

病原性原虫试验室检查方法

(兽医试验室检查方法第14章)

Н. И. 阿格林斯基著

孙澄译

江苏人民出版社

病原性原虫試驗室檢查方法

(兽医試驗室檢查方法第14章)

H·И·阿格林斯基著

孙澄譯

江苏人民出版社

內 容 提 要

本书系根据苏联国家农业书籍出版社 1953 年出版的“兽医实验室检查方法”第 1 卷 14 章“病原性原虫实验室检查方法”(Н.И.阿格林斯基教授所著)譯出。

本书內容列举了錐虫、滴虫、利什曼原虫、球虫、血孢子虫、纖毛虫的多种檢驗方法。方法都很具体、实用。

本书可供兽医原虫学方面的教学、临診和研究工作者之用。

Н. И. АГРИНСКИЙ
МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПАТОГЕННЫХ ПРОСТЕЙШИХ,
СЕЛЬХОЗГИЗ, 1956

病原性原虫試驗室检查方法

(兽医試驗室检查方法第14章)

Н·И·阿格林斯基著

孙 澄 譯

*

江苏省书刊出版营业許可証出〇〇一號

江 苏 人 民 出 版 社 出 版
南 京 湖 南 路 十 一 号

江苏省新华书店发行 南京前进印刷厂印刷

*

开本 787×1092 耗 1/32 印張 3 9/16 字數 77,000

一九五九年三月第一版

一九五九年三月南京第一次印刷

印數 1--2,600

目 录

显微镜检查方法	1
活体状态原虫的检查	2
染色标本的检查	5
显微镜标本的制作技术	5
涂片、切片和压片中原虫的染色法	9
厚血滴标本的染色法	18
原虫染色用水的中和	18
染色标本中原虫的显微镜检查及其与类似物体的鉴别	20
原虫的测量	21
标本中微生物位置的标印	23
家畜锥虫试验室检查方法	23
锥虫病病原的显微镜诊断	23
材料的收集及其浓集方法	23
活的锥虫的检查	26
染色标本的检查	27
锥虫一般的形态学	27
锥虫形态学的变异性	29
家畜病原性锥虫的形态学	29
几种非病原性锥虫的形态学	31
锥虫及由锥虫而引起的疾病的血清学鉴别方法	33
拉维兰及美尼尔氏交叉感染的方法	33
补体结合反应 (PCK)	34
福尔马林反应	34

錐虫的生物学检查方法	35
滴虫的检查方法	36
牛滴虫病病原的显微镜诊断	36
利什曼原虫的检查方法	41
犬利什曼原虫病病原的显微镜诊断	41
染色标本的检查	44
利什曼原虫的培养	44
组织中利什曼原虫的形态学	45
培养物中利什曼原虫的形态学	47
利什曼原虫的血清学诊断	49
球虫的检查方法	51
球虫的显微镜检查方法	51
裂殖体与配子的检查	52
球虫卵囊的培养	53
球虫卵囊的检查	54
几种家畜球虫的形态学	55
球虫的生物学诊断方法	55
血孢子虫的检查方法	63
家畜血孢子虫病病原的显微镜诊断	63
牲畜外周血液和内部器官穿刺物的涂片的采取	63
几种焦虫的形态学	71
几种巴贝斯虫的形态学	77
几种弗氏焦虫的形态学	79
马纳氏焦虫的形态学	85
第一种类型——大型居多的纳氏焦虫的形态学	86
第二种类型——小型居多的纳氏焦虫的形态学	89
几种泰氏焦虫的形态学	92

几种边虫的形态学	99
蜱体内血孢子虫病病原的检查方法	100
血孢子虫病的生物学诊断	104
纖毛虫的检查方法	105
显微镜检查方法	105
活体状态生长型纖毛虫的检查	105
包囊的检查	105
染色状态纖毛虫的检查	106
猪小袋纖毛虫的形态学	107
小袋纖毛虫的培养	108

为研究原虫的形态学与生物学，以及诊断由原虫而引起的疾病，其检查方法基本上分为：显微镜的方法、血清学与生物学的方法、以及某些原虫在人工培养基内培养的方法。

显微镜检查方法

原虫的显微镜检查有：a) 活体状态的检查，即在原虫寄居的自然与人工环境里应用活体染色与不应用活体染色，b) 死体状态的检查，即在标本上经过固定与染色，以及B) 应用特殊显微镜技术的方法。

上述方法各有其优点和缺点，但它们每一种方法都是必须的，而且要互相补短。譬如活体原虫的检查可获得有关其形态、构造、运动和繁殖的有价值的知识。在透过光线下镜检查时，可在活体原虫的细胞质内看到核、伸缩泡及其他的泡，强烈的折射光线还可看到各种形状与大小的颗粒等。在抛物线集光器的暗视野内，运动小器官——纤毛和鞭毛非常明显。活体染色法有可能更详细地研究原虫体部的构造，尤其是消化泡和排泄的包涵物。借着应用各种成分的液体进行固定，以后用各种染色液进行染色来研究杀死不久的原虫，则有可能查明原虫体内比较微细构造的详细情况。

根据所采用的各种方法的结果的比照，就有可能对原虫外部与内部的构造、生理、化学的成分以及它的生物学方面形成一种比较正确的概念。

活体状态原虫的检查

压滴标本的检查 为了观察，可将活的原虫放在干净的载物片上，放于它们能在那里生活的一滴培养液里，而后复以盖玻片，即制成所谓“压滴”（Раздавленная капля）。使用的液体要使它在盖玻片下形成均匀的薄层，但不能溢出盖玻片的边缘。半固体和固体培养物，例如可在上面培养利什曼原虫的琼脂，此时要用化学纯氯化钠生理溶液或林格氏液稀释。为防止血液凝固，可将1—2%的柠檬酸钠溶液添加于温血动物的血液里。为避免所检查的目的物因盖玻片而受到损伤，可在玻片之间放置一块衬垫；其厚度应与所检查的目的物相等。为此目的，可利用几个载物片与盖玻片的小块、厚纸和普通纸、细玻璃丝、细毛、滤纸纤维，或将盖玻片放置于所谓“支柱”（Ножка）上。支柱是一种柱状的小玻璃球，它由2份白蜡和1份在火焰上溶解的威尼斯松节油（Венецианский терпентин）制成。

长时间检查时，宜用凡士林或已经熔化的石蜡围住盖玻片的边缘，以防止液体蒸发和所检查的目的物变干。在检查的液体中加入少量1—2%的明胶、樱桃胶或阿拉伯树胶的溶液可达到抑制某些原虫过于活泼的运动性。

悬滴标本的检查 在压滴标本内只能进行比较短时间的检查，因为盐的浓度在盖玻片下面可由于液体蒸发而变浓，因此它会检查的目的物很快便死亡。为避免检查目的物的死亡，最好使用在细菌学技术上所应用的中間带凹陷的载物片进行悬滴标本的观察。在这种情况下可将带有一滴受检材料的盖玻片压在围于玻片的凹窝四周的一薄层凡士林、已经熔化的石蜡或特殊的油灰（Замазка）（在搅拌的情况下将7—

9份的松香徐徐加在已經熔化的2份黃蜡里)上。用此種方法觀察目的物在數小時之內均可進行。根據原蟲的大小可用低倍、中倍或油浸接物鏡進行檢查，同時要通過縮小光圈或下降集光器的方法使視野變暗。為防止有些原蟲在懸滴或壓滴玻片上因冷卻而很快地減弱以至停止它的運動，可在座燈的火焰上、手掌上或使用一種特殊的加熱台小心加熱之。

濕室標本的檢查 在按下列方法裝置出來一種特殊的“濕室”(Влажный камер)，可對懸滴標本長時間的檢查獲得更好的條件。取帶有深的環形凹槽的厚玻片在槽中滴滿水，用加拿大膠、蜡或石蜡將一玻璃圈膠牢在玻片凹槽的外周。在玻璃圈上面的邊緣塗一層凡士林，用中間帶孔的蓋玻片復蓋，以後用底面載有原蟲培養滴的蓋玻片蓋在它上面。

暗視野標本的檢查 為了發現在現今最高倍的光學顯微鏡下所不能識別出的原蟲微細構造物，以及整個超顯微鏡的生物時就應應用所謂超倍顯微鏡。暗視野標本的檢查通常都使用拋物綫體集光器(Параболоид-конденсор)。將它同阿別氏(Аббе)照明器一同放入到普通顯微鏡里。在檢查壓滴標本內的目的物時，要在拋物綫體集光器的透鏡與載物片之間加入一滴香柏油。可使用焦距為4—3毫米的干鏡頭進行鏡檢。

原蟲的活體染色 為查明活體細胞某些構造的成分(消化胞等)，可用以適當的染色液實行活體染色的方法。染色液應該能很好的溶解在水里并稍溶于類脂肪里，逐漸滲入到細胞內，並要在生理與化學上不致使細胞發生顯著的改變(使它不變形)，在稀薄的稀釋液內不具毒性或毒性很小。下列主要的染色液均符合于這些要求，主要它對細胞的顆粒物着色良好。

中性紅 (Нейтральрот) 使用 1:1,000—100,000 的水的稀釋液。稀薄的染色溶液呈淺褐黃色，較濃的溶液呈紅褐色。在有機酸存在時溶液變藍，如有少量鹼性夾雜物存在則呈黃褐色，而鹼性夾雜物較多時則呈淺紅色。因此細胞的酸性成分染成櫻紅色，鹼性成分染成紅黃色，中性脂肪為紅色。鞭毛蟲的核很容易着色。中性紅常常用於原蟲的活體染色。

美藍 (Метиленовая синь) 只應用稀釋成 1:500—10000 的化學純美藍。美藍對某些原生質的包涵物着色很深尤其是鹼性的溶液。天青 I 和天青 II 對螺旋體染色比美藍深。

煌焦油藍 (Бр ллиант-крезилблау) 使用 1:1,000 的水的稀釋液。溶液呈紫色，有酸存在時變藍色，有鹼存在則變紅色；中性脂肪着紅色。這是原蟲，尤其是血鞭毛蟲類 (Гемофлагеллят) 活體染色最好的染色液。

俾斯麥棕 (Везувен) 稀釋成 1:20,000—1:30,000，可用於營養胞的研究；原生質着淺黃色，而顆粒則為紅褐色。

染色技術 可應用下列方法之一。

1. 用含有原蟲的液體制成壓滴標本，使液體從蓋玻片的下面溢出在蓋玻片的邊緣附近，用吸管加一滴染色液，而從另一面再往蓋玻片加一張濾紙條，以此造成染色液在玻片下面向着濾紙方面流入到標本里的條件。

2. 將含有原蟲的一小滴液體與等量的一滴染色液在載物片上混合，而後用蓋玻片復蓋。

3. 將一滴含有原蟲的液體加在載物片上早已晾干而變濃的一滴染色液里，而後用蓋玻片復蓋。

製成的標本要在顯微鏡下檢查。用油浸鏡檢查時必須使用薄的載物片與蓋玻片。

染色标本的检查

为了比較順利地研究原虫的构造和病原性原虫的显微鏡診斷，通常都將它予以一般的染色和特殊的染色。

显微鏡标本的制作技术

湿的涂片与干燥的涂片、压片和厚滴标本的制作技术共包括：a) 制作标本的載物片与盖玻片的清理，b) 标本本身的制作，c) 标本的固定和 d) 染色。

很好地准备、正确地固定与染色的涂片是順利地检查原虫的基础。

玻片的清理 为制作优良的薄片，載物片与盖玻片首先必須是干淨的，脫去脂肪的，而且要沒有酸硷痕迹的。为此目的，可將它在溫肥皂水里用刷子清洗，而后用干淨的水洗淨，擦干，为了脫脂及保存，需放于干淨的酒精罐里。为了不致將脂肪的痕迹帶到酒精內，在使用以前用鑷子取出，不要用手指，用干淨的毛巾擦淨，要拿在玻片的側面，不要拿在玻片的表面，否則玻片需重新进行脫脂。

对过去用过的玻片首先要用沾有汽油的棉花除去香柏油，而后將它在溫水里用沾肥皂的刷子清洗，擦干并放入酒精中。在清洗与保存时，不应將这些玻片与細菌学检查所使用的玻片混在一起，因为这种玻片常常使用酸和硷。

薄片的制作 在病原性原虫显微鏡診斷时，可检查病畜的外周血液、內部器官、以及淋巴結等涂片。涂片首先应当沒有皮肤微生物的雜質、尘埃和其他外来的顆粒；因此必須消除所有能影响到玻片制作的清洁的因素。譬如，載物片与盖玻片在拿到畜舍时不要打开，要放在干淨的注射器盒或是小的

厚紙盒里。將采血部位的皮膚(耳朵的上部、禽類在翅下靜脈)小心地剪毛(羽)，先用沾水的棉球清除皮膚的污垢，以後用酒精清拭，用醚或揮發油脫脂，令其乾燥，而且只有在乾燥以後，才能用不帶注射器的滅菌針頭刺破表皮的靜脈，或用安全刀刀輕輕割破。假如皮膚業已充分脫脂，則流出來的血滴成球狀，假如在潮濕的表面上則血滴滲散開來就不可能製成優良的塗片。必須採取第一滴的血液作為檢查之用。第一滴血液含有的蟲體數量比以後的血滴多得多，這一點具有極其重要的意義，因為它常常在發病頭幾天，甚至在外周血液蟲體很少的情況下也能夠發現病原。但第一滴血液的塗片並不適于白血球象的計算，因為它含有多量單核白血球及組織細胞。因此在塗片的中部不僅要用普通鉛筆(不是化學鉛筆)注明農場的名稱、牲畜的編號(渾名)和標本制作的日期，而且要注明制作標本所用血滴順序的號數。為了原蟲的顯微鏡檢查要制作不少於3—4張優良的塗片。

塗片的制作最好有助手，由他準備手術區和靜脈穿刺。

濕的塗片通常用蓋玻片制作，而乾燥的塗片用載物片。前一種情況是將夾着蓋玻片的特殊的夾子拿在左手，並將液體的材料滴加在玻片上面的中部。將夾着蓋玻片的第二個夾子拿在右手，而後將它放在那滴材料上，使它分布在兩玻片的中間，以後將一張玻片向右側徐徐移動，而另一張玻片向左側移動，一直到使它們完全分離。比較厚的材料可用吸管或注射器針的鈍緣塗在玻片上。

在載物片上制作乾燥的塗片可使用蓋玻片塗抹材料，但蓋玻片很脆，因此最好用短的一邊琢磨過的并切掉角的載物片代替之。

在靜脉穿刺以前打开盒子，用右手拿在載物片的长側面，在左手的大拇指、食指和中指之間夾住載物片的短緣，同时將手掌向下，以防玻片落上尘埃。以后从穿刺部位取来一滴血液，放在載物片接近于向左侧推动的末端，其大小不得超过粟粒大，而后用盖玻片的背面接触血滴，并成45度角斜着拿住。当血液沿着盖玻片的邊緣均匀分布开以后，便使它在載物片上向左方移动，不可过快，但也不要很緩慢，直到整个血滴用完为止。在用右手的大拇指及食指移动时，应輕輕靠住載物片的邊緣。这样手就不会撞动，并可保持住載物片上均匀的压力，如此即可制出直而均匀变細、末端呈纓子狀的涂片。

已制出的涂片，經数秒鐘即变为干燥，这时要用普通鉛笔、針或剪刀的尖端將上述記載注明。此后將涂片在空气中至少晾干10分鐘，防止直射的太阳光綫和尘埃，在夏季还要防止蒼蝇。以后將它固定。

以后的每一張涂片必須用新的玻片制作，因为在玻片邊緣凝固的血液可使毛細現象遭到破坏，因而就不可能制出优良的涂片。在万不得已的情况下可使用玻片的另一个邊緣，或用棉球擦掉凝固的血液，再擦干后用之。每一張涂片都应当从穿刺部位去掉血液凝块后以流出的新鮮血液来制作。不許从切口处压迫血液；因为它可以使血液有形成分的比例发生显著的改变。

在一年的寒冷季节很难作出优良的涂片，因为由于溫度的不同，水分在玻片上发生凝結，因而取来的血液便部分发生溶血。在特別寒冷时，可能在制片以前血滴就已被冻結。为避免冻結起見，可將玻片在灭菌器或热水浴鍋的盖上或酒精灯火焰上加热到适当的溫度，并要將已制出的涂片很快地放到固定液里。

从伤口流出的血液，以及被血液所污染的一切东西，必須收集在盛有消毒液的小盒里，耳朵的伤口用碘酊涂擦，并用棉花复盖。

假如所采出的血滴大小适当，以均匀的速度与压力按玻片推进，而且玻片是干净的，如此便可以正确地制出完全优良的涂片。涂片的色调在光线下检查时形成虹的色彩，在整个玻片上色调均匀，无空白处，其长不超过载物片的 $\frac{1}{2}$ ，宽度要比玻片的宽度小一些。特别重要的是涂抹要逐渐地消失，并要以纓子状的线条而告終，因为原虫在紅血球彼此分离地排列为一层时則很容易发现。被原虫感染的紅血球比正常的紅血球比重較輕，因此大多数虫体均分布在涂片末端的边缘或涂片的纓子状线条中。

应当将涂片用一种結实的包装(胶合板箱)在干净的书写紙(不能用滤紙)里分別包起来，由邮局或专人寄給試驗室。在寄出以前应将涂片用下列某一种液体固定之。

干燥涂片的固定 干燥涂片最好用绝对化学純的甲醇固定3分鐘。为此可将涂片放在广口瓶或玻璃缸里，使每两张沒有涂抹的玻面合起来。固定用过的甲醇，如果里面沒有弄脏，并保存于带毛玻璃塞的瓶里，則仍可繼續使用(200毫升甲醇可固定300—400张涂片)。干燥涂片也可用无水酒精、90—95°酒精、以至变性酒精固定5—10分鐘。变性酒精的效果次于精溜酒精。

在涂片的表面可加固定液5—10滴，直到固定液完全蒸发。这样固定时，需将載物片的底面放在支架上，或放在圓形玻璃皿与玻璃缸的边缘，支架用一股胶皮管将两根玻璃管或玻璃棒互相結联成一定的距离做成。

由等量的乙醚和酒精組成的尼柯弗洛夫氏混合液(Смесь

Никфоров) 很少被使用, 因为用这种混和液固定的涂片呈浅白色, 着色欠佳。用此种混合液固定需10分鐘。

扎維新和別洛庫勒(1950)曾提出用pH为6.8—7.0的0.85%食盐溶液配成4%化学純的結晶石炭酸滤过溶液来固定血片(为配制溶液需要pH为6.8—7.0的水)。固定時間5秒鐘。在10—15天内溶液还适于应用, 此后則溶液呈硷性反应, 因此涂片不着色。溶液应当保存在暗的地方。

用鑷子从固定液里取出的涂片, 需在滤紙条上垂直地放置5—10分鐘, 以便干燥, 而后进行染色。

涂片、切片和压片中原虫的染色法

研究和診斷病原性原虫涂片的染色方法很多。每一种方法都有其优点和一些缺点。最好的染色方法介紹如下。最常用而完全符合于侵袭性原虫病病原的显微鏡診斷的是罗曼諾夫斯基氏及其修正的染色法。罗曼諾夫斯基最早确定了美蓝与伊紅溶液的混合液可使瘧原虫的核染成洋紅色。这一发现具有重要的意义, 因而大大地促进了瘧疾和其他原虫病病原的形态学的研究。經過一段時間以后又发现了这种染色的机制, 因而姬姆薩、利什曼、波平格也姆等氏又提出了罗曼諾夫斯基氏修正染色法以及他們自己的染色的方法。

罗曼諾夫斯基氏染色法(Окраска по Романовскому)

此方法系由作者于1891年为瘧原虫的染色而提出的。在按罗曼諾夫斯基氏方法染色时, 現在通常都使用姬姆薩氏染色液来用于血孢子虫及其他病原性原虫的染色。

染色原液的成分 天青II—伊紅或伊紅 B.A. 3克, 天青II 0.8克, 化学純甘油125毫升和化学純的甲醇375毫升。甘油及甲醇应当为中性反应的, 为了天青和伊紅的溶解, 需在

水浴鍋內加熱到 60° 。配好的染色液在24小時以後濾過，在溫箱內充分成熟以後，大約在配制後經過一個月的時間，則它就成為完全適用的染色原液。

染色溶液 在使用前將每滴染色液用1毫升水稀釋。有時要根據染色原液含有的成分及其整個染色液的性質來決定，在1毫升水內染色原液只能加2—3滴，不能再多，因為在濃厚的溶液內染色液生出沉淀，甘油和甲醇過濃時可使染色招致破壞。每染一張涂片需染色溶液4—5毫升。

為了配制出染色性能合乎需要的染色液，必須：

a) 染色液要在使用前直接配制，不得過早。

б) 稀釋染色原液用的蒸餾水要中性或弱酸性反應的，因為微量的礦物酸或有機酸對染色性質具有不良的影響。

в) 只有在反應合乎需要的情況下才可使用經過煮沸和濾過的普通水、雨水和雪水。

г) 稀釋染色原液要始終用同一個器皿(量杯、量筒)，器皿的玻璃要中性反應的，並要保持乾淨，壁上無沉淀物，因為如果不這樣就可能由溶液生出沉淀物。

д) 染色原液的需要量要用專用的刻度量筒測量之，而後在不斷輕輕搖動盛水器皿的情況下將它成滴地加在一定容量的水裡面。因為用力地搖動溶液和一次大量加入原液可使染色液生出沉淀物。

е) 為避免染色溶液招致破壞，宜保存在不受酸鹼氣體影響、陰暗而乾燥的地方，並要避免光綫、炎熱與寒冷。當染色性能降低時要將它在水浴鍋內加熱到 60° ，歷時15分鐘，使之恢復。

染色 原蟲的染色最好將染色液添加在標本的下面，或放在盛有染色液的器皿中，而不是將染色液倒在標本上，否則

它会被溶液中生出的沉淀物弄脏。最好在平底的玻璃皿或直接在干淨的平玻璃上放置一个薄的玻璃条(寬0.5公分),而后将載物片放在玻璃条上,以后倒入染色液。

染色时间为15分鐘到1小时,这要决定于涂片新鮮的程度、涂片固定时间的长短、染色液的性質、以及染色液的温度等。譬如新鮮的标本比陈久的标本着色要好一些而且快一些。未經固定的标本在长期保存时便失去正常着色的能力,自制作涂片日开始,平均經一个月以后便不适于染色。經過固定的涂片而不予染色可保存1—2个月,但这种涂片的染色毕竟是不如新制作的涂片;在使用前最好用固定液重新固定数分鐘。凉的染色液最好加一加热,加热时最好将它涂在标本上或在37°的溫箱内染色。

已經染色的标本要用蒸餾水強力的水流仔細地冲洗,可以把染色液冲掉。从帶管的大瓶内流出的水流必須向着标本的上端。冲洗好的标本要将其短的一边近乎垂直地放在滤紙条上,直到完全干燥为止。凡是在滤紙上存有染色液痕迹的都表明染色液沒有从标本的表面完全洗掉。这样的涂片应当在水里重洗。

染色的评价 染色好而薄的血液涂片呈玫瑰色。紅血球常常染成紅色和玫瑰色(浓染的标本呈蓝色),虫体和白血球的原生質呈蓝色,虫体的核呈紅色,而白血球的核呈紫色,嗜伊紅白血球的顆粒呈紅色。

浓染涂片的脫色 紅血球内的虫体,在深蓝色浓染的涂片中,或用硷性染色液染色的涂片中是很难检查的,因为这种涂片看起来很不清楚。因此必須事先进行标本的脫色。将标本迅速地浸入用冰醋酸酸化的80°酒精或水里面(液体100毫升加冰醋酸2滴)即可实现标本的脫色,然后立即用