


全国高职高专卫生部规划教材配套教材
供医学检验专业用

微生物学检验

实验指导

主编 甘晓玲

 人民卫生出版社

全国高职高专卫生部规划教材配套教材

供医学检验专业用

微生物学检验 实验指导

主 编 甘晓玲

副主编 李剑平 郑韵芳

编 者 (以姓氏笔画为序)

万学勤	佛山科学技术学院	芮勇宇	南方医科大学南方医院
王明永	新乡医学院	陈 玉	重庆医药高等专科学校
甘晓玲	重庆医药高等专科学校	郑韵芳	福建卫生职业技术学院
付宝庆	大庆油田总医院	胡生梅	襄樊职业技术学院
朱 华	广西卫生管理干部学院	赵玉玲	赤峰学院医学院
李剑平	江西护理职业技术学院	曹德明	黑龙江护理高等专科学校
李 岩	辽宁中医药大学职业技术学院	黄静芳	苏州卫生职业技术学院
张发苏	安徽医学高等专科学校		

编写秘书 段巧玲

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

微生物学检验实验指导/甘晓玲主编. —北京:
人民卫生出版社, 2010. 8
ISBN 978-7-117-13169-8

I. ①微… II. ①甘… III. ①微生物学-医学检验-
高等学校:技术学校-教学参考资料 IV. ①R446. 5

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 125885 号

门户网: www.pmph.com 出版物查询、网上书店
卫人网: www.ipmph.com 护士、医师、药师、中医 师、卫生资格考试培训

版权所有, 侵权必究!

微生物学检验实验指导

主 编: 甘晓玲

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-67605754 010-65264830

010-59787586 010-59787592

印 刷: 北京市燕鑫印刷有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 9.5 插页: 1

字 数: 231 千字

版 次: 2010 年 8 月第 1 版 2010 年 8 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-13169-8/R·13170

定 价: 18.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社销售中心联系退换)

前 言

《微生物学检验实验指导》是按照教育部有关高等职业教育的精神和医学检验行业人才培养的要求而组织编写的,为《微生物学检验》(第3版)配套的实训教材。

本教材在编写中坚持“工学”结合的职教理念,坚持岗位和实践工作任务需要及“必须、实用”的原则,以突出理论知识的应用、满足岗位能力培养的需求为目的,结合培养目标以及专业教学计划、教学大纲要求,对各个实训内容进行了精心的设计和编写。

教材中实训内容包括“基本检验技术”、“综合技能训练”和“仿真实训”三部分、十二个实训内容。在编排顺序及内容上打破了传统的实验编排习惯,紧紧围绕以微生物检验工作任务为引领的职业能力培养目标,从基本训练到综合训练,以满足行业岗位的需要。其主要特点是:①各实训内容的编排按照先易后难,从基本检验技能到临床综合检验技能的顺序渐进训练;②重点介绍了与微生物检验岗位有关的基本操作技能,竭力做到岗位能力培养与行业工作任务相结合;③每项实验中点拨了与该实验有关的必备知识点,使理论知识与实践更好地结合;④为了师生今后工作方便,书后附录了常用培养基、染色液的配制及用途和菌种保存。

本书供医学检验技术专业使用。由于各地区、各学校进行检验的项目有所不同,因此,编排实训内容时考虑到教材的代表性、兼容性和适用性,各校可根据其培养目标、当地临床实际和本校教学资源、未来学生需求选用不同内容进行教学。

本教材的编写得到了参编者单位领导和同行们的支持和帮助,在此致以衷心的感谢。由于本专业的教材改革尚在探索实践中,为了进一步提高本书的质量,以供再版时修改,请前辈和广大师生在使用过程中不吝指正。

甘晓玲

2010年3月

目 录

模块一 基本检验技术	1
实验一 临床微生物检验工作认知	1
一、微生物实验室操作要求与规范	1
二、微生物检验实验室常用设备及使用	3
三、微生物检验前期准备	7
实验二 微生物镜检技术	11
一、光学显微镜油镜的使用与维护.....	11
二、革兰染色技术.....	13
三、不染色标本压滴法检查.....	15
实验三 细菌培养技术	17
一、培养基制备技术.....	17
二、细菌接种与培养技术.....	19
实验四 细菌常规鉴定技术	25
一、细菌形态鉴定.....	25
二、细菌培养鉴定.....	27
三、细菌生化鉴定.....	29
四、玻片凝集试验.....	32
实验五 微生物控制技术	35
一、物理法.....	35
二、化学法.....	38
三、消毒剂的消毒效果检查.....	40
模块二 综合技能训练	43
实验六 常见细菌检验技术	43

一、葡萄球菌的检验	43
二、链球菌的检验	46
三、大肠埃希菌的检验	49
四、沙门菌属和志贺菌属的检验	51
五、普通变形杆菌的检验	55
六、铜绿假单胞菌的检验	56
七、结核分枝杆菌的镜检	58
实验七 常见真菌的培养和鉴定	63
一、皮肤癣菌的检查	63
二、白假丝酵母菌的检查	65
三、新型隐球菌的检查	68
实验八 抗菌药物敏感试验与耐药性检测	71
一、纸片扩散法	71
二、稀释法	75
三、E 试验	79
四、联合药敏试验	81
五、 β -内酰胺酶和超广谱 β -内酰胺酶检测	83
模块三 仿真实训	87
实验九 临床标本未知细菌的检验	87
一、血液标本的未知细菌检验	87
二、尿液标本的未知细菌检验	90
三、粪便标本的未知细菌检验	93
四、痰液标本的未知细菌检验	96
实验十 医院感染监测	102
一、空气污染与消毒效果检测	102
二、人和物体表面卫生监测	105
实验十一 微生物检验质量控制活动	109
实验十二 微生物检验岗位基本技能水平测试	111
一、微生物检验基本技术操作能力测试	111

二、细菌的生物学特征辨认能力测试	113
三、微生物检验技术综合能力测试	113
附录一 常用染色液的配制及用途.....	116
附录二 常用培养基的配制及用途.....	122
附录三 细菌菌种的保存与管理.....	133
附录四 实训测试题参考答案.....	139

模块一 基本检验技术

实验一 临床微生物检验工作认知

一、微生物实验室操作要求与规范

【目的】

(一) 要求

1. 明确微生物实验室基本操作规则。
2. 明确实验室生物安全意外时的应急处理原则。
3. 学会生物废弃物的处置。

(二) 用途及意义

1. 通过学习微生物实验室基本操作要求与规范,为后期微生物实验活动奠定基础。
2. 认识微生物实验室的功能、特殊性和保障微生物实验室生物安全。
3. 强化无菌观念和生物安全意识。

【内容】

(一) 内容

1. 学习微生物实验室基本操作规则。
2. 学习实验室生物安全意外时的应急处理原则。
3. 学习生物废弃物的处置原则。
4. 实验室生物安全意外应急处理演练(模拟溢出污染的清除)。

(二) 必备知识点

1. 微生物的致病性与感染。
2. 无菌操作的概念及要求。
3. 生物安全实验室有关的法律法规。
4. 医院感染的监控与防治。
5. 消毒、灭菌有关的概念和方法。

【实训】

(一) 学习微生物实验室(BSL-1、BSL-2)基本操作规则

在进行微生物实验活动时,可能要接触实验标本、培养物、带菌材料或器具,为防止实验室感染和保证实验活动能安全、顺利地进行,必须遵守以下规则:

1. 实验前必须了解实验相关的生物安全要求,按《全国临床检验操作规程》进行规范操作。

2. 未经批准,无关人员不得擅自进入实验室工作区。BSL-2 实验室门上应标有国际通用的生物危害警示标志、负责人以及进入实验室的特殊要求等。

3. 凡接触微生物(尤其是致病性强的病原微生物)的实验活动时,应谨慎进行,确保自身和环境安全,实验后应用消毒剂消毒手和台面。

4. 在实验室工作时,必须穿着合适的工作服或防护服。在无菌室操作时,必须穿戴经消毒过的工作帽、口罩,以免污染。在进行可能接触到的血液、体液及其他具有潜在感染性的材料或感染性动物的操作时,应戴上合适的防护设备和手套。手套用完后,应先消毒再摘除,随后必须洗手。

5. 禁止把水、食物、食具带进实验室工作区域。严禁穿着实验室防护服离开实验室工作区域。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。

6. 严禁用口吸或反复吹吸移液管内液体,最好用一次性的无菌塑料吸管。不能向含有感染性物质的溶液中吹入气体。严禁将实验材料置于口内或舔标签。

7. 实验室应保持清洁整齐,并定期进行微生物实验室空气、实验台面消毒处理。定期对实验室设施、设备、材料进行检查,以确保符合国家有关标准。定期检查生物安全防护、菌(毒)种和标本的保存与使用、安全操作以及实验室排放的废气、废水及其他废物处置等制度的落实情况。

8. 在实验过程中,切忌使乙醇、乙醚、丙酮等易燃试剂接近酒精灯;如遇火险,用湿布阻燃灭火,必要时使用灭火器。

9. 所有的实验操作要按尽量减少气溶胶和微小液滴形成的方式来进行。

(二) 学习实验室生物安全意外应对处理原则

1. 建立分级(实验室、单位主管、省、市、国家)报告制度,发生突发事件时,根据事故的等级,逐级报告。

2. 出现溢出、事故以及明显或可能暴露于感染性物质时,应立即进行现场污染的妥善清除,并向实验室负责人报告,人员和动物从现场紧急撤离,现场处理后及时详细记录事故处理过程。

3. 对暴露人员进行医疗监护和医疗咨询;对受伤者进行医疗处理和完整医疗记录。事故处理后,实验室负责人应向单位的生物安全委员会作详细汇报,作出危险程度评估,以确定进一步的对策。

4. 实验过程中,盛有细菌的器皿意外破损,用布或纸巾覆盖受感染性物质污染的破碎物品。然后上面倒上消毒剂,并使其作用适当时间(如 30 分钟)。然后将布、纸巾以及破碎物品清理掉。再用消毒剂由外向内擦拭污染区域。用于清理的布、纸巾和抹布等应当放在盛放污染性废弃物、防漏、防穿透的容器内。在所有这些操作过程中都应戴结实的手套。如果机器正在运行时发生破裂或怀疑发生破裂,应关闭机器电源,让机器密闭 30 分钟使气溶胶沉积。所有破碎的离心管、玻璃碎片、离心桶、十字轴和转子都应放在无腐蚀性的、对已知相关微生物具有杀灭活性的消毒剂内。

5. 菌液误入口中,用 1:10 000 的高锰酸钾或 3% 双氧水漱口,必要时服用抗生素。污染手时,一般情况下,用普通肥皂和水彻底冲洗即可。高危时,用杀菌肥皂完全涂抹全手,搓洗至少 10 秒钟,用干净水冲洗后再用干净纸巾或毛巾擦干或用暖风干手器,也可用 0.05%~0.1% 苯扎溴铵溶液浸泡手消毒。试验台、生物安全柜等表面污染,常用 5% 含氯石灰溶液、3% 过氧化氢溶液或用含 1g/L 有效氯的次氯酸钠溶液(高危时用 5g/L)进行消毒,消毒 20 分钟以上。

(三) 学习生物废弃物的处置原则

各种标本因来源、性质不同,检验目的不同,故处置方法有所差异,但其基本原则是:①不能随意将实验材料(包括标本、培养物等)用完后立即倒入水槽或垃圾桶,必须经过灭菌处理后方可丢弃;②处理后废弃物应放在指定废弃物容器中;③由专人(或废物处置部门)送到专门的处置场地销毁。

(四) 模拟生物安全事故(溢出污染环境)应急处理演练

1. 准备

- (1)消毒液、菌液(已灭菌)、面盆、抹布、手套。
- (2)模拟一菌液污染实验台面的场景(角色扮演,人员分工)。

2. 处置方法

- (1)报告制度。
- (2)戴手套,穿防护服,必要时需进行脸和眼睛的防护。
- (3)用布或纸巾覆盖并吸收溢出物。
- (4)向纸巾上倾倒适当的消毒剂(如苯扎溴铵、甲酚皂溶液等),并立即覆盖周围区域。
- (5)使用消毒剂时,从溢出区域的外围开始,朝向中心进行处理。
- (6)作用适当时间后(如30分钟),将所处理物质清理掉。如果含有碎玻璃或其他锐器,则使用簸箕或硬的厚纸板来收集处理过的物品,并将它们置于可防刺透的容器中以待处理。
- (7)对溢出区域再次清洁并消毒(如有必要,重复3~6步)。
- (8)消毒浸泡污染材料后,将污染材料置于防漏、防穿透的废弃物处理容器中。
- (9)在成功消毒后,通知主管部门目前溢出区域清除污染工作已经完成。
- (10)提交事故现场处理过程记录。

3. 注意事项

- (1)注意选择合适消毒液,消毒时间要充分。
- (2)防止消毒过程中的污染扩散,注意对消毒操作者的防护。

二、微生物检验实验室常用设备及使用

【目的】

(一) 要求

1. 认识微生物实验常用设备及用途。
2. 学会微生物实验常用设备的使用、一般维护。
3. 学会常用器材的清洗方法。

(二) 用途及意义

通过对常用设备、器材的感性认识,为后期微生物实验设备的使用和安全操作奠定基础。

【内容】

(一) 内容

1. 认识微生物检验的常用设备及用途。
2. 玻璃器材的常用规格及清洗方法。

(二) 必备知识点

1. 显微镜的结构,油镜使用方法。

2. 消毒灭菌、无菌技术的相关概念。
3. 生物安全柜、高压蒸汽灭菌器的原理、构造。

【方法】

(一) 准备

1. 实验设备 显微镜、培养箱、干燥箱、高压蒸汽灭菌器、超净工作台、生物安全柜、接种环等。
2. 玻璃器材 试管、培养皿、三角烧瓶、定量刻度吸管、载玻片、量筒、量杯等。

(二) 见习步骤

1. 介绍常用实验设备(常用设备的展示、操作示教或小组演示)

(1) 显微镜:

1) 普通光学显微镜: 普通光学显微镜通常以自然光或灯光为光源, 其波长约 $0.2\mu\text{m}$ 。在最佳条件下, 显微镜的最大分辨率为波长的一半, 即 $0.2\mu\text{m}$, 而肉眼所能看到的最小形象为 0.2mm , 故在普通光学显微镜下用油镜放大 1000 倍, 可将 $0.2\mu\text{m}$ 的微粒放大到 0.2mm , 肉眼便可以看清。一般细菌大于 $0.2\mu\text{m}$, 故用普通光学显微镜均能清楚看到。

普通光学显微镜的构造: 普通光学显微镜的构造主要分为三部分: 机械部分(镜座、镜臂、镜筒、转换器、载物台、调节器)、照明部分(反光镜、聚光器)和光学部分(目镜、物镜)(图 1-1)。

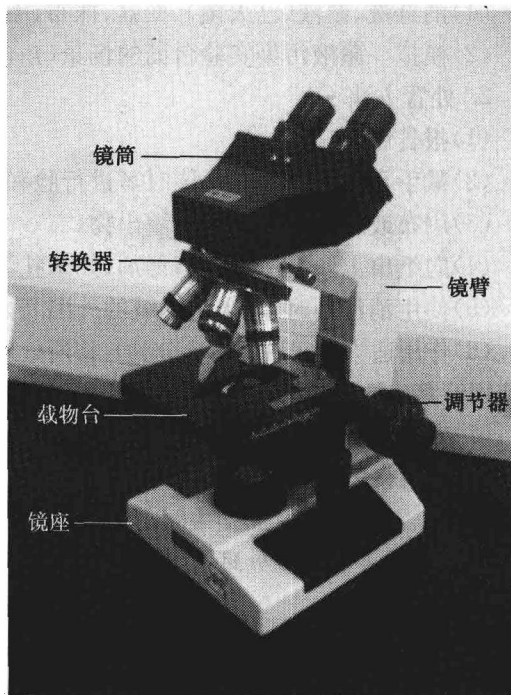


图 1-1 普通光学显微镜

显微镜油镜的操作详见实验二。

显微镜的维护: ①显微镜使用完毕, 必须用乙醚擦除镜头上的香柏油, 以保持镜头的清洁, 否则因香柏油干固于镜头上导致物像无法看清; ②显微镜是精密仪器, 切勿随意拆卸和碰撞; ③显微镜要避免受热, 以免引起镜片的开胶与脱落; ④显微镜选择干燥的房间存放, 显微镜箱内应放置干燥剂; ⑤保持显微镜的清洁, 防止光学元件表面落入灰尘或真菌污染; ⑥显微镜不能和具有腐蚀性的化学试剂(如强酸、强碱等)放在一起; ⑦细调节器向一个方向转动数周遇阻力时, 切忌用力, 应向反方向转动; ⑧不用时转动转换器, 将物镜转成“八”字形, 载物台降至低点, 下降聚光器, 关闭光圈, 套上保护罩。

2) 暗视野显微镜: 使用的集光器为特制的暗视野集光器, 暗视野集光器的中央不透光, 光线不能直接射入镜筒, 故背景视野黑暗无光。从集光器四周边缘斜射到标本部位的光线, 经菌体散射后而进入物镜。故可以在黑暗的背景中看到发亮的菌体, 明暗反差提高了观察的效果。暗视野显微镜多用于不经染色的活菌和螺旋体的形态及运动观察。

3) 荧光显微镜: 用能量较大的紫外光或蓝紫光为光源, 激发荧光色素, 使之成为可见光。细菌经荧光色素染色后, 置于荧光显微镜下, 即可在暗色的背景下看到发射荧光的细菌。

(2)培养箱:用于培养细菌,多采用电加热方式,有直热式培养箱、隔水式培养箱。此外,目前市上还有电热恒温培养及干燥两用箱(彩图 1)。

使用与维护应注意以下事项:①箱内不应放入过热或过冷之物,取放物品时,应随手关闭箱门以维持恒温;②培养箱最低层温度较高,培养物不宜与之直接接触;③箱内培养物也不应放置过挤,以保证培养物温度均匀;④应经常观察并记录培养箱的温度。

(3)干烤箱:又称烤箱,主要用于烤干物品或干热灭菌。电热恒温干烤箱主要由箱体、电热器和温度控制器三部分组成。干烤箱体是由双层金属板制成的方形箱,夹层充以石棉,箱壁中装有电热线圈和鼓风机,箱外有温度计和自动温度控制器等装置,可自动调节箱内温度。

使用与维护应注意以下事项:①放入箱内灭菌的器皿不宜放得过挤,而且不得使器皿与内层底板直接接触;②接通电源后使温度逐渐上升至 160°C 并维持 2 小时左右;③灭菌完毕,关闭电源,待温度自动下降至 50°C 以下再开门取物;④干烤灭菌过程中注意对温度观察监控。

(4)高压蒸汽灭菌器:高压蒸汽灭菌器是一个能密闭、耐高温和高压的双层金属圆桶,两层之间盛水。外壁坚厚,其上或前方有金属厚盖,盖装有螺旋,借以紧闭盖门,因通入的蒸汽不能外逸,锅内压力增高,温度也随之升高,杀菌力也随之增强。高压蒸汽灭菌器上装有排气阀、安全阀,以调节器内压力和保障安全,装有的温度计和压力表显示内部温度和压力。高压蒸汽灭菌器是目前最有效和可靠的灭菌方法。可用于培养基、生理盐水、医疗器械、药品、纱布、敷料和隔离衣等灭菌。

高压蒸汽灭菌器的种类按其原理分“下排气式”高压蒸汽灭菌器、预真空式高压蒸汽灭菌器。“下排气式”高压蒸汽灭菌器是蒸汽在压力作用下进行灭菌,由上而下置换较重的空气并通过灭菌器的排气阀(装有 HEPA 过滤器)排除。有手提式、直立式(彩图 2)及横卧式等多种类型;它们的结构和灭菌原理基本相同。预真空式高压蒸汽灭菌器可以在蒸汽进入前使空气从灭菌器中排出。气体通过一个装有 HEPA 过滤器(高效空气过滤器)的排气阀排出。在灭菌结束时,蒸汽自动排出。这种灭菌器可以在 134°C 下进行,3 分钟即可。由于要抽真空,而不能用于液体的高压灭菌。

用法及注意事项:①手提式和直立式高压蒸汽灭菌器,用时须加适量水至灭菌器内,放入待灭菌物品后,盖好盖门并将螺旋拧紧。加热,待容器内压力升至 0.034MPa 时打开排气阀,使容器内冷空气完全排出。②蒸汽压力上升至所需数值(一般为 0.103MPa 、温度约为 121°C)时开始计算时间,持续 15~20 分钟。③灭菌完毕,须关闭电(热)源或蒸汽阀门,待其压力自然下降至零时,方可开盖。④灭菌物品放入时,不要塞得过紧,包裹亦不宜过大。⑤不适用于不耐高热、不耐高压和不耐潮湿的物品的灭菌。

(5)超净工作台(超净台):超净台是 20 世纪 80 年代问世的一种防止污染的装置,主要功能是利用空气层流装置排除工作台面顶部包括微生物在内的各种微小尘埃。其工作原理是:通过电动装置使空气经高效过滤器除尘、洁净后,通过均压层,以层流状态均匀垂直向下进入操作区(或以水平层流状态通过操作区),使台面始终保持在流动无菌空气的控制之下。而且,在接近外部的一方有一道高速流动的气帘防止外部带菌空气进入。

超净工作台的使用:①接通电源,使用前应提前 15~30 分钟同时开启紫外灯和风机组工作;②工作台面上禁止存放不必要的物品,以保持工作区的洁净气流不受干扰;③操作区内尽量避免作用明显扰乱气流流向的动作;④使用结束后,用消毒液清理工作台面后打开紫

外灯,15~30 分钟后关闭紫外灯,关闭电源;⑤长期不使用的工作台应拔下电源插头。

维护方法:①定期(一般为一周)对环境周围进行灭菌工作,同时经常用纱布蘸乙醇或丙酮等有机溶剂将紫外线杀菌灯表面擦干净,保持表面清洁;②根据环境的洁净程度,可定期(一般为 2~3 个月)将粗滤布拆下清洗或给予更换;③当风速不能达到规定要求时,必须更换高效空气过滤器。

(6)生物安全柜:生物安全柜是用来保护操作者本人、实验室环境以及实验材料,避免受操作过程中可能产生的感染性气溶胶和溅出物的感染。当处理感染性物质,或空气传播感染的危险增大,或进行极有可能产生气溶胶的操作(如离心、研磨、震动等)时,应使用生物安全柜(彩图 3)。

根据生物安全防护水平的不同,生物安全柜可分为 I 级、II 级和 III 级。① I 级:用于人员安全与环境保护的通风安全柜,其向内的非循环吸入气流必须远离操作者。② II 级:有四种类型,分别是 A1 型、A2 型、B1 型、B2 型。用于人员、产品安全与环境保护的通风安全柜,其位于前部开口区域的向内吸入气流是为了保护人员安全;垂直气流经高效过滤器过滤是为了保护检品,避免污染;为了保护环境,排出的气体须经过高效过滤器过滤。③ III 级:一个完全密闭的、不漏气结构的通风安全柜。在安全柜内的操作是通过与安全柜相连接的橡胶手套控制的。安全柜应维持约 124.5Pa 的负压。送入气流经数个高效过滤器过滤后送入安全柜。排出气流应经双层高效过滤器过滤或通过高效过滤器过滤和焚烧来处理。

II 级生物安全柜是目前应用最为广泛的柜型,可保护工作人员、环境和操作对象。

(7)接种环(针):从检验标本或培养物中取材进行细菌涂片染色或接种时,必须使用接种环(针)。接种环(针)是细菌培养时常用的一种接种工具,由塑料接种柄、接种杆和接种环(针)构成,前端是一段长约 4~5cm、硬度适中的镍合金丝或白金丝或电阻丝,细铁丝顶端弯曲成环状,无环者则称接种针(彩图 4)。

使用之前先用酒精灯将接种环(针)烧红灭菌,冷却后蘸取标本或细菌培养物。操作完毕,接种环(针)要烧灼灭菌。

2. 认识玻璃器材的种类及用途(展示各规格器材)

(1)试管:多用于微生物的鉴定与菌种保存。常用试管有下列几种:7.5mm×100mm、8.5mm×150mm、10mm×130mm、10mm×150mm。

(2)培养皿:主要用于细菌的分离培养,常用的培养皿大小有 50mm、70mm、90mm 等几种,现在医院多采用一次性塑料培养皿。

(3)三角烧瓶:多用于贮藏培养基和生理盐水等溶液,有 50ml、100ml、250ml、500ml、1000ml、2000ml、5000ml 等多种。

(4)移液管或刻度吸管:用于吸取小量液体,常用的容量有 10 μ l、20 μ l、50 μ l、100 μ l、200 μ l、0.5ml、1ml、2ml、5ml、10ml 等。现多用可调式移液管和一次性的无菌塑料吸管作为移液辅助器进行加样。

(5)毛细吸管:用于吸取标本、分离血清等。

(6)载玻片、凹玻片及盖玻片:载玻片供作涂片和血清学试验用。凹玻片供制作悬滴标本用。盖玻片用于覆盖载玻片和凹玻片上的标本。

(7)注射器:50~100ml 大型注射器,多用于抽羊血。1~10ml 注射器供作动物试验和其他检验工作用。注射针头的规格亦有多种,视用途和注射途径选用大小合适的针头。

(8)量筒、量杯:用于量取较多液体时使用,大小不一,有 50ml、100ml、250ml、500ml、1000ml 等几种规格。不宜装入温度很高的液体。

3. 玻璃器材的清洗

(1)新的玻璃器皿:因含有游离碱,应在清洁液或 2%盐酸内浸泡数小时,再用自来水冲洗干净,晾干备用。

(2)用过的玻璃器材:①含油脂的玻璃器材:将试管倒置于铺有粗吸水纸的铁丝筐内,置 100℃干烤 30 分钟,取出后放入 5%碳酸氢钠水中煮两次,最后用肥皂水刷洗干净;②盛有培养物的玻璃器材:先经高压蒸汽灭菌和溶化,趁热倒出其中的培养基,用 5%热肥皂水刷,最后用清水冲净;③吸管:将吸管置于 3%甲酚皂液内浸泡 24 小时,再用肥皂水洗涤一次,最后以清水冲洗干净;④试验后的载玻片及盖玻片:先经消毒液浸泡 6~8 小时,放入 5%肥皂水中煮沸 10 分钟,然后用试管刷蘸肥皂水刷洗,用清水冲净,最后用 95%乙醇浸泡,取出后擦干,备用。

(3)注意事项:

1)含有固体培养基的玻璃试管、平皿要趁热清洗,避免残余琼脂再次凝固。

2)玻璃试管和玻璃平皿用清水洗涤后,玻璃表面应水层均匀,不挂有水珠。

三、微生物检验前期准备

【目的】

(一) 要求

1. 了解检验单的通常格式和内容。
2. 明确培养基的选择原则。
3. 学会无菌器材的准备。

(二) 用途及意义

1. 了解临床基本信息,判断标本的性质和标本是否符合检验项目的要求,选择标本前处理的方法以及进一步的检验工作。
2. 作好实验前的准备,确保检验过程的顺利进行。

【内容】

(一) 内容

1. 检验单的核对检查(场景设计教学)。
2. 培养基的选择与准备。
3. 无菌器材的包装。

(二) 必备知识点

1. 检验前质量控制和标本处理原则 检验前的准备是保证检验结果正确的前提,标本应符合检验项目要求,才能提高检出率。根据临床信息、检验项目,采集不同的标本;根据标本的来源和性质,有些标本直接染色检查,另一些标本在检验前须进行离心、增菌或角质化等处理后再进行检验。

2. 检验的基本程序 针对不同的检验目的,检验方法有所不同,因此,检验工作前,应考虑三方面:采什么标本(对象),做什么检验(项目),怎样检验(方法),针对检验要求,确定检验方案。检查对象虽不同,但检验的基本过程是一致的,即形态检查、培养特性检查和生

化、血清学鉴定。病原体鉴定后还需做药敏试验,指导临床选药。

3. 培养基的有关概念及选择原则 培养基是培养微生物的饲料。不同的微生物,其营养要求不同,根据检验的目的菌,选择相应的培养基。有时检验未知的病原菌,则根据标本来源(如血液、尿液等)、初步涂片检查结果,按常规选用培养基(如血平板和弱选择培养基)。

【方法】

(一) 准备

1. 细菌学检验单。
2. 增菌培养基、琼脂平板、载玻片。
3. 三角烧瓶、平皿、吸管、试管、棉花、棉线、纱布、牛皮纸、回形针等。

(二) 步骤

1. 检验单的核查 检查检验单上的患者姓名、性别、年龄、临床诊断或症状、标本类型、来源、送检目的以及是否使用抗生素、采集时间等内容,并进行登记,注意登记检验单的编号、实验室编号或条形码信息,核对检验单与标本是否一致。对不符合采集规定的标本或与检验单不对应的标本予以退回、重新采集等。

2. 标本处理 根据检验目的,可直接涂片镜检,选择适宜的培养基作增菌培养或分离培养。

3. 培养基的准备 培养基最好新鲜配制。临床工作量大时,可将常用培养基按配方制备好后冷藏备用。根据检验目的,选择分离和鉴定所需要的培养基。培养基从冰箱或冷库中取出后,静置于操作台上,在培养基平皿底部编上标本号,确保与检验单相一致。琼脂平板容易在表面出现凝集水,影响细菌分离培养的效果,可置于培养箱中,待培养基稍干燥后再接种标本。分离不耐寒的细菌如脑膜炎球菌、淋病奈瑟菌时,培养基宜在培养箱中预温。培养基选用后即可进行病原体的相关检验工作。

4. 无菌器材的包装准备 在检验工作中,需要大量的无菌平板、试管等用于分装培养基或做鉴定试验等,因此,在培养基灭菌的同时,需准备无菌器材。

(1) 无菌平皿(培养皿):①洗净平板,滤干水分;②装在专用金属平皿筒内,进行干热灭菌 160°C 2 小时,或高压蒸汽灭菌, 0.103MPa (或 $1.05\text{kg}/\text{cm}^2$) 15~20 分钟,再置烤箱内烤干备用;也可用牛皮纸包裹平皿(10 个/包),采用高压灭菌, 0.103MPa (或 $1.05\text{kg}/\text{cm}^2$) 15~20 分钟,置烤箱内烤干备用。

(2) 无菌试管:盛培养基用的试管管口必须用瓶塞塞紧,其方法是:①洗净试管,滤干水分;②选择大小适宜的瓶塞,瓶塞直径要保证在塞入试管口内时,无缝隙、松紧适宜、长短适中。瓶塞塞入试管后,其长度的 $2/3$ 应在试管内,外露 $1/3$ (彩图 5);③集中放入小竹筐中,筐口用纸包裹(也可直接将塞好瓶塞的试管用纸包裹),用绳扎紧;④高压蒸汽灭菌, 0.103MPa (或 $1.05\text{kg}/\text{cm}^2$) 15~20 分钟备用。

(3) 无菌三角烧瓶:①洗净三角烧瓶,滤干水分;②选择大小适宜的瓶塞,瓶塞直径要保证在塞入管口内 $2/3$,无缝隙、松紧适宜、长短适中;③于瓶塞和瓶口外再包以厚纸,用线扎紧,以防灭菌后瓶口被外界细菌所污染;④用高压蒸汽灭菌, 0.103MPa (或 $1.05\text{kg}/\text{cm}^2$) 15~20 分钟备用。

(4) 无菌吸管及毛细吸管:①取少许松散棉花,中心稍厚四周要薄,放置于管口;②用拉直之回形针一端放在棉花的中心,轻轻从管口端向内塞入,松紧必须适中,棉花要不易脱落,通气性能符合需要;③外露棉花纤维用火焰烧去;④灭菌方法:可将吸管(或毛细吸管)装入

金属筒内进行高压或干烤灭菌;也可以将每支吸管用纸条从吸嘴尖端包起,逐步向上包裹,将吸管全部包紧,再进行高压灭菌,0.103MPa(或 $1.05\text{kg}/\text{cm}^2$)15~20分钟备用(彩图6)。

(三) 注意事项

1. 塞入吸管中的棉絮要松散适中。
2. 检验过程中所需用的玻璃器皿,如平皿、试管及吸管等,均需清洗晾干,包装灭菌处理后使用。
3. 玻璃试管、烧瓶在灭菌前必须加塞和纸包裹,以保证其灭菌后使用时管(瓶)内不被外界污染。
4. 瓶塞可用棉制的塞或胶塞,现多用胶塞。棉塞的制备方法:①选取大小适宜的数层方形纱布[以不同大小规格的管(瓶)口为模板],摊开,将棉花撕成大小适宜、中心稍厚四边较薄的圆片状,用竹棒放在棉花的中心,轻轻从管(瓶)口向内塞入,拔去竹棒,然后用纱布的4个角对应十字交叉打结即成;②也可将棉花做成大小适宜、厚薄均匀的方块,从一边卷起,边卷边将两侧毛边向内折入,要求棉塞两端与周围必须平滑。

(张发苏 甘晓玲)

【实训测试】

(一) 单项选择题

1. 在微生物实验室进行实验操作时,下列哪一项是错误的
 - A. 不得把食物带进实验室
 - B. 实验后必须用消毒剂消毒手和台面
 - C. 必须穿实验服进工作区域
 - D. 可以带入书本等资料
 - E. 实验完毕离开实验室时要整理台面
2. 试验台被污染时,用消毒剂覆盖污染区域的消毒时间不少于
 - A. 1min
 - B. 3min
 - C. 5min
 - D. 10min
 - E. 20min
3. 手提式高压蒸汽灭菌器排出冷空气时,蒸汽压力需上升至
 - A. 0.034MPa
 - B. 0.055MPa
 - C. 0.069MPa
 - D. 0.103MPa
 - E. 0.137MPa
4. 干热灭菌的错误操作是
 - A. 灭菌物不能有水
 - B. 加热过程中不能开箱门
 - C. 降温不能太快
 - D. 关闭电源后即可开箱门
 - E. 箱内温度不可超过 180°C
5. 临床微生物实验室中生物安全柜多选用
 - A. I级
 - B. II级
 - C. III级
 - D. II级及II级以上
 - E. III级及III级以上
6. 吸管上端塞入棉花,制作无菌吸管
 - A. 是为了防止菌液吸入口
 - B. 过滤有菌空气
 - C. 棉花要塞紧,并且致密
 - D. 干烤灭菌可以超过 160°C
 - E. 以上均不对
7. 试管塞塞入试管的长度应为试管塞全长的
 - A. 2/3
 - B. 1/3
 - C. 3/4
 - D. 1/4
 - E. 1/2

(二) 多项选择题

- 菌液误入口中,应选用什么漱口
 - 1:10 000 高锰酸钾溶液
 - 3%过氧化氢
 - 1%~2%甲酚皂溶液
 - 2%~5%甲酚皂溶液
 - 75%乙醇溶液
- 手表面轻度被污染时,处理的方法有
 - 肥皂和清水冲洗
 - 用杀菌肥皂完全涂抹全手
 - 消毒时间不应少于10秒
 - 2%甲酚皂溶液浸泡手10分钟
 - 30%过氧化氢溶液浸泡手10分钟
- 对检验单要仔细核对
 - 采集时间
 - 标本类型、来源
 - 是否使用抗生素
 - 送检目的
 - 姓名、性别、年龄、临床诊断或症状
- 琼脂平板在接种标本前应
 - 在琼脂平板的盖上编号
 - 在琼脂平板的底上编号
 - 分离不耐寒的细菌时,培养基宜在培养箱中预温
 - 待琼脂平板稍干燥后再接种标本
 - 冰箱或冷库中取出后,即可接种

(三) 简答题

- 为防止实验室微生物感染,必须注意哪些事项?
- 请简述几种光学显微镜光源的区别。
- 油镜使用完毕后为什么必须擦去香柏油?
- 请指出检验报告单的内容填写是否规范、完整,请加以完善(图1-2)。

××××医院 检验报告 标本号No0009197	
收费通知单	
姓名 <u>王兰</u>	姓名 <u>王兰</u> 年龄 <u>27</u> 性别 <u>女</u> 科别 <u>内</u> 病区 <u>18</u> 床号 <u>2</u>
年龄 <u>27</u>	
性别 <u>女</u>	诊断
科别 <u>内</u>	<u>尿路感染</u>
病区 <u>18</u>	
床号 <u>2</u>	标本 <u>中段尿</u>
检验目的	检验目的
<u>细菌培养</u>	<u>细菌培养</u>
药敏	药敏
	送检日期
检验费 <u>110元0角0分</u>	<u>2010年1月12日</u>
收费者 _____	收到日期
<u> </u> 年 <u> </u> 月 <u> </u> 日	<u>2010年1月12日</u>
	医师签章 <u>蒋萌萌</u> 检验者 _____ 复核者 _____ 年 月 日

图 1-2 细菌检验单