

病毒的分离培养鉴定和血清 学检测



一 病毒的鸡胚接种法

病毒需严格细胞内寄生，培养病毒必须在活的动物、鸡胚或细胞内进行。新城疫病毒（NDV）、流感病毒（IFV）等对鸡胚培养敏感，因此常用鸡胚接种法分离培养NDV、IFV等。目前对IFV的疫苗制备就是在鸡胚培养中进行的。由于NDV、IFV在鸡胚内培养时并不引起明显的鸡胚病变或死亡，常用血凝和血凝抑制试验对病毒进行鉴定。

(一) 接种方法

- 1) 孵育9~11天左右的鸡胚，在照蛋灯下用蜡笔标出气室和胎位；
- 2) 鸡胚直立于蛋盘上，气室端向上，按常规以碘酒，酒精消毒；
- 3) 在避开鸡头和大血管的位置，用磨蛋器在气室中央磨一小孔，再用碘酒擦拭消毒；

4) 用1ml注射器吸取NDV悬液，针头从气室小孔刺入（沿胚胎的长轴刺入）0.5--1cm深度；此时针头已在尿囊腔中，注入0.2ml病毒悬液；

5) 拔出针头，用镊子将小胶布蘸取酒精烧灼后封闭小孔，置于35~36℃温箱内培养，其中翻动两次，用照蛋灯检视一次，36小时后置-20℃冰箱20分钟后，无菌操作收获尿囊液。

鸡胚的检卵



(二) 尿囊液的收获

- 1) 从冰箱中取出鸡胚，用碘酒、酒精消毒气室部位；
- 2) 用无菌镊子除去胶布并去除气室部分的卵壳；
- 3) 用无菌的毛细吸管插入尿囊腔中轻轻吸取尿囊液(避免血管破裂)，置于无菌中号试管中；
- 4) 获得的尿囊液取一部分做血凝和血凝抑制试验（定性），判断病毒的增殖情况并对病毒进行鉴定；同时做无菌实验。

（三）血凝和血凝抑制实验

某些病毒包膜表面的血凝素（HA）能与人“O”型红细胞、脊椎动物如豚鼠、鸡等的红细胞上的血凝素受体结合，引起红细胞凝集。在病毒悬液中加入相应的特异性抗血清后，由于相应的抗体与HA结合，使其失去凝集作用，再加入人的“O”型血、鸡或豚鼠的红细胞则不再发生血凝现象，即为血凝抑制。上述两种现象可作为判断病毒存在的指标及鉴定病毒。

1.血凝实验:

- ①取U型孔有机玻璃板一块，按顺序编号；
- ②于第1孔加入生理盐水0.9ml，余孔各加0.5ml；
- ③于第1孔加收获的尿囊液0.1 ml；
- ④另取一支吸管将第1孔混匀后吸取0.5ml至第2孔；再将第2孔混匀后吸0.5 ml 至第3孔，以次类推，直至第8孔，从第8孔中吸取0.5 ml 弃去。第9孔不含病毒，为红细胞对照孔。每孔加入1%鸡血球0.25ml。

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
生理盐水(ml)	0.9	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
病毒液(ml)	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	弃 0.5
病毒液稀释度	1: 10	1: 20	1: 40	1: 80	1: 160	1: 320	1: 640	1: 1280	—
1%鸡红细胞(ml)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25



立即摇匀，置室温30~45分钟后观察结果。

注：弃去的液体及吸管一起放入盐酸桶中消毒

[结果判断] “+”号多少表示血凝程度：

“++++” 100%的RBC发生血凝，形成花边拉网状； “+++” 75%的RBC发生血凝血凝效价的判断； “++” 50%的RBC发生血凝； “+” 25%的RBC发生血凝； “-” 100%的RBC沉积。

血凝效价以出现“2+”为终点，即50%的RBC发生血凝的最高稀释倍数为病毒的血凝效价。

2.病毒血凝抑制实验（定性）：

- ①根据血凝试验滴定的NDV血凝效价，先将病毒液配成4个血凝单位。做此血凝抑制实验时，应在0.25ml病毒液中含4个血凝单位。如血凝效价为1:320，只需稀释80倍即为4个单位；
- ②在U型孔有机玻璃板上选4个孔，按下表操作：

血凝抑制试验(定性法)

孔号 (ml)	1	2	3	4
生理盐水 (ml)	—	0.25	0.25	0.5
血清(ml)	0.25	0.25	—	—
病毒液(ml)	0.25	—	0.25	—
1%鸡红细胞 (ml)	0.25	0.25	0.25	0.25

说明：1号孔为试验孔，2号孔为血清对照孔，3号孔为病毒对照孔，4号孔为红细胞对照孔。将各孔内容摇匀，室温静置45min，待红细胞完全下沉后观察结果。

结果判断：凡出现明显血凝现象者，为血凝抑制试验阴性。而未出现血凝的试验孔，以阳性表示，说明病毒与该孔所用诊断血清的型与亚型相一致。

二、病毒的细胞接种法与培养



(一) 细胞制备的操作步骤

- 1) 在DMEM和Hank's 液中以1%的量加入双抗;
- 2) 取出两只无菌平皿, 待用;
- 3) 碘酒和酒精棉球分别拭擦鸡胚气室外卵壳;
- 4) 大镊子轻敲卵壳顶部然后小心去掉气室外卵壳;
- 5) 用无菌镊子小心撕破卵膜, 取出鸡胚置于盛有Hank's 液 的平皿中。小心去头、内脏、爪, 洗涤后置于盛有Hank's 液 的平皿中, 再充分洗涤2次;

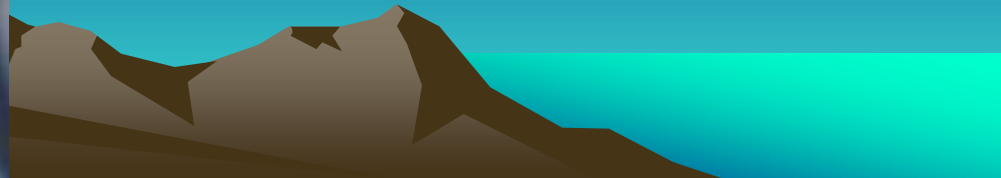
- 6) 取出洗净的组织块置于青霉素瓶中，用无菌眼科剪刀将其剪成约 $0.5\sim 1\text{mm}^3$ 的小块（约250次）此时体积约 0.5ml ；用Hank's液洗涤两次；
- 7) 加入1.0%胰酶，配成终浓度为0.25%，并调节pH至约7.6~8.0（肉眼观为肉红色）。盖上瓶塞，写好标记；
- 8) 将上述青霉素瓶置于 37°C 水浴中约15~30min，其间缓慢摇匀以充分消化；

9) 消化结束后，稍沉淀，缓慢吸出上清，用Hank's 液小心洗涤沉淀2~3次，尽量减少胰酶的残留量，然后加入DMEM液约5ml，吸管充分吹打，使细胞充分分散。吸上清；重复操作3~4次，收集细胞上清，并加入足量的小牛血清（终浓度为10%）；

10) 将上述制备好的细胞悬液移至细胞瓶中，5ml/瓶。



细胞消化后轻轻摇晃，
呈云雾状，表示消化良
好。



(二) 滤泡性口炎病毒 (VSV) 的接种培养

- 1) 一瓶细胞接种病毒0.1ml, 另一瓶细胞作为正常对照, 做好标记, 统一置于CO₂孵箱中恒温培养36 h后, 观察结果;
- 2) 鸡胚原代成纤维细胞的显微镜下观察: 36 h后观察细胞生长情况, 细胞长成单层, 细胞界限清晰、透明, 大多数细胞为梭形并贴壁, 布满细胞瓶的生长面, 说明细胞生长状态良好。接种VSV的鸡胚原代成纤维细胞, 细胞病变效应 (CPE) 的观察: 培养36 h后, 显微镜下观察, 可见细胞出现明显的病变, 细胞圆缩、脱落、溶解。

三、可疑流感患者血清血凝抑制

抗体检测



- **原理：**
- 流感病毒（IFV）包膜表面有血凝素（HA），感染后能刺激机体产生相应的抗体，该抗体与HA结合后，使其失去凝集作用，再加入人的“O”型血、鸡或豚鼠的红细胞则不再发生血凝现象，即为血凝抑制，可通过定量血凝抑制试验测定患者血清中是否有相应抗体及其效价。但需取双份血清作两次试验，若恢复期血清抗体效价比早期高4倍或4倍以上，即有诊断意义。

- ①取一块U型有机玻璃板，选10个孔，按下表所示加样，第1孔加入0.4ml生理盐水，第2至9孔每孔加入0.25ml生理盐水，第10孔加0.5ml；
- ②取经处理的1：4稀释的病人血清0.1ml，加入第一孔内作1：20稀释，抽吸3次，混匀后取0.25ml加至第2孔，依次类推作倍比稀释至第7孔，混匀后从第7孔吸出0.25ml弃去。第8孔为血清对照，加入1：4稀释的血清0.25ml；第9孔为病毒对照、第10孔为红细胞对照，均不加血清；
- ③1~7孔和9孔，每孔加入含4个血凝单位的IFV悬液0.25ml；第8孔血清对照与第10孔红细胞对照则不加IFV悬液；
- ④每孔加入1%鸡红细胞0.25ml，摇匀后置室温30min、45min各观察一次结果，以45min的结果为准(如果红细胞滑下，参考30min的结果)。

• 结果判断

- 血凝抑制试验的结果判断同血凝试验，但是以不出现血凝现象的试验孔为阳性。先观察对照孔，如果病毒对照孔出现完全凝集、血清对照和红细胞对照不发生凝集，再观察试验孔，判断效价。凡呈现能完全抑制凝集的试验孔，其血清的最高稀释度即为血凝抑制效价。根据血清中血凝抑制效价的增长情况，以升高4倍或4倍以上为感染。

- (四) 作业

撰写实验小论文1篇。

- (五) 思考题

1. 简述病毒鸡胚接种法的基本过程。
2. 简述鸡胚原代成纤维细胞制备的主要步骤。

