

肝 炎 病 因 探 讨

刘 文 等编著

肝炎病因探讨

刘文 等编著

☆

原子能出版社出版

(北京 2108 信箱)

北京岳各庄印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行·新华书店经售

☆

开本 $787\times 1092\frac{1}{16}$ · 印张 16 · 字数 376千字

1980年12月第一版 · 1980年12月第一次印刷

印数001—7000 · 统一书号:15175·217

定价: 2.00 元

目 录

一、甲型肝炎病原学研究进展	(1)
(一) 甲型肝炎的病原学研究	(1)
(二) 甲型肝炎病毒的形态及理化特性	(9)
(三) 流行病学	(9)
(四) 甲型肝炎的特异性诊断方法	(11)
(五) 预防	(14)
二、乙型肝炎病毒研究的进展	(18)
(一) 乙型肝炎病毒的命名经过	(20)
(二) 乙型肝炎病毒的形态	(21)
(三) 乙型肝炎病毒的三个抗原-抗体系统	(22)
(四) 乙型肝炎表面抗原的亚型	(26)
(五) 乙型肝炎表面抗原及核心抗原的物理化学特性	(27)
(六) 流行病学	(29)
(七) 乙型肝炎病毒感染与患者的临床反应	(37)
(八) 乙型肝炎病毒与原发性肝癌	(39)
(九) 预防	(41)
(十) 实验室安全问题	(42)
三、乙型肝炎病毒的 e 抗原-抗体系统	(50)
(一) 乙型肝炎 e 抗原的发现经过	(50)
(二) 乙型肝炎 e 抗原 (HBeAg) 的理化性质及其本质	(51)
(三) e 抗原-抗体系统在肝病中出现的频度	(52)
(四) HBeAg 与乙型肝炎表面抗原、乙型肝炎核心抗原及 Dane 颗粒的关系	(54)
(五) e 抗原和 e 抗体的出现及其临床意义	(56)
(六) e 抗原与乙型肝炎表面抗原的垂直传播问题	(57)
(七) HBsAg 系统的检测问题	(58)
四、乙型肝炎与原发性肝癌	(62)
(一) 肝炎、肝硬化与原发性肝癌	(62)
(二) 甲胎蛋白 (AFP) 在原发性肝癌诊断上的应用	(67)
(三) 原发性肝癌的防治问题	(72)
五、免疫活性淋巴细胞及其临床意义	(77)
(一) 免疫反应形成的基本因素简介	(77)
(二) 中枢免疫器官 (或称中枢淋巴器官)	(78)
(三) 免疫活性淋巴细胞的分类	(82)
(四) 免疫活性淋巴细胞的表面标记以及检测方法	(110)
(五) 免疫活性淋巴细胞在一些组织中的分布	(125)
(六) 鉴定免疫活性淋巴细胞的临床意义	(126)

(七) 结束语	(130)
六、乙型肝炎免疫学的几个问题	(148)
(一) 乙型肝炎免疫反应对机体的保护作用	(149)
(二) 乙型肝炎组织损伤的机理	(159)
(三) 乙型肝炎的免疫反应与临床表现	(172)
(四) 乙型肝炎与遗传因素	(183)
七、外源性电离辐射、天然铀化合物与肝脏	(199)
(一) 外源性电离辐射与肝脏	(199)
(二) 天然铀及其化合物与肝脏	(208)
八、放射性作业职工中肝炎流行的调查分析	(220)
(一) 调查对象	(220)
(二) 临床及实验室检查	(220)
(三) 结果	(220)
(四) 讨论	(231)
(五) 小结	(233)
九、放射免疫自显影检测乙型肝炎表面抗原简介	(235)
(一) 放射免疫自显影检测 HBsAg 的基本原理	(236)
(二) 放射免疫自显影检测 HBsAg 的敏感性与特异性问题	(236)
(三) 影响放射免疫自显影敏感性的某些因素	(237)
(四) 小结	(239)
十、反向间接血凝试验检测乙型肝炎表面抗原	(242)
(一) 实验方法简介	(242)
(二) 反向间接血凝试验的影响因素	(243)
(三) 反向间接血凝检测 HBsAg 的敏感性	(244)
(四) 反向间接血凝检测 HBsAg 的特异性	(246)
(五) 小结	(247)

一、甲型肝炎病原学研究进展

刘 文

甲型肝炎（即传染性肝炎）是一种古老的疾病，近年来，本病的发病率似有增多现象，在工厂、企业、社会团体和城镇居民中几乎成为一种常见病和多发病，给人民健康带来一定的危害。本病主要以粪-口途径传播，在人群中流行的肝炎主要是无症状或无黄疸型的，黄疸型肝炎只占少数。婴儿和儿童容易受本病的感染，但其症状较成人为轻。本病潜伏期较短（2—8周），可以散在发病，也可以暴发流行，比如在托儿所、幼儿园、小学校、新兵训练营等集体单位，往往发生暴发性流行。

多年来，世界各国学者曾经投入大量人力物力研究传染性肝炎的病原问题，虽然在病原学、流行病学及预防方面取得了某些成绩，但由于人体外培养病毒一直未能成功（如用鸡胚、组织培养及寻找敏感的实验动物等都不能取得满意的结果），所以直到本世纪60年代初期，仍然只有人体才是传染性肝炎病毒感染的唯一敏感者，这就大大限制了关于传染性肝炎病原学的深入研究。

布卢姆伯格等⁽²⁾在乙型肝炎表面抗原方面的巨大成就，大大促进了对甲型肝炎病原学的研究，因此，在60年代后期无论在传染性肝炎病毒的敏感动物模型的寻找方面，或是在病毒毒株的分离方面，都取得了可喜的进展。跨入70年代之后，在甲型肝炎的病毒学、实验室诊断和流行病学等方面进展更快。1973年 Feinstone^(3,2)用免疫电镜法在肝炎病人粪便中看到了甲型肝炎病毒，此后，有关本病毒的研究报告大为增多，所以有人把1973年看作是传染性肝炎病毒学研究的新时代的开始年。

1972年9月，联合国科教文组织召开的病毒性肝炎专家会议上⁽³⁾对两型肝炎的命名问题曾作出决议，建议取消过去采用的传染性肝炎和同种血清肝炎的旧名称，而分别改称为甲型肝炎和乙型肝炎。甲型肝炎病毒的英文简写为 HAV，甲型肝炎抗原则写为 HA Ag。

（一）甲型肝炎的病原学研究

多年来，不少人试图分离培养甲型肝炎病毒都遭到了失败，即使偶然有所谓成功的报道，也往往重复不出来。比如，1961年 Rightsel 等⁽¹⁾曾报道他们用传代细胞“Detroit-6”成功地培养出肝炎病毒，将这些病毒在监狱中的囚犯“志愿者”^①身上实验，引起了不同类型的肝炎。当时在医学界曾引起不少人的重视，但这一实验也没有重复成功。

1967年以来，国外学者相继从人体及狨猴等身上分离到不同的甲型肝炎毒株，现分别介绍如下。

● 在人身上，即使在囚犯身上进行这种实验是不人道的，在社会主义中国是不允许的。“志愿者”是回避责任的遁词。下同，不另注。

1. 人体甲型肝炎病毒 MS-1 株的分离

第二次世界大战中, Mac Callum和Bradley^[4]证明, 在黄疸出现之前或其早期病人的粪便中存在有传染性肝炎病毒, 若经鼻咽部感染“志愿者”, 21—31天后即发生传染性肝炎。1962年 Ward和Krugman^[5]报告, 在疾病急性期的早期, 黄疸出现前后, 病人粪便及血清中都可以检测到传染性肝炎病毒。这种病毒无论经口、皮下或皮内感染, 其潜伏期之长短变化不大。这些作者从威洛布鲁克 (Willowbrook) 精神病院的传染性肝炎患童身上分离到一株病毒, 叫作 WBRK 株, 该病毒引起的肝炎一般为轻型肝炎。以粪便悬液经口感染或以患者血清肌肉注射感染, 其潜伏期短者35天, 长者56天, 平均约45天。通过一系列实验后, 他们发现一般情况下病毒在疾病的潜伏期即可随粪便排出, 时间相当于经口感染的第25天或黄疸出现前的 2—3 周。他们的所见与1946年 Francis 等^[5]的发现基本一致, 后者曾报道, 在初次症状出现前的 3 天或黄疸出现前的16天病人可以发生病毒血症。Ward 等人的实验表明, 注射极少量肝炎患者血清或血液就可以传递传染性肝炎。比如, 用 WBRK 株病毒肌肉注射0.025毫升血清, 10个受试者中有 6 人发生了黄疸型肝炎, 甚至再稀释10倍, 用 0.025 毫升肌肉注射, 仍有人发生无黄疸型肝炎 (1/11)。

1967 年 Krugman 等^[6]根据他们十多年来对纽约州威洛布鲁克精神病院中大量传染性肝炎的观察, 认为该单位可能存在临床上、流行病学上和免疫学上两种型别不同的病毒性肝炎。他们在该院对新入院的病童“志愿者”进行实验性感染并分离病毒。受试儿童年龄约在 3—10岁, 每批试验包括 6—14个儿童。所有人均在试验前采血, 感染开始后每周或经常采血。受试儿童受到临床观察和肝功能的生化检查, 如血清胆红素 (正常值1.0毫克/100毫升)、

表1-1 Krugman等分离肝炎病毒MS-1, MS-2的经过简况

试验批号	感 染 物	感 染 途 径	受 试 人 数	平均潜伏期 (天)	对 照 人 数
1	WSP-5①	经口100毫升	11(6)①		2 (1)
2	WSP-5	肌肉0.25毫升	10②(6)		3 ②(0)
3	MS-1②	肌肉0.1—0.2毫升	8 (7)	31—53	6 (6)
4	MS-2②	肌肉0.25毫升	9 (7)	41—69	5 (2)
5	MS-2	经口0.5毫升	6③(5)	64—209	3 (0)
6	MS-2	经口0.5毫升	6 (5)	88—108	0
7	MS-1	肌肉0.2毫升	8④(0) 8⑤(7)		0 0

注: ① WSP-5, 代表27名肝炎患者黄疸前 3—7 天的混合血清。

② MS-1, 为患者Mir两次发生肝炎中第一次发病前一星期的血清。

③ MS-2, 为患者Mir第二次发病前 5 天的血清。

④ 括号内为发病人数。

⑤ 这13名即第一批试验中的受试者, 在第二批试验时作了调整, 从原受试者中抽 3 人作为第二批实验的对照, 而将原来 2 个对照者本次作为受试者。

⑥ 这 6 人在经口感染后一周给予肌肉注射丙种球蛋白, 每磅体重0.01毫升。

⑦ 这 8 人在第三批试验中曾受MS-1感染。

⑧ 这 8 人在第四批试验中曾受MS-2感染。

麝香草酚浊度试验(TTT, 正常值为6单位)、血清谷草转氨酶(SGOT, 正常值为100 Karman氏单位)及尿中的胆红素。潜伏期是从暴露后到第一次出现SGOT异常算起。前后共进行七批试验, 实验经过参见表1-1。

他们用采自27名肝炎患者黄疸前3—7天的混合血清(WSP-5)作为感染原, 第一批试验感染了11人, 每人经口喂以100毫升血清。另2人作为对照。过一个月之后有10人先后发生肝炎, 其中6人的潜伏期为30—36天, 3人为51—58天, 1例黄疸见于125天。在前6人中, 有一名代号为Mac的儿童于97天第二次发生自然感染(黄疸型肝炎), 这相当于头次发病后的67天。2个对照者中有1人发生无黄疸型肝炎。这批实验中既然10个受感染而发病的人潜伏期长短不一, 而且病例Mac在头次发病的两个多月后又发生第二次肝炎, 因此推想WSP-5混合血清中很可能同时有两型肝炎病毒。为了证明这个设想, 作者在半年后仍以第一批试验中的儿童为对象, 选取原受试者8人, 加上原对照2人当作第二批试验中的实验者, 原受试者中的另3人作为对照。实验组肌肉注射0.25毫升WSP-5, 结果有6人发生肝炎, 其中2人是上次试验中的对照者, 另4人(Sch., Mas, Wac., and Mir)都是两次发病。第一次的潜伏期为35—51天, 第二次为66—82天。第一次发病时SGOT异常的天数为5—17天, 第二次拖长到17—64天。据此, 作者认为可能存在两型肝炎病毒。于是选择了两次均发生黄疸型肝炎的患者Mir的血清, 用以进行下一步感染实验, 第一次发病前一星期的血清命名为MS-1, 第二次发病前5天的血清命名为MS-2。

以后几批实验证明, 以MS-1肌肉注射感染发病者潜伏期短(31—53天), SGOT呈尖峰状增高(3—19天), 病后可以防止同型病毒的再次侵犯, 密切接触的对照者多数受到感染。以MS-2肌肉注射感染而发病的人潜伏期较长(41—69天), 患者的SGOT缓慢上升, 持续时间较久(35—200天), 麝香草酚浊度多正常, 患病后对MS-1无交叉保护力, 密切接触的对照者只有少部分受到感染。如果以MS-2毒株经口感染, 发病者的潜伏期明显拖长, 最长达209天。此外, 感染MS-2之后一星期给患者注射丙种球蛋白不能防止发病。根据以上实验, 作者认为显然存在着免疫学上完全不同的两型肝炎病毒, MS-1引起的为典型的传染性肝炎(甲型肝炎), 而MS-2则引起同种血清肝炎(乙型肝炎)。他们指出, 潜伏期可以从暴露时起算到第一次出现SGOT异常, 也可以算到黄疸出现之时, 这样, MS-1的潜伏期平均为35或37天, MS-2的潜伏期为54或71天。

Boggs⁽⁷⁾于1970年指出, 从Krugman等人实验室得到的MS-1株虽是引起儿童发生传染性肝炎的病毒, 但经他们在成人“志愿者”(囚犯)身上经口感染也能引起部分成人发生肝炎, 潜伏期大约24—44天。此后, 许多学者都证实了MS-1确系甲型肝炎的病原因子^(17, 19, 20), 而MS-2与布卢姆伯格发现的乙型肝炎病毒的抗原性基本一致^(8, 9)。这些年来, 这两型病毒对甲型、乙型肝炎的病原学、临床、流行病学、免疫学和预防等方面的研究提供了良好的手段, 做出了相当大的贡献。但也不可否认, 由于只能在人体上进行实验, 因此关于它们的物理化学性质、生物学特性、预防和治疗等方面的研究受到了一定的限制。

2. 猿猴实验感染的发现与甲型肝炎病毒的GB株及CR326株

1967年, 美国学者Deinhardt等⁽¹⁰⁾报告了引人注目的研究。他们连续五年对南美一种小型灵长类动物猿猴(marmosets)用传染性肝炎病人(GB)的血清进行感染, 观察其能否当作实验室的敏感动物。当时所用的猿猴有白唇毛面猿猴(*saguinus fuscicollis*), 白唇猿猴(*s. ni-*

gricollis) 及一种头毛如棉花的狨猴 (*s.oedipomidax*)。先后共进行六批实验。前五批实验中每只狨猴静脉注射 0.5 毫升 1 : 2 稀释的急性肝炎病人早期的血清。第六批实验所用的材料为非肝炎病人材料, 同时平行进行组织培养。结果根据生物化学及形态学检查, 发现有两批狨猴发生了典型的肝炎组织损伤, 而且能够由狨猴到狨猴连续传代下去。在狨猴身上由于反复通过, 病毒的毒力逐渐加强。这是世界上第一次发现的对传染性肝炎病毒敏感的动物模型。

Park 等^[11, 12] 1969 年报道, 他们将人肝炎材料接种给狨猴后也看到狨猴出现血清转氨酶增高与肝组织变化, 但这种变化并不明显地大于对照组狨猴, 因此他们认为这种肝炎病毒可能是狨猴身体内固有的病毒。

Holmes 等^[13] 报道, 他们给 3 名“志愿者”口服 MS-1 病毒, 这些人先后经过 27、29 及 31 天发病, 经组织活体检查确诊为肝炎。在 29 天及 30 天后从这 3 个人取血作为感染的标本。每个病人取接种前及急性期的血清各感染 5—6 只狨猴, 观察狨猴出现肝炎的情况。表 1-2 列举了他们的实验。由表看出, 狨猴的肝炎都是在感染人的肝炎病毒后发生的, 所以绝非狨猴本身的潜伏肝炎。

Deinhardt 等^[14] 列举了各实验室感染狨猴的实验, 发现 95—100% 的狨猴在接种肝炎患

表 1-2 用感染 MS-1 的“志愿者”发病后急性期血清感染狨猴的实验^[13]

病 人	血 浆 标 本	受接种的狨猴数日	发 生 肝 炎 的 狨 猴 数 目	潜 伏 期 (天)
R.F	接 种 前	6	0	34, 41, 41, 41, 48
	急性期(29天)	6	5	
F.R	接 种 前	6	0	33, 33, 40, 40, 40
	急性期(30天)	6	5	
G.C	接 种 前	5	0 ●	36, 36, 36, 36, 51
	急性期(29天)	6	5	
对 照	无	8	0	

● 本组有一只动物在第 60 天时血清酶升高, 但肝活检正常。

者的血清或粪便浸液后都发生了典型的肝炎症状, 多数没看到有自然性肝炎。此外, 他们引证了自己和 Holmes^[13] 的实验, 说明三例“志愿者”在接种前的血清不含有病毒, 用以接种狨猴没有引起任何异常反应。但是采用 3 例发病急性期的血清感染狨猴, 多数动物在一个月之后即发生肝炎。可见, 狨猴对人肝炎病毒的感染是敏感的。越来越多的证据说明, 从狨猴分离出的肝炎病毒就是人的肝炎病毒, 而非狨猴身上潜伏的病毒。Lorenz 等^[15] 用 Deinhardt 氏的肝炎病毒及传染性肝炎病人的血清感染狨猴 (*saguinus mystax*, 一种上唇为白胡须的狨猴), 结果 SGOT 增高 3—10 倍, 肝细胞发生坏死, 而对照或接种乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 阳性血清的动物却无此种变化。这个结果进一步证明了 Deinhardt 关于狨猴可以感染人的甲型肝炎的报道。

1973 年, Mascoli 等^[16] 进一步从哥斯达黎加选了 7 名甲型肝炎儿童及 1 名乙型肝炎患者, 在发病前的 42 天及发病后的 11 天采集血液标本, 血清作 1 : 5 稀释。每份血清接种至少

2只狨猴，每只接种量为0.25—0.5毫升。结果7例甲型肝炎患者中有5人的血清引起狨猴发生肝炎。表1-3列出了他们的实验情况。其中有2个患者（206-033-03和068-330-08）的血清在狨猴身上连续通过3代，全部狨猴发生了肝炎。206-033-03血清感染狨猴后的传代病毒，后来命名为CR326株病毒。从第三次及第四次通过中曾滴定其感染性，50%的感染剂量

表1-3 人甲型肝炎病人血清感染狨猴的试验^{〔16〕}

病 例	患者年龄	狨 猴 种 类 及 数 量	第 一 次 通 过		第二次通过	第三次通过
			肝 炎 阳 性 动 物 数	肝 组 织 改 变 动 物 数		
甲型肝炎						
206-033-03	9	6m	6/6	3/3	6/6 5/5	3/3 3/3
206-033-07	2	4m	4/4	4/4		
206-033-02	11	6m	2/6	2/2		
068-330-08	7	6m	6/6	5/5	4/4 4/4	6/6 6/6
203-035-09	8	4m 1n	1/5	0/5		
038-153-05	5	2n	0/2	0/2		
211-156-04	6	1m 3n	0/4	0/3		
乙型肝炎						
202-039-05	20	6m	0/6	0/6		

注：m—白须狨猴，n—白唇狨猴。

为 $10^{2.5}—10^{4.5}$ ／毫升。后来，他们连续五年使用甲型肝炎或乙型肝炎的急性期前、急性期及恢复期病人的血清，正常山羊血清，磷酸缓冲盐水及人的免疫球蛋白等共接种了274只狨猴，观察注射后的反应。结果证明，多数甲型肝炎病人急性期的材料可使狨猴发生感染，少数恢复期病人血浆也可使其感染，但乙型肝炎病人的材料、正常山羊血清、人免疫球蛋白及磷酸缓冲液则不能使狨猴产生肝炎症状或肝组织损害。因此，他们的工作进一步确证了Deinhardt等工作的可靠性，同时还分离到一株狨猴肝炎毒株CR326。

Provost等^{〔17〕}报告，他们通过在狨猴身上作的中和试验证明：(1)自然发生的甲型肝炎病人4例，其发病前期的血清不含有抗CR326株的抗体，但其恢复期血清都含有抗CR326株的中和抗体。(2)4名以MS-1株病毒经口感染的“志愿者”，对其双份血清进行检测，证明对CR326株的中和抗体在恢复期血清中明显增加，但另一名以MS-2感染者则不产生对CR326株的中和抗体。(3)人的免疫球蛋白可以中和CR326株病毒，但山羊抗人球蛋白则没有中和作用。

从以上实验可以看到：(1)既然甲型肝炎病人的恢复期血清含有能够中和CR326株病毒的抗体，说明在免疫学上CR326株病毒与甲型肝炎病毒关系极为密切。(2)接受MS-1株病毒实验感染的“志愿者”，其恢复期血清也含有对CR326株的中和抗体，可见MS-1株与CR326株病毒在免疫学上同样密切相关。(3)人的免疫球蛋白一般认为可以预防或抑制甲型肝炎的发生，既然它能中和CR326株病毒，同样说明CR326株病毒和甲型肝炎病毒在免疫原上是相当一致的。

Holmes等^{〔18〕}报告了他们在狨猴身上感染甲型肝炎成功后，继续狨猴实验感染的初步结果，他们使用了Deinhardt等^{〔10〕}以前曾用过的三种狨猴，先后实验6次，凡接种甲型肝炎急

性期血清或血浆者，多数猿猴发生了感染。但是，接种正常血清白蛋白或对照者的血清或血浆者，猿猴全部正常。从而进一步肯定了猿猴是一种对甲型肝炎病毒敏感的实验动物。Maynard等⁽¹⁹⁾用MS-1，MS-2和正常人血清感染猿猴。初次接种时，以MS-2株病毒和正常人血清各接种10只猿猴，没有一只发生肝炎，但是，20只接种MS-1株病毒者有9只猿猴发生了肝炎，而且再连续3次通过猿猴都引起了肝炎。第二次通过时19只中有8只阳性，第三次通过时7只中3只阳性；到第四次通过时8只猿猴全都发生了肝炎。可见，甲型肝炎病毒MS-1株在猿猴身上代传通过时，通过次数增多，则病毒的毒性也一次比一次增强。这种现象，Deinhardt等⁽²⁰⁾也有类似的发现。他们看到MS-1株在猿猴身上多次通过后，当其再感染猿猴时，病猴比初次通过时更易使其他猿猴发生接触感染。

总之，从1967年Deinhardt等第一次报道用甲型肝炎病人(外科医生GB)急性期血清感染猿猴成功，到目前已经十多年，而其他研究工作者也通过实验确证了他们的发现。至此，在人类以外终于找到了一种对甲型肝炎敏感的实验动物，这对进一步全面研究甲型肝炎的病原学、疾病的诊断、治疗和预防等无疑提供了一个新的手段。不过，猿猴为南美野生动物，要大量供应目前仍比较困难，预计随着科研工作的进展，这些问题将会逐步得到解决。

1973年，Holmes和Deinhardt⁽¹⁸⁾通过在猿猴身上进行的交叉感染及攻击试验发现，从猿猴身上分离到的甲型肝炎病毒GB株与从人体分离到的MS-1株两者在猿体上相互不能引起对抗异株的免疫力，各自只能保护猿猴不受同株病毒的再感染。1975年Deinhardt⁽²⁰⁾进一步报告，GB株病毒不仅在免疫特性上与MS-1株有所不同，不能互相保护(作者指出，若先感染GB株，再以MS-1株攻击时，仍可出现一定的保护力)，而且用这两株病毒经口感染

表1-4 两株甲型肝炎病毒的特性⁽²¹⁾

	GB 株	MS-1 株
形 态	?	立方体的病毒颗粒
大 小	约20—30毫微米或小些	20—30毫微米
在氯化铯中的浮密度	1.18—1.23 (血清中有传染性的颗粒)	1.32—1.34 (粪便中的颗粒) 1.18—1.27 (血清中有传染性的颗粒)
稳定性: 50%乙醚 4℃, 12小时 20%乙醚 4℃, 12小时	部分灭活 稳 定	未 试 稳 定
温度: 56℃, 30分钟 60℃, 30—60分钟 100℃, 55分钟	稳定或灭活 ^① 灭活(30分钟) 灭 活	未 试 稳定(60分钟) 灭 活
人免疫球蛋白中和试验	可 疑	阳 性

① 不同实验室的结果。

猿猴时潜伏期也稍有差别。GB株感染猿猴时潜伏期为12—47天，而MS-1感染后约为28—63天。此外，在物理化学性质方面亦有些差别(参见表1-4)。另外，猿猴受MS-1感染后可以对粪便中的肝炎抗原及对CR326株产生抗体，但感染GB株的猿猴则不产生上述两种抗体。

综上所述，猿猴对甲型肝炎病毒是敏感的，无论经胃肠外或经口感染都可以引起发病。

目前至少从狨猴分离到两株肝炎病毒毒株，即 GB 株及 CR326 株。其中 CR326 株从物理化学性质及抗原特性上都与从人体分离到的 MS-1 株病毒比较一致，可以被肝炎病人恢复期血清或混合的免疫球蛋白所中和。动物接受 MS-1 或 CR326 毒株感染后可以发生交叉保护作用。另一株病毒 GB 株感染狨猴后与 MS-1 或 CR326 株只发生轻度交叉保护作用，但若先感染 MS-1，后用 GB 株攻击，则不出现交叉保护作用。人或狨猴的恢复期血清不能中和 GB 病毒。看来，GB 株病毒与甲型肝炎病毒的关系究竟如何，有待进一步研究。

3. 猩猩的实验感染

为了寻找传染性肝炎实验感染的敏感动物，多年来人们已作过各种尝试，但都没有取得成功。猩猩就是对象之一。既然乙型肝炎表面抗原可以持续存在于猩猩的血循环中，又能产生相应的抗体^[21, 22]，而且有些学者已经成功地在猩猩身上引起了乙型肝炎实验性感染^[23-25]，那么，猩猩对甲型肝炎病毒的敏感性怎样呢？为什么过去在猩猩身上感染肝炎病人急性期的血清都遭到了失败呢？Smetana^[26]于1965年指出，猩猩之所以实验感染不成功，可能因为它们以往已经受到自然感染的缘故。他们的根据是，某次从非洲进口一批猩猩，在到达30天后有只动物突然发生自然性肝炎，而且两名饲养员各在30天及45天后也发生了肝炎。猩猩的临床症状、实验室检查和肝组织的病理变化都和肝炎病人是一致的。据此，他认为猩猩的肝炎与人的肝炎可以相互传染。显然，猩猩如果以往曾受到传染性肝炎的自然感染，其体内已产生免疫力，因此实验感染也就往往失败。

1974年 Maynard 等^[27]报告，他们以含有大量 27 毫微米病毒样颗粒的粪便浸液接种猩猩，成功地引起了病毒性肝炎，而且猩猩的粪便也排出同样的病毒样颗粒，血清中还出现了对该颗粒的抗体变化。Purcell等^[28]报道，他们检查了一些灵长类动物血清中抗甲型肝炎病毒的抗体情况，发现部分猩猩、恒河猴和赤猴(patas monkey)等皆含有抗甲型肝炎病毒的抗体，说明这些猴在天然情况下已经受到了甲型肝炎的感染。他们用抗体阴性的猩猩作甲型肝炎病毒的实验感染，也获得成功。另外，在抗体阴性的恒河猴身上作感染实验，也看到了阳性血清反应。这类研究工作现仍在进行之中。

表1-5 灵长类动物血清中抗甲型肝炎抗体的情况^[28]

灵 长 类	被 检 动 物 数	含 抗 体 的 动 物 数
猩猩	24	8
野生者	8	8
人工饲养者	16	0
恒河猴	12	4
赤猴(Patas monkey)	4	4
非洲绿猴	5	1
狒狒(baboon)	4	0
拉猴(cebus monkey)	4	0
狨猴(S. mystax)	19	0

血清抗体阴性的猩猩在用曾受 MS-1 感染的成人“志愿者”(囚犯)的粪便感染后，猩

猩确实发生了肝炎，而且粪便中出现了类似的甲型肝炎抗原，转氨酶异常增高，肝组织也发生了改变。实验情况见表 1-6。

表1-6 猩猩 的 实 验 感 染^[28]

猩猩编号	接种途径	接 种 后 异 常 变 化 出 现 的 天 数				
		粪 便 甲 型 肝 炎 抗 原	SGPT ^① 首次上升时间	SGPT 峰 值 时 间	首次出现抗体	IgM的峰值
753	静 脉	15—25	22	26	22	22
714	经 口	27—28	29	36	26	33

● SGPT——谷丙转氨酶。

Maynard 等^[19, 29]也以甲型肝炎病人粪便浸液感染猩猩。经预先检测,这些猩猩的HBsAg和乙型肝炎表面抗体均阴性。感染材料取自 7 名病人发病后 3—10 天,即转氨酶达到峰值前的粪便浸液。患者系亚利桑那州立大学一次食物污染引起的流行中罹患肝炎者,粪便浸液中含有 27 毫微米的病毒样颗粒,命名为 Phx 抗原(Phoenix antigen,译为菲尼克斯抗原)。3 只动物受感染,每只静脉注射 1 毫升,结果全部发生肝炎。感染后 17 天 SGPT 开始增高,维持约 12—22 天,组织活检看到了肝炎所特有的组织改变。所有动物也都产生了抗 Phx 抗原的抗体。猩猩的粪便中在感染后 14—18 天出现病毒颗粒,持续时间约 3—5 天。作者根据实验所见认为,人和猩猩粪便中甲型肝炎抗原颗粒从形态和免疫学上是完全一致的,因此,这种颗粒近似甲型肝炎病毒,或本身就是甲型肝炎病毒。Maynard 等对亚利桑那州立大学 1 例患者与 1 例感染 MS-1 的囚犯“志愿者”的双份血清对 Phx 抗原及 Joliet 抗原(系囚犯“志愿者”粪便中的抗原,即 1973 年 Feinstone^[32]免疫电镜中所观察的病毒样颗粒)的作用作了比较,发现两个病人的恢复期血清都有抗体可同时和两种抗原发生反应。这说明 Phx 抗原与 MS-1 株病毒在免疫学上基本上是相同的。Dienstag 等^[30]也报告,他们成功地用甲型肝炎病毒使猩猩发生了感染。

Schulman 等^[31]以肝炎病人的粪便浸液给两只猩猩静脉注射,动物分别于 19 天和 20 天血清中谷丙转氨酶(SGPT)异常增高。另一只猩猩静脉注射来自发生实验性肝炎的猩猩的粪便浸液,经过 21 天后,被感染猩猩的谷丙转氨酶也开始增高。3 只猩猩粪便中都看到了甲型肝炎抗原,在恢复期血清中测到了相应的抗体。猩猩的肝脏、胆汁及粪便悬液经过氯化铯中同密度区带离心,测定甲型肝炎抗原的浮密度,结果肝浸液中为 1.32—1.33 克/毫升,胆汁中为 1.29 及 1.34 克/毫升,粪便中则有两个峰值,分别为 1.32—1.34 及 1.37—1.39 克/毫升。在免疫电镜下,粪便中的甲型肝炎抗原均呈实心颗粒,在肝浸液及浮密度为 1.34 克/毫升的胆汁中也都是实心颗粒,而在 1.29 克/毫升浮密度的胆汁中几乎全部为空心颗粒。

综上所述,除了狨猴,最近又成功地证明猩猩也是甲型肝炎病毒的敏感动物。过去许多人实验感染猩猩之所以不成功,原因是动物以往已发生过自然感染,体内已出现了免疫力。因此,目前在实验感染前必须先测定其血清中是否有甲型肝炎抗体,抗体阴性者始可选作实验对象。Purcell 等发现,恒河猴及赤猴的血清中也含有甲型肝炎的天然抗体,如果确属如此,则恒河猴等也有希望成为甲型肝炎病毒的敏感动物。这将给甲型肝炎的研究带来极大的方便,并可克服狨猴及猩猩稀少和昂贵的缺点。

(二) 甲型肝炎病毒的形态及理化特性

Feinstone 等^[32]使用免疫电镜技术观察受 MS-1 株病毒感染的“志愿者”急性期的 2% 粪便浸液,发现了一种 27 毫微米的病毒颗粒,同时在病人恢复期血清中看到可以与这种病毒颗粒相作用的抗体。这种病毒样颗粒是立方对称形,类似细小核糖核酸病毒 (Picornavirus) 或细小 DNA 病毒 (Parvovirus)。有的呈空心颗粒,有的为实心颗粒。联合国病毒性肝炎专家委员会 1976 年 10 月^[33]对甲型肝炎病毒下的定义也是如此。Bradley 等^[36]在亚利桑那州立大学学生中甲型肝炎流行时从病人粪便中分离到的 Phx 抗原,在电镜下观察也是 27 毫微米。Almeida 等^[34]在急性甲型肝炎病人粪便浸液中用电镜观察,除了看到 27 毫微米的颗粒外,还看到了 22 毫微米和 30 毫微米的实心与空心颗粒。

Provost 等^[38]根据 CR326 株出现在猴肝细胞的原浆之中,而且可以用吡啶橙染色的特点,认为甲型肝炎病毒属于 RNA 病毒。但甲型肝炎病毒的核酸类型至今尚未明确定性。

甲型肝炎病毒对乙醚及氯 (lppm) 的作用有抵抗力^[36]。98℃ 加热 1 分钟可使其灭活^[37],但加热 60℃ 1 小时只有部分灭活。1:4000 福尔马林在 37℃ 下作用 3 天可使 CR326 株灭活^[38]。但在低温下数年不会改变其形态或破坏其传染性。

(三) 流行病学

甲型肝炎的传染源主要为病人。潜伏期一般约 2—8 周,平均约 30 天左右。一般在疾病的急性期、转氨酶升高前大约 5—7 天或黄疸出现前后,病人的血液及粪便中就会出现病毒,所以潜伏期及急性期病人的血液及粪便均有传染性。临床上无黄疸型或亚临床型甲型肝炎明显地多于黄疸型肝炎,比如有的报告说^[39],在成人中黄疸型与无黄疸型肝炎的比例为 1:1,儿童甚至达 1:2;另一种说法^[40],两者的比例为 1:10。这样,因为许多患者难于发现,以至难于进行隔离治疗等,便成了潜在的传染源。甲型肝炎病人通常在恢复期血清中即可出现特异性抗体,所以血清及粪便中的病毒的传染性短期内即行消失,长期带毒者比较少见。

甲型肝炎可侵犯所有的年龄组,但以侵犯儿童及青年为多。

甲型肝炎病毒主要从粪便排出体外,通过污染的手、食物及用具等经口传染,平时主要由于人与人之间的密切接触引起散发性流行。卫生情况不良或过分拥挤的居住条件都会促使其蔓延。据文献记载,甲型肝炎曾因水源或食物的污染引起过多次暴发流行,现简要介绍于下。

1. 水源性流行

世界各国曾经发生过多次由于饮水被污染而引起的流行。Mosley^[41] (1959) 曾对从 1895—1957 年的 60 多年中世界各地所发生的 28 次水源性流行作了综合介绍。其中最大的一次暴发流行发生在 1955 年 12 月到 1956 年 1 月期间,印度新德里市 29000 人发生了黄疸型肝炎。这次流行主要是由于在发病高峰前大约 6 个星期该市的水源有一周光景受到了下水污染^[6]。1966 年 Taylor^[42] 又一次对水源性流行作了综述,列举了 25 次美国及其他国家的流行简况。

作者认为,任何水源,包括井水、泉水或地面水,只要消毒处理不彻底,都可以成为甲型肝炎暴发性流行的传播媒介。1971—1974年美国发生了13次水源性暴发流行,病人达351人^[43]。

2. 食物引起的流行

污染的牛奶、菜肴等都可以引起甲型肝炎的流行。1975年 Leger^[44]报道,1973年10月至12月在美国亚利桑那州立大学学生中发生了一次由食物引起的肝炎流行,发病人数共40人。调查结果表明,传染源为学生们经常用膳的两个饭馆。这两个饭馆各有一名制做菜肴的厨师正是这次流行的来源。在这次流行中,从7例患者急性期粪便中分离到27毫微米的病毒,经血清学证明与MS-1株病毒抗原性是一致的^[45]。1977年 Danes^[46]等也报道了食堂职工由污染食物引起的甲型肝炎流行。

3. 水生生物引起的流行

牡蛎、贝蛤等贝壳类动物或其他海产物也可以传播甲型肝炎^[38, 39, 43, 47]。Gard 曾报道^[38],瑞典西海岸一个小渔村的两个海产品批发商店,因他们出售的牡蛎引起了629人患传染性肝炎,其特点是发病者全是25—60岁的成人,没有一个儿童。经追踪得知,在一个海产品批发商店中有一名职员曾在本次流行发生前约25天发生过肝炎,在疾病的潜伏期及发病初期他的粪便未经消毒处理便倒入了海港,那里正有大量牡蛎储存。受污染的牡蛎,引起了这次肝炎的暴发性流行。Mason^[48]报告,1961年头三个月由于食用密西西比州波斯卡高拉(Poscagoula)河口打捞的生牡蛎引起了80例的肝炎流行。在这次流行中,有一家人中凡是吃了油煎牡蛎者都没有得病,而那些吃生牡蛎的人,那怕是咬了一点点也发生了肝炎。Diens-tag^[49]报道,澳大利亚墨尔本市一家14口人由于吃了未煮熟的牡蛎而引起甲型肝炎流行。在吃牡蛎之后一个月左右全家有7人发生肝炎,血清学(免疫粘附血凝试验)试验证明病人体内含有抗甲型肝炎病毒的抗体。

4. 猩猩等灵长类动物引起的肝炎

据报道^[39],从1961—1971年曾发生37次灵长类动物引起的肝炎流行,受牵连的人达160名。多数病例与新近进口的猩猩有关,发病率最高的是饲养员、兽医或其他与动物密切接触者。人被感染后发病较轻,多为亚临床型,与甲型肝炎无法区别。Smetana^[20]看到一只患肝炎的猩猩传染了两名饲养员。Dienstag^[60]报道,他们应用免疫粘附血凝试验对因接触从非洲进口的患病猩猩而感染的人和毛猴等测定了血清中所含的抗体。结果发现,在这些受感染的人或灵长类动物的恢复期(或晚期)血清中都产生高滴度的抗甲型肝炎的抗体,但测不到抗乙型肝炎的表面抗体或核心抗体。从而证实了灵长类动物的肝炎与人类的甲型肝炎的病原因子在免疫学及流行病学上密切相关。

此外,甲型肝炎也可以通过输血或消毒不彻底的注射器传播,但因甲型肝炎病毒在血液中持续时间较短,所以不是主要的传播方式。

Hindman 等^[63]在美国新英格兰州对精神缺陷者病院用放射免疫测定法调查甲型肝炎流行的情况。他们发现,在105例肝炎患者中,有人即使乙型肝炎表面抗原阳性却仍然可以受到甲型肝炎的感染,两种病毒之间没有看到有相互干扰的作用。

(四) 甲型肝炎的特异性诊断方法

目前甲型肝炎病毒仍不能在体外进行分离培养,因为常用的鸡胚及小动物对其不敏感。但自从发现狨猴及猩猩对甲型肝炎病毒敏感以来,人们利用受感染的狨猴肝脏作为抗原开展血清学研究之后,进展相当之快。当然,检测方法还不算多。目前检测甲型肝炎抗原和抗体的方法有免疫电泳法,补体结合法,免疫粘附血凝试验,在狨猴身上的中和试验和固相放射免疫测定技术等。

1. 免疫电泳法

1973年 Feinstone等^[32]报告,他们使用免疫电泳技术在发生实验性肝炎的“志愿者”粪便中看到了甲型肝炎抗原。这种抗原是一种直径为27毫微米的病毒颗粒,可以被病人恢复期的血清所凝聚。他们的工作被以后的 Almeida等^[34]的工作所证实。1977年, Rakela等^[51]比较了免疫电泳法与免疫粘附血凝试验检测甲型肝炎抗体的使用效果。实验表明,用免疫电泳法检测,病人的甲型肝炎抗体出现得相当早,比用免疫粘附血凝试验测到抗体能提前约几个星期,往往当免疫电泳法检测到低滴度抗体的时候,用免疫粘附血凝试验却还测不出来。因此,作者认为即使没有恢复期血清,免疫电泳法也可以用作临时性诊断。

有人认为,免疫电泳法比常规电泳检测敏感1000倍,病毒数量即使少到每毫升 10^4 — 10^6 颗粒,熟练的技术人员都可以将其检出。本法的困难在于粪便悬液中存在大量病毒、细菌、噬菌体以及其他抗原,而且病人恢复期血清中还可能在对其他抗原的特异性抗体,因此当粪便悬液和血清作用后,如何正确鉴别,找出甲型肝炎抗原,这就要求操作人员必须具备丰富的实践经验。还必须注意,通常甲型肝炎病毒在患者血清转氨酶增高或症状出现之前开始由粪便排出,短时间内将有大量病毒排出,一旦黄疸出现,病毒排泄量往往急剧下降,因而,不少病人就医时,粪便中肝炎病毒已经不多,甚至不易查到了。

现将具体操作^[52]方法介绍于下:

粪便悬液的制备。以含有0.5%牛血清白蛋白的小牛肉汤将粪便制成2%悬液,用玻璃珠震摇5分钟(每10毫升容积放置8—10玻璃珠)。然后,在4℃下1500g离心沉淀2小时,再用预先浸过0.5%牛血清白蛋白的孔径为1.2微米或0.45微米的醋酸纤维膜滤过,备用。

检测。取0.9毫升2%粪便悬液,加入0.1毫升1:10特异性甲型肝炎抗血清,室温培育1小时,4℃下47000g离心沉淀90分钟,弃去上清液。再加入0.05毫升去离子水,使沉渣重新悬浮,加入0.05毫升3%磷钨酸(pH 7.2)混合作负染色。然后于40000—60000倍电泳下检查甲型肝炎病毒颗粒。

用同法,在已知含有甲型肝炎病毒颗粒的粪便悬液中,加入未知血清标本,则可对抗体进行定量测定。

2. 补体结合试验(CF test)

Provost等^[53, 54]用CR326株甲型肝炎病毒感染狨猴,当其血清转氨酶发生异常增高时杀死取其肝脏,用磷酸缓冲盐水制成10%肝脏悬液,低速离心,取其上清液当作抗原。实验

前,上清液在56℃加热两小时,然后1:2稀释备用。对照组用未感染的狨猴肝脏制成同样浓度悬液。补体为豚鼠血清,正式试验时采用4℃过夜。绵羊红细胞用1%浓度。结果判定以发生50%补体结合者作为最高滴度。

作者发现,本法常发生抗补体现象或出现抗正常肝脏的抗体,但其滴度远低于抗甲型肝炎的抗体滴度。对甲型肝炎的CF抗体在发病后不久即可产生,约在一个月时达到高峰,然后维持相当长时间(约185天),最长者可达7年而滴度不变。

他们比较了免疫粘附血凝抗体与补体结合抗体产生的情况,发现免疫粘附血凝抗体往往比补体结合抗体出现得晚,但其滴度要高得多。比如3例甲型肝炎病人发病前免疫粘附抗体皆小于1:5,病后则达1:10240—1:81960,而补体结合抗体发病前为1:5—1:20,病后为1:640—1:12800。

3. 免疫粘附血凝试验(IAHA)

1975年,Miller等^[55]首先报告用感染CR326株甲型肝炎病毒后27天的狨猴肝脏,将其用磷酸缓冲盐水制成10%的悬液,然后进行同密度区带离心,取其在氯化铯中浮密度为1.32—1.36克/毫升者,再对磷酸缓冲盐水透析,所得即为免疫粘附血凝试验的抗原。

免疫粘附血凝试验的原理^[56]是在正常人血清中含有补体成分C_{3b},它一旦出现于红细胞的表面,就会使红细胞发生免疫粘附现象,在体外试管中形成凝集。可是,血清中还含有一种抑制C_{3b}活性的抑制物,使C_{3b}丧失其活性,若加入二巯基乙醇(Dithiothreitol)即可消除血清中的C_{3b}抑制物的作用,促使抗原、抗体、补体与红细胞发生免疫粘附血凝现象。Hilleman等^[54]的研究表明,甲型肝炎病人可以产生免疫粘附抗体,并维持较长时间,但这种抗体较补体结合抗体出现得晚。此外,他们用IAHA检查了一批动物,发现在灵长类动物中猩猩、恒河猴及grivet猴对甲型肝炎病毒有天然的免疫粘附抗体,而在狒狒、长臂猿(Gibbon)、蜘蛛猴(Spider monkey)、狨猴等动物未发现此类抗体,其他在猪、大白鼠、豚鼠及地鼠等也都没有发现。

Krugman^[57]曾对20例甲型肝炎病人的473份血清标本检查了免疫粘附抗体及补体结合抗体。结果发现,补体结合抗体的产生早于免疫粘附抗体约一周,峰值介于1:640—1:1280,可持续10年之久。至于免疫粘附抗体,病前多呈阴性(<1:5),病后1—4周产生高滴度抗体(≥1:1024),几个月后达峰值(≥81900),5—10年后仍介于1:640—1:20480。作者认为,补体结合试验不如免疫粘附血凝试验的特异性强。

Moritsugu等^[58]和Dienstag等^[59]用患者粪便悬液代替狨猴或猩猩的肝脏制备免疫粘附血凝试验的抗原,这就大大方便了本试验的开展。Dienstag等^[59]选择Krugman等^[8]1967年实验感染MS-1株病毒的儿童15人,取其接种前及接种后2年5个月至7年的血清(已在-20℃储存5—10年)用免疫电泳、免疫粘附血凝试验及放射免疫测定等方法比较检测甲型肝炎抗体。结果发现,放射免疫检测法的抗体滴度一般低于免疫粘附抗体的滴度,而免疫电泳法的阳性分级与免疫粘附抗体的滴度也不成线性关系。作者认为,从特异性、敏感性及操作的繁简程度来看,免疫粘附血凝试验不论其抗原来源如何,对于大量血清标本的检测,不失为一种最有用的血清学方法。

近年来,已有一些使用免疫粘附血凝试验进行甲型肝炎血清学调查的报道。Gust^[60]等在澳大利亚墨尔本市对1971—1974年住入费尔菲尔德传染病院的26例肝炎病人用免疫粘附

血凝试验检查有无甲型肝炎抗体。结果表明,有16人属于6个家庭,其中14人确证为甲型肝炎;另10人中也有8例证明为甲型肝炎。这些病人很少在发病后3周内测到免疫粘附抗体,多数在4周后呈阳性,滴度上升至8—9周达峰值。这种抗体究竟维持多久,他们还不能确切地回答,但有两个病人的甲型肝炎免疫粘附抗体在病后210天和217天时尚未下降。

Szmunn等^[61]对住院的精神痴呆症患者233人检测甲型肝炎免疫粘附抗体,其中175人为阳性,占75.1%。性别和年龄对阳性率无关。他们看到,甲型肝炎免疫粘附抗体的阳性率与本人既往是否乙型肝炎表面抗原(或抗体)阳性无关。这些患者甲型肝炎抗体的产生不受本身免疫缺损的影响。

Dienstag^[62]用免疫粘附血凝试验对32例不属于乙型输血后肝炎的患者作了甲型肝炎抗体的测定。结果发现,12人输血前及病后恢复期都没有甲型肝炎的免疫粘附抗体,另20人输血前就有免疫粘附抗体,但病后恢复期这种抗体滴度变化不大。因此,他们认为这些患者输血后的肝炎属于非甲型非乙型的新型肝炎。

Rakela等^[63]用免疫电镜法及免疫粘附血凝试验对美国的洛杉矶和阿根廷的罗萨利奥两地甲型肝炎流行中分离的病毒作了物理学及免疫学特性分析。结果发现,(1)两地的甲型肝炎病毒形态一致,大小都是27毫微米,有致密的病毒核心及蛋白外衣(Capsid);(2)美国的病毒浮密度为1.39,阿根廷的病毒浮密度为1.36;(3)用免疫粘附血凝试验证明,美国与阿根廷分离的两株甲型肝炎病毒的免疫性完全一致。

免疫粘附血凝试验的具体操作方法。

(1) 抗原的制备。用实验感染的猕猴肝脏或患者急性期的粪便制备成10%悬液,低速离心,然后在CsCl中同密度区带离心,取浮密度为1.32—1.36克/毫升的组分,最后对磷酸缓冲盐水透析之,所得即为抗原。

(2) 人“O”型正常红细胞,用0.04M EDTA-VBD缓冲液(含有0.1%明胶的佛罗那缓冲稀释液,其配法为:2份0.1MEDTA, pH 7.15,加3份VBD)配成1%浓度或 1.2×10^8 细胞/毫升。

(3) 补体。新鲜豚鼠血清,取自2—3只250—300克体重的豚鼠,稀释成1:75—1:100备用。

(4) 二巯基乙醇。用0.04MEDTA-VBD缓冲液配成3毫克/毫升的溶液。一般用前现配。

操作方法:

(1) 被检血清作两倍稀释,稀释液用上述VBD缓冲液,按0.025毫升加入微量血凝板“U”孔中。

(2) 加入0.025毫升甲型肝炎抗原(4免疫粘附单位)。

(3) 37℃培育1小时。

(4) 加入0.025毫升豚鼠补体震荡2分钟。

(5) 37℃培育40分钟。

(6) 加入0.025毫升二巯基乙醇(3毫克/毫升),震荡2分钟。

(7) 加入0.025毫升正常人“O”型红细胞(1.2×10^8 /毫升)。

(8) 混合,25℃培育1小时。

(9) 观察并判定结果。