

病毒实验诊断手册

北京协和医院检验科 主编

24073

人民卫生出版社

病毒實驗診斷手冊

北京协和医院檢驗科 主編

張乃初 審閱

人民衛生出版社

一九六〇年·北京

內 容 提 要

本书是叙述病毒实验诊断常规的简明手册。书中收载有关病毒检验的一般常用器具和各种基本方法，包括动物实验、鸡胚接种及组织培养等。关于几种主要的病毒性疾病，如流行性乙型脑炎、脊髓灰白质炎、狂犬病、流行性腮腺炎、流行性感冒、腺病毒感染、牛痘和天花以及单纯疱疹等的实验诊断，作了专题介绍。本书系根据实际经验写成，操作方法简单扼要，可作病毒室检验人员工作中的依据，亦可供病毒研究工作者的参考。

病毒实验诊断手册

开本: 787X1092/32 印张: 6 1/8 插页: 2 字数: 126千字

北京协和医院检验科 主 编

人 民 卫 生 出 版 社 出 版

(北京书刊出版业营业许可出字第〇四六号)

·北京崇文区琉璃厂胡同三十六号·

北 京 市 印 刷 一 厂 印 刷

新华书店科技发行所发行·各地新华书店经售

统一书号: 14048·2187

1960年3月第1版·第1次印刷

定 价: 0.65 元

(北京版) 印数: 1-7000

前 言

1958年，在党的建設社会主义总路綫的光輝照耀下，我院掀起了轰轰烈烈的技术革命运动。在这一群众运动高潮中，我科病毒組同志倡議編写一本切合实用的常見病毒性疾病实验診斷手冊。这个倡議得到本院內科、中国医学科学院病毒系、卫生部生物制品檢定所、北京儿童医院等单位的大力支持。在党的领导下，通过上述各单位的协作，终于在很短時間內完成了这本手冊的初稿。張乃初教授又在病中对全稿进行了热心的审阅。

病毒学是一門年青的科学，而把病毒学应用于临床实验診斷更是最近几年的事。为了逐步健全实验室操作規程，保証实验結果的准确性，来满足临床診斷的需要，并帮助进修生学习起見，我們以拋磚引玉的精神大胆編写了这本小冊子。

由于近年来組織培养法的飞速发展，所以在本书的总論里着重介紹了組織培养的技术及其在临床病毒学上的应用。在各論中只簡單扼要地介紹了几种有代表性的病毒性疾病，对我国的重点病毒性疾病，如流行性乙型脑炎和流行性感冒，作了比較詳細的介紹；对脊髓灰白質炎实验診斷也給以足够的重視。在診斷方法的选择上，一方面根据病毒学发展的現狀，另一方面考虑到国内目前客观条件，总以实际可行、便于推广为原则。相信本书不但对于病毒檢驗人員有所帮助，而且对于一般病毒研究人員和临床医师也有一定的参考价值。

当然，这本手冊的缺点还是很多的，主要是收載的病毒性疾病还不够全面。深望病毒学专家及实际工作者多多提出意見并給以指正，以便在再版时进一步修改和补充。

北京协和医院檢驗科 1959年12月

目 錄

第一章 病毒和立克次氏病實驗診斷的基本概念和方法	1
一、概述	1
二、原液的配制	2
三、實驗診斷方法	7
1. 顯微鏡檢查	7
2. 病毒分離	7
3. 血清學試驗	13
（一）補體結合試驗	13
（二）血球凝集抑制試驗	13
（三）中和試驗	15
（四）凝集試驗	15
（1）特異性凝集試驗	15
（2）非特異性凝集試驗	15
四、標本的收集和保存	17
1. 採取標本的時間	18
2. 標本的收集	18
3. 运送	18
4. 保存	18
五、濾器的使用和清洗	18
1. 種類	18
2. 清洗和滅菌	19
六、病毒的保存	20
1. 低溫冷凍保存	20
2. 保存于50%甘油中	21
3. 真空干燥保存	22
七、半数致死量的測定	25

1. 意义	25
2. 操作方法	25
3. 确定 LD_{50} 值的几种方法	27
4. LD_{50} 在中和試驗中的应用	28
(一) 固定血清、稀釋病毒的方法	28
(二) 固定病毒、稀釋血清的方法	30
附录一 病毒实验室工作的安全規則	31
附录二 病毒立克次氏体檢驗室一般所需設備和用具	31
第二章 动物實驗	35
一、概述	35
二、用途	36
三、动物的选择	37
四、实验动物的编号	38
五、实验动物的观察与照料	39
六、动物接种法	41
1. 鼻内接种	41
2. 皮内接种	42
3. 皮下接种	42
4. 腹腔内接种	42
5. 胸腔内接种	42
6. 静脉内接种	43
(一) 家兔	43
(二) 豚鼠	43
(三) 小白鼠	43
(四) 大白鼠	43
七、动物采血法	44
1. 家兔	44
2. 豚鼠	44
3. 小白鼠	45

4. 大白鼠	46
5. 鸡及鸽子	45
八、感染动物的解剖	46
九、培养病毒的种类	47
十、常用实验动物的自发性传染病	47
1. 细菌性疾病	47
2. 病毒性疾病	49
3. 其他	51
4. 动物体外寄生虫的控制	51
第三章 鸡胚培养	52
一、鸡胚的发育	52
二、材料设备	54
1. 卵	54
2. 孵卵器	54
3. 检卵灯及暗室	55
4. 开卵钻及磨牙机	55
5. 卵盘	55
6. 接种罩及紫外线灯	55
7. 其他	55
三、鸡胚培养注意事项	56
1. 无菌技术	56
2. 细心谨慎的操作	56
3. 保持培养条件	56
4. 无菌试验	56
四、操作技术	57
1. 鸡卵的保存、孵育及检卵	57
2. 各种途径的鸡胚接种方法	57
(一) 卵黄囊接种法	57
(二) 绒毛尿囊膜接种法	58
(三) 尿囊接种法	59

(四) 羊膜腔接种法	60
(五) 静脉接种法	61
(六) 颅内接种法	62
五、总结表	62
第四章 組織培养	64
一、概述	64
二、用具的规格, 洗涤和消毒	65
1. 玻璃器皿	65
2. 橡皮管和橡皮塞	66
3. 組織攪碎器	66
4. 解剖用具	66
三、各种溶液、血清、浸出液的准备、消毒、保存和使用	66
1. Hanks 液	66
2. Earle 氏液	67
3. 磷酸缓冲盐水	68
4. 199 綜合培养基	68
5. Eagle 氏营养液	74
6. 鸡胚浸出液	75
7. 牛胚浸出液	76
8. 血清	76
9. 鸡血浆	78
10. 羊水	79
11. 0.02% 乙二胺四乙酸二鈉溶液	79
12. 胰蛋白酶溶液	80
13. 抗菌素	80
14. 0.5% 乳蛋白水解物	80
四、培养方法	80
1. 单层細胞培养	81
(一) HeLa 細胞	81
(二) Detroit-6 細胞	84

(三) 人胎盘羊膜細胞	85
(四) 猴腎上皮細胞	86
(五) 鸡胚細胞	88
(六) 鸡胚肝脏細胞	89
2. 組織块培养	90
五、染色方法	92
六、总结表	94
第五章 流行性乙型腦炎(包括淋巴球脉絡丛腦膜炎)	96
一、概述	96
二、血清学試驗	96
1. 补体結合試驗	96
(一) 1.25% 羊血球悬液的配制	96
(二) 溶血素	97
(三) 补体	98
(四) 抗原	99
(五) 免疫血清的制备	101
(六) 血清	103
(七) 致敏羊血球悬液	103
(八) 試驗步驟	106
附: 微量补体結合試驗操作方法	106
(一) 标本的采取	106
(二) 試驗	108
2. 血球凝集抑制試驗	111
(一) 0.01M 磷酸缓冲盐水(pH6.4)的制备	112
(二) 0.25% 小雞血球悬液	112
(三) 流行性乙型腦炎血凝素的制备	112
(四) 血清的处理	112
(五) 試驗步驟	113
3. 中和試驗	114
(一) 动物	114

(二) 血清	114
(三) 病毒	114
(四) 方法	114
三、病毒的分离和鉴定	115
1. 分离	115
(一) 标本	115
(二) 悬液的制备	115
(三) 动物	115
(四) 接种	116
(五) 观察	116
(六) 傳代	116
2. 鉴定	116
(一) 初步鉴定	116
(二) 最后鉴定	117
(1) 动物感染范围	117
(2) 交互中和試驗	118
(3) 交互补体結合試驗	118
(4) 交互保护試驗	118
四、流行性乙型脑炎的早期診斷	118
第六章 脊髓灰白質炎	119
一、概述	119
二、分离和鉴定	120
1. 标本	120
(一) 标本的收集和保存	120
(二) 标本的运送	121
(三) 标本的处理	121
2. 分离	122
(一) 接种	122
(1) 猴子	122
(2) 組織培养	122

(二) 观察	123
(1) 猴子	123
(2) 組織培养	123
3. 鉴定	124
(一) 免疫血清	124
(二) 中和試驗	125
4. 快速鉴定	127
5. 分离和鉴定脊髓灰白質炎及其他腸道病毒的程序	127
三、血清学試驗	127
1. 中和試驗	127
2. 补体結合試驗	129
3. 結果的解釋	129
第七章 狂犬病	131
一、概述	131
二、實驗室工作人員应注意之点	131
三、标本来源	132
1. 临床标本	132
2. 尸檢标本	132
四、組織病理診斷	132
五、病毒的分離和鉴定	133
六、血清学診斷	134
第八章 流行性腮腺炎	134
一、概述	134
二、病毒的分離和鉴定	135
1. 标本采集和运送方法	135
2. 标本处理及病毒分离鉴定	135
(一) 标本处理方法	135
(二) 标本接种及病毒分离鉴定方法	135
(1) 鵝胚羊膜腔接种法	135
(2) 組織培养	136

三、血清学試驗	136
1. 补体結合試驗	136
(一) 抗原的制备	137
(1) 病毒抗原(V抗原)	137
(2) 可溶性抗原(S抗原)	137
(3) 对照抗原	137
(二) 免疫血清制备	137
(三) 試驗方法	138
(四) 結果判定	138
2. 血凝抑制試驗	138
(一) 血凝素	139
(二) 病人血清	139
(三) 鸡血球悬液	139
(四) 操作方法	139
(五) 結果的解釋	139
第九章 流行性感胃	140
一、概述	140
二、血清学試驗	140
1. 血球凝集試驗和血球凝集抑制試驗	140
(一) 血球凝集試驗	140
(1) 材料	141
(2) 操作方法	141
(3) 注意事項	142
(二) 血球凝集抑制試驗	143
(1) 材料	143
(2) 血清处理法	144
(3) 操作方法	144
(4) 注意事項	146
2. 补体結合試驗	146
(一) 抗原的制备	146

(1) 可溶性抗原	146
(2) 病毒抗原	146
(二) 血清	147
(三) 免疫血清的制备	147
(四) 操作方法	148
三、分离病毒	148
1. 标本的收集	148
2. 用鸡胚羊膜腔接种法分离病毒	148
(一) 注射液的准备	148
(二) 羊膜腔接种	149
(三) 孵育	149
(四) 收获羊水	149
(五) 测定羊水的血球凝集素	149
(六) 血凝反应真假阳性之判別	149
(七) 繼續傳代	150
四、新分离病毒型别的初步鉴定	151
1. 血凝抑制試驗	151
2. 补体結合試驗	151
五、关于排除实验室污染的可能应采取的措施	152
六、毒种的傳代和保存	153
1. 傳代方法	153
2. 毒种保存方法	153
(一) 冷冻干燥保存	153
(二) 低温冰箱保存	154
(三) 普通冰箱保存	154
七、流行性感冒病毒株的命名	154
附录: 霍乱滤液的制造和效力的測定方法	156
第十章 腺病毒感染诊断	159
一、概述	159
二、病毒的分离和鉴定	159

1. 咽喉液与咽拭子液	159
2. 組織培养	159
3. 分离病毒	160
4. 病毒的鉴定	160
(一) 动物試驗	161
(二) 对乙醚的抵抗力	161
三、血清学試驗	161
1. 中和試驗	161
2. 补体結合試驗	162
3. 免疫血清的制备	162
第十一章 天花和牛痘	163
一、概述	163
二、病毒的分离和鉴定	163
三、快速診斷	164
四、Paul 氏反应	165
五、血清学診斷	166
第十二章 單純疱疹	167
一、概述	167
二、病毒的分离和鉴别	168
1. 鸡胚培养	168
2. 动物試驗	168
三、血清学診斷	169
第十三章 常見立克次氏体病的實驗診斷	170
一、概述	170
二、立克次氏体实际操作时的注意点	170
三、立克次氏体的分离方法	171
1. 檢驗标本的收集和接种	171
(一) 病人标本	171
(二) 由节肢动物及动物宿主分离立克次氏体	171
2. 应用动物分离立克次氏体	172

(一) 豚鼠	172
(二) 小白鼠	173
3. 毒种在动物体内連續傳代	173
4. 鸡胚接种及傳代	173
(一) 接种及观察	173
(二) 解剖及傳代	174
(三) 无茵試驗	174
5. 毒株的保存	175
6. 立克次氏体的染色和鏡檢	176
四、立克次氏体的血清学診斷	176
1. 外斐氏反应	176
(一) 抗原的制备	176
(二) 操作方法	177
2. 补体結合試驗	177
(一) 立克次氏体顆粒性抗原的制备	179
(二) 可溶性抗原的制备	179
五、免疫保护試驗	180

第一章 病毒和立克次氏体病实验诊断 的基本概念和方法

一、概 述

病毒性疾病的特异性实验诊断,至目前为止,还不能满足临床的要求,一般不能及时报告结果,供给临床诊断的参考。在病毒性疾病的血清学诊断方面,很少以单份血清标本的检验结果作为诊断的依据,需待双份血清(第一份在发病的早期采取,第二份在发病二周后采取)收齐后同时进行试验,第二份血清内的抗体滴度高于第一份血清4倍者,始有诊断意义。

培养病毒的方法又与细菌不同,病毒须在生活的组织内生长繁殖,故须用动物、鸡胚或组织培养来进行病毒的分离。由于鸡胚须事先孵育,组织培养亦须事先准备,所以在标本收到后,须先存放在低温冰箱内,因之在病毒检验工作中标本的登记和保存须有一定的完善的制度。

近十年来,由于抗原制备方法的改进和组织培养方法的广泛应用,病毒实验诊断的方法已向前跃进了一步,虽不能达到及时报告结果,但在确定诊断上有着一定意义。而且有个别情况也能很快地得出结果,如由大便分离脊髓灰白质炎病毒,有可能在48—72小时内报告阳性结果。

目前大部分的血清试验都是测定血清中的抗体,但抗体一般要在发病后两周始能出现,如能提高血清试验的敏感性,采取用抗体测定抗原的方法(尤其是用荧光抗体的方法)测定

发病早期血液、組織和其他体液中的抗原,可以达到早期診斷的目的,这是今后发展的方向。

本章介紹病毒實驗中常用的各种溶液的配制、实验診斷的几种方法、标本的收集和保存、病毒的保存以及半数致死量的測定等。

二、原液的配制

1. 磷酸緩冲原液(pH 7.6) 用以配制麦氏染液及酪蛋白原液用。

磷酸二氫鈉($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	4.6 克
磷酸氫二鈉($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	107.4 克
蒸溜水	3,000 毫升

2. 緩冲生理食鹽原液(pH 8.0)

氯化鈉	17.0 克
磷酸氫二鈉(无水)	1.59 克
磷酸二氫鉀	0.09 克
蒸溜水	100 毫升

取此緩冲液 50 毫升,加蒸溜水 950 毫升,經高压蒸汽灭菌后即可用以配制血清鹽水。

3. 緩冲生理食鹽原液(pH 7.0) 供补体結合試驗用之稀釋液。

氯化鈉	17.0 克
磷酸氫二鈉	1.13 克
磷酸二氫鉀	0.27 克
蒸溜水	100 毫升

取此緩冲液 50 毫升加 950 毫升蒸溜水,經高压蒸汽灭菌