

从病人粪便中分离的甲型肝炎病毒抗原

毛江森 余佩华 黄柏章 陈念良 郁俊豪

(浙江省人民卫生实验院, 杭州)

经文采

(浙江省望江山医院, 杭州)

自 1973 年 Feinstone 等人^[1] 应用免疫电泳技术, 从感染 MS-1 甲型肝炎病毒的病人粪便中, 确认一种直径 27 毫微米的球形颗粒为甲型肝炎病毒以来, 从粪便中直接提取病毒颗粒已有少数成功的报告^[2-4]。

1978 年, 杭州市郊农村发生了一次较典型的甲型肝炎流行 (流行病学调查及临床观察都排除了乙型肝炎的可能), 在这次流行中我们采取了一批病人黄疸前期或血清谷丙转氨酶 (SGPT) 高峰前期的粪便标本, 分离出 3 份病毒抗原, 从形态学观察及血清学检查等, 认为属于甲型肝炎病毒, 结果报告如下。

材料与方法

(一) 标本来源

采自与甲型肝炎密切接触者的粪便, 置 -40℃ 冻存。对这些接触者每周查肝功能 (包括 SGPT) 一次, 一旦证明为急性肝炎, 即用其粪便标本提取甲型肝炎病毒颗粒。

(二) 甲型肝炎恢复期血清

采自典型的甲型肝炎患者病后一个月至一年的血清, 多数来自与粪便标本同一的甲型肝炎流行点, 经反向血凝检测其乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 为阴性者, 置 -30℃ 保存, 用前经 56℃ 30 分钟灭活。

(三) 甲型肝炎参考血清

系由美国国立卫生研究院用甲型肝炎病毒 MS-1 株感染黑猩猩而制备的, 经世界卫生组织赠给卫生部药品生物制品检定所。感染前血清的批号为 V-811-801-573; 感染后恢复期血清的批号为 V-811-501-573。

(四) 聚乙二醇 (以下称 PEG)

分子量为 6,000, 上海洗涤二厂出品。

(五) 氟里昂 113 (以下称 F113)

上海曙光化工厂出品。

(六) 粪便中甲型肝炎病毒颗粒抗原的提取

提取方法与参考文献^[4]相似。取粪便 10 克, 加入 0.05M Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4, 以下称 TBS) 连续抽提 3 次。将收集的 3 次上清液 (约 200 毫升) 合并, 经 4℃ 10,000 转/分离心 30 分钟, 取上清液, 加入 PEG 干粉使其浓度为 10% (W/V), 溶解后, 再加入氯化钠使其浓度为 0.4M, 溶解后, 置 4℃ 18—24 小时。经 4℃ 8,000 转/分离心 30 分钟, 弃上清液, 沉淀物用 60 毫升 TBS 溶解, 再加入等量 F113 振摇 30 分钟。经 4℃ 4,000 转/分离心 30 分钟, 吸取上清液, 余下之蛋白及 F113 再加入等量之 TBS, 重复离心, 吸取上清液。将两次离心的上清液合并, 必要时用等量 F113 重复处理。重复加 PEG 沉淀, 沉淀物用 4 毫升 TBS 溶解, 即得病毒颗粒抗原, 置 -40℃ 冻存, 供免疫电泳或血清学检测用。提取后的抗原代号分别为: 杭州甲-1, 杭州甲-2 及杭州甲-3。

(七) 免疫电泳法

典型甲型肝炎患儿恢复期 3 个月的血清, 用前测其抗体滴度, 作 1:16 稀释。吸抗原 0.2 毫升。加 TBS 0.7 毫升, 再加稀释好的甲型肝炎恢复期血清 0.1 毫升, 混匀后, 置 37℃ 1 小时, 再置 4℃ 过夜, 经 4℃ 45,000 转/分离心 2 小时, 弃上清液, 沉淀物用适量重蒸馏水溶解, 然后滴于 Formvar 包被的电镜铜网上, 数分钟后用滤纸吸干剩液, 再滴入 3% 磷钨酸 (pH 7.2) 负染, 数分钟后吸去剩液, 33℃ 烘干 2 小时, 然后在 Hitachi

本文于 1979 年 4 月 7 日收到。

郑友常、徐敏源和庄元忠等同志参加部分工作。卫生部药品生物制品检定所病毒室提供黑猩猩参考抗血清, 河北医科大学电镜室协助电镜观察, 特此致谢。

500 型电镜下观察。

(八) 微量补体结合试验

在 U 型微孔有机玻璃板上进行, 正式试验时采用 2 个单位溶血素, $2\frac{1}{2}$ 单位补体, 抗体与抗原的结合采用 4℃ 过夜的冷结合法, 溶血系统为 2% 致敏绵羊红血球。以小于或等于 50% 溶血的最高稀释度作为终点滴度。

结 果

(一) 杭州甲-1 抗原的免疫电镜观察

用前述的幼儿甲型肝炎恢复期血清与杭州甲-1 抗原进行免疫电镜观察。在放大 30,000 倍的电镜视野下, 可见有抗体包裹或过度包裹的球形病毒颗粒的数目在数十个至数百个。球形颗粒的病毒直径为 27—28 毫微米, 有实心颗粒与空心壳体两种。由于抗体分子的作用, 病毒颗粒高度聚集, 有的病毒颗粒由于抗体的过度包裹其形态显得有点模糊。图版 1-1 中可见有的实心颗粒聚集连结成环状, 而空心壳体虽亦有与实心颗粒互相混杂聚集的。但可见到有 10 个空心壳体聚集在一起的现象。病毒壳体上的子粒清晰, 特别在空心颗粒壳体周边上的子粒清晰可数, 平面每周约可见 18 个子粒, 排列规则, 每颗子粒有的连结有抗体分子, 抗体桥清楚(图版 1-2)。

(二) 病毒的抗原滴度

取儿童及幼儿的甲型肝炎恢复期血清, 用微量补体结合法测定杭州甲-1、杭州甲-2 及杭州

甲-3 的抗原滴度。结果(表 1)表明, 甲型肝炎病毒的抗原滴度在 1:32—1:64。

(三) 同一抗原对甲型肝炎病人双份血清的反应

用与粪便标本属同一流行点和同一时期的甲型肝炎儿童患者的急性期和恢复期双份血清, 进行了同一抗原对双份血清在同一微孔有机玻璃板上的微量补体结合反应。结果(表 2)表明, 恢复期血清的抗体滴度比急性期增长 4 倍或 4 倍以上。经棋盘测定进一步证实了这一结果。

表 2 患者双份血清微量补体结合试验结果

抗 原	甲型肝炎双份血清	补体结合抗体滴度
杭州甲-1	葛×× 急性期	1:32
	恢复期	1:256
	葛×× 急性期	1:64
	恢复期	1:256
	葛×× 急性期	1:128
	恢复期	≥1:512
杭州甲-2	葛×× 急性期	1:16
	恢复期	1:64

(四) 双份参考血清的补体结合试验

在同一块微孔有机玻璃板上, 进行了同一抗原对黑猩猩双份参考抗血清的补体结合试验, 其结果(表 3)表明, 黑猩猩感染 MS-1 毒株后的抗血清, 对杭州甲-1、杭州甲-2 及杭州甲-3 抗原反应, 测出抗体的补体结合滴度为 1:64—1:128。而对照(阴性抗原)则感染前后均为 ≤1:8。经棋盘反应进一步证实了上述的结果。

表 1 甲型肝炎病毒的抗原滴度

抗 原	甲型肝炎恢复期血清(1:16)	抗原滴度
杭州甲-1	包××	1:32
	倪××	1:64
	葛法×	1:64
	葛建×	1:64
杭州甲-2	包××	1:32
	弗××	1:64*
	倪××	1:64*
	葛××	1:64
杭州甲-3	葛巧×	1:32
	胡××	1:32
正常抗原对照	包××	1:4
	胡××	<1:8
杭州甲-1	阴性血清对照	≤1:8

* 抗原经孔径 300 毫微米超滤膜处理。

表 3 黑猩猩参考血清的补体结合试验

抗 原	抗 体 滴 度	
	感 染 前	感 染 后
杭州甲-1	≤1:8	1:64
杭州甲-2	≤1:16	1:128
杭州甲-3	≤1:8	1:64
对 照	≤1:8	≤1:8

(五) 甲型肝炎患者恢复期血清的补体结合试验

我们收集了 12 份有流行病学资料的典型甲型肝炎患者的恢复期血清, 用杭州甲-1 等病毒抗原测定了血清中的补体结合抗原滴度。结果(表

表4 甲型肝炎患者恢复期血清的补体结合试验

血 清 来 源			抗 原	补体结合抗体滴度
甲型肝炎暴发点	姓 名	患肝炎后天数		
杭州市袁浦公社	葛 巧 ×	90	杭州甲-1	1:512
	葛 国 ×	71	杭州甲-2	1:512
	韩 桂 ×	47	杭州甲-3	1:256
	倪 × ×	85	杭州甲-2	1:128
宁波市	徐 × ×	120	杭州甲-1	1:256
	陶 × ×	165	杭州甲-1	1:512
杭州市留下公社	汪 × ×	330	杭州甲-1	1:512
	包 × ×	311	杭州甲-1	1:256
正常人血清对照	黄 × ×	未患过肝炎	杭州甲-1	≤1:8
	韩 × ×	未患过肝炎	杭州甲-2	<1:8

注: HBsAg 检测结果均为(-)。

4) 表明, 甲型肝炎恢复期血清中的补体结合抗体滴度为 1:128—1:512, 多数达 1:256 或 1:256 以上。

讨 论

从甲型肝炎患者的粪便中直接分离甲型肝炎病毒, 有助于对该病毒性质的研究。但由于粪便中已知的其它病毒颗粒较多^[3,6], 所以必须进行细致认真的鉴别。

我们对病人粪便中分离到的甲型肝炎病毒抗原进行了初步的研究。结果表明, 杭州甲-1 等病毒抗原具有较好的抗原性。它具有一定的使用和参考价值。目前已知, 甲型肝炎抗原即病毒颗粒本身, 故可以认为, 杭州甲-1、甲-2 及甲-3 属于与 MS-1 病毒有相似抗原性的甲型肝炎病毒。

补体结合方法曾用于甲型肝炎病毒抗原的研究^[8,9], 但未获得较高滴度的病毒抗原。我们应用这一方法获得了较满意的结果。但必须指出, 在少数粪便提取物中, 曾遇到抗补体及非特异性

反应的问题。因此, 在应用此法鉴定来自粪便的可疑甲型肝炎病毒抗原时, 必须用甲型肝炎双份血清进行检测。此外, 单份幼儿甲型肝炎恢复期血清也很有参考价值。

参 考 文 献

- [1] Feinstone, S. M. et al.: *Science*, **182**: 1026, 1973.
- [2] Locarnini, S. A. et al.: *Inter. Virology*, **4**: 110, 1974.
- [3] Gravell, C. R. et al.: *J. of Infect. Dis.*, **131**: 167, 1975.
- [4] Seigl, G. and G. G. Frösner: *J. of Virology*, **26**: 40, 1978.
- [5] Purcell, R. H. et al.: *The Amer. J. of the Med. Sci.*, **270**: 61, 1975.
- [6] Almeida, J. D. et al.: *Lancet*, **2**: 748, 1974.
- [7] Krugman, S. et al.: *New Eng. J. of Med.*, **292**: 1141, 1975.
- [8] Provost, P. J. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **148**: 962, 1975.
- [9] Hilleman, M. R. et al.: *The Amer. J. of the Med. Sci.*, **270**: 93, 1975.