

〔美〕熊菊贞 编

临床病毒学的新进展

LINCHUANG BINGDUXUE DE XINJINZHAN

74

人 民 卫 生 出 版 社

序

熊菊贞教授多年来每年在耶鲁大学医学院举办临床病毒学讲习会，这本书是1979年讲习会的讲稿，于1980年又经原讲课者修订。书中介绍了对几种主要病毒病包括肝炎、流感、虫媒病毒感染、单纯疱疹、慢病毒感染和一些不常见的烈性病毒病诊断方面的新进展，也介绍了电子显微镜技术，某些新的免疫学和分子生物学技术在病毒诊断方面的应用。本书叙述比较简单明了，可供传染病医师、防疫工作者和病毒工作者阅读和参考，为此我们特将它译成中文出版。

朱既明

目 录

熊菊贞 (G. D. Hsiung)

1960~1980 年临床病毒学的进展: 20 年的回忆··· 1

June D. Almeida

电子显微镜技术在诊断方面的应用····· 8

Frances W. Doane

病毒形态学对快速诊断的帮助····· 26

W. K. Joklik

病毒的合成与复制: 呼肠孤病毒与痘苗病毒的
比较····· 38

Edwin D. Kilbourne

分子生物学对粘液病毒的临床病毒学的新贡献··· 60

André J. Nahmias

单纯疱疹病毒感染: 一个儿科医生提出的问题
与前景····· 69

William C. Summers

DNA 病毒的分子流行病学: 限制性核酸内切
酶切割部位分析的应用····· 82

Jules L. Dienstag

肝炎病毒组: 定性和诊断技术····· 91

A. Baumgarten

病毒免疫诊断法····· 108

Robert H. Yolken

酶联免疫吸附测定法(ELISA): 病毒和其它传
染性因子的一个快速诊断实用工具····· 132

Robert E. Shope

与虫媒病毒有关的脑炎·····146

John Booss

“慢病毒”脑病和脑脊髓多发性硬化症的免疫缺

陷的类型·····157

Walter R. Dowdle

外来病毒病·····170

1960~1980年临床病毒学的进展：20年的回忆

熊菊贞 (G. D. Hsiung)

美国康乃狄格州退伍军人医学中心病毒实验室及耶鲁大学医学院实验医学系

1979年8月30日收到

过去二、三十年间临床医学领域发生了戏剧性的变化。20世纪50年代初 Enders 等^[1]发现,脊髓灰质炎病毒能够在细胞培养中繁殖。这一突破性的发现不但在脊髓灰质炎的防治上有很大意义,更重要的是影响了整个病毒学界,为组织培养的应用提供了基础。病毒学家们过去和现在仍然赖以进行基础的和诊断的研究。

1960年7月,通过 R. H. Green 的推荐,已故的 J. R. Paul 指派我为耶鲁新港市医院病毒诊断室主任。这个实验室建于数年之前,主要是对疑似病毒感染患者进行诊断。在当时我正从事肠道病毒复制方面的基础研究,而室内其他成员的研究兴趣是脊髓灰质炎^[2]。因此大部诊断技术和设备,原本都是为脊髓灰质炎病毒和其它肠道病毒的分离和鉴定用的。幸而,我是在夏季到任的,正是新港市肠道病毒流行季节,分离所得的大部病毒都是我们大家所熟悉的。可是夏季过后秋冬开始,流感、副流感、呼吸道合胞病毒等出现了。为了完成日常临床实验的任务,学习和设计新方法以提高病毒分离率变得更加迫切了。同时,对病毒的识别和定性方法方面的知识和经验,由于受原来实验室的局限也感到不足,于是

产生了举办进修医师“诊断病毒学”学习班的设想，并于1962年在耶鲁医学院办了第一期。班上学员需要一个手册，于是在1964年作为实验室指南的《诊断病毒学》第一版出版了^[3]。同时学习班按正规举办，开始每年一次，后来隔年一次。班上讲授常见病毒病的临床和实验方面的知识并进行深入的实验室操作，结合使用传染病诊断和病毒复制的基础研究所用的一系列最新发展的技术。

对不同病毒组兴趣的变化

脊髓灰质炎与流感

对于某一特定病毒组的研究上有新的技术的发展，就将引起对该组病毒的高度重视，这种情况非常明显。对每组病毒兴趣的起伏和研究活动的波动反映在《医学索引》(Index Medicus)中发表的报告的数目上(图1)。由于在20世纪60年代初成功地使用了脊髓灰质炎病毒活疫苗，减少了脊髓灰质炎的发病，对于脊髓灰质炎病毒研究的兴趣逐渐下降。另一方面，流感病毒感染的每年散发或流行引起公众的一贯关注，于是在那些年间，对于该组病毒的兴趣保持在稳定的水平上(在1975~1976年，因为有猪流感可能大流行的威胁，或许是那年和后来几年论文数目增多的原因^[4])。

病毒性肝炎

虽然病毒性肝炎早在20世纪60年代初以前就被认为是临床上的重要课题，但发表报告的数目有限。任凭不懈地寻找病毒性肝炎的病原，没有突破。直到20世纪60年代初，在肝炎患者血清中发现澳大利亚抗原，后来叫乙型肝炎表面抗原^[5]。随后，在患者血清中发现Dane颗粒(乙型肝炎成熟

病毒颗粒)^[6]和使用固相放射免疫测定法以过筛乙型肝炎病毒抗原和抗体^[7,8],使肝炎病毒研究得到进一步发展。急性期肝炎病人的粪便中排出甲型肝炎病毒是多年来就知道的,但不能查见甲型肝炎病毒颗粒,直到20世纪70年代初使用电子显微镜检查法才发现了甲型肝炎病毒^[9]。由于使用了较新技术,最近又发现非甲、非乙肝炎^[10]。这种进展从临床和流行病学观点看都是特别重要的,并且反映在20世纪70年代初发表的论文数目骤然增多上(图1)。关于肝炎病毒的进一步讨论,读者可参阅本书 Dienstag 的综述^[11]。

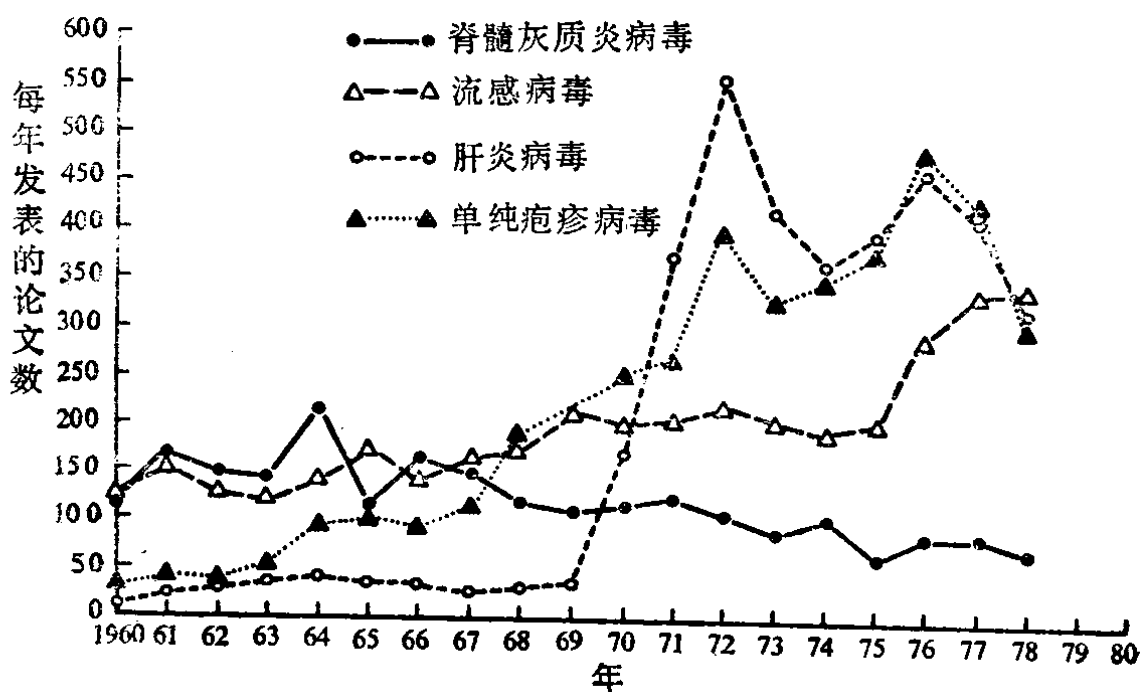


图1 《医学索引》在1960~1978年间每年报导的关于四群代表性病毒的论文数目。图中的曲线表示对不同病毒的兴趣的变化

疱疹病毒组

20世纪60年代初有关疱疹病毒组,包括单纯疱疹病毒的研究论文很少发表,可能因为除偶发的疱疹脑炎病例外,

其余都不是临床上的重要课题。由于单纯疱疹 2 型与宫颈癌在流行病学上的关联^{〔12,13〕}、Epstein-Barr 疱疹病毒与 Burkitt 淋巴瘤^{〔14〕}、鼻咽癌^{〔15〕} 和传染性单核细胞增多症^{〔16〕} 关联的报告，以及肾移植病人中巨细胞病毒的分离率增高和服用免疫抑制药物的患者水痘带状疱疹病毒分离率增高，立刻引起对疱疹病毒组，特别是对单纯疱疹病毒的兴趣，反映在 20 世纪 70 年代发表论文数量的增多上（图 1）。另一方面是因为用腺嘌呤阿拉伯糖苷（adenine arabinoside）治疗单纯疱疹病毒脑炎的明显成功^{〔18〕}。预料今后临床学家和基础病毒学者对本组病毒的高度兴趣还将持续一个时期。单纯疱疹病毒在现代社会中传播广泛，正如本书 Nahmias 综述^{〔19〕}中所指出的那样，说明当人们认识到单纯疱疹 2 型感染是一种主要的性病时，所引起的巨大社会影响。

技术的最新进展

技术进展的重要性，特别是精密仪器的发展，对病毒学广泛而持续的发展起着不可忽视的重要作用。例如，病毒性肝炎和非细菌性胃肠炎是由现在仍然难以在组织培养上繁殖的病原体引起的，但可用其它方法进行研究。病毒学家现在已不依赖实验动物及/或组织培养，而可以采用替代方法诊断病毒，例如电子显微镜检查法和免疫电子显微镜检查法（进一步的讨论可参考 Hsiung 等^{〔20〕}、Almeida^{〔21〕}和 Doane^{〔22〕}的综述）、放射免疫测定法^{〔7,8,11〕}和酶联免疫吸附测定法^{〔23〕}。而且分子病毒学家已发展和利用基础知识分析研究各种病毒感染的临床与流行病学问题（进一步研究可参考本书另外几个综述^{〔24,25,26〕}）。本年度的一系列讲演的组织和编排就是为了解释、探索和了解临床病毒学上这些新的成就并

尽可能贯穿到课程的全部内容中去。

结 论 要 点

回顾过去年代，临床病毒学有过很大的变化。在20世纪60年代初，由于发展了各种细胞培养系统，发现和鉴定出许多新病毒。现在由于利用新近发展的侦查病毒抗原的技术与设备，越来越多的病毒被认为是许多疑难病的病原体。由于病毒性疾病的化学治疗可能实现，谋求更加有效的方法快速诊断病毒病的压力将会增大。因此，病毒病的研究需要加强，特别是发展更敏感和更有效的检查病毒存在的方法。

参 考 文 献

1. Enders JF, Weller TH, Robbins FC: Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. *Science* 109:85~87, 1949
2. Paul JR: A History of Poliomyelitis. New Haven, Yale University Press, 1971
3. Hsiung GD: Diagnostic Virology. New Haven, Yale University Press, 1964. Revised edition, New Haven, Yale University Press, 1973
4. Kilbourne ED: Influenza panedemics in perspective. *JAMA* 237:1225~1228, 1977
5. Blumberg BS, Alter HS, Visnich SA: A "New" antigen in leukemia sera. *JAMA* 191:541~546, 1965
6. Dane DS, Cameron CH, Briggs M: Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen associated hepatitis. *Lancet* 1:695~698, 1970

7. Ling CM, Overby LR: Prevalence of hepatitis B virus antigen as revealed by direct radioimmune assay with 125 I-antibody. *J Immun* 109:834~841, 1972
8. Purcell RH, Wong DC, Alter HJ, et al: Microtitier solid-phase radioimmunoassay for hepatitis B antigen. *Applied Micro* 26:478~484, 1973
9. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH: Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a virus-like antigen associated with acute illness. *Science* 182:1026~1028, 1973
10. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, et al: Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Eng J Med* 292:767~770, 1975
11. Dienstag JL: Hepatitis viruses: characterization and diagnostic techniques. *Yale J Biol Med* 53:61~69, 1980
12. Nahmias AJ, Josey WE, Naib ZM, et al: Antibodies to herpesvirus hominis types 1 and 2 in humans. II. Women with cervical cancer. *Am J Epi* 91:547~552, 1970
13. Melnick JL, Rawls WE: Herpesvirus type 2 and cervical carcinoma. *Ann NY Acad Sci* 174:993~998, 1970
14. Epstein MA, Henle G, Achong BG, et al: Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *J Exp Med* 121:761~770, 1965
15. Henle W, Henle G, Ho HC, et al: Antibodies to Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma, other head and neck neoplasms and control groups. *J Natl Cancer Inst* 44:225~231, 1970
16. Diehl V, Henle G, Henle W, et al: Demonstration of a herpes group virus in cultures of peripheral leuko-

- cytes from patients with infectious mononucleosis. *J Virology* 2:663~669, 1968
17. Naraqi S, Jackson GG, Jonasson O, et al: Prospective study of prevalence, incidence and source of herpes-virus infections in patients with renal allografts. *Jour Inf Dis* 136:531~540, 1977
 18. Whitley RJ, Soong SJ, Dolin R, et al: Adenine arabinoside therapy of biopsy-proved herpes simplex encephalitis. *N Eng J Med* 297:289~294, 1974
 19. Nahmias AJ: Herpes simplex virus infection: problems and prospects as perceived by a peripatetic pediatrician. *Yale J Biol Med* 53:47~54, 1980
 20. Hsiung GD, Fong CKY, August MJ: The use of electron microscopy for diagnosis of virus infections: an overview. *Prog Med Virology* 25:133~159, 1979
 21. Almeida JD: Diagnostic electron microscopy. *Yale J Biol Med* 53:5~18, 1980
 22. Doane FW: Virus morphology as an aid for rapid diagnosis. *Yale J Biol Med* 53:19~25, 1980
 23. Yolken RH, Kim HW, Clem TW, et al: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. *Lancet* 2:263~267, 1977
 24. Joklik WK: Virus synthesis and replication: reovirus vs vaccinia virus. *Yale J Biol Med* 53:27~39, 1980
 25. Kilbourne ED: Recent contributions of molecular biology to the clinical virology of myxoviruses. *Yale J Biol Med* 53:41~45, 1980
 26. Summers WC: Molecular epidemiology of DNA viruses: applications of restriction endonuclease cleavage site analysis. *Yale J Biol Med* 53:55~59, 1980

电子显微镜技术在诊断方面的应用

June D. Almeida

英国宝威研究实验室

1979年8月11日收到

电子显微镜阴性染色或称作负染色检查法，首先用于病毒形态学上，而获得了病毒形态的一些基本知识。但近年来已发展成为病毒诊断的实用方法。这些方法既简单又快速。以下综述讨论取得好的电子显微镜标本的详细步骤，并用插图说明一些能够获得的结果。

过去10年，在实用病毒学的领域中出现了深刻的变化。在这里，“实用”这个词有两个涵义：第一，指的是在病毒诊断中所使用的技术；其次，指的是在控制病毒感染的发生和传播上所起的作用。侦查乙型肝炎表面抗原（HBsAg）所用的新技术，象放射免疫测定法和被动血凝试验一样，方法简单易行，且其灵敏程度远远超过象免疫扩散和补体结合试验这样的老的技术。同一例子也可以说明“实用”这个词的另外方面的意义，因为识别出一个乙型肝炎表面抗原的带毒者就可导致采取一种或多种重要措施，如禁止带毒者作为供血者，并且假若患者住院治疗，照料这个病人的时候要尽可能避免接触他的血液。随着病毒化学治疗的进一步发展，实用程度将更加提高^[1]。

过去 10 年中，病毒学由理论上的兴趣转向临床应用，电子显微镜成为了解病毒基本知识的重要工具，但更重要的还是用它能够很快而明确地发现病毒。电子显微镜在这个时期的成就，是多而广泛的，其范围自首次描述一个新的病毒^[2]到在一个偶然情况下发现天花病毒^[3]。但不幸的是，产生了一种印象，认为电子显微镜是一种难以掌握的技术，只有在专家的手中才好用。实际并非如此，由于技术上有几个要点尚未被广泛注意，因此在文献中出现过很多不好的照片。本文将讨论为了制成标本能够在电子显微镜下得到好的结果所必须注意的步骤和解释这些结果的方法。

制作电子显微镜快速诊断用的标本的方法只有一个，就是阴性染色技术。理论上讲，这种方法本身很简单。病毒颗粒绕以重金属原子，这种重金属原子就象是电子染料，电子束能通过低电子密度的病毒但不能通过金属背景，因此“阴性染色”就是明亮的病毒对衬暗色的背景。

实际操作上这个方法也是同样简单的。病毒悬液加上含有合适的重金属离子溶液，常用磷钨酸 (PTA)，然后使之干燥在铜网上。如所预料，在这个基本方法上会出现许多变化，这些将在用于特定标本时加以阐述。

阴性染色用的基本设备

阴性染色染料

有几种阴性染料都是以钨或铀为基础的^[4]。可能最接近成为普遍染料的仍然是磷钨酸，它是第一个被应用的阴性染料^[5]。由于有时需要改变染料与病毒悬液的比例，最好把磷钨酸制成高浓度溶液储存备用。最好配成 4% 溶液，可适于

所有用途。染液的 pH 也是重要的，一般使用 pH 6，产生的对比较中性或硷性要好。但是有的病毒，特别是牛口蹄疫病毒和鼻病毒，对酸敏感，应配制 pH 8 的 PTA 溶液。在以上两种情况下都是把 4% 磷钨酸用 1N 氢氧化钾调整为所需 pH。把待用 PTA 溶液放在滴瓶中保存在 4℃ 最为方便。

铜网

因为阴性染色标本由于它的本性而密度不规则，所以网眼愈小稳定性愈大。建议用 400 孔铜网。再者，由于标本性质不稳定，铜网所用以覆盖的支持膜要尽量既坚实又柔韧。Formvar-carbon 可能是最好的支持膜。

消毒

消毒虽然与阴性染色法没有直接关系，但是必须记住阴性染色标本有生物学活性。例如在用一块滤纸吸掉网上的液体时，滤纸立即被病毒污染，必须以适当方法加以处理。一个盛有次氯酸盐溶液的容器，最好再加上阴离子去污剂，必须经常放在进行阴性染色工作的实验台上。

其它项目

小镊子、显微镜载片、巴氏吸管和滤纸构成进行阴性染色工作的全部设备（插图 2）。

标本的类型

应该首先分清能够处理的和应该处理的标本。因为每个标本所费的时间是很少的，任何独特的或不常见的标本都应该做阴性染色检查。因为这种试验所需材料很少，并不需要把为镜检用的标本都用完。另一方面，大量常规或半常规性质的标本虽然能够检查，但是太费时间并且常是不必要的。在过去，只有用电子显微镜才能鉴定某些标本，后来有了电镜以外的新技术、这些新技术更适于大量标本的检查。一个

很好的例子见于肝炎方面。有一个时期，证实乙型肝炎抗原带毒者常要靠电子显微镜。现在，放射免疫测定法和被动血凝试验，已成为最好的诊断方法。

几乎任何生物学材料都可做标本进行电子显微镜检查。该项技术受两个主要因素的限制：标本中病毒的绝对数量和病毒与杂质污染物或背景物质的比例。尿液因为含杂质少，病毒颗粒含量为 10^5 就可制成好标本。但含同样病毒浓度的痰液，因为背景材料多，几乎不适于制造标本。由于病毒不同对所需病毒的绝对数量的要求也不同。例如， 10^5 个颗粒的小圆形病毒，不用更为灵敏的免疫电子显微镜检查法就看不见。这就需要把特异性抗血清加到含有病毒的标本中使之形成抗原和抗体聚集物^[6]。免疫复合物中的小圆形病毒比未曾聚集的病毒容易看见。对低度阳性的乙型肝炎抗原携带者进行实验，证明免疫电子显微镜检查法与放射免疫测定法具有同等的灵敏性。尽管如此，对于大部分病毒，原始材料中病毒浓度每毫升需有 10^6 个病毒才能被阴性染色法所看见。幸而，活的和灭活的病毒颗粒都能在电子显微镜下看到，并且一个每毫升含 10^6 个物理颗粒的标本中可能只含有 10^3 个具有感染力的成熟病毒。

标本制作

总述

制作阴性染色用铜网的最后步骤是让标本和染料一起或先后滴在载网上，并使其晾干。标本层不论如何薄都会具有一定厚度，并且干燥过程会使物质浓缩。因此重要的是减少或除净任何低分子量蛋白质和有机盐类。有机盐类呈结晶

构造，破坏标本，但容易识别；低分子量物质干燥成不定形的一层，若不注意就会遮掩阳性样品。基于这些原因，在制备阴性染色标本时必须遵守三条基本规则。

1. 必须用蒸馏水作溶剂。这有利于溶解细胞结构，但不损害病毒。看起来病毒颗粒对渗透压并不敏感。

2. 离心浓缩时必须尽可能使用最低速。因为病毒常与细胞碎片纠缠在一起，能在出人意料的低速条件下沉淀。大块的细胞物质在电镜检查中不成问题，而低分子量物质不会沉淀下来。离心沉淀的时间和速度因样品不同会有一些改变，但多数可用 15,000g 一小时。这个速度似乎低些，但是病毒虽有些损失，铜网上标本的质量却大有改进。

3. 在收取最终沉淀物时，最主要的是要去掉试管内的最后液滴。假若留有液体，在将沉淀物重新悬浮时就会被低分子量物质所污染。用以下办法可以保证试管排水充分：除去上清液后倒置试管，放在垫有脱脂纱布的烧杯中。可以把几个试管放在一个烧杯里并且假若不立即镜检，可用箔片或石蜡把烧杯口封起来保存在 4℃。为了安全起见，必须牢记纱布和烧杯会被病毒污染，因此须用少量次氯酸盐溶液浸湿纱布。在从烧杯取出试管时，仍然保持倒置状态，并检查试管口部是否有液滴，发现液滴时可用滤纸吸除。只有做到这些之后，才能将试管直立起来，并重新悬浮沉淀物（图 2）。

阴性染色法

1. 标准方法 阴性染色法较切片法优越的地方在于最终的标本系自原始大量的样品浓缩得来的，因而减少了取样的影响。常用的有几种浓缩方法，但沉淀法仍是最有效的方法之一。最终形成的沉淀物用少量蒸馏水重新悬浮，具体用水量视沉淀物多少而定。沉淀物的大小不一，从看不见



图 2 阴性染色用的设备

注意：待检样品倒置在石蜡密封的烧杯中，已经处理过的样品放在无盖烧杯内。

直径几厘米。看不见的只用最少量约 50 微升蒸馏水悬浮，而其它大小的重新悬浮后稀释到稍有混浊度即可。初学者的主要错误在于把悬液弄得太浓。下列建议至少对某些使用电镜的人有所帮助：使最后悬液的混浊度就象杜松子酒在不加过量水时所具有的一种诱人的带蓝色的乳光。一滴悬液加同样一滴 4% 磷钨酸溶液混匀后取适量加在用镊子夹持的铜网上，使之吸附数秒钟然后用毛边滤纸吸除多余的液体（图 3）。把滤纸扯成毛边看起来是件小事，但毛边滤纸比齐切的滤纸接触密切容易吸水。铜网干燥后即可镜检。

2. 快速阴性染色法 遇有样品需要尽快检查，以便指