

基础医学实验学丛书

杨树森 主编
钟启平 杨秀珍 王金龙 副主编



病原生物学与 医学免疫学实验

天津大学出版社
TIANJIN UNIVERSITY PRESS

基础医学实验学丛书

病原生物学与医学免疫学实验

杨树森 主编

钟启平 杨秀珍 王金龙 副主编

天津大学出版社

内容提要

基础医学实验学丛书的《病原生物学与医学免疫学实验》是根据临床医学五年制教学大纲的要求,结合我校实验课教学经验和教学内容而编写的。力争使每一实验目的明确、方法实用并具有一定的先进性。全书分3部分,第一部分医学微生物学实验,包括细菌学、真菌学和病毒学实验共19个,并附有医学微生物学实验材料的制备与常用特殊染色方法及重要英文词汇等。第二部分人体寄生虫学实验,包括医学蠕虫学、医学原虫学和节肢动物,并明确自学和示教标本的学习重点,附有技术操作要点与常用寄生虫病检查法及重要英文词汇等。第三部分医学免疫学实验,以培养学生基本技能为原则编写了免疫学研究中常规使用的基本技术,共15个实验及附录。

本书可供临床、预防、口腔及护理医学生的实验课使用,对初级检验师及临床医生也有参考价值。

图书在版编目(CIP)数据

病原生物学与医学免疫学/杨树森主编.一天津:天津大学出版社,2001.9

(基础医学实验学丛书)

ISBN 7-5618-1457-7

I. 病… II. 杨… III. ①病原微生物—实验②医药学;
免疫学—实验 IV. R37-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2001)第060428号

出版发行 天津大学出版社

出版人 杨风和

地址 天津市卫津路92号天津大学内(邮编:300072)

电话 发行部:022-27403647 邮购部:022-27402742

印刷 河北省昌黎县人民胶印厂

经销 全国各地新华书店

开本 787mm×1092mm 1/16

印张 9.5

字数 238千

版次 2001年9月第1版

印次 2001年9月第1次

印数 1—4 000

定价 12.50元

前　　言

病原生物学与医学免疫学实验是两门十分重要的医学基础课,实验课是其必要的教学环节,它有助于学生对基本理论、基本知识和基本技能的掌握。

在《病原生物学与医学免疫学实验》的编写过程中,我们根据临床医学五年制教学大纲的要求,考虑到七年制医学生以及非临床医学专业的需要,对内容有适当增加。而每一部分的附录如常用试验溶液的配制、染色液成分及配法、培养基的配制以及常用仪器的使用和维护、常用的专业词汇等,不但对医学生而且对初级检验师和临床医师都有重要参考价值。

在编写过程中,我们力争确切地扼要描述每个实验的目的要求,材料的名称规范齐全,方法实用、规范且有一定先进性。为利于学生完成实验,许多部分都补充了线条插图。

本书是天津医科大学基础医学院微生物学教研室、寄生虫学教研室和免疫学教研室在多年使用的实验课用书的基础上增删编写而成的,它是教研室几代教师在实验课教学建设方面的结晶。

本书由杨树森主编,钟启平、杨秀珍、王金龙副主编。

参加编写的人员如下:

第一部分医学微生物学实验:尹冰楠(实验一至六)、钟启平(实验七至十二)、李秋香(实验十三至十九)、苏琦华(附录一至五)。

第二部分医学寄生虫学实验:安桂珍(吸虫、绦虫)、佟小莺(线虫)、刘佩梅(原虫)、吴增强(医学节肢动物)、杨秀珍(常用仪器的使用和维护、附录一、二)。

第三部分医学免疫学实验:迟芳(实验一、二、三、十一)、帅建华(实验四、八、九、十五)、李鉉钊(实验五、六、七、十、十二)、叶璐(实验十三、十四)、王金龙(附录)。

我们恳切欢迎广大读者对本书提出意见。

编者

2000年12月

目 录

实验室规则	(1)
常用仪器的使用和维护	(2)
第一部分 医学微生物学实验	(5)
实验一 细菌的形态与结构	(7)
实验二 革兰染色法	(9)
实验三 细菌的培养法	(11)
实验四 细菌的分布	(14)
实验五 外界因素对细菌的影响	(16)
实验六 肺炎球菌荚膜的致病作用	(19)
实验七 病原性球菌	(20)
实验八 肠道杆菌	(25)
实验九 肥达(Widal)反应 伤寒、副伤寒的血清学检验	(28)
实验十 厌氧芽胞梭菌属	(30)
实验十一 结核杆菌	(32)
实验十二 需氧芽胞杆菌	(33)
实验十三 标本中未知细菌的分离和鉴定	(34)
实验十四 立克次体	(38)
实验十五 螺旋体	(39)
实验十六 真菌	(40)
实验十七 病毒的形态	(41)
实验十八 病毒的分离培养	(42)
实验十九 病毒的血凝抑制试验	(47)
附录一 常用培养基的制备	(50)
附录二 常用染液、试剂及溶液的配制	(56)
附录三 几种特殊染色方法	(58)
附录四 常用灭菌器及滤菌器	(60)
附录五 医学微生物学重要英文词汇	(63)
第二部分 人体寄生虫学实验	(69)
测微计的使用	(70)
蠕虫	(71)
华支睾吸虫 <i>Clonorchis sinensis</i>	(71)

卫氏并殖吸虫 <i>Paragonimus westermani</i>	(72)
布氏姜片吸虫 <i>Fasciolopsis buski</i>	(72)
日本裂体吸虫 <i>Schistosoma japonicum</i>	(73)
链状带绦虫 <i>Taenia solium</i>	(74)
肥胖带绦虫 <i>Taenia saginata</i>	(74)
微小膜壳绦虫 <i>Hymenolepis nana</i>	(76)
细粒棘球绦虫 <i>Echinococcus granulosus</i>	(76)
十二指肠钩口线虫 <i>Ancylostoma duodenale</i>	(77)
美洲板口线虫 <i>Necator americanus</i>	(77)
似蛔蛔线虫 <i>Ascaris lumbricoides</i>	(78)
蠕形住肠线虫 <i>Enterobius vermicularis</i>	(79)
毛首鞭形线虫 <i>Trichuris trichiura</i>	(80)
班氏吴策线虫 <i>Wuchereria bancrofti</i>	(81)
马来布鲁线虫 <i>Brugia malayi</i>	(81)
旋毛形线虫 <i>Trichinella spiralis</i>	(82)
原虫	(83)
溶组织内阿米巴 <i>Entamoeba histolytica</i>	(83)
结肠内阿米巴 <i>Entamoeba coli</i>	(84)
杜氏利什曼原虫 <i>Leishmania donovani</i>	(84)
阴道毛滴虫 <i>Trichomonas vaginalis</i>	(85)
蓝氏贾第鞭毛虫 <i>Giardia lamblia</i>	(85)
疟原虫 <i>Malaria parasite</i>	(86)
间日疟原虫 <i>Plasmodium vivax</i>	(86)
恶性疟原虫 <i>Plasmodium falciparum</i>	(86)
三日疟原虫 <i>Plasmodium malariae</i>	(86)
刚地弓形虫 <i>Toxoplasma gondii</i>	(87)
卡氏肺孢子虫 <i>Pneumocystis carinii</i>	(87)
隐孢子虫 <i>Cryptosporidium</i>	(87)
结肠小袋纤毛虫 <i>Balantidium coli</i>	(88)
医学昆虫	(89)
蚊 Mosquito	(89)
白蛉 Sandfly	(91)
蝇 Fly	(92)
蚤 Flea	(93)
虱 Louse	(94)
臭虫 Bedbug	(94)
蜱 Ticks	(95)
螨 Mite	(96)
附录一 寄生虫病实验诊断的常用方法	(97)

附录二 人体寄生虫学重要英文词汇	(101)
第三部分 医学免疫学实验	(105)
实验一 中和实验	(106)
实验二 吞噬细胞的吞噬作用	(107)
实验三 血清总补体活性的测定(CH₅₀测定)	(109)
实验四 凝集反应	(112)
实验五 沉淀反应	(115)
实验六 酶联免疫吸附试验	(119)
实验七 T 细胞和 B 细胞分离技术	(121)
实验八 T 淋巴细胞及其亚群的测定(间接免疫荧光技术)	(124)
实验九 淋巴细胞转化试验	(126)
实验十 B 淋巴细胞功能的测定(溶血空斑技术)	(128)
实验十一 白细胞移动抑制试验	(130)
实验十二 NK 细胞活性测定	(131)
实验十三 单克隆抗体的制备	(133)
实验十四 白细胞间介素(IL-2)的测定	(136)
实验十五 免疫球蛋白 G(IgG)分离和纯化	(137)
附录 免疫学常用英文词汇	(140)

实验室规则

1. 进入实验室要穿白大衣,必要时要带帽子和口罩,按规定位置就坐。实验课进行时,不得随意出进。
2. 保持实验室安静。在实验室内绝对禁止饮食、吸烟、用嘴湿润铅笔和标签等。
3. 实验材料和动物等应按规定处理,不要乱动乱放,未经许可不得将实验室的物品携出室外。
4. 实验室用的玻璃器材,如玻片、培基、试管等,应根据试验要求,在使用前用标记笔写上标记,如细菌名称、实验日期、组别、姓名等,以免混淆。
5. 沾染过传染材料的或实验结束后的吸管、滴管、玻片、盖片立即轻轻地放入规定的消毒缸内。需要培养的实验材料要集中起来,然后放入温箱中培养。
6. 看示教时,未经许可,不得移动显微镜推进尺。
7. 爱护显微镜、标本、药品及其他器材。不得乱拧室内仪器的控制钮。不慎发生损坏时应立即报告老师,照章赔偿。
8. 如因不慎发生割破皮肤或传染性材料污染台面、器物等意外,要立即报告老师,进行妥善处理。皮肤破伤,先除去异物,用无菌生理盐水冲洗干净,涂以 3% 碘酒或 2% 红汞;菌液污染台面或地面,立即以 3% 来苏或 5% 石炭酸喷洒消毒,至少作用 1h 以上,若手上沾有活菌应立即用消毒液浸泡 10min~20min 后,再以肥皂洗刷并用清水冲净。
9. 注意防火,火源不要接近易燃物品(如棉塞、酒精、二甲苯等)。
10. 实验完毕,整理实验台。检查门、窗、水、电、火。认真做清洁,桌面、地面打扫干净,凳椅排列整齐。离开实验室前用消毒液泡手或用肥皂水洗手。

常用仪器的使用和维护

实验室常用仪器种类很多,下面仅就显微镜、恒温箱和水浴箱等的使用和维护简要加以介绍。

一、显微镜的使用与维护

(一) 显微镜的使用

1. 取出显微镜,平稳地放在实验台上,保持载物台呈水平状态。
2. 将灯源亮度调节钮(电压调节器)调节至“0”刻度处,接通电源,打开显微镜电源开关,慢慢调节灯源亮度调节钮和集光器,使光强达到最佳亮度。但光线强弱均应适宜,低倍镜需要弱光,高倍镜及油镜则需强光,都可通过集光器高低及灯源亮度调节钮调节。
3. 用自然光、日光灯光等采光的显微镜,需将反光镜对准光源。
4. 调整两目镜间距。
5. 检查标本时,最初尽量用低倍镜,当找到物体后,再更换高倍镜。由于高倍镜或油镜视野面积比低倍镜小,因此在由低倍镜换高倍镜或油镜之前,必须把观察部位移到视野正中央,然后再转换。
6. 立体观的概念:观察的寄生虫均为整体标本,是立体的,有一定的厚度。在粗、细螺旋上、下调节时,只能看到标本的某一层平面。往上调时,上层清晰;往下调节时,下层清楚。随着上下调节,应依次联系到各层间的不同位置和所示的不同结构,对虫体应有个立体概念。
7. 油镜的使用
 - (1)用低倍或高倍镜找到所观察的物体,将其移至视野中心,调节光源亮度调节钮至最佳亮度,转换油镜头,在镜头对准之标本片上加一滴镜油后,即在显微镜侧面注视,慢慢小心转动粗螺旋,使油镜头浸入油滴中,注意切勿与标本接触,以免压损标本。
 - (2)经接目镜边看边慢慢转动粗螺旋,使镜台缓缓下移(此时只应向下,不能再向上移动,以免压碎玻片标本和损坏镜头),注意视野中出现物像时,改用细螺旋略加调节,至物像清楚为止。若发现油镜头已离开油滴,但尚未观察到视野内物像时,则仍按以上步骤,将油镜头浸入油滴中,重新观察。
 - (3)观察完毕应把镜头和载玻片上的镜油擦净。方法是使镜台下移,把油镜头转向外侧,用擦镜纸蘸取少许二甲苯擦净,并立即用另一干擦镜纸拭去二甲苯,以免镜片脱胶损坏。标本上的镜油,需将擦镜纸敷在载玻片上,其上滴1滴~2滴二甲苯,小心拖拉镜纸,至无油迹。
8. 显微镜用毕,需将低倍镜移至中央,或将接物镜转成“八”字形,集光器向下移,然后转动粗调节,使镜台下移,以免接物镜与集光器相碰受损。灯源亮度调节钮调节至“0”刻度处,关闭显微镜,切断电源。然后将显微镜放入镜柜中。

(二) 显微镜的维护

1. 显微镜是贵重的精密仪器,使用时要小心爱护,禁止随意拆卸。
2. 显微镜保存时,不得放置在潮湿地方,更不得与挥发性药品如酒精或酸类放在一起,防止损坏金属部分。

3. 显微镜不能放在强阳光下暴晒,因金属吸热,而镜头玻片均为数层粘连,易于溶裂。
4. 镜头必须注意保持清洁,不得用手摸,以免使视野模糊。镜头沾污油滴或污物,如系水溶性则用擦镜纸沾清水擦之,油性的则用擦镜纸蘸二甲苯擦后再以干的擦镜纸擦之。
5. 镜头只能擦外表镜片,不得擦里面,更不得用口吹,也不能随便把目镜取下,以免尘土落入。
6. 变换接物镜时要转动回转板的螺旋部分,不要直接扳动镜头。

二、水浴箱的使用与维护

1. 使用前应加入与需用温度相近的温水,并放一温度计。
2. 通电后红色指示灯亮,表示电热管(发热器)已发热,观察温度达到所需温度时,调节控制器旋钮到指示灯忽亮忽暗之点,此后即能自动保持箱内温度恒定。
3. 经常保持箱内外整洁,箱内温水应定期更换。
4. 温度控制器一经调好固定后,不得任意转动。
5. 防止酸碱等腐蚀性药物进入箱内,以免损坏箱壁,如被病原菌污染则应立即消毒处理。

三、温箱的使用和维护

1. 为便于热空气对流,温箱内的培养物不宜过挤,无论放入或取出培养物,应随手关门,以免温度波动。
2. 通电后红色指示灯亮,表示电热管(发热器)已发热,观察温度计达到所需温度时,调节控制器旋钮到指示灯忽亮忽暗之点,此后即能自动保持箱内温度恒定。
3. 为防止电热式温箱内环境过于干燥,可在箱内放一盛水容器,维持一定湿度。
4. 应经常保持温箱内外整洁。

第一部分

医学微生物学实验

医学微生物学实验课是本课程学习过程中的重要环节之一。其学习目的在于使学生加深和巩固对理论课内容的理解和领会。在印证系统理论知识的基础上,学习和掌握微生物学实验的基本操作技术,为今后有关课程的学习及科学的研究工作和临床实践打下良好的基础。

实验内容包括细菌总论、各论和其他微生物及病毒几部分。在细菌总论实验中着重于微生物实验操作技术的学习。其他部分中,是一些对人类危害较为严重的病原微生物的生物学性状的试验,使学生了解传染病病原学及血清学诊断方法及过程。在微生物学的实验过程中,应严格遵循“无菌操作”的原则,贯彻“无菌概念”的培养和训练。

实验课形式基本分为教师示教和学生操作两种。前者主要是指导学生如何操作以及一些不便于在课堂上完成全过程的实验内容,或让学生从不同角度反复学习、训练,以达到较为熟练掌握本课程学习内容的目的。

为提高实验课的效果,要求学生做到以下几点

1. 每次实验课前务必做好预习,明确实验目的、内容、操作中应注意的事项及其理论依据,避免或减少错误的发生。
2. 实验过程中要坚持严肃、严格与严密。对操作的实验,应遵照实验指导依次进行;对示教实验,要仔细观察,两种实验均需联系有关理论课的内容,巩固课堂所学。实验中还需学会科学地分配和利用时间。
3. 实验课需认真记录、分析、归纳。遇到和理论不符的结果,应探讨其原因,培养自己的科学思维。实验完成后,写出实验报告,以此训练自己总结和书面表达的能力。

实验一 细菌的形态与结构

各种细菌在一定环境条件下,有相对恒定的形态与结构。了解细菌的形态与结构是鉴别细菌的重要方法之一。此外,对分析细菌的致病性和免疫发生的机理等方面,也有一定的意义。

目的要求

观察细菌的基本形态和一些细菌的特殊结构。

一、细菌的基本形态

细菌在适宜的生长繁殖条件下所显示的形态可分为三大类:球菌、杆菌和螺形菌。不同的细菌又可表现出不同的排列方式,在细菌的鉴别上有一定的参考价值。

材料

1. 球菌示教片:葡萄球菌、链球菌和肺炎球菌。
2. 杆菌示教片:大肠杆菌和炭疽杆菌。
3. 螺形菌示教片:霍乱弧菌。

方法

1. 使用显微镜的油镜观察球菌、杆菌和螺形菌的示教片。
2. 注意各菌的形状、大小、排列方式等特点(注意:细菌染成什么颜色不是本实验要求,染色方法将在以后实验中实际操作)。

结果记录

实验结果	葡萄球菌	链球菌	肺炎球菌	大肠杆菌	炭疽杆菌	霍乱弧菌
细菌形状						
细菌排列方式						

二、细菌的特殊结构

细菌的特殊结构仅为某些细菌所具有,而且特殊结构的形成受到一定条件的限制。虽然特殊结构不是细菌生存所必须的,但它们的存在将赋予细菌一定的功能,在致病性、抗原性以及对细菌的鉴别上都有一定的意义。

材料

1. 破伤风梭菌示教片(示芽胞)。
2. 肺炎球菌示教片(示荚膜)。
3. 变形杆菌示教片(示鞭毛)。

方法

1. 使用显微镜的油镜,观察细菌的芽胞、荚膜和鞭毛的示教片。
2. 注意芽胞在菌体上的位置和大小,荚膜的大小及其与菌体的关系;注意鞭毛形态、数量及其位置。将所观察到的细菌特殊结构的形态特点记录于下表中。

结果记录

细菌	破伤风梭菌	肺炎球菌	变形杆菌
特殊结构			

三、细菌的动力观察

一些细菌具有鞭毛，鞭毛是细菌的运动器官。有鞭毛的细菌在生活状态下能运动，这种运动不同于小颗粒性物质在液体介质中的布朗运动。因此，有无动力是鉴别细菌的一种重要指标。观察细菌动力的方法有悬滴法、压滴法、暗视野法等。

(一) 压滴法

材料

1. 变形杆菌、葡萄球菌 12h 肉汤培养物。
2. 载玻片、盖玻片、接种环、酒精灯、镊子等。

方法

1. 用接种环取变形杆菌菌液 2 环~3 环，置于洁净载玻片中央。
2. 用镊子将盖玻片轻轻盖在菌液上。为避免产生气泡，放置盖玻片时可先将盖玻片一边接触菌液，缓缓放下。
3. 在高倍镜或油镜下观察细菌的运动情况。
4. 同法，制备葡萄球菌压片，在高倍镜或油镜下观察其运动情况。

(二) 悬滴法

材料

1. 变形杆菌、葡萄球菌 12h 肉汤培养物。
2. 凹玻片、盖玻片、凡士林、接种环、酒精灯、镊子等。

方法

1. 取一凹玻片，在凹窝四周涂以少许凡士林。
2. 用接种环取适量变形杆菌菌液置于洁净的盖玻片中央。
3. 将凹玻片的凹面向下，使凹窝对准盖玻片的菌液处，盖于其上。
4. 翻转凹玻片，菌液悬滴于盖玻片下，用镊子轻轻按压盖玻片，使二者贴紧。
5. 用高倍镜观察细菌的运动情况。
6. 同法，制备葡萄球菌悬滴片，在高倍镜下观察其运动情况。

(三) 暗视野法

材料

1. 变形杆菌、葡萄球菌 12h 肉汤培养物。
2. 载玻片、盖玻片、无菌滴管。

方法

1. 取洁净载玻片 1 张，用滴管取葡萄球菌菌液 1 滴置于载玻片上。用盖玻片盖于其上，制成一压片。
2. 同法，作变形杆菌压片。
3. 取 1 滴镜油置于暗视野集光器上，然后将制好的压片放在镜台上，并使集光器表面的镜油与压片接触。用油镜观察细菌运动的情况。
4. 注意用于暗视野显微镜观察的载玻片厚度应小于 1.2mm，否则影响检查结果。

实验二 革兰染色法

活的细菌为无色半透明状，在普通光学显微镜下不易观察清晰。若用染色的方法可使菌体表面及内部结构着色与背景形成鲜明对比，可在显微镜下清晰地观察其形态。

细菌的染色方法很多，其中最为广泛使用的一种鉴别染色法是由丹麦医生 Christian Gram 于 1884 年创建的革兰(Gram)染色法。利用此法可将细菌分为革兰阳性细菌和革兰阴性细菌两大类。革兰阳性菌因细胞壁中含有大量的肽聚糖和磷壁酸，可保留结晶紫与碘的复合物，并不被酒精脱色而显示为蓝紫色。革兰阴性菌因其细胞壁中肽聚糖含量少，脂类物质含量高而被酒精脱色，经复染呈红色。

目的要求

了解革兰染色的原理，掌握革兰染色的方法。

材料

1. 菌种：葡萄球菌、大肠杆菌培养物。
2. 染液：结晶紫染液、卢戈(Rugol)碘液、95% 酒精和沙黄染液。
3. 其他：玻片、接种环、酒精灯、无菌生理盐水等。

方法

1. 涂片

取洁净玻片 1 张，作好标记后置实验台上。

点燃酒精灯，右手以持笔式握持接种环并放置火焰中烧灼灭菌，如图 1-1，先将接种环的接种丝部分置于火焰中，待金属丝烧红并蔓延至金属环端，再直接烧灼金属环直至烧红，然后由金属环至金属杆方向快速通过火焰，随后再反方向通过火焰，如此 2 次~3 次。

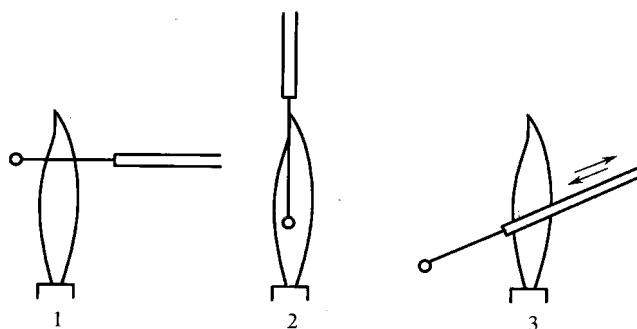


图 1-1 接种环的灭菌操作

用灭菌的接种环取无菌生理盐水 2 环，分别置于玻片左右两处。然后左手持葡萄球菌斜面培养物试管，拔取试管上的棉塞，将管口迅速通过火焰数次灭菌；右手仍以持笔式将接种环再次放在火焰上灭菌，待接种环冷却后，挑取适量培养物。烧灼管口，塞好棉塞，将斜面培养物放回原处。然后将挑取的细菌混合于其中一处的盐水中，涂抹均匀使成一层薄膜(若检材是液体，则不必加盐水)，薄膜涂抹的面积约 $1.5\text{cm} \times 2.0\text{cm}$ 。

- 按上法制备大肠杆菌涂膜。
2. 于室温中自然干燥。
 3. 固定: 涂片在酒精灯火焰上快速通过 3 次~4 次以固定细菌, 并使其不易从玻片上脱落。注意不要将涂片直接放在火焰上烤, 以免破坏细菌结构。
 4. 染色
 - (1) 初染
在涂膜上滴加结晶紫染液 1 滴~2 滴, 染 1min, 水冲洗, 并轻轻倾去玻片上的积水。
 - (2) 媒染
加卢戈碘液 1 滴~2 滴, 染 1min, 水冲洗。将表面积水甩干。
 - (3) 脱色
用 95% 酒精数滴滴于玻片上, 频频摇晃以脱色, 0.5min 左右, 立即用水冲洗(若涂膜较厚, 可延长脱色时间; 必须随时观察, 以免脱色过度)。
 - (4) 复染
最后滴加沙黄染液 1 滴~2 滴, 复染 1min 后用水冲洗。最后用吸水纸吸干。
 5. 用显微镜的油镜观察染色结果, 将实验结果记录于下表:

结果记录

细菌	染色性	形态	排列方式
葡萄球菌			
大肠杆菌			