

病毒性疾病的实验诊断

山东省卫生防疫站 合编
济南市卫生防疫站

毛主席语录

路线是个纲，纲举目张。

把医疗卫生工作的重点放到农村去。

应当积极地预防和医治人民的疾病，推广人民的医药卫生事业。

对于外国文化，排外主义的方针是错误的，应当尽量吸收进步的外国文化，以为发展中国新文化的借镜；盲目搬用的方针也是错误的，应当以中国人民的实际需要为基础，批判地吸收外国文化。

前 言

病毒性疾病是由一些致病性的病毒引起的，在人类、动物、植物中均有发生和流行。这类疾病在人类中发生的不少，有些具有传染性强、发病率高的特点，如流行性感冒、麻疹、传染性肝炎等。对人类的健康和工农业生产的发展具有极大的影响和危害。

为贯彻好预防为主方针，达到对这类疾病的治疗、预防、以至扑灭的目的，不仅需要对它的流行病学、病理学、病理生理学和传染病学等进行系统的和细致的研究，则更重要的是能及时对发生和流行的疾病的病原作出正确的诊断，迅速采取有效防治措施，才能控制疾病的扩散和蔓延。随着防治工作的进展，对病毒性疾病的实验诊断技术和研究方法的需要，日益显示了它的迫切性和重要性。为促进病毒学工作的开展，在党的“十大”精神的鼓舞下，现将我省举办的病毒学进修学习班的有关材料，整理编印成册，供工作中参考。

本材料共分实验诊断的一般方法和常见疾病的实验诊断两个部分。由于我们的思想和技术水平的限制，不妥和错误之处，请提出批评指正。

者

1973.10.1

目 录

第一章 实验诊断的一般方法	(1)
第一节 实验守则	(2)
第二节 须备的仪器及药品	(3)
第三节 滤器的种类、使用及清洁法	(6)
第四节 标本的采集、运送及保存	(15)
第五节 病毒株的保存方法	(19)
第六节 实验诊断的方法	(24)
第七节 动物试验	(59)
第八节 鸡胚培养	(79)
第九节 组织培养	(99)
第二章 常见疾病的实验诊断	(158)
第一节 流行性乙型脑炎	(159)
第二节 脊髓灰质炎	(169)
第三节 Cocksackie 病毒感染	(178)
第四节 ECHO 病毒感染	(183)
第五节 流行性感冒	(187)

第 六 节	副流感	(208)
第 七 节	流行性腮腺炎	(215)
第 八 节	腺病毒感染	(219)
第 九 节	鼻病毒(Rhino Viruses)感染.....	(223)
第 十 节	麻疹	(229)
第十一节	天花和牛痘	(232)
第十二节	狂犬病	(238)
第十三节	其他病毒感染	(241)
附 录	常见病毒的特性鉴别	(247)

第 一 章

实验诊断的一般方法

病毒的体积甚为微小，也不能在人工培养基上生长繁殖。近些年来，由于电子显微镜、超速离心机许多新仪器和组织细胞培养等新技术的应用，使病毒学的研究工作有了飞跃发展，不断获得新的成就，从而提高了人们对病毒性疾病的认识能力和防治水平。

病毒性疾病的实验诊断，一般需要较长的时间才能完成，且有些疾病的诊断则需要较特殊的仪器及药品和较高的技术，因此，一时尚难普遍被采用，由于这样就还未能满足临床上的要求。

为了疾病诊断上的一般需要，在本部分内将对病毒性疾病的实验诊断中的实验守则、须备的器材和药品、滤器的种类、使用和清洁法、标本的收集、运送和保存、病毒株的保存方法、动物实验、鸡胚培养、组织培养常用的实验诊断方法等基本技术，作较为详细的介绍和叙述，以供参考。

第一节 实验守则

病毒学的实验室内可致传染的物品较多，工作人员应随时提高警惕，为避免意外事故发生，特规定守则如下：

一、在病毒学实验室内工作的人员，应接种必要的与实验有关的有效病毒疫苗。

二、实验室内特别是组织培养操作间，须经常保持干燥、清洁，在进行病毒传种或无菌操作前后，均应以紫外线照射灭菌，必要时可先用 3 ~ 5 % 的酚（石炭酸）或煤酚皂（来苏儿）溶液擦拭或喷雾消毒。

三、进入接种间时，须更换经消毒的隔离衣、口罩和帽子，并穿着拖鞋等。两手要进行严格消毒，必要时须戴消毒橡胶手套和防护眼镜。

四、一个接种操作间，严禁同时进行二株病毒株的传种。吸取活毒材料时，勿于悬空吹出。

五、在进行活毒实验操作完毕后，所穿着的隔离衣、口罩、帽子等物，应于出操作间前更换掉，两手须经消毒液浸泡后，方能外出。

六、凡沾有活毒的材料或器具，须随时投入 5 % 煤酚皂或 1 % 盐酸溶液内，浸泡过夜或煮沸消毒后，始能进行洗涤。处理活毒材料后，桌面也须以 5 % 煤酚皂溶液擦洗消毒。

七、凡有感染性的鸡胚或动物尸体，应立即投入炉内焚化，或浸入 5 % 煤酚皂溶液内，或盛入容器内进行高压消毒后，方能带出室外进行处理。

八、工作人员要随时注意安全操作，以免发生事故。如发生意外，应及时向领导报告，迅速采取有效措施。

第二节 须备的仪器及药品

电动仪器

其他仪器

玻璃器皿

化学药品

一、电动仪器

病毒学所用的电动仪器，除少数与细菌不同外，多数均相同。一般的病毒学实验室内应有表1内所列规格要求的仪器。

表1 电动仪器的规格要求、数量及用途

名 称	规 格 要 求	数 量	用 途
普通冰箱	4°~8℃	2	保存各种溶液及处理标本
低温冰箱	-20°~-70℃	1	保存各种病毒材料(标本)及血清等
普通离心机	3000~5000转/分钟	1	分离血清，洗涤血球及制造抗原等
高速离心机	10000~18000转/分钟	1	提纯病毒等
恒温水浴箱	37℃及56℃	2	消化组织，病毒血清灭活及血清学试验等
真空抽气机	30~50立升	1	真空干燥及吸引滤过等
孵育箱	35℃~37℃	3	组织培养、接种后的鸡胚培养等
孵卵箱	盛放100~500只卵	1	鸡胚孵化
检卵器	内照视者	1	检视鸡胚
卵壳开窗器		1	鸡胚开窗
组织捣碎机	8000~10000转/分钟	1	捣碎组织等
紫外线灯	30瓦2537. Å	数只	实验操作间等消毒

二、玻璃器皿

供病毒学实验用的玻璃器皿质量要求较细菌学为严格，特别是供作组织培养用的玻璃器皿，须选择中性硬质，管(瓶)壁厚薄均匀平坦，且无划痕者。各种玻璃器皿的规格要求可参考表2。

表 2 玻璃器皿的规格要求、数量及用途

名 称	规 格 要 求	数 量	用 途
真空干燥器	20厘米	1	干燥毒种用
普通干燥器		2	保存易潮解的药品
玻璃研磨器	大、中、小	10	磨碎小量组织
玻璃研钵	6~10厘米	3	磨碎组织及其他物质用
玻璃蒸馏器	双蒸馏全玻璃	1	制造双蒸或三蒸馏水
冰 瓶		1	运送标本
注射器	10、5、2、毫升 1及0.25	各10	供接种用
中性硬质玻璃瓶	500、250、100、 50及30毫升		盛放溶液
中性硬质玻璃管	3.5×22厘米	10	盛放滴管
中性硬质玻璃管	3.5×40厘米	5	盛放吸管
中性硬质玻璃管	1.8×18厘米	20	盛放1毫升0.25毫升注射器
中性硬质玻璃管	1.2×10厘米		血清学试验及组织培养用
中性硬质玻璃瓶	10毫升		组织培养用
下口瓶	10.000毫升	1	盛放单蒸馏水
下口瓶	5.000毫升	1	盛放双蒸馏水
中性硬质培养皿	10厘米	10	处理组织
量 筒	1000及100毫升	2	配制溶液用
吸 管	10、1、0.2 毫升		吸量溶液
滴 管	直形及大肚形		移液及吹打组织用
无刻度量筒	2.000毫升	2	浸泡吸管及滴管
鼠 缸	13×15厘	10	盛放试验鼠
玻璃砂滤器	4、5、6 号	各2	溶液澄清、除菌及病毒滤过试验
抽气吸引瓶	500及250毫升	各1	抽气滤过
玻璃漏斗	9 及12厘米	各1	滤过溶液用

三、其他仪器

可参考表 3。

表 3

名 称	规 格 要 求	数 量	用 途
普通显微镜	1000×	1	观察组织病变;包涵体,细胞培养及病变等
受皿天平	100克	1	平衡用
扭力天平	50克	1	一般称量用
精细天平	1/1000克	1	较精密称量用
鸡卵盘	4 × 6 孔	20	盛放鸡卵
试管架	3 × 10及 4 × 10孔	各10	血清试验用
有机玻璃反应板	4 × 5 孔	20	血凝及血凝抑制试验用
针 头	19、20、22及27号		接种用
蔡氏滤器		2	除菌用
体温计		2	测量试验动物体温
搪瓷桶	大、小	3	处理物品用
计时钟		2	计时用
铝 盒			盛放组织培养瓶
高压灭菌器	小 型	1	消毒用
煮沸锅		1	消毒用
鸡胚固定架		2	架放鸡卵用
动物固定器		1	固定动物用
接种橱	设有紫外线灯	2	进行严格无菌操作用
外科及眼科有关器械			供动物解剖及处理组织用
隔离衣、帽、口罩等			进行无菌操作用
橡皮塞	各种型号		密封组织培养管(瓶)用

四、化学药品

病毒学所用之化学药品种类较多,其质量要求亦严格,尤以盐类为更甚。为保证工作质量,须选择成分高,杂质含量低的分析试剂或保证试剂(即AR或GR)供使用。

化学药品使用的名称目前较复杂,有的药品名称竟达十数个之多,为避免因名称差异而可能发生错误,文中所用化学药品名称,绝大部分是录用了中国医药公司上海化学试剂采购供应站编著的“试剂手册”中的正名。如核对其别名时,可查阅该手册。

第三节 滤器的种类、使用及清洁法

滤器的种类

火棉胶滤膜

矽藻土制滤器

滤器的使用

陶瓷滤器

滤器的清洁法

石棉板滤器

附：火棉胶滤膜的制作方法

玻璃砂滤器

滤器为病毒学实验研究所必须的工具之一，由于它具有一定大小的孔径而一般细菌不能通过，故常用来将液体中的病毒与细菌相分离。现将滤器的种类、使用及清洁方法等，分述如下：

一、滤器的种类

按其所以采用原料不同，可分为矽藻土、陶瓷、石棉、玻璃砂及火棉胶等制品五种。

(一) 矽藻土制滤器：利用矽藻土(Diatomaceous)为原料者有贝克斐尔特(Berkefeld)氏滤器，曼特尔(Mandler)氏滤器两种，均为柱状。前者其滤心部系由矽藻土压制而成，带负电。以其孔径大小分为“V”(Viel—粗号，孔径约为 $8 \sim 12 \mu$)，“N”(Normal—中号，孔径约为 $5 \sim 7 \mu$)，“W”(Weng—细号，孔径约为 $3 \sim 4 \mu$)三级。而后的滤心部则系由矽藻土，石膏和石棉等混合压制而成。以其孔径大小分为“P”(Preliminary—初步)，“R”(Regular—正规)及“F”(Fine—细微)三级。

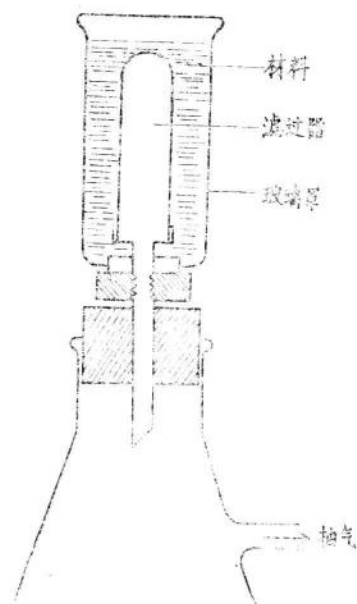


图1 贝克斐尔特氏滤器装置

(二) 陶瓷滤器：利用未涂釉的素烧瓷为滤心者有张伯兰 (Chamberland) 氏滤器，西拉斯 (Selas) 氏滤器及库尔 (Coors) 氏滤器三种，均为柱状。此类滤器系由白陶土与少许砂土混合烧制而成，其质较坚固，不易破碎。

张伯兰氏滤器分为 L_1 、 L_{1bis} 、 L_2 、 L_3 、 L_5 、 L_7 、 L_9 、 L_{11} 及 L_{13} 等九级，号头愈大其孔径愈细，滤速也愈慢。

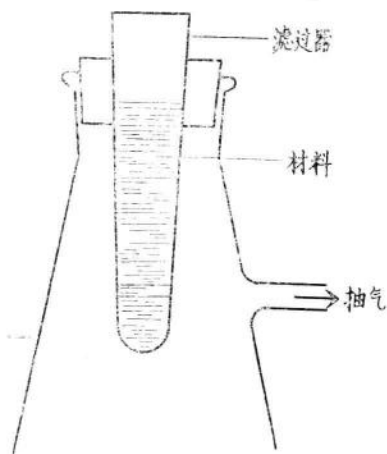


图2 张伯兰氏滤器装置

西拉斯氏滤器较常见者有七级，仅有三级常用来除菌，即“015”号(孔径约在 1.4μ 以下)，“02”号(孔径约在 0.85μ 以下)及“03”号(孔径约在 0.6μ 以下)三级。

库尔氏滤器 P-1 (Porosity No. 1) 为最粗号(孔径约为 $13\sim 15\mu$)，P-2 (Porosity No. 2) 即粗号(孔径约为 $6.5\sim 8.5\mu$)，P-3 (Porosity No. 3) 即细号(孔径约为 $1.3\sim 2.0\mu$) 及 P-5 (Porosity No. 5) 即微细号(孔径约为 $0.65\sim 0.8\mu$)。

(三) 石棉板滤器：实验中常用的蔡氏(Seitz)滤器，其滤过部分为石棉压制的石棉板。滤板孔度分为 K (Klar)

及EK(Entkeimung)两种，前者常用来澄清液体，而后者用来除菌。此类滤器通常有二种形式，一为减压式滤过者，另为加压式滤过者。滤过板用后均弃之。



图3 蔡氏滤器装置

(四) 玻璃砂(或垂熔玻璃)滤器：此类滤器亦称半熔玻璃滤器，其滤过部分为均匀的玻璃微细颗粒，在一定温度条件下模压而成的具有极细孔度的玻璃质滤板。其级别的表示方法各厂均不相同，Pyrex厂采用EC(Exlracoarse)即最粗号(孔径约为 160μ)，C(Coarse)即粗号(孔径约为 40μ)，M(Medium)即中号(孔径约为 14μ)，F(Fine)即细号(孔径

约为 5μ), UF(Ultra—Fine)最细号(孔径约为 $1\sim 2\mu$)。但有的厂则采用“0”号(孔径约为 $150\sim 200\mu$),“2”号(孔径约为 $40\sim 90\mu$),“3”号(孔径约为 $15\sim 40\mu$),“4”号(孔径约为 $5\sim 15\mu$),“5”号(孔径约为 $0.7\sim 3\mu$)及“5/3”号(为避免“5”号滤板在使用过程中易于破碎,以5号及3号的滤板合并而成)。

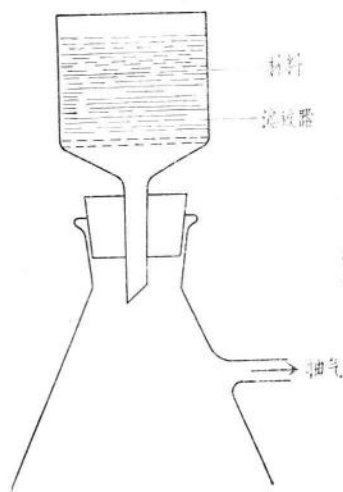


图4 玻璃砂滤器装置

(五) 火棉胶滤膜: 此滤膜系由火棉胶 (Collodion) 即硝化纤维素 (Nitrocellulose) 制成。目前所用的滤膜主要系根据尔福特 (Elford) 氏的方法制备的。即将火棉胶与适量的戊醇 (Amyl alcohol) 及醚与醇的混合液制成火棉胶液, 然后倾注到玻璃板上, 于室温中蒸发变干成一胶膜, 再

以流水冲洗即成。制成胶膜的孔径大小，可因改变火棉胶溶液的成份及蒸发变干时的温度而得到控制，一般能制成 $3\mu\sim 10m\mu$ 不同大小孔径的膜。它最适用于研究病毒的大小，经实验证明与电子显微镜或超离心沉淀法所测结果大致相同。

二、滤器的使用

由于滤器的种类型号繁多，因此，在进行滤过时须根据需要作适当选择，方可达到滤过的目的。现将常用的几种滤器型号，按其性能及用途列入表 4，供选择时参考。

表 4 各种滤器的性能及用途

类 别	性 能 用 途 型 号	能阻止粗大混悬物，而不能阻止所有细菌。	能阻止大部分细菌，而不能阻止所有病毒。	能阻止所有细菌及部分大型病毒
		澄 清	澄清及一般除菌	除 菌
贝克斐尔特滤器		V	N	W
曼特滤器		P	R	F
张伯兰滤器		L ₁ , L ₁ Bis, L ₂	L ₃ , L ₅ , L ₇	L ₉ , L ₁₁ , L ₁₂
西拉斯滤器				015.02.03
库尔滤器		P-1, P-2		P-3, P-6
蔡氏滤器		K		EK
玻璃砂滤器		EC, C, M	F	UF
		0, 1, 2, 3,	4	5(5/3), G-6*
火棉胶滤膜		预 滤 膜		1, 2, 3, 4, 5

*G—6 型号的玻璃砂滤器为国内目前市售的一种。

新购得的矽藻土制或素烧瓷，以及玻璃砂滤器，先用

洁净的软毛刷除去附着表面上的尘埃，并用净水冲洗干净，然后以鼓入少量空气的方法在水中观察由滤心或滤板逸出经水上浮的气泡是否为细小一致。如发现有大气泡出现可表示滤心或滤板壁上有较大的孔隙存在，欲确实证明滤器是否合用，还须将被检查的滤器进行高压灭菌后，用灵菌(*Serratia marcescens*，即粘质沙雷氏菌)菌液作除菌效果的试验(灵菌体积甚小，约为 $750\text{m}\mu$)。如滤液经培养未发现有细菌生长，即表示此滤器的除菌作用良好。

将检查合用的滤器，用厚纸或布绸包裹好，置高压灭菌器内进行灭菌，待冷却后取出置 37°C 低温环境中使干保存备用。

作除菌滤过一般多采用负压力装置(可利用自来水泵或抽气机)，为安全起见可于滤过装置中间连接一个空瓶，以资缓冲。抽气时负压力也不宜过高，否则会使滤器受到损害。为了容易滤过可将准备滤过的液体先用较粗号的滤器除去其中较大的混悬物，使液体澄清后再行除菌滤过。

须注意某些物理或化学因素可影响滤过的效果，物体能否被滤过不仅与滤器的孔度及物体本身大小有关，且与压力的大小，时间的长短、温度、悬液的性质及物体与滤器本身所带之电荷等皆有关系。例如病毒等混悬于肉浸汤或10%血清内较之混悬于生理盐水内容易通过滤器；又如混悬于微碱性液体中，较之混悬于酸性液体中亦容易通过滤器。

三、滤器的清洁法

使用过的滤器必须立即进行冲洗(蔡氏滤器上的石棉板及火棉胶滤膜用后弃去即可)，如沾有可感染性的物体应将其浸泡于1~2%煤酚皂水溶液内杀菌，然后再用软毛刷除去附着的污物，并以清水(如滤液为含球蛋白的溶液可改用生