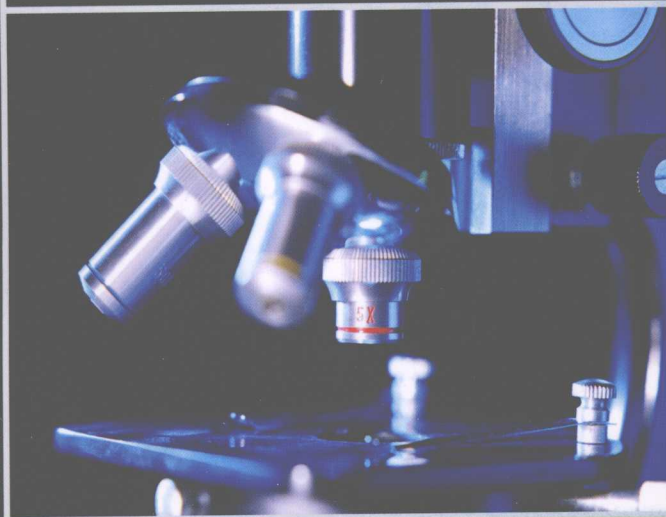


微生物学及检验技术

主编 于威 孟冬梅

WEISHENGWUXUE

JI JIANYAN JISHU



黑龙江科学技术出版社

微生物学及检验技术

主编 于 威 孟冬梅

黑龙江科学技术出版社

中国·哈尔滨

图书在版编目 (CIP) 数据

微生物学及检验技术/于威等主编. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 2008. 5

ISBN 978—7—5388—5805—1

I. 微... II. 于... III. 微生物学—医学检验
IV. R446.5

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 075596 号

责任编辑 张向红

封面设计 刘 洋

微生物学及检验技术

WEISHENGWUXUE JI JIANYAN JISHU

主编 于威 孟冬梅

出 版 黑龙江科学技术出版社

(150001 哈尔滨市南岗区建设街 41 号)

电话 (0451) 53642106 传真 53642143 (发行部)

印 刷 黑龙江中亚印务有限公司

发 行 黑龙江科学技术出版社

开 本 787×1 092 1/16

印 张 16.75

字 数 396 000

版 次 2008 年 6 月第 1 版·2008 年 6 月第 1 次印刷

印 数 1—1 000

书 号 ISBN 978—7—5388—5805—1/R·1500

定 价 30.00 元

《微生物学及检验技术》

编委会

主 编	于 威	孟冬梅
副主编	郑遵荣	蔺慧敏 康淑霞
编 委	于 威	东北农业大学校医院检验科
	王炳辉	黑龙江省牡丹江市中医医院检验科
	刘景香	黑龙江省农垦总局牡丹江分局中心医院检验科
	刘云生	黑龙江省农垦总局牡丹江分局中心医院检验科
	张学艳	东北农业大学校医院检验科
	孟冬梅	黑龙江省农垦总医院检验科
	郑遵荣	黑龙江省农垦总医院检验科
	康淑霞	黑龙江省牡丹江市中医医院检验科
	蔺慧敏	黑龙江省中医研究院检验科
	潘秀萍	黑龙江省五九七农场医院检验科
	魏艳娣	黑龙江省虎林市八五零农场医院检验科
	高珉之	黑龙江省疾病控制中心毒理病理所
	赵玉梅	黑龙江省牡丹江市中医医院检验科

前 言

临床医学检验目前正以日新月异的速度飞速发展,新技术、新方法、新仪器不断推出。医学检验部门在疾病的诊疗方面发挥着举足轻重的作用,特别是生物工程技术的发展与应用,更促进了许多新的医学检验项目的应运而生,从而将医学检验推向了一个新的阶段。

为了进一步推进各医疗单位的医学检验技术的发展,规范临床检验操作,提高各医疗单位对临床医学实验室的管理水平,我们查阅了大量有关微生物学及检验技术方面的最新资料,编写了此书。主要内容包括临床微生物标本培养的规范化操作;微生物实验室的建立;临床细菌室基本染色技术常用培养基、试剂与诊断血清;各种微生物的分离与鉴定;各种微生物检验技术;抗微生物敏感性试验规范等,适合从事临床微生物学的工作者阅读。

本书的编写着重于实用性与先进性兼顾,法规性与参考性并存,力求文字简明,表达准确,便于掌握。但由于篇幅较大,内容与行文风格难免有不协调之处,希望各单位的检验工作者多提宝贵意见,以便再版时修正。

在本书的编著过程中,得到多方面的关心和支持,在此一并感谢。

于 威
2008年3月

目 录

第一章 微生物检验绪论	(1)
第一节 微生物和医学微生物学.....	(1)
第二节 医学微生物学发展简史.....	(2)
第三节 微生物检验技术简介.....	(4)
第二章 微生物学实验室设备及实验器材	(7)
第一节 细菌学实验室建设.....	(7)
第二节 病毒学实验室的建设.....	(9)
第三节 常用实验器材的准备	(11)
第三章 临床微生物标本培养的规范化操作	(16)
第一节 标本采集和处理的原则	(16)
第二节 血液培养的操作规范	(18)
第三节 下呼吸道标本培养的操作规范	(21)
第四节 尿液标本培养的操作规范	(24)
第五节 粪便标本培养的操作规范	(27)
第六节 生殖道标本培养的操作规范	(31)
第七节 化脓和创伤标本培养的操作规范	(35)
第八节 穿刺液标本培养的操作规范	(37)
第九节 眼、耳、鼻、咽拭子标本培养的操作规范.....	(40)
第十节 导管等标本培养的操作规范	(41)
第十一节 组织标本培养的操作规范	(42)
第四章 细菌的形态学检查方法	(45)
第一节 细菌大小的测定方法	(45)
第二节 细菌形态的检查方法	(46)
第三节 细菌特殊结构的检查方法	(51)
第五章 临床细菌室常用培养基、试剂与诊断血清	(55)
第一节 常用基本分离培养基	(55)
第二节 基本的生化鉴定培养基	(96)
第三节 常用诊断血清.....	(123)
第六章 需氧菌及兼性厌氧菌鉴定	(136)
第一节 细菌鉴定工作的注意问题.....	(136)
第二节 葡萄球菌属鉴定.....	(138)
第三节 链球菌属鉴定.....	(141)

第四节	肠球菌属鉴定	(144)
第五节	奈瑟菌属鉴定	(145)
第六节	莫拉菌属鉴定	(147)
第七节	嗜血杆菌属常规鉴定	(148)
第八节	棒状杆菌属鉴定	(151)
第九节	军团菌属鉴定	(153)
第十节	李斯特菌属鉴定	(155)
第十一节	奴卡菌属鉴定	(157)
第十二节	弧菌属鉴定	(159)
第十三节	气单胞菌属鉴定	(163)
第十四节	邻单胞菌属鉴定	(164)
第十五节	布兰汉菌亚属鉴定	(165)
第十六节	假单胞菌属鉴定	(166)
第十七节	肠杆菌科鉴定	(169)
第十八节	不动杆菌属	(182)
第十九节	产碱杆菌属常规鉴定	(184)
第二十节	加德纳尔氏菌属	(185)
第七章	常见厌氧菌的分离与鉴定	(187)
第一节	概 述	(187)
第二节	各类厌氧菌一般鉴定	(190)
第八章	常见致病性病毒检验技术	(201)
第一节	病毒的检测方法概论	(201)
第二节	常见的病毒与临床	(204)
第九章	抗微生物药物敏感性试验	(210)
第一节	抗菌药物敏感试验概述	(210)
第二节	抗菌药物敏感试验指南	(213)
第三节	苛养菌的体外抗菌药物敏感试验	(229)
第四节	厌氧菌的体外抗菌药物敏感试验	(231)
第五节	酵母样真菌体外药敏试验	(233)
第六节	联合抗菌药物体外抗菌药物敏感试验	(236)
第七节	体内抗菌药物浓度及活性检测	(237)
第八节	细菌耐药性检测	(238)
第九节	临床经验	(251)
第十章	细菌检验中的自动化技术	(253)
第一节	自动化细菌鉴定系统	(253)
第二节	自动血培养分析仪	(255)
参考文献		(258)

第一章 微生物检验绪论

第一节 微生物和医学微生物学

微生物(microorganism or microbe)是众多个体微小、结构简单、肉眼直接看不到的微小生物的总称。微生物种类繁多,广泛存在于自然界土壤、空气、水中及动物与人体的体表和与外界相通的腔道里,如消化道、呼吸道等。按照目前生物分类系统,将所有生物分为6个界,即病毒界、原核生物界、真核原生生物界、真菌界、植物界与动物界。微生物包括除动、植物界以外的4个界中。而根据其细胞结构特点,习惯地把微生物归为3种类型,即真核细胞型微生物、原核细胞型微生物和非细胞结构型微生物。

(1)非细胞结构型微生物。无细胞结构,由核心和蛋白质核壳组成。核心中只有RNA或DNA一种核酸。此类微生物包括病毒(virus)以及结构更简单的亚病毒(subvirus)。

(2)原核细胞型微生物(prokaryote)。细胞的分化程度较低,仅有原始的核,无核仁和核膜,胞浆内无完整的细胞器。属于原核细胞型的微生物统称细菌(bacterium),包括古细菌(archaebacterium)、真细菌(eubacterium)和蓝细菌(cyanobacterium)。蓝细菌过去称蓝绿藻(bluegreen algae),能进行光合作用,目前尚未发现具有致病性。古细菌代表一类细胞结构更原始、其16SRNA序列与其他原核细胞微生物和真核细胞微生物截然不同的微生物,包括产甲烷细菌(methanogen)、在极端条件下生长的极端嗜盐菌(extreme halophile)和嗜热嗜酸菌(thermoacidophile)。除了古细菌和蓝细菌以外的其他原核细胞型微生物统称为真细菌,包括细菌、衣原体、支原体、立克次体、螺旋体和放线菌等。

(3)真核细胞型微生物(eukaryote)。细胞核的分化程度较高,有核膜、核仁和染色体,胞浆内有完整的细胞器,行有丝分裂。真菌界和真核原生生物界的微生物都属于此类。自然界中的绝大多数微生物对人类和动植物的生存是无害、甚至是必不可少的,在地球上生物的繁荣发展、食物链的形成中微生物起着重要作用。如果没有微生物把有机物降解成无机物并产生大量CO₂,其结果将是一方面地球上有机物堆积如山。另一方面,新的有机物将无法继续合成。在这样的生态环境中一切生物将无法生存。

人和动物机体内正常情况下存在的微生物群系称为正常菌群(normal flora)。微生物学的研究证明,正常菌群对于机体具有生理作用、免疫作用和生物屏障作用。在人类的生活和生产活动中,微生物的作用已被广泛应用于各个领域。在工业方面,微生物应用于食品、酿造、制革、石油勘探、废物处理,尤其在抗生素的生产中更是十分重要的。

在农业方面,细菌肥料、植物生长激素的生产以及植物虫害的防治都与微生物密切相关,微生物还在近年开展起来的遗传工程或基因工程中广为利用。例如,噬菌体和质粒是分子遗传学中的重要载体;限制性核酸内切酶是细菌代谢的产物;大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌及酵母菌是常用的工程菌。

自然界中的微生物有少数能使人类和动植物发生病害,称为病原微生物(pathogenic microbes, or pathogen)。例如,结核分枝杆菌可引起结核病,肝炎病毒引起病毒性肝炎等。

微生物学(microbiology)是研究微生物的形态结构、生命活动规律以及与机体相互关系的科学。微生物学工作者的任务是在不断深入研究的过程中,使对人类有益的微生物服务于社会生产实践,并使对人类有害的微生物得到有效的控制和消灭。随着微生物科学的飞速发展,微生物学已形成若干分支。例如,着重研究微生物基本生命规律的有普通微生物学、微生物分类学、微生物生理学、微生物遗传学、微生物生态学、分子微生物学等。根据其应用领域分为工业微生物学、农业微生物学、医学微生物学、兽医微生物学、海洋微生物学、环境微生物学等。根据研究的微生物对象又可分为细菌学、病毒学及真菌学等。这些分支学科通过各自领域的深入研究,为微生物学全面发展提供了丰富的内容。

医学微生物学(medical microbiology)是研究与医学有关的病原微生物的生物学特性、致病性和免疫性、微生物学检查法以及特异性预防和治疗原则等内容的一门科学。医学微生物学是医学基础课程中必不可少的组成部分,与寄生虫学、生物学、免疫学、病理学、药理学、生物化学、分子生物学以及分子遗传学等学科有着广泛联系,为学习临床各科的感染性疾病、超敏反应性疾病、肿瘤等奠定重要的理论基础。同时,也可运用所学知识直接为控制和消灭感染性疾病、保障人民健康服务。

第二节 医学微生物学发展简史

医学微生物学是人类在探讨传染性疾病的病因、流行规律以及防治措施的过程中,通过长期反复实践、认识,并随着科学的进步逐渐发展和完善起来的科学。学习医学微生物学发展史,不但能使我们了解医学微生物学发展的历史,也会使我们从各阶段的重大发现中得到启发,鼓舞人们朝着更深的方向和在新的领域里不断探索。

从远古开始,人类的生存即经常受到各种传染性疾病尤其是烈性传染病的困扰。但由于科学不够发展,对于微生物是传染性疾病的真正病原长期未能得到认识。直到16世纪(1546年)意大利人Fracastoro(1483~1553年)提出传染生物学说(contagium vivum theory),认为“流行病是由肉眼看不见的活的传染性微生物传播的”。他将传染区分为接触传染、空气传染和媒介物传染3种方式。限于当时的科学技术水平虽不能证实这些传染性生物的存在,但他的观点是符合今天的流行病学规律的。在中国明朝的隆庆年间(1567~1572年)人们已广泛应用人痘预防天花。

1674年荷兰人吕文虎克(Antony van Leeuwenhoek, 1632~1723年)用自制的能放大40~270倍的显微镜第一次观察到各种形态的微生物。尽管当时对微生物与传染病的关系没有得到确认,但对微生物的存在给予了肯定的客观证实,为微生物学的发展奠定了基础。

巴斯德(Louis Pasteur, 1822~1885年)是法国化学家,也是微生物学和免疫学的奠基人。他在解决葡萄酒变质原因的研究工作中证实了有机物的发酵与腐败是由微生物引起的,而酒类的变质是由于污染了酵母菌以外的另一些杂菌的结果。为了防止酒类变质,他在发酵生产中先将供发酵的基质加温62℃,作用3 min,然后再放入酵母菌。此即沿用至今的巴氏消毒法(pasteurization)。巴斯德用加热过的酵母菌液不再发酵的事实否定了“生物自生论”在生物科学中的影响。此外,巴斯德还首次研制成了炭疽菌苗、狂犬病疫苗。

继巴斯德之后,德国医生科霍(Robert Koch,1843~1910年)在确立病原菌作为传染病病因方面做了大量研究工作。他创用了固体培养基和细菌染色技术,使得病原菌的分离培养和鉴定成为可能。科霍先后发现了炭疽芽孢杆菌(1876年);结核分枝杆菌(1882年)和霍乱弧菌(1883年)。在他的带动和影响下,各国细菌学家相继发现了许多对人和动物致病的病原菌。到19世纪末,很多重要的病原菌陆续被发现。为了论证某一特定细菌引起某种特定的传染病,科霍提出了4条标准,即科霍法则(Koch's postulate):①在同一特定疾病的机体中常能发现同一种病原菌。②能从患该病的机体中得到病原菌的纯培养。③将这种培养物接种到易感动物体内能引起相同的疾病。④能从感染的实验动物重新获得纯培养的病原菌。此法则虽然忽视了机体防御机能以及并非所有的病原菌都能满足上述条件,但是在今天它在确定某一新的病原体与疾病的关系时仍具有一定的指导意义。

在巴斯德、科霍等人对细菌学研究取得迅速进展的同时,科学家们又把目光转移到比细菌更小的微生物病因的研究上。1892年俄国学者伊凡诺夫斯基1864~1920年,发现患烟草花叶病的烟叶汁通过滤菌器仍保留其感染性。1898年荷兰科学家贝杰林克(Beijerinck M. W.,1851~1931年)在重复上述实验时指出,该病是由一类比细菌更小的传染性病原体引起。同年Loeffler和Frosch发现患口蹄疫动物的淋巴液中含有能通过滤菌器的感染性物质,并命名为超滤性病毒(ultrafiltrable vires)。1901年美国科学家Walter-Reed首先分离出黄热病毒。这是第一个被发现的人类病毒。1915年英国人Twort发现了噬菌体。至此,到本世纪初,植物病毒、动物病毒、人类病毒和细菌病毒相继被分离出来。

英国医生琴纳(Edward Jenner,1749~1823年)于18世纪末应用研制的牛痘苗预防天花是人类运用人工自动免疫方法预防疾病的开始。巴斯德研制的炭疽疫苗和狂犬病疫苗大大丰富了人工自动免疫的内容。德国学者贝林格(Emil Adolf von Behring,1845~1917年)研制了白喉抗毒素以及他与日本学者北里(Kitasato S. 1852~1931年)共同研制的破伤风抗毒素开创了人工被动免疫在治疗传染性疾病中应用的先例。

抗生素的发现是继化学治疗药物之后治疗微生物感染方面具有划时代意义的重大科学成果。1929年英国人弗莱明(Alexander Fleming,1881~1955年)发现青霉菌产物青霉素能抑制金黄色葡萄球菌的生长。1940年Florey等提取出青霉素的结晶纯品,并证实了其临床应用价值,给感染疾病的临床治疗带来了一次大的革命。青霉素的发现带动了抗生素的寻找和生产。此后链霉素(1944年)、氯霉素(1947年)、四环素(1948年)、头孢霉素(1948年)、红霉素(1952年)、林可霉素(1962年)以及庆大霉素(1963年)相继被发现并研制成功。

进入本世纪中期,随着生物化学、遗传学、细胞生物学和分子生物学等学科的发展,以及电子显微镜、气相色谱和液相色谱技术、免疫技术和分子生物学技术的进步,促进了微生物学的发展,人们在分子水平上探讨基因结构与功能、致病物质基础及诊断方法,使人们对微生物的生物学特性及其活动规律有更深刻的认识,发现了一些过去没发现的病原微生物。例如,1976年在美国费城发生一起与退伍军人集会有关的暴发性肺炎流行,1978年嗜肺军团菌(*L. pneumophila*)便被确认和命名;1977年在美国康涅狄格州Lyme镇发现一种特殊的皮肤病,被命名为莱姆病(Lymedisease)。1982年Burgdorfer和Barbour从蜱体内分离出一种新的螺旋体,证实为莱姆病的病原体,此即现在已命名的伯氏疏螺旋体(*B. burgdorferi*,莱姆病螺旋体)。从发现疾病到证实其病原体只用了2~5年时间,这在以前是难以想象的。这些结果的取得是与微生物学科有关的新技术的应用及有关理论知识的发展和进步

是分不开的。1981年首例获得性免疫缺陷综合征即艾滋(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)在美国报告。1983年5月,法国巴斯德研究所首先从AIDS病人淋巴结中分离出一种新的逆转录病毒,命名为淋巴腺病相关病毒(Lymphopathy-associated virus, LAV),并证明LAV与AIDS的病原关系。1984年5月美国研究者Gallo将从AIDS病人淋巴细胞分离的一种逆转录病毒命名为嗜T淋巴细胞白血病病毒3型(HTLV-III)。1986年,7月,国际病毒分类委员会将引起AIDS的病毒统一命名为人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)。研究发现, HIV侵犯人的CD₄⁺细胞,引起CD₄⁺细胞的大量破坏,造成免疫功能损伤,最后因并发感染或肿瘤而死亡。截至1998年12月1日,据世界卫生组织(WHO)公布的统计数字表明,世界上HIV感染者和AIDS患者已达3340万人,死亡者为1390万。目前,在中国内地上的HIV感染者已逾30万人,AIDS患者超过万人。各国政府对AIDS的研究都给以很大支持,相信人类最终会像征服其他传染病一样能够控制AIDS的流行。

20世纪80年代开展起来的单克隆抗体(McAb)技术、酶联免疫吸附试验(ELISA)、聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)以及其他新标记技术的应用使微生物学诊断技术更特异、更简便和更敏感。目前已经完成了流感嗜血杆菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、幽门螺杆菌、肺炎支原体、生殖支原体、伯氏疏螺旋体、梅毒螺旋体8种细菌、3种古细菌(Methanococcus Jannaschii、Methanobacterium thermoautotrophicum 和 Archaeoglobus fulgidus)以及啤酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)等微生物的全基因组序列分析。在20世纪行将结束的时刻,回顾历史,微生物学可以无愧地宣布,在本世纪生物学发展的3个关键阶段上(DNA双螺旋与中心法则、遗传工程和人类全基因组研究),它都是站在潮流的前列发挥着不可代替的作用的。

1980年5月WHO宣布人类已彻底消灭了天花这一曾经对人类造成严重威胁的烈性传染病。WHO计划下一步要在全球消灭脊髓灰质炎、麻疹和白喉等传染病。可以预期,随着医学微生物学的发展,会有更多的疾病被战胜、被消灭;也会有新的微生物被发现。展望21世纪,古老的微生物学将冲出传统的模式微生物、特殊微生物及医学微生物的领域,进入以分子生物学和分子遗传学为代表的生物信息学时代,人们最终将把遗传、发育与进化统一起来,以更大的规模在更深的层次上改造生物,使之为人服务。

医学微生物学在我国起步较晚。解放前只有极少数人从事微生物学工作。新中国成立后,在党和政府的关怀和统一规划下,从培养干部到基本建设都取得了显著成绩。我国学者汤飞凡在世界上首次分离培养出沙眼衣原体。在我国,基因工程生产的干扰素和乙型肝炎疫苗已大量投放市场;较快地消灭了天花;基本控制了包括鼠疫在内的烈性传染病的发生和流行;成功地制造脊髓灰质炎疫苗、麻疹疫苗、甲型肝炎疫苗以及其他一些细菌的、病毒的疫苗,推广计划免疫,降低这些传染病的发病率。今天,广大医学微生物学工作者正在积极努力,使我国医学微生物学在理论和技术方面缩短与世界先进水平的差距,更好地为保障人民健康、提高民族素质,为实现四个现代化和迎接21世纪做出自己的贡献

第三节 微生物检验技术简介

根据病原微生物的形态、结构、代谢活动、遗传和变异等生物学特性,临床微生物的实验

室诊断技术主要包括：

一、形态学检查

病人标本直接涂片做染色镜检是简便、快速、有价值的方法之一。如脑膜炎患者的脑脊液和淤斑刺破涂片，常可显示在细胞内的革兰阴性肾形双球菌，具有诊断价值。白喉患者咽部假膜涂片中可见典型的杆菌有时可有异染颗粒，也有参考诊断价值。结核患者痰直接或浓集后，涂片抗酸染色检出抗酸杆菌有参考诊断价值。另外，可利用免疫荧光或酶标记抗体染色镜检方法进行快速诊断，如粪便中的霍乱弧菌、痢疾杆菌等。

二、细菌的人工培养及生化试验

1. 人工培养

大多数病原菌的形态与染色并无特征，因此需要用培养方法来分离与鉴定细菌。虽然这一方法需要的时间较长，但比较可靠。细菌的人工培养就是人工提供细菌生长繁殖所需要的营养和生长条件，如温度、湿度及气体环境，使细菌迅速生长繁殖。细菌人工培养的主要目的是对细菌进行分离鉴定及增菌培养。临床微生物学中人工培养技术除用于对病原菌分离鉴定外，还用于毒力鉴定及抗菌药物敏感试验。

2. 生化试验

细菌在合成与分解代谢过程中，能通过酶利用一些物质或分解一些物质。不同的细菌具有不同的酶促系统，因此能够利用与分解的物质也各不相同。因此，在细菌的鉴定过程中，常常根据细菌对营养物质的分解能力不同及其代谢产物的差异来区别和鉴定细菌。细菌的生化反应是指反映纯培养细菌群体的代谢能力以及鉴别细菌的技术。

3. 免疫检测技术

(1) 抗原的检测。有些细菌即使用生化反应也很难区别，但其细菌抗原成分(包括菌体抗原、鞭毛抗原)却不同，利用已知的特异抗体测定有无相应的细菌抗原可以确定菌种或菌型。微生物学中常用的免疫检测技术包括：凝集反应、沉淀反应、补体结合试验、免疫荧光技术、酶免疫测定及皮肤反应等。常用的方法为玻片凝集反应，近年又发展了各种免疫检测的敏感方法，如对流免疫电泳、放射免疫等，试图直接从患者标本中检测细菌抗原作快速诊断。如在细菌性脑膜炎中，利用对流免疫电泳在脑脊液中可分别检测到肺炎球菌、脑膜炎球菌及流感杆菌抗原，特异性高，敏感性亦高。检测抗原的另一优点为在应用了抗菌药物治疗后，细菌生长被抑制，利用培养方法不能检出的细菌，因尚有抗原存在，在短期内仍可被检出，从而有助于明确病因。

(2) 抗体的检测。用已知的细菌或抗原检测患者体液(主要为血清)中有无相应抗体及抗体量的动态变化，可辅助诊断。一般采用血清进行试验，故又称为血清学试验。血清学试验适用于抗原性较强的病原菌及病程较长的传染病诊断。正常人如已经受过某些病原菌隐性感染或近期进行过预防接种，血清中可能含有对该种病原菌的一定量的抗体，因此必须有抗体效价升高或随病程递增才有参考价值。血清学诊断主要为病后的回顾性诊断，但对感染产生相应的 IgM 抗体的检测，有早期诊断的价值。此外，在检测抗体时至少应有怀疑可能致病细菌的线索方可采用相应抗原，否则就无从选择做何种血清学试验。免疫缺陷病人和早期使用抗菌药物的病人抗体水平低可能影响结果判断。

4. 核酸分子杂交与聚合酶链式反应技术

通过检测病原体遗传物质来确认病原体,也许是检查病原体最为直接的方法了。目前比较成熟的技术包括核酸分子杂交与聚合酶链式反应技术。

(1)核酸杂交。应用核酸杂交技术检测病原微生物核酸是临床诊断学的重大发展,其原理是采用带有放射性核素或非放射性物质标记的已知序列核酸单链(股)作为探针,在一定条件下,按照碱基互补原则与待测标本的核酸单链退火形成双链杂交体,通过杂交信号检测,鉴定标本中有无相应的病原微生物基因及其分子大小。

(2)聚合酶链式反应技术。聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)是20世纪80年代末发展起来的一项极有应用价值的技术,设计病原体基因的特异引物,标本(不经培养)经过简单裂解、变性后,就可在PCR仪上进行扩增反应,经过25~30个循环,通过琼脂糖电泳即可观察扩增结果,检出病原体。由于PCR具有巨大的扩增能力、高敏感性、高特异性、简便、快速等特点,被临床广泛用于细菌、病毒、寄生虫所致疾病的诊断,尤其适于那些培养时间较长、生长条件要求苛刻的病原菌的检查,如结核杆菌、支原体、病毒等。PCR高度的敏感性使该技术在病原体诊断过程中容易出现假阳性,避免污染是提高PCR诊断准确性的关键环节。

5. 动物实验的应用

有些微生物在体外无法进行培养,必须通过动物实验进行分离,如立克次体及某些病毒等,结核分枝杆菌的致病性也只有动物实验才能最终确定。用动物实验检测细菌毒素是了解病原微生物毒力和致病力的一个重要方面。例如:白喉棒状杆菌毒力试验、破伤风梭状杆菌毒力保护试验、大肠埃希菌肠毒素检测等。

(于 威)

第二章 微生物学实验室设备及实验器材

第一节 细菌学实验室建设

一、细菌学实验室设置基本条件

细菌学实验室是进行细菌学实验的工作场所,临床标本的接种、分离、鉴定及药敏试验等操作都要在此完成。由于工作对象主要是病原菌,因此细菌学实验室(以下简称“细菌室”)应该符合一定的条件。

(1)细菌室所处的位置非常重要,一般位于建筑物的一端,有利于隔离和处理,房间坐北朝南。大体可划分三个区:第一区为清洁区,设办公室、会议室及仓库等,培养基室或试剂室亦可设置在此区内;第二区为中度危险区,此区设有标本收集室、刷洗室、一般实验室;第三区为危险区,从事传染性强的微生物实验工作。实验室以整齐、清洁、光线充足的单独房间为宜。室内酌情设置橱柜桌凳、水池、超净台等,以辅助日常工作的开展。地面用水磨石或瓷砖、塑料贴面,便于清理消毒处理。此外,根据工作的需要及可能,可设专用血清室、感染动物室等。

(2)细菌室必须有严密的门窗,防止室内环境受到外界微生物的污染,而且室内禁用风扇,避免室内细菌传播到室外。

(3)细菌室必须安装紫外灯,在操作台上方 1 m 处,工作前照明 20 min。要及时更换失效的灯管。

(4)室内应备有常用的消毒剂和供工作人员洗手用的盛有消毒剂的水盆、肥皂及自来水源等。室内操作台须每日用消毒剂擦洗,地面至少一周用消毒剂擦洗 1 次。

(5)对有菌的物品、标本和无菌的器材应明确分开并放在指定位置,同时要对用过的物品及时进行消毒处理。

(6)细菌室最好安装空调机,适合细菌实验工作,同时还要考虑消防安全问题。

二、基本设备和器具

1. 必须配置的设备

(1) 温箱、CO₂ 培养箱、厌氧培养设备。用于细菌培养。

(2) 高压蒸汽灭菌器和干烤箱。用于物品灭菌。

(3) 显微镜(附有油浸接物镜头)。用于观察细菌形态及标本直接镜检。

(4) 净化工作台和接种柜。无菌操作用。

(5) 冰箱和冷藏柜。贮存培养基、血清、抗生素及菌种。

(6) pH 计。制备培养基用。

(7) 接种针、接种环和酒精灯。用于挑取标本、接种的接种器具和用于接种器具灭菌的

酒精灯。

2. 辅助设备

离心机、天平(包括分析天平)、平皿等玻璃器皿、温度计、试管及试管架、漏斗、乳钵、标本缸、载物玻片、吸管、注射器、各种容量的烧瓶等,可根据需要购置其他仪器及用具。

三、几种仪器的管理和使用

1. 温箱

有隔水和非隔水式两种类型,温度可以调节,使用控温仪进行温度控制,其目的是可以避免由于温度偶然升高导致细菌死亡或生长受影响,也可以避免发生火灾。

一般培养细菌温度为 37°C ,附带的温度计可指示每时每刻的温度。培养箱在初次使用时,要每天观察温度变化,可以在箱门外面贴一张记录表,随手将温度记录在表中,此表为质控图,记录每天的温箱温度,一旦发现温度升高或降低,应及时调整。温箱温度正常的波动幅度应为所定温度 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。温箱内可放置一水盘或湿布,并经常更换以保持箱内一定的湿度,防止干燥。

2. 显微镜

显微镜油镜头是用来观察细菌菌体形态及标本的,应注意保护。使用结束后,应用擦镜纸擦去油镜头上的香柏油,或用拭镜纸蘸上二甲苯擦拭。但要注意二甲苯不应久存在镜头上,以免镜头上胶质被溶化而致镜片移位。旋转转换器,使各物镜呈八字形,放回原箱。避免阳光曝晒,不能用强酸、强碱、氯仿、乙醚或酒精擦拭。

3. 冰箱

冰箱是细菌室用于贮存制备好的培养基、菌种、菌液、药物、血清及标本等的必需设备。温度可以随意调节,使用时箱内禁止放入温热物品。放置冰箱内的器皿应加盖加塞,取放物品动作要快并迅速关闭箱门,以免箱内温度上升,定期进行清洁、整理及除冰。

4. 离心机

离心机要安放在合适地方,以保证离心机稳固和水平。操作时,液体注入沉淀管中后,连同外护套等金属管放在粗天平上平衡,离心时金属管底应垫以橡皮或棉花,以防玻璃离心管破碎。离心沉淀开始或停止时,使速度逐渐增快或减慢。关闭电门后,应待其自然停止旋转,不得用手强行制止。离心机必须保持干燥与清洁,每1~2个月给机器轴心加机油一次。

5. 净化工作台

净化工作台也称超净工作台,是当前国内外最普遍应用的无菌操作装置。其原理是内设鼓风机,驱动空气通过高效滤器净化后,让净化后空气徐徐通过台面空间,使工作场地构成无菌环境。根据净化后气流方向的不同,净化工作台有几种类型:侧流式为净化后气流由左侧或右侧通过台面流向对侧;直流式为气流从下向上或相反方向流动;外流式为气流迎操作者面吹来。三者都能达到净化效果。

当前市面净化工作台种类繁多,适合不同工作要求。净化工作台占据空间面积小,启动电源后立即可用,操作极其方便。根据使用滤垫微孔密度不同,不仅可滤掉细菌等微生物,对病毒透过也有一定防止作用,大大提高了工作效率。净化工作台的缺点是因尘埃堵塞需经常更换滤垫。为此工作台需安放在清洁无尘的房间,尘土过多易使滤器很快堵塞,降低净化作用。使用中要经常检查滤器是否淤滞,一旦发现气流变弱,如酒精灯火焰不摆动,说明滤器已阻塞应及时更换。在工作环境中尘埃较多时,为延长滤器寿命,可用5~8层纱布贴

盖在第一级滤口外以阻挡较大的尘埃。

6. pH 计

制备培养基时,校正 pH 计的精度要求不高,误差为 ± 0.1 即可。使用 pH 计校正 pH 时,可将电极放入盛有培养基的容器内,在磁力搅拌器的作用下,边测 pH 边滴加碱或酸校正。有条件的实验室可配置袖珍 pH 计,用来校正配量很少的培养基的 pH。pH 计的用法请参阅有关说明书。

第二节 病毒学实验室的建设

一、病毒学实验室的设置要求

理想的病毒学实验室应有多个房间并有单独的通气和排污系统。病毒学实验室一般与细菌学实验室相连,其中有一些器材、仪器(如天平、超速离心机、低温冰箱)可以共用,刷洗室也可以共用,故有 3 个工作间即可。若仅有一间实验室,如严格设计仍能开展工作。

1. 清洁区

应安排在房间远离人口的一端。所有无菌操作均应在此区域完成,利用净化工作台进行病毒培养。无菌器械应置于该区域相邻的位置,便于取用。操作台要进行日常消毒。该区域最好处于负压状态,空气经过过滤后排出室外。同时,工作人员仍应十分注意无菌操作,要严格遵守标本处理和病毒分离的实验程序,防止环境污染和实验人员感染。

2. 工作区

该区域有适当的通风和温度控制。尽量减少走动以避免空气混流及灰尘污染。工作台面要耐水、丙酮、酒精、染料并易于消毒。还备有防尘的抽屉、贮橱,用于存放玻璃器材、吸管、注射器及办公用品。

3. 洗涤区

安排在实验室的入口处。存放标本的冰箱、高压蒸汽灭菌器及其他日常使用的设备也可放置于此,并有工作人员更换衣服鞋帽的壁橱。

设备和仪器有:

CO ₂ 培养箱	荧光显微镜(落射光)
净化工作台	离子交换器
低温冰箱(-80℃)	超速离心机
酶标仪	电子天平
倒置显微镜	液氮(罐)瓶

二、几种仪器的保护与使用

1. CO₂培养箱

哺乳动物离体培养的细胞与体内生长的细胞一样,都需要在恒定温度条件下才能生存,温度变化值一般不应超过 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。因此要求培养箱应具有较高的灵敏度;电热恒温箱的质量关键在于控温装置的优

CO₂培养箱已成为普遍应用的设备,优点是箱内能恒定地提供一定量的 CO₂(通常为 5%),可使培养液维持稳定的 pH,减少调 pH 的麻烦。用 CO₂培养箱培养细胞,培养容器需

与外界保持通气状态,因此需用培养皿、螺帽培养瓶或用消毒棉堵塞容器口的办法,以保证通气。箱内空气应保持干净,如箱内有紫外灯时,应定期开启紫外灯进行消毒;如无紫外灯时,可定期用酒精擦拭消毒以减少箱内微生物。此外箱内尚需置水槽以维持湿度,避免培养液蒸发。水槽内注入的蒸馏水需为无菌水,并应加无腐蚀性和无挥发性的防腐剂,以防生霉。

2. 电热干烤箱

电热干烤箱主要用于烘干和干热消毒灭菌玻璃器皿。在干热灭菌时,温度一般要达到 160°C 。由于温度较高,而且需消毒的玻璃器皿数量较大,因此应选择比较大型规格的干烤消毒箱($650\text{ mm}\times 500\text{ mm}\times 500\text{ mm}$)。箱体太小不仅增加消毒灭菌次数,还容易使包裹的纸或棉花烧焦,烧焦的残渣对细胞生长不利。有些干烤箱往往带有鼓风机,鼓风干烤箱虽然升温较慢,但温度均匀,效果较好。鼓风与升温应同时开始,待温度达到 100°C 时可停止鼓风。禁止先升温后鼓风,因上升温度较高时,鼓风能使新鲜空气进入局部的高温区,有时会引起火灾或使玻璃器皿破裂。干热消毒灭菌后,要待温度降到 100°C 以下时,再打开箱门,以免玻璃器皿突然遇到冷空气而炸裂。金属器械、塑料制品、橡胶等不能在干烤箱内消毒灭菌。

3. 低温冰箱

各种培养用的溶液,如培养液、生理盐水、消化液、血清和各种待培养的组织等都要贮存在 0°C 或更低的温度条件下。普通冰箱是组织培养的必需设备。血清、酶、消化液和配制好的抗生素等溶液需要低温保存以防失去活性。不同生物制品要求保存温度不同,有的在保鲜温度(4°C)有的则必须低温保存。因此,尚需配置 -20°C 以下的低温冰箱,冰箱内应经常保持清洁,禁止存放易挥发、易燃和有毒的物品。

4. 倒置显微镜

培养细胞经常需用显微镜观察,一方面要了解细胞生长的情况,以便及时做各种处理;另一方面,还需及时检查细胞是否发生污染,为此首先应置备一台进行日常检查的倒置光学显微镜。为开展研究,需购置质量较好、带有长焦距相差装置和摄影装置的倒置光学显微镜,附有荧光装置更好。其他类型显微镜的购置视需要而定。

5. 水纯化装置

组织培养对水的质量要求极高,配置各种溶液一般都要用经玻璃器皿蒸馏三次的蒸馏水,至少也得用二蒸水。不能用金属蒸馏器,因为易混入金属离子。

6. 洗刷装置

已包装好并已消毒的塑料产品多为一次性用品,只限使用一次,组织培养使用器皿量大,有的玻璃器皿、吸管需循环反复使用。

7. 抽滤装置

培养液用抽滤的方法进行除菌处理。抽滤装置有一次性定型产品和反复使用的滤过装置及玻璃砂滤器。

8. 细胞冷冻贮存器

冷冻贮存器是细胞培养所必要的设备,主要为液氮贮存器,型号有35和50两种。每两周补充液氮一次,液氮温度达 -196°C 。