



临床检验医师必读

王永祥 齐顺祥 王存平 总主编

临床病毒学

检验

刘艳芳 张勇建 苏明◎主编

JBLINCHUANG
BINGDUXUE
IANYAN



军事医学科学出版社

临床检验医师必读

临床病毒学检验

主 编 刘艳芳 张勇建 苏 明

军事医学科学出版社
· 北 京 ·

图书在版编目(CIP)数据

临床病毒学检验/刘艳芳,张勇建,苏明主编.

-北京:军事医学科学出版社,2009.4

(临床检验医师必读)

ISBN 978-7-80245-163-6

I.临 II.①刘… ②张… ③苏… III.病毒学-医学检验 IV.R446.5

中国版本图书馆CIP数据核字(2009)第018764号

出版:军事医学科学出版社

地址:北京市海淀区太平路27号

邮编:100850

联系电话:发行部:(010)66931051,66931049,81858195

编辑部:(010)66931039,66931127,66931038

传真:(010)63801284

网址:<http://www.mmisp.cn>

印装:三河佳星印装有限公司

发行:新华书店

开本:850mm×1168mm 1/32

印张:12

字数:306千字

版次:2009年4月第1版

印次:2009年4月第1次

定价:24.00元

本社图书凡缺、损、倒、脱页者,本社发行部负责调换

前 言

随着基础医学与临床医学的迅速发展,临床检验作为一门辅助学科,如何适应这一发展,及时准确地为临床提供各种实验数据,从而更好地促进临床医学的发展,是我们检验人员一项非常重要的职责。为了适应临床检验学的发展,帮助广大临床检验医师掌握科学的检验方法、技能,提高临床检验水平,我们组织经验丰富的教授、一线专家,编写了这套《临床检验医师必读》。

该丛书在编写设计上,从临床实际出发,根据检验人员理论水平的实际状况,对各种实验的基础部分和临床意义部分介绍得较为详细,以满足检验人员基础素质的提高,适应临床发展的需要。丛书包括:《临床基础检验》、《临床细菌学检验》、《临床病毒学检验》、《临床免疫学检验》、《临床血液学检验》。该丛书是临床检验人员掌握基础检验知识及技能,并了解临床检验学发展的一本重要参考书。

由于编写时间及作者能力所限,文中不足之处在所难免,望读者指正。

编委

2009 - 01 - 12

目 录

绪论	(1)
第一章 病毒学实验的基本要求	(9)
第一节 病毒检验生物安全性及其防护要求	(9)
第二节 病毒学检验操作基本要求	(11)
第三节 病毒学实验室质量控制	(20)
第二章 病毒学检验常用技术	(23)
第一节 光学显微镜技术	(23)
第二节 病毒分离	(30)
第三节 病毒鉴定	(37)
第四节 病毒的滴定及其应用	(43)
第五节 血清学实验	(49)
第六节 病毒快速诊断	(67)
第三章 电子显微镜技术	(74)
第一节 电子显微镜的构造与原理	(74)
第二节 电镜标本制备方法	(79)
第三节 免疫电镜技术	(86)
第四节 电镜技术在病毒检测中的应用	(90)
第四章 细胞培养技术	(92)
第一节 病毒学检验中使用细胞培养的种类	(92)
第二节 体外培养细胞的生物特性	(93)
第三节 用于病毒培养的细胞选择	(99)
第四节 用细胞培养分离病毒	(101)
第五节 原代细胞制备过程	(103)
第六节 传代细胞制备及培养技术	(105)

第七节	细胞的冻存、复苏和运输	(107)
第八节	细胞培养污染与监测	(110)
第九节	细胞培养设备与条件	(114)
第五章	鸡胚培养法	(120)
第一节	概述	(120)
第二节	具材	(122)
第三节	鸡胚的选择与孵育	(122)
第四节	接种与收获	(124)
第六章	动物实验技术	(130)
第一节	实验动物的种类与基本操作方法	(130)
第二节	动物实验在病毒检验中的应用	(139)
第三节	病毒学检验中动物实验的基本步骤	(140)
第四节	病毒学动物实验应注意的问题	(145)
第七章	放射免疫技术	(147)
第八章	免疫荧光技术	(151)
第九章	酶标记免疫技术	(157)
第一节	免疫酶染色试验	(157)
第二节	酶联免疫吸附试验	(163)
第十章	核酸杂交技术	(167)
第一节	基本原理	(167)
第二节	核酸探针的制备	(169)
第三节	Southern 印迹杂交	(176)
第四节	Northern 印迹杂交	(180)
第十一章	聚合酶链反应	(184)
第一节	基本原理	(184)
第二节	PCR 的反应体系及其优化	(185)
第三节	几种常用的 PCR 技术	(191)
第十二章	基因克隆技术	(196)
第一节	基本原理	(196)

第二节	基本步骤	(200)
第三节	技术应用	(211)
第十三章	基因芯片技术	(213)
第一节	基本原理	(213)
第二节	基本步骤	(214)
第三节	基因芯片技术的应用	(218)
第十四章	DNA 序列测定	(221)
第一节	基本原理与技术	(221)
第二节	DNA 测序基本步骤	(225)
第十五章	乳头瘤病毒及其检验	(230)
第一节	病毒的生物学特性	(230)
第二节	临床表现及流行病学特征	(231)
第三节	实验室检查	(232)
第十六章	疱疹病毒及其检验	(234)
第一节	病毒的生物学特性	(234)
第二节	临床表现及流行病学特征	(235)
第三节	实验室检查	(240)
第十七章	小 RNA 病毒及其检验	(246)
第一节	病毒的生物学特性	(246)
第二节	临床表现及流行病学特征	(248)
第三节	实验室检查	(249)
第十八章	嗜肝 DNA 病毒及其检验	(259)
第一节	病毒的生物学特性	(259)
第二节	临床表现及流行病学特征	(261)
第三节	实验室检查	(262)
第十九章	披膜病毒及其检验	(270)
第一节	病毒的生物学特性	(270)
第二节	临床表现及流行病学特征	(271)
第三节	实验室检查	(273)

第二十章 正黏病毒及其检验	(279)
第一节 病毒的生物学特性	(279)
第二节 临床表现及流行病学特征	(280)
第三节 实验室检查	(282)
第二十一章 副黏病毒及其检验	(289)
第一节 病毒的生物学特性	(289)
第二节 临床表现及流行病学特征	(290)
第三节 实验室检查	(294)
第二十二章 呼肠孤病毒及其检验	(300)
第一节 病毒的生物学特性	(300)
第二节 临床表现及流行病学特征	(301)
第三节 实验室检查	(302)
第二十三章 弹状病毒及其检验	(306)
第一节 病毒的生物学特性	(306)
第二节 临床表现及流行病学特征	(307)
第三节 实验室检查	(308)
第二十四章 逆转录病毒及其检验	(312)
第一节 病毒的生物学特性	(312)
第二节 临床表现及流行病学特征	(314)
第三节 HIV-1 实验室检查	(316)
第二十五章 冠状病毒及其检验	(325)
第一节 病毒的生物学特性	(325)
第二节 临床表现及流行病学特征	(327)
第三节 实验室检查	(328)
第二十六章 黄病毒及其检验	(333)
第一节 黄病毒的共同特性	(333)
第二节 登革病毒	(334)
第三节 流行性乙型脑炎病毒	(337)
第四节 丙型肝炎病毒	(340)

第五节	森林脑炎病毒	(344)
第二十七章	布尼亚病毒及其检验	(347)
第一节	病毒的生物学特性	(347)
第二节	病毒的实验室检查	(348)
第三节	肾综合征出血热病毒	(350)
第四节	辛诺柏病毒	(354)
第二十八章	丝状病毒及其检验	(357)
第一节	病毒的生物学特性	(357)
第二节	临床表现及流行病学特征	(358)
第三节	实验室检查	(360)
第二十九章	朊病毒及其检验	(363)
第一节	病毒的理化特性	(363)
第二节	与病毒相关的疾病	(364)
第三节	实验室检查	(367)

绪 论

病毒是活细胞的寄生物,主要寄生于人类、动物、植物、真菌、细菌、放线菌和蓝细菌等各种生物体内。人、动物和植物都会因病毒的感染而发生各种疾病,有些病毒对人类具有较强的感染性和传染性,可在人群中引起病毒性传染病的暴发流行,给人类健康和生命造成巨大危害。另外,近年来分子流行病学研究证明,病毒感染与癌症有密切的联系,如乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒能诱发肝癌等。在 21 世纪,控制病毒性疾病的流行仍然是有待解决的重大公共卫生问题。因此,病毒性疾病的诊断、治疗和预防控制工作,需要一大批掌握现代病毒学理论和病毒学检验技术的高级技术人才,同时也要依靠病毒学检验技术提供科学的实验依据。

病毒学检验(laboratory science of virology)是用实验室检验方法对临床和流行病学现场送检的标本(如人或宿主动物的血液、组织、尿、粪便和组织液等)进行病毒学的定性和定量检测分析,为病毒感染和病毒性疾病的诊断、治疗和预防控制提供科学依据。病毒学检验作为微生物学检验的一个分支,是与基础医学、临床医学以及预防医学密切联系、紧密结合的一门科学。它是以医学病毒学的基本理论为指导,以病毒学基本方法为基础,结合应用免疫学、分子生物学等方法所形成的检验方法学,其目的是解决临床和流行病学中所遇到的病毒性疾病的诊断、治疗及预防控制等方面的问题。

病毒学的发展主要依赖于病毒学检验技术的发明及应用。病毒学(包括分子病毒学)的发展史实际上也反映了病毒学检验技术的发展历程。

(一) 病毒的发现

自古以来,人类一直遭受着病毒性疾病的折磨。公元前1400年古埃及的浮雕像上,一位祭司右腿明显萎缩,说明他曾患过小儿麻痹症。天花是对人类危害最大的病毒性传染病,公元前1160年,古埃及法老拉美西斯五世的木乃伊面部有天花瘢痕。在与病毒性疾病作斗争的过程中,人类逐步认识了预防和控制病毒性疾病的方法。在我国,公元前500年的《左传》一书中曾记载狂犬病流行的史料,说“国人逐瘕狗”,居民逐疯犬,为的是预防狂犬病。早在11世纪宋朝中医就开始用“人痘接种术”来预防天花。18世纪英国的医生爱德华·琴纳(Edward Jenner)发明了“牛痘接种术”,由于这种方法预防天花效果好,副作用小,很快取代了“人痘接种术”。

1683年安东尼·凡·列文虎克(Van Leeuwenhoek A)发明了显微镜,并用显微镜发现了单细胞微生物。显微镜这一新技术的开发和利用,使人类发现和认识了微生物。19世纪后半叶,路易斯·巴斯德(Louis Pasteur)开创了微生物研究的新纪元。罗伯特·科赫(Robert Koch)也对微生物学的发展做出了卓越的贡献。罗伯特·科赫为证明某微生物是否是引起疾病的病原,根据他自己成功分离培养出炭疽杆菌、结核杆菌和霍乱弧菌的研究经历,提出了如下四条准则:①从该病的每个患者都能发现这个病原微生物;②该病原微生物不仅能从患者分离出来,而且能培养出纯品;③用此纯品接种易感动物或人时,能复制出相同的疾病;④从感染的动物身上,能重新分离到该病原微生物。罗伯特·科赫的这四条准则,为以后发现和认识病原微生物确定了最基本的标准和研究思路,至今在验证艾滋病、SARS等新发病毒性疾病的病原方面仍有指导意义。

19世纪中叶,烟草种植业在西方国家迅速发展。1886年,德国农艺化学家迈尔(Adolf Mayer)发现烟草上出现深浅相间的绿色条纹,并且长满了斑点和水泡,将其称之为烟草花叶病。他将患

病的烟草叶汁液注射到健康烟叶中,结果大多数健康烟叶也同样患病,再将患病的烟草叶汁煮沸,感染性就消失,所以他认为烟草花叶病可能是由细菌所致。1892年,俄国植物病理学家伊万诺夫斯基(Ivanowski D)重复了迈尔的实验。但是,他首先用细菌过滤器过滤了患病的烟草叶汁,将滤液涂抹到健康的烟叶上,不久这些烟叶也出现了花叶病。同时他还发现,滤液不能在细菌培养基上培养,显微镜下也未见到滤液中含有任何微生物。伊凡诺夫斯基认为,烟草花叶病的致病因子可能是细菌产生的毒素。1898年,荷兰学者贝杰林克(Martinus Beijerinck)验证了伊凡诺夫斯基的研究工作。根据实验结果,他总结出以下几个特点:①烟草花叶病的致病因子能通过细菌过滤器;②该因子仅能在感染的细胞内繁殖;③这个因子在体外非生命物质中不能生长。贝杰林克认为,烟草花叶病是由比细菌更小且具有传染性的活毒液所致,并给这种活毒液取名为 Contagium Virum Fluidum,即传染性的病原体,后来简称为病毒(virus)。贝杰林克冲破了巴斯德“疾病菌源学说”的框架,建立了病毒的基本概念。

在烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)发现的同年,德国细菌学家 Freidrich Loeffler 和 Paul Frosch 利用细菌过滤器证实了牛羊的口蹄疫病毒(foot and mouth disease virus)的存在。这是人类发现和认识的第一个动物病毒。1915年 Frederick Twort 发现了感染细菌的病毒。1917年 Felizd Herelle 发现了志贺痢疾患者的粪便滤液可以使痢疾杆菌的肉汤培养基变得清澈透明,他把这种裂解因子命名为噬菌体(bacteriophage),奠定了细菌病毒学基础。

(二) 用活的宿主分离病毒技术的应用

贝杰林克对病毒本质的初步认识,促进了研究人员利用活的宿主系统(植物或动物,甚至人作为敏感宿主)来发现和研究病毒。烟草花叶病毒被发现以后,研究者以植物作为活的宿主陆续发现了马铃薯花叶病病毒、小麦花叶病病毒、黄瓜花叶病病毒等。

1908年 Karl Landsteiner 和 Erwin Popper 用猴子分离出脊髓灰质炎病毒。他们把因患小儿麻痹症而死亡的儿童脊髓提取物接种给猴子,成功地复制了小儿麻痹症。脊髓灰质炎病毒可经猴子连续传代,之后还把这株脊髓灰质炎病毒适应到小白鼠。19世纪末黄热病在美洲流行,死亡率非常高,Walter Reed 怀疑蚊子是本病的传播媒介。1902年他首先让蚊子叮咬黄热病患者后,再让蚊子叮咬健康志愿者,经过一段潜伏期其中一些志愿者得了黄热病。Walter Reed 通过人体试验发现了黄热病病毒经蚊子传播。这对于人类控制黄热病的流行起到非常重要的作用。1927年 Stokes A 用恒河猴分离得到黄热病毒,1936年 Theiler M 把黄热病毒适应到鼠胚胎组织,然后又把该病毒适应到鸡胚胎组织,经过数百次传代后制成黄热病减毒活疫苗。20世纪初病毒学工作者还采用动物胚胎(如鸡胚)来分离鉴定病毒。澳大利亚伯内特(Macfarlane Burnet)于1933年曾用鸡胚培养法分离出流感病毒,之后用鸡胚培养技术成功研制了流感疫苗,至今用鸡胚培养技术研制的流感疫苗,仍然是安全有效的疫苗。后来人们还发现,可用鸡胚培养法来培养牛痘及天花病毒和研制牛痘疫苗,而且可用鸡胚进行鸡胚尿囊膜病毒空斑试验,这个试验是最早的病毒定量试验。

(三) 细胞培养技术的建立与发展

在20世纪40年代至60年代,病毒学在基本理论和研究方法上都取得了很大的进展,并逐步形成了一门独立的学科。在此时期,细胞培养技术开始应用于动物病毒的分离和病毒疫苗的研制。1943年我国学者黄祯祥利用鸡胚组织块在试管内进行病毒传代、病毒滴定及中和试验。1949年 Enders JF 成功地利用人原代细胞培养了脊髓灰质炎病毒,还用脊髓灰质炎病毒制备了灭活疫苗。在这之前的40年当中,为研究不同的脊髓灰质炎病毒分离株的性质,各国学者曾使用近9000只猴子、150只猩猩和133名志愿者进行了病毒学实验。因此,很多学者认为,细胞培养技术在病毒学研究中的应用,标志着病毒学黄金时代的开始。1952年 Dulbecco

利用病毒空斑试验精确地测定了病毒滴度。后来许多学者采用细胞培养技术,相继分离出上百种过去对实验动物不敏感的新病毒,如呼吸道合胞病毒、副流感病毒、鼻病毒、腺病毒、Echo 病毒和柯萨奇病毒等,这些研究使人类对病毒的种类与性质有了更深刻的认识。

(四) 免疫学方法在病毒学研究中的应用

病毒学与免疫学之间一直存在着紧密的联系,病毒学家利用了许多免疫学的方法来进行病毒学检验。1941 年 GGeorge Hirst 发现流感病毒的血凝素具有凝集鸡或者人的红细胞的现象。从此,红细胞凝集试验和红细胞凝集抑制试验就开始用于流行性感胃病毒和其他病毒的鉴定和检测。此外病毒学家还用其他血清学试验方法,如中和试验、补体结合试验等检测病毒抗原、病毒抗体及抗体滴度。20 世纪 60 年代以后,更敏感和更特异的现代免疫技术用于病毒学检验,如免疫荧光试验、免疫过氧化物酶染色、酶联免疫吸附试验、固相放射免疫测定和蛋白印迹等方法。这些方法的优点是可测定样品中的微量病毒抗原或病毒抗体,其中有些方法可做到结果判定的自动化,使结果判定更科学更客观,有些方法还可测定宿主组织中的病毒抗原,而有些技术可测定血液中的病毒抗原或病毒抗体。近些年来,单克隆抗体和噬菌体抗体技术的应用,也极大地推动了病毒学的发展。

(五) 病毒结构和化学组成的研究

1932 年德国科学家 Ruska 和 Knoll 研制出世界上第一台电子显微镜。1939 年, Kansch GA 在电子显微镜下直接观察到了烟草花叶病毒,该病毒是直径为 1.5 nm,长为 300 nm 的长杆状的颗粒。在 20 世纪 30 年代,病毒学家用不同孔径的胶膜测量了病毒粒子的直径。到了 60 年代,用超速离心机较精确地测量了病毒粒子的大小。在 50 年代,通过 X-射线晶体衍射技术测定了烟草花叶病毒等植物病毒颗粒的结构,结果发现病毒粒子有两个基本结构,即螺旋形(helix)和二十面体形(icosahedron)。1933 年,美

国生物化学家斯坦利(Stanley WM)发现烟草花叶病毒的浸染性能被胃蛋白酶破坏。在这一现象的启示下,他用提纯蛋白质的方法提取了烟草花叶病毒,最后得到了一小匙针状结晶的物质。他把结晶物质的水溶液涂抹在健康烟叶上,一星期以后这棵烟草也得了同样的花叶病,这证明提纯的物质是烟草花叶病毒。通过各种试验,最终他证明了这种结晶物质是蛋白质。1936年英国的鲍登(Bawden)和皮里(Pirie)等在纯化的烟草花叶病毒中发现了含磷和糖的成分。因为这两种成分是核酸所特有,这个发现表明烟草花叶病毒可能含有核糖核酸。烟草花叶病毒的结晶及其化学本质的发现是对病毒学和生物学的巨大贡献,它不仅引导人们从分子水平去认识病毒的本质,而且为分子生物学和分子病毒学的创立奠定了基础。

(六) 分子病毒学的发展

1953年 Watson JD 和 Crick F 指出生物的遗传物质是核酸,并提出 DNA 双螺旋结构理论。该理论使人们开始从分子水平上去认识遗传物质——DNA 的结构及其功能、基因表达与性状的关系,从而为分子生物学的创立奠定了基础,使病毒学的研究步入了分子病毒学的发展时期。

1952年 Herslaey 和 Williams 分别用化学法和电子显微镜观察到噬菌体浸染细菌时只是将核酸注入细菌体内,而蛋白质衣壳留在细菌外面,证明了噬菌体的遗传物质是 DNA。1962年, Casfar DL 阐明了许多病毒的二十面体结构,明确了病毒核衣壳二十面体的构成规律,这是对病毒超微结构认识的重大突破。1969年 Delbruck M 和 Hershey AD 及 Luria SE 分析了病毒基因结构和复制机制,提出了病毒致癌基因假说。1970年, Temin HM 和 Baltimore D 分别发现了病毒的逆转录酶(reverse transcriptase)。逆转录酶和逆转录过程的发现,是对 Crick 1958年提出的遗传学中心法则的重要补充和发展。

1972年 Smith 发现并纯化限制性 DNA 内切酶以后, Nathans D

和 Danna 等用酶切法建立了肿瘤病毒基因图谱。1975 年英国学者 Frederick Sanger 发明了 DNA 序列测定技术,1977 年他用这个 DNA 测序技术完成了噬菌体中 Φ X174-ssDNA 全部序列的测定。20 世纪 80 年代,病毒学家精确地测定了许多病毒基因组的一级结构,例如,腺病毒 Ad2 DNA 为 35 937 bp,人类免疫缺陷病毒 (HIV) 单链 RNA 基因组为 9 749 个核苷酸,甲肝病毒为 7 478 个核苷酸,甲型流感病毒为 13 588 个核苷酸等。迄今大约 500 多种病毒基因组的核苷酸序列,被国际数据库收集,这对揭示 DNA 病毒和 RNA 病毒的复制机制、基因表达调控原理具有重要的意义。

1979 年, Taniguchi T 用载体成功地表达了人干扰素基因。这是基因工程的一项重大突破。1983 年, Montagnier 和 Gallo RC 分别分离到与艾滋病相关的人类免疫缺陷病毒。1985 年,美国生物化学家 Mullis KB 建立了聚合酶链反应技术。该技术很快成为进行基因克隆、基因定位、DNA 测序、DNA 重组与表达、基因结构分析和功能检测等领域中应用最为广泛的分子遗传学实验技术。

此外,这个时期亚病毒 (Subvirus) 的发现也更进一步促进了从分子水平研究病毒。1971 年, Diener TO 在分离马铃薯纺锤形块茎病的病毒时,发现了类病毒 (viroids)。1981 年首次从绒毛茛的斑驳病毒中分离到拟病毒 (virusoid)。Prillsiner SB 于 1982 年证实羊瘙痒病的致病因子不是类病毒,而是一种分子量只有 3.0×10^4 的蛋白质,称为朊病毒 (prion)。亚病毒的发现,是 20 世纪生命科学中的一件大事,是分子病毒学研究历史上的一个重大突破,它不仅揭示了自然界存在着比病毒更简单的生物,加深了人们对生命起源的认识,而且为研究功能性生物大分子提供了理想的材料。

总之,在短短的 50 多年里,分子病毒学在理论和技术上的创新和进步,为人类预防和控制病毒性疾病做出了重要贡献。分子病毒学在分子水平上阐明了病毒的结构、功能和特性,揭示了病毒基因组复制、基因表达调控原理、病毒与宿主细胞的相互作用规

律,病毒感染和致病的分子机制,同时分子病毒学新技术为病毒性感染的诊断提供了先进的手段。