

程东庆 主编

病原生物学检验 实验指导

BINGYUAN SHENGWUXUE JIANYAN
SHIYAN ZHIDAO



浙江工商大学出版社
ZHEJIANG GONGSHANG UNIVERSITY PRESS

病原生物学检验实验指导

程东庆 主编



浙江工商大学出版社
ZHEJIANG GONGSHANG UNIVERSITY PRESS

图书在版编目(CIP)数据

病原生物学检验实验指导 / 程东庆主编. —杭州:
浙江工商大学出版社, 2014. 6
ISBN 978-7-5178-0230-3

I. ①病… II. ①程… III. ①病原微生物—医学检验
②病原微生物—实验 IV. ①R446.5 ②R37-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 010376 号

病原生物学检验实验指导

主 编 程东庆

责任编辑 刘 韵

封面设计 王好驰

责任校对 傅 恒

责任印制 包建辉

出版发行 浙江工商大学出版社

(杭州市教工路 198 号 邮政编码 310012)

(E-mail: zjgsupress@163.com)

(网址: <http://www.zjgsupress.com>)

电话: 0571-88904980, 88831806(传真)

排 版 杭州朝曦图文设计有限公司

印 刷 杭州恒力通印务有限公司

开 本 710mm×1000mm 1/16

印 张 9.75

字 数 191 千

版 印 次 2014 年 6 月第 1 版 2014 年 6 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-5178-0230-3

定 价 27.00 元

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江工商大学出版社营销部邮购电话 0571-88904970

编写委员会

- 主 编 程东庆(浙江中医药大学)
- 主 审 陈 瑜(浙江大学医学院附属第一医院)
- 副主编 王贤军(杭州市第一人民医院)
- 曹俊敏(浙江省中医院)
- 陈宜涛(浙江中医药大学)
- 编 委 杨雪静(浙江省中医院)
- 周青雪(杭州市第一人民医院)
- 潘佩蕾(浙江中医药大学)
- 周芳美(浙江中医药大学)
- 李小余(湖州师范学院)
- 甘 力(浙江中医药大学)

前 言

2002 年我校开始招收医学检验专业学生至今,不知不觉中我们已承担了十多轮的“临床微生物学与检验”课程的教学,全体编委在总结以往教学和临床经验的基础上,编写了这本实验教材,并根据教学计划中课程名称的调整,将本教材定名为《病原生物学检验实验指导》。

全书分为基本技能训练、综合性实验、临床模拟标本的设计性实验三部分,基本技能训练部分强调对学生的基础理论、基本知识和基本操作的训练,并整理了一个技能过关考核项目表供学生自查。综合性实验部分系统介绍了常见细菌的培养和鉴定、常见真菌检测技术、病毒检测技术以及寄生虫的检测技术。设计性实验部分,则制备了有特定目标菌的临床模拟标本,要求学生自行设计检验方案并开展相关实验,最后给出检测报告,以缩短学校实验室教学与临床工作的距离。

为适合实验教学工作的实际开展,本教材改变了以往教材中的章节框架结构,而是根据理论教材中的章节,选择合适的实验内容,结合教学课时,按实验序号进行编排,以方便排课。

本教材在朱君华院长的鼓励和关怀下组织编写,并得到了各参编单位的大力支持和关心,在此一并表示衷心的感谢!

虽然编者已尽心尽力,但限于我们的学术水平和编写能力,本教材肯定存在欠缺和错漏,恳请广大读者指正。

程东庆

2014 年 6 月

目 录

微生物免疫实验室安全卫生制度	001
微生物免疫实验室意外的紧急处理办法	002

第一部分 基本技能训练

实验一 培养基的配制	005
实验二 消毒灭菌	010
实验三 细菌的分离培养	019
实验四 纯种细菌培养法	023
实验五 细菌的基本形态和特殊结构观察	028
实验六 细菌涂片的制备及染色	033
实验七 细菌培养特征的观察	038
实验八 细菌的生化反应	041
实验九 抗菌药物敏感性试验	053
基本技能过关考核项目记录卡	058

第二部分 综合性实验

实验一 临床常见球菌的分离培养及鉴定	061
实验二 肠杆菌科细菌的选择培养和血清学分型鉴定	068
实验三 大肠埃希菌、沙门菌、志贺菌的生化鉴定	071
实验四 肠杆菌科其他细菌的培养及鉴定	075
实验五 肠杆菌科未知菌的数字编码鉴定	078
实验六 非发酵菌和其他革兰阴性菌的分离鉴定	081
实验七 需氧革兰阳性杆菌、分枝杆菌、厌氧菌及钩端螺旋体	085
实验八 真菌的培养及鉴定	089

实验九 病毒的培养及检测	093
实验十 寄生虫病的病原学诊断	096

第三部分 设计性实验

临床模拟标本设计性实验的总体安排	101
临床模拟标本细菌学检验的实验设计书要求	102
临床模拟标本细菌学检验的实验记录要求	103
实验一 血液标本的细菌学检验	104
实验二 尿液标本的细菌学检验	107
实验三 生殖道标本的细菌学检验	110
实验四 肠道标本的细菌学检验	112
实验五 呼吸道标本的细菌学检验	115
实验六 脑脊液标本的细菌学检验	121
实验七 脓液及创伤感染分泌物的细菌学检验	123
附录一 常用器具的清洗	125
附录二 常用的培养基	126
附录三 常用试剂	135
附录四 麦氏(Mcforland)比浊法	138
附录五 部分实验结果图片	139

微生物免疫实验室安全卫生制度

1. 本实验室从事与病原微生物菌(毒)种及样本有关的研究、检测等活动,涉及生物安全一级、二级防护,实验人员须经过生物安全知识培训后方可进行实验。

2. 实验人员必须遵守国家统一颁发的《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》和《病原微生物实验室生物安全管理条例》。

3. 进实验室必须穿白大衣,离开时脱下反折保存,以防微生物尤其是病原微生物的四处传播。

4. 全部操作应严格按操作规程进行,遇到菌液溢出、皮肤破损或菌液接触身体等意外情况发生时,应立即报告指导教师,切勿隐瞒。

5. 实验需进行培养的材料,应做好标记(包括姓名、菌种名称、时间等),放于指定的地点进行培养。实验室中的菌种和物品等,未经许可,不得带出实验室。

6. 对易燃、易爆、剧毒等危险品严格管理。实验过程中,切勿使乙醇、乙醚、丙酮等易燃物品接近火焰。如遇火险,应先关掉火源,再用湿布或沙土掩盖灭火。必要时用灭火器。

7. 各类仪器设备、电器的使用应严格遵守操作规程。

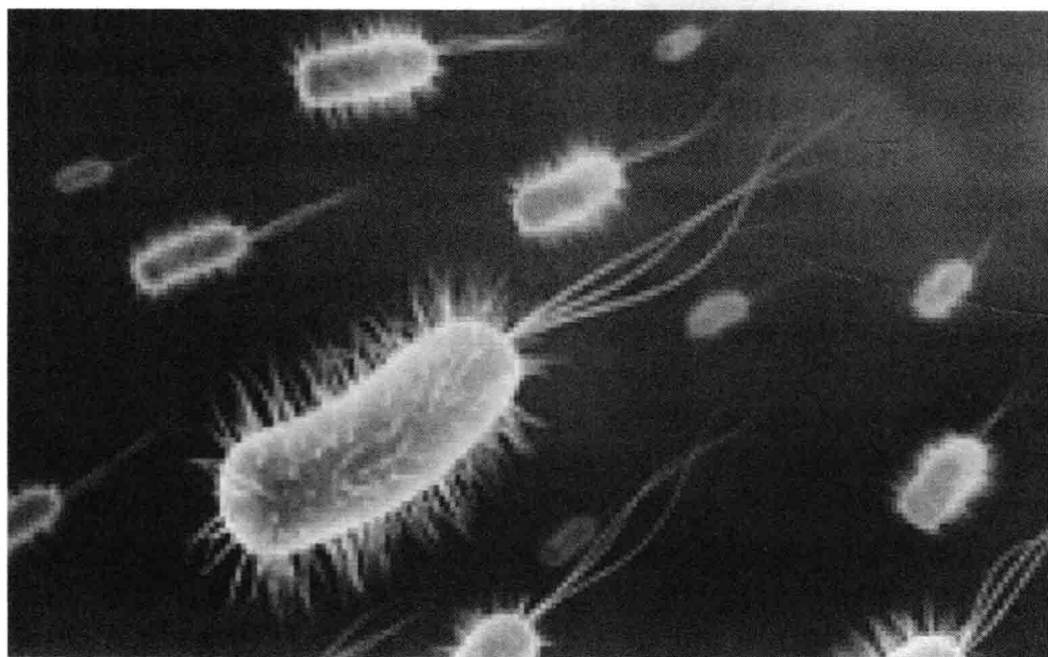
8. 实验结束应确保实验室所有仪器、水电设施安全关闭,带菌之工具浸泡入消毒缸中,其他实验废弃物、垃圾整理到位,最后将手洗净,方能离开。

微生物免疫实验室意外的紧急处理办法

1. 皮肤破损:先除去异物,用蒸馏水或生理盐水洗净后,涂 2% 红汞或 2% 碘酒。
2. 烧伤:局部涂凡士林、5% 鞣酸或 2% 苦味酸,有条件的直接涂烫伤膏。
3. 化学药品腐蚀伤:若为强酸,先用大量清水冲洗,再以 5% 碳酸氢钠溶液中和;强碱腐蚀伤时先以大量清水冲洗后,再用 5% 醋酸或 5% 硼酸溶液中和。若受伤处是眼部,经过上述步骤处理后,再滴入橄榄油或液体石蜡 1~2 滴。
4. 菌液误入口中:应立即吐入消毒容器内,并用 1 : 1000 的高锰酸钾溶液或 3% 双氧水漱口;并根据菌种不同,服用抗菌药物预防感染。
5. 菌液流洒桌面:将适量 2%~3% 来苏尔或 0.1% 新洁尔灭倒于污染面,浸泡半小时后抹去。若手上有活菌,亦应浸泡于上述消毒液 3 min 后,再用肥皂和水清洗。
6. 火警:如发生火警险情时须沉着处理,切勿慌张,应立即关闭电闸,关掉火源。如酒精、乙醚、汽油等有机溶液起火,切忌用水扑救,可用沙土等扑灭火苗。

第一部分 基本技能训练

病原生物学检验实验指导



实验一

培养基的配制

一、目的要求

1. 掌握配制培养基的一般方法和步骤。
2. 了解常用的培养基及其作用。

二、实验原理

培养基是人工配制的适合微生物生长繁殖或积累代谢产物的营养基质,用以培养、分离、鉴定、保存各种微生物或积累代谢产物。在自然界中,微生物种类繁多、营养类型多样,加之实验和研究的目的不同,所以培养基的种类很多。不同种类的培养基中,一般应含有水分、碳源、氮源、无机盐、生长因素等。不同微生物对 pH 要求不一样,霉菌和酵母的培养基的 pH 一般是偏酸性的,而细菌和放线菌的培养基的 pH 一般为中性或微碱性的(嗜碱细菌和嗜酸细菌例外)。所以配制培养基时,都要根据不同微生物的要求将培养基的 pH 调到合适的范围。

此外,由于配制培养基的各类营养物质和容器等含有各种微生物,配制好的培养基必须立即灭菌,以防止其中的微生物生长繁殖而消耗养分和改变培养的酸碱度所带来不利的影响。

根据微生物的种类和实验目的不同,培养基分为天然培养基、合成培养基、半合成培养基;按培养基的物理状态分为固体培养基(含 1.5~2.0% 琼脂,可供微生物的分离、鉴定、活菌计数、菌种保藏等用)、半固体培养基(含 0.5~0.7% 琼脂,常用来观察细菌运动的特征、菌种保存等)、液体培养基;按用途分为基础培养基(如肉汤培养基)、加富培养基(如血平板和巧克力平板)、鉴别培养基(如 EMB 培养基)、选择培养基(如 SS 培养基)等。

目前已有各种商品化的“干燥培养基”成品出售。这种培养基是将新鲜配制的液体培养基用喷雾干燥法、真空干燥法、低温干燥法或蒸发干燥法等将培养基内所含的水分去掉;或将培养基内的各种固形成分经适当处理、充分混匀,制成干燥粉末而成。使用时只要按比例加入一定量的水,经溶解、分装,高压蒸汽灭菌,即可使用。这种培养基的优点是配制省时,携带方便,使用简易,质量稳定。

培养基制备的基本过程包括调配成分、溶解、校正 pH、是容过滤澄清、分装、灭菌、质量检查和保存。

(1) 调配成分: 按培养基处方用量准确称取各种成分。

(2) 溶解: 加适量蒸馏水使其充分溶解, 必要时可稍稍加热, 定容。

(3) 校正 pH: 一般将培养基的 pH 调至 7.2~7.6 之间。经高压灭菌后其 pH 可发生 0.1~0.2 的变动。若用 NaOH 校正, 高压灭菌后 pH 下降 0.1~0.2; 若用 Na_2CO_3 校正, 高压灭菌后 pH 升高 0.1~0.2。

(4) 过滤澄清: 自配的培养基通常有一些混浊或沉淀, 需过滤澄清后方可使用。液体或半固体培养基常用滤纸过滤, 固体培养基在熔化后趁热用绒布或双层纱布加脱脂棉过滤。

(5) 分装: ①基础培养基, 一般分装于容量为 500 mL 锥形瓶灭菌后备用, 以便随时倾注制平板或配制营养培养基等; ②琼脂斜面: 通常在融化后分装于试管, 量为试管高度的 $1/4 \sim 1/3$, 加塞后灭菌, 趁热摆成斜面; ③半固体培养基: 分装量为试管容量的 $1/4 \sim 1/3$, 加塞灭菌后趁热直立凝固; ④琼脂高层培养基: 分装量为管长的 $2/3$ (接种厌氧菌用), 灭菌后趁热直立凝固; ⑤琼脂平板: 先将灭菌琼脂融化后冷却至 50°C 左右, 以无菌操作倾注于灭菌平皿内 (内径 90 mm 的平皿, $13 \sim 15$ mL), 轻轻摇匀, 待琼脂凝固后将平皿翻转, 置 4°C 保存备用。

(6) 灭菌: ①由耐热物质配制成的培养基 (如普通营养琼脂等) 常用高压蒸汽灭菌, 条件为 0.1 MPa (1.05 kg/cm^2), 121.3°C , $15 \sim 20 \text{ min}$; 含糖培养基以 0.06 MPa (0.59 kg/cm^2), 112.6°C , $10 \sim 15 \text{ min}$ 为宜, 以免破坏糖类物质; ②不耐高热的物质配制成的培养基, 如糖类、明胶和牛乳等常用流通蒸汽灭菌, 方法是加温到 $80 \sim 100^\circ\text{C}$, 30 min , 每天 1 次, 连续 3 天; ③富含蛋白质的培养基 (如含血清或鸡蛋清的培养基) 需用血清凝固器灭菌, 方法是将配制好的培养基摆放在血清凝固器内 (一般做成斜面) 灭菌, 第 1 天 75°C , 30 min , 第 2 天 80°C , 30 min , 第 3 天 85°C , 30 min , 在 3 次灭菌的间隙将培养基取出, 置 35°C 孵箱中过夜; ④对高营养液态的不耐热培养基, 如血清、细胞培养液等, 则可用过滤除菌。

(7) 质量检查: 须做无菌试验和效果试验。①无菌试验: 将灭菌后的培养基置 35°C 孵育 24 h , 无任何细菌生长为合格; ②效果试验: 将已知的标准参考菌株接种于待检培养基中, 检查细菌的生长繁殖状况和生化反应是否与预期的结果相符合。

(8) 保存: 制备好的培养基应注明名称、制作日期, 如琼脂平板应将底在上盖在下 (带培养基的平皿), 用牛皮纸包裹或装于保鲜袋内, 以减少水分蒸发。液体培养基应直立放置, 制作好的培养基应存放于冷暗处或 4°C 冰箱。

下面介绍几种常用培养基:

(1) 牛肉膏蛋白胨培养基 (肉汤培养基)。牛肉膏蛋白胨培养基是一种应用

最广泛和最普通的细菌基础培养基。由于这种培养基中含有一般细菌生长繁殖所需要的最基本的营养物质,所以可供微生物生长繁殖之用。基础培养基含有牛肉膏、蛋白胨和氯化钠。其中牛肉膏为微生物提供碳源、能源、磷酸盐和维生素,蛋白胨主要提供氮源和维生素,而氯化钠提供无机盐。由于这种培养基多用于培养细菌,因此要用稀酸或稀碱将其 pH 调至中性或微碱性,以利于细菌的生长繁殖。

牛肉膏蛋白胨培养基的配方如下:

牛肉膏	3.0 g
蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
水	1000 mL
pH	7.4~7.6

根据需要加入 1.5%~2.5%(一般为 1.8%)的琼脂成营养琼脂,加入 0.2%~0.7%(一般为 0.5%)琼脂,则成半固体培养基。

(2)血液琼脂培养基(巧克力琼脂)。血液琼脂培养基是一种含有脱纤维动物血(一般用兔血或羊血)的牛肉膏蛋白胨培养基。因此除培养细菌所需要的各种营养外,还能提供辅酶、血红素等特殊生长因子。因此血液琼脂培养基常用于培养、分离和保存对营养要求苛刻的某些病原微生物。此外,这种培养基还可用来测定细菌的溶血作用。

血液琼脂培养基的配方如下:

牛肉膏	3.0 g
蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0~20.0 g
水	1000 mL
pH	7.4~7.6
无菌脱纤维兔血(或羊血)	100 mL

按牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(营养琼脂)方法制备、分装、灭菌后,待培养基冷却至 45~50℃时,以无菌操作加入无菌脱纤维血至 10%(临用前 37℃水浴预温 30 min),立即摇匀(避免产生气泡),分装于无菌试管和平皿内,凝固后即成血液琼脂斜面或血液琼脂平板。

若基础培养基温度在 70~80℃时加入血液,并在 80℃水浴中摇匀 15~20 min,倾注于平板后即成巧克力琼脂平板。如图 1-1 所示。

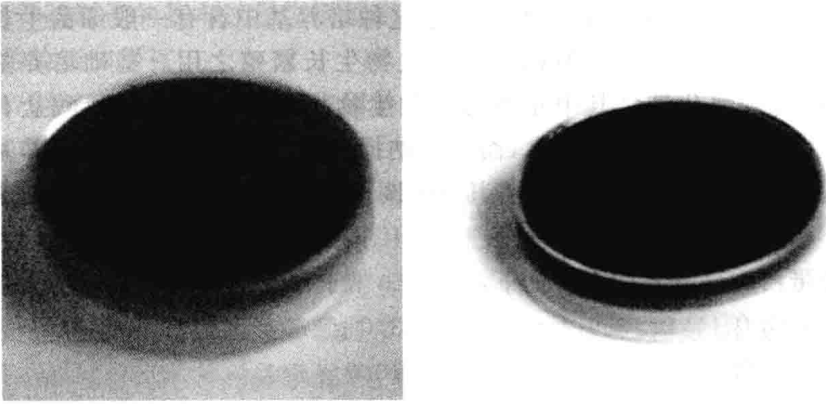


图 1-1 血平板和巧克力平板

三、实验内容及方法

(一)肉汤培养基(营养琼脂)的制备

1. 材料。

牛肉膏、蛋白胨、氯化钠、蒸馏水、量筒、电子秤、试管、试管帽、锥形瓶等。

2. 方法。

(1)称量:(4 人一组)。

根据培养基配方(牛肉膏 3%、蛋白胨 10%、氯化钠 5%),按 500 mL 的用量准确称取各试剂,加入适量蒸馏水充分溶解,定容,调 pH 到 7.2~7.6。

(2)分装:(4 人分为 A 组和 B 组)。

A 组:配半固体培养基。取 30 mL 稀释后培养液加 0.5% 琼脂,加热溶解,分装小试管 10 支,每支 3 mL;

液体培养基。取 20 mL 稀释后培养液分装小试管 6 支,每支 3 mL。

B 组:配斜面培养基。取 30 mL 稀释后培养液加 1.8% 琼脂,加热溶解,分装中试管 5 支,每支 6 mL;

配液体培养基。取 20 mL 稀释后培养液分装小试管 6 支,每支 3 mL。

剩余 400 mL 培养液置 500 mL 锥形瓶中,加 1.8% 琼脂。

(3)包扎、标记。标记内容:培养基种类、班级、姓名、日期。

(4)湿热高压灭菌。121℃,20 min 进行灭菌。

(5)摆斜面。实验台上放一木条,厚度为 1 cm 左右。将试管头部枕在木条上,使管内培养基自然倾斜,凝固后即成斜面培养基。

(6)倒平板。将刚刚灭过菌的盛有培养基的锥形瓶和培养皿放在实验台上,点燃酒精灯,右手托起锥形瓶瓶底,左手拔下塞子,将瓶口在酒精灯上稍加灼烧,左手

打开培养皿盖,右手迅速将培养基倒入培养皿中,每皿约倒入 15 mL(以铺满皿底为度),平放在台子上,待培养基凝固后,进行无菌检测。

(7)无菌检测。将灭菌完成后的培养基置 37℃,孵育 24 h,若无菌生长则菌检合格,可以使用。

3. 结果记录及分析。

记录所配培养基情况,并分析原因。

四、思考与讨论

1. 培养基调配溶解。先在锥形瓶底加入少量水,再加入蛋白胨等成分,以防其粘瓶底烧结。制备大量培养基,除玻璃容器外,还可使用搪瓷缸,但不可用铁、铜容器,以免铁、铜离子进入培养基;因培养基中含铁量超过 0.14 mg/L 时可抑制细菌毒素的产生,含铜量超过 0.3 mg/L 时可抑制细菌生长。需在培养基中加染料、胆盐、指示剂等,应在校正 pH 后加入。

2. 培养基的澄清。如需要制备十分澄清的培养基,可用卵蛋白加热澄清法。其方法为:取一个蛋的卵蛋白加水 20 mL,搅拌至出现泡沫,倒入 1000 mL 液体或熔化的固体培养基中混匀,然后在流动蒸汽中加热 30~60 min,使培养基中不溶性物质附着于凝固蛋白,取出后以纱布夹脱脂棉(固体培养基)或滤纸(液体或半固体培养基)过滤即可。

3. 斜面摆放。斜面摆放若培养基温度过高,凝固过程中遇外界温差过大形成大量冷凝水留在斜面底部,影响细菌生长,而且容易污染。必要时刻在斜放的试管上覆盖纱布保温,减少温差,自然冷却。

一般制作斜面培养基时,每支 $\Phi 15 \times 150$ mm 的试管,装 3~4 mL($1/4 \sim 1/3$ 试管高度),摆放后斜面的长度不超过试管长度的 $1/2$ 为宜。

4. 平板的倾注。倾注培养基时,切勿将皿盖全部开启,以免空气中尘埃及细菌等微生物落入。倾注时若培养基温度过高,则冷凝水过多,易致污染,不易分离到菌落;若温度过低,部分琼脂凝固,倾注时平板表面会高低不平。可在无菌室或接种罩内倾注培养基后,将皿盖稍开一缝隙,在紫外灯照射下待凝,这样利于蒸汽散发,减少平板内冷凝水。

倾注血液琼脂时,由于加血时琼脂表面容易产生气泡,倾注时适时转动锥形瓶,使气泡附于瓶壁,以减少血平板表面的气泡。

实验二

消毒灭菌

一、目的要求

1. 掌握消毒、灭菌、防腐、无菌的概念。
2. 掌握高压灭菌的原理以及使用方法。
3. 熟悉其他消毒、灭菌的方法以及原理。
4. 了解影响灭菌效果的因素。

二、实验原理

在微生物学工作中,培养基和器皿的彻底灭菌是防止杂菌污染、确保工作顺利进行的基本技术之一,也是保证科研和正常生产的关键性措施。灭菌是指采用物理或化学的方法,使物体的表面和内部的所有微生物全部被杀死,所以,经过灭菌的物体是无菌的。消毒(Disinfection)与灭菌(Sterilization)两者的意义有所不同。消毒一般是指消灭物体表面和内部有危害的病原菌或有害微生物的营养体,是一种常用的卫生措施。灭菌则是指杀灭一切微生物的营养体、芽胞和孢子。灭菌的彻底与否一般以是否杀死细菌的芽胞为标准。

消毒与灭菌的方法很多,一般可分为高温、过滤、辐射和使用化学药品等方法。

高温之所以能灭菌,最主要的原因是因为高温能使原生质中的蛋白质变性或凝固。同时高温也能破坏酶的活性,使微生物死亡。高温灭菌根据加热方式的不同,又可分为干热灭菌和湿热灭菌两种。在实践中可根据物品的性质和具体条件选择应用。

1. 干热灭菌。干热灭菌有火焰烧灼灭菌和热空气灭菌两种。火焰烧灼灭菌直接利用火焰把微生物烧灼而死。此法灭菌彻底可靠,简便迅速,但是适用范围有限,只适用于接种环、接种针和金属用具如镊子等,无菌操作时的试管口和瓶口也在火焰上作短暂烧灼灭菌。涂布平板用的玻璃棒也可在蘸有乙醇后进行灼烧灭菌。对于一些污染物品、带菌物品或实验动物的尸体等也可用焚烧来灭菌。

通常所说的热空气灭菌是在电烤箱内利用高温干燥空气($160\sim 170^{\circ}\text{C}$)进行灭菌,此法适用于玻璃器皿如吸管和培养皿等的灭菌。一般灭菌时间 $1\sim 2\text{ h}$ 。但热