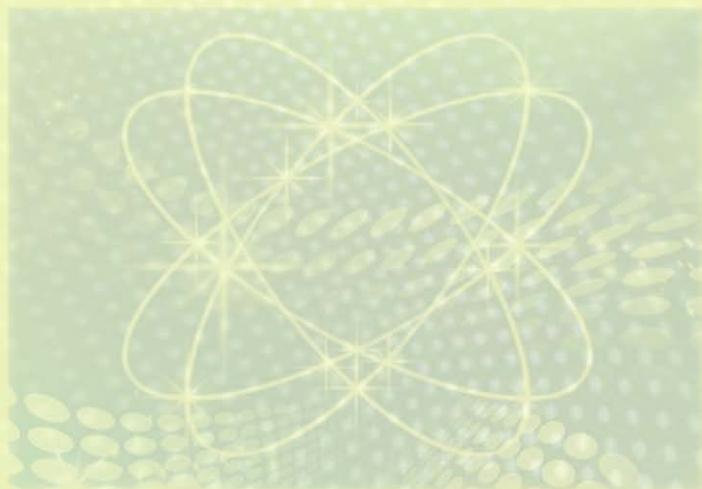


病原生物学与免疫学 综合实验项目指导

宋文剑 主编



湖北省科技出版社

病原生物学与免疫学 综合实验项目指导

主 编: 宋文剑

湖北省科技出版社

病原生物学与免疫学

综合实验项目指导

主 编 宋文剑

副主编 胡 松 程喻力 邱文洪 黄丽霞

编 者 (按姓氏笔画排列)

孔 争 刘 锴

许楚娟 宋文剑

邱文洪 胡 松

程喻力 张 慧

张泽华 黄丽霞

前 言

病原生物学是研究病原生物的形态结构、生命活动规律以及与机体相互作用关系的一门学科,主要包括医学微生物学和人体寄生虫学。医学微生物学主要研究病原微生物与人类疾病的关系问题,包括研究病原微生物的生命特征或生物学特性,致病性与致病机理、感染与免疫、特异性诊断和防治等。人体寄生虫学是研究人体寄生虫的形态结构、生活史、致病机制、实验诊断、流行规律与防治措施的一门科学。免疫学是研究机体免疫系统的组成、结构与功能、免疫应答的发生机制以及免疫学在疾病诊断与防治中应用的一门科学。传统医学教育中,上述三门课程分别设有依附于理论课的实验课,其中难免有部分重复的实验内容。

本实验教材建立在上述三门学科理论及实验技术的基础上,以培养学生科学的创造性思维为出发点,强化基本技能训练的同时,加强了学科知识的横向联系,以综合性实验为重点,并为学生设计性、探索性实验提供思路和空间。在编写过程中,力求条理清晰,简明实用,以病原生物感染的检查为主线,从常见的感染部位出发,将医学微生物学、医学寄生虫学及医学免疫学实验优化整合,剔除陈旧重复内容,融入学科技术发展新知识,并有机地将各学科知识贯穿于综合性实验项目之中,使之成为以上三门学科实验指导及重要辅助教材。

全书包括三大部分,20个综合性实验项目。适用于本科医学各专业学生使用。

江汉大学医学院
病原生物学与免疫学实验教学组
2010年4月

目 录

第一部分 实验室操作规范与实验室生物安全	(1)
一、实验要求	(1)
二、实验室规则与注意事项	(1)
三、实验室生物安全	(2)
四、显微镜的结构及油浸物镜的使用	(2)
第二部分 实验项目	(4)
项目一 病原生物的基本形态结构观察	(4)
一、细菌的形态与结构	(4)
二、病毒包涵体	(7)
三、真菌的形态与结构	(7)
四、人体寄生虫	(9)
项目二 病原学基础实验	(10)
一、细菌的染色法	(10)
二、理化及生物因素对细菌的影响实验	(12)
三、细菌质粒 DNA 的提取	(14)
四、PCR 方法对病原生物的检测	(15)
项目三 实验设计	(17)
一、文献检索	(17)
二、实验设计报告	(20)
项目四 免疫细胞的分离与功能检测	(21)
一、外周血单个核细胞的分离	(21)
二、淋巴细胞的分离	(23)
三、T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的分离	(23)
四、淋巴细胞转化试验	(26)
五、T 淋巴细胞亚群的检测	(27)
六、NK 细胞的分离	(28)
七、NK 细胞活性测定	(30)
八、单核/巨噬细胞分离	(32)
九、巨噬细胞的吞噬作用	(33)
十、人外周血中性粒细胞制备	(34)
十一、中性粒细胞吞噬功能试验	(35)
十二、嗜碱性粒细胞的分离	(37)
十三、嗜酸性粒细胞的分离	(38)
十四、组织肥大细胞的分离	(38)
十五、树突状细胞(DC)的分离	(39)

十六、红细胞的分离	(40)
项目五 免疫血清的制备	(41)
一、伤寒沙门菌 O 抗原免疫血清的制备	(41)
二、抗人血清抗体的制备	(43)
项目六 抗原抗体特异性检测	(45)
一、沉淀反应	(46)
二、凝集反应	(48)
三、免疫标记技术	(51)
项目七 肠道病原的检查 I	(54)
一、肠道细菌的分离	(55)
二、肠道杆菌的生化反应	(57)
三、寄生虫粪便检查法	(57)
四、肛门寄生虫检查法	(62)
项目八 肠道病原的病原生物学检查 II	(62)
一、肠道细菌的基本结构观察	(63)
二、肠道寄生虫虫卵及其成虫的形态	(63)
项目九 血吸虫病的诊断	(71)
一、感染血吸虫病兔耳静脉采血,分离血清	(71)
二、解剖病兔观察成虫寄生部位,收集成虫;摘取带有虫卵结节的病肝镜下观察	(72)
三、日本血吸虫虫卵、毛蚴、成虫的形态观察	(72)
四、虫卵自然沉淀法及毛蚴孵化法	(74)
五、间接血凝试验	(74)
六、酶联免疫吸附试验	(75)
项目十 组织内及血液内病原	(78)
一、形态学观察	(79)
二、溶血现象	(80)
三、咽拭培养	(81)
四、血浆结合凝固酶检测	(81)
五、抗“O”实验	(82)
六、肌肉压片法检查旋毛虫幼虫囊包及旋毛虫转种	(82)
七、周围血涂片检查及血片制作	(83)
八、弓形虫	(86)
九、杜氏利什曼原虫	(86)
十、细粒棘球绦虫	(88)
项目十一 泌尿生殖道病原检查	(88)
一、阴道毛滴虫	(89)
二、梅毒螺旋体	(89)
项目十二 呼吸道病原的检查	(90)
一、呼吸道病原性球菌(葡萄球菌)感染检查与鉴定	(90)
二、呼吸道寄生虫的检查	(94)

项目十三 其他器官组织病原的检查	(95)
一、骨髓穿刺法	(95)
二、淋巴结穿刺法	(96)
三、肌肉活检	(96)
四、皮肤及皮下活检	(96)
五、直肠黏膜	(97)
项目十四 医学节肢动物	(97)
一、医学节肢动物常见各纲的形态特点	(97)
二、蚊	(98)
三、蝇	(98)
四、白蛉	(100)
五、虱、蜚蠊、蚤、臭虫	(100)
六、蜱、螨	(102)
第三部分 自选实验项目	(105)
项目一 呼吸道感染常见病原生物的实验室检查	(105)
一、病原性球菌(葡萄球菌)感染检查与鉴定	(105)
二、测定抗链球菌溶血素“O”抗体的试验	(105)
三、呼吸道感染病毒的分离培养	(106)
四、病毒血凝试验	(108)
项目二 病毒的抗原检测技术	(110)
一、免疫荧光技术	(110)
二、免疫酶染色法	(112)
三、免疫酶斑点试验	(112)
四、免疫印记试验	(112)
五、病毒核酸检测技术	(113)
项目三 手足口病的流行病学调查和控制方案	(116)
项目四 细菌耐药性及检测技术	(117)
一、细菌产生灭活酶或钝化酶	(117)
二、细菌药物作用靶位改变	(117)
三、细菌细胞膜渗透性改变	(118)
四、细菌主动药物外排机制	(118)
五、细菌生物被膜的形成	(118)
六、细菌耐药性对策	(120)
项目五 食用猪肉的寄生虫检验	(121)
一、寄生于猪肉的常见寄生虫	(121)
二、寄生虫检验	(122)
项目六 核酸的琼脂糖凝胶电泳及限制型内切酶消化	(122)
一、质粒 DNA 琼脂糖凝胶电泳	(122)
二、质粒 DNA 的限制性内切酶消化	(123)

第一部分 实验室操作规范与实验室生物安全

一、实验要求

1. 实验前必须掌握与实验相关的医学微生物学、医学寄生虫学及医学免疫学基础理论。做好预习,明确实验目的与实验内容。
2. 对于设计性实验,在老师的指导下,注意发挥自身潜能,勤于思考,灵活掌握所学知识。
3. 在实验过程中做到三严:严肃、严格、严谨。如实记录实验结果,按规定完成实验报告。对于失败实验结果要分析原因,必要时重复实验。

4. 严格遵守实验室规则。

二、实验室规则与注意事项

1. 未经批准,不得擅自进入实验区域。
2. 与实验无关动物,不得带入实验室。
3. 进实验室穿工作服,离开时脱下,反折。
4. 按规定位置就坐并保持实验室安静,不得大声喧哗。
5. 实验室内禁止进食、饮水、吸烟、化妆和处理隐形眼镜。
6. 实验操作应严格按实验指导和教师的要求进行。
7. 实验过程中,若传染性标本不慎污染桌面、手及其他物品时,应立即报告老师紧急处理,不得擅自处理。

常见处理如下:

(1) 皮肤创伤 先除尽异物,用无菌生理盐水洗净后,涂以 2% 红汞或 2% 碘酒,必要时进行包扎。

(2) 灼伤 涂以凡士林油、5% 鞣酸或 2% 苦味酸。

(3) 化学药品腐蚀伤 若为强酸腐蚀伤,先用大量清水冲洗,再以 5% 碳酸氢钠或氢氧化铵溶液洗涤中和之;若为强碱腐蚀伤,则先以大量清水冲洗后,再用 5% 醋酸或 5% 硼酸溶液洗涤中和之。若受伤部位是眼部,经过上述步骤处理后,最后滴入橄榄油或液体石蜡 1、2 滴,并及时就诊。

(4) 吸入病菌菌液 应立即吐出,并用 1:1 000 高锰酸钾溶液漱口,及时就诊。

(5) 细菌污染衣物 应立即脱下,放入 3% 来苏尔或 3% 氯胺液内浸泡半小时,或仔细包好经高压蒸汽灭菌后清洗。

(6) 菌液污染桌面 倾倒适量 2~3% 来苏尔或 0.5% 84 消毒液于污染处,浸泡半小时后抹去。若手上沾有活菌,应浸泡于上述消毒液中 10~20min 后,再以肥皂水冲刷之。

8. 观看示教时,未经允许,不得移动显微镜推进尺。

9. 爱护实验室器材及设备,认真填写实验设备使用纪录。不慎发生损坏时,应立即报告老师,照价赔偿。

10. 实验结束后,凡使用过的实验器材必须放在指定地点:如吸过菌液的吸管、毛细吸管要投入含有 2%~3% 来苏尔或 0.1% 新洁尔灭的玻璃筒中,或置“待消毒”处,不得放在桌上,不

可直接置于水槽内。用过的玻片也应放于含有消毒液的容器内。需要培养的实验材料集中后放入温箱中培养。

11. 实验完毕,应及时清理实验室(包括桌面,地面,试验用具等),值日生打扫室内卫生,管好门窗、水电。离开实验室前,将双手在消毒液内浸泡 3 ~ 5min,再用清水洗净,方可离室。

三、实验室生物安全

生物危险是指由生物因子形成潜在的危险,当在实验室中处理致病微生物时,或处理基因重组过程中产生的可能具有潜在生物危害的新未知基因时,或在处理致病因子的产物时,这些病原体有可能对实验室的工作人员造成危害。当实验室硬件条件缺失、管理制度不完善以及不规范的操作程序时,将会导致实验室致病因子泄漏和逃逸,可能造成灾难性的后果。因此,不同危险等级的生物因子,我们要在相应的生物安全防护等级的实验室进行研究操作,以避免危险生物因子造成实验室人员暴露、向实验室外扩散并导致危害。

目前,根据生物因子对个体和群体的危害程度,我们将其分为以下几级:危险度 1 级——无或极低的个体和群体危险;危险度 2 级——中度的个体危险,低度的群体危险;危险度 3 级——高度的个体危险,低度的群体危险;危险度 4 级——高度的个体和群体危险。根据所操作的生物因子的危害程度和采取的防护措施,将生物安全防护水平分为一至四级:一级生物安全水平(BSL-1)——基础实验室;二级生物安全水平(BSL-2)——基础实验室;三级生物安全水平(BSL-3)——屏蔽实验室;四级生物安全水平(BSL-4)——高度屏蔽实验室。

四、显微镜的结构及油浸物镜的使用

(一) 普通光学显微镜的基本结构

显微镜的基本结构可分为光学系统、光源照明系统和机械装置三部分。光学部分主要有目镜、物镜、镜筒、内置光源(或反光镜)、光阑等;光源照明系统可分为内置光源和外置照明。内置光源:接通电源,按下底座的开关,电源打开即可。外置光源:将光圈放到最大位置,在用眼睛观察目镜的同时,转动反光镜使其朝向光源(自然光或灯光),使视野中的光线最明亮、均匀。

机械部分包括镜座、镜臂、调节螺栓、载物台、夹持器、转换器、粗调焦手轮及细调焦手轮等(图 1-1)。

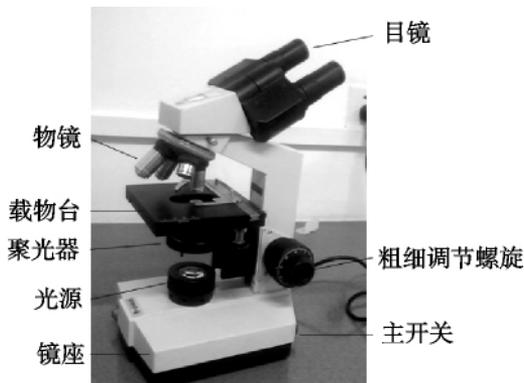


图 1-1 光学显微镜

(二) 油浸物镜(简称油镜)的使用

显微镜的物镜一般有低倍镜、高倍镜及油镜。病原生物学实验中最常用者为油镜。

油镜放大倍数是 $90\times$ 或 $100\times$; 若镜筒的长度不变, 显微镜的放大倍数 = 目镜倍数 \times 物镜倍数。其镜头下缘有一白色线圈或黑色线圈; 镜筒上刻有“油”或外文“HI”、“Oil”、“Oil”等字样; 油镜头比低倍镜和高倍镜长。

1. 油镜的原理 使用油镜时需将玻片上滴加香柏油。由于从标本玻片上透过的光线, 因介质密度不同, 部分光线发生折射散失, 使射入物镜光线减少(高倍镜孔径较大, 影响不显著), 因油镜的孔径较小, 进入的光线则不够, 致使物像显现不清。当在油镜与标本片之间加香柏油后, 香柏油折射率($n=1.515$)和玻璃的折射率($n=1.52$)相似, 因此可增加进入透镜的光线, 使视野亮度加强。

2. 油镜的使用方法

(1) 对光 转动转换器, 将低倍镜镜头(4倍、10倍)转至载物台中央透光孔位置, 打开透光光阑、对光, 直至目镜中出现光线最明亮、最均匀的视场为止。一般染色标本用油镜检查时, 光度宜强, 可将光圈开足, 集光器上升至与载物台相平; 检查未染色标本用低倍镜或高倍镜观察时, 应适当缩小光圈, 下降集光器, 使光度减弱。

(2) 装片 将标本片放置在工作台的夹持器中, 用夹持器移动标本片至工作台开口中心(透光孔处)。

(3) 调节焦距 通过旋转粗调焦手轮, 将载物台升到最高限定位置(制片不能触到物镜), 此时已准备好调焦。使用4倍或10倍物镜, 在目视目镜的同时, 旋转粗调手轮, 使工作台缓慢下降, 在目视目镜中观察到的清晰的图像时, 再调节光阑聚光镜孔, 选择与物镜相匹配的孔, 调节微调焦手轮, 使视野中的图像最清晰。用低倍镜找出标本的范围, 然后提高镜筒, 在标本的待检部位加一小滴香柏油, 慢慢将油镜头浸于油中, 但勿接触玻片。最后, 自目镜处一面观察, 一面微转动粗调节器, 使镜筒徐徐上升, 待看到模糊物像时, 改用细调节器调至物象清晰。如果是滴片标本, 先滴一滴标本在玻片上, 轻轻盖上盖玻片。加盖玻片时, 先将盖玻片的一边与在玻片上的水滴边缘接触, 接着自一侧轻轻放下, 先在低倍镜下观察, 然后在高倍镜下观察, 通过改变光圈的大小或转动细调焦手轮。

(4) 还镜 观察完毕后, 要及时进行清洁工作, 油浸物镜前端先用干的擦镜纸把大部分油去掉, 再用二甲苯滴湿的擦镜纸擦拭, 最后用干的擦镜纸擦一次。将低倍镜转成八字型, 降下聚光器, 转动粗调节器, 使镜台下移, 以免接物镜与集光器相碰受损。罩上镜套, 放回原处。

第二部分 实验项目

项目一 病原生物的基本形态结构观察

【实验目的、要求】

掌握微生物的基本形态与结构,了解原虫及蠕虫虫卵的基本形态结构特点。

【实验内容】

观察细菌的基本形态与结构,包括基本结构和特殊结构。观察真菌的菌丝和孢子。观察病毒的包涵体。

了解原虫及蠕虫虫卵的基本结构。

【试剂与器材】

显微镜、香柏油、二甲苯。

标本片: 球菌、杆菌、螺形菌、荚膜、芽胞、菌丝、孢子、病毒包涵体。

一、细菌的形态与结构

细菌从形态上分,主要有球菌(coccus)、杆菌(bacillus)、螺形菌(spirilbacterium) 三种。

多数球菌(coccus) 直径在 $1\mu\text{m}$ 左右,外观呈圆球形或近似球形。由于繁殖时细菌分裂平面不同和分裂后菌体之间相互黏附程度不一,可形成不同的排列方式,这对一些球菌的鉴别颇有意义。不同杆菌(bacillus) 的大小、长短、粗细很不一致。大的杆菌如炭疽芽胞杆菌长 $3\sim 10\mu\text{m}$,中等的如大肠埃希菌长 $2\sim 3\mu\text{m}$,小的如布鲁菌长仅 $0.6\sim 1.5\mu\text{m}$ 。螺形菌(spiral bacterium) 菌体弯曲,有的菌体长 $2\sim 3\mu\text{m}$,只有一个弯曲,呈弧形或逗点状称为弧菌(vibrio),如霍乱弧菌;有的菌体长 $3\sim 6\mu\text{m}$,有数个弯曲称为螺菌(spirillum),如鼠咬热螺菌;也有的菌体细长弯曲呈弧形或螺旋形,称为螺杆菌(helicobacterium),如幽门螺杆菌。

细菌的结构按分布部位大致可分为: 表层结构,包括细胞壁、细胞膜、荚膜; 内部结构包括细胞浆、核蛋白体、核质、质粒及芽胞等; 外部附件,包括鞭毛和菌毛。习惯上又把一个细菌生存不可缺少的,或一般细菌通常具有的结构称为基本结构,而把某些细菌在一定条件下所形成的特有结构称为特殊结构。

细菌基本结构包括细胞壁、细胞膜、细胞浆及核质; 细菌的特殊结构包括荚膜、鞭毛、菌毛和芽胞(图 2-1-1)。

细菌的特殊结构:

(一) 荚膜(Capsule)

许多细菌胞壁外围绕一层较厚的黏性、胶冻样物质,其厚度在 $0.2\mu\text{m}$ 以上,普通显微镜可见,与四周有明显界限,称为荚膜(图 2-1-2)。如肺炎双球菌。其厚度在 $0.2\mu\text{m}$ 以下者,在光学显微镜下才不能直接看到,必须以电镜或免疫学方法才能证明,称为微荚膜(Microcapsule)。大多数细菌(如肺炎球菌、脑膜炎球菌等) 的荚膜由多糖组成。链球菌荚膜为透明质酸; 少数细菌的荚膜为多肽(如炭疽杆菌荚膜为 D-谷氨酸的多肽)。细菌一般在机体内和营养丰富的培养基中才能形成荚膜。有荚膜的细菌在固体培养基上形成光滑型(S型) 或黏液型

(M) 菌落,失去荚膜后菌落变为粗糙型(R)。荚膜并非细菌生存所必需,如荚膜丢失,细菌仍可存活。

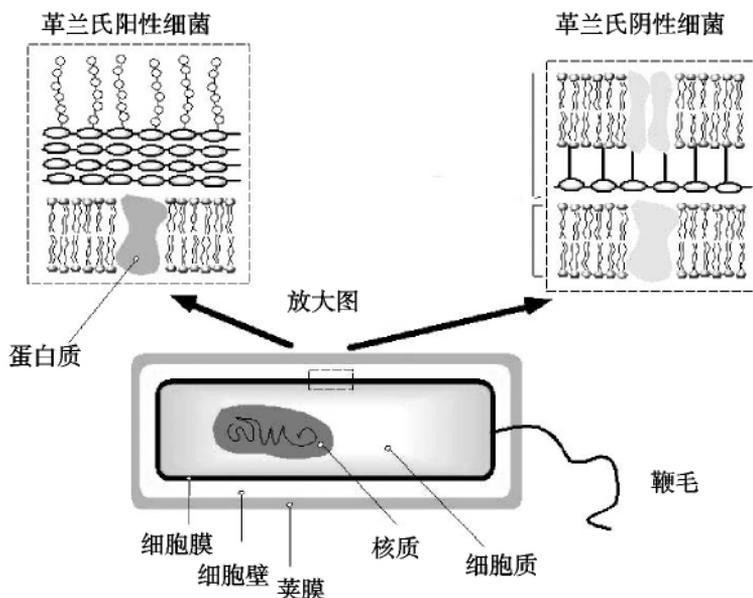


图 2-1-1 细菌形态结构示意图

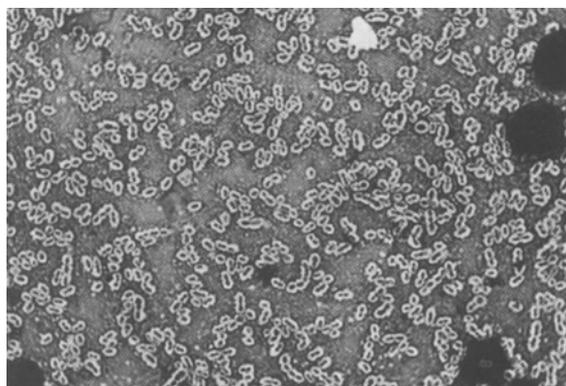


图 2-1-2 肺炎双球菌荚膜

荚膜除对鉴别细菌有帮助外,还能保护细菌免遭吞噬细胞的吞噬和消化作用,因而与细菌的毒力有关。荚膜抗吞噬的机理还不十分清楚,可能由于荚膜黏液层比较光滑,不易被吞噬细胞捕捉之故。荚膜能贮留水分使细菌能抗干燥,并对其他因子(如溶菌酶、补体、抗体、抗菌药物等)的侵害有一定抵抗力。

(二) 鞭毛(Flagellum)

在某些细菌菌体上具有细长而弯曲的丝状物,称为鞭毛(图 2-1-3)。鞭毛的长度常超过菌体若干倍。不同细菌的鞭毛数目、位置和排列不同,可分为单毛菌(Monotrichate)、双毛菌(Amphitrichate)、丝毛菌(Lophotrichate)、周毛菌(Peritrichate)。



图 2-1-3 霍乱弧菌鞭毛

鞭毛自细胞膜长出,游离于细胞外。用电子显微镜研究鞭毛的超微结构,发现鞭毛的结构分为:基础小体、钩状体和丝状体三个部分组成。

鞭毛是细菌的运动器官,往往有化学趋向性,常朝向有高浓度营养物质的方向移动,而避开对其有害的环境。常存在于杆菌及弧菌中。鞭毛的数量、分布可用以鉴别细菌。鞭毛抗原有很强的抗原性,通常称为 H 抗原,对某些细菌的鉴定、分型及分类具有重要意义。

(三) 菌毛(Pilus)

菌毛是许多革兰氏阴性菌菌体表面遍布的比鞭毛更为细、短、直、硬、多的丝状蛋白附属器,也叫做纤毛(Fimbriae)。其化学组成是菌毛蛋白(Pilin),菌毛与运动无关,在光镜下看不见,使用电镜才能观察到。菌毛可分为普通菌毛(Commonpilus)和性菌毛(Sexpilus)两种。

(四) 芽胞(Spore)

在一定条件下,芽胞杆菌属(如炭疽杆菌)及梭状芽胞杆菌属(如破伤风杆菌、气性坏疽病原菌)能在菌体内形成一个折光性很强的不易着色小体,称为内芽胞(Endospore),简称芽胞(图 2-1-4)。芽胞一般只在动物体外才能形成,并受环境影响,当营养缺乏,特别是碳源、氮源或磷酸盐缺乏时,容易形成芽胞。不同细菌开成芽胞还需不同的条件,在合适的营养和温度条件下,芽胞的核心向外生长成繁殖体,开始发育和分裂繁殖。芽胞并非细菌的繁殖体,而是处于代谢相对静止的休眠体态,以维持细菌生存的持久体。

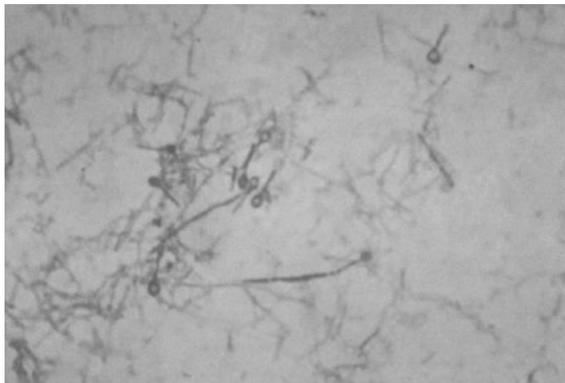


图 2-1-4 破伤风梭菌芽胞

芽胞呈圆形或椭圆形,其直径和在菌体内的位置随菌种而不同,例如,炭疽杆菌的芽胞为卵圆形、比菌体小,位于菌体中央;破伤风杆菌芽胞正圆形、比菌体大,位于顶端,如鼓槌状。这种形态特点有助于细菌鉴别。芽胞在自然界分布广泛,因此要严防芽胞污染伤口、用具、敷料、手术器械等。芽胞的抵抗力强,对热力、干燥、辐射、化学消毒剂等理化因素均有强大的抵抗力,用一般的方法不易将其杀死。有的芽胞可耐 100℃ 沸水煮沸数小时。杀灭芽胞最可靠的方法是高压蒸汽灭菌。当进行消毒灭菌时往往以芽胞是否被杀死作为判断灭菌效果的指标。

二、病毒包涵体

包涵体(图 2-1-5)是病毒感染细胞中独特的形态学变化。各种病毒的包涵体形态各异,单个或多个,或大或小,圆形,卵圆形或不规则形态。包涵体位于核内或胞浆内,嗜酸性或嗜碱性。荧光抗体染色和电镜检查证明包涵体是病毒复制合成场所。根据病毒包涵体的形态、染色性及存在部位,对某些病毒有一定的诊断价值。

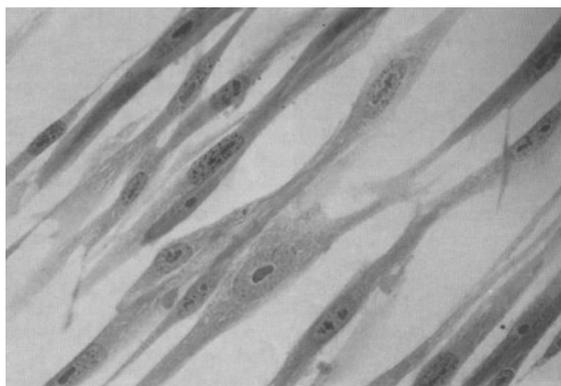


图 2-1-5 病毒包涵体

(采自医学微生物学 张卓然)

常见的病毒包涵体有:

牛痘病毒:胞浆内嗜酸性染色的包涵体,又称“顾氏小体(Guarnieri body);单纯疱疹病毒:胞核内嗜酸性染色的包涵体(属于 Cowdry 氏 A 型包涵体);呼肠孤病毒(Reovirus):胞浆内嗜酸性染色的包涵体,围绕在细胞核外边,用电子显微镜可看出是很多病毒体呈结晶形排聚的集团;腺病毒:胞核内嗜碱性染色的包涵体,电镜检查的情况同呼肠孤病毒。狂犬病病毒:胞浆内嗜酸性染色的包涵体,又叫“内基氏小体”(Negri body),在脑神经细胞内;麻疹病毒:胞核内和胞浆内嗜酸性染色的包涵体。

三、真菌的形态与结构

真菌分为单细胞和多细胞两类。

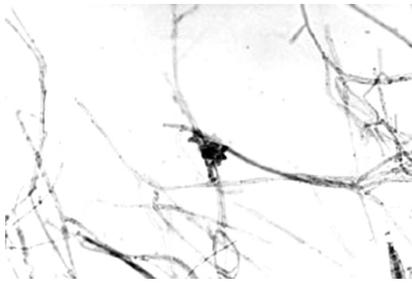
单细胞:圆形或卵圆形,称酵母菌。

多细胞:长出菌丝和孢子,交织成团,称丝状菌,又称霉菌。

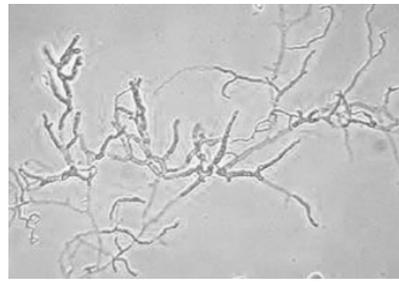
有些真菌可因环境条件的改变,出现两种形态发生互变,称为二相性真菌。

(一) 菌丝

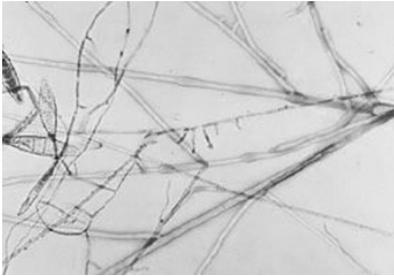
在环境条件适宜情况下,由孢子长出芽管,逐渐延长呈丝状,称菌丝。菌丝长出分枝交织成团称菌丝体(图 2-1-6)。



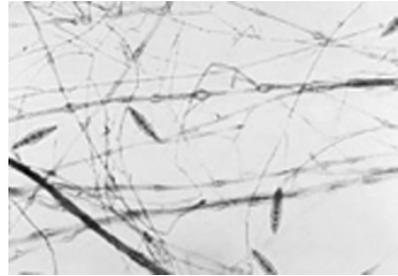
结节菌丝



鹿角菌丝



破梳状菌丝



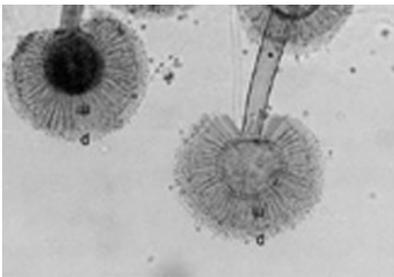
球拍菌丝

图 2-1-6 真菌菌丝(医学真菌学诊断彩色图谱)

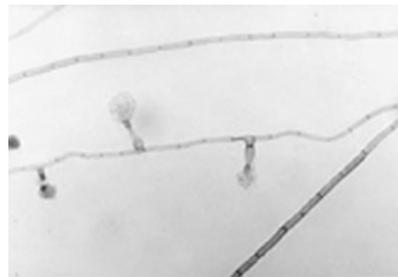
(二) 孢子

孢子是真菌的繁殖结构。可分为有性孢子和无性孢子两种。有性孢子是由同一菌体或不同菌体上的两个细胞融合经减数分裂形成的。

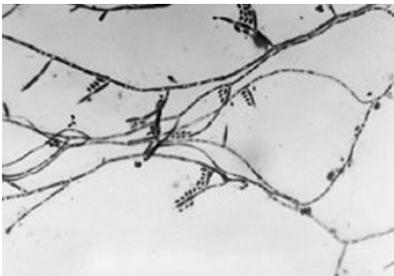
无性孢子是菌丝上的细胞分化或出芽生成的。病原性真菌大多形成无性孢子(图 2-1-7)。



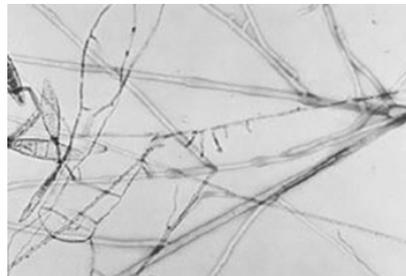
孢子囊孢子



孢子囊孢子



叶状孢子



大分生孢子

图 2-1-7 真菌孢子(医学真菌学诊断彩色图谱)

无性孢子主要有:

1. 分生孢子 是生殖菌丝侧缘或末端形成的单个、链状或成簇的孢子。其中大分生孢子,其大小、细胞数、颜色是鉴定的重要依据;小分生孢子,无特异性,对真菌的鉴别意义不大。
2. 叶状孢子 由菌丝内直接形成的孢子。主要包括:①芽生孢子;②厚膜孢子;③关节孢子。
3. 孢子囊孢子 生在孢子囊内的孢子。

四、人体寄生虫

人体寄生虫是一大类营寄生生活的多细胞无脊椎动物和单细胞原生物。寄生虫经长期演化,失去了独立生活的能力,其形态与生理已适应寄生生活。人体寄生虫包括医学蠕虫、医学原虫、医学节肢动物。

医学蠕虫(helminth)主要包括线虫(nematode)、吸虫(trematode)及绦虫(cestode),属多细胞无脊椎动物。虫体外形、感染虫期、在人体寄生部位、移行途径、排出虫期因虫种不同而各异。其形态及生态因不同虫期而异。不同虫种有雌雄同体及雌雄异体之分,其繁殖方式有卵生及卵胎生之分。成虫所产幼虫或虫卵需显微镜观察。其虫卵外形、颜色、卵内容物、壳厚薄及有无卵盖因虫种而异。虫卵大小 $28\mu\text{m} \times 20\mu\text{m} \sim 140\mu\text{m} \times 85\mu\text{m}$ 不等(图 2-1-8)。

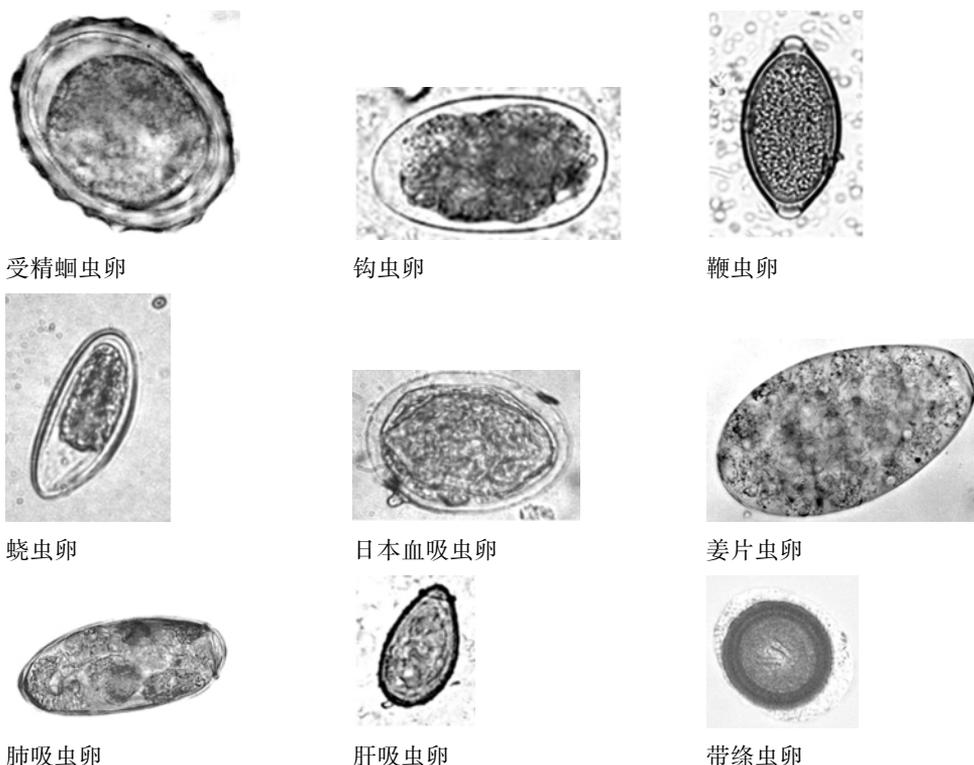


图 2-1-8 常见人体寄生虫卵

医学原虫(protozoa)是单细胞真核生物。原虫虫体为单细胞,大小 $3 \sim 200\mu\text{m}$ 不等。原虫的外形多样,其结构由胞膜、胞质和胞核组成。原虫的各种生理功能由细胞器来完成。根据运动细胞器,将原虫分为叶足虫纲、鞭毛虫纲、纤毛虫纲、孢子虫纲。原虫的繁殖有无性繁殖、有性繁殖、世代交替之分。依虫种不同,原虫可以寄生在不同的组织或细胞内。

【实验结果】

观察标本,用红蓝两色笔绘制镜下观察到的病原形态结构,并描述之。

【思考题】

1. 细菌的基本结构和特殊结构有那些?
2. 病毒包涵体的定义?
3. 真菌的菌丝和孢子的分类有哪些?
4. 病原学显微镜的使用方法是是什么?
5. 人体寄生虫包括哪些?

项目二 病原学基础实验

【实验目的、要求】

学习病原生物的染色法及理化因素对它们的影响。掌握细菌的革兰染色,细菌接种操作方法。熟悉紫外线、抗生素、溶菌酶对细菌的影响,抗酸染色的步骤和原理。了解各种理化因素对病原生物的不同影响。

【实验内容】

细菌的染色法

紫外线杀菌实验

药敏实验

溶菌酶杀菌实验

一、细菌的染色法

细菌个体微小,普通光学显微镜下不易直接观察,故常用染色技术使细菌细胞着色。包括细菌单染色技术、细菌的革兰染色技术、细菌的芽胞染色技术、细菌的荚膜染色技术和细菌的鞭毛染色技术,还有抗酸染色法等。本节重点介绍革兰染色法和抗酸染色法。

(一) 革兰染色(Gram stain)

【原理及方法】

微生物的细胞小且透明,在普通光学显微镜下不易识别,必须对它们进行染色,使经染色后的菌体与背景形成明显的色差,从而能更清楚地观察到其形态和结构。因此,微生物染色技术是观察微生物形态结构的重要手段。(注:任何一项技术都不是完美无缺的。染色后的微生物标本是死的,在染色过程中微生物的形态与结构均会发生一些变化,不能完全代表其生活细胞的真实情况,染色观察时必须注意。)

细菌的等电点较低,pH值2~5,故在中性、碱性或弱酸性溶液中,菌体蛋白质电离后带负电荷;而碱性染料电离时染料离子带正电。因此,带负电的细菌常和带正电的碱性染料进行结合。所以,在细菌学上常用碱性染料进行染色。

影响染色的其他因素,还有菌体细胞的构造和其外膜的通透性,如细胞膜的通透性、膜孔的大小和细胞结构完整与否,在染色上都起一定作用。此外,培养基的组成、菌龄、染色液中的电解质含量和pH、温度、药物的作用等,也都能影响细菌的染色。

微生物染色方法一般分为单染色法和复染色法两种。前者用一种染料使微生物染色,但不能鉴别微生物。复染色法是用两种或两种以上染料,有协助鉴别微生物的作用。故亦称鉴别染色法。常用的复染色法有革兰染色法和抗酸性染色法,此外还有鉴别细胞各部分结构的(如芽胞、鞭毛、细胞核等)特殊染色法。微生物检验中常用的是单染色法和革兰染色法。