜40	＜40	＜40	＜40	
住院日(W)	0	1	2	3	4	6	10	14	24	36	
			例2	男性，	26岁，	急肝→HBsAg携带者					
				主诉：	乏力、	纳差、	尿黄5天				
HBsAg/IgM复合物	(+)	(+)	(+)	/	/	(+)	(+)	(+)	/	/	(+)	(−)
HBsAg	(+)	(+)	(+)	/	/	(+)	(+)	(+)	/	/	(+)	(+)
抗HBc	(−)	(−)	(−)	/	/	(−)	(−)	(−)	/	/	(−)	(−)
抗HBc-IgM	(+)	(+)	(+)	/	/	(+)	(+)	(+)	/	/	(+)	(+)
SB(mg/dl)	4.0	4.4	4.1	2.3	1.8	1.5	1.2	(−)	1.1	(−)	(−)	(−)
SGPT(m/dl)	570	119	80	178	290	100	58	42	＜40	＜40	＜40	＜43
住院日(W)	0	1	2	3	4	6	8	9	10		24	36

附随访在三个月以上，观察较系统的21例患者的各项实验指标及转归（见附表2）。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.ne

附表：21例乙肝患者各项实验指标及转归

病例	诊断	病程(天)	HBsAg/IgM 复合物检测时间(周) 0	1	2	3	4	8	12	16	20	24	>24	HBsAg 首次	HBsAg 末次	抗HBc(总) 首次	抗HBc(总) 末次	抗HBc-IgM 首次	抗HBc-IgM 末次	抗HBs (恢复期)	转归
周××	AH	7	(+)	…	(+)	(−)	(−)	(−)	…	(−)				1:16	(−)	(+)	(+)	(+)	(+)	(−)	痊愈
邱××	AH	7	(+)	…	(−)	(−)	…	…	(−)	…	…	…	(−)	1:64	(−)	(−)	(−)	(+)	(−)	1: 8	痊愈
叶××	AH	9	(+)	(+)	…	…	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)			1:64	(−)	(+)	(+)	(+)	(+)	(−)	痊愈
张××	AH	5	(+)	…	(+)	…	…	(−)	…	…	(−)	…	(−)	1:16	(−)	(−)	(+)	(+)	(−)	1:16	痊愈
顾××	AH	9	…	(+)	(+)	(−)	(−)	(−)	(−)					1:16	(−)	(+)	(+)	(+)	(+)	(−)	痊愈
李××	AH	9	…	(+)	…	(+)	(−)	(−)	…	…	…	…	(−)	1: 8	(−)	(+)	(+)	(+)	(−)	(−)	痊愈
魏××	AH	2	…	(+)	(−)	…	(−)	(−)	…	…	…	…	(−)	1:64	(−)	(−)	(−)	(+)	(−)	1: 8	痊愈
王××	AH	15	…	(+)	(+)	(−)	…	…	…	…	(−)			1: 8	(−)	(−)	(+)	(+)	(−)	1:16	痊愈
高××	AH	9	…	…	(+)	(−)	(−)	…	(−)					1:64	(−)*	(+)	…	(+)	(+)	(−)	痊愈
殷××	AH	9	(−)	(+)	(−)	(+)	(−)	…	…	…	…	…	(−)	(−)*	(−)	(+)	…	(+)	(+)	(−)	痊愈
梁××	AH	5	(+)	(+)	(+)	…	…	(+)	(+)	…	…	…	(+)	1:16	(−)*	(−)	(−)	(+)	(+)	1:8	慢性倾向
彭××	AH	8	…	…	…	…	(+)	(+)	…	(+)				1:64	(−)*	(+)	(+)	(+)	(+)	(−)	慢性倾向
夏××	AH	5	(−)	…	(+)	(+)	…	…	(+)	…	…	(+)		1:16	(−)*	(+)	(+)	(+)	(+)	(−)	慢性倾向
罗××	AH	75	(−)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	…	(+)	…	…	(+)	1:16	(−)*	(+)	(+)	(−)	(+)	(−)	慢性倾向
王××	AH	60	(−)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	…	…	…	…	(+)	1:32	(+)	(+)	(+)	(−)	(+)	(−)	慢性倾向
李××	SFH	22	(+)	…	…	(+)	…	(+)						1:32	1:32	(+)	(+)	(+)	(+)	(−)	未愈
方××	SFH	18	…	…	…	…	(+)	(+)	(+)					1:16	1:8	(+)	(+)	(+)	(+)	1:8	稳定
庄××	CAH	30+	(+)	…	…	(+)	(+)	(+)	…	(+)	(+)	(−)	(+)	1:64	1:64	(+)	(+)	(+)	(+)	(−)	未愈
孙××	CAH	30+	…	…	(+)	(+)	…	(+)	(−)	(+)	(+)			1:64	1:64	(+)	…	(+)	(+)	(−)	复发
黄××	CAH	2	…	…	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(−)			1:64	1:16	(+)	(+)	…	…	1:16	稳定
李××	CAH	20	…	…	…	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(−)			1:32	(−)*	(+)	(+)			1:16	稳定

注：各项实验阳性标准的血清稀释度，　抗HBc＜10^{-2}，　抗HBc-IgM＜10^{-4}

* ELISA法为阳性

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

讨　论

血清HBsAg/IgM复合物的检出和HBV感染的关系很密切。Toti[2]报告94例的急性乙肝患者，均于入院后一周内测到HBsAg/IgM复合物，而急性非乙肝患者的血清与包被抗IgM小株共同孵育后，即使再和纯HBsAg共孵，亦未获阳性结果。我们改用ELISA法对29例临床诊断为急性乙肝患者进行该项检查，得到同样结果，全部患者血清HBsAg/IgM都在入院后1～2周内转为阳性（平均8.2天），而无HBV感染指标的血清标本却是阴性。28例正常健康体检者的标本也是阴性结果。虽然到目前为止所测的HBsAg/IgM复合物是否就是反映血清HBsAg和抗HBs-IgM之间的循环免疫复合物？尚不能肯定。但它对HBV感染的这种特异现象，却对目前乙肝的诊断大有俾益。

首先，血清HBsAg/IgM复合物的测定，能较早地判断急性乙肝的转归[1][2][3]。这是该实验的最大优点，它能早在患者住院的第四周就可判断急性乙肝的预后，是痊愈?或是转为慢性。文献中和我们观察到的大多数自限性急性乙肝患者，HBsAg/IgM复合物不但出现很早，消失也快，多不超过住院三周，即在其他临床指标尚未恢复的时候，它就已消失。而那些有可能转为慢性的患者（Toti[2]观察到13例，我们的材料中也有5例），其HBsAg/IgM复合物在住院的第四周仍为阳性，并持续3～6月以上。这些患者的其它临床指标亦久久不恢复，随访中均可观察到转为慢性肝炎的迹象。

对于早期判断乙肝转归的实验检查，目前虽已有一些方法，如特异性DNA-多聚酶、HBV-DNA、HBeAg[4]以及抗HBc-IgM[5]等，但多存在一些实际问题[6]。DNA-多聚酶和HBV-DNA只能在少数研究室中进行，对于大多数的实验室，目前尚无检测的条件；HBeAg国内现在的方法，敏感性尚不理想；抗HBc-IgM则要在半年以上才能确定是否转为慢性，而检测血清HBsAg/IgM复合物，却能在急性乙肝患者住院的第四周，就可预测其转归；改用ELISA法进行该项实验，方法亦较简便，是临床早期判断乙肝预后的一种较为理想的实验方法。

其次，HBsAg/IgM复合物还可考虑作为确定急性乙肝现症患者的指标。如前所述，全部乙肝患者的HBsAg/IgM复合物都在住院后短期内出现阳性，非乙型的急性肝炎，即使HBsAg阳性（HBsAg携带者），其HBsAg/IgM复合物亦始终阴性。Toti曾对15例罹患其它类型急肝（甲型5例，δ型6例，非甲非乙4例）而又携带HBsAg的患者做了HBsAg/IgM复合物的检查，除有一例甲肝出现阳性结果外，其余均为阴性，说明HBsAg/IgM复合物和乙肝现症患者的密切关系。这一点，为临床上对急性乙肝患者和HBsAg携带者又罹患了其它类型病毒的急性肝炎患者的鉴别提供了切实可行的检测方法。只要血清中查到HBsAg/IgM复合物，就可考虑其为乙肝现症患者。此法较抗HBc-IgM不但更具特异性（只限于现症患者），而且方法简单，试剂来源亦较易。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.ne

参 考 文 献

1. Palla M, et al: Ital J of Gastroent 13:223,1981
2. Toti M, et al:J of Med Virol 11:139,1983
3. Careoda F, et al:Lancet 2:358,1982
4. Bonino F, et al: Hepatol 5:386,1981
5. Lemon SM, et al:J Infect Dis 143:803,1981
6. 大连会议座谈纪要：中华内科杂志，1：1，1983

Detection of HBsAg-IgM Complex in Serum of Patients with Viral Hepatitis B —A Preliminary Report

Li Qifen, Li Qiaozhi, Wu chunqing, Ye Baozheng

(Department of Infections Diseases, First Teaching Hospitai, The Third Military Medical College)

This paper is to report the result of using ELISA to detect HBsAg-IgM complex in the serum of patients with viral hepatitis B. A series of serum samples of 35 patients,including 29 acute,2 subacute severe and 4 chronic active cases were tested. 28 normal individuals were also tested as control.

HBsAg-IgM complex was discovered in the sera of all the patients in the first one or two weeks of hospitalization. It disappeared from the sera of 24 patients (among whom 10 have been followed up for more than 3 to 6 months) who recovered completely after 4 weeks of treatment. The disappearance of the complex occurred long before the clearance of HBsAg and the returning to normal levels of other biochemical parameters. In 5 cases of acute hepatitis with the tendency to be chronic and in those subacute and chronic cases,HBsAg-IgM complex delayed to disappear and could be found in the sera even 6 months later. All the normal controls were negative.

It is suggested that the detection of HBsAg-IgM complex in the serum of hepatitis B patient may be used not only as a criterion to evaluate the prognosis of acute cases but also as an index to determine whether the patient is suffering an active disease process.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.ne