

诊断病毒学

光学显微镜与电子显微镜图示

〔美〕熊菊贞 卡罗琳 K.Y. 方 著

科学出版社

6.5
Z

诊 断 病 毒 学

光学显微镜与电子显微镜图示

【美】熊菊贞 卡罗琳 K.Y. 方 著

湖南医学院微生物学教研室 译

李沛涛 吴洁如 汪秀明 校

科 学 出 版 社

内 容 简 介

本书系根据原文第三版译出,内容分四部分:第一部分介绍诊断病毒学的一般原则和最新进展,以及病毒学检查的标本采集和处理;第二部分是常用的病毒分离和鉴定方法;第三部分是根据病毒的形态及其所致的细胞病变,识别病毒并研究其特性;第四部分介绍细胞培养方法,包括培养基、试剂和溶液的配制。

本书文字简洁,技术操作叙述具体,并附有许多光学显微镜下拍摄的照片,是临床病毒学实验工作者的良好指南。可供从事病毒学实验工作者、医师及医学院校师生参考。

21122/14

G.D.Hsiung CAROLINE K.Y.Fong

DIAGNOSTIC VIROLOGY

Illustrated by Light and Electron Microscopy

Yale University Press, Third edition, 1982

诊 断 病 毒 学

光学显微镜与电子显微镜图示

〔美〕熊菊贞 卡罗琳 K.Y.方 著

湖南医学院微生物学教研室 译

李沛涛 吴洁如 汪秀明 校

责任编辑 谢 诚

科 学 出 版 社 出 版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1987年3月第 二 版 开本: 787×1092 1/16

1987年3月第一次印刷 印张: 13¹/₂; 插页: 1

印数: 0001—3,300 字数: 305,000

统一书号: 14031·101

本社书号: 4893·14

定价: 3.40 元

译 者 的 话

本书原文第三版是美国耶鲁大学医学院病毒学教授、退伍荣军医学中心病毒学实验室主任熊菊贞博士于1982年10月来华讲学时所赠。熊教授从事临床病毒学工作35年，具有丰富的教学 and 实践经验，本书是她和合作者卡罗琳、K. Y. 方的近作。

本书的主要特点是：理论阐述言简意赅，技术操作叙述详细具体，并附有大量实物标本照片、光学显微镜或电子显微镜下摄制的照片和示意图等，这是近年来出版的病毒学方法书中难以见到的。本书可供从事病毒学实验工作者、医生、教师参考。

在翻译时，原著中所用的大量常用缩写词，原则上在第一次出现时都附在全称后面，但为了阅读方便，以后则仍采用全称。许多病毒命名是按照《病毒名称》（1979年科学出版社出版）一书翻译的，极少数译名后还附有原文名。原著中个别明显错误处译者已予改正，并加译者注。序言中的感谢一项及有关试剂和仪器出品公司、厂号以及最后的索引等均省略未译。缩写词移至正文后面。

本书在出版前承中国医学科学院抗菌素研究所陈鸿珊先生提出宝贵意见，特在此表示谢忱。

由于参加本书翻译的人员众多，在文风、格调及措词方面难以完全划一，加之水平所限，仍不免出现谬误，敬希读者批评指正。

译 者 1983年11月于长沙

第三版序言

本书第一版曾作为实验指南发表于1964年,它是为毕业后的学员参加诊断病毒学课程使用的。随后若干年,在实验室里它已被用作识别病毒和描述病毒特征的手册,在医学生课堂中用作教学指导书,并且在实验室课程(诊断和实验病毒学)中用作实验指导。为了说明病毒在细胞培养中引起细胞病变的某些特征,本书附有许多光学显微镜下摄制的照片。尽管诊断病毒学在技术操作方面发展迅速,这些图片和说明仍然必不可少。特别重要的是在这一版中,增加了负染色标本及感染细胞中病毒形态的电子显微镜照片。

为了使资料新颖,对许多章节作了相当大的修订。由于对肝炎病毒和轮状病毒认识的突破以及由于人类乳头多瘤空泡病毒能在细胞培养中分离和增殖,因此增加了包括电子显微镜照片及说明的新的几章。

本书主要是病毒特别是人类疾病中的病毒的形态及其引起细胞病变的直观教材,它对临床实验室工作者、医生、教师在识别病毒及其引起的细胞病变方面有一定帮助。叙述性的资料可作为说明材料的引导。为了使本书便于使用,关于病毒复制的理论和机制的讨论深度、病毒分离鉴定步骤的叙述都加以限制。

本书分为四部分,第一部分介绍诊断病毒学的一般原则和采集标本的规定。第二部分叙述病毒学实验室最常用的病毒分离、鉴定以及抗体测定的基本技术,共列九章,可用作医学病毒学课程的教学指导或教学提纲。第三部分组成本书的大部分,将临床病毒学实验室中可能遇到的代表性病毒再分组列出各病毒型,并且对每组病毒的一般性质作了简短的描述。各型病毒的不同特征都用大体的或显微镜下的照片说明:或是显微镜下显示病毒引起的细胞病变;或是电子显微镜下显示的病毒颗粒或病毒感染的细胞。最后一部分即第四部分,论述了用作组织培养的灵长类或非灵长类组织细胞的制备,并且描述了常见内源性病毒污染,尤其强调了猴病毒组的污染。病毒学家对于组织培养中的猴病毒应当特别注意。

书中的照片可供识别人类病毒及动物病毒的参考,其中描述的实验步骤既对动物病毒研究者也对人类病毒研究者有用。所有照片的大小都为最后的放大倍数(大约数)。

本书未列参考文献,但在第一、二和四部分末尾以及第三部分每章的末尾都简列有综述和选择的专著作为补充读物。

(李沛涛译 吴洁如校)

目 录

第三版序言	(vii)
第一部分 概论	(1)
1. 诊断病毒学的一般原则和最近进展	(1)
病毒诊断的现代概念	(1)
免疫学技术的新进展	(1)
用于准确和快速诊断的电子显微镜检查法	(2)
对病毒组兴趣的增长	(2)
总结	(3)
2. 病毒学检查的标本采集和处理	(4)
标本采集	(4)
标本的保存和运送	(6)
分离病毒的标本处理	(6)
血清学试验	(7)
安全预防	(7)
第二部分 常用的病毒分离和鉴定方法	(9)
3. 病毒分离法	(9)
细胞培养系统	(9)
新生小鼠接种	(10)
胚卵接种	(10)
4. 病毒测定与中和试验	(15)
液体培养细胞的细胞病变	(15)
琼脂覆盖细胞培养瓶的空斑形成	(15)
甲基纤维素覆盖细胞培养板的空斑形成	(17)
细胞培养的中和试验	(18)
培养基和溶液	(20)
5. 血凝与血凝抑制试验	(23)
血凝素滴度测定	(24)
血凝抑制试验	(25)
血细胞凝集抑制试验测定抗体	(26)
去除血清中存在的非特异抑制物	(26)
血清中自然凝集素的去除	(27)
6. 补体结合试验	(28)
补体结合试剂的标准化	(28)
补体单位的滴度测定	(29)
试剂	(32)
7. 酶联免疫吸附测定 (ELISA)	(34)

酶联免疫吸附测定法检测抗原·····	(35)
酶联免疫吸附测定法检测抗体·····	(36)
试剂·····	(36)
8. 光学显微镜检查法·····	(38)
免疫过氧化物酶染色·····	(38)
苏木精-伊红染色·····	(39)
福尔根 (Feulgen) 反应·····	(40)
9. 暗视野显微镜检查法·····	(42)
免疫荧光染色·····	(42)
吖啶橙染色·····	(43)
试剂·····	(44)
10. 电子显微镜检查法·····	(46)
负染色法·····	(46)
免疫电子显微镜检查法·····	(48)
超薄切片法·····	(48)
试剂·····	(50)
11. 主要病毒组特性的理化检查法·····	(53)
核酸测定·····	(54)
大小和结构·····	(54)
类脂成分·····	(56)
酸性pH稳定性 试验·····	(57)
第三部分 根据病毒的形态学和病毒所致的细胞病变 识别病毒和研究其特性 ·····	(58)
RNA病毒 ·····	(58)
12. 小核糖核酸病毒科·····	(58)
肠道病毒·····	(58)
鼻病毒·····	(67)
13. 披盖病毒科·····	(73)
阿尔发病毒组 (Alphaviruses) 和黄色病毒组 (Flaviviruses)·····	(73)
试剂·····	(82)
14. 风疹病毒科·····	(84)
风疹病毒·····	(84)
试剂·····	(90)
15. 粘病毒科·····	(91)
流行性感胃病毒和副流行性感胃病毒·····	(91)
16. 假粘病毒科·····	(101)
麻疹病毒·····	(101)
呼吸道合胞病毒·····	(107)
17. 呼肠病毒科·····	(111)
呼肠病毒·····	(111)
轮状病毒·····	(116)
18. 弹状病毒科·····	(119)
狂犬病毒和水疱性口炎病毒·····	(119)

DNA病毒	(122)
19.腺病毒科	(122)
腺病毒	(122)
20.疱疹病毒科	(132)
单纯疱疹病毒	(132)
水痘-带状疱疹病毒与巨细胞病毒	(138)
爱泼斯坦-巴尔病毒 (Epstein-Barr Virus)	(146)
21.痘病毒科	(150)
天花与牛痘病毒	(150)
22.乳头多瘤空泡病毒科	(159)
疣、BK与JC病毒	(159)
未分类病毒	(163)
23.肝炎病毒	(163)
第四部分 细胞培养	(167)
24.细胞培养的制备	(167)
原代肾细胞培养	(168)
原代胚胎细胞培养	(170)
连续传代细胞系	(171)
25.动物组织的内源性病毒污染	(173)
猿猴病毒	(173)
非灵长类动物病毒	(176)
26.培养基、试剂和溶液	(181)
培养基	(181)
试剂和溶液	(185)
缩写词	(189)
补充读物	(191)

第一部分 概论

1. 诊断病毒学的一般原则和最近进展

近年来,虽然在分子病毒学方面已取得广阔的进展,但病毒性疾病的实验诊断仍未被广泛应用。病毒诊断设备通常仅用在研究室和国家卫生部门,而在临床微生物学实验室却很少使用。这种状况在很大程度上是由于进行病毒学试验必须具有严格的操作程序和专业知 识。一般卫生工作者不熟悉病毒诊断程序,包括正确采集病毒培养的标本。然而,由于检查病毒抗原的快速、敏感的技术发展,以及由于治疗某些病毒病有效药物的进展,近年来医生对于诊断病毒学的态度已有相当 的转变。

病毒诊断的现代概念

通常,当医生对一个患者的发热性疾病不能作出明确的诊断时,他(她)可以解释患者“可能为病毒感染”。然而,在许多病毒中鉴定哪一种病毒可能引起患者的疾病,这对临床医生来说似不重要,因为通常没有特效治疗。

现今疱疹性脑炎的化学疗法已有可能,但在着手治疗前通常要做脑活检证明为单纯疱疹病毒感染。同样,当从即将分娩的孕妇生殖道分离出单纯疱疹病毒时,为了避免新生儿感染,建议作剖腹产术。在这两个例子中,必须有明确的病毒诊断。因而,为了满足对病人给以恰当治疗的需要,诊断病毒学家有责任尽可能准确而快速地从临床标本中鉴定病毒。

下几章叙述用选择性细胞培养系统结合光学和电子显微镜检查,作为识别和鉴定病毒以及病毒引起细胞变化的方法。在各个主要病毒组的章节中,特别制定了对病毒感染快速诊断的指标,并附有对可能遇到的某些不常见情况,例如混合病毒感染的特别参考资料。

免疫学技术的新进展

现今,有许多血清学试验用于病毒性疾病的诊断,普遍应用的有补体结合试验(CF)、血凝抑制试验(HI)和中和试验(NT)。近年来,通过在免疫荧光染色(IF)、酶联免疫吸附测定(ELISA)或放射免疫测定(RIA)中使用标记的特异性病毒抗体,血清学试验的敏感性已有提高。这些新的免疫学试验,特别是酶联免疫吸附测定,对于检测那些用细胞培养法不能培养出来的病毒或者在细胞培养中生长缓慢的病毒特别有价值。在这些情况下,病毒性疾病的诊断几乎完全依靠免疫学试验。这些试验在流行病学研究中极为有用。可是,因经常出现抗原交叉以及可能缺乏高度特异的试

剂, 在分离和鉴定出病毒之前常不能保证准确的诊断。

用于准确和快速诊断的电子显微镜检查法

在电子显微镜下直接检视病毒颗粒, 对于识别特殊的病毒是最可靠的方法之一。用电子显微镜检查 (EM) 鉴别皮肤病损中的痘类病毒与疱疹病毒已有数十年。在培养的淋巴母细胞株中识别爱泼斯坦-巴尔 (Epstein-Barr) 病毒, 在进行性多灶性脑白质病 (PML) 患者的脑细胞中识别乳头多瘤空泡病毒 (Papovavirus) 颗粒, 以及在亚急性硬化性全脑炎 (SSPE) 患者的脑细胞中识别麻疹病毒核衣壳, 都是由于应用电子显微镜才使人类病毒性疾病的诊断成为可能。用电子显微镜也能在乙型肝炎患者血清中发现两种颗粒, 即表面抗原和丹 (Dane) 颗粒, 以及在甲型肝炎患者粪便标本中发现小病毒颗粒。此外, 近年来免疫电子显微镜检查法 (IEM) 发展很快, 比单纯电子显微镜检查更为有用和敏感。如果没有应用电子显微镜或免疫电子显微镜检查, 在非细菌性胃肠炎患者粪便标本中鉴定诺尔瓦克 (Norwalk) 病毒以及在婴幼儿腹泻的粪便标本中识别轮状病毒 (Rotavirus) 就不可能。

过去, 为作电子显微镜检查, 冗长而耗费时间的标本制备步骤相当大地阻碍了它在临床实验室的应用。近年来改进的技术已简化了许多步骤, 且减少了标本制备所需的时间, 而将电子显微镜检查法引入临床病毒学实验室的范畴。

对病毒组兴趣的增长

新技术的发展大大地影响了对某些病毒组兴趣的增长。兴趣的增减、研究积极性的波动和对病毒诊断的要求, 每年起伏不定。如同《医学文献索引》(Index Medicus) 中报道的出版文献数所示 (图 1)。明显地, 由于二十世纪六十年代初期为降低脊髓灰质炎的发病率, 成功地使用了脊髓灰质炎减毒活疫苗, 研究该病毒的兴趣已逐渐下降。另方面, 流行性感冒病毒 (简称流感病毒) 感染每年以散发或流行的形式出现, 引起群众经常的注意, 可以理解若干年来对流行性感冒病毒有着稳定的兴趣。1975—1976年猪流行性感冒可能大流行的威胁或许是当年和其后两年出版的流行性感冒文献数目增多的原因。

虽然病毒性肝炎久已被认为是重要的临床课题, 但直到最近以前在这方面发表的文献仍然不多。在患者血清中发现乙型肝炎病毒抗原, 电子显微镜下看到病毒颗粒, 放射免疫测定的应用, 以及为检查乙型肝炎病毒抗原和抗体的其他免疫学方法, 无疑是与对乙型肝炎兴趣的增长有关。另外, 由于电子显微镜和免疫电子显微镜检查法的应用, 使得认识甲型肝炎病毒成为可能, 随后涌现出许多关于这个课题的文献。

二十世纪六十年代之初, 疱疹病毒包括单纯疱疹病毒方面发表的文献很少, 可能因为考虑这些病毒除了偶尔引起疱疹性脑炎外, 不能引起主要的人类疾病。然而, 通过单纯疱疹病毒 2 型和宫颈癌之间的流行病学联系, 爱泼斯坦-巴尔病毒和伯基特淋巴瘤 (Burkitt's lymphoma)、鼻咽癌、传染性单核细胞增多症之间的联系, 肾移植受体中巨细胞病毒 (Cytomegalovirus) 分离率的增长, 和在使用免疫抑制剂的患者中水

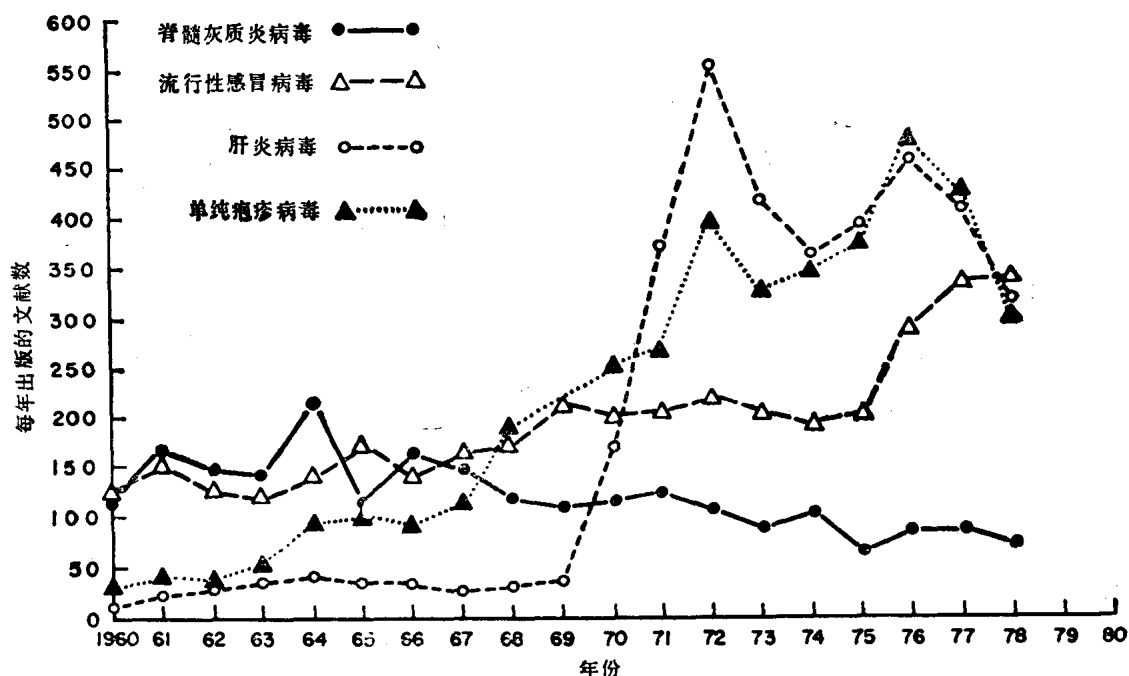


图1 1960—1978年, *Index Medicus*逐年报道的关于四个代表病毒组的文献数 (引自 G.D.Hsiung Yole *J. Biol. Med.* 53: 1, 1980)

痘-带状疱疹病毒分离率的增长, 阿糖腺苷 (Adenine arabinoside) 治疗单纯疱疹性脑炎的成功, 以及认识到疱疹病毒是性传播疾病的一个重要原因, 激起了对疱疹病毒巨大的兴趣。

总 结

在诊断病毒学方面兴趣的扩大与增长, 无疑地部分是由于技术的进展。组织移植、癌症化学疗法的新发展和抗病毒疗法的进展, 大大增长了对病毒感染的快速、准确诊断的需要。病毒学家不再依赖实验动物和细胞培养法去分离鉴定病毒, 现在他们也可换用其他方法, 包括电子显微镜和免疫电子显微镜检查法以及近来发展的免疫学试验。如果对更多的病毒疾病的化学疗法成为现实, 对病毒性疾病的特异和快速诊断的需要将更迫切。因而, 诊断病毒学实验室不久即可象诊断细菌学实验室一样为临床服务, 从而成为临床医学的一个重要分支。

(胡明杰译 王 慧校)

2. 病毒学检查的标本采集和处理

标本采集

要从临床材料中成功地分离出病毒，很大程度上取决于标本的恰当采集和处理。用来作为病毒检查的标本应收集于无菌容器中，而且尽可能在病程的早期采集（图2），或者在患者住院的当天进行。这类合适的标本要立即送往病毒学实验室。一切标本都要作适当的标记，并附有下列资料，如患者姓名、年龄、性别、发病日期和暂定的临床诊断；后者对于选择最敏感的试验系统是重要的。从疑为病毒性感染患者采集的标本类型概括于表1。

咳嗽液 可以用5—10毫升生理盐水，让患者含嗽几次而取得。生理盐水中通常加有0.5%明胶或者牛血清白蛋白，以保护不稳定的病毒。

喉、鼻咽或直肠拭子 将拭子放入2毫升的试管，其中含有蛋白稳定剂——0.5%明胶或小牛血清的汉克斯（Hanks'）平衡盐溶液（BSS）。也可将拭子直接放入含有双倍浓度抗菌素的培养管中。其他类似的拭子均可使用。

粪便标本 因为任何时候粪便材料中只含少量病毒，所以取5—10克粪便标本比直肠拭子要好。

脑脊髓液（CSF）、胸膜或者心包渗出液 各取几毫升（最好5—10毫升）装入无菌试管中。

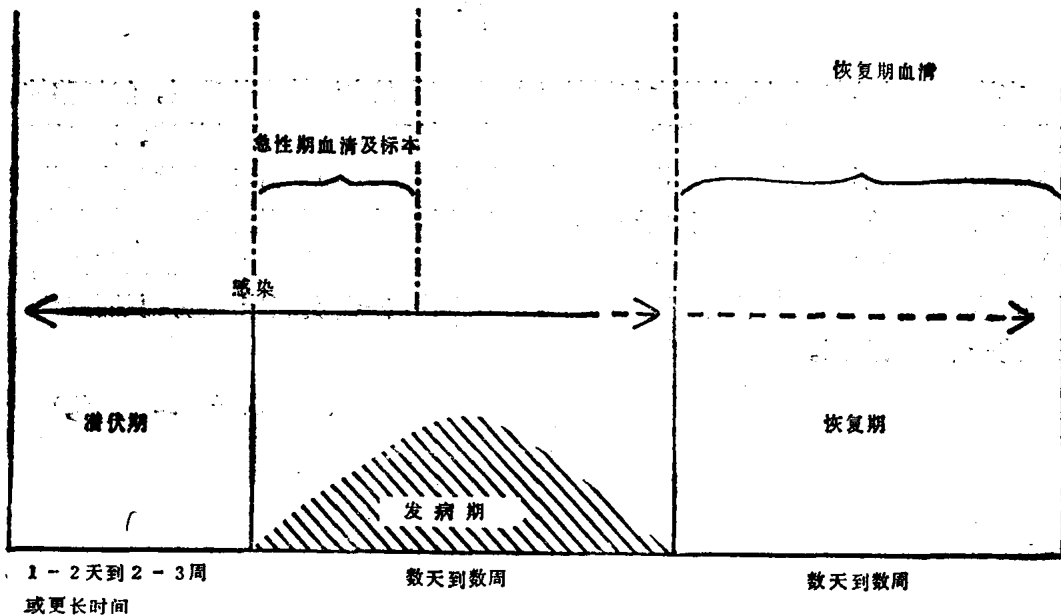


图2 病毒检查采集标本时间表

（摘自G.D.Hsiung and R.H.Green, *Virology and Rickettsiology*, vol. 1, pt. 1, p. 4）

尿液 取刚排出的新鲜尿液，最好是用无菌瓶收集第一次晨尿（5—10毫升）。

血标本 所有的患者都要抽血。第一份血标本（凝固的血液10—15毫升）在入院时采取。第二份血标本在2—3星期后，或者在出院前采取。有时，为了分离血细胞，也需要枸橼酸盐或肝素抗凝的血液。

尸检材料 应于死后尽可能早地获得，无菌采集，不要使用防腐剂。对于切除的各种器官，要分开使用器械和容器。

表1 从疑为病毒感染的患者采集的各种标本

可疑病毒	常与病毒有关的临床疾病	临床标本 ^①	尸检材料
肠道病毒	无菌性脑膜炎，肋肌痛（pleurodynia） 心肌炎，心包炎，疱疹性咽峡炎，脊髓灰质炎	粪便，直肠拭子， 喉拭子，脑脊液	脊髓和其他中枢神经系统组织，血液，心包液，病理损伤组织，结肠内容物
鼻病毒	非特异性发热性疾病，普通感冒， 非发热性上呼吸道感染	鼻洗液， 鼻咽拭子	呼吸道组织， 肺组织
披盖病毒	急性发热性疾病，脑炎， 无菌性脑膜炎	血液	脑和中枢神经系统组织， 血液
流感病毒和副流感病毒	咽炎，哮喘（croup），毛细支气管炎， 肺炎，上呼吸道感染	鼻咽洗嗽液，鼻拭子， 喉拭子，血液， 含嗽液，尿	肺组织，气管，血液
腮腺炎病毒	腮腺炎，睾丸炎，无菌性脑膜炎	喉拭子，血液，尿	血液，中枢神经系统组织，肺
麻疹病毒	麻疹，亚急性硬化性全脑炎（SSPE）	喉拭子，血液，尿	
呼吸道合胞病毒	哮喘，毛细支气管炎，肺炎	喉拭子，鼻拭子	肺，气管
呼肠病毒	呼吸道疾病（？）腹泻（？）	喉拭子，直肠拭子	粪，血，肺
轮状病毒	胃肠炎	粪便	小肠和结肠内容物
风疹病毒	先天性风疹，淋巴结病	喉拭子，直肠拭子，尿	胎盘和胎儿组织
腺病毒	急性呼吸道疾病，肺炎，咽结膜热，角膜结膜炎等	喉拭子，直肠拭子，粪便，眼拭子	肺，结肠内容物
单纯疱疹病毒	口龈炎，角膜结膜炎，唇疱疹，生殖器疱疹，脑炎	水泡液，喉拭子或口嗽液，阴道拭子， 脑活检组织	病损的脑组织，其他器官
水痘-带状疱疹病毒	水痘，带状疱疹	水泡液，病灶拭子	
巨细胞病毒	单核细胞增多症，肝炎，肺炎，巨细胞包涵体病	血块黄层，尿，喉拭子	肺，肾，唾液腺
痘病毒	湿疹性痘疹，天花	局部病损液体，脓汁，痂皮，血液	肝，脾，血液
肝炎病毒	黄疸	血清，粪便，肝，肾	肝，血液，结肠内容物

①作抗体测定，发病后应立即采集急性期血清；发病后2—4周要采集恢复期血清。

标本的保存和运送

因为大多数病毒不稳定，对于分离病毒的标本必须冷藏。重要的是要将标本快速递送到实验室，如难免延误，则必须冷藏。如有可能，标本一经送到实验室应立即处理和接种。如耽误时间不长，仅数小时，可在4℃冷藏。对于较长时间冻存的标本，最好置于-70℃而不要置于-20℃。

如邮寄标本，需将标本置于装有干冰的密封容器内。

分离病毒的标本处理

血标本 血标本不需冰冻，凝固的血液离心后即可得到血清。血清应尽早自血凝块中分离并冻存，最好是在-70℃。在某些情况下，肝素或者枸橼酸盐抗凝的全血，或者含有白细胞的血块黄层（buffy coat）均可用于病毒分离。

体液（包括脑脊液、胸腔液、水泡液以及尿液） 直接接种到试验用的培养管中。

喉拭子、眼拭子、鼻拭子等 直接放入含有双倍浓度抗生素*的试验培养管中或者将采集物/运送液接种到试验的培养管中。

粪便标本 处理如下：

1. 取4克粪便加入16毫升汉克斯平衡盐溶液中，制成20%的粪悬液。

2. 如果方便，装在有塞盛有玻璃珠的烧瓶中，强力振荡30分钟。

3. 以3000转/分离心沉淀30分钟。最好用冷冻离心机。

4. 吸出上清，以3000转/分再离心沉淀30分钟。

5. 通过450毫微米微孔滤膜过滤，并加入抗生素，其最后浓度是：青霉素500单位/毫升，链霉素500微克/毫升，新霉素100微克/毫升，两性霉素B2.5微克/毫升或者庆大霉素100微克/毫升。

6. 接种到合适的培养系统中。

尸体解剖材料（包括骨髓、肺组织等） 处理如下：

1. 用乳钵和研棒或用匀浆器研磨尸体解剖组织。

2. 加1—2毫升汉克斯平衡盐溶液，研磨成糊状；再加1—2毫升平衡盐溶液研磨，然后逐渐加平衡盐溶液，直到制成10—20%悬液。

3. 加入上面列举的抗生素。

4. 以1000转/分离心15分钟，将上清液和细胞沉淀物接种于合适的培养系统中。

5. 对于分离与细胞相联的病毒，将组织绞碎或者用胰蛋白酶消化以避免细胞溶解（见第四部分）。

6. 绞碎的或用胰蛋白酶处理后的细胞悬液应用生长液稀释成10%的浓度，培养于细胞培养瓶中或与易感细胞共同培养。

* 各实验室中选用抗生素溶液情况不同，见188页附录资料。

血清学试验

在病毒分离不可能进行以及要判定所分离的某些病毒的意义时，必须作血清学试验。血清学试验应用于诊断时，需要双份血清。一份取自疾病的急性期，另一份取自发病后10—21天或更长的时间。偶尔采取发病后短期内的单份血清，用于检测抗体的IgM部分，但是一定要作类风湿因子对照。关于各种血清学试验的操作步骤在第二部分叙述。

至于标本采集和处理、病毒分离以及血清学试验更详细的步骤第191页所列的参考文献作了介绍。另外的资料可从各种手册和教科书中查找。

安全预防

病毒实验室工作人员的安全预防

与传染因子接触或者处理疑有病原因子材料的所有工作人员都面临感染的危险，因此必须有适当的安全预防和遵守下述细致的基本实验室规则。在病毒实验室中，这些预防措施特别重要。病毒实验室中病毒污染物是经常要考虑的感染来源，甚至在未接种的“正常”对照培养管里也有。最好是在病毒实验室工作的所有人员开始工作之前，取得他们的血清标本，以后每年采取一次血清，冻存，为以后试验备用。

特殊的实验室安全规则

1. 所有含病毒的小瓶、培养管、烧瓶等在不使用时，应该塞紧。
2. 勿用口吸吸管，所有病毒的稀释和接种都用吸管操作装置进行。用过的吸管要放入有消毒剂的容器内。
3. 被污染了病毒的吸管切勿放置在工作台上。切勿手持污染的吸管到处走动，切勿将任何含病毒的液体弃入污水槽中。
4. 不允许在实验室内吃、喝或吸烟，不允许在实验室橱柜里或电冰箱里贮藏食物或饮料。
5. 离开实验室之前要充分洗手。（离开工作区之前要脱去外科手套）。
6. 每天工作完毕后用消毒剂擦洗工作台面。
7. 在病毒实验室工作的全部时间内要穿上工作服。

一般的实验室安全操作

1. 一切被污染了的器材，包括吸管、注射针和注射器都要专门标记，在清洗或处理以前要用高压蒸气灭菌。不许将有传染性的物质放入建筑物的排水系统中。
2. 工作场所必须备有适用的消毒剂，包括10%福尔马林和/或70%乙醇。
3. 要特别关心与感染动物接触的人员。感染动物用过的水瓶或笼子要灭菌。必须小心丢弃感染动物的尸体和组织，将它们送到焚化炉处理。感染过的胚卵也要用同样的方

法处理。

总结

如能使用高压蒸气灭菌器或者蒸气热是最有效的消毒灭菌方法。在不能使用高压蒸气灭菌的地方，紫外线能有效地去除空气和物体表面的污染。此外，无论哪个实验室要针对实验中正在使用的特殊病毒，应用有效的疫苗，对工作人员进行免疫接种。

(查国章译 胡明杰校)

第二部分 常用的病毒分离和鉴定方法

3. 病毒分离法

病毒分离的方法各个实验室有所不同, 这些不同不仅取决于专门的物资和设备, 也取决于所用的动物种类和组织培养细胞系统。通常, 用新生小鼠、胚卵和多种细胞培养为好。对于虫媒病毒或柯萨基A组病毒的感染, 新生小鼠是最敏感的宿主。甲型流感病毒则选用胚卵, 某些甲型流感病毒株偶尔可用细胞培养来分离。临床实验室中常见病毒的分离鉴定的操作流程将于本章末介绍。然而, 细胞培养仍然是大多数(即使不是全部)诊断病毒实验室最常用的方法。

细胞培养系统

自从发现脊髓灰质炎病毒能在培养的动物细胞中增殖后, 细胞培养就成为分离多种病毒最合适的系统; 多种原代细胞培养和传代细胞系都被采用。虽然大多数细胞型有商品供应, 但多种细胞仍能较易地在各自的实验室制备。应用新鲜制备的细胞培养是最理想的。老化的细胞通常对病毒感染的敏感性有所降低。表2列举了对主要病毒组病毒分离的常用各种细胞系统。各种病毒引起的细胞病理的详细情况将在特殊病毒组的各章节中述及。通常采用下述步骤:

1. 每个培养管接种标本0.1—0.3毫升(在某种选择的情况下, 可按同样方式将标本接种于含有盖玻片的莱顿(Leighton)细胞培养管中)。

2. 每天检查接种管的细胞病变(CPE)(某些细胞株, 如从人喉上皮样细胞癌衍变出来的人喉上皮癌(Hep-2)细胞株培养, 需每两天换新鲜培养液)。

3. 当细胞病变出现后, 再传代培养到新鲜的同型细胞培

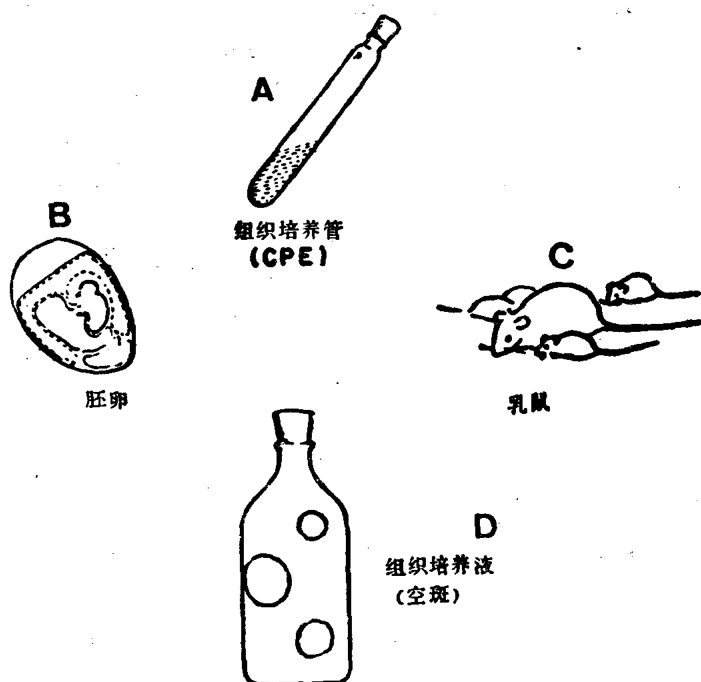


图8 病毒分离的实验室技术 A. 细胞病变的组织培养系统。 B. 胚卵接种。 C. 乳腺接种。 D. 空斑形成的组织培养系统