

第五部分 其他微生物

实验二十五 病原性真菌

真菌是微生物中体积最大的一种，可分为单细胞和多细胞两大类。真菌的营养要求不高通常在含有糖类的沙保弱(Sabouraud)固体斜面培养基上即可生长。但生长较慢，需要一定的温度，培养基的 pH 为酸性，大多数需氧，合适的温度为 22-28℃，某些深部致病性真菌在 37℃ 中生长良好。由于真菌有特殊形态和结构。因此形态学诊断有一定价值。单细胞真菌如酵母菌、白色念珠菌革兰氏染色阳性。多细胞真菌可采用棉兰染色。

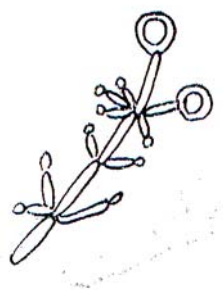
一、真菌形态观察

(一) 白色念珠菌

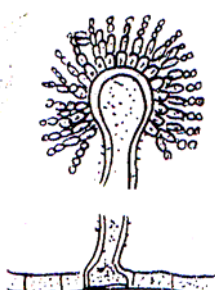
1. 革兰氏染色标本：取在沙保弱斜面培养上经 37℃ 培养 5-7 天的白色念珠菌，制成涂片作革兰氏染色，高倍镜或油浸镜下检查。可见到革兰氏阳性的卵圆形菌体，比葡萄球菌约大 2-5 倍。

2. 假菌丝和厚膜孢子标本：在消毒玻片上滴加米粉吐温琼脂或玉蜀黍吐温琼脂少许，将白色念珠菌接种在琼脂中央，覆盖玻片，37℃ 培养 2-4 天，用高倍镜镜检，可见白色念珠菌体上长出芽管，并可伸长形成假菌丝。在假菌丝紧束点上又可附着芽生孢子，在顶端出现圆的厚膜孢子。

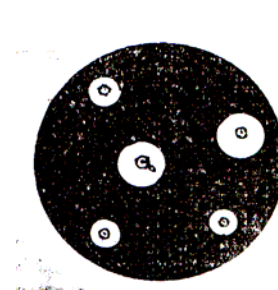
将融化之沙保弱氏培养基少许加于消毒载玻片上，待凝后，将曲菌种在琼脂中央，复盖消毒盖玻片，37℃ 培养 1-2 天，室温放 24 h，以棉蓝以染色，用低倍或高倍镜观察菌丝与孢子。



菌丝厚膜孢子



菌丝和小分生孢子



暗视野下的新生隐球菌

图 25-1 真菌形态

(二) 新生隐球菌：

将新生隐球菌引起的脑膜炎患者脑脊液(或接种于沙保弱固体斜面培养物)滴 1-2 滴于

载玻片上，与一接种环墨汁混匀，盖上盖玻片，四周用树脂密封，高倍镜镜检。可见黑色背景中的球形菌体和荚膜。

(三) 曲菌：

二、真菌菌落观察

真菌的菌落形态可分三大类：酵母型菌落、类酵母型菌落及丝状菌落。观察接种于沙保弱琼脂斜面上各型菌落。

(一) 酵母型菌落(酵母菌)

菌落为圆形，较大，白色，表面光滑湿润，无菌丝伸入培养基内，类似一般细菌菌落。

(二) 类酵母型菌落(白色念珠菌)

菌落与酵母型菌落相假，生长的假菌丝伸入培养基内，呈树枝状。

(三) 丝状菌落(曲菌)

菌落表面呈墨绿色绒毛状，菌落底部有营丝伸入培养基内。

三、浅部真菌病标本检查法

浅部真菌临床上极为常见，包括各种各样的毛发，指甲和皮肤的癣病，临床上常用的方法是直接镜检。

【材料】

毛发、指甲或皮屑。

10% KOH 溶液。

载玻片及盖玻片。

【方法】

(一) 标本采集

采集病变发癣标本时，用镊子选择病变部位的断残头或带白色皮屑的毛发，以及皮损部位的脱屑最易获得阳性结果。采取足癣标本时，则小刀刮取损害部位皮屑，若足趾间有损害，则应选择潮湿或干裂皮屑。用过的器具立即经火焰灭菌。

(二) 标本处理

将病变头发或皮屑放去载玻片上，滴 10%KOH 溶液 1-2 滴，加盖玻片，在火焰上微微加热，用手轻按一下盖玻片，使标本压平后即可镜检。

(三) 镜检：

用高倍镜观察发生于毛发之内部的菌丝及孢子特征，例如黄癣病，发内有粗细一致的菌丝与发长轴平行，分散于发内，有时分隔似关节孢子，可有或气泡。

黑癣菌，发内有大量孢子，呈关节型排列并充满整个发内，因此毛发出皮即断。

铁锈色小孢子菌，发外有卵圆型小孢子，大小 2~3 μ m 直径，密集成片。在发内(根部)可见少数细菌丝。

足癣趾间皮屑，镜检可见到上皮细胞附有细长的有隔菌丝及链球状排列的孢子。

实验二十六 病原性螺旋体

螺旋体是一类细长而柔韧，弯曲呈螺旋状，形态与大小不一，运动活泼的单细胞微生物。用细菌染色法染色时不易着色。除钩端螺旋体与伯氏螺旋体外皆不易能在人工培养基上生长。其中大多数为非致病性螺旋体，仅少数对人和动物有致病性。

一、钩端螺旋体的培养：

【材料】

钩端螺旋体标本

柯索夫(Korthof)液体培养基

【方法】

将钩端螺旋体标本接种到柯索夫液体培养基，28℃培养5-7天，可见云雾状生长。

二、用暗视野显微镜观察钩端螺旋体

【方法】

1. 取钩端螺旋体培养液一滴于载玻片上，其上覆以盖玻片。
2. 用暗视野显微镜观察其形态与运动：在暗色视野中可见发亮呈念珠状的菌体，二端弯曲带钩状，运动活泼。通常呈C、S型。

附：暗视野显微镜

(一)结构及原理：(图25-1)

采用一有黑色横隔的特别聚光器代替普通显微镜的聚光器，使光线仅能从横隔周围上升，经反射作用而出聚光器，形成一个圆锥样的光柱。调节聚光器之高低，可使此圆锥的顶点(即焦点)恰在载物玻片的表面，此时如玻片上空无一物，或为完全透明之物体，则光线直穿而过，不能进入接物镜中，因之视野呈黑色，如玻片上有可以折光的物体(如细菌或其他颗粒)存在，则由聚光器而来的光线遇此物体，形成一个弥散反射，其中有一部分光线即经反射进入镜头，到达观察者的眼睛，此时所见者即为闪光的物体颗粒，衬托在黑色背景中，状如夏夜晴空中的点点繁星，异常清晰。

(二)使用方法：

1. 将检查标本置于厚1.3-1.6 mm的洁净玻片上，覆以盖玻片，置于显微镜台上。
2. 在聚光镜之顶面镜片与玻片底层之间加一香柏油。使光线通过聚光器后即在折射系数类同之介质中进行，不经过空气层。
3. 用低倍显微镜观察，调节聚光器之高低与位置，使所见的光线聚为最小一点，又恰位于视野之中央。
4. 换用油镜观察，所见物体即成闪光状。

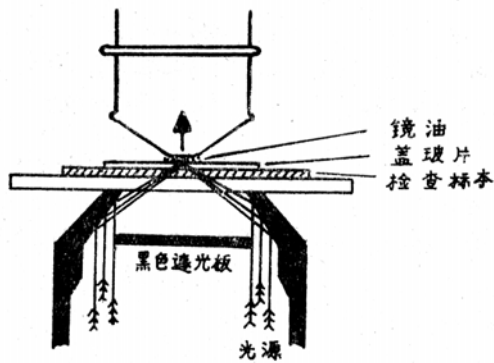


图 26-1 暗视野显微镜原理示意图

三、快速血浆反应素环状卡片试验（RPR）：

梅毒的初筛试验，非特异性的血清学检查方法。

1. 原理：牛心肌类脂与梅毒脂质成分或梅毒损伤宿主细胞释放的抗原交叉，可与反应素 IgM 或 IgG 结合。将牛心肌内脂吸附到载体上，作为诊断试剂，与代检者血清做凝集反应，用于辅助诊断梅毒螺旋体的感染。

2. 【材料】

- (1) TRUST 抗原悬液
- (2) 试验专用卡片
- (3) 待测标本两份
- (4) 阴性和阳性对照
- (5) 50ul 微量注射器
- (6) 50ul 枪头

3. 实验操作

- (1) 用微量注射器将抗原悬液混匀，分别取 10 ul 加至试验卡片的两个圆圈当中；
- (2) 用微量注射器分别将两份待测标本混匀，分别取 20 ul 加至试验卡片的两个圆圈中；
- (3) 用枪头将抗原圆圈中的抗原悬液与标本混匀，观察是否有凝集现象产生；
- (4) 同时做阴性和阳性对照。
- (5) 有凝集现象出现者为阳性，阴性对照应不出现凝集现象。