维普资讯 http://www.cqvip.com

从海水毛蚶中分离出甲型肝炎病毒

季国芳[1] 李显[1] 黄红玉[1] 张华远[2] 金志宪[1] 刘 斌[1]
舒泉[1] 王志高[1] 刘光中[1] 万宗举[2] 吴冬明[2]
（1江苏省卫生防疫站，南京 210009）
（2中国药物及生物制品检定所，北京 100050）

提 要

1988年初上海发生甲肝暴发流行，流行病学分析与生食毛蚶有关，本文报道在引起甲肝暴发流行的毛蚶产地江苏启东海域采集毛蚶标本，取腮和消化系统制成40%悬液，用$FRhk_4$细胞分离甲肝病毒，每代培养21天，连续传二代后经过免疫荧光，ELISA，HAV-cDNA斑点杂交试验，免疫电镜等鉴定，5份标本全部阳性，上述结果证实毛蚶中携带甲肝病毒，并为病原学研究提供依据。

关键词： 甲型肝炎病毒 $FRhK_4$细胞 毛蚶

1979年 Provost 及 Hillemau 等[1]首次报告甲肝病毒可成功地在猕猴肝及恒河猴胚肾细胞（$FRhK_4$）中增殖成功[1]，随后，国内外学者进行了大量的工作，目前人们已能较准确地从受染材料中培养和检测 HAV 病原。上海1983年，1988年初发生甲肝暴发流行，从流行病学分析与食用未经煮熟的毛蚶有关，但毛蚶被污染的环节，系水中或运输途中众说不一，本文报道从引起暴发流行的毛蚶产地江苏启东海域采样，用$FRhK_4$细胞分离病毒、经免疫荧光，ELISA，免疫电镜，HAV-cDNA 斑点杂交试验等检定，证明是甲型肝炎病毒，现将结果报道如下。

材 料 和 方 法

一、毛蚶标本来源及处理 毛蚶标本采自江苏启东大洋港附近（距海岸约12浬处）海域，共收集5个采样点，每点取200只左右毛蚶（见表1）。冷藏回实验室。

表1 标本采集情况

Table 1. Conditions of Specimen collection for HAV isolation

标本号	采样点间距（浬）	离岸距离（浬）	水深（米）
1	1—1.5	12	10—15
2	1—1.5	12	10—15
3	1—1.5	12	10—15
4	1—1.5	12	10—15
5	1—1.5	12	10—15

本文于1988年12月26日收到
本工作承蒙洪涛、刘崇柏教授指导，汪媛、温瑞福、宋华章等同志帮助，特此致谢。

维普资讯 http://www.cqvip.com

取腮和消化系统制备成40%悬液，－20℃过夜，次日冻融三次，经3000r/min(4℃)离心半小时，取上清加入等量氯仿，室温震摇30分钟，再以10000r/min 4℃离心半小时，取水层，如此重复二次，加入双抗（最终浓度1000单位/ml），置4℃作用18小时，经56℃30分钟灭活，－20℃冻存备用。

二、细胞 $FRhk_4$细胞系北京卫生部生物制品检室所提供，细胞培养液为eagles'MEM，内含10%小牛血清，200mM谷氨酰胺，青链霉素（常规量），用6.5%$NaHCO_3$调pH至7.2，细胞长成单层后按1：3传代。

三、甲肝恢复期血清 系中国预防医学科学院病毒研究所肝炎室赠送，效价1：5000。羊抗人IgG荧光抗体；卫生部北京生物制品研究所出品（1：12）稀释。

四、病毒分离及传代 将长成单层形态良好的$FRhK_4$细胞，用HanKs液洗一次，每瓶分别接种标本1ml（100ml方瓶）0.5ml（25ml方瓶），35℃吸附2小时，分别补充维持液9ml(100ml方瓶)，3.5ml（25ml方瓶），35℃培养，每周换维持液一次，培养21天收毒，置－20℃保存，传代时冻融5次，按上法传至第二代，继续培养21天，用0.01mol/L PH7.2P.B.S洗一次，将感染标本的细胞制成细胞抽提物[2]，进行免疫荧光，酶联免疫吸附（ELISA），HAV-cDNA斑点杂交试验，免疫电镜等检测。

五、甲肝病毒的检测方法

1. 免疫荧光（IF）试验：用间接免疫荧光法检测细胞内病毒抗原，具体步骤是将接种甲肝病毒第一代（21天）和第二代（21天）细胞，用0.25%胰酶消化，接种附玻片的24孔克隆板，置于含5%$Co_2$37℃恒温箱中培养21小时，待细胞贴壁伸展后，取出玻片以冷丙酮固定10分钟，加入甲肝恢复期阳性血清(1：20稀释)，37℃温育1小时，洗涤后加入羊抗人IgG荧光抗体，37℃作用1小时、洗涤、在荧光镜下（Fluophot olympus）观察细胞浆内有无病毒增殖。

2. 酶联免疫吸附试验：采用双抗体夹心法参照文献[3]。

3. 免疫电镜检查：取0.1ml感染细胞抽提液，加入0.1ml甲肝恢复期阳性血清（1：20稀释）37℃作用1小时后，加4%PEG（分子量6000）4℃过夜[7]，14000r/min（4℃）离心150分钟，弃上清，加入适量P.B.S稀释，滴于FormVar膜铜网上，以2%磷钨酸负染，于EM 410电镜下（×69000）观察病毒形态，并摄片菌检。

4. HAV-cDNA斑点杂交试验：由中国预防医学科学院病毒学研究所肝炎室检测。

结　果

在整个病毒分离与传代过程中未见细胞病变。

表 2　毛蚶分离物鉴定结果

Table 2　Results of isolate identification from *Arca subcrenata*

标本号	鉴定项目					
	IF		ELISA P/N>2.1为阳性		HAV-cDNA斑点杂交	免疫电镜
	1代	2代	0	2代	2代	2代
1	++	+++	−(<2.1)	+(4.51)	+	+
2	+	+++	−(<2.1)	+(5.42)	+	+
3	+	+++	−(<2.1)	+(5.31)	+	+
4	+	+++	−(<2.1)	+(5.11)	+	+
5	±	+++	−(<2.1)	+(5.00)	+	+
阴性对照	−	−	−(<2.1)	−(1.00)	−	−
阳性对照	+++	+++	+(3.06)	+(3.17)	+	+

维普资讯 http://www.cqvip.com

1. 免疫荧光检测（见表2图1）原代病毒培养至21天，5株标本中有4株在FRh-K_4细胞聚感染细胞中可见细小的荧光颗粒，均匀分布于核周围浆内，传至第二代继续

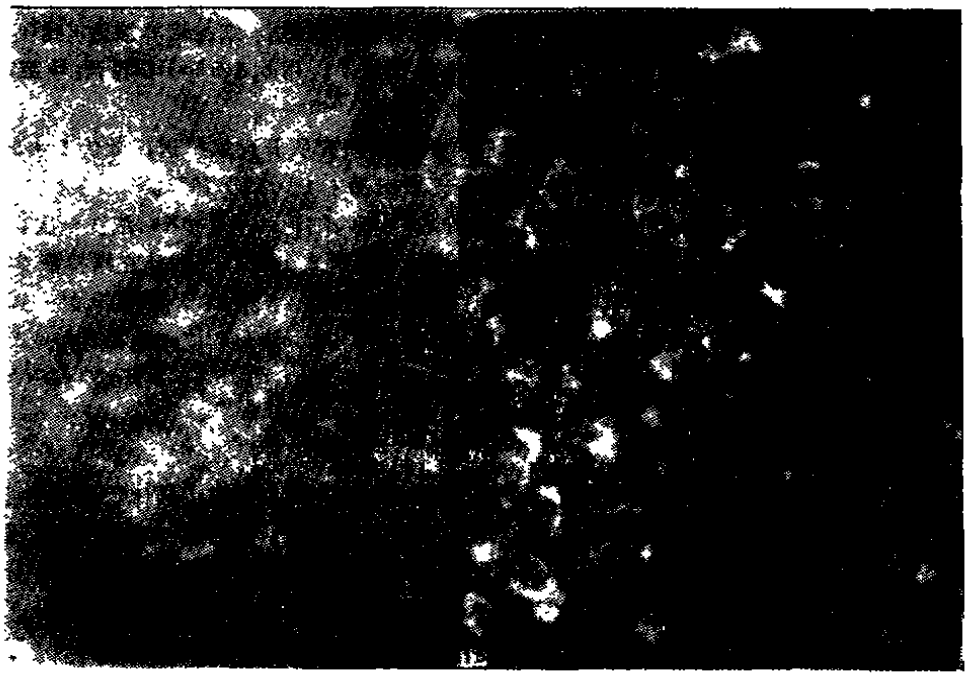

图 1. 应用免疫荧光法检测感染细胞内的HAV
Fig.1. Detection of HAV in infected by IF

图 2. 用免疫电镜测定从FRhk$_4$K细胞分离到的HAV
Fig. 2. Detection of the extracted HAV particles from the infected ERNK$_4$ cells by IEM（×138000）

培养21天，5株病毒全部观察到阳性细胞，IF_4占80%以上，荧光颗粒较强，而对照细胞IF检测为阴性。

2. 酶联免疫吸附试验，（表2），用双抗体夹心法测定的5份标本，全部呈阳性，P/NOD值为4.51—5.42，而阴性对照P/NOD值为1，呈为阴性。

3. 免疫电镜观察，（见图2），5株感染细胞抽提物均能与甲肝恢复期阳性血清起凝集反应，电镜下可见典型聚集的实心和空心病毒颗粒，直径约30nm±，表面可见亚单位结构，有的可见抗体桥。

4. 以HAV-特异性cDNA作探针与5株病毒分离物进行斑点杂交试验，结果均为阳性（见图3）

维普资讯 http://www.cqvip.com

图 3. 应用HAV-cDNA探针斑点杂交方法检测从毛蚶中分离的甲型肝炎病毒
Fig. 3. Detection of HAV-RNA by dot hybridized with HAV-cDNA probe

讨 论

1. 文献报道(4)泸水撮食的壕，蛤和贻贝能将水内肠道病毒浓集于组织内，贝类本身不被感染，但能成为人类肠道病毒的携带者，当人们食用未经煮熟的贝类后会导致甲肝或急性胃肠炎的传播，1988年初上海发生历史上空前的甲肝暴发流行，本文从毛蚶产地——江苏启东县海水中采集的毛蚶中分离到甲肝病毒、证实了上述论点，并进一步阐明这次甲肝暴发流行的病原体及主要传播途径。

2. 本研究以远离海洋12浬，水深约10多米处采集的毛蚶中检测到甲肝病毒，说明该区域海水肠道病毒污染严重，应加强环境检测[6]，并应制订贝类养殖，农田灌溉和循环用水内的病毒卫生标准。

参 考 文 献

〔1〕 Provost PJ et al., 1979, *Proc Soc Exp Biol Med* 160：213.
〔2〕 胡孟冬等，1982，上海医学 5：249.
〔3〕 张启华等，1982，上海医学，5(1)：33.
〔4〕 方馨寅：1988，国外医学微生物学分册(2)56—57.
〔5〕 祝学礼等：卫生研究(4)19—21.
〔6〕 Binn CN et al, 1984, *J Clin Microbil* 20：28.
〔7〕 高峰等，实验和临床病毒学杂志 2(1)：44.

维普资讯 http://www.cqvip.com

Isolation of Hepatitis A Virus (HAV) from Arca subcrenata Lischke in Sea

Ji Guo-fang[1] Li Xien[1] Huang Hong-yu[1] Zhang Hua-yuan[2]
Shu Quan[1] Liu Bing[1] Jin Zhi-kuan[1] Liu Guang-zhong[1]
Wang Zhi-gao[1] Wan Zong-ju[2] Wu Dong-ming[2]

An outbreak of hepatitis A with uncooked *Arca subcrenata* Lischke has been reported in shanghai in early 1988.

Five specimens were collected from the sea at Qidong County Jiangsu Province vhere Produce *Arca subcrenata* Lischke. Specimens were made of suspension of 40% with the gill and system enteron, then treated by trichloromethane.

HAV was isolated with FRHK4 cell cultrues by 21 days and passed continually two generation.

All specimens are positive for HAV by IF, ELISA, HAV-cDNA dot hybridization test and IEM.

It has been shown *Arca subcrenata* Lischke carries HAV, which can provide evidence for etiology study.

Key words, Hepatitis A virus FRhk4 cell *Arca subcrenata* Lischke

(1. *Jiangsu Provineial Sanitary and Anti-epidemic Station, Jiangsu* 210009 2. *National Instiiute for the Control of Pharmacenticel and Biological Products, Beijing* 100050)