



普通高等学校“十四五”规划医学检验技术专业特色教材

供医学检验技术等专业使用

# 临床寄生虫学检验技术 实验指导

曾涛 孙雪文 ◆ 主编

LINCHUANG

JISHENGCHONGXUE

JIANYANJISHU SHIYAN ZHIDAO



华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>

## 内 容 简 介

本书是普通高等学校“十四五”规划医学检验技术专业特色教材。

本书介绍实验总则、常用寄生虫学实验室检验技术(包括寄生虫标本采集、保存和鉴定,病原学检查技术,免疫学检验技术,分子生物学检验技术)、寄生虫形态学观察内容。本书还在每种虫体的形态学观察之前介绍寄生虫生活史与要点,在每个寄生虫检验实验结束后安排作业与思考题。

本书供普通高等学校医学检验技术等专业使用。

### 图书在版编目(CIP)数据

临床寄生虫学检验技术实验指导/曾涛,孙雪文主编. —武汉:华中科技大学出版社, 2021. 4  
ISBN 978-7-5680-7044-7

I. ①临… II. ①曾… ②孙… III. ①寄生虫病-医学检验-实验-医学院校-教材 IV. ①R530.4-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2021)第 058894 号

临床寄生虫学检验技术实验指导

曾 涛 孙雪文 主编

Linchuang Jishengchongxue Jianyan Jishu Shiyao Zhidao

策划编辑:余 雯

责任编辑:孙基寿

封面设计:原色设计

责任校对:阮 敏

责任监印:周治超

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉) 电话:(027)81321913

武汉市东湖新技术开发区华工科技园 邮编:430223

录 排:华中科技大学惠友文印中心

印 刷:武汉市洪林印务有限公司

开 本:889mm×1194mm 1/16

印 张:8

字 数:236千字

版 次:2021年4月第1版第1次印刷

定 价:32.00元



本书若有印装质量问题,请向出版社营销中心调换  
全国免费服务热线:400-6679-118 竭诚为您服务  
版权所有 侵权必究

# 普通高等学校“十四五”规划医学检验技术专业特色教材建设指导委员会

主任委员 徐克前 康熙雄

副主任委员 岳保红 龚道元 周芙玲 王小林 赵建宏 贾天军 李玉云

编委(按姓氏笔画排序)

王小林	北京大学医学部	岳保红	郑州大学
王俊利	右江民族医学院	周芙玲	武汉大学
权志博	陕西中医药大学	郑文芝	海南医学院
吕厚东	济宁医学院	赵建宏	河北医科大学
任伟宏	河南中医药大学	胡志坚	九江学院
伊正君	潍坊医学院	袁忠海	吉林医药学院
闫海润	牡丹江医学院	贾天军	河北北方学院
纪爱芳	长治医学院	徐霞	广州医科大学
李玉云	蚌埠医学院	徐广贤	宁夏医科大学
李树平	湖南医药学院	徐克前	中南大学湘雅医学院
余蓉	成都中医药大学	徐菲莉	新疆医科大学
张式鸿	中山大学	高荣升	佳木斯大学
张红艳	河北工程大学	陶华林	西南医科大学
陈大鹏	重庆医科大学	黄泽智	邵阳学院
林东红	福建医科大学	龚道元	佛山科学技术学院
欧阳丹明	湘南学院	康熙雄	首都医科大学

# 总 序

ZONGXU

近年来,随着科学技术的进步、大量先进仪器和技术的采用,医学检验得到飞速的发展。各种新的检验技术不断涌现,对临床疾病的诊疗越来越重要,作用越来越突出,为人类疾病的诊断、治疗监测、预后判断提供大量新的实验室监测指标。据统计,临床实验室提供的医学检验信息占患者全部诊疗信息的60%以上,医学检验已成为医疗的重要组成部分,被称为临床医学中的“侦察兵”。

《国家中长期教育改革和发展规划纲要(2010—2020年)》《国家中长期人才发展规划纲要(2010—2020年)》要求全面提高高等教育水平和人才培养质量,以更好地满足我国经济社会发展和创新型国家建设的需要。根据《教育部关于进一步深化本科教学改革 全面提高教学质量的若干意见》,在教材建设过程中,教育部鼓励编写、出版适应不同类型高等学校教学需要的不同风格和特色的教材;积极推进高等学校与行业合作编写教材;鼓励编写和出版不同载体和不同形式的教材,包括纸质教材和数字化教材。2012年教育部制定的新本科专业目录中,将医学检验专业更名为医学检验技术专业,学制由五年改为四年。

为了更好地适应医学检验技术专业的教学发展和需求,体现最新的教学理念和特色,在认真、广泛调研的基础上,在医学检验技术专业教学指导委员会相关领导和专家的指导和支持下,华中科技大学出版社组织了全国40多所医药院校的200多位老师参加了本套教材的编写。本套教材由国家级重点学科的教学团队引领,副教授及以上职称的老师占80%,教龄在20年以上的老师占72%。教材编写过程中,全体参编人员进行了充分的研讨,各参编单位高度重视并大力支持教材的编写工作,各主编及参编人员付出了辛勤的劳动,确保了本套教材的编写质量。

本套教材着重突出以下特点:

(1) 教材定位准确,体现最新教学理念,反映最新教学成果。紧密联系最新的教学大纲和临床实践,注重基础理论和临床实践相结合,体现高素质复合型人才培养的要求。

(2) 适应新世纪医学教育模式的要求,注重学生的临床实践技能、初步科研能力和创新能力的培养。突出实用性和针对性,以临床应用为导向,同时反映相关学科的前沿知识和发展趋势。

(3) 以问题为导向,导入临床案例。通过案例与提问激发学生学习的热情,以学生为中心,以利于学生主动学习。

(4) 纸质与数字融合发展。全套教材采用全新编写模式,以扫描二维码形式帮助老师及学生在移动终端共享优质配套网络资源,通过使用华中科技大学出版社数字化教学资源平台将移动互联、网络增值、慕课等新的教学理念和学习方式融入教材建设中,开发多媒体教材、数字化教材等新媒体教材形式。

本套教材得到了教育部高等学校医学技术类教学指导委员会和中国医师协会检验医师分会相关领导和专家,以及各院校的大力支持与高度关注,我们衷心希望这套教材能为高等医药院校医学检验技术专业教学及人才培养做出应有的贡献。我们也相信这套教材在使用过程中,通过教学实践的检验和实际问题的解决,能不断得到改进、完善和提高。

普通高等学校“十四五”规划医学检验技术专业特色教材  
建设指导委员会

# 前 言

QIANYAN

随着社会的发展、医学的进步及环境卫生的改善,人群中寄生虫感染率明显下降,但一些危害性大的寄生虫病对人群的威胁依然存在。近年来,一些食源性寄生虫病疫情不断增加,机会性寄生虫病发生率也有上升迹象,寄生虫病的防治任务仍十分艰巨。临床寄生虫学检验技术在寄生虫病的早期与准确诊断中发挥越来越重要的作用。因此,培养一批具备扎实的寄生虫学检验理论知识和实践技能的医学检验技术专业人才尤为迫切。

临床寄生虫学检验技术课程是医学检验技术专业的主干课程之一,实践性较强,因此其实验教学在该课程教学中一直占有重要的地位。本书首先简单地介绍了实验总则,接着在第二章系统地介绍了常用寄生虫学实验室检验技术(包括寄生虫标本采集、保存和鉴定,病原学检查技术,免疫学检验技术、分子生物学检验技术),然后在第三章详细阐述了各种寄生虫形态学观察内容,希望通过由总论到各论的内容编排让学生的学习思路更加清晰。我们还在每种虫体的形态学观察之前介绍了寄生虫生活史与要点,便于学生在短时间内对该寄生虫有一个全面的回顾与理解。本书还在每个寄生虫检验实验结束后安排作业与思考题,以引导学生复习与思考。

本书邀请了一些高校检验专家与临床检验一线专业技术人员参与编写,经全体编写人员的共同努力及多次审阅修改后定稿,但由于水平、经验和时间有限,不足之处在所难免,敬请广大师生批评指正。

编 者

# 目 录

MULU

第一章 实验总则	/1
第二章 常用寄生虫学实验室检验技术	/4
第一节 寄生虫标本采集、保存和鉴定	/4
第二节 病原学检查技术	/7
第三节 免疫学检验技术	/28
第四节 分子生物学检验技术	/44
第三章 寄生虫形态学观察内容	/47
第一节 医学原虫	/47
第二节 医学线虫	/62
第三节 猪巨吻棘头虫	/76
第四节 医学吸虫	/77
第五节 医学绦虫	/86
第六节 医学节肢动物	/99
参考文献	/110
彩图	/111

# 第一章 实验总则

人体寄生虫学检验实验教学是临床寄生虫学检验技术教学的重要组成部分。通过标本观察、实验操作、实验报告完成,加深学生对课堂上所学理论知识的理解,使学生能够理论联系实际,掌握常见寄生虫病的病原学检查方法,熟悉常用的免疫学与分子生物学诊断新技术,同时培养较强的动手能力、独立思考能力与实践应用能力,以利于他们成长为具有综合性素质的合格人才,为将来从事临床检验工作打下坚实的基础。

## 一、实验室守则

实验室是学生进行实验的重要场所,而且寄生虫学检验相关实验涉及生物安全、仪器使用等问题。因此,在实验教学过程中,学生必须有严谨的学风、严明的纪律,严格遵守实验室的有关规章制度,以保护人身安全与仪器正常使用,提高实验效果与教学质量。

(1) 学生必须接受实验室生物安全防护知识教育,充分认识到实验室存在高危因素,掌握正确的自我防护措施。

(2) 必须严格遵守实验室上课纪律,不得迟到、早退或无故缺席,有病或有事应向任课教师请假。

(3) 进入实验室,必须穿实验工作服,带实验指导、实验报告本、绘图铅笔、橡皮等;保持专注与肃静,保证实验室的良好秩序。

(4) 要爱护公物,爱惜仪器设备和标本,节约实验试剂、耗材与水电。对于精密贵重仪器要细心取放及使用。实验前,要检查显微镜是否完好,用后将显微镜擦拭干净。如有损坏,及时报告指导教师。

(5) 实验时,应根据实验指导与教师要求,循序渐进,细心观察和操作,认真做好实验记录,分析实验结果,按时完成实验报告。不得随意移动示教标本及标签,以免影响其他同学观察。

(6) 高度重视生物安全,所有具潜在危险性的病原寄生虫相关实验都要求在Ⅱ级生物安全实验室操作。在进行具有感染性或污染性的实验操作时,要严格遵守实验室管理制度和实验操作规程,保持实验室的洁净和废弃物的无害化处理;实验完毕后,要妥善处理标本、器材。

(7) 实验结束后,实验台应整理清洁,用过的物品归还原处(如染色液、香柏油等);值日生应认真将实验室打扫干净,关好门、窗、水、电后方可离开实验室。

## 二、普通光学显微镜的使用及维护

### (一) 普通光学显微镜的使用

取出显微镜时,右手握紧镜臂,左手托住底盘,将显微镜放置于实验台的前方偏左侧,以镜座的后端离实验台边缘6~10 cm为宜,以免显微镜翻倒落地;不要单手斜提或前后摆动,以防镜头或其他零件滑落。首先检查显微镜的各部件是否完整和正常,如发现有损坏或性能不良者,应立即报告。

#### 1. 低倍镜的使用

(1) 采光:打开显微镜电源开关,转动粗调螺旋,将载物台略下降(或镜筒略升高),使物镜与载物台距离略拉开。再旋转物镜转换器,将低倍镜对准载物台中央的通光孔(可听到“咔嗒”声)。打开光圈,上升聚光器,双眼向目镜内观察,同时调节反光镜的方向(电光源显微镜无反光镜,应调节亮度旋钮),直到视野内光线均匀、亮度适中。一般用凹面镜对光。

(2) 放置玻片标本片:将玻片标本放在载物台上,有盖玻片或有标本的一面向上,用标本移动器上的弹簧夹固定好,然后通过转动标本移动器的螺旋,把要观察的标本部分转移到通光孔的正中央。



NOTE

(3) 调节焦距:从显微镜侧面注视物镜镜头,同时旋转粗调调节器,使载物台缓慢上升(或镜筒下降),当低倍镜与玻片间的距离为 0.5 cm 时,再从目镜里观察视野,左手慢慢转动粗调旋钮,使载物台缓慢下降(或镜筒缓慢上升),直至视野中出现物镜为止。如物像不太清晰,可转动细调旋钮,使物镜更加清晰。如果需要观察的物像不在视野中央,甚至不在视野内,可用标本移动器前后、左右移动标本的位置,使物像进入视野中央。

**2. 高倍镜的使用** 依照上述操作步骤,先用低倍镜找到需观察的清晰物像,并将其移至视野的中央,同时调准焦距,使被观察的物像更清晰。眼睛从侧面注视,转换高倍镜,直接使高倍镜对准通光孔。眼睛向目镜内观察,同时,微微上下转动细调旋钮,直至视野内物像清晰。

**3. 油镜的使用** 先按照从低倍镜到高倍镜的操作步骤,找到标本的清晰物像,把要放大观察的部分移到视野中央。将高倍镜移开,往玻片标本上需观察的部位(载玻片的正面,相当于通光孔的位置)滴一滴香柏油,然后在眼睛的注视下,轻轻转换油镜头并浸于油滴中。聚光器上升到最高处,光圈适当调大。缓缓来回调动细调旋钮,即可看清物像。

油镜使用完毕后,必须及时将镜头上的油擦拭干净。先使载物台下降(或使物镜上升)约 1 cm,将物镜转离通光孔,先用干擦镜纸擦拭一次,把大部分的油去掉,再用沾有二甲苯(或乙醚 7:乙醇 3 混合液)的擦镜纸擦一次,最后再用干擦镜纸擦一次。加盖片的玻片标本上的油也可用该方法擦拭干净。无盖片的玻片标本,可用拉纸法擦油,即先把一张擦镜纸盖在油滴上,再往纸上滴几滴擦镜油,趁湿将纸往外拉,如此反复几次即可擦拭干净。

## (二) 显微镜使用的注意事项及维护

(1) 使用时要严格按步骤操作,熟悉显微镜各部件性能,掌握粗、细调焦旋钮的转动方向与载物台或物镜的关系。粗、细调焦旋钮要配合使用,细调焦旋钮不能单方向过度旋转。

(2) 在使用镜筒直立式显微镜时,镜筒倾斜的角度不能超过 45°,以免重心后移使显微镜倾斜。观察带有液体的临时标本时,显微镜不能倾斜,以免液体污染镜头和显微镜。

(3) 调光开关应从小到大调节光的强度,应同时调节聚光镜,达到合适的光强度,避免光源长时间处于最大强度,缩短使用寿命。使用结束前,要把光亮度调到最小位置。

(4) 在利用显微镜观察标本时,要养成两眼同时睁开,双手可用(左手操纵调焦旋钮,右边操纵标本移动器)的习惯,必要时应一边观察一边计数或绘图记录。

(5) 在使用高倍镜或油镜时,不要一边在目镜中观察,一边下降镜筒(或上升载台),以避免镜头与玻片相撞,损坏镜头或玻片标本。

(6) 禁止随意拆卸目镜、物镜和聚光器等零件,以免发生丢失损坏或使灰尘落入镜内。

(7) 显微镜的光学部件不可用手指、纱布、手帕或其他粗糙物品擦拭,以免磨损镜面。需要时只能用擦镜纸擦拭。机械部分可用纱布等擦拭。

(8) 显微镜使用完毕后应及时复原。先降低载物台(或升高镜筒),取下玻片标本,使物镜转离通光孔。然后上升载物台(或降低镜筒),使物镜与载物台相接近。垂直反光镜,降低聚光器,关小光圈,最后放回镜箱中。

## 三、寄生虫标本的类别及观察方法

寄生虫标本一般分为玻片标本、小瓶装标本、针插标本、活体标本、大体(病理)标本五类,应注意采用不同的观察方法进行观察学习。

### (一) 玻片标本

玻片标本是指将病原体封存于载玻片和盖玻片之间制成的标本,包括封片标本和染色标本。这些标本是将体积较小的寄生虫卵、幼虫、成虫、原虫或组织等分别采用不同方法制作、封装而成,有利于长期保存并便于在显微镜或解剖镜下观察,是实验教学中常见的标本。

应先注意玻片标本内封装的标本内容与标本正反面。对于较大的虫体,须用放大镜或解剖镜进行观察。如需使用显微镜观察,应先在低倍镜下找到观察物像,并将其移至视野中,然后依次转

换高倍镜或油镜下进行详细的观察。原虫标本很小,需要在油镜下观察才能辨清其形态结构。

由于不同种类寄生虫标本厚薄和染色深浅有所不同,虫体大小亦不同,在观察这些玻片标本时,应随时注意调节显微镜的光线和不同的放大倍数,以求能清晰观察每一种标本的外部形态和内部结构。观察显微镜下标本时,一般采用标本顺序观察法进行观察,以避免遗漏及保证观察结果的准确性。

## (二) 小瓶装标本

为封装小型虫体、部分虫体或中间宿主等。这些标本观察时,要注意虫体大小、形状和颜色等,应与活体寄生虫标本相比较。

## (三) 针插标本

一般为医学昆虫标本,经干燥防腐处理后制成,装在透明玻璃管中或平皿中,用肉眼或放大镜观察,了解这些昆虫的外部形态、颜色、大小、结构特征等。

## (四) 活体标本

为实验室保存的活体寄生虫标本。须注意在活体状态下,寄生虫虫体形态、大小、染色和运动状态等,应与小瓶装死亡固定以后的标本相比较。

## (五) 大体(病理)标本

将体积较大的寄生虫成虫或幼虫、中间宿主、引起病变的组织器官用70%乙醇或5%~10%甲醛溶液固定后,用合适的液体保存于大小适当的玻璃瓶或有机玻璃瓶内,封闭瓶口,贴上标签即可完成制作。这些标本可用肉眼或放大镜进行观察。观察时,要注意其形态、大小及结构特征,确定寄生虫种类、发育阶段,结合其致病与诊断达到系统掌握。如果是大体病理标本,应首先辨认脏器、组织,再联系致病机制,掌握其病理改变的特征,并且与其他寄生虫所致疾病进行鉴别。

# 四、实验报告与寄生虫绘图方法

学生应按时、按要求完成实验报告。实验报告的内容要完整,其中寄生虫形态观察往往要进行绘图;技能操作实验报告应包括实验原理、实验试剂与器材、操作步骤、结果判断、讨论等内容。教师通过批阅实验报告,及时了解学生的学习情况。

在实验课进行寄生虫标本的生物学绘图是帮助学生加强记忆、准确掌握寄生虫形态结构的有效手段,同时,也是培养学生观察力和促使学生端正学习态度的过程,是寄生虫检验实验课基本技能训练的内容之一。有关绘图,具体要求如下。

**1. 科学性和准确性** 绘图前必须认真观察标本,多观察几个视野,学习与之有关的文字描述,正确理解、掌握各部分的形态特征,然后选出特征典型的绘图对象,以保证形态结构的准确性。

**2. 点、线要清晰流畅** 绘图通常用HB铅笔和2B铅笔,部分染色标本可用彩色笔。线条要一笔画出,粗细均匀,光滑清晰,接头处无分叉和重线条痕迹,切忌重复描绘。点要圆且大小均匀,根据需要灵活掌握疏密变化,暗的地方点密集,明亮的地方点稀疏。不能用涂抹阴影的方法代替圆点,不能将点画成小线段。

**3. 比例要正确** 要按虫体各部分构造的实际比例绘出,同一张绘图纸上绘多个形态时,还要注意各形态之间的大小比例,要注明放大的倍数。

**4. 图纸及版面要保持整洁** 图纸及版面要力求整洁,铅笔要保持尖锐,尽量少用橡皮擦。

**5. 准确标注** 图注一律用正楷字书写,应尽量详细,并要求用水平的直线引出,间隔要均匀,且一般向右边引出。图注部分接近时可用折线,但注意图线之间不能交叉,图注要尽量排列整齐。作为实验报告,图及图注要求用铅笔,不要用钢笔、有色水笔或圆珠笔。实验题目写在绘图报告纸的上方,图题、放大倍数、染色方法及日期写在图的下方。



## 第二章 常用寄生虫学实验室检验技术



### 第一节 寄生虫标本采集、保存和鉴定

#### 一、常用固定液及染色液的配制

固定就是使新鲜虫体在短时间内迅速死亡,保持虫体原有的特征,且标本的形态结构和成分不会损伤和改变;还可沉淀和凝固虫体细胞内蛋白质、脂肪、糖和各种酶,防止细胞自溶和腐败,使之染色后更易于辨认。因此,寄生虫标本采到后,根据标本的种类、检验和制作的目 的尽快固定,被固定的标本越新鲜越好。

标本固定的方法分为物理法和化学法。物理法是指用加热、冰冻或干燥的方法固定标本。化学法是指用化学试剂配成溶液来固定标本,这些溶液称为固定液或固定剂,可将标本浸于固定液内固定。

##### (一) 常用固定液

###### 1. 单纯固定液

(1) 甲醛(formaldehyde) 常温下是一种无色气体,具有强烈的刺激性气味,35%~40%的甲醛水溶液称为福尔马林(Formalin),此液杀菌力强,可保存大块组织和大型虫体使其不腐烂;渗透力强,固定组织均匀,有硬化标本的性能。缺点是用福尔马林浸渍时间较长久的标本,可影响细胞核染色效果。因此,若标本用作染色用,固定后则必须再用流水冲洗,然后置于70%的乙醇中保存。

常用浓度为5%~10%的甲醛溶液进行固定和保存标本,配制时可将本液浓度(40%甲醛)按百分之百计算,如配制5%甲醛溶液,取5 mL福尔马林加95 mL水即可,配制10%甲醛溶液,取10 mL福尔马林加90 mL水,依此类推;配制时可用自来水或生理盐水。小型的虫体标本用此液一般数小时即可固定好,大型虫体和大块组织则需要1~2天。

(2) 乙醇(ethanol) 又称为酒精,是无色液体,渗透力强,具有固定、保存和硬化标本的作用。其缺点是可吸收水分,使标本收缩变硬,因此较难渗入组织深部,不宜用于固定大型虫体和大块组织。固定虫体一般用70%乙醇溶液,固定时间为24 h。因乙醇可逐渐氧化为乙酸,所以保存的标本每两年需换液一次,如在乙醇中加入5%或等量甘油,则可用于永久保存标本。

(3) 甲醇(methanol) 又名木醇,是一种无色液体,易燃、有毒,其固定性能与乙醇类似,主要用于固定血液和骨髓穿刺液涂片标本,固定时间为1~3 min,固定后不需要水洗即可进行染色。

(4) 升汞(mercuric chloride) 又称氯化汞,为白色粉末状或结晶,有剧毒和腐蚀性,使用时应特别注意切勿与金属器械接触,以免与金属发生化学反应。升汞渗透力强,能充分固定细胞核和细胞质,对蛋白质具有极大的沉淀性能,能使虫体组织收缩,因此常与冰醋酸混合使用。常用的浓度为5%水溶液,固定时间一般为1.5~6 h,标本经此液固定后,内部可产生一种沉淀,须用0.5%碘酒浸泡,使其变成碘化汞后,再保存至70%乙醇溶液中,以除去沉淀。

(5) 冰醋酸(glacial acetic acid) 一种无色液体,酸味强,其浓度在99.5%以上,当气温降至16.7℃以下时,则成无色结晶,在冬季使用时需要加温溶解。渗透力强,用于固定标本的浓度为0.3%~5%,可沉淀核蛋白,对染色质的固定效果良好,一般固定时间为1 h,但对组织有膨胀作用,通常不单独使用,多与乙醇、福尔马林、升汞等固定液混合使用。

(6) 苦味酸(picric acid) 一种黄色结晶体,有毒、无臭、味苦,受热易燃烧和爆炸,一般预先配



NOTE

成饱和水溶液备用。溶解度因水温而不同,冷水的溶解度为 0.9%~1.2%。苦味酸能沉淀蛋白质,可使标本收缩,但不会过度硬化。标本固定后需用 70%乙醇溶液冲洗,冲洗时如加入少许碳酸锂(lithium carbonate),则可使苦味酸黄色更易洗除。

## 2. 复合固定液

(1) 鲍恩(bouin)固定液 饱和苦味酸溶液 75 mL,福尔马林 25 mL,冰醋酸 5 mL。此液最好在临用前配制,不宜久藏。小型虫体固定 4~16 h 即可,较大者则需 12~24 h。固定后,标本需用 70%乙醇浸洗 10 余小时,直至黄色苦味酸脱去为止。

(2) 劳氏(looss)固定液 饱和升汞水溶液 100 mL,醋酸 2 mL。此液可用于固定小型吸虫,在临用前配制。固定时间为 4~24 h,固定后放置在加碘液的 70%乙醇溶液中以去除沉淀,然后保存在 70%乙醇溶液内。

(3) 布莱(bless)固定液 70%乙醇溶液 90 mL,福尔马林 7 mL,临用前加冰醋酸 3~5 mL。此液渗透力强,固定时间为 3~12 h,适用于固定昆虫幼虫,亦可用于固定小型吸虫或绦虫,效果较好。

(4) 肖氏(schaudinn)固定液 饱和升汞水溶液 66 mL,95%乙醇溶液 33 mL,每 100 mL 混合液中临用前加入冰醋酸 5~10 mL。此液适用于固定肠道原虫,固定时间为 10~60 min,固定完后用 50%或 70%乙醇溶液换洗,再用碘酒或碘液除去升汞沉淀。本液配制后可以长期保存。

## 3. 固定后处理

固定标本要注意防止虫体变形,应趁新鲜固定,且固定液需适量,固定液与标本体积的比例一般为 15:1,固定时间需根据虫体标本的大小、厚薄、固定液类别、室温高低来决定。固定好的标本需保存在紧塞的瓶中,注明标本的来源、名称、保存液、日期和患者姓名,并存放在阴暗处备用。

### (二) 常用染剂

为了更好地观察虫体形态和内部结构,可用染料将标本染色,使虫体各部结构能清晰显出,从而达到鉴别虫种的目的。染色原理包括物理与化学两方面作用。物理作用主要是吸附作用,即组织吸附染液的染色颗粒,并与之牢固结合。例如用墨汁或其他颜料注射于绦虫妊娠节片的子宫内,使子宫侧支能清楚显示。化学作用主要是亲和作用,因为虫体组织或细胞内,有酸性物质和碱性物质,染料也有酸性和碱性的区别。组织或细胞中酸性部分的阴离子,可以与碱性染料中的阳离子结合着色,同时组织或细胞中碱性部分的阳离子,也可与酸性染料中的阴离子结合而着色。由于被染物质不同部分对染色剂的反应不同,这样虫体各个不同的部分也就能清楚地显示。

染液是由染料和某些化学药品配制而成的,需将染料溶于溶剂内成为溶液才能染色,这种溶液称为染液或染色剂,溶剂常用蒸馏水与乙醇溶液。

**1. 卡红(胭脂红,carmin)** 一种从昆虫胭脂虫雌虫中提炼出来的粉末状染料,应将其溶解于酸性或碱性溶液中,对细胞核和细胞质染色效果较好。用卡红配制成的盐酸卡红染液和明矾卡红染液是染制蠕虫整体标本时最常用的染色剂。

(1) 盐酸卡红染液 卡红 4 g,盐酸 2 mL,蒸馏水 15 mL,85%乙醇溶液 95 mL。将卡红溶于盐酸蒸馏水中,边煮边用玻璃棒搅拌至煮沸,然后继续加入乙醇溶液加热至 80℃左右,冷却过滤,加入氨水数滴中和。染色过深时可用稀盐酸乙醇溶液(即含有 0.5%~2%盐酸的 70%乙醇溶液)分色。

(2) 明矾卡红(alum carmine)染液 将卡红 1 g,钾明矾 4 g,蒸馏水 100 mL 置于烧杯中煮沸 30 min,冷后过滤,加石炭酸数滴或福尔马林 1 mL 防腐。分色可用 2%钾明矾水溶液。

**2. 苏木素(苏木精,haematoxylin)** 苏木素是由产于南美洲的一种植物苏木中提炼出来的浅黄色或浅褐色的细粒结晶体,对细胞核和染色质具有很强的染色作用,是肠内原虫、小型蠕虫和幼虫常用的染料。

配制染液时,通常先将苏木素溶解于乙醇后,再加入其他成分。配制的苏木素染液必须经过氧化成为苏木红后才起染色作用。所以可将染液配好后暴晒于日光下,或放在 37℃温箱中使其自然



氧化,时间愈长,氧化愈成熟,染色力愈强;也可以在染液中加入氧化剂,如过氧化氢、氧化汞等,使其快速氧化,但染色效果不如前者。因此,此类染液应提前配制待其自然氧化成熟后应用。染液中需加入媒染剂如钾明矾、铁明矾或用媒染剂媒染后才容易着色。常用的染液有戴氏苏木素染液和哈氏苏木素染液。

(1) 戴氏苏木素(delafield haematoxylin)染液 苏木素结晶 4 g,95%乙醇溶液 10 mL,饱和铵明矾水溶液 100 mL,甘油 25 mL,甲醇 25 mL。将苏木素溶于乙醇溶液中,滴入饱和铵明矾水溶液与之混合。混合液晒于日光下或置温箱中,经过 2~4 周,加入甘油和甲醇,静置数日后再过滤,放置约 2 个月,直至液体成熟呈暗红色时即可使用。用时将此原液加蒸馏水稀释 10~20 倍。

(2) 哈氏(harris)苏木素染液 苏木素 1 g,无水乙醇 10 mL,铵(或钾)明矾 20 g,蒸馏水 200 mL,氧化汞 0.5 g。将苏木素溶解于无水乙醇溶液中,另将钾明矾置于蒸馏水中加温溶解。待钾明矾全部溶解,再与苏木素乙醇溶液混合,煮沸 3~5 min 再加氧化汞。待液体变为深紫色,立即将烧瓶放于流动冷水中,使染液快速冷却,然后过滤。使用前加入冰醋酸 4 mL,可增强其核染色力。

3. 伊红(eosin)染液 伊红 2 g,蒸馏水 100 mL,冰醋酸 1~2 滴。此液应用极广,通常将 0.1%~0.5%乙醇(95%)溶液与苏木素配合,进行复染;在检查肠道原虫时,常与碘液配合进行对比染色。

4. 快绿(fast green)染液 快绿粉 0.2 g,95%乙醇溶液 100 mL。此液适用于小型吸虫标本的复染。先用卡红染液染色,后脱水至乙醇浓度维持 95%不变时加入此液数滴进行复染。1 min 后,立即进行脱水透明。

5. 中性红(neutral red) 红色粉末状,略带碱性,是细胞核的活体染料,渗透力强,无毒。通常配成 0.01%~1%水溶液,可用于原虫与蠕虫幼虫等标本的染色。

6. 碱性复红(basic fuchsin) 碱性染料,红色粉末状,对细胞核着色力强。在昆虫标本制作中通常配成石炭酸复红染液,作几丁质染色用。

7. 甲酚紫(cresly violet) 又名焦油紫,常用 0.1%甲酚紫水溶液,可用于活体标本染色。染色时将标本置于载玻片上,加此剂 1~2 滴,待虫体呈红色后,加盖玻片置显微镜下观察。

染色方法分为活体染色和死体染色。活体染色法是临时观察虫体形态构造,较清晰方便,但标本不能长久保存。染液均为水液,取活体染色剂滴于载玻片上,将虫体置于染液中,在虫体受染后,盖上盖玻片在显微镜下观察即可。死体染色法是虫体经过固定后染制的,染液可分为水溶液与乙醇溶液。根据染色剂将其分为单染和复染两种。单染是只用一种染液来进行染色,复染是用两种以上的染液进行染色。染色时间根据标本种类、染液性质、温度不同而有所区别:一般水溶性染液染色时间长,乙醇配制的染液染色时间短;大而厚的虫体染色时间长,小而薄的虫体染色时间短;温度高着色较快,温度低则着色慢。染色所用染液若为水溶性,应将保存于 70%乙醇溶液中的标本移置水中后,再浸入染液中染色,染后仍用水冲洗;染色所用染液若是用乙醇配制的,从 70%乙醇溶液中取出标本后可直接进行染色,染后亦需用 70%乙醇溶液冲洗。

## 二、寄生虫标本的采集

寄生虫标本的正确采集是获得准确检验结果的前提,也为寄生虫病流行病学调查和预防提供科学依据。不同的寄生虫,其生活史各异,因此,在采集标本前应先了解寄生虫的形态、生活史、寄居部位、地域分布,才能确保采集工作顺利进行。

1. 标本来源 体内寄生虫可寄生于人体的肠道、腔道、淋巴管、血液、骨髓、肝、肺、脑、肌肉等器官组织内。寄生于肠道和腔道的蠕虫卵和少数成虫、原虫滋养体或包囊,可从排泄物或分泌物中获取;大部分消化道内寄生的蠕虫成虫需用药物驱虫后再收集;血液与骨髓内的寄生虫通过抽血或骨髓穿刺采集;寄生于肝、肺、脑、肌肉等器官组织内的寄生虫,需要通过活组织检查获取;有些难采集的标本可通过动物接种或人工培养来获得。



## 2. 标本采集注意事项

(1) 做好相关记录 标本名称、采集地点、日期、标本来源、宿主种类、寄生部位、采集人姓名等内容均应详细记录,如是动物接种或人工培养获得的标本应注明,昆虫标本还应记录采集场所的气候等情况。

(2) 确保标本完整性 采集过程中操作应仔细,尽可能保持标本完整,不损坏标本结构,尤其在采集昆虫标本时,更应注意保护昆虫的足、翅、体毛、触角、鳞片等结构,确保各部位不残缺。

(3) 避免感染 采集过程中应采取适当防护措施以防造成感染。操作时,要穿工作服,戴手套,必要时还要戴口罩和防护镜,结束后要消毒器具和实验台,以免造成污染或传播;采集钉螺和解剖钉螺及接种动物时,应预防血吸虫尾蚴侵入皮肤;采集病媒昆虫标本时,应防止被叮咬,可涂抹驱避剂或穿防护衣。

## 三、寄生虫标本的保存

采集到的寄生虫标本,需按标本的种类、大小、性质、制作要求,尽快进行处理。如要进行动物接种或人工培养,应按所需条件妥善安排;如制作标本,应先用生理盐水将虫体或病理组织表面洗净,再置于保存液(或固定液)中保存固定。如不能及时处理,需将标本放入冰箱内,但时间也不宜过久。如要进行动物接种或人工培养,应按照所需条件妥善进行处理。

## 四、寄生虫标本的鉴定

寄生虫标本的鉴定以形态学为依据,进行生物学分类并确定虫种。如果属于形态完整、较大的常见寄生虫,只需经一般形态学观察即可判定。但对于死亡、残缺不全的小虫体,特别是病理组织切片中的虫体或个体很小的原虫,可根据虫体形态结构和来源部位,结合患者病史、临床症状和体征、寄生虫免疫诊断检测指标等资料判断该虫体大致类别,再结合已知的资料查阅文献来验证最初的分析,如结果不符合或无从获得验证资料,需进一步使用免疫学方法和分子生物学技术来鉴定。寄生虫标本的鉴定方法包括一般形态学观察鉴定和特殊结构与分子水平检查鉴定。

1. 一般形态学鉴定 对于肉眼可见的大部分蠕虫和节肢动物,根据形态特征可直接作出判断,如蛔虫、钩虫、蛲虫、姜片虫、带绦虫孕节、膜壳绦虫、组织中的蝇蛆等;对于原虫、蠕虫卵等肉眼看不清楚的寄生虫则需借助显微镜观察,如疟原虫、阿米巴原虫、各种蠕虫卵、蠕形螨、疥螨等。如虫体不完整或结构不清,还需要对虫体做透明处理,然后置于载玻片上镜检。如虫体需保存,可用10%甲醛或70%乙醇固定。观察具体指标包括形状、大小、颜色、由外到内的细微结构特点等。

2. 特殊结构与分子水平鉴定 包括组织切片观察横断面结构、扫描电镜观察虫体体表或某一部分构造特征、透射电镜观察原虫细胞器或虫体皮层结构、特异性免疫组化分析、染色体核型与显带分析、同工酶谱和蛋白质区带比较分析,DNA重复序列酶切长度分析、种特异基因序列PCR扩增产物与DNA杂交分析等。

(赵莉平)

## 第二节 病原学检查技术

### 一、粪便标本的病原学检验技术

#### (一) 直接涂片法(direct smear method)

##### 1. 生理盐水涂片法(saline smear)

【原理】用生理盐水作粪便的稀释剂,可不改变涂片的渗透压,维持病原体形态结构完好。



NOTE

**【器材与试剂】**载玻片、盖玻片、竹签、生理盐水、光学显微镜。

**【操作方法】**

(1) 在洁净载玻片上滴加 1~2 滴生理盐水。

(2) 用竹签从粪便的不同部位挑取米粒大小的粪便,在生理盐水中均匀涂抹形成薄粪膜,覆盖玻片后置显微镜下检查。要求粪膜厚薄适当,其标准以透过涂片能隐约看到书上字迹为合适。

(3) 检查时先用低倍镜查找,如发现可疑物再转换高倍镜仔细观察。

**【方法学评价】**此法操作简便,适用于检查蠕虫卵和原虫滋养体,但由于取材较少,容易造成漏检,所以仅作为初步检查的一种手段。

**【注意事项】**

(1) 粪便须新鲜,粪便容器应洁净无污染。

(2) 镜检采用阅读式顺序检查,以防漏检。

(3) 镜检时光线要适当,光线过强则影响观察效果,容易引起视疲劳。

(4) 检查虫卵时,应注意与粪便残渣和食入的酵母菌、油滴、植物纤维区别。

(5) 检查完后的涂片放入 5% 来苏液消毒缸内,粪便盒、竹签或牙签放入污物桶内。

## 2. 碘液染色涂片法 (iodine staining)

**【原理】**用碘液可将原虫包囊着色,可在高倍镜下观察形态、颜色和内部结构。

**【器材与试剂】**

(1) 载玻片、盖玻片、竹签、生理盐水、光学显微镜。

(2) 碘液配制:碘化钾 4 g,溶于 100 mL 蒸馏水中,再加入碘 2 g,待溶解后储存于棕色瓶中备用。

**【操作方法】**

(1) 在洁净载玻片上滴加 1 滴碘液。

(2) 用竹签从粪便的不同部位挑取米粒大小的粪便,在碘液中均匀涂抹,覆盖玻片后镜检。

(3) 检查时先用低倍镜查找,如发现可疑物再转换高倍镜仔细观察。

**【方法学评价】**此法操作简便,适用于检查包囊。

**【注意事项】**

(1) 碘液不宜太多和太浓,否则影响检查结果。

(2) 检查包囊时,应注意与人酵母菌或脂肪滴区别:人酵母菌形态大小不同,内有较大空泡;脂肪滴折光性强,不着色,内无任何结构。

## (二) 浓集法 (concentration method)

### 1. 厚涂片透明法 (改良加藤法, modified Kato's thick smear)

**【原理】**粪膜经浸透甘油-孔雀绿溶液的玻璃纸片透明后,甘油可使粪渣透明,以便于光线通过,孔雀绿可使光线柔和,减轻视疲劳。

**【器材与试剂】**

(1) 载玻片、玻璃纸、竹板、100 目不锈钢筛、橡皮塞、光学显微镜。

(2) 甘油-孔雀绿溶液配制:纯甘油 100 mL,蒸馏水 100 mL,3% 孔雀绿溶液 1 mL,充分混匀。

(3) 玻璃纸制备:将玻璃纸剪成大小为 20 mm×30 mm 的纸片,浸泡于甘油-孔雀绿溶液中 24 h 以上,直至玻璃纸呈现绿色。

**【操作方法】**

(1) 将 100 目不锈钢筛覆盖在粪便标本上,用竹板从网上刮取粪便 50 mg,置于载玻片上。

(2) 用浸透甘油-孔雀绿溶液的玻璃纸覆盖在粪便上,用橡皮塞轻压,使粪膜铺开,大小为 20 mm×25 mm。

(3) 放置在 30~36 °C 温箱中约 30 min,或 25 °C 温箱中约 1 h,待粪膜稍干并透明后镜检。

**【方法学评价】**此法使镜下对比鲜明,易于观察,适用于检查蠕虫卵。



NOTE

**【注意事项】**

(1) 粪膜要均匀展开,不宜过厚。

(2) 粪膜透明时间要适当,如检查钩虫卵,时间应在 30 min 内。如粪膜厚、透明时间短,则难以发现虫卵;透明时间过长,则导致虫卵变形不易识别。

**2. 饱和盐水浮聚法(brine floatation)**

**【原理】**利用部分蠕虫卵比重小于饱和盐水比重(1.20),使虫卵漂浮在溶液表面,从而达到浓集虫卵的目的。常见蠕虫卵和包囊比重见表 2-2-1。

表 2-2-1 蠕虫卵和包囊比重

蠕虫卵或包囊	比重	蠕虫卵或包囊	比重
华支睾吸虫卵	1.170~1.190	蛲虫卵	1.105~1.115
姜片虫卵	1.190	受精蛔虫卵	1.110~1.130
肝片形吸虫卵	1.200	未受精蛔虫卵	1.210~1.230
日本血吸虫卵	1.200	毛圆线虫卵	1.115~1.130
带绦虫卵	1.140	溶组织内阿米巴包囊	1.060~1.070
微小膜壳绦虫卵	1.050	结肠内阿米巴包囊	1.070
钩虫卵	1.050~1.080	微小内蜒阿米巴包囊	1.065~1.070
鞭虫卵	1.150	蓝氏贾第鞭毛虫包囊	1.040~1.060

**【器材与试剂】**

(1) 载玻片、盖玻片、竹签、浮聚瓶或青霉素小瓶、滴管、光学显微镜。

(2) 饱和盐水配制:向烧杯中加入清水煮沸,慢慢加入食盐并不断搅动,直至食盐不再溶解,冷却后即成为饱和盐水,100 mL 沸水中加入食盐 35~40 g。

**【操作方法】**

(1) 用竹签挑取黄豆大小的粪便,放入盛有少量饱和盐水的浮聚瓶或青霉素小瓶内,将粪便搅匀(图 2-2-1(a))。

(2) 用滴管向小瓶内缓慢滴加饱和盐水至瓶口,用竹签挑去浮在水面的粪渣,继续滴加饱和盐水至液面略高于瓶口而又不溢出为止(图 2-2-1(b)、图 2-2-1(c))。

(3) 取一张载玻片盖于瓶口,静置 15~20 min(图 2-2-1(d))。

(4) 将载玻片垂直向上提起并迅速翻转,加盖玻片镜检(图 2-2-1(e)、图 2-2-1(f))。

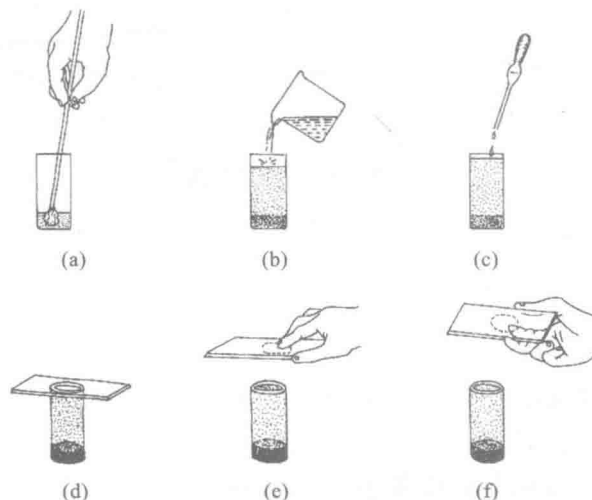


图 2-2-1 饱和盐水浮聚法



NOTE

【方法学评价】此法适用于检查各种线虫卵,尤其是钩虫卵,估测感染度,也可评估药物驱虫效果。

【注意事项】

- (1) 挑取粪便时应从不同部位挑取,粪便量需适当,过多过少都影响浓集效果。
- (2) 加饱和盐水时,量应适当,标准以盖上盖玻片没有气泡而又不溢出为宜。
- (3) 玻片要洁净,避免玻片与液面间有气泡或漂浮的粪渣。
- (4) 静置时间要充足。
- (5) 翻转玻片时动作要轻巧,速度适宜,不要使液体流失影响检查效果。

3. 自然沉淀法(nature sedimentation method)

【原理】利用蠕虫卵、包裹和卵囊的比重大于水,可沉于水底,使虫卵浓集检出。

【器材与试剂】三角量杯(500 mL)、烧杯、玻棒、铜筛(60~80目)、载玻片、盖玻片、吸管、光学显微镜。

【操作方法】

- (1) 取 20~30 g 粪便放入烧杯中,加清水调成混悬液,用铜筛过滤至 500 mL 三角量杯内(图 2-2-2(a))。
- (2) 加清水至 500 mL 处静置,检查蠕虫卵需静置 20~30 min,包裹需静置 6~8 h(图 2-2-2(b))。
- (3) 倒去上清液,换加清水(图 2-2-2(c)、图 2-2-2(d))。
- (4) 如此重复操作,直至上清液清澈为止(图 2-2-2(e))。
- (5) 倾去上清液,用吸管吸取沉渣镜检。如为检查包裹,还需加碘液染色(图 2-2-2(f))。

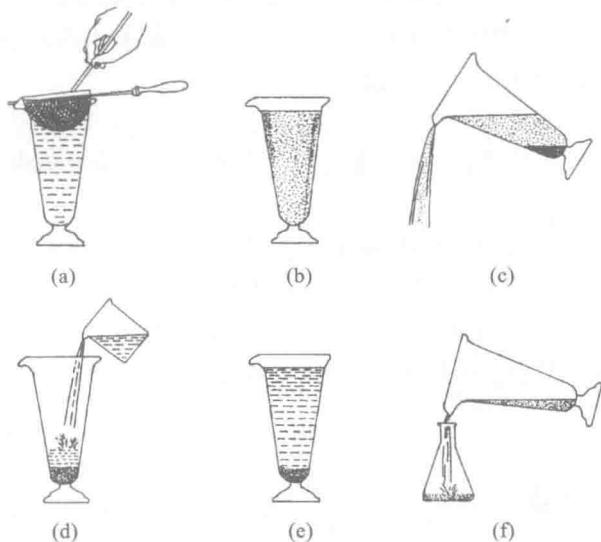


图 2-2-2 自然沉淀法

【方法学评价】此法可使虫卵集中,且经过水洗,观察视野较清晰,易于检出,但较费时。对比重较小的钩虫卵检查效果差,但比重大的包裹也可用此法。

【注意事项】

- (1) 应将粪便搅匀后再过滤。
- (2) 注意换水时间,尤其是血吸虫卵检查,应缩短换水时间或用 1.2% NaCl 溶液代替清水,以防止毛蚴孵化。
- (3) 更换清水时,避免沉渣浮起,使虫卵随上清液流失。
- (4) 此法使用粪便量较大,应避免污染环境。



#### 4. 尼龙袋集卵法 (nylon bag method)

【原理】将较多量的粪便加水混匀,经过 3 个不同孔径的筛网,用铜筛粗筛去除粗粪渣,第一个尼龙袋去除细粪渣,第二个尼龙袋收集虫卵,再经消化进一步去除粪渣,从而更好地浓集血吸虫卵。

【器材与试剂】铜筛(60 目)、尼龙袋(120 目和 200 目各 1 个)、烧杯、20% NaOH 溶液 20 mL、载玻片、盖玻片、吸管、光学显微镜。

##### 【操作方法】

(1) 取 30~50 g 粪便放入烧杯中,加少量水调匀,先用铜筛过滤去除粗粪渣,在自来水下冲洗粪渣直至流水变清为止。

(2) 收集过滤后粪液,倒入重叠的尼龙袋内(120 目在上,200 目在下),用自来水边洗边筛,直至流水变清。

(3) 移去 120 目尼龙袋,将留有粪液的 200 目尼龙袋浸泡在 20% NaOH 溶液中消化 10 min,用自来水继续冲洗去掉细粪渣。

(4) 用吸管吸取筛内粪渣涂片镜检。

【方法学评价】此法为病原诊断慢性血吸虫病的首选方法。此法浓集速度快、省时、省水,虫卵散失少,还可避免在自然沉淀中虫卵孵出的毛蚴因换水而被倒掉。尼龙袋体积小、体重轻、便于携带,适用于大规模调查。

##### 【注意事项】

(1) 粪便必须新鲜,夏季不宜超过 12 h,冬季不宜超过 24 h。送检标本量不足的应退回再送。

(2) 用自来水做孵化时,应将水放在缸内过夜。

(3) 铜筛、尼龙袋等器材使用完毕后,应冲洗干净,再用来苏水浸泡杀卵。为避免交叉感染,尼龙袋在使用前后均应在来苏水中浸泡 30 min,然后用自来水冲净。

(4) 清洗尼龙袋时,不能用刷子刷洗、揉搓,不能用开水烫,以免孔径破坏影响集卵效果。

#### (三) 定量透明法 (quantitative transparency method)

【原理】在厚涂片透明法基础上,刮取定量粪便,检出粪内全部虫卵并计数。

【器材与试剂】聚苯乙烯定量板(大小 40 mm×30 mm×1.37 mm,膜孔孔径 8 mm×4 mm,两端呈半圆形,孔内平均容纳粪样 41.7 mg)、载玻片、甘油-孔雀绿溶液、玻璃纸(50 mm×25 mm)、竹板、100 目不锈钢筛、橡皮塞、光学显微镜。

##### 【操作方法】

(1) 将 100 目不锈钢筛覆盖在粪便标本上,用竹板从网上刮取粪便。

(2) 将定量板置于载玻片上,用手指压住定量板两端,用竹板刮取粪便填满膜孔,刮去多余粪样。掀起定量板,载玻片上留下长条形粪样。

(3) 用浸透甘油-孔雀绿溶液的玻璃纸覆盖在粪便上,用橡皮塞轻压,使粪膜铺开呈长椭圆形。

(4) 在 25℃ 温箱中放置 1 h 后即可镜检,按顺序观察并记录全部虫卵数。

(5) 将虫卵数乘以 24,再乘以粪便形状系数(成形便为 1,半成形便为 1.5,软湿便为 2,粥样便为 3,水泻便为 4),即为每克粪便虫卵数(eggs per gram,EPG),根据排便量计算每条雌虫每天排卵数(表 2-2-2)。

表 2-2-2 常见蠕虫每条雌虫每日产卵数

虫名	每日产卵数(平均数)	虫名	每日产卵数(平均数)
华支睾吸虫	1600~4000(2400)	牛带绦虫	97000~124000/孕节
姜片虫	15000~48000(25000)	十二指肠钩虫	10000~30000(24000)
卫氏并殖吸虫	10000~20000	美洲钩虫	5000~10000(9000)
日本血吸虫	1000~3500	蛔虫	234000~245000(240000)
猪带绦虫	30000~50000/孕节	鞭虫	1000~7000(2000)



NOTE