

病毒性肝炎实验诊断

刘锡光 胡宗汉 王伯祥 主编
冯 坚 毕爱华
邓瑞麟 王心禾 卓焕慈 审

人 民 卫 生 出 版 社

内 容 提 要

本书共分3篇24章,较全面地介绍了病毒性肝炎病原学、免疫学检验,肝脏功能试验和血清酶学检验等主要实验诊断方法。资料取材广泛,基本反映了国内外近20年来在甲型肝炎、乙型肝炎、非甲非乙型肝炎、 δ 肝炎等有关的研究进展。对病原的生物学特性、实验室的各种检查法及其临床意义都有较详细的记述。对肝炎防治工作者、临床医学工作者及科研人员、病毒学及免疫学工作者都有较高的参考价值。

病毒性肝炎实验诊断

刘锡光 胡宗汉等 主编

人民卫生出版社出版

(北京市崇文区天坛西里10号)

人民卫生出版社印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

787×1092毫米16开本 26 $\frac{3}{4}$ 印张 4插页 622千字

1986年1月第1版 1986年1月第1版第1次印刷

印数: 00,001—11,100

统一书号: 14048·5005 定价: 5.55元

[科技新书目 99—54]

刘锡光 胡宗汉 王伯祥 冯 坚 毕爱华 主编

编 者

(按姓氏笔划为序)

王伯祥	邓瑞麟	许建音	刘永佳	刘 彦	刘锡光	卢孝曾	冯 坚
朱亚琦	陆显新	邵荣康	庞其芳	毕爱华	李延福	李南华	陈丽英
金慰鄂	卓焕慈	胡宗汉	谢彦博	范殿英	徐志一	徐志学	徐贤泽
徐乌格	郭锡琼	郭恒昌	韩秀菊	熊启华			

邓瑞麟 王心禾 卓焕慈 审

序

研究病毒性肝炎和其有效防治措施已被列入国家科研攻关项目。为此广大医药卫生工作者正在努力解决各种课题，以便控制该病的流行。

病毒性肝炎包括不同种类病毒引起的肝脏疾病，其中有的病原还不明，流行规律、临床表现等都比较复杂。因此，诊断疾病和检测病原无论在实际防治或科研工作中都占有首要地位。近年来，国际上诊断技术发展非常迅速，而且可以说每项新技术都被应用于诊断和研究病毒性肝炎的实践中来。但至今国内还没有比较全面地收集和介绍这方面的资料 and 经验的书籍。现在应广大技术人员的需要出版了这本书，她必将受到大家的欢迎。在提高我国对病毒性肝炎的诊断水平，使之早日进入国际先进行列的工作中，我们希望她将成为读者的有益参考书。另外，本书涉及的范围比较广，读者可以从中选择适宜的方法在自己的工作中应用并逐步使之标准化。

李河民

1984年12月5日

× × × × ×

肝炎的病毒病因，甚为广泛。特别是乙型肝炎病毒的带毒率之高和其引起肝硬化和肝癌的严重后果，对人民群众的身体健康带来很大的威胁，是医学中带有世界性的极为严重的问题之一。所以，关于病毒性肝炎的实验诊断，理应受到很大的重视。病毒性肝炎带毒者的检测和临床病例的早期明确诊断，对于采取适当的措施阻止病毒的传播是必要的。刘锡光等同志编写的《病毒性肝炎的实验诊断》，是普及诊断技术、提高诊断方法的一本很有实际应用价值的书籍。

本书共分3篇24章。第一篇主要叙述病毒学和免疫学的检查法，包括电镜快速检查法，并讨论了肝炎病毒的组织培养问题；第二篇叙述一般有关的免疫血清学技术；第三篇涉及肝功能的检查方法等，有很好的科学性和内在联系，是临床工作者、防疫工作者特别是检验工作者以及从事肝炎病毒研究的人员和医药院校的微生物学青年教师及研究生等必须人手一册的技术参考书。

向近敏

1984年9月于武昌

前 言

病毒性肝炎实验诊断是当前医学诊断技术发展较快的一个领域，近二十年发展起来的有关实验病毒学和病毒性肝炎病原学、免疫学等方面许多新理论、新方法，都在病毒性肝炎实验诊断上得到广泛应用。而且，技术方法、诊断试剂等的更新换代日新月异，在肝炎防治上愈来愈重要。

为了更好地配合我国广大城乡大规模开展病毒性肝炎防治、科研的需要，我们编写了《病毒性肝炎实验诊断》这本书，目的是为各级医疗、防疫机构及有关科研工作者提供一部简明实用的参考工具书。本书较系统地编写了1974年以来国内外已应用的，特别是经国内实践过的病毒性肝炎实验诊断技术，并结合实验诊断对病毒性肝炎理论方面的研究进展也简明地作了介绍。

本书编写过程中，承蒙杨超前、向近敏、黄大有、崔振宇、买凯和陶其敏等医师的热情帮助以及卫生部肝炎专题委员会、湖北省药检专科学校有关领导的关怀支持，在此一并致谢！

由于我们水平有限，时间仓促，在编写过程中，遗误之处在所难免，诸多问题均请读者批评、指正。

编 者

1984年12月

目 录

第一篇 病毒性肝炎病原学及免疫学检验	1
第一章 概论	1
第一节 命名	2
第二节 甲型肝炎病毒的形态学及其性质	3
第三节 乙型肝炎病毒的形态学及其本质	5
第四节 乙型肝炎表面抗原的理化性质	13
第五节 乙型肝炎。抗原的本质	18
第六节 非甲非乙型肝炎研究概况	21
第七节 δ 抗原	27
第八节 病毒性肝炎病原检测的临床意义	28
第二章 病毒性肝炎实验室的基本要求	41
第一节 关于病毒性肝炎实验室的基本知识	41
第二节 病毒性肝炎的消毒法和预防方法	43
第三节 病毒性肝炎病原检测的各种试剂的制备	46
第四节 血清的浓缩方法	49
第三章 病毒性肝炎病原学和免疫学的诊断用品	52
第一节 国外病毒性肝炎病原的诊断用品	52
第二节 国内乙型肝炎病原诊断用品概况	53
第三节 乙型肝炎表面抗原的纯化	56
第四节 乙型肝炎抗-HBs血清及抗-HBs亚型血清的制备	61
第五节 乙型肝炎诊断试剂的检定和评价	62
第四章 甲型肝炎抗原和抗体的检测	74
第一节 免疫电泳 (IEM)	74
第二节 补体结合试验 (CF)	76
第三节 免疫粘附血球凝集试验 (IAHA)	78
第四节 放射免疫测定 (RIA)	78
第五节 酶联免疫吸附测定 (ELISA或EIA)	81
第六节 微量固相放射免疫测定法	83
第七节 酶联免疫夹心法检测抗-HAVIgM	87
第五章 乙型肝炎表面抗原和抗体的检测	93
第一节 琼脂凝胶免疫双扩散法 (AGD)	93
第二节 液流泳 (RP)	96
第三节 对流免疫电泳 (CIEP)	100
第四节 补体结合试验 (CF)	106
第五节 被动血球凝集试验 (PHA)	114
第六节 反向被动血凝试验 (RPHA)	119
第七节 放射免疫测定 (RIA)	125
第八节 免疫粘附血球凝集试验 (IAHA)	133

255.5-5/98-026220

第九节	酶联免疫吸附试验 (ELISA)	141
第十节	乙型肝炎表面抗原亚型的检测	145
第十一节	葡萄球菌 A 蛋白 (SPA) 在检测抗-HBs 上的应用	149
第六章	乙型肝炎 e 抗原和 e 抗体的检测	155
第一节	概述	155
第二节	琼脂免疫扩散法	160
第三节	对流免疫电泳	168
第四节	微量补体结合试验	170
第五节	放射免疫自显影检测	171
第六节	酶联免疫检测法	172
第七章	乙型肝炎核心抗原和抗体的检测	176
第一节	补体结合试验	176
第二节	免疫粘附血球凝集试验	181
第三节	被动血凝试验	183
第四节	微量固相放射免疫测定法	184
第五节	血清中 HBcAg 的检测	187
第六节	固相放射免疫法检测血清抗-HBc IgM (夹心法)	189
第七节	酶联免疫双夹心法检测抗-HBc IgM	192
第八章	乙型肝炎循环免疫复合物的检测	197
第一节	概述	197
第二节	简便的 PEG 沉淀试验	197
第三节	Raji 细胞放射免疫测定法	200
第四节	酶联免疫吸附试验检测 HBsAg 免疫复合物	202
第五节	PEG 胰蛋白酶解离试验检测 HBsAg 免疫复合物	203
第六节	聚乙二醇与胰蛋白酶联合使用检测 HBsAg 免疫复合物	204
第九章	乙肝病毒其它标志的检测	207
第一节	乙型肝炎病毒 DNA 多聚酶的检测	207
第二节	δ 抗体的检测	211
第三节	Dane 颗粒抗体测定	211
第四节	被动血凝法测定 HBsAg 白蛋白受体	213
第五节	测定血清中 HBV-DNA 基因组的方法	214
第六节	淋巴细胞杂交瘤与单克隆抗体技术	222
第十章	电子显微镜和超速离心技术在诊断肝炎病毒上的应用	233
第一节	用电子显微镜方法检测甲、乙型肝炎病毒颗粒及其抗原	233
第二节	肝炎病毒的电镜快速诊断技术	235
第三节	密度梯度区带离心法及其在肝炎病毒工作中的应用	240
第十一章	组织中乙型肝炎病毒抗原的检测	248
第一节	概述	248
第二节	肝脏穿刺活组织检查	249
第三节	检测肝细胞中乙型肝炎抗原的方法	251
第十二章	肝炎病毒组织培养研究的新进展	266
第一节	甲型肝炎病毒的细胞培养	266

第二节	乙型肝炎病毒细胞培养的研究	270
第三节	非甲非乙型肝炎病毒的细胞培养研究	272
第十三章	几种与人乙型肝炎病毒类似的病毒与引起人肝炎的其它病毒	273
第一节	几种与人乙型肝炎病毒类似的病毒	273
第二节	引起肝炎的其它病毒	279
第二篇	与病毒性肝炎有关的其它免疫学检验	282
第一章	概述	282
第一节	肝脏在免疫中的重要意义	282
第二节	肝脏患者免疫功能异常及其临床意义	282
第三节	病毒性肝炎发病的免疫机理	289
第二章	血清免疫球蛋白含量测定	291
第一节	IgG、IgA及IgM含量测定	291
第二节	血清IgD含量测定	297
第三节	血清IgE含量测定	299
第三章	血清补体含量测定	303
第一节	血清总补体活性测定	303
第二节	血清补体C ₃ 含量测定	305
第四章	血清自身抗体的检测	310
第一节	非器官特异性自身抗体的检测	310
第二节	器官特异性自身抗体的检测	312
第五章	细胞免疫功能的测定	321
第一节	淋巴细胞转化试验	321
第二节	T淋巴细胞玫瑰花环试验	325
第三节	白细胞移动抑制试验(LMIT)	330
第四节	白细胞粘附抑制试验(LAI)	335
第五节	迟发型皮肤变态反应	337
第六章	其它测定	341
第一节	甲胎蛋白的测定	341
第二节	E玫瑰花形成抑制因子的测定	347
第三节	肝病患者体液内毒素测定——鲎试验	348
第四节	HLA的测定——用于HLA分型的标准微量淋巴细胞毒试验	352
第五节	异常淋巴细胞对鉴别甲、乙型急性肝炎的意义	357
第三篇	与病毒性肝炎有关的肝脏功能试验和血清酶学检验	359
第一章	概述	359
第一节	肝功能试验的种类、临床意义与评价	359
第二节	临床生化检验质量的控制	364
第二章	检查肝细胞完整性紊乱的试验	369
第一节	转氨酶测定	369
第二节	血清乳酸脱氢酶同功酶测定	370
第三节	血清精氨酸琥珀酸裂解酶测定	374
第四节	血清 γ -谷氨酰转肽酶活性测定	377
第五节	血清铁测定	379

第三章	检查肝脏代谢功能受损的试验	382
第一节	蛋白质的测定	382
第二节	纤维蛋白原测定	384
第三节	凝血酶原时间测定——奎克 (Quick 氏法)	385
第四节	胆碱酯酶测定	387
第五节	半乳糖耐量试验	389
第六节	血清甘胆酸的放射免疫测定	390
第四章	排泄功能减退试验	395
第一节	血清亮氨酸氨基肽酶总活力测定	395
第二节	血清胆红素测定	397
第三节	血清铜测定	401
第四节	血清碱性磷酸酶总活性测定	403
第五章	检查间质反应增强的试验血清单胺氧化酶测定——色素直接比 色法	406
附录一	名词解释	409
附录二	病毒性肝炎实验室常用略语的英汉对照	412
附录三	常用化学试剂的配制	416
附录四	常用酸、碱当量溶液的配制和溶液稀释	417

致谢·····	134
参考文献·····	135
附录 1 利什曼原虫分离物标记鉴定中心标准品 来源·····	136
附录 2 测量皮肤试验反应硬结的圆珠笔技术·····	151
附录 3 分离及低温保存利什曼原虫的方法·····	152
附录 4 脾脏穿刺抽吸术及寄生虫分级·····	158
附录 5 供防治疟疾滞留喷洒用的四种杀虫剂费 用比较·····	161

第一篇 病毒性肝炎病原学及免疫学检验

第一章 概 论

病毒性肝炎由多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或持续性传染病。以乏力、食欲不振或发热开始,继有肝脏肿大疼痛、部分病例出现黄疸。迄今所知,病毒性肝炎除外已知的甲型和乙型外,尚有非甲非乙型和S型肝炎,这些均分别由独特的嗜肝性病毒引起:1. 甲型肝炎(简称甲肝)由甲型肝炎病毒(HAV)引起;2. 乙型肝炎(简称乙肝)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引起。4. δ 肝炎,由 δ 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、巨细胞病毒、EB病毒等,都可引起肝脏炎症,但这类病毒所致的肝炎,属其全身感染的一部分,故不包括在病毒性肝炎这个特定范围内。

肝炎病毒及其抗原发现的历史

年限	名 称	发现者
1965	澳大利亚抗原(HAA),即 HBsAg	Blumberg
1970	Dane 氏颗粒即乙肝病毒本身	Dane
1971	HBsAg 亚型的确定	Le Bouvier
1971	发现 HBV DNA 多聚酶	Hirshman等
1972	e 抗原、e 抗体	Magnius
1973	甲型肝炎病毒颗粒(HAV)	Feinstone
1974	首次用电镜观察到 HBV DNA 的环形分子	Robinson
1975	核心抗原(HBcAg)	Almeida
1975	提出 HBsAg 各种亚型决定簇的顺序谱系	Le Bouvier
1976	鉴定了 e_1 、 e_2	Williams
1977	发现了 δ (delta) 抗原和抗体	Rizzetto
1978	叙述了 e_3	Courouge-Pauty
1978	建立了 HBV-DNA 原位杂交技术	Brahic 等
1978	ayw 亚型的病毒 DNA 克隆入大肠杆菌	Pritsch
1979	发现非甲非乙型肝炎的病毒颗粒	Trepo
1979	HAV 体外组织培养成功	Provost
1979	对 ayw 亚型病毒的 DNA 核苷酸顺序进行了分析 并绘制出 HBV-DNA 物理图	Galibert
1983	adr 亚型病毒基因组的克隆和限制性酶切图谱	吴祥甫等
1983	HAV 的克隆和基因表达	Gust 等

第一节 命名

一、肝炎病毒及其抗原、抗体的命名

参照 1977 年世界卫生组织专家委员会修改的肝炎病毒与抗原、抗体的命名意见,简介如下:

(一) 甲型肝炎

甲型肝炎病毒 HAV

甲型肝炎抗原 HAAg

抗甲型肝炎病毒的抗体 抗-HAV

抗甲型肝炎病毒 IgM 抗体 抗-HAV IgM

抗甲型肝炎病毒 IgA 抗体 抗-HAV IgA

抗甲型肝炎病毒 IgG 抗体 抗-HAV IgG

(二) 乙型肝炎

乙型肝炎病毒 (即丹颗粒) HBV

乙型肝炎表面抗原 HBsAg

抗乙型肝炎表面抗原的抗体 抗-HBs

乙型肝炎核心抗原 HBcAg

抗乙型肝炎核心抗原的抗体 抗-HBc

抗乙型肝炎核心抗原 IgM 抗体 抗-HBc IgM

抗乙型肝炎核心抗原 IgG 抗体 抗-HBc IgG

乙型肝炎 e 抗原 HBeAg

HBeAg/e₁、e₂、e₃

抗乙型肝炎 e 抗原的抗体 抗-HBe

DNA 聚合酶 DNAP

(三) 非甲非乙型肝炎

非甲非乙型肝炎病毒 NANBV

非甲非乙型肝炎抗原 NANBAg

非甲非乙型肝炎抗体 NANBAb

Delta 抗原 δ 抗原

抗 Delta 抗原的抗体 抗- δ

二、乙型肝炎表面抗原的亚型抗原决定簇

HBsAg 活性颗粒,经细致的血清学分析,除有一共同的组特异性抗原 a 外,常至少带有二种互相排斥的亚型抗原决定簇 d 或 y 和 w 或 r。亚型是乙型肝炎病毒不同遗传型变种表型的表达。最初识别为四种主要的表型: adw, adr, ayw 及 ayr。这些亚型提供了流行病学标记以及不同传染来源的区别方法,但不同的亚型与肝炎的特殊临床形式无关。

现已知道有 8 种不同的亚型和 2 种混合亚型,这是由各种亚型抗原决定簇 d, y, w

和 r 等联合组成。另外，原认为与共同决定簇 a 有关的其它变种，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 ₁ dw)
ayw ₂ (a ₁ yw)	adw ₄ (a ₃ dw)
ayw ₃ (a ₁ yw)	adr
ayw ₄ (a ₃ yw)	adyw
ayr	adyr

主要的亚型抗原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。但这些系统并非独立，因 w（发现同 y 在一起的）的 4 个变种中，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 HBsAg 的亚型病毒时，由决定簇的表现型或基因型混合所造成。

其他的表面抗原决定簇如：q、x、f、t、j、n 和 g 等也有报道。但尚无这些抗原决定簇之间的必要的血清学对比。

三、乙型肝炎 e 抗原的亚型抗原决定簇

乙型肝炎 e 抗原的亚型抗原决定簇已鉴定出 3 种，称为 HBeAg/1、HBeAg/2 和 HBeAg/3。

第二节 甲型肝炎病毒的形态学及其性质

一、甲型肝炎病毒的形态学

Feinstone 于 1973 年用免疫电镜首次观察到志愿接受甲型肝炎患者血清而获得

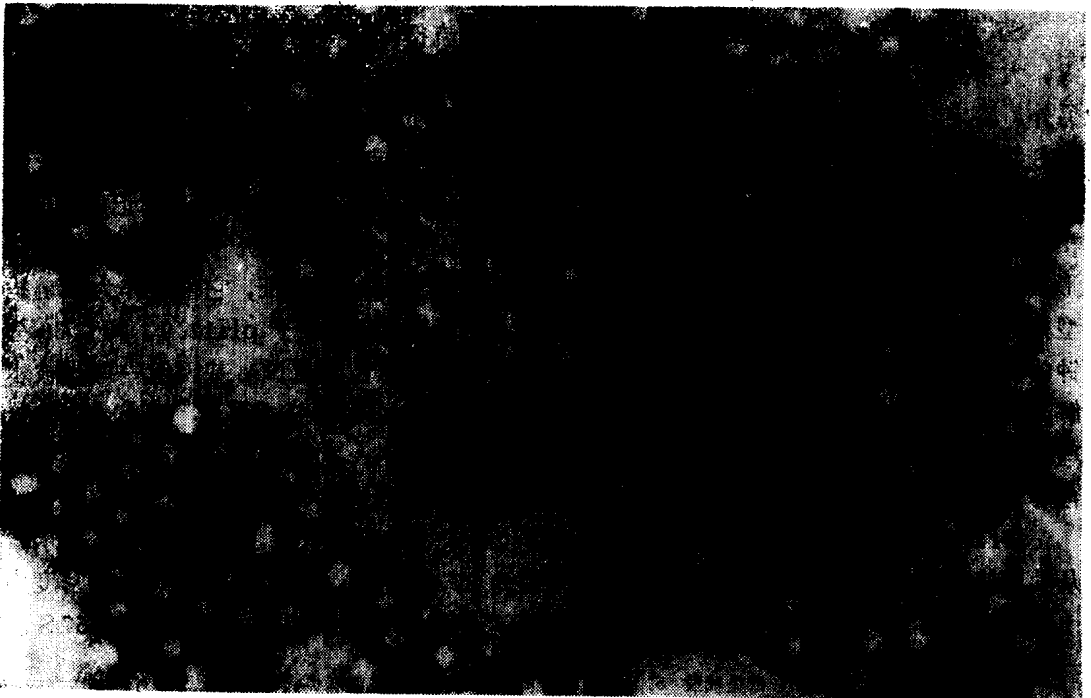


图 1-1-1 甲型肝炎病毒的电镜照片 (×234,000)

实验感染的人,在其急性期的粪便提取液中,有一种病毒样颗粒存在,其大小易变而不固定。颗粒直径在 24~29 毫微米之间,平均为 27 毫微米。此种颗粒有空心和实心的两种,没有外衣*。据电镜观察,实心者不易被染色液透入,空心者则易。经黑猩猩和狨猴的实验性感染后,在其粪便中也找到了类似的这种病毒颗粒。庞其方等描述:(1)正常病毒颗粒呈圆形,电子穿透均匀,平均直径为 27.5 毫微米左右,约占全部病毒数量 $\frac{3}{4}$ ~ $\frac{1}{4}$ 不等。(2)空心病毒颗粒呈圆形,中空,除了个别较大的直径达 32 毫微米外,绝大多数直径在 27 毫微米左右。在一般情况下,实心与空心颗粒相混杂,而以实心者为主(图 1-1-1)。

二、甲型肝炎病毒的性质

Bradley 等 (1977) 将病人粪便和实验感染黑猩猩的粪便中的甲肝病毒提纯,发现在氯化铯梯度中病毒具有多样的浮力密度,成熟毒粒 1.34 克/毫升、未成熟毒粒 1.29~1.33 克/毫升、高密度毒粒 1.38~1.46 克/毫升。其沉降系数为 156~160S。病毒衣壳由 4 个不同的多肽组成,其相对的分子量分别为 30,000~33,000 (VP1), 24,000~27,000 (VP2), 21,000~23,000 (VP3) 及 7,000~14,000 (VP4)。

Baroudy (1984) 曾用 Maxam 和 Gilbert 技术顺序分析几个 HAV cDNA 克隆;迄今,已测得相当于基因组中二个大区域的顺序,取得了相当于 HAV RNA 5' 端 3,119 个碱基对的顺序。这一顺序含有一个开放读码,从距 5' 端约 750 碱基对开始,延伸至 2,407 碱基对。HAV 包括一个单股正股 RNA 基因组,约 8kb 长,在基因组 3' 端的一端,有一 15 个碱基对的多 (A) 带。这一多 (A) 带是开放读码中其前有 1,407 碱基对的二个相邻末端密码下方的 51 个碱基对。

现已将 HAV 分类属于小 RNA 病毒科中的肠道病毒属 72 型。

Siegl 和 Frosner (1978) 从德国一次暴发流行时获得的粪便标本中提纯甲肝病毒,大多数颗粒在氯化铯中浮力密度为 1.34 克/毫升,在蔗糖中沉降系数约为 160S。另外,鉴定出另一种不同的甲肝抗原,其浮力密度为 1.305 克/毫升,沉降系数在 50~90S 之间。进而又发现一种积聚于密度范围 1.38~1.44 克/毫升之间的不稳定成分。160S 颗粒的直径是 27~29 毫微米,可与直径范围为 22~24 毫微米小病毒标记 (LuIII) 相鉴别。浮力密度为 1.34 克/毫升的病毒颗粒,在 4M 尿素和约 90% 甲酰胺中释放出线形核酸分子,核酸分子具有单链 RNA 或单链 DNA 纽结状的特征,它们与作为双链构型标记而加入到制剂中的噬菌体 λ 的核酸不同。甲肝颗粒孵育于 pH12.9、50℃ 30 分钟的实验,其核酸分子能与并行分析的脊髓灰质炎病毒 2 型 RNA 基因组一样易被水解。然而噬菌体 $\phi \times 174$ 的单链 DNA 和微小病毒类 LuIII 的单链 DNA,经上述方法处理不受影响,而噬菌体 λ 的双链 DNA 则变性为单链分子。从以上研究断定,甲肝病毒含有单链 RNA 的线型基因组,故该病毒应与小核糖核酸病毒类一起归类。

Bradley 等 (1978) 从他们研究结果中也断定甲肝病毒含有 RNA。而且显示,从共同来源暴发流行的人类中提纯的平均直径为 27 毫微米,在氯化铯中浮力密度为 1.34 和 1.45 克/毫升的甲肝病毒颗粒,在中性蔗糖梯度中都有相同的沉降系数 157 S。

* Coakley (1976) 报道在一感染猕猴 *S. mystax* 肝的小部分提出的甲型肝炎病毒颗粒,内部有核心样结构,此外在此核心外围有双层外壳,这与多数的肠道病毒不同。

重密度的颗粒 (1.45 克/毫升) 在线型蔗糖梯度中, 沉降系数为 157 S 和 230 S, 而轻密度颗粒 (1.34 克/毫升) 仅沉降于 157 S。轻密度颗粒的碱性 pH 降解表明, 在 pH 10.0 时, 157 S 颗粒丧失 50%, 而 pH 11.0 时则全部丧失。重密度的颗粒经处理表明, 在 pH 11.0 降解后, 有相当大的一部分 157 S 颗粒并未丧失, 于 pH 10.0 处理密度重的颗粒, 对低浓度为 $10^{-4} \mu\text{g ml}^{-1}$ 的核糖核酸酶的消化作用仍很敏感, 而 DNase 无作用。重密度的颗粒经碱性 pH 处理产生的 157 S 颗粒, 对 RNase 也敏感。Coulepis 等 (1978) 从 3 名自然感染的病人粪便中提纯甲肝病毒, 将提纯的病毒制剂置于 0.1% 十二烷基硫酸钠中, 作间断的聚丙烯酰胺凝胶电泳。分离出了 3 种重要的多肽, 分子量分别为 34,000、25,000 和 23,000。此种多肽是甲肝病毒所特有的, 与已报告过的属于小核糖核酸病毒的肠道病毒属极其相似, 但第 4 种共同低分子量的多肽尚未检出。

HAV 颗粒相对耐热, 对酸性溶液和消毒剂等均有较强的抵抗力。置于乙醚或酸性溶液 (pH3) 中, 以及加热至 60℃ 1 小时, 均不被灭活, 但置于 1:4,000 福尔马林中、在 37℃ 下 3 天、暴露于氯 (1 毫克/升) 30 分钟、紫外线 (1.1 瓦) 照射 1 分钟或加热至 100℃ 5 分钟, 可使之灭活。

Provost 将提纯病毒用吖啶橙染色后呈橙红色, 说明 HAV 颗粒内含有 RNA。在 60℃ 下, 用胰 RNA 酶处理 1 小时, 可以部分破坏之。他初认为 HAV 是一种 RNA 病毒。

甲型肝炎病毒 (CR326 株) 与其它大小相似的病毒的性质的比较见表 1-1-1。

表 1-1-1 甲型肝炎病毒 (CR326 株) 与其他大小相似的病毒性质的比较

病 毒	大小 (毫微米)	浮力密度 (克/毫升)	核酸 类型	细胞内 部 位	对理化因子的稳定性			
					加热 60℃	加热 100℃	乙醚	酸
甲型肝炎病毒 CR326	27	1.34	RNA	胞浆	稳 定	灭 活	稳定	稳 定
肠道病毒	24~28	1.32~1.34	RNA	胞浆	不稳定	不稳定	稳定	稳 定
鼻病毒	23	1.38~1.43	RNA	胞浆	不稳定	不稳定	稳定	不稳定
乙型肝炎病毒								
Dane 颗粒	42	1.24	DNA		—	—	—	—
Dane 核心	28	1.30~1.32	DNA	核	—	—	—	—
表面抗原	20	1.21	无	胞浆	—	—	—	—
微病毒	19~24	1.39~1.44	DNA	核	稳 定	—	稳定	稳 定
GB病毒	<20	1.21			不稳定	—	稳定	—

注: —, 不明或未做。

(刘锡光、冯坚)

第三节 乙型肝炎病毒的形态学及其本质

一、乙型肝炎病毒的形态学

用电镜观察人体血液中乙型肝炎病毒 (HBV) 的颗粒至少可分为三类:

1. 小球形颗粒, 直径平均为 22 毫微米, 为主要的 HBsAg 成分, 可能是病毒的

衣壳,其颗粒的表面有一组特异性抗原决定簇 a 和亚型特异性抗原决定簇 d/y 和 w/r。这种小球形颗粒被认为是在装配 Dane 氏颗粒时过剩,而大量游离到血液中的。

2. 管形颗粒,直径约为 22 毫微米,长短及形态不一,长度可为 100~700 毫微米,同样具有 HBsAg 的抗原性。

3. 大球形颗粒,被认为是有感染性的完整乙型肝炎病毒,亦称为 Dane 氏颗粒,是一种大的双层外壳的球形颗粒,直径约为 42 毫微米。Dane 氏颗粒能分为核心和外壳两个部分,可呈实心或部分实心,也可呈空心状,外壳厚度为 7 毫微米,具有 HBsAg 的抗原性。小球形颗粒与管形颗粒则被认为是无感染性的过剩的病毒蛋白外壳(图 1-1-2)、(图 1-1-3)、(图 1-1-4)。

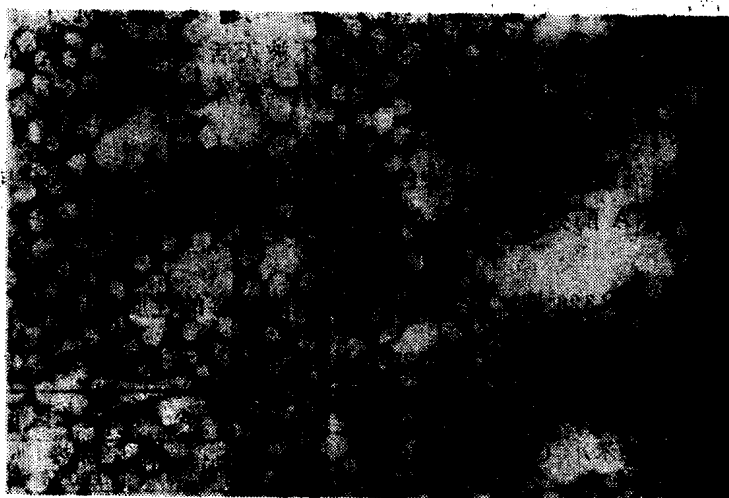


图 1-1-2 在电镜下, HBsAg 阳性乙型肝炎患者血清中存在的三类颗粒 ($\times 120,000$) (陶其敏提供)

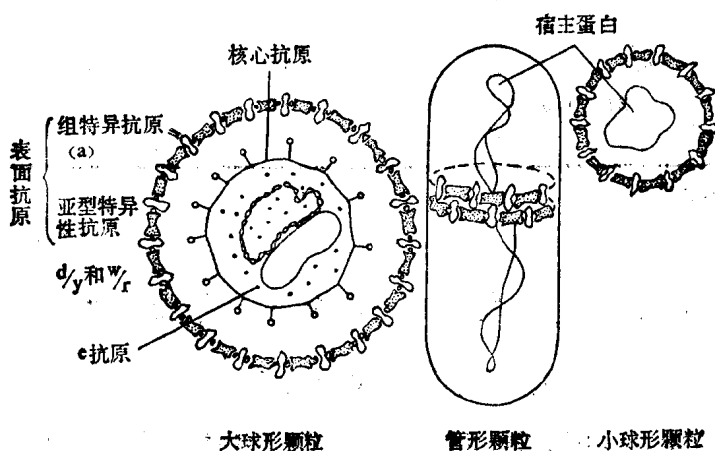


图 1-1-3 乙型肝炎病毒三类颗粒形态示意图

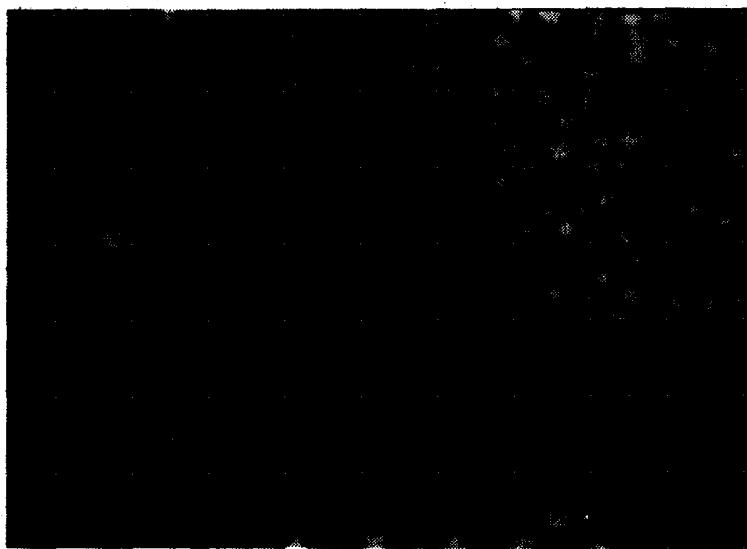


图 1-1-4 乙型肝炎表面抗原, 小球体22毫微米 ($\times 130,000$)

(庞其芳提供)

二、乙型肝炎病毒的本质

由于适于 42 毫微米乙肝病毒繁殖的体外组织培养系统尚未成功, 其次是因为从与乙肝伴随的其他颗粒形式中提纯这种颗粒较为困难, 故未能直接证实其传染性。但其某些物理化学性质和流行病学资料都表明, 至少有一部分 42 毫微米颗粒即是致病因子, 包括发现这些颗粒的核心内有 DNA, 一种伴随的内源性激活的多聚酶, 以及其核心成分与其他 20 面体病毒核衣壳结构的形态相似等。(图 1-1-5) 此外, 假定为病毒颗粒的直径, 与早期用已知有传染性的血清作超过滤实验所见极为符合。用核酸杂交技术, 也显示在感染的细胞内有乙肝 DNA 分子的碱基顺序。在分离出来的病毒颗粒和病毒成分方面, Robinson (1977) 曾详述了早期曾做过的一些实验, 发现了内源性的 DNA 多聚酶反应, 从而促进了对乙型肝炎病毒本质的进一步研究, 故首先阐述此种酶的性质。

(一) 乙肝病毒伴随的 DNA 多聚酶

Kaplan 等 (1973) 证实 DNA 多聚酶的存在和 42 毫微米病毒颗粒密切相关。用非离子去污剂除去表面抗原外壳后, 脱氧核苷酸结合于不溶于酸的产品中, 反应可在无外源性模板条件下进行; 镁和铵离子可促进此反应。相反, 锰的浓度甚至低于 0.01M 时, 也可抑制酶的活性。可取单价离子钾和钠促进反应的程度及高盐浓度时酶的活性, 作为核心抗原内 DNA 多聚酶与其他类似酶活性相鉴别的基础。至于乙型肝炎 DNA 多聚酶的特性是否由病毒基因组所标示的则不清楚。但是将此酶的离子要求, 和它对 N-乙基顺丁烯二酰亚胺 (N-ethylmaleimide) 的敏感性进行比较的结果提示, 这种多聚酶对乙型肝炎感染具有特殊意义 (表 1-1-2)。

尽管这种测定方法具有一定程度的专一性, 但测定 DNA 多聚酶仍为提示病毒复制的一种有用的指标。Howard (1978) 综述了用这种酶测定法诊断乙肝的确切条件。Cappel 等 (1977、1978) 证实有 DNA 多聚酶活性经常是乙肝病毒的仅有的标志。接