

請交換

請批評

常見人体寄生虫实验操作 技术手册



河南省卫生防疫站 编印
贵州省卫生防疫站

一九七四年四月

前 言

无产阶级文化大革命以来，在毛主席革命卫生路线指引下，我们两省防治寄生虫病工作取得了很大成绩，形势大好。

长期以来，广大寄防人员，特别是搞寄生虫病检验的同志，在与人体寄生虫病的斗争中，积累了一定经验，操作技术有不少革新创造，只是没有及时认真总结，这在一定程度上影响到寄生虫病防治工作的更好开展。在批林批孔斗争的推动下，遵照毛主席“**要认真总结经验**”的教导，我们收集了各地的经验资料，编写为《常见人体寄生虫实验操作技术手册》，供搞这个专业的同志工作参考。希望它能帮助我们提高防治寄生虫病工作的水平。

这个小册子分：原虫、蠕虫、昆虫，染色液配制及染色法，实验仪器的使用和实验室有关技术操作等六部分。对实验操作相类者，删繁从

筒，如肠道寄生线虫仅以钩虫为例。

事物是不断发展的，毛主席教导我们：“人类总得不断地总结经验。”我们希望广大寄防人员，“认真看书学习，弄通马克思主义”，提高“三个觉悟”，钻研业务技术，在工作中勇于创新，不断总结新鲜经验，尽早实现毛主席“**送瘟神**”的光辉思想，支援社会主义革命，促进工农业生产的发展。

由于我们政治思想水平低，业务知识、文字水平所限，缺点错误确属难免。敬望同志们批评指正。

编 者

一九七四年四月

毛 主 席 语 录

中国共产党是全中国人民的领导核心。没有这样一个核心，社会主义事业就不能胜利。

思想上政治上的路线正确与否是决定一切的。

自然科学是人们争取自由的一种武装。……为着要在自然界里得到自由，就要用自然科学来了解自然，克服自然和改造自然，从自然里得到自由。

备战、备荒、为人民

把医疗卫生工作的重点放到农村去。

动员起来，讲究卫生，减少疾病，提高健康水平。

目 录

第一篇 原 虫

一、疟原虫的检查技术.....	(1)
(一) 血片的制作.....	(1)
(二) 血膜的染色.....	(3)
(三) 吡啶橙染色和荧光显微镜检查疟原虫.....	(4)
(四) 血内疟原虫计数法.....	(6)
(五) 动物疟原虫保种常规.....	(7)
二、杜氏利什曼原虫检查技术及各种血清试验.....	(10)
(一) 病原检查.....	(10)
1. 各种穿刺检查.....	(10)
2. 皮肤活体组织检查.....	(13)
3. 黑热病原虫的培养.....	(13)
(二) 各种血清试验.....	(15)
三、阿米巴原虫检查技术.....	(24)
(一) 粪便检查.....	(24)
(二) 涂片染色法.....	(27)
(三) 离体培养.....	(28)
(四) 乙状结肠镜检查.....	(32)
(五) 肛门拭.....	(32)
四、阴道毛滴鞭毛虫检查技术.....	(33)

- (一) 阴道分泌物涂片检查..... (33)
- (二) 分泌物内毛滴虫培养法..... (33)

第二篇 蠕 虫

- 一、研究动物寄生蠕虫的技术..... (37)
 - (一) 解剖动物寄生宿主的采集方法..... (37)
 - (二) 吸虫..... (38)
 - (三) 绦虫类..... (41)
 - (四) 线虫类..... (43)
 - (五) 粪便虫卵标本之玻片保留法..... (45)
- 二、钩虫检查技术与标本制作..... (48)
 - (一) 粪便检查方法..... (48)
 - (二) 试管培养幼虫法..... (49)
 - (三) 钩蚴分离法..... (49)
 - (四) 标本的保存与制作..... (53)
 - (五) 洪氏虫卵计算法..... (64)
 - (六) 小管漂浮虫卵计数法..... (66)
 - (七) 钩虫病感染度的测定..... (67)
- 三、丝虫检查方法..... (68)
 - (一) 微丝蚴检查法..... (68)
 - (二) 犬丝虫提纯抗原 (F、P、T) 皮内试验诊断
丝虫病..... (70)
 - (三) 乳糜尿检查..... (71)
- 四、蛲虫检查方法..... (72)
 - (一) 检查虫卵..... (72)
 - (二) 检查成虫..... (73)

(三) 手指甲检查虫卵法·····	(73)
(四) 椅子和玩具上虫卵检查法·····	(74)
(五) 尘土中检查虫卵法·····	(74)
(六) 标本的收集、保存与制作·····	(74)
五、吸虫的诊断方法及标本制作·····	(75)
(一) 实验室检查方法·····	(75)
(二) 标本制作·····	(76)
(三) 肺吸虫·····	(80)
1. 检查方法·····	(80)
2. 动物感染·····	(81)
(四) 肝吸虫·····	(81)
1. 中间宿主形态与检查方法·····	(81)
① 螺蛳·····	(81)
② 鱼的解剖·····	(83)
③ 鱼的囊蚴检查法·····	(84)
2. 实验诊断·····	(85)
六、绦虫·····	(85)
(一) 成虫的采集与保存·····	(85)
1. 大型绦虫的采集与保存·····	(85)
2. 小型绦虫的采集与保存·····	(86)
(二) 幼虫的采集与保存·····	(87)
(三) 玻片标本的制作·····	(89)
(四) 实验诊断·····	(91)
七、血吸虫·····	(91)
(一) 血吸虫的实验诊断·····	(91)
(二) 几种血清免疫诊断操作方法·····	(93)

(三) T、T、C染色茚三酮复染鉴别直肠组织内血

吸虫卵方法..... (98)

(四) 活体荧光吖啶粉染色鉴别血吸虫卵方法... (100)

(五) 制造血吸虫干卵安瓿方法..... (102)

(六) 制造血吸虫成虫抗原方法..... (104)

(七) 钉螺房实验操作常规..... (106)

(八) 实验血吸虫病的操作常规..... (108)

第三篇 昆 虫

一、蚊虫对杀虫剂抗性(敏感度)的测定常规..... (114)

二、淡色库蚊和白纹伊蚊的饲养保种操作常规..... (118)

三、雷氏按蚊饲养和在蚊笼内交配传代的方法..... (120)

四、雷氏按蚊吮吸离体血感染人间日疟的方法..... (121)

五、中华按蚊人工饲养的研究..... (123)

六、白蛉人工繁殖的方法..... (126)

七、白蛉人工感染利什曼原虫试验常规..... (128)

八、蚊体内疟原虫解剖检查及标本制作常规..... (131)

九、蚊体内丝虫蚴虫的解剖操作常规..... (135)

第四篇 染色液的配制及染色方法

一、Wright's (瑞氏)染色法..... (138)

二、Giemsa's (吉氏)染色法..... (139)

三、杰司皮染色法..... (139)

四、品蓝快速染色法..... (141)

五、湖蓝快速染色法..... (142)

六、硼砂美蓝伊红染色法..... (143)

七、瑞氏、吉氏混合染色法	(144)
八、瑞氏稀释法染厚滴片	(144)
九、改良吉氏染色法	(144)
十、美蓝快速染色法	(144)
十一、活体染色法	(145)
十二、铁苏木素染色	(145)
十三、赫氏苏木素染色改进法	(147)
十四、快速永久固定染色法	(149)
十五、苏木素染色法	(150)
(一) DeLafield's (德米飞氏) 苏木素	(150)
(二) 苏木素明矾染剂	(151)
(三) Ehrlich (欧立区氏) 酸性苏木素	(151)
(四) 赫氏 (Hanis) 苏木素	(152)
十六、微丝蚴改良染色法	(153)
十七、天青Ⅱ: 伊红生理盐水染微丝蚴法	(153)
十八、甲烷基绿——派伦纫染微丝蚴法	(154)
十九、胭脂红 (Carmin) 染液配制	(155)
(一) 明矾胭脂红	(155)
(二) 硼砂胭脂红	(155)
(三) 醋酸明矾胭脂红	(156)
(四) 钾明矾胭脂红	(156)
(五) 盐酸胭脂红	(156)
二十、有关一般溶液的配制	(157)

第五篇 实验仪器的使用

一、复式显微镜与双目解剖镜的使用方法	(159)
--------------------	-------

二、测微器和描绘器的使用方法·····	(163)
三、PH 计的使用方法·····	(168)
四、分析天平的使用·····	(172)
五、科伟581型光电比色计操作方法·····	(175)
六、烘箱的使用·····	(180)
七、抽气机用于真空干燥和沙氏滤器过滤时的操作方法 使用步骤·····	(181)
八、温箱的使用·····	(182)
九、离心机的使用·····	(183)
十、冰箱的使用·····	(185)
十一、手提式高压消毒锅的使用·····	(187)
十二、消毒室的使用·····	(188)

第六篇 实验室有关技术操作

一、实验室药品保管及使用规则·····	(189)
二、玻璃器皿的清洁法·····	(191)
三、酸硷滴定方法·····	(196)
四、重蒸馏水的制备·····	(201)
五、容量器皿的校准·····	(203)
六、溶液的配制·····	(208)
七、抗疟药物筛选常规·····	(216)
八、口服预防与治疗血吸虫病新药的初筛方法·····	(221)
九、驱除钩虫药物筛选常规·····	(222)
十、动物的投药方法·····	(225)
十一、灭螺药物过筛常规·····	(227)

第一篇 原 虫

一、疟原虫的检查技术

(一) 血片的制作

1. 玻片的清洁:

玻片清洁与否,是影响血涂片质量好坏的一个重要因素,务必使玻片达到去污脱脂,以免血膜污染或者脱落。新购买的玻片也要经清洁后才能使用。

清洁的方法:用5%肥皂水煮沸,将玻片逐张投入,然后去火,待血膜脱落、肥皂水稍冷后,逐张玻片洗擦。一般用左手食指两指夹持玻片两端,右手以纱布夹住玻片两面,细心来回拭擦,再用清水反复洗净,而后用毛巾或纱布逐张擦干擦亮,最后用清洁纸包扎好备用。

已洁净的玻片,应避免用手指接触玻片的上下两面,以防手上油垢污染玻片表面,影响涂片质量和造成染色过程血膜的脱落。

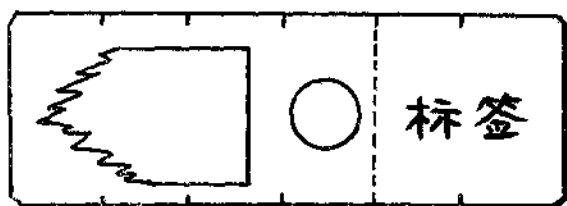
2. 血片制作方法和注意事项:

1) 取血部位的消毒:采血常取的部位为耳垂(婴儿可在足跟部取血)。针刺之前先用75%酒精棉球消毒,并应拭擦干净,防止创口感染和污物污染被检之血滴,待皮肤上酒精干后,以手拇、食指紧捏耳垂上部,使耳垂充血,右手指持消毒

刺针（一般用折断半边的钢笔尖）迅速刺入，不宜过深，其挤出之第一滴血液涂薄膜，第二滴血液涂厚膜。

2）取血量及血膜涂布方法：取洁净之载玻片二张，一张平置桌上做涂片，另一张以右手拇指和食指夹持侧缘做推片。用推片的左下角从耳垂沾取厚血膜血液3—4立方毫米（约火柴头大小），在左端边缘中部沾取薄血膜血液0.5—1.0立方毫米（视薄血膜大小而定血量）；先将左端下角的血液于涂片上涂成厚血膜，揩去玻片角上的残余血液，继将推片左端下缘贴于涂片上，使血液在涂片与推片之间向两侧扩展至二厘米宽时，保持推片与涂片成25—30度角，从右向左迅速推出制成薄血膜。

3）厚、薄血膜的位置和大小：假定将玻片自右至左划为六格，厚血膜应位于第三格中央，薄血膜位置应在第四格的三分之一处至第六格之间。厚血膜为正圆形，大小直径为0.8—1.0厘米，薄血膜宜呈舌状，宽约2厘米，血膜皆须厚薄均匀，边缘光滑。血片的形状位置如下图：



疟原虫标本片血膜位置示意图

4）血膜编号和保管：制成的血片，待薄血膜干后用铅笔于薄血膜中写上血片的编号，以防差错。血片应平置于玻片标

本盒内，以防灰沙污染和苍蝇、蟑螂吮吸血膜，待其自然干燥，切勿用火烤或日晒等方法促使干燥，致使血红蛋白凝固。未干的血膜，绝对不要倾斜放置，避免厚血膜中血细胞沉积于一边，造成血膜厚薄不均，厚处不易脱血和着色而影响检查结果。血膜干燥后还应避免受潮和高热。

此外，还应注意在血片标本的血膜充分干燥后至12小时以内进行染色，以免厚血膜上血红蛋白凝固不能溶解，影响镜检。有时由于某些原因致未能及时进行染色时，可在厚血膜干燥后（一般在涂片后12—24小时），先用甲醇或无水酒精固定薄血膜，再用过滤清水溶掉血膜上的血红蛋白，凉干后包扎好待以后染色。但勿使溶血前的厚膜遇到固定液——甲醇，也勿使未固定的薄膜遇到溶血的蒸馏水。前一种情况使厚膜溶血困难，后一种情况使薄膜溶血，都不利于染色检查。

（二）血膜的染色

1、血膜染色常用的有姬氏、瑞氏、品兰、桀斯匹等，其方法请参阅染色液的配制和染色方法。

2、影响血片染色的重要因素：

①染剂和溶剂的质量：如染料色素、甲醇和甘油等不很纯，常使所配制染液，有时硷性甚强、有时酸性甚强，由于染液不呈中性色而影响着染色的酸硷度。因此，每次新购或新制的染液需要先行测定，应以什么样酸硷度的水去稀释，才能达到良好的着色。

②染液的新旧：新配制的染液，因色素成分尚未充分混合

溶解，少数杂质还未沉淀，一般染色力弱，染色效果差，且常带硷性。染液放置稍久，染色力逐渐增强，故以陈旧染液为佳。

③染液的稀释浓度：染液浓度高，则染色快，各种细胞着色粗糙，薛氏小点、茂氏小点等粗大显著；染液浓度低，则染色慢，各种细胞着色细致，内部构造着色均匀自然，如环状体、孢子体及疟色素均在稀染液较长时间染时（留做标本的血片，一般用2%姬氏染液稀释染色1小时），清晰可见，但薛氏点茂氏点则细小或消失。

④染色时间：染料对细胞的着色系化学结合作用，染色时间过于短促，染料与被染物间的化学反应未能充分完成，染色效果较差。外界气温高时，则染色化学反应加快，着色快速，故染色时间应略于缩短；反之，气温低时，则染色时间应予以延长。所以，染色时间要随染液的新旧、染液的稀释浓度和染色的气温而伸缩。

⑤稀释用水和冲洗用水：染液的稀释用水和染色的冲洗用水，须经煮沸过滤，以免自由生活的原虫污染血膜，同时，更要求具适当的酸硷度，使新稀释的染液呈中性，从而获得良好的染色结果。最好用缓冲蒸馏水，也可用生理盐水来作稀释用水。

（三）吡啶橙染色和荧光显 微镜检查疟原虫法

原料及配法：

1、吡啶橙母液：吡啶橙1克，加蒸馏水或PH6.5磷酸盐缓冲液100毫升，过滤后保存于有色玻塞瓶中，可使用数月之久。

2、0.01%吡啶橙染液：取上述母液1毫升，加过滤的普

通水或PH6.5磷酸盐缓冲液99毫升即成。染色前临时配制，可用2--3天。

3、氯化钙净化液：氯化钙（ CaCl_2 ）16克，加水至1000毫升，染色后作褪色和分色用。吖啶橙染色过深时脱氧核糖核酸（DNA）和核糖核酸（RNA）均呈橙红色萤光，经净化液处理后，DNA显现黄绿色萤光，而RNA仍呈橙红色萤光。

染色和观察：薄血膜经甲醇固定后，在0.01%吖啶橙染液中染色1分钟，用清水漂洗数次，然后用1.6%氯化钙净化液褪色半分钟，最后再用清水漂洗数次。或经甲醇固定的薄血膜，在0.01%吖啶橙染液中染1—2秒钟，然后用清水漂洗3分钟亦可。

厚血膜不用甲醇固定，可直接放入0.01%吖啶橙染液中染10—15分钟，清水漂洗几遍后，用氯化钙净化液褪色1分钟，再水洗几遍。或将厚血膜先用清水脱去血红蛋白，在0.01%吖啶橙染液中染半分钟，水洗3—4分钟即可。

染好的血片晾干后，可保存半至一个月不褪色。检查时，打开萤光光源，使紫兰光柱直接照射在显微镜的反光镜上，利用反光镜将最亮的光线调节在视野的中心。在血膜上滴一小滴PH7.5的缓冲液或普通清水做表封剂，然后加一盖片，再在40×或60×物镜和5×目镜下观察，这样萤光色彩更鲜艳，物象更清楚。需用油浸镜观察时，在盖玻片上滴一小滴90%缓冲甘油（90毫升甘油，加10毫升PH7.2磷酸盐缓冲液）取代香柏油。

萤光色素染色标本中如有可疑为原虫者，可直接用姬氏染液复染，在普通显微镜下复查。若普通染色标本需用萤光显微镜进行复查者，可用甲醇褪去染料后，用萤光色素重染，然后观察。

注意事项：厚血膜要比通常的厚血膜稍薄，厚薄力求均

匀，这样可保证满意的染色结果。净化液褪色的时间要适中，时间过短，原虫核显不出黄绿色萤光，时间过长，原虫胞浆橙红色萤光会减退。在血片制作、染色和观察过程中，要注意清洁，尽量避免细菌或其他水生物的污染，各种用水最好用蒸馏水或过滤的冷开水，否则血膜上污染的细菌等生物可着染绿或红色萤光，干扰检查。配制的吖啶橙母液要过滤，血片染色后要将表面的色素沉渣漂洗干净。判定疟原虫要具备核和胞浆两个基本条件，并符合疟原虫的形态结构。

(四) 血内疟原虫计数法

此法应用于疟原虫感染的强度以及观察考核疗效。

1. 直接计算法：用血红蛋白吸管吸血20立方毫米，将全部血液吹在玻片上，准确制成 4×1 厘米大小的均匀厚血片。按照厚血片染色法染色。将测微计放在显微镜上测定目镜测微计与镜台测微计的大小比例，然后取下镜台测微计，换以检查血片。选择血片的中央部分，利用测微计测定好的0.01平方毫米的范围内计数原虫。将200个视野内所见到的原虫总数用10乘即得每立方毫米血液内原虫数。

2. 间接计算法：在采制薄血片同时进行红细胞计数的检验，从薄血片上同范围查出疟原虫数与红细胞数算出百分比，再乘上病人每一立方毫米血液内红细胞总数，间接计算出每立方毫米血液内疟原虫的约数。此法方便易行，特别重度感染者计算较直接计算简单，用此法同时可将各期疟原虫分类计算出来。在计算疟原虫数，最好用具有线格的目镜，计算不易重复

和遗漏。

（五）动物疟原虫保种常规

现有的动物疟原虫为鸡疟原虫（*P. galli*）及鼠疟原虫（*P. berghei*）的印度株与苏联株。鸡疟原虫可采用子孢子接种或血液转种二种方法保种，无免疫力的健康鸡一般在接种后一周左右可在血涂片内查见原虫，其配子体可感染白纹伊蚊。鼠疟原虫在我国尚未获得可供感染的蚊媒，仅可应用血液转种法保种。无免疫力的小白鼠经腹腔接种后第五天血内均可查见疟原虫，多数小白鼠在感染后2周左右死亡。

为了使现有的动物疟原虫得到妥善保种，及时供应实验需要，特制订本规程。

动物疟原虫保种

1）接种前准备

（1）动物：小白鼠可选择20克左右，保种鸡可采用2市斤左右的莱克亨鸡。在外购买的鸡须经隔离饲养2周以上，确证无鸡瘟等急性传染病者方可供用。

（2）器材与药品：注射器（1毫升，2毫升），针头（24号），三角烧瓶（25毫升），烧杯（50毫升），量杯（5毫升），量筒（100毫升）、载玻片、滴管、昆虫镊子、剪刀。

煮沸消毒器、煤气灯或酒精灯、三角架及石棉板、染色缸、手摇计数器、显微镜、棉球、75%酒精、二甲苯（纯）、甲醇（无水）、柏油、姬姆萨氏原液、0.85%盐水（经高压消毒）、