

前 言

病毒性肝炎是危害广大劳动人民健康的常见病、多发病，近年来其发病率不断上升，其中乙型肝炎患病率上升尤为突出，因此，如何采取积极有效的措施，尽快的治愈现症患者，预防新发病例，降低发病率，是肝炎防治工作中的重要课题。

为了在我国广大城乡基层医疗机构和防疫机构推广普及乙型肝炎抗原的检验技术，我们编写了这本《乙型肝炎抗原检验》（手册），并结合作者工作中的体会对乙型肝炎抗原的检验技术，予以详尽叙述，讨论在各种实验室条件下，如何选择最适用的方法。并且从实验操作的步骤方面，着重说明可能导致的误差，阐明不准确性的原因及避免的方法，强调证实阳性试验结果的重要性。

这本手册承河南省卫生局防疫处和河南省生物制品研究所领导的支持，并请河南医学院肝炎研究组的部分同志和买凯医师、甘肃省人民医院、中山医学院《病毒性肝炎》编写小组审阅。绘图由徐雅芬同志协助。在此一一致谢。

由于我们水平有限，在编写过程中遗误之处，在所难免，请读者提出宝贵意见，供我们修改、提高。使手册在实现四个现代化的宏伟目标中为我国的医药卫生事业起到一砖一瓦的作用。

刘锡

冯 坚（郑州市第五人民医院）

1978.12.13.

目 录

第一章 概 述	(1)
第一节 命名	(3)
第二节 乙型肝炎抗原的物理化学性质.....	(5)
一、乙型肝炎表面抗原.....	(6)
二、乙型肝炎核心抗原.....	(7)
三、乙型肝炎“e”抗原.....	(8)
第三节 乙型肝炎抗原检测的临床意义.....	(8)
一、检测HBsAg的临床意义.....	(10)
二、检测HBcAg/抗-HBc的临床意义	(16)
三、检测HBeAg/抗-HBe的临床意义	(18)
第二章 乙型肝炎实验室的安全措施, 标本的采集 与实验室的操作和处理	(20)
一、能引起肝炎的实验室操作(按其潜在危险 大小依次列出).....	(21)
二、一般安全措施与实验卫生.....	(21)
三、标本的采集和处理办法.....	(22)
四、专门预防措施.....	(23)
五、易感染人员的安全防护.....	(24)
第三章 实验准备	(26)
一、各种检验方法的比较.....	(26)

二、检验方法的选择.....	(32)
三、HBsAg和抗-HBs试剂的获得.....	(33)
四、HBsAg和抗-HBs的贮藏和保存.....	(35)
第四章 浓缩血清以提高乙型肝炎抗原检出的	
灵敏度.....	(37)
一、聚丙烯酰胺凝胶浓缩.....	(37)
二、膜过滤.....	(40)
三、聚乙二醇浓缩.....	(41)
第五章 琼脂扩散.....	(43)
第一节 乙型肝炎表面抗原、抗体的检测.....	(43)
仪器和材料.....	(43)
注意事项.....	(45)
操作程序.....	(45)
说 明.....	(47)
讨 论.....	(48)
第二节 乙型肝炎抗原亚型的检测.....	(50)
仪器和材料.....	(51)
操作程序.....	(51)
注意事项.....	(53)
说 明.....	(53)
第三节 HBeAg和抗-HBe的检测.....	(55)
仪器和材料.....	(57)
注意事项.....	(58)
操作程序.....	(59)
说 明.....	(62)

第六章 液流泳	(64)
第一节 Peters法.....	(64)
仪器和材料.....	(65)
注意事项	(66)
操作程序	(66)
说 明	(68)
第二节 浙江人民卫生实验院法.....	(70)
仪器和材料.....	(70)
操作程序.....	(71)
说 明	(72)
第七章 对流电泳	(73)
第一节 对流电泳法.....	(73)
仪器和材料.....	(73)
注意事项.....	(75)
操作程序.....	(75)
说 明	(77)
第二节 Ashcavai 法.....	(79)
仪器和材料.....	(80)
注意事项.....	(82)
操作程序.....	(84)
说 明	(87)
讨 论.....	(87)
第三节 对流电泳的新技术.....	(88)
一、对流电泳的改进.....	(88)
二、应用对流电泳法检测HBeAg	

/抗-HBe	(89)
第四节 乙电池对流电泳	(90)
仪器和材料	(90)
注意事项	(93)
操作程序	(93)
说 明	(93)
第八章 补体结合试验	(95)
第一节 手控法	(95)
仪器和材料	(95)
实验试剂	(97)
操作程序	(98)
说 明	(110)
第二节 小量补体结合试验	(110)
仪器和材料	(110)
注意事项	(112)
操作程序	(112)
说 明	(117)
第九章 血凝和血凝抑制试验	(120)
第一节 被动血球凝集试验	(120)
仪器和材料	(120)
操作程序	(122)
注意事项	(124)
第二节 改良的 Vyas 法	(128)
仪器和材料	(128)
注意事项	(131)

操作程序·····	(131)
说 明·····	(134)
讨 论·····	(135)
第三节 简易被动血凝试验·····	(137)
试剂配制·····	(137)
操作步骤·····	(138)
第四节 被动血凝试验检测乙型肝炎核心抗体 ·····	(139)
方 法·····	(139)
结 果·····	(141)
第十章 反向被动血凝试验 ·····	(143)
第一节 上海第六人民医院检验组法·····	(143)
仪器和材料·····	(143)
注意事项·····	(145)
操作程序·····	(146)
说 明·····	(149)
第二节 大河内法·····	(149)
仪器和材料·····	(150)
注意事项·····	(151)
操作程序·····	(151)
说 明·····	(154)
讨 论·····	(155)
第三节 简化的反向被动血凝试验·····	(156)
试剂的配制·····	(156)
操作步骤·····	(157)

结果判定.....	(158)
第十一章 放射免疫测定.....	(162)
第一节 乙型肝炎抗原免疫放射自显影.....	(162)
仪器和材料.....	(163)
¹²⁵ 碘抗-HBs 的制备、分离和鉴定.....	(164)
操作程序.....	(166)
说 明.....	(168)
讨 论.....	(169)
第二节 用 ¹²⁵ 碘标记抗原的方法.....	(171)
第三节 用 ¹²⁵ 碘标记抗体的方法.....	(172)
仪器和材料.....	(172)
注意事项.....	(173)
操作程序.....	(175)
说 明.....	(178)
讨 论.....	(179)
第四节 新近发展的技术.....	(183)
(一) Prince改良法.....	(183)
(二) RIA检测乙型肝炎抗原亚型.....	(184)
(三) 乙型肝炎e抗原(HBeAg)放射免 疫自显影检测法.....	(184)
第十二章 免疫粘附血球凝集试验.....	(188)
仪器和材料.....	(189)
注意事项.....	(191)
操作程序.....	(192)
一、改进法.....	(192)

二、DTT法	(195)
说明	(198)
第十三章 酶免疫测定法用于病毒性疾病	
的诊断	(204)
一、材料	(204)
二、方法	(206)
三、在病毒性疾病诊断上的应用	(209)
四、几个问题	(212)
第十四章 乙型肝炎免疫复合物的检测	(216)
第一节 免疫复合物的理化性质	(216)
第二节 检测免疫复合物的临床意义	(218)
第三节 PEG 环状沉淀试验检测乙型肝炎循环免疫复合物(CIC)	(219)
附录一、名词解释	(224)
附录二、实验室常用略语的英汉对照	(229)
附录三、乙型肝炎病毒实验室的主要仪器(组织培养实验室除外)	(233)
附录四、乙型肝炎病毒实验室的常用化学药品(组织培养实验室除外)	(235)
附录五、常用酸、碱当量溶液的配制和溶液稀释之算法	(239)

第 一 章

概 述

病毒性肝炎系由三种不同的肝炎病毒所引起，是一种以肝脏损害为主的全身性急性传染病。以乏力、食欲不振、发热开始，继有肝脏肿大疼痛、部分病例出现黄疸。迄今所知，病毒性肝炎有三型，分别由独特的嗜肝性病毒所致：

1. 甲型肝炎(下称甲肝)由甲型肝炎病毒(HAV)引起；2. 乙型肝炎(下称乙肝)由乙型肝炎病毒(HBV)引起；3. 非甲非乙型肝炎，由一种或数种与甲型和乙型肝炎病毒都无关的病毒所致。虽然有多种病毒如黄热病病毒、单纯疱疹病毒、风疹病毒、巨细胞性病毒、E-B病毒等，都可引起肝脏炎症，但这类病毒所致的肝炎，不包括在病毒性肝炎这个特定范围内。

对病毒性肝炎的认识虽然有悠久的历史，但在四十年代以前，限于科学技术水平，对它的了解很肤浅，尤其对有关的基本概念、分类、病原学、发病机理、流行病学等的认识含糊不清，以致妨碍了临床诊断和防治方面的进展。近三十余年来人们对该病的认识有了明显的改观，第二次世界大战期间，就已知至少有两种独特的病毒性肝炎，两者的潜伏期长短与主要传播方式均不相同；一种类型的急性肝炎常可造成流行(当时称为“流行性肝炎”)，粪——口途径是

其主要传播方式，其潜伏期较短，通常为4~6周；另一型急性肝炎，常呈散发，经肠胃肠道外途径是其主要传播方式，其潜伏期较长，通常为6周~6个月（曾被称为“注射器黄疸”“同种血清性黄疸”“血清性肝炎”）。1963年Blumberg偶然发现一名曾经接受过多次输血的血友病患者和一个与其完全无关的澳大利亚土著人的血清在Ouchterlony扩散试板上，形成免疫沉淀线，当时他不理解此血友病患者血清中有什么（抗体）物质，可以和该澳大利亚土著人血清内的（抗原）物质发生反应。遂将此种抗原命名为“澳大利亚抗原”，此后，陆续有人证实在“血清性肝炎”的潜伏期和早期，以及少数貌似健康的人血清中，均可检出此种抗原，现已证实澳大利亚抗原就是乙型肝炎抗原。1970年Dane首先在电镜下观察到乙型肝炎病人血清中，有外径约为42毫微米、核心直径约为26毫微米的双壳病毒样颗粒。1972年Magnius发现了第三种抗原系统，称为e抗原、抗体系统。1973年Feinstone从甲型肝炎早期患者的粪便中，首先观察到甲型肝炎病毒，此种病毒颗粒直径为27毫微米，没有外壳。这一系列的发现，导致对此种感染的流行病学、免疫病理学及临床特点认识上的飞跃发展。由于病毒性肝炎特异性诊断的进步，又发现了一种新的，与甲型和乙型病毒感染无关的一型肝炎，当前在国外某些地区，此种新型肝炎，在输血后肝炎中占有很高的比例。此外，似为引起散在的成人肝炎患者的一个重要原因。此种新型肝炎病毒的抗原性与上述两型者无关，多数人同意暂命名为“非甲非乙型肝炎”。

综上所述，可知在三型病毒性肝炎中，以乙肝的研究进展最快，积累的经验亦较丰富，乙肝的特异性诊断技术已在国内逐步普及，甲肝的检测技术尚待推广普及，故只概括简要介绍。此外，由于目前尚缺乏非甲非乙型肝炎病毒的血清学和病毒学鉴定标准，故本手册以下各章主要介绍和阐述与乙肝有关的实验室诊断技术。

第一节 命名

由于对肝炎病毒和抗原有了进一步的了解，加上很多实验室新的发现，1977年联合国世界卫生组织专家委员会修改了肝炎病毒与抗原的命名。

一、甲型肝炎病毒（HAV）：系立体对称性的25~28毫微米的小病毒。和其他同样大小的病毒一样，有呈空心的，也有呈实心的颗粒。通过免疫电镜均能鉴定出这两种颗粒。甲型肝炎病毒的其他血清学试验包括：补体结合、免疫粘连血凝和放射免疫测定等法。

二、乙型肝炎病毒（HBV）：系一种42毫微米的双层外壳的病毒，原称为Dane颗粒。

乙型肝炎表面抗原（HBsAg）：见于乙型肝炎病毒的表面，以及伴随出现的球形（22毫微米）与管形颗粒上的乙型肝炎抗原。

乙型肝炎核心抗原（HBcAg）：见于病毒核心内的乙型肝炎抗原。

乙型肝炎e抗原（简称e抗原，HBeAg）：与乙型肝炎

感染密切相关。

三、抗肝炎病毒的抗体

抗-HAV 抗甲型肝炎病毒的抗体。

抗-HBs 抗乙型肝炎表面抗原的抗体。

抗-HBc 抗乙型肝炎核心抗原的抗体。

抗-HBe 抗e抗原的抗体。

乙型肝炎表面抗原的亚决定簇

HBsAg携带一个共同的决定簇a和若干主要的亚决定簇，它具有病毒基因的密码。以适当试剂用免疫扩散试验，从“分枝”的形成中可显示亚决定簇。现已知道有8种不同的亚型和2种混合亚型，这是由各种亚决定簇d, y, w和r等联合组成。另外，原认为与共同决定簇a有关的其他变异，现认为用w特异性的变异来标示更为妥当，因它们均表现为r的等位基因。10种类型如下：

ayw 1 (a ₁ yw)	adw 2 (a ₂ ¹ dw)
ayw 2 (a ₂ ¹ yw)	adw 4 (a ₃ dw)
ayw 3 (a ₂ ² yw)	adr
ayw 4 (a ₃ yw)	adyw
ayr	adyr

主要的亚决定簇似表示它们包括2个等位基因组：一组为d和y，另一组是w₁、w₂、w₃、w₄和r。但这些系统大概并非独立，因w（发现同y在一起的）的4个变异型中，只发现有2个是和d在一起的。2个混合亚型类别是罕见的，可能是同时感染一种以上亚型的HBsAg的病毒时，由决定簇的表现型或基因型混合所造成。

其他的表面抗原反应物如：q、x、f、t、j、n和g等也有报道。但尚无这些反应物之间的必要的血清学对比。

乙型肝炎e抗原的亚决定簇

已鉴定出两种抗原，称为HBeAg/1和HBeAg/2。

其它肝炎病毒

已识别的一种新型肝炎，在临床上与甲型或乙型肝炎无区别，但其抗原性与上述两型者无关。目前在一些地区，这一型肝炎是输血后所发生的、最常见的型别。

第二节 乙型肝炎抗原的理化性质

乙型肝炎病毒（HBV）在人体血循环中，能观察到的颗粒至少可分为三类：1.小的多形性颗粒，直径平均为22毫微米；2.长短及形态不一的管状形；3.乙型肝炎病毒本身一大的（42毫微米）双层外壳球形颗粒。HBV颗粒可呈实心或部分实心的、也可呈空心的，能分为核心和外壳两个部分。

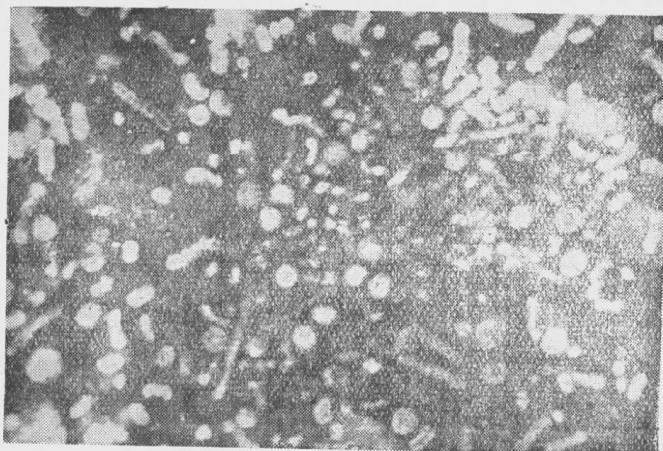


图 1~1 在电镜下HBsAg阳性乙型肝炎患者血清中存在的三类颗粒：小球形为22毫微米；长短及形态不一的管状形；Dane颗粒，42毫微米，为乙型肝炎病毒。

（河南医学院肝炎研究组提供）

一、乙型肝炎表面抗原

乙型肝炎表面抗原为圆形，直径19~22毫微米，由多种亚单位组成。电镜视野中分散的20毫微米颗粒制备物呈管形，其直径相同，但纵轴直径长数倍。HBsAg密度梯度分离显示颗粒在氯化铯中的密度为1.20克/毫升时，聚结在电场中的HBsAg，随 α_2 球蛋白一起移动，电泳的泳动度有某些异质性。平均沉降系数（在20℃水中）为33~54S，分子量为240~300万达尔顿（daltoni），脂质的含量可占其总重量的30%。

用有机溶剂和解离试剂处理纯化HBsAg的研究显示，经二乙基乙醚，1:1氯仿-尿素，十二烷基硫酸钠和各种溶蛋白酶的处理后，HBsAg的抗原活性仍相当稳定。但经乙醇和丁醇处理后，导致抗原活性完全消失。HBsAg在酸性PH下培育数小时仍保持稳定，用含有0.02%胃蛋白酶，0.02 N之HCl，(PH2.3)作5倍稀释处理后，可产生不杂有正常血清蛋白的抗原。这种制剂适宜于免疫家兔和豚鼠。还发现，先用十二烷基硫酸钠或二乙基乙醚处理，可增加抗原对溶蛋白酶的易感性。

HBsAg耐热，纯化抗原加热至60℃10个小时，抗原活性并无丧失，虽然加热至100℃5分钟，仅完全消除其对抗体的亲和力。HBsAg在85℃下培育60分钟，其抗原活性完

全丧失。共同抗原决定簇a在60℃下能保持稳定达21小时。

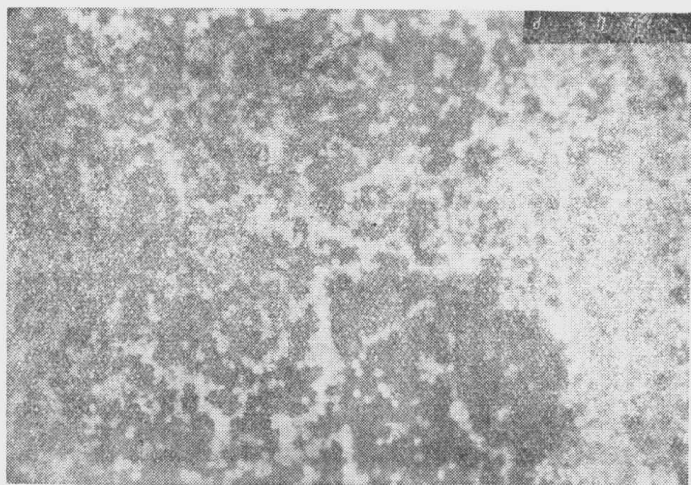


图 1~2 经提纯的HBsAg 电镜下仅见22毫微米的小球体

(北京医学院附属人民医院提供)

二、乙型肝炎核心抗原

Dane发现的一型病毒颗粒，直径约42毫微米，含有约28毫微米直径的内部小体，具有20面体对称性。Moritsugu等发现从Dane颗粒得到的核心的密度为1.34~1.36克/毫升。从猩猩肝所得核心颗粒的密度为1.30~1.33克/毫升。等电点为PH4.0，沉降系数为124S，分子量为850~900万。多肽结构与HBsAg有一些相同之处，只有三个多肽，其分子量分别为8.8万、7.9万、5.9万，是核心颗粒特有的。

三、乙型肝炎“e”抗原

e抗原不是HBsAg颗粒的表面组成成份，它既不同于已知的表面抗原决定簇a、d、y、w、r，也不同于HBcAg。它的体积比HBsAg小，沉降系数为 11.6 ± 0.6 ，分子量约为300,000。e抗原的漂浮密度为1.28克/厘米³，等电点为P 5.5。e沉淀不被苏丹黑B但易被考马斯亮兰染色，它不是脂蛋白，而是一种可溶性非颗粒性抗原。e抗原不稳定，不耐热，于37℃下10天丧失其活性，加热至56℃耐受2~3小时，若将e抗原阳性血清加热至60℃10~15分钟，其抗原性迅速被破坏，污染血清中e的抗原性迅速消失，但在-20℃或4℃贮存23年的血清仍具有抗原性。目前对e抗原的本质尚不完全了解，有人认为是病毒作用于宿主的产物。

近期研究结果证明，e抗原是7SIgG的二聚体。由于e和抗e二者都是Ig，所以e抗原/抗e系统，必然是一种抗体/抗、抗体系统。

第三节 乙型肝炎抗原检测的临床意义

乙型肝炎病毒有三个抗原抗体系统，即乙型肝炎表面抗原和抗体，乙型肝炎核心抗原和抗体以及1972年新发现的e抗原和抗体。迄今研究较为充分，积累经验较多者为HBsAg，故本节在讨论乙型肝炎抗原的临床意义时，主要涉及的是HBsAg，另两种抗原仅略加阐述。

病毒性肝炎就其型别而论，甲型与乙型肝炎，无论在临

原 书 缺 页