



高等医药院校基础医学实验教学系列教材

病原生物学实验

杨致邦 叶 彬 主编

高等医药院校基础医学实验教学系列教材

病原生物学实验

主 编 杨致邦 叶 彬
副主编 胡福泉 李明远 张锡林 王 和
张育华 杨宗棋 魏 洪 李晋川

编 委 (按姓氏笔画排序)

王 和(贵阳医学院)	杨宗棋(川北医学院)
王 跃(成都医学院)	杨致邦(重庆医科大学)
叶 彬(重庆医科大学)	邹晓毅(重庆医科大学)
田一玲(重庆医科大学)	国 果(贵阳医学院)
何永林(重庆医科大学)	武卫华(重庆医科大学)
张 静(重庆医科大学)	金 路(重庆医科大学)
张育华(泸州医学院)	胡福泉(第三军医大学)
张锡林(第三军医大学)	徐 蕾(重庆医科大学)
张德纯(重庆医科大学)	秦思栋(重庆医科大学)
李明远(四川大学华西医学中心)	蒋仁举(重庆医科大学)
李晋川(成都医学院)	魏 洪(遵义医学院)
杨 春(重庆医科大学)	

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本教材涵盖医学微生物学和医学寄生虫学实验,尝试将实验教学相对独立成为不依赖于理论教学体系的实验教学改革新模式,使学生掌握病原生物学的基本实验操作技术,注重培养学生独立操作、独立观察和思考、独立分析问题和解决实际问题的能力。全书共3篇9章,包括基本实验方法、仪器使用、试剂配制、微生物学实验、寄生虫学实验,其中微生物学实验、寄生虫学实验项目分别划分为经典验证性实验、综合性实验、创新性实验。

本教材主要适合五年制临床医学专业,兼顾七年制临床医学以及五年制、三年制预防、口腔、麻醉、影像、药学、检验、护理等专业的需要。各医学专业学生可根据培养要求选择不同板块的实验项目完成实验教学课程。

图书在版编目(CIP)数据

病原生物学实验 / 杨致邦,叶彬主编. —北京:科学出版社,2008

(高等医药院校基础医学实验教学系列教材)

ISBN 978-7-03-021939-8

I. 病… II. ①杨…②叶… III. 病原微生物-实验-医学院校-教材
IV. R37-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2008)第067912号

策划编辑:李国红 / 责任编辑:邹梦娜 李国红 / 责任校对:陈玉凤

责任印制:刘士平 / 封面设计:黄 超

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

源海印刷有限责任公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2008年6月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2008年6月第一次印刷 印张:17 3/4 插页:4

印数:1—5 000 字数:409 000

定价:29.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈明辉〉)

《高等医药院校基础医学实验教学 系列教材》编写指导委员会

主 任 雷 寒(重庆医科大学)
副主任 董 志(重庆医科大学)
张绍祥(第三军医大学)
委 员 王亚平(重庆医科大学)
李 和(华中科技大学同济医学院)
侯一平(四川大学华西基础医学与法医学院)
文 斌(川北医学院)
梁文妹(贵阳医学院)
李著华(泸州医学院)
范奇元(遵义医学院)
王燕蓉(宁夏医学院)
罗殿中(广西医科大学)

系列教材总策划 徐 晨(重庆医科大学)

总 序

医学是一门实践性极强的科学,医学实验教学在整个医学教育中占有极为重要的地位,因此,提高医学实验教学质量将有助于提高整体医学教育水平。改革传统的以教研室为单位的教学实验室模式,整合完善现代医学实验室功能和管理是提高医学实验教学质量的重要环节。传统医学实验教学的主要任务是让学生验证理论知识、增加感性认识,但缺乏对学生创新能力的培养,因而实验难度不高,实验条件比较简单。随着现代生命科学及其各种实验技术的飞速发展,必将对现代医学实验教学提出更高的要求,大量先进医学实验进入实验教学课程体系将成为必然的趋势,要全面推进现代医学实验教学的发展,必须加大对实验项目、实验条件、实验教学体系改革力度,这对培养适应 21 世纪医学卫生事业发展的高素质医学人才有重要意义。近年来,国内很多医科院校对传统医学教学实验建设模式进行较大力度的改革,积累了不少经验,很多经验值得借鉴。

围绕跨世纪医学生的培养目标,转变旧的传统观念,打破现行课程框架,重新构建新型基础医学实验教学体系的改革势在必行。现代高等医药院校实验教学强调培养学生的探索精神、科学思维、实践能力和创新能力。这就要求从根本上改变实验教学依附于理论教学的传统观念,充分认识并落实实验教学在学校人才培养和教学工作中的地位,形成理论教学与实验教学统筹协调的理念和氛围。要从人才培养体系的整体出发,建立以能力培养为主线,分层次、多模块、相互衔接的科学实验教学体系,使实验教学与理论教学既有机结合又相对独立。要把学生从二级学科狭隘的“项目”实验教学提高到基于一级学科平台的“方法”实验教学,最大限度地拓展学生的专业视野。要实现以上目标,除了对实验室进行整合外,其核心内容就是实验教学教材。为了能够编写出一套适合中西部地区高等医药院校医学教育现状的实验教学教材,在科学出版社的大力支持下,《高等医药院校基础医学实验教学系列教材》编委会以重庆医科大学为主体,协同全国 26 所高等医药院校相关专业的专家教授共同编写了这套实验教学系列教材。全套共十本,包括《人体大体形态学实验》、《人体显微形态学实验》、《人体机能学实验》、《病原生物学实验》、《免疫学实验》、《生物化学与分子生物学实验》、《医用化学实验》、《医学物理学实验》、《法医学实验》和《核医学实验》。

本系列实验教材的编写理念是将实验教学按照国家实验教学示范中心要求的实验教学模式,借鉴国外同类实验教材的编写模式,力求做到体系创新、理念创新及编写精美。内容上将基础医学实验教学按照基础医学实验体系进行重组和有机融合,按照基础医学实验教学逻辑和规律,将实验内容分为基本实验操作及常用仪器使用、经典验证性实验、综合性实验和创新性实验等板块进行编写。

本系列教材编写对象以本科、专科临床医学专业为主,兼顾预防、基础、口腔、麻醉、影像、药学、检验、护理、法医、生物医学工程、卫生管理、医学信息等专业需求,涵盖全部医学生的基础医学实验教学。各层次学生可按照本专业培养特点和要求,通过对不同板块的必选实验项目和自选实验项目相结合修选实验课程学分。

由于基础医学实验教学模式尚存在地区和校际间的差异,加上我们的认识深度和编写水平有限,本系列教材在编写过程中可能存在偏颇之处,请广大医学教育专家谅解,欢迎同行们提出宝贵意见。

《高等医药院校基础医学实验教学系列教材》编委会

2008 年 3 月

前 言

病原生物学包括医学微生物学和寄生虫学,是一门实践性与应用性很强的学科,在科学技术发展中具有重要的位置。掌握病原生物学研究的基本技能,并充分利用实验教学的特点,培养学生的科学素质及创新意识是对现代病原生物学实验教学提出的要求。根据《教育部关于开展高等学校实验教学示范中心建设和评审工作的通知》(教高[2005]8号)精神,为使实验教学独立成为不依赖于理论教学的体系,将教学改革和科研的成果融入实验教学中,有利于培养实践能力和创新精神强的创新型医学人才,我校组织编写了有创新和改革、符合国家实验教学示范中心要求的高等医药院校基础医学实验教学系列教材,《病原生物学实验》即为系列教材中的一册。

本书涵盖基础医学的微生物学和寄生虫学实验,定位于本科实验教学,立足于多数高校的实验条件,以五年制临床医学专业为主,兼顾基础医学和七年制临床医学、五年制预防、口腔、麻醉、影像、药学、检验、护理、法医、卫生管理、医学信息等专业本、专科病原生物学实验教学的需要。按照各专业培养特点和要求,满足学生通过对不同板块的必选实验项目和自选实验项目相结合选修实验课程。

本书内容结合我校教学改革和科研的实际,融入多个医学院校的相关科研成果,体现实用性和创新性。实验项目分以下四个部分:

- (1) 基本实验方法:为病原生物学实验特有的基本操作技术。
- (2) 经典验证性实验:为验证病原生物学理论,加深学生感性认识的实验。
- (3) 综合性实验:为融合病原生物学实验知识结合科研而设计的一些实践性实验。
- (4) 创新性实验:结合临床实际,学生在教师指导下,根据所学的病原生物学实验知识自行设计完成的实验。

本教程的目标是使学生掌握病原生物学的基本方法与基本操作技术;强化实验室生物安全观念,掌握无菌操作技术;加深学生对病原生物学基本理论知识的理解与认识;培养学生独立操作、独立观察和思考、独立分析问题和解决实际问题的能力;增强科技创新能力;培养学生严谨的作风、科学的方法和严肃认真的工作态度。

将实验教学独立成为不依赖于理论教学的体系是实验教学改革的新模式,本书的编写是适应这一新模式的尝试,有待在教学实际中去检验和改进。随着病原生物学学科的发展,新的实验技术不断涌现,也需在应用中以补充。我们希望本书的出版和使用能促进实验教学改革的探索。限于我们的水平和经验,难免有疏漏之处,殷切盼望同道们不吝惠教。

杨致邦 叶 彬

2008年3月

目 录

绪言	(1)
----	-----

第一篇 基本实验方法、仪器使用、试剂配制

第1章 基本实验方法	(5)
第一节 常用实验器材的准备	(5)
第二节 病原微生物形态结构的观察方法	(7)
第三节 病原微生物的分离培养技术	(15)
第四节 微生物菌、毒种的保存	(42)
第五节 寄生虫感染病原学检查方法	(43)
第六节 寄生虫感染免疫学检查方法	(63)
第七节 寄生虫感染分子生物学检查方法	(69)
第2章 常用仪器设备的使用	(72)
第一节 高压蒸汽灭菌器	(72)
第二节 普通培养箱	(73)
第三节 电热鼓风干燥箱	(74)
第四节 生物安全柜	(75)
第五节 厌氧培养箱(多功能培养箱)	(78)
第六节 菌落计数器	(79)
第3章 常用试剂的配制	(80)
第一节 常用消毒液的配制	(80)
第二节 常用细菌染色液的配制	(81)
第三节 常用寄生虫标本固定液配制	(82)
第四节 常用寄生虫标本染色剂配制	(88)

第二篇 微生物学实验

第4章 微生物学经典验证性实验	(102)
第一节 病原微生物形态、结构的观察	(102)
第二节 病原微生物生长现象的观察	(114)
第三节 常见病原微生物鉴定的基本试验	(125)
第四节 细菌毒素的检测	(139)
第五节 细菌的药物敏感性试验	(142)
第六节 消毒与灭菌试验	(146)
第七节 证实细菌变异的实验	(149)
第八节 证实细菌毒力的实验	(153)

第5章 微生物学综合性实验	(159)
第一节 人体正常菌群的检测	(159)
第二节 卫生学检测	(162)
第三节 临床标本常见病原微生物的检查	(166)
第四节 病毒的快速检测	(176)
第五节 皮肤真菌的检查	(182)
第6章 微生物学创新性实验	(184)

第三篇 寄生虫学实验

第7章 寄生虫学经典验证性实验	(191)
第一节 线虫	(191)
第二节 吸虫	(206)
第三节 绦虫	(212)
第四节 原虫	(222)
第五节 医学节肢动物	(239)
第8章 寄生虫学综合性实验	(252)
第一节 线虫	(252)
第二节 吸虫	(258)
第三节 绦虫	(260)
第四节 原虫	(263)
第五节 医学节肢动物	(266)
第9章 寄生虫学创新性实验	(269)
第一节 易与寄生虫虫卵混淆的混合物配制	(269)
第二节 市售蔬菜的寄生虫卵污染状况检查	(270)
第三节 实验动物血吸虫感染的免疫学诊断	(272)
第四节 阴道毛滴虫的体外培养	(274)
第五节 蝇的饲养及蝇幼虫抗菌物的提取	(275)

彩图

(彩图1)	金黄色葡萄球菌	第一章
(彩图2)	肺炎链球菌	第二章
(彩图3)	大肠埃希菌	第三章
(彩图4)	沙门氏菌	第四章
(彩图5)	霍乱弧菌	第五章
(彩图6)	乙型肝炎病毒	第六章
(彩图7)	狂犬病病毒	第七章
(彩图8)	脊髓灰质炎病毒	第八章
(彩图9)	麻疹病毒	第九章
(彩图10)	风疹病毒	第十章
(彩图11)	流行性腮腺炎病毒	第十一章
(彩图12)	水痘-带状疱疹病毒	第十二章
(彩图13)	单纯疱疹病毒	第十三章
(彩图14)	巨细胞病毒	第十四章
(彩图15)	腺病毒	第十五章
(彩图16)	轮状病毒	第十六章
(彩图17)	诺如病毒	第十七章
(彩图18)	甲型肝炎病毒	第十八章
(彩图19)	乙型肝炎病毒	第十九章
(彩图20)	丙型肝炎病毒	第二十章
(彩图21)	丁型肝炎病毒	第二十一章
(彩图22)	戊型肝炎病毒	第二十二章
(彩图23)	脊髓灰质炎病毒	第二十三章
(彩图24)	麻疹病毒	第二十四章
(彩图25)	风疹病毒	第二十五章
(彩图26)	流行性腮腺炎病毒	第二十六章
(彩图27)	水痘-带状疱疹病毒	第二十七章
(彩图28)	单纯疱疹病毒	第二十八章
(彩图29)	巨细胞病毒	第二十九章
(彩图30)	腺病毒	第三十章
(彩图31)	轮状病毒	第三十一章
(彩图32)	诺如病毒	第三十二章
(彩图33)	甲型肝炎病毒	第三十三章
(彩图34)	乙型肝炎病毒	第三十四章
(彩图35)	丙型肝炎病毒	第三十五章
(彩图36)	丁型肝炎病毒	第三十六章
(彩图37)	戊型肝炎病毒	第三十七章
(彩图38)	脊髓灰质炎病毒	第三十八章
(彩图39)	麻疹病毒	第三十九章
(彩图40)	风疹病毒	第四十章
(彩图41)	流行性腮腺炎病毒	第四十一章
(彩图42)	水痘-带状疱疹病毒	第四十二章
(彩图43)	单纯疱疹病毒	第四十三章
(彩图44)	巨细胞病毒	第四十四章
(彩图45)	腺病毒	第四十五章
(彩图46)	轮状病毒	第四十六章
(彩图47)	诺如病毒	第四十七章
(彩图48)	甲型肝炎病毒	第四十八章
(彩图49)	乙型肝炎病毒	第四十九章
(彩图50)	丙型肝炎病毒	第五十章
(彩图51)	丁型肝炎病毒	第五十一章
(彩图52)	戊型肝炎病毒	第五十二章
(彩图53)	脊髓灰质炎病毒	第五十三章
(彩图54)	麻疹病毒	第五十四章
(彩图55)	风疹病毒	第五十五章
(彩图56)	流行性腮腺炎病毒	第五十六章
(彩图57)	水痘-带状疱疹病毒	第五十七章
(彩图58)	单纯疱疹病毒	第五十八章
(彩图59)	巨细胞病毒	第五十九章
(彩图60)	腺病毒	第六十章
(彩图61)	轮状病毒	第六十一章
(彩图62)	诺如病毒	第六十二章
(彩图63)	甲型肝炎病毒	第六十三章
(彩图64)	乙型肝炎病毒	第六十四章
(彩图65)	丙型肝炎病毒	第六十五章
(彩图66)	丁型肝炎病毒	第六十六章
(彩图67)	戊型肝炎病毒	第六十七章
(彩图68)	脊髓灰质炎病毒	第六十八章
(彩图69)	麻疹病毒	第六十九章
(彩图70)	风疹病毒	第七十章
(彩图71)	流行性腮腺炎病毒	第七十一章
(彩图72)	水痘-带状疱疹病毒	第七十二章
(彩图73)	单纯疱疹病毒	第七十三章
(彩图74)	巨细胞病毒	第七十四章
(彩图75)	腺病毒	第七十五章
(彩图76)	轮状病毒	第七十六章
(彩图77)	诺如病毒	第七十七章
(彩图78)	甲型肝炎病毒	第七十八章
(彩图79)	乙型肝炎病毒	第七十九章
(彩图80)	丙型肝炎病毒	第八十章
(彩图81)	丁型肝炎病毒	第八十一章
(彩图82)	戊型肝炎病毒	第八十二章
(彩图83)	脊髓灰质炎病毒	第八十三章
(彩图84)	麻疹病毒	第八十四章
(彩图85)	风疹病毒	第八十五章
(彩图86)	流行性腮腺炎病毒	第八十六章
(彩图87)	水痘-带状疱疹病毒	第八十七章
(彩图88)	单纯疱疹病毒	第八十八章
(彩图89)	巨细胞病毒	第八十九章
(彩图90)	腺病毒	第九十章
(彩图91)	轮状病毒	第九十一章
(彩图92)	诺如病毒	第九十二章
(彩图93)	甲型肝炎病毒	第九十三章
(彩图94)	乙型肝炎病毒	第九十四章
(彩图95)	丙型肝炎病毒	第九十五章
(彩图96)	丁型肝炎病毒	第九十六章
(彩图97)	戊型肝炎病毒	第九十七章
(彩图98)	脊髓灰质炎病毒	第九十八章
(彩图99)	麻疹病毒	第九十九章
(彩图100)	风疹病毒	第一百章

绪言

一、病原生物学实验技术的发展

据世界卫生组织(WHO)报告,全球平均每年约有 1700 多万人死于各类传染病,其中对人类危害最大的是艾滋病。2003 年全球新增加 HIV 感染者约 500 万人(平均每天新增约 14 000 人),在全世界已累计感染 4200 万人。艾滋病正在全球范围迅速蔓延,我国 HIV 感染者已达 84 万余人,其中艾滋病患者达 8 万人。SARS 在我国的爆发流行,继而波及到全球 32 个国家和地区,造成了重大的公共卫生事件。防治病原生物的危害,仍然是现今医学领域中的重要问题。病原生物的生物学特性、致病机制、机体的抗感染免疫、检测方法以及相关感染性疾病的防治措施的研究,都依赖于病原生物学实验技术。病原生物学实验技术的发展,推动着病原生物学学科的发展。

早在 1676 年,荷兰人 Antony van Leeuwenhoek(1632~1723)(图绪-1)采用自制的显微镜,从雨水、牙垢等标本中,首次观察并描述了各种形态的微生物,证实了微生物在自然界中的客观存在,为微生物学的研究奠定了基础。



图绪-1 Antony van Leeuwenhoek(1632~1723)

19 世纪 60 年代,法国科学家 Louis Pasteur(1822~1895)(图绪-2)在解决葡萄酒变质原因的实验中,发现有机物的发酵与腐败现象主要是由微生物引起,通过著名的“S 形曲颈瓶”实验,证实了有机物的发酵是酵母菌的作用,而酒味变



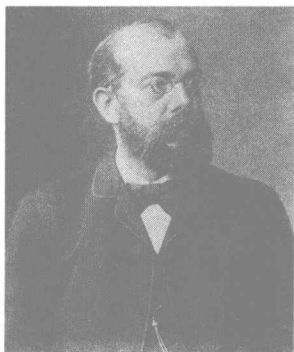
图绪-2 Louis Pasteur(1822~1895)

酸主要是污染了除酵母菌以外的其他杂菌的结果。为了防止酒类

变质,他将待发酵的基质液预先经 62℃ 处理 30 分钟后,再加入酵母菌,成功解决了酒味变酸的难题,从而建立了巴氏消毒法。随后,英国外科医生 Lister(1827~1912)受巴斯德研究工作的启发,认识到伤口感染可能与微生物感染有关,采用苯酚(石炭酸)喷洒手术室;煮沸法处理手术器械;创立了外科无菌手术,减少了外科手术感染。

德国医生 Robert Koch(1843~1910)(图绪-3)创用了固体培养基,可以从病人排泄物或其他标本中分离出细菌的单个菌落,获得了各种纯培养细菌,炭疽芽孢杆菌就是他分离出的第一种细菌。为证实炭疽芽孢杆菌是病原菌,他将该菌接种于健康动物,引起相同的疾病后,再从该动物体内分离出同样的细菌。据此他

提出了确定病原微生物的标准,即著名的 Koch 法则。同时, Koch 还建立了标本染色和实验性动物感染的方法,对鉴定病原体起到了重要的作用。随后,他和他带动的一大批学者相



图绪-3 Robert Koch
(1843~1910)

继发现了许多对人和动物致病的重要病原菌,如结核分枝杆菌、霍乱弧菌、脑膜炎奈瑟菌、痢疾志贺菌、白喉棒状杆菌等,促进了病原微生物学的发展,成为另一位微生物学的奠基人,

1892年,俄国学者 Iwanovski(1864~1920)发现烟草花叶病的烟叶汁通过除菌滤器后仍具有感染性。1898年,荷兰科学家 Beijerinck(1851~1931)重复上述试验后,提出烟叶汁中确实存在一种比细菌更小的传染性病原体,开创了人类对病毒的研究。同时 Loeffler 和 Frosch 发现患口蹄疫动物的淋巴液中也含有能通过除菌滤器的感染性物质,称滤过性病毒。1901年,美国科学家 Walter Reed 首先分离成功第一个人类病毒——黄热病毒。1951年,英国学者 Twort 发现了细菌病毒(噬菌体)。在20世纪早期,植物病毒、动物病毒、人类病毒和细菌病毒相继被分离出来。

随着病原微生物学实验技术的发展,人们不断探索防治传染性疾病的方法。早在明朝隆庆年间(1567~1572),中国古代人已采用人痘接种来预防天花,该方法先后传至朝鲜、日本、俄国和欧洲。在人痘接种预防天花的启发下,英国医生 Edward Jenner(1749~1823)在18世纪末采用牛痘来预防天花。随后巴斯德研制成炭疽病疫苗和狂犬病疫苗,德国学者 Behring 在1891年用白喉抗毒素成功地治疗白喉患儿,推动了预防医学和抗感染免疫的发展。德国化学家 Ehrlich 首先合成治疗梅毒的化学治疗剂“606”,该药是经过605次实验失败后才获得成功而取名,从而开创了微生物传染性疾病的化学治疗途径。此后一系列的磺胺类药物相继合成并得到广泛应用。1929年,英国细菌学家 Alexander Fleming 意外发现污染的青霉菌在固体培养基上可抑制葡萄球菌生长的现象,由此制备出青霉素滤液作进一步研究。1940年,H. W. Florey 等提取出青霉素G的纯品,经临床验证有抗感染的确切疗效,为抗生素的研究和生产翻开了第一页,鼓舞了人们寻找从微生物来源的具有抗菌活性的化合物。此后,链霉素、氯霉素、四环素、头孢霉素、红霉素、庆大霉素等抗生素相继被发现并广泛应用于临床,给感染性疾病的治疗带来了曙光。

20世纪中期,随着物理学、生物化学、遗传学、细胞生物学和分子生物学等学科的发展,许多高新科技技术的建立和融入,新仪器设备的应运而生,如电子显微镜、电子计算机、细胞培养、免疫学技术、分子生物学技术等日新月异,也促进了病原生物学实验技术的迅速发展。近20年来,一大批快速、特异的病原生物学诊断方法相继建立。如单克隆抗体技术、免疫荧光技术、酶联免疫吸附试验(ELISA)、聚合酶链反应(PCR)以及基因探针杂交技术等,为人类提供了新研究方法和手段,加速了人类对病原生物结构与功能的认识,使研究从细胞水平深入到分子水平,进而推动了病原微生物基因组结构、基因表达、致病机制及其疾病的诊断防治方法的发展。

二、病原生物学实验室生物安全

病原生物学实验教学是从事传染性物质操作的教学活动,涉及实验室生物安全(bio-safety for laboratories)。为避免病原微生物对操作者和相关人员造成实验室相关感染,防

止实验室污染泄漏对环境和公众的健康造成危害;保护试验材料免受污染,以保证实验的科学性;根据中华人民共和国国务院第 424 号令公布施行的《病原微生物实验室生物安全管理条例》和《实验室生物安全通用要求》(GB19489 2004. 10),为确保实验室生物安全,在实验教学中应严格遵守实验室生物安全的规范。

(一) 建立有菌观念、掌握无菌技术

病原生物学实验工作人员和进行实验的学生必须建立严格的有菌观念,掌握熟练的无菌操作技术。有菌观念是指细菌等微生物广泛地分布于自然界,即人或动物的皮肤、黏膜、排泄物;室内外的空气、尘埃;所有未消毒灭菌的物品上都存在各种微生物,在实验过程中以及一切医疗活动中都要防止这些微生物的污染。无菌操作技术是指在实验教学中防止自然界的微生物污染实验材料,防止具有感染性的实验材料传染人和污染环境的操作技术规范。

1. 从事病原生物学实验教学工作的人员必须身体健康,经过生物安全培训,具有生物安全意识、技术水平和业务能力。
2. 实验教学活动一般仅涉及第三、第四类病原微生物,尽量避免涉及高致病性病原微生物。建议学生实验室应具备一级生物安全防护水平(BSL-1),并配置生物安全柜;教学准备室应具备二级生物安全防护水平(BSL-2)。
3. 建立生物安全的规章制度。菌毒种和实验室应有专人管理。
4. 非实验室工作人员和上课教师、学生,不得进入实验室。
5. 实验教学应严格按照生物安全实验室操作技术规范进行,根据实验教学内容采取相应的个人防护措施。

(二) 无菌操作技术

1. 进入病原生物学实验室应配戴相应级别的个人防护装备,即防护服、防护口罩、防护帽、防护眼镜、手套等。实验完后按规范操作脱下,放到指定地点,进行适当消毒处理。
2. 用于无菌操作的器皿,应适当包装,吸管吹吸端应塞有棉花,严格消毒灭菌。
3. 经消毒灭菌的物品在使用过程中不得与未经消毒灭菌的物品接触,如不慎接触,应立即更换无菌物品。凡使用后有菌污染的物品,必须存放在规定的容器内,经过灭菌后才能洗涤。
4. 生物安全柜外的无菌操作,应在酒精灯旁进行。因酒精灯旁的操作不能避免感染性气溶胶的产生和传播,涉及含有危害程度第三类以上病原微生物的操作,应在生物安全柜内进行。
5. 接种环(针)于每次使用前后,应彻底烧灼灭菌。
6. 无菌试管或烧瓶于开塞后及塞回前,管口或瓶口应通过火焰烧灼,以杀死可能附着在管口或瓶口的细菌。开塞后的管口及瓶口应尽量靠近火焰,试管及烧瓶应尽量平放,切忌口部向上和长时间暴露于空气中。试管塞或烧瓶塞应握在手中,不能放在桌上。
7. 无菌吸管应使用橡皮球吹吸,不能用口吹吸,以免吹吸液经口感染或口腔内杂菌污染实验材料。
8. 保持无菌的实验用品的制备,如倾注琼脂平板等应在无菌室、超净工作台或生物安全柜内进行操作,病原微生物的接种,动物试验应根据其危害程度,在相应防护级别的条件

下进行。

9. 无菌室、超净工作台或生物安全柜在使用前后,应用紫外线灯照射(30min~1h)或用5%苯酚或5%甲酸喷雾消毒。定期检测染菌程度。

10. 离开实验室前,要浸泡消毒清洗手,方可离去。

(三) 学生实验室规则

1. 进入实验室前必须穿好实验室配备的工作服,离室时脱下,不得穿着工作服离开实验区。不得在实验室内穿露脚趾的鞋。

2. 必需的实验讲义、笔记本、文具等应放在指定的位置。其他非实验用品一律不准带入实验室。

3. 禁止在实验室内进食、饮水、吸烟、化妆和处理隐形眼镜,以免引起实验室相关感染。

4. 实验室内应保持安静,遵守秩序,不准打闹嬉笑,以免引起意外事故的发生。

5. 在教师指导下严格按照生物安全实验室操作技术规范进行实验。在实验过程中,若发生意外事故,如划破手指、打破菌种管、培养物外溢等,应立即报告教师,及时进行相应的处理,并报告实验室生物安全员,记录备案。

6. 实验完毕应将所用器材归还原处,整理好实验用品。需要培养的标本及时放入培养箱,需消毒处理的物品放到指定位置。未经许可,不得将任何实验材料,特别是菌种带出实验室。

7. 实验课结束前应清点实验物品,清点菌种管,若有缺失,应立即报告任课教师,查清后方能离开实验室。

8. 实验课结束后,应及时清除杂物、垃圾,做好实验室清洁卫生。离开实验室前应洗手,必要时用消毒液泡手。关好门窗、水电方可离开实验室。

(四) 生物安全实验室(BSL-1 和 BSL-2)规范操作注意事项

1. 严禁用口吹吸移液管,严禁将实验材料置于口内,严禁舔标签。

2. 所有的实验操作应按尽量减少气溶胶和微小液滴形成的方式进行。

3. 限制使用注射针头和注射器。除进行肠道外注射或抽取实验动物体液外,注射针头和注射器不能用于移液或其他用途。

4. 实验室应制订并执行处理溢出物的标准操作程序,出现溢出、事故以及明显或可能暴露于感染性物质时,必须向实验室负责人报告。实验室应如实记录有关暴露和处理的情况,保存相关记录。

5. 所有受到污染的材料、标本和培养物在废弃或清洁再利用之前,必须先严格消毒灭菌处理。

6. 污染的液体在排放到生活污水管道以前必须采用化学或物理学方法清除污染,根据所处理的微生物因子的危险度评估结果准备专门的污水处理系统。

7. 只有保证在实验室内没有受到污染的文件纸张才能带出实验室。

8. 涉及生物安全实验室仪器设备的使用规范见第2章。

(杨致邦)

第一篇

基本实验方法、仪器使用、试剂配制

第1章 基本实验方法

第一节 常用实验器材的准备

病原生物学实验中使用的各种器材需要做常规处理,否则易造成实验误差,影响实验结果。特别是在细胞培养工作中对所用器皿要求较高,用于病原微生物分离培养的实验用器材可分为:玻璃类器材、橡胶类物品、金属器械、塑料及有机玻璃类器皿共四大类。各种器皿的处理过程大致为三个步骤:

一、清 洗

(一) 玻璃器皿

要求透明、干净、无油迹,无任何毒性残留物,清洗过程可分为四个环节。

1. 浸泡 新购买的玻璃器皿表面常附有碱性物质及较多的尘埃,应先用自来水洗至无污垢,再用1%~2%稀盐酸溶液浸泡过夜。使用过的玻璃器皿立即浸入清水中,以免器皿内黏附的蛋白质干涸难于洗涤。

2. 刷洗 经过浸泡的玻璃器皿,一般多用软毛刷及洗涤剂刷洗。刷洗时注意不要损坏器皿内外表面光洁度,瓶角等部位不能留有未洗干净的死角。刷洗后要用自来水反复冲洗,将洗涤剂冲洗干净。消毒灭菌前应烘干或自然干燥。

3. 清洁液浸泡 清洁液由重铬酸钾、浓硫酸、蒸馏水按一定比例混合配制而成。具有较强的去污能力和氧化作用。清洁液对玻璃器皿无腐蚀作用,但对人及其他物品有较强的腐蚀

作用,配制时要多加小心,避免烧伤。玻璃器皿放在清洁液中最好过夜,至少要 6h 以上。

4. 冲洗 浸泡后的玻璃器皿必须要用流水冲洗,反复 10 次以上,直至清洁液全部冲洗干净,不留任何残迹。再用蒸馏水漂洗 2~3 次,三蒸水漂洗 1 次,烤箱烘干。

(二) 橡胶类物品

不能用清洁液浸泡。使用后经消毒灭菌的橡胶塞、培养瓶盖等应及时浸泡在清水中,用洗涤剂刷洗后放入洗涤剂水或 2% NaOH 液煮沸 10~20min。用自来水冲净后再以 2% HCl 液浸泡 30min,自来水冲洗,蒸馏水漂洗 3 次,三蒸水漂洗 1 次,晾干。新的橡胶塞带有滑石粉,先用自来水冲洗干净,再常规清洗。

(三) 金属器械

先反复用洗涤剂水洗刷,再用自来水冲洗,后用 75% 乙醇擦洗,蒸馏水漂洗 3 次,三蒸水漂洗 1 次,干燥。

(四) 塑料及有机玻璃类器皿

这类器皿主要是指用于细胞培养的培养板、培养皿及培养瓶等,多为进口的一次性商品,买回时已经消毒灭菌并包装密封,开包即可使用。但我国大多实验室还不能一次性使用,仍需清洗及消毒灭菌后反复使用。其方法是:使用后立即浸泡以防干涸,流水冲洗(不用刷洗),晾干,2% NaOH 液浸泡 12h,自来水冲洗;再用 2% HCl 液浸泡 30min,自来水冲洗;蒸馏水漂洗 3 次,三蒸水漂洗 1 次,自然干燥包装。

二、包 装

经清洗、晾干后的器皿必须包装后再进行消毒,以免取用时发生再次污染,包装材料常用牛皮纸及棉布等。将培养瓶、滤器、存放培养液的盐水瓶的瓶口部分做局部包装密封后,再用牛皮纸或棉布包起备用。重复使用的培养板可用优质塑料纸严密封口,注射器及金属器械可直接装入铝饭盒内。

三、消毒灭菌

实验室物品的污染是造成实验失败的主要原因,尤其是细胞培养。其污染主要来自实验材料的污染和操作人员无菌操作的失误或疏忽,加强对实验室物品的消毒和灭菌及进行无菌操作是防止实验室物品污染的重要环节。消毒灭菌的方法也因对象不同而异。主要分为三类:

(一) 实验室环境的消毒

1. 空气消毒 采用过滤系统对实验室空气进行消毒是最理想的方法,最好与恒温设备结合使用。常用紫外线照射消毒,通常紫外线灯装在 2.5 米高度以内,切忌边工作,边照射,以免造成人体皮肤伤害。还可用甲醛加高锰酸钾熏蒸消毒,效果较好,但刺激较大,房间空气消毒时人应及时离开。

2. 地面 通常用 3%~5% 来苏儿或 0.1% 苯扎溴铵溶液擦洗,过氧乙酸消毒能力较

强,0.5%的浓度 10min 即可杀死芽孢,可用于喷洒或擦洗地面。

3. 工作台和桌椅 表面可用紫外线照射,也可用 0.1%苯扎溴铵溶液或 0.5%的过氧乙酸擦洗。

(二) 器材的消毒

对于凡是耐高温高压的器材,可采用高压蒸汽灭菌,如金属类、玻璃器皿、橡胶类、布料类等。对于不耐耐高温高压的器皿,可用消毒液浸泡或 ^{60}Co 照射消毒。

(三) 液体的消毒

凡是不怕耐高温高压的溶液,可采用高压蒸汽灭菌。凡含有蛋白质等生物活性物的液体,如血清、酶、合成培养液等,因不耐高温,只能采用过滤除菌法。

(金 路)

第二节 病原微生物形态结构的观察方法

一、不染色标本的观察

【实验目的】

了解细菌标本不染色检查方法。

【实验原理】

细菌标本不经染色直接镜检,可观察生活状态下的细菌形态及其运动情况。许多杆菌、弧菌有鞭毛,有鞭毛的细菌具有动力,常能朝着一定方向移动,用适当的方法可在普通光学显微镜下观察。直接检查细菌动力是鉴别细菌的方法之一。

【实验材料】

1. 菌种 葡萄球菌、变形杆菌肉汤培养物。
2. 仪器 普通光学显微镜。
3. 其他材料 酒精灯、接种环、镊子、载玻片、凹玻片、盖玻片、凡士林、香柏油、擦镜纸等。

【实验方法】

细菌标本不染色检查的方法有压滴法和悬滴法。

1. 悬滴法

- (1) 取洁净凹玻片 1 张,在凹窝四周涂上少许凡士林。
- (2) 取洁净盖玻片 1 张,用接种环分别取葡萄球菌或变形杆菌液体培养物 2~3 环加在盖玻片中央。
- (3) 将凹玻片的凹窝中央对正菌液处合于盖玻片上(图 1-1)。
- (4) 迅速翻转凹玻片,用小镊子轻压,使盖玻片与凹窝边缘黏紧封闭,以防水分蒸发。
- (5) 将凹玻片置显微镜载物台上,调低显微镜的聚光器或缩小光圈,以减少光亮,使背

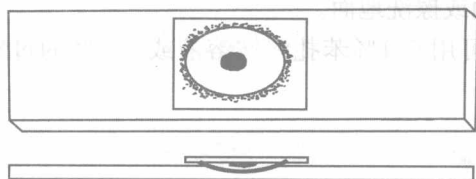


图 1-1 悬滴法

景较暗而易于观察。

(6) 先在低倍镜下找到悬滴,然后换用高倍镜观察。镜下可见有鞭毛的变形杆菌运动活泼,并可向不同方向迅速运动。无鞭毛的葡萄球菌只在一定范围内作位移不大的颤动,这是细菌受水分子撞击而引起的分子运动,即布朗运动(Brownian movement)。

2. 压滴法

- (1) 取洁净载玻片 1 张。
- (2) 用接种环分别取葡萄球菌或变形杆菌液体培养物 2~3 环加于载玻片中央。
- (3) 用小镊子取 1 张盖玻片轻轻覆盖在载玻片的菌液上。放置盖玻片时,应先将盖玻片的一端接触载玻片,然后缓慢放下,以免菌液中产生气泡。
- (4) 在低倍镜下对光找到细菌所在部位,然后用高倍镜观察细菌运动。

【实验结果】

变形杆菌有明显的定向运动,葡萄球菌只有布朗运动。

【注意事项】

1. 镜检时须适当降低聚光器或缩小光圈,视野不宜过亮。
2. 须注意区别细菌的真正运动和分子运动,前者是有方向性的位置移动,而后者则只在原地颤动。

二、染色标本的观察

细菌个体微小,呈半透明状。未经染色的细菌,在光学显微镜下只能观察到细菌的大致形态和大小。经过染色后的细菌,不但能清楚地观察到细菌的各种形态,还可对细菌进行初步鉴别。细菌涂片标本的染色方法可分为单染色法和复染色法两种。单染色法是指只用一种染料进行染色的方法,可清楚观察细菌的形态、大小,但对细菌无鉴别价值,复染色法是用两种或两种以上染料进行染色的方法,对细菌有辅助鉴别意义,故亦称鉴别染色法。常用的复染色法有革兰染色法、抗酸染色法等。

(一) 单染色法

【实验目的】

掌握细菌培养物涂片的制作、单染色法和用油浸镜观察细菌。

【实验原理】

用于细菌涂片标本染色的染料多为苯的衍生物,其带色基团与染料分子中不饱和双键的存在有关,含双键的部位化学性质极不稳定,易吸收光线而显色。细菌的等电点较低,在 pI 2~5 之间。在中性、碱性或弱酸性溶液中,整个菌体带负电荷,易被碱性染料着色。碱性染料是指电离后其显色离子带正电荷的染料,如用于细菌等微生物涂片标本染色的甲紫、亚甲蓝、碱性复红等均属碱性苯胺类染料,对细菌的核蛋白或胞壁成分有较强的亲和力。

【实验材料】

1. 细菌 葡萄球菌液体培养基或琼脂斜面 18~24h 培养物,大肠埃希菌液体培养基或琼脂斜面 18~24h 培养物。
2. 染液 甲紫染液、稀释复红染液或碱性亚甲蓝染液。
3. 其他 酒精灯、接种环、生理盐水、载玻片、香柏油、二甲苯、擦镜纸等。

【实验方法】

1. 细菌涂片的制作

(1) 涂片:取洁净载玻片一张,用记号笔将其划分为 2 格,在每一小格中央放置 1 接种环生理盐水。左手握菌种管,右手握笔样持接种环,先在酒精灯火焰上烧灼接种环,冷却后,分别挑取葡萄球菌、大肠埃希菌斜面培养物少许,在生理盐水中磨匀,涂成直径约 1cm^2 大小的区域。在第一小格中放置葡萄球菌,第二小格中放置大肠埃希菌。若为液体培养基,可直接涂布于载玻片上,不必加生理盐水(图 1-2、图 1-3、图 1-4)。

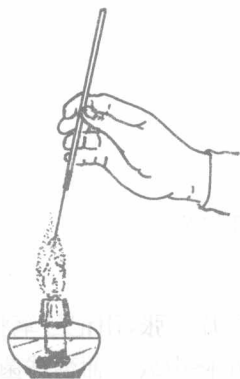


图 1-2 接种环灭菌



图 1-3 采取菌法

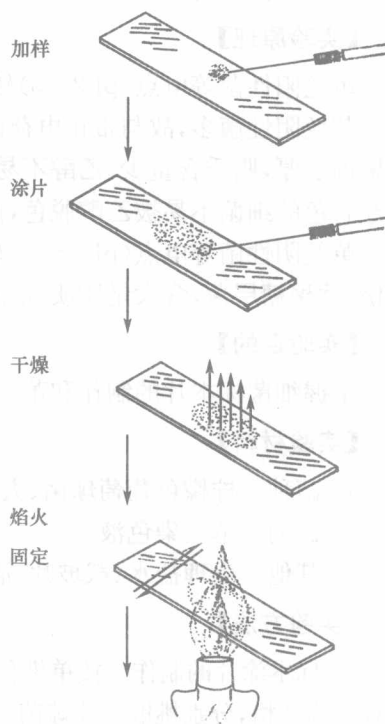


图 1-4 涂片的制作

(2) 干燥:涂片最好在室温下自然干燥,或将标本片接种面向上,置酒精灯火焰约 15cm 高处慢慢烘干,切不可直接放在火焰上烤干。

(3) 固定:将干燥后的标本片匀速通过酒精灯火焰来回 3 次,这样既可以杀菌,又能将细菌固定在玻片上,以免玻片上的细菌在染色过程中被水冲洗掉,还可增强细菌的着色性。

2. 染色 滴加甲紫或稀释复红或碱性亚甲蓝染液 1~2 滴,使染液盖满细菌涂膜,约 1~2min 后,用细小流水洗去染液,甩掉涂片上的水滴。按上述方法干燥。

3. 镜检 在染片涂膜中央处滴加一滴香柏油,在油浸镜下观察。