

全国高等院校医学实验教学规划教材

实验病原生物学

主编 李 剑



科学出版社

全国高等院校医学实验教学规划教材

实验病原生物学

主 编 李 剑

主 审 李 孜

副主编 马长玲

编 委 (以姓氏笔画为序)

李美丽 沈二霞 陈代雄 陈晓湘

陈新宇 张雪雁 姜 波 袁竹青

郭海萍 黄 俊

科 学 出 版 社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

《实验病原生物学》教材的编写是为培养创新型、复合型人才,探索实验课程体系改革,并尝试打破学科界限,改变传统微生物学与寄生虫学单科独立的实验教学模式,力求给学生一个病原生物学的整体概念,让学生有机会把不同的病原生物放在同一环境中进行思考和比较,自主掌握不同病原生物间的差别而进行的一番有益尝试。

本书从形态学实验方法、免疫学实验方法、生物化学实验方法、分子生物学实验方法和动物实验方法五个方面,全面综合地介绍了病原生物相关实验的原理和方法,列举了相应的基础性、综合性和设计创新性实验实例,并附有病原生物学实验室规则,常用仪器的使用与维护,常用培养基的制备与应用,常用染色液、试剂及溶液配制,细胞培养常用试剂及培养液,菌种的保存及保管方法和病原生物学重要中英文词汇对照表。

本书既可作为基础医学、临床医学、预防医学、医学检验、麻醉学、医学影像、护理学等专业学生的病原生物学实验教材,也可作为医药卫生专业人员的参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

实验病原生物学 / 李剑主编. —北京:科学出版社,2014. 1

全国高等院校医学实验教学规划教材

ISBN 978-7-03-039586-3

I. 实… II. 李… 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(2014)第 011957 号

责任编辑:李 植 周万灏 / 责任校对:张凤琴

责任印制:肖 兴 / 封面设计:范璧合

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>

北京世汉凌云印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2014 年 1 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2014 年 1 月第一次印刷 印张:13 1/2

字数:319 000

定价:65.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

病原生物学研究的对象包括人体寄生虫、细菌、病毒和真菌等病原体,即传统的医学微生物学和人体寄生虫学,是一门实践性与应用性很强的学科,在各医学学科中有着重要的地位。使学生充分了解病原生物学研究的基本要求和熟练掌握并灵活运用基本实验技能,是培养学生良好的医学科学素质和创新意识的重要环节。

由于传统的实验教学模式依附并跟随于理论教学,导致某些同类的实验方法分散出现在不同的章节及有关不同的病原生物体的实验中,而某些相同的实验方法则反复出现。其结果是割裂了某些同类的实验方法而重复了某些实验方法,导致学生对同类实验方法的适用范围缺乏全面和整体的了解,且浪费了实践更多实验方法的机会,不利于学生熟练掌握并灵活运用尽可能多的基本实验技能及通过实验进一步加深、巩固和加强对理论知识的理解和掌握。

基于针对各类病原生物所使用的实验方法基本是共通的,《实验病原生物学》以方法学为主线,将实验方法划分为:形态学实验、免疫学实验、生物化学实验、分子生物学实验和动物实验等模块。通过实验方法将各类不同的病原生物有机地融合进每一模块,模糊各种不同的病原生物之间的差异,强化病原生物的整体概念,实现不同的病原生物在实验方法学上的统一,目的是尝试将《实验病原生物学》的实验教学改革成为基于但不依赖和跟随于理论教学体系的实验教学模式,并通过进一步充实完善,使之发展成为一门新的、独立的学科,以利于学生能充分理解各种实验方法的原理、步骤和适用范围,牢固掌握各种基本实验的技能,并能综合和灵活地运用于实践。

我们希望通过《实验病原生物学》教材的公开出版和使用,将我们多年的病原生物学实验教学经验和近年实验教学改革的体会与同行分享,更希望得到同行的意见、建议和参与。让我们携手努力,共同促进病原生物学实验教材的建设。

编 者
2013年8月

目 录

绪论	(1)
----------	-----

第一篇 病原生物学实验基础

第一章 病原微生物实验室生物安全与消毒灭菌	(2)
第一节 病原微生物实验室生物安全	(2)
第二节 消毒灭菌	(3)
第二章 病原生物的分离培养技术	(6)
第一节 标本的采集、处理和保存	(6)
第二节 细菌的分离培养	(8)
第三节 病毒的分离培养	(9)
第四节 真菌的分离培养	(11)
第五节 人体寄生虫的分离培养	(11)
第三章 病原生物的形态学检查	(14)
第一节 不染色标本的检查	(14)
第二节 染色标本的检查	(17)
第四章 病原生物的生物化学检查	(21)
第一节 细菌碳水化合物代谢产物的检测	(21)
第二节 细菌蛋白质和氨基酸代谢产物的检测	(23)
第三节 细菌酶类生化反应	(24)
第四节 细菌的其他生化反应	(25)
第五章 病原生物的免疫学检查	(26)
第一节 凝集反应	(26)
第二节 沉淀反应	(26)
第三节 补体参与的反应	(27)
第四节 免疫标记技术	(27)
第五节 免疫细胞的分离、纯化及功能检测	(27)
第六章 病原生物学的分子生物学检查	(28)
第一节 核酸的提取与纯化	(28)
第二节 核酸的扩增与鉴定	(33)
第七章 动物实验技术	(39)
第一节 动物感染模型的建立	(39)
第二节 标本的采集和检查	(43)

第二篇 病原生物学实验

第八章 基础性实验	(46)
实验一 消毒灭菌	(46)
实验二 细菌接种培养和生长现象观察	(48)
实验三 真菌的培养和生长现象观察	(51)

实验四	病毒培养及病毒数量和感染性的测定	(52)
实验五	活菌运动的观察、粪便和血涂片寄生虫检查	(57)
实验六	细菌的染色	(64)
实验七	寄生虫卵、虫体和原虫、医学节肢动物观察	(67)
实验八	细菌糖及蛋白质代谢产物的检测	(117)
实验九	病原生物免疫学检测	(121)
实验十	病原生物的分子生物学检查	(140)
第九章	综合性实验	(145)
实验一	脓汁或渗出液标本的病原学检查	(145)
实验二	咽拭子标本的病原学检查	(147)
实验三	痰及支气管分泌物标本	(147)
实验四	血液及骨髓标本	(150)
实验五	脑脊液标本	(152)
实验六	尿液标本	(155)
实验七	粪便标本	(156)
实验八	胆汁标本	(159)
实验九	生殖道分泌物标本	(159)
实验十	皮肤真菌的检查	(163)
实验十一	淡水鱼中华支睾吸虫囊蚴的检查	(165)
实验十二	日本血吸虫实验动物的感染及其实验诊断	(165)
实验十三	周边地区褐云玛瑙螺的广州管圆线虫感染情况调查	(167)
实验十四	野生蛙体内裂头蚴的检查	(167)
实验十五	大学生口腔牙龈内阿米巴的检查	(168)
实验十六	鼠疟原虫感染及其实验诊断	(168)
实验十七	大学生蠕形螨感染的调查	(169)
第十章	设计创新性实验	(170)
实验一	市售蔬菜、瓜果寄生虫卵污染状况的检测	(170)
实验二	猫、犬等宠物弓形虫感染情况的调查	(170)
实验三	周边地区恙螨、蜱的孳生地调查	(171)
附录	(173)

绪 论

病原生物指可以侵犯人体,引起感染甚至传染病的生物,或称病原体,包括病原微生物和人体寄生虫。病原微生物是指与人类医学有关的、形体微小、数量繁多、肉眼看不见、需借助于光学显微镜或电子显微镜放大数百倍、上千倍甚至数万倍才能观察到的最低等的微小生物。具体包括真菌、细菌、螺旋体、支原体、立克次体、衣原体、病毒。生物学上可分为三大类:

1. 非细胞型微生物 非细胞型微生物为形体最小,以纳米(nm)为测量单位,结构最为简单,仅含有RNA或DNA一种核酸,或仅为传染性蛋白粒子,具有超级寄生性,仅在活的易感细胞中才能复制,且易变异的最低等生物体。此类微生物有病毒、朊粒等。

2. 原核细胞型微生物 原核细胞型微生物为单细胞微生物,大小以微米(μm)计,其细胞分化不完善,无完整细胞核及核膜、核仁,核质(或称拟核)由胞质内聚积的双链螺旋结构DNA和RNA构成,胞质内有核糖体,但缺少内质网、线粒体等细胞器。此类微生物包括细菌、支原体、衣原体、立克次体、螺旋体和放线菌等六类。

3. 真核细胞型微生物 真核细胞型微生物为多细胞或单细胞微生物,其细胞分化完善,有细胞核和各种细胞器,故易在体外生长繁殖。真菌属此类微生物。

寄生原虫、吸虫、绦虫、线虫及医学节肢动物等。

寄生虫(parasite)指神经系统和消化系统高度退化,一生中大多数时间寄生于其他动物(宿主)体内或体表的生物。人体寄生虫则是指以人体为宿主的寄生虫,包括生物学上分三类:

1. 原生生物 此类寄生生物很广泛,常见的如疟疾原虫(*Plasmodium sp.*)、贾干弟鞭毛虫(*Giardia lamblia*)等。

2. 无脊椎动物 此类寄生虫从数量和种类上都是最多的,常见的如营内寄生的扁形动物猪肉绦虫(*Taenia solium*)、中华肝吸虫(*Clonorchis sinensis*)和营外寄生节肢动物的阴虱(*Phthiruspubis*)、头虱(*Pediculus humanus capitis*)、库蚊(*Culex*)。

3. 脊椎动物 此类寄生生物很罕见。盲鳗(*Myxine*)是脊椎动物中唯一的内寄生动物的。

以寄生虫与宿主的关系分类:

1. 专性寄生虫 专性寄生虫(obligatory parasite)生活史及各个阶段都营寄生生活,如丝虫;或生活史某个阶段必须营寄生生活,如钩虫,其幼虫在土壤中营自生生活,但发育至丝状蚴后,必须侵入宿主体内营寄生生活,才能继续发育至成虫。

2. 兼性寄生虫 兼性寄生虫(facultative parasite)既可营自生生活,又能营寄生生活,如粪类圆线虫(成虫)既可寄生于宿主肠道内,也可以在土壤中营自生生活。

3. 偶然寄生虫 偶然寄生虫(occasional parasite)因偶然机会进入非正常宿主体内寄生的寄生虫,如某些蝇蛆进入人肠内而偶然寄生。

4. 体内寄生虫和体外寄生虫 体内寄生虫(endoparasite)如寄生于肠道、组织或细胞内的蠕虫或原虫;体外寄生虫(ectoparasite)如蚊、蚤、虱、蜱等,吸血时与宿主体表接触,饱食后即离开。

5. 长期性寄生虫和暂时性寄生虫 长期性寄生虫(permanent parasite)如蛔虫,其成虫期必须过寄生生活;暂时性寄生虫(temporary parasite)如蚊、蚤、蜱等吸血时暂时侵袭宿主。

6. 机会致病寄生虫 机会致病寄生虫(opportunistic parasite)如弓形虫、卡氏肺孢子虫等,在宿主体内常处于隐性感染状态,当宿主免疫功能受累时,可出现异常增殖且致病力增强。

研究病原生物的形态、结构、代谢活动、遗传和变异、致病机制、机体的抗感染免疫、实验室诊断及特异性预防等,对我们人类预防和治疗感染性及传染性疾病有着极其重要的意义。形态学实验方法、免疫学实验方法、生物化学实验方法、分子生物学实验方法和动物实验方法是病原生物学研究的常用方法。我们将从以上五个方面全面综合地介绍病原生物的相关实验的原理和方法,并列举相应的基础性、综合性和设计创新性实验实例。

第一篇 病原生物学实验基础

第一章 病原微生物实验室生物安全与消毒灭菌

实验室生物安全(laboratory biosafety)是指实验室的生物安全条件和状态不低于容许水平,可避免实验室人员、来访人员、社区及环境受到不可接受的损害,符合相关法规、标准等对实验室生物安全要求的要求,包括病原微生物实验室安全、重大传染病的爆发流行、生物恐怖等,本章主要介绍病原微生物实验室安全。

第一节 病原微生物实验室生物安全

病原微生物实验室生物安全是指在安全的实验室内外环境中使用安全的方法从事相关活动,以保护实验室工作人员和公众的健康。

一、病原微生物的分类

根据病原微生物的传染性、感染后对个体或者群体的危害程度,将病原微生物分为四类:

第一类病原微生物,指能够引起人类或者动物非常严重疾病的微生物以及我国尚未发现或者已经宣布消灭的微生物。

第二类病原微生物,指能够引起人类或者动物严重疾病,比较容易直接或间接在人与人、动物与人、动物与动物间传播的微生物。

第三类病原微生物,指能引起人类或动物疾病,但一般情况下对人、动物或环境不构成严重危害,传播风险有限,实验室感染后很少引起严重疾病,具备有效治疗和预防措施的微生物。

第四类病原微生物,指在通常情况下不会引起人类或动物疾病的微生物。

第一类、第二类病原微生物统称为高致病性病原微生物。根据卫生部 2006 年制订的《人间传染的病原微生物名录》,将人间传染的病原微生物详细列出并归为下述四类:第一类病原微生物包括天花病毒、克里米亚-刚果出血热病毒(新疆出血热病毒)、埃博拉病毒等 29 种病毒;第二类病原微生物包括艾滋病毒、高致病性禽流感病毒、乙型脑炎病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病毒(街毒)、SARS 冠状病毒、结核分枝杆菌、霍乱弧菌等 70 种微生物;第三类病原微生物包括巨细胞病毒、登革病毒、肠道病毒、EB 病毒、各种肝炎病毒、丙型肝炎病毒、单纯疱疹病毒、呼吸道合胞病毒、麻疹病毒、脑膜炎奈瑟菌、淋病奈瑟菌等 275 种微生物;第四类微生物包括小鼠白血病病毒、小鼠乳腺瘤病毒和大鼠白血病病毒等共 7 种微生物。

二、实验室生物安全防护水平分级

(一) 定义

生物安全实验室(biosafety laboratory),又称之为生物安全防护实验室(biosafety containment for laboratories),是通过防护屏障和管理措施避免或控制被操作的有害生物因子的危害,从而达到生物安全要求的生物实验室和动物实验室。

(二) 生物安全实验室的分类

根据实验室用于体内还是体外实验,将其分两类:一般生物安全防护实验室(不使用实验脊椎动物和昆虫)和实验脊椎动物生物安全防护实验室。前者用于体外实验,后者用于体内实验。

(三) 生物安全实验室分级

根据对所操作生物因子采取防护措施的不同,将实验室安全防护水平分为四个等级,1级防护水平最低,4级防护水平最高。仅从事体外操作的实验室,即一般生物安全防护实验室的生物安全防护水平表示为BSL-1、BSL-2、BSL-3、BSL-4(biosafety level,BSL)。而从事动物活体操作(体内实验)的实验室,即实验脊椎动物生物安全防护实验室的生物安全防护水平表示为ABSL-1、ABSL-2、ABSL-3、ABSL-4(animal biosafety level,ABSL)。1级、2级实验室为基础实验室,不可从事高致病性病原微生物实验活动。

BSL-1实验室适用于对健康成年人已知无致病作用的微生物,如用于教学的普通微生物实验室。BSL-2实验室适用于对人或环境具有中等潜在危害的微生物。BSL-3实验室适用于主要通过呼吸途径使人传染上严重的甚至是致死疾病的致病微生物及其毒素,通常已有预防传染的疫苗。艾滋病病毒研究(血清学实验除外)应在3级生物安全防护实验室中进行。BSL-4实验室适用于对人体具有高度危险性,通过气溶胶途径传播或传播途径不明,目前尚无有效疫苗或治疗方法的致病微生物及其毒素。与上述情况类似的不明微生物,也须在4级生物安全防护实验室中进行。待有充分数据后再决定此种微生物或毒素应在4级还是在较低级别实验室中处理。实验脊椎动物生物安全防护实验室适用的微生物范围与同级的一般生物安全防护实验室相同。

第二节 消毒灭菌

多数微生物为单细胞微生物,极易受到环境中各种因素的影响。在医学上常采用物理、化学的方法,抑制或杀死物品上的微生物。

一、基本概念

(一) 消毒

消毒(disinfection)指杀灭物体上和环境中的病原微生物,使之达到无害化处理。消毒不一定能杀死细菌芽孢和非病原微生物。根据有无已知传染源可分预防性消毒和疫源性消毒两种。通常用化学方法达到消毒作用,用于消毒的化学药物为消毒剂(disinfectant)。消毒剂通常用于日常生活所接触的事物,如地板、餐具,在医疗上则只可用于一些体外的工具或皮肤黏膜消毒。

(二) 灭菌

灭菌(sterilization)是指用物理或化学的方法杀灭或清除物体上所有微生物的方法,包括杀灭所有的致病和非致病微生物以及细菌芽孢。

消毒与灭菌是不同概念,灭菌可包括消毒,而消毒却不能代替灭菌。第一,两者要求达到的处理水平不同。消毒要求杀灭和(或)清除致病微生物,使其数量减少到不再能引起人发病,而灭菌则要求达到没有一个活菌存在,包括杀灭细菌芽孢。第二,两者选用的处理方法不同。灭菌与消毒相比,要求更高,处理更难。第三,消毒多用于卫生防疫,灭菌主要用于医疗护理。

(三) 无菌

无菌(asepsis)指没有活菌的意思,多是灭菌结果。经过灭菌处理后的物品称无菌物品,经过灭菌处理后的区域称无菌区域。防止细菌进入人体或其他物品的操作技术,称无菌操作。

(四) 清洁

清洁(cleaning)指通过洗涤等方法除去尘埃和污秽以减少微生物数量的过程,是消毒、灭菌前必须要有的处理过程,能提高消毒、灭菌的效果。

(五) 防腐

防腐(antisepsis)指防止或抑制体外细菌生长繁殖的方法。细菌可能存活,但不能繁殖。

二、物理消毒灭菌法

消毒灭菌的方法有两大类:物理方法和化学方法。

物理消毒灭菌法是利用物理因素杀灭微生物的方法,包括热力、辐射、滤过等。

(一) 热力灭菌法

高温对病原生物有明显的致死作用,常用于消毒和灭菌。热力灭菌法分为干热灭菌和湿热灭菌两大类,在同一温度下,湿热灭菌的效力比干热灭菌好。

1. 干热灭菌法 干热(dry heat)的杀菌作用是利用火焰、热空气及电磁波产热等方法,使微生物脱水、干燥,细胞内化学成分氧化和大分子变性而达到灭菌的目的。

(1) 焚烧:直接点燃或在焚烧炉内焚烧,是一种彻底的灭菌方法。废弃的物品或有感染性的动物尸体等用焚烧法来灭菌。

(2) 烧灼:直接用火焰灭菌。微生物学实验室用的接种环、瓶口等的灭菌用烧灼方法。

(3) 干烤:将待灭菌的物品放入干烤箱,一般加热至 160 ~ 170℃ 经 2 小时。适用于耐高温的物品(玻璃器皿、瓷器、玻璃注射器)等的灭菌。

(4) 红外线:利用红外线热效应来杀菌,杀菌作用与干热相似。该法多用于医疗器械灭菌。

2. 湿热灭菌法

(1) 巴氏消毒法(pasteurization):采用较低温度杀灭液体中的病原菌(如结核分枝杆菌、布氏菌等)或特定微生物,而仍保持物品中所需的不耐热成分不被破坏的消毒方法。此法由巴斯德创立,故而得名。主要用于乳制品和酒类等液体食品的消毒。具体方法:61.1 ~ 62.8℃ 加热 30 分钟或 71.7℃ 加热 15 ~ 30 秒。

(2) 煮沸法(boiling water):100℃ 的水煮沸 5 分钟即可杀死一般细菌的繁殖体,而杀灭细菌的芽孢则需 1 至数个小时。该法常用于食物、水、金属器皿的消毒。

(3) 流动蒸汽法(free-flowing steam)和间歇蒸汽灭菌法(fractional sterilization):这两种方法均是利用蒸汽进行消毒灭菌。流动蒸汽法又称常压蒸汽消毒法,指在 1 个大气压下水煮沸时产生的蒸汽进行消毒,经 15 ~ 30 分钟,细菌繁殖体常被杀灭,但不保证杀灭芽孢。该法常用器具是 Arnold 消毒器,我国的蒸笼具有相同原理。间歇蒸汽灭菌法是利用反复多次流动蒸气间歇加热,在加热间歇使芽孢形成繁殖体后杀灭其繁殖体,以达灭菌目的。此法适用于一些不耐高热的含糖、牛奶等的培养基的灭菌。

(4) 高压蒸汽灭菌法(autoclaving sterilization):是一种最常用、最有效的灭菌方法,可杀灭包括细菌芽孢在内的所有的微生物。方法是加热高压蒸汽灭菌器,使其内蒸汽压力上升至 103.4kPa(或 1.05kg/cm²),温度达到 121.3℃,经 15 ~ 20 分钟,即可杀死包括细菌芽孢在内所有微生物。该法常用于手术敷料、细菌培养基、玻璃器皿等耐高温、耐湿制品的灭菌。

(二) 辐射杀菌法

1. 紫外线 波长为 240 ~ 300nm 的紫外线(ultraviolet radiation,UV)均具有杀菌作用,以 265 ~ 266nm 杀菌作用最强。紫外线的杀菌机制是其作用于 DNA,使两个相邻胸腺嘧啶共价结合而形成二聚体,干扰 DNA 的转录复制,从而导致微生物的死亡。利用紫外线杀菌的缺点包括:①穿透力较弱,故适用于无菌室、手术室、传染病房等的空气消毒,或物体表面的消毒灭菌。②紫外线对人体皮肤、眼睛有损伤作用,应注意防护。

2. 电离辐射 电离辐射(ionizing radiation)包括 γ 射线和 β 射线等,是一种常温灭菌方法,具有灭菌时不会使物品温度升高、穿透力强、对物品损坏小的特点。当剂量足够时,对各种细菌均有致死作用。除某些塑料、活细胞及制剂外,适用于大多数医药用品的灭菌。

3. 微波 微波 (microwave) 是一种波长为 1 ~ 1000mm 的电磁波,微波杀菌是利用了电磁场的热效应和生物效应的共同作用的结果。微波可穿透玻璃、塑料薄膜与陶瓷等物品,但不能穿透金属表面,多用于非金属器械、检验室用品、食品食具、药杯等物品的消毒。

(三) 滤过除菌法

滤过除菌法 (filtration) 是将待除菌的液体或空气通过有许多微小孔 (孔径 $< 0.45 \mu\text{m}$) 的滤菌器,由于细菌、真菌等的微生物直径大于滤菌器的微小孔的孔径,而无法通过滤菌器,从而除去液体或空气中的微生物,以达到无菌的目的。该法不能去除病毒和支原体。主要用于不耐热的血清、毒素、抗生素等的除菌以及空气的滤过除菌。

三、化学消毒灭菌法

化学消毒灭菌法是使用化学消毒剂进行消毒灭菌,因对病原微生物和人体组织细胞都有毒害作用,故只能外用或用于环境的消毒。根据消毒剂的化学结构和性质的不同,分为醇类、酚类、表面活性剂、烷化剂、重金属盐类、氧化剂和卤素类等消毒剂。

消毒剂的作用机制包括:使微生物蛋白质变性或凝固,如高浓度的重金属盐类、酚类、醇类、醛类及酸碱类等;干扰微生物的酶系统和代谢环节,如低浓度的重金属盐类及氧化剂;损伤微生物膜结构,如某些阳离子表面活性剂如苯扎溴铵、脂溶剂及低浓度的酚类等。

根据消毒剂的杀菌能力将其分为三类。高效消毒剂 (high-level disinfection):可以杀灭包括细菌芽孢在内的所有微生物。这类消毒剂有次氯酸钠、甲醛、戊二醛、环氧乙烷、过氧乙酸等。中效消毒剂 (intermediate-level disinfection):能够杀灭除细菌芽孢以外的大多数微生物,包括细菌的繁殖体、多数病毒和真菌。这类消毒剂有碘酊、碘伏、乙醇等。低效消毒剂 (low-level disinfection):能杀死多数细菌的繁殖体,不能杀灭芽孢、结核分枝杆菌及某些抵抗力较强的真菌和病毒。苯扎溴铵、氯己定、高锰酸钾等属于这类消毒剂。

四、影响消毒灭菌效果的因素

影响消毒灭菌的效果包括微生物的特点、消毒剂的性质以及环境等多种因素。

(一) 微生物的种类、数量和物理状态

不同种类微生物对消毒剂的敏感性不同,大致排序如下 (敏感性由高到低):真菌、细菌繁殖体、病毒、分枝杆菌、芽孢,所以要根据消毒对象选择合适的消毒剂。微生物数量也会影响消毒灭菌效果,微生物数量越多则需要消毒时间越长。另外,即便同一种微生物,不同的生长状态其抵抗力也不同。如在营养缺失情况下生长的微生物比在营养丰富的条件下生长的微生物抵抗力更强。

(二) 消毒剂的化学性质、浓度与作用时间

消毒剂的理化性质不同,对微生物的消毒灭菌作用效果也有差异。如阳离子表面活性剂对革兰阳性菌的杀灭效果比对革兰阴性菌好。一般来讲,同一种消毒剂浓度越高,则杀菌作用越强 (醇类例外);降低到一定浓度时,则只有抑菌防腐作用。一定浓度的消毒剂,作用时间越长,消毒灭菌的效果也越好。

(三) 温度、酸碱度、有机物

消毒剂的消毒灭菌过程本质上是化学反应,故消毒剂灭菌效果可随温度提高而增强。消毒剂灭菌效果也受酸碱度影响,如含氯消毒剂在酸性条件下杀菌作用好。有机物也影响消毒剂效果,因有机物 (痰、脓汁等) 与消毒剂结合,不仅消耗部分消毒剂,还可阻碍消毒剂与病原菌的接触而降低杀菌效果。故在消毒灭菌前应先清除其表面的污物,再进行消毒灭菌处理。

(沈二霞)

第二章 病原生物的分离培养技术

第一节 标本的采集、处理和保存

标本是能客观反映机体状况的检验材料,是进行临床实验室检验的物质基础。所有实验室检测的结果均与标本质量、检测方法的可靠性以及检测人员的能力密切相关。

一、标本质量的重要性及意义

标本质量的好坏直接影响到实验室检测的准确性与效率,从而影响到,如医生对疾病的判断和治疗、疫情的判断与防控策略的制订等。对感染性疾病的诊断、治疗以及流行病学调查等,都离不开对标本的病原学检测和鉴定。标本的质量与标本的采集、保存、运输密切相关,正确地采集、保存、运输标本是保证实验室检测结果准确可靠的前提。

二、采集标本的基本原则

采集标本进行病原学和血清学检测,应遵循以下原则:

(1) 早期采集:尽可能在疾病早期采集,对于分离培养的标本,应尽量在应用抗生素或抗病毒药物之前采集。

(2) 无菌采集:标本采集时应严格执行无菌操作,尽量减少或避免标本受机体正常菌群及其他杂菌污染。对本身带有细菌或真菌等微生物(如粪便)或易受其污染的标本,进行病毒分离培养时,应使用抗生素抑制标本中的细菌或真菌等生长繁殖。

(3) 安全采集:采集标本时不仅要防止皮肤和黏膜正常菌群对标本的污染。同时也要注意安全,防止传播和自身感染。

(4) 根据不同疾病及疾病的不同时期采集目的标本。

(5) 采集的标本要有足够的量。

(6) 尽快送检:标本应新鲜,取材后应立即送检。根据不同检验项目要求,合理保存和运送标本。

(7) 标本应做好标记,填写采样单。

三、常见疾病标本的种类

不同病原生物引起不同系统的感染,采集的标本也不同。呼吸道感染性疾病,如结核、百日咳、流感、麻疹、风疹等,需采集患者的咽拭子、痰液、血液等。肠道感染性疾病,如细菌性痢疾、伤寒或副伤寒、甲肝、手足口病、胃肠炎等,需采集患者的粪便、血液、肛拭子等。泌尿系统感染性疾病,则主要采集尿液标本。中枢系统感染性疾病,如流脑、乙脑等,则可采集脑脊液和血液等。皮肤感染性或创伤性疾病,如化脓性感染、疱疹等,可采集患者的脓液、疱疹液、瘀点瘀斑等。

四、常见标本的采集时间和方法

根据标本的用途可以将标本分为两大类:用于病原学检测(包括检测病原体或其成分如抗原、核酸及其代谢产物)的标本和用于血清学诊断(检测血清中的某病原体的特异性抗体)的标本。前者标本很多,包括:血液、痰液、咽拭子、粪便、尿液、脓液及创伤感染标本等;而后者标本

则主要包括血清和脑脊液。

(一) 用于病原学检测的标本

1. 血液标本 于患者发热初期或发热高峰时采集,并尽量在抗菌药物治疗之前、下次给药前、或停用抗生素 2 天后采集,若 24 小时内采集 2~3 份标本可提高检出率。通常采集肘静脉血。

2. 痰液标本及支气管分泌物标本 采集方法有自然咳痰法、特殊器械采集法和小儿取痰法。自然咳痰法:一般留取晨痰,多数患者清晨痰量较多,故较易留取。特殊器械采集法包括支气管镜采集法、经鼻导管吸痰法、防污染毛刷采集法、环甲膜穿刺经气管吸引法、经胸壁针刺吸引法等。小儿取痰法用于婴幼儿。尽可能在用抗菌药物之前采集标本。采集的痰液标本应尽快送检或 4℃ 保存,以防口咽部的正常菌群迅速生长繁殖,而致病原微生物的检出率下降。

3. 咽拭子 用无菌棉拭子直接擦拭咽后壁、扁桃体或假膜边缘等处。咽拭子的采集时间应最好在发病 3 日内,用于病原检测的阳性率较高。为防止正常菌群的生长繁殖,应尽快送检。

4. 粪便标本 应尽可能在发病早期(3 天以内)及应用抗生素之前采集。为提高检出率,最好采集新鲜粪便,挑取有脓血、黏液部分的粪便(液状粪便取絮状物)送检。用棉拭子挑取粪便插入磷酸盐甘油中送检,可提高病原菌的检出率。对不易获取粪便者或婴幼儿,可用肛拭子采集。

5. 尿液标本 一般多采集中段尿,也可通过留置导尿管采集或膀胱穿刺法取尿液标本。中段尿采集方法简单、易行,是最常用的尿培养标本收集方法,但容易受到会阴部细菌污染。对于尿厌氧菌培养、婴幼儿中断尿采集困难、培养结果与病情不符时,可用膀胱穿刺法取尿。送检标本采集后立即送检。

6. 脓液及创伤感染标本 首先用无菌生理盐水清洗去除病灶表面的污染杂菌。对已破溃脓肿,用无菌棉拭子采取脓液及病灶深部的分泌物。对于未破溃脓肿,患部皮肤消毒后,用无菌注射器抽取脓液及分泌物,也可于切开排脓时,以无菌棉拭子采取。

(二) 用于血清学诊断的标本——血清

血清学诊断因是检测机体感染病原生物后对该病原体的免疫应答能力,即抗体的产生和浓度的高低来做出诊断,故受到多种因素的影响,需采集双份血清,如疾病早期及一周后、或急性期和恢复期分别采集一次,第二次得到的抗体效价是第一次的 4 倍及 4 倍以上,有诊断意义。一般是采集静脉血,放入非抗凝管,于室温静置 15~30 分钟后完全凝固,离心,取血清,用已知的抗原检测血清中未知的抗体,并测定其效价。

五、标本的保存和运输

(一) 标本的保存

病原微生物标本保存的目的是确保待检病原微生物的存活并抑制其他微生物的过度生长,受到运送时间的长短及不同病原微生物对干燥、温度、营养、pH 的耐受能力等条件的影响,故应选择合适目的病原生物的容器和稳定的保存温度等保存条件。

标本采集后应尽快送至实验室,若不能及时送检,已采集的标本要按检验规定的储存条件,如温度等,将标本直立置于稳定、干燥、避光、密闭的环境中,避免振摇,以免标本遗洒或溶血影响检测结果。

用于分离培养细菌的标本,不同的部位标本,其保存容器则可能不同。痰标本有专用的痰杯,粪便标本放在粪便专用的容器内。培养目的不同则保存容器也可不同,如虽同是血液标本,用于需氧菌的培养、厌氧菌的培养以及真菌的培养,均需选择相应的专用容器。一般来讲,若采集后立即送检(1~2 小时内),室温即可;若不能立即送检(超过 1 或 2 小时),有的标本需要保存在 4℃,如尿液、粪便等;而有的标本则仍需室温保存,如血液、脑脊液等。一般情况下,用于细

菌培养的标本保存时间不应超过 24 小时。

用于分离病毒的标本,一般应放在含有病毒保存液密闭容器内 4℃ 保存,最好 12 小时内送检,最长不可超过 24 小时,若不能立即分离病毒时,应将标本 -20℃ 冷冻暂时保存,或 -70℃ 长期储存。

采集的标本用于核酸检测时不能使用棉拭子和木质拭子棒,因为这类材料中含有核酸扩增抑制剂。并应低温快速送检。4℃ 保存需 12 小时内送检,-20℃ 可暂时保存,需长期保存的标本存于 -70℃ 及以下,防止核酸降解。

用于免疫检测的标本,如检测抗体的血清标本可在 4℃ 保存约 1 周,超过 1 周必须在 -20℃ 以下保存。用于检测抗原或抗体的其他标本可在 4 ~ 8℃ 短期保存,在 -20℃ 及以下可保存更长时间。

(二) 标本的运输

标本必须放在大小合适的带螺旋盖、内有橡圈的塑料管里拧紧密闭,连同填写的标本送检登记表放入塑料袋密封。然后放入专用的标本运输箱内,在合适的温度条件下运输,如 4℃ 需填充冰袋,-20℃ 需填充干冰等。所有容器须印有生物危险标识运输,并在外包装上有标签标明寄送人和接收人的详细联系方式,包括日期和运输日期等。标本运送要求专人专车。

第二节 细菌的分离培养

培养基(culture medium)是由人工方法配制而成的,专供微生物生长繁殖使用的混合营养制品。

一、培养基的分类

培养基种类很多,组分和形态各异,有几种不同分类方法。

(一) 根据物理状态

培养基分为固体培养基、液体培养基和半固体培养基。固体培养基是在培养基中加入凝固剂,如琼脂等;液体培养基中不加任何凝固剂;半固体培养基是在液体培养基中加入少量凝固剂(凝固剂含量比固体培养基少),可用于观察细菌的运动等。

(二) 按照培养基的成分

培养基可分为合成培养基、天然培养基和半合成培养基。天然培养基是指利用动物、植物、细菌体或其提取液制成的培养基,最大特点是不知其确切化学组分,其优点是易获取、营养丰富、种类多、配制简单。其缺点是不同批次的培养基成分不稳定。合成培养基是由化学成分完全了解的物质配制而成的培养基,它的特点是成分精确,重复性好,利于保持培养基组分的一致。其缺点是价格较贵,配制繁杂。半合成培养基是既含有天然组分又含有纯化学试剂的培养基。

(三) 按照培养基用途

培养基分为基础培养基、增菌培养基、选择培养基、鉴别培养基和厌氧培养基。

基础培养基是含有一般微生物生长繁殖所需的基本营养物质的培养基。牛肉膏蛋白胨培养基是最常用的基础培养基。增菌培养基,是为了满足某些微生物的营养需求,在基础培养基中加入血、血清、动植物组织提取液制成的培养基。选择培养基是用来将某种或某类微生物从混杂的微生物群体中分离出来的培养基,在培养基中加入相应的特殊营养物质或化学物质,抑制不需要的微生物的生长,有利于所需微生物的生长。鉴别培养基是用于鉴别不同类型微生物的培养基,在培养基中加入某种特殊化学物质,使培养后会发生某种变化,从而区别不同类型的微生物。厌氧培养基是专门用来培养厌氧细菌的培养基。

二、培 养 法

一般细菌均可用人工方法进行培养,使其生长繁殖,以便进一步观察和研究它们的各种生

物学特性。根据培养目的和细菌的种类选用最适宜的培养方法。常用的培养方法有一般培养法、二氧化碳培养法和厌氧培养法。

(一) 一般培养法

一般培养法,又称需氧培养法,是指需氧菌或兼性厌氧菌在有氧条件下的培养,将目的细菌接种在适宜的培养基后,置 37℃ 孵箱中培养 18~24 小时,无特殊要求的细菌均可生长。对少数增殖缓慢的细菌,如结核分枝杆菌,需培养 2~4 周。为使孵育箱内保持一定的湿度,可在其内放置一杯水。对培养时间较长的培养基,接种后应将试管口用棉塞塞好或用石蜡-凡士林封固,以防培养基干裂。

(二) 二氧化碳培养法

某些细菌特别是初次分离培养时,如脑膜炎奈瑟菌、淋病奈瑟菌等,需置 5%~10% CO₂ 环境才能生长。常用以下方法供给 CO₂: 二氧化碳培养箱、烛缸法、化学法、气袋法。常用简便的方法是二氧化碳培养箱。二氧化碳培养箱能对二氧化碳的含量、温度和湿度进行调节,培养基置于孵育箱内,孵育一定时间后可直接观察生长结果。

(三) 厌氧培养法

厌氧菌对氧敏感,在氧存在的情况下不能生长或会死亡。因此,厌氧菌标本的采集及运送有特殊的要求及注意事项,应尽量少接触空气,避免正常菌群的污染,并立刻送检。厌氧菌的培养法可分为:物理法、化学法、生物法以及混合法。

三、生长现象

(一) 液体培养基

液体培养基一般用来扩增细菌,细菌在液体培养基中有三种生长现象,包括混浊生长、沉淀生长和表面生长。

1. 混浊生长 细菌均匀混浊生长在液体培养基中,大多数细菌包括兼性厌氧菌呈混浊生长。
2. 沉淀生长 细菌在液体培养基的底部生长,如链状的细菌。
3. 表面生长 专性需氧菌在液体培养基的表面形成菌膜,如结核杆菌。

(二) 固体培养基

固体培养基包括平板和斜面培养基,平板培养基一般用来分离培养,将原混杂在一起的细菌分散在固体培养基表面,经过培养,形成单个菌落(colony)。菌落是单个细菌分裂繁殖成一堆肉眼可见的细菌集团。菌落有以下三种形态。

1. 光滑型菌落 一般呈圆形、突起,表面光滑、湿润,边缘整齐,大多数细菌是光滑型菌落。
2. 粗糙型菌落 表面粗糙、干燥,呈颗粒状。如结核分枝杆菌形成粗糙型菌落。
3. 黏液型菌落 表面黏稠、有光泽,似水珠样。如厚荚膜的细菌。

(三) 半固体培养基

半固体培养基一般用来鉴别细菌的动力和保存菌种。经过穿刺接种培养后,有鞭毛的细菌,即有动力,沿穿刺线呈扩散生长,穿刺线周围浑浊;没有鞭毛的细菌,无动力,沿穿刺线生长,周围透明。

第三节 病毒的分离培养

病毒的分离培养是病毒性状研究、疫苗制备、流行病学检测、临床诊断等方面的重要实验技术。病毒是专性细胞内寄生,不能在无生命的培养基上生长,必须在活的细胞内才能进行复制

增殖。实验动物、鸡胚以及体外的细胞成为人工培养病毒的场所。据此,用于分离和培养病毒的方法有:动物培养法、鸡胚培养法和细胞培养法。

一、动物培养法

动物接种是最原始的病毒培养方法,但目前仍有不少病毒需用动物来分离培养。病毒在易感动物细胞内能够很好地生长繁殖。根据病毒种类,选择适宜的敏感动物及接种部位。常用的动物有小鼠、大鼠、豚鼠、兔和猴等;接种的途径有皮下、皮内、鼻内、脑内、腹腔内、静脉等,接种时要根据病毒对动物及组织细胞的亲嗜性而选择特定的接种部位。

动物培养法的优点是操作简便、结果易于观察等,缺点是动物本身可能有病毒的隐形感染,有的动物很贵等(如猴子、猩猩等)。一般来讲,幼龄动物比年长动物对病毒的敏感性更高。

二、鸡胚培养法

鸡胚适于许多人类和动物病毒的生长增殖,是常用的病毒分离培养方法之一。目前,鸡胚在正黏病毒、副黏病毒、痘病毒、疱疹病毒及脑炎病毒,尤其在禽类病毒的研究上应用较多。用于病毒的分离、鉴定,抗原和疫苗制备等。鸡胚培养的优点是价格低廉,来源充足,操作简单,易感病毒谱较广等。鸡胚培养的缺点是除痘斑和鸡胚死亡是特异性感染指征外,多需用第二试验系统来测定病毒存在与否;非 SPF(specific pathogen free)鸡胚,可能带有病毒。原则上应使用非免疫蛋来孵鸡胚,最好用 SPF 鸡胚。

根据病毒种类不同,可将标本接种于鸡胚的羊膜腔、尿囊腔、卵黄囊或绒毛尿囊膜上。不同的病毒应选择各自适宜的接种途径,并根据接种途径确定鸡胚的胚龄。绒毛尿囊膜接种主要用于疱疹病毒和痘病毒等病毒的分离和培养,接种的病毒可在鸡胚绒毛尿囊膜上形成痘斑和病斑。优点是收毒量高,缺点是操作不易成功。尿囊腔接种主要用于正黏病毒和副黏病毒,如禽流感病毒和新城疫病毒的分离和培养。卵黄囊接种主要用于虫媒披膜病毒以及鸚鵡热衣原体和立克次体的分离和培养。羊膜腔接种主要用于正黏病毒和副黏病毒的分离和培养,操作技术比较困难。

三、细胞培养

20 世纪 50 年代采用了将组织细胞分散的技术,使组织培养变为细胞培养,得以应用于病毒学研究、诊断及疫苗制备等方面。由于细胞培养源自组织培养,现组织培养和细胞培养基本看做是同义词,前者是包括后者在内的更广义的动物细胞、组织、器官的离体培养。细胞培养最常用于培养病毒,特点是细胞培养中的每个细胞的生理特性基本一致,对病毒的易感性也相等,没有实验动物的个体差异;可以用于实验的数量远远超过动物或鸡胚,并且可以在无菌的条件下进行标准化的实验,可重复性良好;病毒增殖可通过观察细胞产生的变化如细胞病变等来判定结果,也可结合免疫学技术检测细胞内有无增殖的病毒;用细胞培养可从感染动物组织内分离病毒并进行病毒克隆,以分离获得纯化的单一毒株。

随病毒种类和感染细胞类型的不同,细胞感染病毒后会发生不同的改变即细胞病变效应,如细胞变圆、坏死、溶解、脱落等,或可形成多核巨细胞,或形成包涵体。根据细胞的来源,染色体特性及传代次数又可分为下列类型:原代细胞培养,二倍体细胞株和传代细胞系。

原代细胞(primary cell):动物组织经胰蛋白酶等消化、分散,获得单个细胞,培养于培养器皿生长的细胞。最好用 SPF 动物组织,以避免携带潜伏的病毒。大多数组织均可制备原代细胞,但生长的速度及难易程度不等,肾和睾丸最为常用。二倍体细胞株(diploid cell strain):将长成的原代细胞消化分散成单个细胞,继续培养传代,传代细胞的染色体数目与原代细胞一样,都为

二倍体,即为二倍体细胞株。从样本中分离培养病毒,一般多采用此种细胞。传代细胞系(established cell line):与上述两类细胞不同,由肿瘤组织或转化细胞培育而成的染色体数目异常、可无限传代和性状稳定的细胞株。具有传代及培育简便、应用广泛等优点,但也具有对分离野毒不敏感、易于污染或隐性感染病毒等缺点,因此传代细胞系一般不能用于制备疫苗,尤其是人用疫苗。

至今上述分离培养病毒的方法,没有任何一种可将全部或绝大多数病毒分离培养成功。所以,采用何种培养方法,还要具体问题具体对待。

第四节 真菌的分离培养

真菌对营养的要求不高,常用的培养基是沙保弱培养基(Sabouraud's medium)。该培养基的成分简单,主要含有蛋白胨、葡萄糖、氯化钠和琼脂。常用的培养基还有马铃薯糖琼脂培养基、黄豆芽汁培养基和豌豆琼脂培养基等。真菌在不同培养基中均能生长,但菌落及菌体形态有很大差异。为了统一标准,鉴定时以沙保弱培养基上生长的真菌菌落形态为准。

真菌分离培养应考虑所分离真菌的特性,配制合适的培养基,选择所需的气体环境。多数病原性真菌生长缓慢,培养1~4周才出现典型菌落;培养真菌的温度为22~28℃,某些深部感染的真菌其最适生长温度为37℃;最适酸碱度为pH4~6。同时,由于真菌分离材料常污染有大量细菌,所以可在培养基中加入抗生素并在分离培养过程中严格执行无菌操作。

在沙保弱培养基上,不同的真菌可形成三种不同的菌落。

酵母型菌落:是单细胞真菌的菌落形式。菌落为圆形,较大,柔软而致密、光滑、湿润,无菌丝长入培养基,与细菌菌落相似。隐球菌菌落属于此型。

类酵母型菌落:也称酵母样菌落,是单细胞真菌的菌落形式。菌落外观上和酵母型菌落相似,假菌丝长入培养基,在显微镜下可看到假菌丝。白假丝酵母菌落属于此型。

丝状菌落:是多细胞真菌的菌落形式。菌落表面大都有气中菌丝,呈绒毛状、粉状、棉花样,菌落底部有营养菌丝长入培养基内,菌落正背两面呈不同的颜色。丝状菌落的形态和颜色常作为鉴定真菌的参考。

第五节 人体寄生虫的分离培养

模拟寄生虫生活所需要的环境及人工制备寄生虫所必需的生活条件进行寄生虫的体外培养,从而获得大量新鲜和具有生活力的虫体,供寄生虫免疫学、遗传学、生理生化以及药物治疗等方面的研究和实验诊断。这些对加强基础理论研究和实际应用都具有重要的意义。下面介绍一些人体寄生虫代表性的分离培养方法。

一、腔道原虫的培养

腔道原虫培养的接种、培养与转种全过程须无菌操作,实验方法如下:

(一) 取材

注意粪便要新鲜、无尿液混合;滋养体要在排便后15分钟内接种,包囊可在1~2天内接种。

(二) 容器消毒

盛粪便的容器应煮沸消毒,勿用化学药品消毒。

(三) 接种

稀便取约0.5ml,采用脓、血、黏液处;成形粪便从不同部位取黄豆大小的粪便接种进试管,与管内培养液混匀;或将大使用沉淀法浓集后,取沉淀物约0.5ml进行培养。