

主编：方 凤

小儿病毒相关性疾病



第二军医大学出版社

25.11
71
00
1

小儿病毒相关性疾病

主 编 方 晨

副 主 编 赵 薇 蒋瑾瑾 罗荣城

编写人员 方 凤 赵 薇 蒋瑾瑾 欧阳建华
蒋玉淮 毋永正 方超平 卞金陵
郭林芳 罗荣城

第二军医大学出版社

内 容 提 要

本书旨在引导临床医师较系统地认识常见病毒的特性及其致病机制,并融汇了微生物学、免疫学、内科学、儿科学、传染病学等知识。作者对呼吸道病毒感染性疾病、过敏性紫癜、再生障碍性贫血、哮喘和病毒性心肌炎等疾病有较长时间的临床研究经验,特别就柯萨奇 B 组病毒对细胞免疫和天然免疫的影响及其在小儿临床免疫相关疾病中的重要性作了较详细的论述。作者在临床实践中积累了较丰富的经验,提出调理细胞免疫和维持免疫平衡是防治病毒感染及其相关性疾病的关键策略,同时摸索出易于小儿临床实施的调理细胞免疫的中西医治疗方法。该书适于内科、儿科、传染科各级医师和研究生以及对病毒性疾病感兴趣的所有医务工作者阅读,是一本既具理论参考价值又能指导临床医师诊断和治疗疾病的工具书。

图书在版编目(CIP)数据

小儿病毒相关性疾病/方凤主编. —上海:第二军医大学出版社,1999.12

ISBN 7-81060-058-3

I. 小… II. 方… III. 小儿疾病:病毒病-诊疗 IV. R725.11

中国版本图书馆 CIP 数据核字(1999)第 52969 号

小儿病毒相关性疾病

主 编 方 凤

责任编辑 傅淑娟

第二军医大学出版社出版发行

(上海市翔殷路 800 号 邮政编码:200433)

全国各地新华书店经销

第二军医大学出版社排版 江苏省丹阳市教育印刷厂印刷

开本:789×1092 1/16 印张:13.25 字数:310 440 字

2000 年 1 月第 1 版 2000 年 1 月第 1 次印刷

印数:1~2 500 册

ISBN 7-81060-058-3/R·047

定价:20.00 元

前 言

病毒感染性疾病在儿科临床极为普遍,尽管病毒感染性疾病各有特征,但治疗总策略是相仿的。随着临床病毒学研究进展,发现许多疾病的发生和发展与病毒感染直接或间接相关,为了探索和防治病毒感染及其相关性疾病,特编写此书。

在临床研究和临床实践过程中,我们得到以下结果:①柯萨奇 B 组病毒在呼吸道病毒感染性疾病、过敏性紫癜、哮喘和病毒性心肌炎等疾病中均有较高的感染率;②观察到过敏性紫癜、再生障碍性贫血、哮喘和病毒性心肌炎等疾病有类似的细胞免疫和天然免疫细胞变化规律;③通过调理细胞免疫和维持免疫平衡,可有效地防治病毒感染;④在病毒相关性疾病治疗过程中,同时进行较长期的调理细胞免疫和维持免疫平衡,病儿病毒感染机会明显减少,其疾病的治疗效果和愈后大大改观。为了便于临床医师全面认识病毒感染性疾病和相关性疾病,本书融汇了微生物学、免疫学、内科学、儿科学、传染病学等知识,提出调理细胞免疫和维持免疫平衡是抗病毒感染的关键策略,并列出临床行之有效、易于实施的中西医治疗方法,期望能与同道交流,共同造福于病儿。由于水平有限,书中一定有不妥和错误之处,敬请读者批评指正。

编 者

1999 年 9 月

目 录

第一部分 病毒学临床基础

第一章 病毒概论	(3)
第一节 病毒的基本构造	(3)
第二节 病毒的分类	(3)
第三节 病毒的增殖	(4)
第四节 人病毒感染的发病机制	(6)
第五节 持续性病毒感染	(6)
第二章 临床病毒学诊断的基本方法与原理	(8)
第一节 病毒的培养	(8)
第二节 血清学检查的原理与方法	(8)
第三节 酶联免疫吸附试验技术的应用	(8)
第四节 免疫荧光技术的应用	(9)
第五节 放射免疫的应用	(10)
第六节 电镜诊断技术的应用	(10)
第七节 分子杂交技术的应用	(10)
第八节 聚合酶链反应技术	(11)
第九节 微孔捕获杂交法	(11)

第二部分 抗病毒系统

第三章 干扰素	(15)
第一节 干扰素的基本特征	(15)
第二节 干扰素的临床应用	(16)
第四章 抗病毒免疫	(17)
第一节 与免疫应答有关的宿主基因和抗原决定簇	(17)
第二节 T细胞和其他细胞	(18)
第五章 抗病毒治疗	(21)
第一节 抗病毒治疗策略	(21)
第二节 常见抗病毒药物	(22)
第六章 临床调理免疫策略	(30)
第一节 维生素和锌	(30)
第二节 静脉免疫球蛋白	(33)
第三节 胸腺肽	(35)
第四节 左旋咪唑	(35)
第五节 涌泉穴位	(36)

第三部分 临床常见病毒

第七章 呼吸道病毒	(39)
第一节 腺病毒	(39)
第二节 流感病毒	(40)
第三节 副流感病毒	(41)
第四节 呼吸道合胞病毒	(42)
第八章 消化道病毒	(44)
第一节 轮状病毒	(44)
第二节 脊髓灰质炎病毒	(45)
第三节 柯萨奇病毒	(46)
第四节 埃可病毒	(50)
第五节 新型肠道病毒	(51)
第六节 肝炎病毒	(51)
第九章 疱疹病毒	(55)
第一节 单纯疱疹病毒	(55)
第二节 EB 病毒	(55)
第三节 巨细胞病毒	(57)
第十章 其他病毒	(58)
第一节 狂犬病毒	(58)
第二节 腮腺炎病毒	(58)
第三节 人类免疫缺陷病毒	(59)

第四部分 病毒直接引起的疾病

第十一章 皮肤疱疹病毒感染性疾病	(65)
第一节 单纯疱疹	(65)
第二节 水痘和带状疱疹	(68)
第十二章 EB 病毒感染性疾病	(71)
第一节 传染性单核细胞增多症	(71)
第二节 恶性淋巴瘤	(73)
第十三章 呼吸道病毒感染性疾病	(80)
第一节 急性上呼吸道感染	(80)
第二节 急性感染性喉炎	(84)
第三节 急性喉气管支气管炎	(86)
第四节 急性支气管炎	(88)
第五节 哮喘性支气管炎	(89)
第六节 病毒性肺炎	(90)
第七节 毛细支气管炎	(98)

第八节	流行性喘憋性肺炎·····	(101)
第十四章	巨细胞包涵体病·····	(104)
第十五章	先天性风疹综合征·····	(108)
第十六章	病毒性脑膜脑炎·····	(110)
第一节	ECHO 病毒性脑膜脑炎·····	(110)
第二节	柯萨奇病毒性脑膜脑炎·····	(111)
第三节	单纯疱疹病毒脑炎·····	(112)
第四节	淋巴细胞脉络丛脑膜炎·····	(113)
第十七章	艾滋病·····	(115)
第十八章	常见病毒性传染病·····	(129)
第一节	麻疹·····	(129)
第二节	风疹·····	(132)
第三节	幼儿急疹·····	(133)
第四节	流行性感冒·····	(134)
第五节	流行性腮腺炎·····	(136)
第六节	脊髓灰质炎·····	(139)
第七节	病毒性肝炎·····	(143)
第八节	狂犬病·····	(153)
第九节	流行性乙型脑炎·····	(156)

第五部分 病毒相关性疾病

第十九章	血液性病毒相关性疾病·····	(165)
第一节	病毒相关性骨髓衰竭·····	(165)
第二节	小儿再生障碍性贫血·····	(166)
第三节	急性淋巴细胞白血病·····	(171)
第二十章	血管炎·····	(176)
第一节	川崎病·····	(176)
第二节	过敏性紫癜·····	(177)
第二十一章	支气管哮喘·····	(179)
第二十二章	病毒性心肌炎·····	(191)
主要参考文献·····		(198)

第一部分

病毒学临床基础

第一章 病毒概论

病毒感染性疾病在临床是非常普遍的。由于病毒致病机制与细菌等微生物不同,以及病毒感染后引起机体免疫系统的结构与功能发生显著变化等,因此我们应该重视对临

床重要病毒的认识。为了便于系统理解病毒感染性疾病,找出其中的致病关键环节,制定相应抗病毒策略,首先描述病毒的基本构造、分类、增殖和人病毒感染的发病机制。

第一节 病毒的基本构造

病毒的基本构造是核酸和蛋白质。病毒与其他生物不同的特征为仅含有一种核酸,即或为核糖核酸(RNA),或为脱氧核糖核酸(DNA)。

一、病毒的核酸

病毒核酸(基因组)的分子差别十分显著。最小的微小病毒(parvovirus)为单链DNA病毒,约有5 000个碱基,相对分子质量(M_r)为 1.5×10^6 。最大的痘类病毒有 2×10^5 个碱基对(200 kb), $M_r = 1.5 \times 10^8$ 。根据病毒核酸的存在形式,可分为单链RNA病毒、双链RNA病毒、单链DNA病毒及双

链DNA病毒。

二、病毒的蛋白质

病毒的蛋白质,主要为病毒的衣壳,分为结构蛋白与非结构蛋白。由于病毒基因组小,能编码的蛋白多肽不多,因此病毒的衣壳必须由相同的多肽重复组成,可有螺旋对称、二十面体对称或复合对称不同形式。非结构蛋白乃是病毒的酶或调节蛋白,在病毒复制中占重要地位。

有包膜的病毒表面具有糖蛋白,其蛋白质组分的合成是由病毒的基因组编码的。

第二节 病毒的分类

根据病毒核酸的不同,将病毒分为RNA病毒和DNA病毒两大类。每类病毒的具体成员很多,本书仅列出较常见的病毒及其相关的疾病,后文将详细讨论。

一、RNA病毒

1. 呼肠病毒科病毒感染

(1) 科罗拉多蜱传热(Codorado tick fever virus);

(2) 呼肠病毒和环状病毒(reovirus and orbivirus)感染;

(3) 轮状病毒(rotavirus)感染。

2. 披膜病毒科病毒感染

(1) A群虫媒病毒感染(arbovirus);

(2) 风疹(rubella, German measles)。

3. 黄病毒科病毒感染

(1) 丙型病毒性肝炎(hepatitis C);

(2) 黄热病(yellow fever);

(3) 登革热(dengue fever);

(4) 流行性乙型脑炎(type B encephalitis);

(5) 森林脑炎(forest encephalitis);

(6) 鄂木斯克出血热(Omsk hemorrhagic fever)。

4. 冠状病毒科病毒感染

人冠状病毒(human coronavirus)感染。

5. 正粘液病毒科病毒感染

流行性感冒(influenza)。

6. 副粘液病毒科病毒感染

(1) 副流感病毒感染(parainfluenza);

(2) 流行性腮腺炎(epidemic parotitis, mumps);

(3) 呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus)感染;

(4) 麻疹(measles);

(5) 亚急性硬化性全脑炎(subacute sclerosing panencephalitis)。

7. 弹状病毒科病毒感染

(1) 狂犬病(rabies);

(2) 水疱性口炎病毒(vesicular stomatitis virus)感染。

8. 丝状病毒科病毒感染

9. 布尼亚病毒科病毒感染

流行性出血热(epidemic hemorrhagic fever)。

10. 沙粒病毒科病毒感染

淋巴细胞脉络丛脑膜炎(lymphocytic choriomeningitis)。

11. 小 RNA 病毒科病毒感染

(1) 脊髓灰质炎(poliomyelitis);

(2) 柯萨奇病毒(Coxsackie virus, CV)感染;

(3) 埃可病毒感染(Echo virus);

(4) 甲型病毒性肝炎(hepatitis A, HAV);

(5) 鼻病毒(rhinovirus)感染。

12. 杯状病毒和星芒病毒科病毒感染

(1) 戊型病毒性肝炎(hepatitis E);

(2) 杯状病毒和星芒病毒(calicivirus infection and astrovirus)感染。

13. 逆转录病毒科病毒感染

艾滋病(acquired immunodeficiency syndromes, AIDS)。

二、DNA 病毒

1. 痘病毒科病毒感染

(1) 牛痘(cowpox);

(2) 天花(variola);

(3) 猴痘(monkey pox);

(4) 副牛痘(paravaccinia);

(5) 传染性软疣(molluscum contagiosum)。

2. 疱疹病毒科病毒感染

(1) 单纯疱疹病毒感染(herpes simplex virus);

(2) 水痘(varicella, chicken-pox);

(3) 带状疱疹(herpes zoster);

(4) 巨细胞病毒感染(cytomegalovirus infection);

(5) 传染性单核细胞增多症(infectious mononucleosis)。

3. 腺病毒科病毒感染

4. 乳多空病毒科病毒感染

(1) 乳头状瘤病毒感染(papillomavirus infection);

(2) JC 病毒、BK 病毒。

5. 嗜肝病毒科病毒感染

(1) 乙型病毒性肝炎(hepatitis B);

(2) 丁型病毒性肝炎(hepatitis D)。

6. 细小病毒科病毒感染

细小病毒 B19 (parvovirus)。

第三节 病毒的增殖

病毒的增殖又称为病毒的复制,是病毒在活细胞中繁殖的过程。

一、病毒复制的基本特点

病毒只能在活细胞内复制,离开活细胞,病毒便处于无活性或静息状态。在病毒的复制过程中,宿主细胞提供合成病毒核酸与蛋白质的原料、能量和必要的酶。病毒核酸在复制的过程中起“指令”作用,使宿主细胞按病毒核酸所携带的遗传信息,合成病毒的核酸、蛋白质,然后进行装配。因病毒复制需其核酸(即基因组)指令,故病毒需进入易感细胞并使其核酸释放至细胞内而起指令作用。无蛋白衣壳的“裸”核酸在一定的条件下也可致病毒复制。以病毒核酸导入细胞称为转染(transfection),核酸导入细胞致病毒复制的效率远低于病毒感染,仅为病毒感染的1%。

病毒复制的基本特点是:

- (1)病毒只能在活细胞内复制;
- (2)宿主细胞提供合成病毒核酸全部原料;
- (3)病毒核酸在复制的过程中起“指令”作用;
- (4)该“指令”使宿主细胞按病毒核酸所携带的遗传信息,合成病毒的核酸、蛋白质,然后进行装配。

二、DNA 病毒的生物合成

各类DNA病毒的复制均不相同。多数DNA病毒(微小病毒、乳多空病毒、腺病毒与疱疹病毒)的DNA均在细胞核内复制,病毒蛋白质则先在胞浆内合成,再移行至核内装配。

三、RNA 病毒的生物合成

RNA病毒的基因组是RNA,其转录、翻译和复制与DNA病毒及细胞均不相同。与DNA病毒相比,RNA病毒所携带的遗传信息较少。正链RNA病毒的RNA既可起模板作用,复制出子代RNA,又可起mRNA作用,直接翻译出病毒所编码的蛋白质。负链

RNA病毒的RNA不能作为mRNA,必须转录为互补的RNA,后者才是mRNA。由于宿主细胞中不具备依赖RNA的RNA聚合酶,因此病毒必须携带依赖RNA的RNA多聚酶,才能完成整个复制过程。当以足量RNA病毒感染细胞时,病毒释放的时间为几小时至十几小时。肠道病毒所需时间最短,仅为3~4 h,而流感病毒则需8~10 h。根据病毒RNA的极性(正链或负链)以及其是否分阶段等性质,可将RNA病毒分为单正链、单负链、单负链分阶段、双链分阶段RNA病毒及逆转录病毒五大类。RNA病毒的复制及装配(除流感病毒及逆转录病毒外)均在胞浆中进行。

RNA病毒的生物合成特点是:

- (1)与DNA病毒生物合成不同;
- (2)正链RNA病毒的RNA即可起模板作用;
- (3)负链RNA病毒要有依赖RNA的RNA聚合酶,才能完成复制过程。

四、病毒的体内复制

病毒在体内的复制与致病力有密切的关系,病毒入侵一定的细胞、组织,与其对该组织细胞受体的亲和性或嗜性有关。病毒入侵后在体内播散与病毒基因有关。

五、异常的病毒复制

正常病毒复制的结果是释放完整的有传染性的子代病毒,但病毒复制过程中的各个阶段均可被阻断,而出现异常结果。

1. 流产性复制(abortive replication)

不能复制而产生有传染性的子代时,称为流产性复制。流产性复制可因细胞或病毒因素所致。

2. 缺陷干扰病毒颗粒(defective interfering particle, DIP)

缺陷干扰病毒颗粒是一种特殊的病毒颗粒,其基因组较正常有传染性的病毒为小,即

病毒基因组有所缺失。

第四节 人病毒感染的发病机制

尽管病毒种类不同,但人病毒感染的发病机制基本一致,由于病毒是“侵入”细胞内复制而引起感染,使得清除病毒感染较清除细菌感染更艰难。

一、人病毒感染基本步骤

病毒进入机体引起感染,病毒感染基本步骤大多相似,具体是首先病毒通过吸附蛋白的作用与靶细胞膜上的受体,产生亲嗜性,此过程称“吸附”;然后吸附于靶细胞膜,通过胞饮作用被吞入细胞质内,称之为“穿入”;病毒被吞入细胞质内后,其外壳发生变化,然后脱去外壳并释放核酸,此过程称“脱蛋白衣壳”;进一步通过核酸内携带的遗传信息在宿

主细胞内进行病毒核酸和蛋白质生物合成,并保存病毒的特异性,即“复制”;最后子病毒以芽生方式释放,或从裂解细胞中释放,可在细胞间传播扩散,称为“释放”。简言之,人病毒感染基本步骤是:吸附、穿入、脱蛋白衣壳、复制和释放 5 个环节。

二、临床感染过程

病毒进入机体后,先在局部组织的细胞内复制,再经血流或淋巴道扩散,引起临床症状和体征。另外病毒感染刺激宿主免疫系统,激活 B 细胞或产生淋巴细胞毒性抗体等,可发生不同的自身免疫系统性疾病。

第五节 持续性病毒感染

病毒感染除典型的急性感染外,还存在持续性感染。在这类感染中,病毒在机体内持续数月、数年,甚至数十年,可出现症状,也可不出现症状而长期携带病毒,成为重要的传染源。持续性病毒感染可能与某些免疫性疾病有关,故对持续性病毒感染的研究已成为病毒分子生物学研究的一个重要方面。

一、持续性病毒感染的分类

持续性病毒感染可分三类:

1. 潜在性感染(latent infection)

病毒感染后,尽管病毒基因已存在于一定组织或细胞中,但并不能产生感染性病毒。只有在某些条件下病毒才被激活,出现急性发作,此时采集相应部位标本能检测出病毒,如单纯疱疹病毒(HSV)、水痘-带状疱疹病毒、巨细胞病毒(CMV)。当发作期后,用一般常规法就不能分离出病毒了。

2. 慢性感染(chronic infection)

病毒可持续存在于血液或组织中,病毒效价较高,可不断排出体外,或经输血、注射而传播。病毒在整个持续过程中可被检测出,一般在机体免疫功能低下时发病。病毒致病机制常与免疫病理过程有关,如乙型肝炎病毒(HBV)、乳多空病毒科病毒(JC 病毒、BK 病毒)、人类免疫缺陷病毒(HIV)及沙粒病毒科病毒感染等。

3. 慢病毒感染(slow virus infection)

病毒(或致病因子)感染后,有很长的潜伏期,以后出现慢性进行性疾病,最终常为致死性感染。

二、人类持续性病毒感染及相关疾病

许多病毒既可直接感染引起急性感染疾病,又可在体内持续存在,导致持续性病毒感染及相关性疾病。常见的病毒有:HSV、水

痘-带状疱疹病毒、CMV、EB 病毒、HBV、微小病毒 B19 和 HIV 等。上述病毒致人类持续性病毒感染及相关的疾病有:

(1)HSV 感染引起皮肤及黏膜疱疹、角膜炎;并在细胞与组织中持续存在,除皮肤、粘膜疱疹外,尚有泌尿生殖道疱疹、脑炎。

(2)水痘-带状疱疹病毒引起的急性感染疾病是水痘;其在细胞与组织(神经元、感觉神经节)中持续存在,致带状疱疹。

(3)CMV 引起的急性感染性疾病较多,如肺炎、脑炎、视网膜炎、结肠炎、先天畸形等;其还在细胞与组织(肾、唾液腺、淋巴细胞、单核细胞)中持续存在,可致肝炎、传染性单核细胞增多症、淋巴细胞增多症等。

(4)EB 病毒急性感染引起传染性单核细胞增多症;在细胞与组织(B 淋巴细胞、咽部上皮细胞)中持续存在,可致 Burkitt 淋巴瘤、鼻咽癌。

(5)HBV 急性感染引起急性肝炎;在细胞与组织(肝、胰、淋巴细胞)中持续存在,可致慢性肝炎、肝癌。

(6)细小病毒 B19 急性感染引起小儿传染性红疹;在细胞与组织(骨髓中前红细胞)中持续存在,可致慢性骨髓功能衰竭溶血性

贫血。

(7)HIV 在细胞与组织($CD4^+$ T 淋巴细胞,单核-巨噬细胞系统、神经胶质细胞)中持续存在,可致艾滋病。

三、细胞培养中的持续性病毒感染

在细胞培养中,几乎所有的病毒都建立了病毒持续存在而细胞也存活的持续性感染模型,可分为稳定状态感染(steady-state infection)及携带状态感染(carrier infection)。稳定状态感染常见于出芽增殖的 RNA 病毒感染的细胞培养中。病毒通过出芽增殖,不断地自细胞中释放至培养液中,但细胞本身的新陈代谢或分裂增殖并不受到严重影响。

另一种持续性病毒感染的模型是携带状态感染。携带状态感染可见于多种病毒。

四、构成持续性病毒感染的机制

病毒构成持续性感染的机制是:①使病毒不裂解细胞而得以持续存在,称为调控其溶细胞机制;②具有能逃逸被宿主免疫系统识别与清除的机制。此外宿主的遗传因素及免疫应答状态也有重要作用。

第二章 临床病毒学诊断的基本方法与原理

随着现代免疫学、分子生物学的发展,各病毒学的实验诊断方法带来了突破性进展。种新的技术成功地应用于临床标本的检测,给

第一节 病毒的培养

病毒分离可以直接鉴定某种病毒,根据病毒必须在活细胞中才能增殖的特性,故常以接种培养的方法鉴定病毒。长期以来,能够既满足病毒复制又适于培养的方法主要有应用动物接种、鸡胚接种与细胞培养接种三种培养方法。其中以细胞培养方法最为敏感、经济和最有前途,已经逐渐替代动物接种

或鸡胚接种。如单纯疱疹病毒、副流感病毒等可在多种细胞系(人胚肾细胞、原代人羊膜细胞和原代兔肾细胞等)中生长,将标本接种于上述细胞后 48~96 h,便可进行鉴定。病毒接种培养是最敏感和特异的,但因其技术复杂、费用昂贵、不能快速等原因,在临床诊断病毒感染性疾病中难以普及应用。

第二节 血清学检查的原理与方法

病毒感染后,作为抗原刺激机体将会产生相应的抗体,血清学方法主要是检测各种病毒感染后的抗体。血清学检测是诊断病毒感染和鉴定病毒的重要方法,目前在临床已经广泛地应用,主要有以下方法。

一、中和试验

中和试验是病毒在活体或细胞培养中被特异抗体中和而失去感染性的一种试验。可用来检查病人血清中抗体增长情况或检查人群中隐性感染后抗体保持的水平。中和抗体特异性较高,维持的时间较长,适宜于流行病学的调查。

二、补体结合试验

用已知病毒的可溶性抗原来测定病人血清中有无相应抗体。本试验的特异性较中和试验低,但由于补体结合抗体出现早,消失快,因而可用于早期诊断。

三、血凝抑制试验

许多病毒能凝集鸡、豚鼠或人红细胞,称为血凝现象。这种现象能被相应抗体所抑制。本试验经济简便,特异性较高,可鉴定病毒不同型别的特异性抗体,多用于具有血凝特性的病毒性感染,如流感病毒等。

第三节 酶联免疫吸附试验技术的应用

酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)技术以免疫过氧化物酶技术为基础,建立于 1971 年,它的敏

感性高,特异性强,且操作简便。

ELISA 技术在临床病毒学的应用较为广泛,用本方法检测相应抗体的有风疹病毒、

流感病毒、麻疹病毒、巨细胞病毒、乙型肝炎病毒、腺病毒、柯萨奇 B 组病毒、呼吸道合胞病毒等 20 余种病毒。已报道应用 ELISA 技术检测病毒抗原的有乙型肝炎病毒、柯萨奇 B 组病毒、痘病毒、疱疹病毒、轮状病毒等。

一、ELISA 的基本原理

将抗原或抗体吸附到固相载体的表面,抗原或抗体与酶形成结合物,结合物与相应的抗体或抗原反应后形成免疫复合物,免疫复合物上的酶当遇到相应的底物,可催化底物水解、氧化或还原,从而产生有色物质。因为颜色反应的深浅与相应抗体或抗原成正比,据此可以进行抗体或抗原的定量测定。ELISA 基本原理的特点是:

(1) 抗原或抗体吸附到固相载体的表面而仍保持其免疫活性;

(2) 抗原或抗体与酶所形成的结合物各自保持其免疫学活性和酶的催化活性;

(3) 免疫复合物上的酶与底物作用,产生有色物质。有色物质颜色的深浅与相应抗体或抗原成正比,从而可以对抗体或抗原进行定量测定。

二、主要类型

ELISA 方法问世才 20 多年,但其发展迅速,已演化甚多,在临床已较血清学检查更广泛应用。尽管已有多种类型的 ELISA 方

法,但实际应用的只有 3 种类型:间接法、夹心法及竞争法。

(1) 间接法(indirect method):主要用于检测抗体。它是将已知抗原包被(吸附)在固相载体,加上待测抗体的标本,最后用酶标抗体间接地予以检出。

(2) 夹心法(sandwich method):主要用于检测大分子抗原。它是将已知抗体包被在固相载体,用以捕捉待测抗原,为此该固相抗体称为捕捉抗体,加上待测抗原的标本,然后用酶标抗体(检出抗体)予以检出。

(3) 竞争法(competitive method):主要用于检测小分子抗原。它是将已知抗体包被在固相载体,将待测抗原的标本与酶标抗体同时加入,使二者竞争地结合固相抗体,与单加酶标抗原作为对照相比较,少结合的酶标抗原即显示标本中存在的待测抗原量。

三、结果和判断

ELISA 的结果和判断是用光密度(D 值)的方法测定颜色反应的深浅得到光密度值,与阴性对照的光密度值比较,得出结果。判断方法是:

(1) 以标本 D 值 $>$ 阴性对照平均 D 值加 2~3 个标准差作为阳性结果的阈值。

(2) 以 $P/N \geq 2.1$ 为阳性, $P/N \leq 2.1$ 而 ≥ 1.5 为可疑, $P/N < 1.5$ 为阴性。

$$P/N \text{ 值} = \frac{\text{标本 } D \text{ 值} - \text{空白对照 } D \text{ 值}}{\text{阴性对照 } D \text{ 值} - \text{空白对照 } D \text{ 值}}$$

第四节 免疫荧光技术的应用

免疫荧光技术(immunofluorescence technique)实际上包括荧光抗体技术和荧光抗原技术两部分,是以特异性抗原抗体反应为基础,利用荧光色素作为标记物标记已知抗体(或抗原),在特定条件下检测未知抗原或抗体的免疫学检测方法。免疫荧光技术在病毒学中应用十分广泛,它既可以用来研究病毒感染过程、病毒在感染细胞内的定位、病

毒各型的鉴别、以及肿瘤抗原与病毒抗原相互关系等,又可用于诊断病毒性疾病。对于病毒感染的诊断,免疫荧光技术可以通过检测特定抗原或特定抗体,尤其是 IgM 类抗体来实现。免疫荧光技术的特点是:①利用荧光色素作为标记物标记已知抗体(抗原);②因有荧光色素作为标记物,故可行感染细胞内定位;③可鉴别特定抗原或特定抗体。

第五节 放射免疫的应用

放射免疫测定(radioimmunoassay, RIA)是一种利用放射性核素作为标记物的免疫学测定方法。放射免疫测定用于特异性抗体检测和抗原检测。其特点是将放射技术和免疫技术共同融入医学诊断学上。

一、特异性抗体检测

病毒感染人后,机体免疫系统可产生特异性抗体,检测这些抗体有助于对病毒感染进行诊断,尤其是特异性 IgM 的测定,对早

期快速诊断意义很大。

二、抗原检测

病毒在体内增殖、致病的过程中,本身的成分以及复制过程的中间产物等均可作为抗原被检测。抗原测定在一定程度上更直接,往往比检测抗体诊断意义更大。病毒抗原检测是 RIA 在病毒感染诊断中应用的另一个重要方面。

第六节 电镜诊断技术的应用

用电镜诊断技术来检测或鉴定病毒及其感染。免疫电镜是指先用抗体处理病毒颗粒,然后制片进行电镜观察分析。以电镜技术来检查病毒是比较繁杂的,一般用于研究探讨性目的,不适用于常规检验工作。如要申请或确定用电镜技术来检查病毒,还须满足下列条件方可实施。电镜技术检查病毒适应证:

(1)被检查的标本中病毒颗粒要多,每毫升中低于 1 万颗粒就不易被检查出来。

(2)病毒颗粒应游离于组织液或细胞液上清,混于粘液的病毒在低速离心时易同粘液一起沉淀。

(3)被检病毒最好有自身的形态特征。

(4)单个病毒颗粒出现在荧光屏上尚难确定其性质,故须观察到比较多的病毒颗粒才能下判断。

(5)电镜诊断技术人员应善于判断和鉴别细胞碎片、盐类结晶、细胞鞭毛、蛋白晶体、尘埃等微细颗粒。

第七节 分子杂交技术的应用

分子杂交即应用核素(如 ^{32}P)标记的已知病毒特异性核酸片段作为探针,来检测标本中与探针有相同核酸序列的片段。用探针检测标本中含有病毒 DNA,表示该病人感染了该病毒,那么标本中的 DNA 就会和探针 DNA 结合,使标本中留有探针 DNA。因探针 DNA 是经核素标记的,所以经放射自显影后,如标本上有核素(提示为阳性标本),就能使感光胶片曝光,而阴性标本则因无病毒

DNA,就不能和探针结合,故不带核素。分子杂交技术对病毒性疾病的早期诊断极其重要,且能用于病毒性疾病的特异性诊断。分子杂交技术的特点:①核素标记病毒特异性核酸片段形成探针;②用探针可测标本中含有相同核酸序列的病毒 DNA;③阳性标本经放射自显影后使感光胶片曝光;④特异性高、敏感性好。