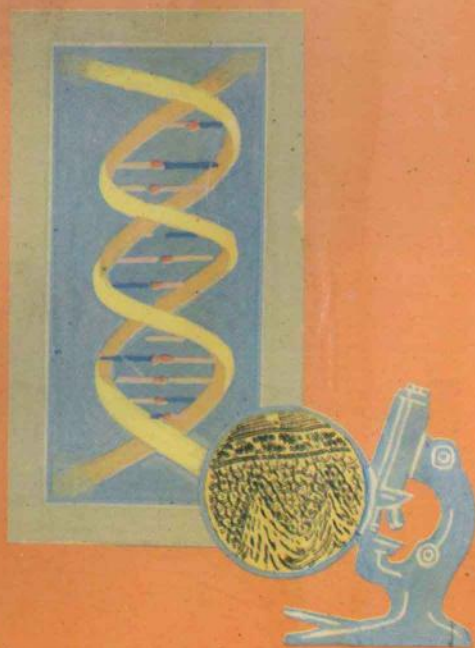


皮肤科实验技术与科研方法

陆前进 主编



成都科技大学出版社

皮肤科实验技术与科研方法

主 编： 陆前进

编著者：（按姓氏笔画顺序）

刘贞富 陈杨宝 吴先林

何云志 陆前进 卿之驹

游学科

成都科技大学出版社

[川]新登字 015 号

责任编辑 靳思源

陈杨宝

封面设计 任森林

皮肤科实验技术与科研方法

陆前进 主编

成都科技大学出版社出版发行

湖南航天长字印刷厂印刷

开本:850×1168 1/32 印张:9.62 字数:25.3千字

1994年12月第一版 1994年12月第一次印刷

印数 1—3000册

ISBN7—5616—2853—6/R.132

定价:11.80元

序言

《皮肤科实验技术与科研方法》一书由于几位作者的努力,终于得以正式出版,值得庆贺,作为一本案头必备工具书,定将对广大皮肤科专业工作者有较大的指导作用和实用价值。

本书不仅清晰地介绍了皮肤科的经典实验技术,而且,作者参阅了国内外文献,并结合自己的实践经验,有选择地,较详细地介绍了一些最新实验技术。此外,本书还较系统地叙述了皮肤科科研工作中的一些基本原则和方法。毫无疑问,本书的撰写和出版对提高皮肤病学、性病学的研究水平,必将起到积极作用。

第三军医大学 教授 刘荣卿
 博士生导师

一九九四年十二月

前言

随着免疫学、细胞生物学、分子生物学、分子遗传学的不断发展,我国的皮肤科学和其他医学学科一样,近年来有了长足的进展。但是,和世界上其他发达国家相比,我国皮肤病、性病的基础理论研究还有差距,很多实验技术和方法也有待于普及和提高。当前,广大皮肤科专业工作者迫切希望进一步提高自己的科研素质和实验技能。同时,也期望有一本内容比较完善实用的皮肤科实验技术和科研方法的工具书。基于此种情况,我们参考了国内外专著和刊物,结合自己粗浅的实践经验编写了本书。

本书重点放在提供详细的实验方法学上,使皮肤科临床医师或实验室工作人员基本上不用参考其它资料即可掌握这些技术。希望此书有助于打开长期以来我国多数皮肤科医师进实验室无从下手的局面,也为皮肤科实验室工作者在进行有关研究时提供直接的参考。

本书最后一章较全面地涉及了皮肤科科研工作中所必需掌握的基本知识和基本技能,对皮肤科科技工作者加强科研基本功训练,掌握科研论文写作知识与方法将会有所裨益。

本书是皮肤科医师、皮肤科研究生、皮肤科实验室技术人员必备的工具书之一。同时,也可作为医院检验科及其他实验室工作者参考。

在编写本书的过程中,得到了湖南省科委有关领导的大力支持和关怀;第三军医大学刘荣卿教授给予热情鼓励和指导,并在百忙中为本书赐序;在书稿的整理过程中,得到湖南中医学院谭兴贵老师的支持和帮助,在此,一并表示深深的谢意。

编写此书时,我们力求系统全面、内容实用、新颖,方法可靠,但由于编者水平有限,谬误之处在所难免。再者,由于执笔者人数较多,实验内容的处理和叙述方式不尽统一。敬希专家及广大读者不吝指教,以便今后补充修正。

编者

一九九四年十二月十七日

目 录

§ 1 皮肤病、性病病原体检查·····	1
§ 1.1 细菌学检查 ·····	1
§ 1.2 病毒学检查 ·····	7
§ 1.3 真菌检查·····	14
§ 1.4 其它病原体检查·····	20
§ 2 皮肤病组织病理检查·····	31
§ 2.1 基本技术·····	31
§ 2.2 皮肤组织学简述·····	51
§ 2.3 皮肤组织学常用术语·····	52
§ 2.4 皮肤病组织病理诊断概述·····	54
§ 2.5 几种皮肤病组织病理及免疫荧光图型·····	65
§ 3 皮肤科免疫学检测技术·····	77
§ 3.1 免疫细胞的检测·····	77
§ 3.2 免疫细胞功能检测·····	82
§ 3.3 免疫分子检测·····	87
§ 3.4 自身抗体检测 ·····	104
§ 3.5 变态反应性疾病特异性诊断方法 ·····	114
§ 4 分子生物学技术在皮肤病、性病研究中的应用·····	122
§ 4.1 概述 ·····	122
§ 4.2 分子生物学基本方法 ·····	122
§ 4.3 分子生物学技术在皮肤病、性病研究中的应用·····	178
§ 5 组织和细胞培养技术在皮肤病、性病研究中的应用·····	196
§ 5.1 组织和细胞培养基本概念 ·····	196
§ 5.2 实验室及实验室装备 ·····	196
§ 5.3 实验室常用的清洗、消毒方法和无菌操作·····	199

§ 5.4	培养用液	200
§ 5.5	取材	217
§ 5.6	细胞培养	218
§ 5.7	细胞冻存和细胞运输	221
§ 5.8	细胞生物学检测	223
§ 5.9	培养细胞的观察	226
§ 5.10	组织和细胞培养技术在皮肤病研究中的应用.....	234
§ 6	实验动物与动物实验在皮肤病、性病研究中的应用.....	242
§ 6.1	实验动物	242
§ 6.2	实验实验	248
§ 6.3	动物疾病模型的复制	260
§ 7	皮肤病、性病临床科研方法.....	269
§ 7.1	怎样查阅和积累医学文献资料	269
§ 7.2	皮肤科临床科研设计	273
§ 7.3	一些常用的最基本的统计学处理方法	281
§ 7.4	如何撰写文献综述和皮肤科科研论文	288
附录	常用试剂的配制.....	295

§ 1 皮肤病、性病病原体检查

§ 1.1 细菌学检查

§ 1.1.1 淋病奈瑟氏菌检查

淋球菌为严格的人体寄生菌，常存在于急、慢性尿道炎与阴道的脓性分泌物及新生儿眼结膜分泌物中，淋病奈瑟氏菌为需氧的革兰氏阴性双球菌，可呈卵圆形或肾形，呈双或短链状排列。淋球菌对消毒剂、防腐剂、润滑剂等非常敏感，因此，在留取标本前不应使用上述药物，男性患者可取尿道脓性渗出物检查，应将棉拭子头部伸入尿道2~4cm，转动并停留几秒钟，然后取出。无症状或渗出物不明显的病人，最好取晨尿，离心后取尿沉渣检查。此外，精液也可作淋球菌检查。宫颈内粘膜是女性生殖道感染的原发部位，也是检出淋球菌可能性最大的部位。取标本前应先棉拭子涂擦宫颈口以除去正常菌群，然后用脱脂棉拭子伸入宫颈内1~2cm，转动并压出宫颈内腺体渗出物并取出。为提高阳性率，可同时从阴道、尿道、尿道旁腺和前庭大腺、肛管取标本。新生儿淋病可取结膜渗出物检查。

1. 直接涂片革兰氏染色检查

将所取标本直接涂于载玻片上，干燥、火焰固定后经革兰氏染色，油镜下镜检。在男性患者中，涂片镜检于细胞内外发现革兰氏阴性双球菌，可诊断为淋病。其敏感性和特异性均 $\geq 90\%$ 。但在女性患者中，由于直接涂片阳性率低，同时在女性生殖道存在有其它杂菌，如灰色奈瑟氏菌、不动杆菌属和摩拉氏菌属。它们在形态上与淋球菌相似，容易产生混淆，因此抹片检查的敏感性仅为40~50%，需要通过培养来确诊。

2. 淋球菌培养

淋球菌的培养对营养的要求很高,需要在培养基内加入腹水、血液或阴囊水肿液。同时因生殖道内存在大量的正常菌群,且某些细菌可抑制淋球菌生长,因此,在培养基内还应加入一些抗菌素,常用的淋球菌培养基种类很多,在此仅介绍一种培养基如下:淋球菌基础培养基 43g/L, 1% 血红蛋白, 10% 的鸡蛋蛋黄液, 万古霉素 3mg/L, 多粘菌素 1000IU/L, 磺胺增效剂 5mg/L 及二性霉素 15mg/L。

标本取出后,立即划线接种于培养基中,于 36℃, 含 7%CO₂, 饱和湿度的培养箱中培养 48 小时。观察挑选可疑菌落。淋病奈瑟氏菌的菌落特点为圆形、光滑、湿润、凸起、无色或灰白色,直径约 0.5~1.0mm。挑取这种可疑菌落,如涂片为革兰氏阴性双球菌,且氧化酶试验阳性,分解葡萄糖产酸不分解麦芽糖,则鉴定为淋病奈瑟氏菌。

3. 抗原检查

(1) 免疫荧光法:

①直接免疫荧光法:采取分泌物标本后,直接涂于载玻片上,完全干燥后,用丙酮固定 10 分钟,取出使丙酮完全挥发,用 2ml 蒸馏水将冻干的荧光标记的抗淋球菌菌毛抗原抗体溶解,加 30μl 抗体,使覆盖整个标本,于室温下,湿盒内孵育 15 分钟,用蒸馏水洗去未结合的抗体,于荧光显微镜下观察。

②间接免疫荧光法:标本采取后,将棉拭子插入 0.5ml 淋球菌转运培养基中保存。临用前将抗原悬液混匀,用一直径为 3mm 的接种环挑取一环悬液涂片,固定后加入 50μl 用 pH7.2 PBS 1:16 稀释的抗淋球菌蛋白 I 的单克隆抗体,覆盖整个标本,于 35℃ 温孵育 30 分钟,取出后于 pH9.0 0.01M 的磷酸盐缓冲液中浸泡 10 分钟,干燥后,加入 50μl 1:500 稀释的荧光标记羊抗鼠 IgG, 35℃ 孵育 30 分钟,载玻片取出后,洗涤干燥,加一滴甘油,放置盖玻片观察。

③荧光斑点法:对于产青霉素酶的淋球菌可用此方法来快速检测。用棉拭子收集男性患者尿道分泌物,将此拭子放进含 50μl

氨苄青霉素底物溶液的 250 μ l 的微型沉淀管中,于 45℃ 水浴保温 10 分钟,然后弃去试子,加 50 μ l 荧光显色溶液,混匀,继续在 45℃ 水浴中保温 10 分钟以上,取 5 μ l 反应混合物滴入 Whatman514 滤纸中,在长波(Long-Wave)紫外线下检查荧光斑点。

氨苄青霉素底物溶液的制备:加 3.49mg/ml 的酸型氨苄青霉素于 25mmol/L pH7.6 的 Tris-Hcl 缓冲液中配制成 pH7.0 的溶液。荧光显色剂的制备:用 0.8mol/L 的酒石酸钠缓冲液加 12% 的甲醛配制成 pH4.5 的溶液。

(2) 酶联免疫法

Danielsson 于 1983 年利用酶联免疫试剂盒(GonozymeTM)直接检测患者炎性分泌物中的淋球菌抗原,具体方法简介如下:用棉试子擦试男性尿道和女性宫颈分泌物,棉试子插入 200 μ l 试剂盒所提供的转运培养液中,将一些处理过的小珠与标本一同孵育,标本中如含有淋球菌,该菌将粘附于小珠上,小珠洗净后,与兔抗淋球菌抗体一同孵育,洗涤,小珠继续于过氧化物酶标记的羊抗兔抗体孵育,洗涤,加入底物邻苯二胺和过氧化氢孵育,阳性标本显示桔黄色的颜色,光吸收值可在波长 492nm 处测量。

(3) 协同凝集试验

金黄色葡萄球菌细胞壁中的 A 蛋白,能与人和多种哺乳动物抗血清中 IgG 的 Fc 段结合,这种结合不仅不影响 IgG 的抗体活性,而且使其 Fab 段暴露于葡萄球菌表面。将抗淋球菌菌毛抗原抗体与 SPA 结合,在电解质存在的条件下抗血清与淋球菌菌毛抗原反应,产生肉眼可见的凝集块。

取 SPA 瓶(10%)加 1ml 蒸馏水,完全溶解后吸入离心管中,并用 pH7.2 的 PBS 将试剂完全洗入离心管内,3000rpm/分离心 30 分钟,弃上清,用 PBS 盐水洗涤一次后,混匀备用,取 1ml 2.5%SPA 菌体试剂悬液加入抗血清 0.2ml,于 37℃ 作用 30 分钟,并不时振摇,3000 转/分离心,弃上清,用 PBS 洗涤二次后恢复原体积备用。将分泌物于 GC 培养基上培养 48 小时后,挑取可疑菌落进行凝集试验。

(4) DNA 探针法

检测淋球菌 DNA 的 2.6MD 结晶质粒片段和合成 β -内酰胺酶的 4.4MD 质粒可用于诊断淋病,首先将患者的炎性分泌物滴在硝酸纤维膜上,经 NaOH 处理,使 DNA 变性,再将膜浸泡在杂交液中,以 ^{32}P 标记的探针进行杂交,然后完成放射自显影,(具体操作参见分子生物学章),此方法的敏感性和特异性均高,并能发现其它快速方法不能鉴定的 β -内酰胺菌株。

§ 1.1.2 麻风杆菌的检查

麻风杆菌属于分枝杆菌属。为抗酸性杆菌,主要侵犯皮肤及周围神经,也可侵犯粘膜及淋巴结,晚期可累及深部组织及内脏器官。麻风杆菌的检查,目前一般实验室常用的仍是形态学检查,本菌细长两端稍尖细,微弯曲,长约 $1\sim 8\mu\text{m}$,宽约 $0.2\sim 0.5\mu\text{m}$ 。在鼻粘膜涂片上常成束或平行排列成木栅状,多半聚积于细胞内,形成所谓“麻风细胞”,亦有散在细胞外的。在结节组织切片中,本菌常在表皮细胞内,形成特殊的“泡沫样细胞”。除基本形态棒状外,尚有短杆状、断裂状、颗粒状等形态。

1. 标本的采集

(1) 鼻粘膜标本:以无菌操作方法采取鼻中隔粘膜或其分泌物涂片,必要时也可在标本采集之前给患者服碘化钾 4g,使其产生药物性鼻卡他。增加鼻粘膜分泌物。

(2) 皮肤标本:除面部病灶外,眶上、颧部、下颌和耳垂处的病灶也可。方法为:以左手拧紧患者皮肤,右手持消毒刀片切开表皮并深达真皮,用消毒刀片切割病灶处真皮部分小块皮肤。也可在患处切 $2\sim 3\text{mm}$ 深的切口,挖取其底部的组织液,涂片染色,每张玻片可涂 $2\sim 4$ 个部位大小在 $5\sim 7\text{mm}$ 左右。

(3) 淋巴结穿刺标本:以无菌手续采取腹股沟淋巴结穿刺液涂片染色。

2. 检验方法

(1) 涂片染色法

固定涂片后可用萁一尼(Ziehl-Neelsen)氏染色法染色。根

据 WHO1980 年的麻风病管理指南要求,抗酸染色要用新过滤的石碳酸复红液(即取 50g/L 的石碳酸 180ml 与 100g/L 的碱性复红乙醇液 20ml 混合而成),染色 20 分钟,轻轻水洗,之后用稀酸—乙醇(盐酸 1ml, 95% 乙醇 66ml 和蒸馏水 33ml)脱色到无色为止(但不可过度,因为麻风杆菌与结核杆菌易于脱色)水洗,然后用美兰液(美兰 0.6g,置于 95%乙醇 60ml 中,再加蒸馏水 140ml 即成)染色 1 分钟,水洗,待干后镜检。

(2) 血清学诊断方法

①ELISA 法:此法可用于麻风病人血清中抗体检测,目前为最常用的方法。从瘤型麻风病人分离出的麻风杆菌感染狨猴后,麻风菌在其肝脏大量繁殖再从其肝脏提取麻风菌,经生理盐水洗涤后加 NaOH 煮沸。测定上清液中蛋白质含量估计麻风菌数目,以 pH8.0 10 mM Tris—HCL 缓冲液配成含蛋白 5 μ g/ml,聚苯乙烯板每孔包被含菌的上清液 50 μ l(相当于 5×10^7 麻风菌)室温过夜,再经 0.25%戊二醛固定 10 分钟后,用 PBS 洗涤,用 5%(g/L)牛血清白蛋白封闭,该法用全麻风菌作抗原,被检血清通过事先吸收而获得与麻风菌产生特异性反应。

②凝胶扩散酶联免疫吸附试验:这是一种新的免疫学方法,其测定简单,不需要特殊仪器,特异性高,具有 ELISA 法的优点,且比常规 ELISA 敏感,它将有可能成为麻风病血清学试验的首选方法。具体操作如下:聚苯乙烯佩特里(Petri)细菌培养皿(60 $\times$ 15mm)经乙醇洗净干燥后,加新糖结合物(1mlpH9.6 碳酸盐缓冲液含 3.6—二甲基咪唑葡萄糖相当于 1.5mg 葡萄糖)于培养皿中,37 $^{\circ}$ C 温育 1~2 小时。以 pH7.4PBS 洗涤。加满 1%BSA PBS 中止未反应点,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟,倾出后加 1%琼脂(0.1%BSA PBS 配制)6ml,打孔(孔径为 3mm),此培养皿可在室温中保持稳定 3 个星期,再将待检血清 10 μ l 加入孔中。室温孵育 24 小时,除去琼脂和血清后,经 PBS 洗 4 次,随后加入 4ml 过氧化物酶结合抗人 IgM(用 PBS 1:1000 稀释,含 20%正常羊血清),37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时倾出后洗涤 4 次,最后加 1%琼脂糖(用 pH6.8 PBS—EDTA

缓冲液配制,含 5-氨基水杨酸底物 1mg/L 和 0.01% H_2O_2) 6ml,再室温避光孵育 20 分钟后,用园规测定棕黑色反应圈直径,直径大小与血清中抗体成正比。麻风病血清学检查方法还有放射免疫法,但由于有放射性危害,已被 ELISA 法代替。此外聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)也已用于麻风病血清学诊断研究。

(3) 分子生物学检查

重组 DNA 技术的进展使分子生物学研究发生了革命化的改变,麻风杆菌基因文库的构建是麻风杆菌分子遗传学研究的重要里程碑,同种麻风杆菌抗原已能在体外表达,它们的基因也已被测序。为麻风杆菌的分子生物学检查提供了可靠的基础。

用编码蛋白抗原基因为基础的探针如下:用麻风杆菌 28KD, 65KD 和 70KD 蛋白的 DNA 探针分析 *EcoR* I, *Pst* I 和 *Pvu* I 消化的麻风杆菌 DNA;以核糖体 RNA 为基础的探针,用重组 2.2Kb 的麻风杆菌 DNA 插入片段为探针,对麻风杆菌 DNA 进行限制性片段长度多态性的分析是检查麻风杆菌的一个飞跃。此外,PCR 也已用于麻风杆菌的检查,已见到针对 36KD 18KD 65KD 蛋白基因的引物为基础的少数 PCR 方法的文献。(详情请参阅分子生物学技术有关章节)

§ 1.1.3 杜克雷嗜血杆菌检查

本菌为软性下疳的病原菌,菌形短小,约 $1\sim 1.5\times 0.5\mu m$,常单独存在,亦有呈短链或成堆,菌体两端着色较深,生长需要 X 因子,不需要 V 因子。在血琼脂平板上,可形成灰白色、圆形、凸起、边齐、有狭窄溶血环的闪光菌落,可分解葡萄糖产酸。硝酸盐还原酶试验典型阳性。

培养杜克雷嗜血杆菌的最佳培养基是 GC-HgS 和 MH-HB,两者联合使用可使检出率达到最高。为了便于使用可将两者倾入一个平皿内,在这两种培养基平皿中,24 小时后菌落大小如针尖,48 小时后,增加到 $1\sim 2mm$ 。它呈粘液状,凸起、致密、细粒状,颜色为黄褐色,黄色或灰色。

附:GC-HgS 培养基成份:

淋球菌基础培养基	43g/L
牛血红蛋白	2%
胎牛血清	5%
盐酸万古霉素	2.04 μ mol/L
	(2.04 μ mol/L=3mg/L)

MH-HB 培养基:

牛肉浸液	600ml
酪蛋白酸水解物	17.5g
淀粉	1.5g
琼脂	17g
蒸馏水	400ml
巧克力化的马血	5%
万古霉素	2.04 μ mol/L

§ 1.2 病毒学检查

§ 1.2.1 单纯疱疹病毒检查

单纯疱疹病毒(Herpes simplex virus)是有包膜的中等大小的DNA病毒,单纯疱疹病毒有二个血清型,即I型(HSV-1)和II型(HSV-2)。HSV-1主要引起生殖器以外的皮肤、粘膜和器官感染,HSV-2主要引起生殖器及腰以下的皮肤疱疹。

1. 病毒分离:

HSV可以在多种动物细胞中增殖,其中包括乳地鼠肾细胞(BHK)。非洲绿猴肾细胞(Vero),人胚肺细胞(HEL),原代兔肾细胞(PRK),恒河猴胎肾细胞(FRHK),人胎包皮细胞(HFF),人肺癌细胞(A549),人新生儿肾细胞(HNK)等,采取患者水泡中的内容物或渗出物,直接接种于细胞上,根据细胞的病变及代谢改变。判定病毒是否在细胞内增殖,通过中和试验来达到检查HSV的目的。

2. 抗原检查

(1) 免疫酶方法

将特异性的抗 HSV 抗血清包被于 96 孔反应板上,经 4℃ 过夜,洗涤后加入分泌物或细胞培养液,作用 1 小时于 37℃,洗涤后加入过氧化物酶标记的二抗,37℃ 作用 1 小时,加入底物,于 492nm 处测定其光吸收值。根据阳性对照和阴性对照的光吸收值,确定标本阳性或阴性。

(2) 协同凝集

用棉拭子取疑似 HSV 感染的临床病人标本,立即放入培养液中培养后将培养液滴在载玻片上,离心,室温干燥后,再用戊二醛固定,检测程序是在玻片沉积的细胞上先加特异性抗 I 型和 II 型的 HSV 兔血清,经孵育冲洗后,再加富含 SPA 的葡萄球菌菌悬液,再经孵育冲洗后,最后用显微镜观察细胞表面粘附葡萄球菌者为病毒阳性,不粘附者为阴性。

(3) DNA 检查

Kimura 等将 PCR 用于 HSV 的检测和分型,他们设计了三种引物,一种来自 HSV-1 和 HSV-2 共有的 DNA 序列。经进行 PCR 后,HSV-1 和 HSV-2 分别产生了各自所特有的 469 和 391 个碱基对的产物,借此不同的分子量可对 HSV 进行分型和鉴定。(详情请参阅分子生物学技术有关章节)

3. 抗体检测

所有用于抗原的免疫学方法经适当改良后,均可用于检测抗体,目前在 HSV 特异性抗体的检测中主要有 IgG IgM 和 IgA 三种,这里仅简要介绍一下三类抗体的临床意义。

IgG 抗体:主要用于 HSV 诊断中,单份血清 IgG 水平表示自然免疫状况,在我国 HSV-IgG 阳性率达 90% 以上,只有特定部位如 CSF 中 $>1:80$,或神经鞘内 HSV-IgG 阳性才有提示感染的意义。双份血清中 IgG 滴度有 4 倍以上升高者或血/CSF 比值在 20~40:1,才能诊断 HSV 近期感染。

IgM 抗体:HSV-IgM 作为 HSV 感染指标,特别是脑部感染

具有一定的临床意义 HSV-IgM 出现在临床症状发作后第 3 天直到 4 周,初次感染者 100%阳性,再次感染者 48%阳性,虽然 IgM 抗体常作为许多传染病的早期诊断指标,但在 HSV 感染中由于 HSV 反复感染均可引起 IgM 出现,影响了作为初次早期诊断的意义。

IgA 抗体:HSV-IgA 是一种与局部免疫有关的抗体,sIgA 在 HSV 感染初次症状出现后第 3~5 天的泪液中达到高峰,在女性生殖器疱疹病毒感染血清中,初次感染是 11S 的 HSV-IgA 为主,再次感染则以 7S 为主。HSV-Ab 检测侧重机体对 HSV 的免疫状况,间接推测 HSV 的感染状况,更多反映的是临床症状与 HSV 的检查。

§ 1.2.2 人类乳头瘤病毒检查

人类乳头瘤病毒(Human papillomavirus)可引起人类皮肤粘膜多种增殖性损害,其中发生于肛周生殖器部位的尖锐湿疣近年来成倍的增加。乳头瘤病毒广泛存在于自然界,可感染鸟及人等许多脊椎动物,HPV 核酸由双链环状 DNA 链组成,约 8000 个碱基对,分子量为 5×10^6 道尔顿,电镜下呈球型具有 20 面立体对称性,外壳有 72 个壳微粒组成,直径约 $50\mu\text{m}$,为最小的 DNA 病毒。该病毒不能用血清学方法进行分型,只能通过分子杂交方法分型。已证实 HPV 有 57 个不同型。并预计有更多的新型出现。目前 HPV 的体外培养尚未成功,故其检查主要通过抗原检查。

1. Southern 分子杂交法:首先提取组织中病毒 DNA,经 DNA 限制性内切酶消化后,置凝胶电泳,根据其核酸片段的大小,将同样大的片段在凝胶上成带,用化学或物理的方法使其变性解链成单股,然后将分带后的 DNA 转移到硝酸纤维素膜或尼龙膜上,再加标记的 DNA 探针进行杂交,结束后,漂洗,用放射自显影法显色。Southern 分子杂交法有较高的敏感性,并可对 HPV 进行分型,但不能对 HPV 感染的组织学进行定位,不能分析阳性反应的确切组织来源。

2. DNA 探针原位杂交法:目前多用福尔马林固定的石蜡切

片,组织脱蜡后,置含蛋白酶的消化液中处理,使靶细胞 DNA 易于杂交,加酶标或同位素标记的 DNA 探针于处理后的切片上,加热使靶细胞 DNA 变性解链,然后置温育,进行杂交,结束后,洗掉未结合探针,加酶底物或放射自显影方法显色,阳性反应多位于鳞状细胞浅层,包括伴有角化不全的角质层、颗粒细胞层及棘细胞层。阳性细胞少则数个,多则达整个上皮浅层着色,可呈散在、灶状及片状分布,该法敏感性比免疫组化高,能对感染有明确的组织定位,同时该法省时,标本需要量少,也可对 HPV 进行分型。

3. RNA 探针原位杂交法:此方法类似 DNA 探针原位杂交法,但组织标本不需加热,这样探针只与组织中相应的 mRNA 结合。而不与 DNA 结合,杂交完毕,冲洗,放射自显影法显色。阳性反应为局限于组织浆和细胞核中聚集的银颗粒。(详情请参阅分子生物学技术有关章节)

4. 免疫组化方法:目前用于检测 HPV 抗原的抗体主要由乳头瘤病毒 I 型及跖疣组织中提取的 HPV 免疫动物后产生的多克隆抗体,因乳头瘤病毒属具有共同抗原。其间存在着广泛的交叉反应,因此该抗体可以用于检测各种乳头瘤病毒引起的损害。目前多用福尔马林固定的石蜡切片,组织脱蜡后按顺序加第一抗体及酶标试剂,酶底物显色,苏木素复染,明胶封片。阳性结果为细胞核内出现棕褐色颗粒状沉着,阳性反应细胞均出现在空泡化细胞内,主要分布于鳞状上皮浅层及角化不全的角质层内,数目多少不一,分布不均。

§ 1.2.3 巨细胞病毒检查

巨细胞病毒(Cytomegalovirus)是巨细胞包涵体病的病原体。它同单纯疱疹病毒一样,是中等大小有包膜的 DNA 病毒,它可引起典型的细胞增大故称为巨细胞病毒。

1. 直接镜检

从尿、唾液的离心沉淀物和活检标本脱落细胞中,直接镜检发现含有嗜酸性核内包涵体的巨细胞可作为诊断依据。

2. 病毒培养