

**国家级实验教学示范中心**  
**全国高等院校医学实验教学规划教材**

# **病原生物学与医学免疫学实验**

## **——综合创新篇**

总主编 郑葵阳  
主 编 汤仁仙



科学出版社

国家级实验教学示范中心  
全国高等院校医学实验教学规划教材

# 病原生物学与医学免疫学实验

## ——综合创新篇

总主编 郑葵阳

主 编 汤仁仙

副主编 刘晓梅 刘转转

编 委 (按姓氏笔画排序)

|     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|
| 王晓天 | 王维维 | 韦艳霞 | 尤红娟 | 孔德龙 |
| 史 震 | 付琳琳 | 刘亚萍 | 刘转转 | 刘晓梅 |
| 汤仁仙 | 李小翠 | 李向阳 | 何静姝 | 郑葵阳 |
| 秦苏萍 | 颜 超 | 潘智华 |     |     |

科 学 出 版 社。

北 京

## 内 容 简 介

本书是高等医学院校医学实验系列教材之一。内容包括四个部分：第一部分为综合性实验，通过临床标本如呼吸道、消化道、血液等标本检查，训练学生学会将病原生物学与免疫学基础性实验技术与操作应用于实践；第二部分为病原生物感染动物模型的制备，介绍艰难杆菌、华支睾吸虫等感染动物模型的制备方法，帮助学生理解临床相关疾病的发病机制；第三部分为基于临床案例的创新性综合实验设计，通过实验设计、实验操作、结果分析等方面培养学生科研创新能力；第四部分简单介绍一些临床及科研上应用广泛的新型实验技术及仪器。

本书适用于临床医学、预防医学、麻醉学、临床药学等医学相关专业使用。也可供从事临床检验、卫生防疫的实验技术人员使用。

### 图书在版编目 (CIP) 数据

病原生物学与医学免疫学实验：综合创新篇 / 汤仁仙主编. —北京：科学出版社，2018.1

国家级实验教学示范中心·全国高等院校医学实验教学规划教材  
ISBN 978-7-03-055781-0

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

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 298651 号

责任编辑：李 植 / 责任校对：郭瑞芝  
责任印制：赵 博 / 封面设计：陈 敬

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>

三河市书文印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2018 年 1 月第 一 版 开本：720×1000 1/16

2018 年 1 月第一次印刷 印张：5 1/2

字数：118 000

定价：25.00 元

(如有印装质量问题，我社负责调换)

# 全国高等院校医学实验教学规划教材 编审委员会

总 主 编 郑葵阳

副总主编 蔡红星 侯筱宇 孙 红 汤仁仙 刘 莹

委 员 (按姓氏笔画排序)

王阿明 乔伟丽 刘志安 刘 慧

李 冲 宋远见 张咏梅 徐 明

郭 栋 蔡绍京 魏建峰

# 丛 书 前 言

知识爆炸、信息化时代已经到来。现代医学教育演变改革，历经百年，已发展到以岗位胜任力为导向的医学教育新时代。今天，如何适应新时代知识传授的新特点、能力培养的新要求，以及当代大学生学习模式的悄然转变，已经成为当代医学教育的核心问题之一。徐州医科大学自 2004 年开展以 CBL 为载体的教育教学改革、2012 年开展以医学生岗位胜任力为导向的内涵式质量提升工程，以学生为中心的自主式学习正在全面、有序展开。

医学是实践性很强的生命科学，基础医学的学习是大学生步入医学的起始阶段，基础医学实验训练对医学生职业素质的养成和后续的专业学习，都有着很大影响。因此，加强基础医学教学实验中心建设，提高实验教学质量，培养大学生实践创新能力具有重要意义。以培养适应国家及区域医药卫生事业发展和经济建设需要的高素质、高水平卓越医学人才为根本任务，从“育人为本、德育为先、能力为重、全面发展”的教育理念出发，树立“以学生为主体、以能力培养为核心”的实验教学观，徐州医科大学基础医学国家级实验教学示范中心对基础医学实验课程进行了优化设计，组织编写了一套新颖的实验教材。本套教材以案例作为引导，构建“理论实践相互结合、基础临床相互渗透、教学科研相互促进”的实验教学体系；构建模块化、层次化、多元化满足学生自主学习的实验教学新模式。本套实验教材按照医学生物学实验课程群、正常人体形态学实验课程群、疾病基础实验课程群、医学机能学实验课程群和病原生物学与免疫学实验等五大课程群循序编排。在实验项目层次上，精简基础性实验和内容重复过多的实验，增加综合设计性实验和研究创新性实验比例，使学生通过实验课程学习，系统掌握从“分子”、“细胞”、“组织”、“器官”到“系统”；从形态到功能；从正常到异常；从疾病诊断到防治等一套完整的基础医学实验的知识与技能，为后续的学习和工作打下坚实的基础。

本套实验教材是徐州医科大学基础医学国家级实验教学示范中心全体老师辛勤劳动的结晶，是我校多年来教学改革成果体现。衷心感谢科学出版社对编写工作的热情鼓励和悉心指导。诚然，由于编者的学识、水平和能力的限制，难免存在诸多不足和遗憾，恳请广大专家、教师和学生提出宝贵意见与批评，为推动我国医学教育的发展共同努力。

郑葵阳

2017 年 12 月

# 前 言

本实验教材是一套创新性教材，分“基础篇”和“综合篇”两个分册，从理念到编排进行了一些新的尝试。按照本套教材的整体设计思想，体现“以学生为主体、以能力培养为核心”的实验教学理念，强化基础、注重实践、培养能力、鼓励创新、提高素质。

“基础篇”分册以培养学生岗位胜任力为基点，本实验教材以夯实必要的基础性实验技能为目标，并为综合性、创新性实验打牢基础，着力训练学生的基本技术、基本知识、基本能力。

本册将原来独立设置的医学微生物学、人体寄生虫学和医学免疫学实验进行了优化、整合，精选学科经典、重要的基本内容，删除淘汰的陈旧部分。

在编排上，实验开篇不是先交代实验目的而是首先提出“问题与思考”，提出的问题密切围绕本次实验需要但又不拘泥于实验本身，引导学生自主学习；对实验目的不再按传统的“掌握、认识、了解”设置，而是从“学习”角度提出目标；作业形式灵活多样，既有对实验结果的分析、讨论，也有对形态学内容传统的手绘记录和利用数码互动显微镜拍摄观察内容，体现现代教育技术的应用。

“综合篇”分册以培养学生发现问题、解决问题为基点，着力训练学生的综合素质与能力，培养学生整体观与整合意识。在遵循学科自身规律的基础上，由浅入深，由简单到综合，设置了综合性、设计性实验，体现学科内、学科间纵向连贯、横向渗透、交叉融合。本分册对设计性实验进行深化，提出动物模型制备方案，大胆引入案例式学习，按照“早临床、多临床、反复临床”和岗位胜任力要求，结合学生学业阶段学习能力，适当联系基础医学相关知识与实际临床案例，鼓励学生围绕案例设计实验，自主提出实验方案，促进医学基础学科与临床医学知识整合，基础课与专业课知识相互渗透交融，是为本实验教材的又一创新亮点。

“基础篇”与“综合篇”两个分册既相对独立、更相互衔接，是一个有机整体，方便教学中结合不同专业、拓展训练等实际情况使用。本实验教材适用于临床医学、预防医学、检验医学、全科医学、口腔医学、影像医学、麻醉学、护理学等专业使用。编写工作得到了郑葵阳教授从理念到撰写的悉心指导，得到了科学出版社的鼓励与帮助，在此一并表示感谢。全体编写人员均为一线教学教师，富有教学经验，富有改革热情，希望奉献一本具有时代特点的创新性教材，但由于水平、学识有限，难免有不妥之处，恳请专家、学生批评指正。

汤仁仙

2017年12月

# 目 录

|                                          |    |
|------------------------------------------|----|
| 第一章 综合性实验 .....                          | 1  |
| 第一节 病原生物的分布与检查 .....                     | 1  |
| 第二节 呼吸道感染标本的病原生物检查 .....                 | 5  |
| 第三节 消化道感染标本的病原生物检查 .....                 | 10 |
| 第四节 泌尿生殖道感染标本的病原生物检查 .....               | 17 |
| 第五节 血液或骨髓标本的病原生物检查 .....                 | 21 |
| 第六节 皮肤感染标本的病原生物检查 .....                  | 25 |
| 第七节 免疫分子功能的检测 .....                      | 30 |
| 第八节 免疫细胞功能的检测 .....                      | 33 |
| 第九节 抗体的制备 .....                          | 44 |
| 第二章 病原生物感染及免疫相关的动物模型制备 .....             | 49 |
| 第一节 艰难梭菌性肠炎模型 .....                      | 49 |
| 第二节 结核杆菌感染动物模型 .....                     | 51 |
| 第三节 豚鼠过敏性休克模型 .....                      | 52 |
| 第四节 类风湿关节炎大鼠模型 .....                     | 53 |
| 第五节 疟原虫感染动物模型 .....                      | 55 |
| 第六节 日本血吸虫感染动物模型 .....                    | 57 |
| 第七节 华支睾吸虫感染动物模型 .....                    | 58 |
| 第八节 旋毛虫感染模型 .....                        | 61 |
| 第三章 创新性实验 .....                          | 63 |
| 第四章 实验室生物安全与新的实验技术进展 .....               | 67 |
| 第一节 实验室生物安全 (laboratory biosafety) ..... | 67 |
| 第二节 新的实验技术进展 .....                       | 69 |

# 第一章 综合性实验

## 第一节 病原生物的分布与检查

在土壤、水、空气、动植物和人体体表及与外界相通的腔道中，存在着许多种类不同的病原生物。了解病原生物的分布以及其与人类的关系，对建立无菌观念、严格无菌操作、预防感染和相关病原生物检查具有重要意义。

### 实验一 微生物的分布与检查

#### 【问题·思考】

1. 在微生物学实验中，你认为该如何避免杂菌的污染？
2. 空气、水、地面以及人体体表通常采取何种方法进行消毒灭菌？
3. 你认为可引起外科手术切口术后感染的细菌主要有哪些？

#### 一、空气中微生物的分布与检查

##### 【目的】

1. 学会空气中微生物的检测方法。
2. 了解空气中的微生物及其对人类的危害。

【材料】 普通琼脂平板、酒精灯、37℃培养箱等。

【方法】 采用自然沉降法检测。取普通琼脂平板 1 个，在室内任选一处，距离地面垂直高度 80~150cm 处，打开平板盖，暴露于空气中 5~10min，然后盖好盖，置 37℃培养箱培养 18~24h 后，观察结果。

【结果】 观察菌落特点，并记录菌落数。

【注意事项】 采样前，关好门窗，在无人走动情况下，采集样本。

#### 二、水中微生物的分布与检查

##### 【目的】

1. 学会水中微生物的检测方法。
2. 了解水中的细菌及其对人类的危害。

【材料】 高层琼脂培养基、75mm 无菌空培养皿、无菌试管、无菌吸管、池塘水、自来水、酒精灯、试管架、特种铅笔、消毒缸、37℃培养箱等。

##### 【方法】

1. 用无菌吸管分别吸取池塘水和自来水各 1ml 放入 2 只无菌空培养皿中。
2. 取 2 支融化且已冷却至 45℃左右的高层琼脂培养基 9ml，分别倾入步骤 1 中的 2 只培养皿内，转动平板混匀，待琼脂凝固后，贴标签，将平板倒置于



37℃培养箱培养 18~24h 后, 观察结果。

**【结果】** 观察并记录菌落数。

**【注意事项】**

1. 观察菌落时, 可用肉眼观察, 必要时用放大镜检查, 以防遗漏。
2. 如 1ml 水中菌落数太多无法计数, 需将样本按一定比例稀释后再重新培养计数。
3. 采集自来水样本时, 先将自来水龙头用酒精灯火焰灼烧无菌后, 再开水龙头使水流 5min, 以无菌三角烧瓶取水样备用; 采集池塘水样本时, 应取水面下 10~15cm 的深层水样备用。

### 三、土壤中微生物的分布与检查

**【目的】**

1. 学会土壤中微生物的检测方法。
2. 了解土壤中细菌及对人类的危害。

**【材料】** 普通琼脂平板、无菌生理盐水、泥土、无菌吸管、无菌棉签、37℃培养箱等。

**【方法】**

1. 取地面下 10cm 处的泥土 1g, 与 10ml 无菌生理盐水按 1:10 混匀, 静置数分钟后, 备用。
2. 用无菌吸管吸取上清液 0.1ml, 放入于普通琼脂平板表面, 再用无菌棉签涂布均匀, 置 37℃培养箱培养 24h 后, 观察结果。

**【结果】** 观察菌落生长情况, 并记录菌落数。

**【注意事项】**

1. 由于日光中紫外线及含水量等原因, 地表面泥土含菌量不能代表土壤中微生物, 因此, 样品采集应该取 5~20 cm 土壤剖面, 且多点采集, 混匀后取样本, 装无菌塑料袋带回, 4℃冰箱保存, 备用。
2. 土壤中微生物种类多 (如细菌、放线菌、霉菌等), 要配制多种适宜培养基进行培养鉴定。

### 四、皮肤、黏膜及其他物品表面微生物的分布与检查

**【目的】**

1. 学会正常人体及物品上微生物的检测方法。
2. 了解正常人体及物品上微生物的分布。

**【材料】** 普通琼脂平板、无菌生理盐水、棉签、相应物品、特种铅笔、酒精灯、37℃培养箱等。

**【方法】**

1. 取一只普通琼脂平板, 用特种铅笔在平板底外部分别标注皮肤、黏膜及

相应物品名, 然后反转平板。

2. 用手指指腹在“皮肤”标志处的琼脂上轻轻擦拭。
3. 用蘸取了无菌生理盐水的湿棉签擦拭咽部或鼻腔处的黏膜, 然后轻轻抹在“黏膜”标志处的琼脂上。
4. 分别将相应物品如钱币、卡等平整面在不同琼脂培养基的区域轻轻擦拭。
5. 盖好皿盖、贴标签、送 37℃ 培养箱培养 18~24h 后, 观察结果。

【结果】 观察琼脂平板上细菌生长现象, 并记录正常人体皮肤、黏膜及物品表面的菌落数。

### 【注意事项】

1. 无菌操作, 采样要用湿润的无菌棉签, 不能使用干的无菌棉签。
2. 所采样本应及时检测, 室温下存放不得超过 2h, 4℃ 冰箱存放不得超过 4h。
3. 根据需要, 可选用血平板或同时使用两种培养平板进行实验。

### 【实验报告】

1. 记录空气中微生物的分布与检查的结果并分析讨论。
2. 记录水中微生物的分布与检查的结果并分析讨论。
3. 记录土壤中微生物的分布与检查的结果并分析讨论。
4. 记录皮肤、黏膜及其他物品表面微生物的分布与并分析讨论。

## 实验二 寄生虫的分布与检查

### 【问题·思考】

1. 完成生活史离不开水源的寄生虫有哪些? 影响其分布的因素是什么?
2. 我国土源性寄生虫有哪些? 它们在外界的发育类型有何不同?
3. 我国血吸虫的分布特点及原因是什么? 如果你作为国家卫生部指派的血吸虫病流行区调查员, 会如何开展某地区的血吸虫病检查工作?

### 一、土壤中寄生虫的分布与检查

土源性蠕虫如蛔虫和钩虫等, 其虫卵随人类便排出体外, 在土壤中发育成感染性虫卵或幼虫。以检查土壤中蛔虫卵为例介绍土壤中寄生虫的检测方法。

【目的】 学习土壤中寄生虫的检查方法。

【材料】 铜筛 (2mm 和 3mm)、5%NaOH、饱和硝酸钠溶液、离心管 (50ml)、离心机、显微镜、载玻片和盖玻片等。

【方法】 采用饱和改良硝酸钠漂浮法分离、镜检。

1. 从作物田取表层至表层以下 5cm 处的土壤, 庭院、厕所和厨房等取表层土, 晾干、研细。
2. 用 3mm 和 2mm 的铜筛依次过滤, 收集细土作为样本。

3. 每 10g 样本放入 1 支 50ml 离心管, 加 5% NaOH 至 40ml, 盖紧管口用力振摇, 充分混匀后, 2000rpm 离心 4min。

4. 弃去上清液, 加入饱和硝酸钠溶液至管口, 覆上盖玻片, 静置 15min 后取下盖玻片置于载玻片上镜检。

【结果】 蛔虫虫卵有受精卵和未受精卵两种, 具体形态结构详见基础篇第二章第四节。

### 【注意事项】

1. 由于虫卵在土壤中的分布不均, 土样的选择与虫卵的筛选要尽量做到多地点多批次, 防止漏查。

2. 操作者需佩戴手套和胶鞋, 注意自我保护。

## 二、水中寄生虫的分布与检查

寄生虫污染水源, 人通过接触疫水或生饮水而感染。水中可能存在的寄生虫有隐孢子虫、贾第虫和日本血吸虫等。

【目的】 学习水中寄生虫的检查方法。

【材料】 滤膜、离心机、载玻片、烧杯、恒温箱(带光源)、显微镜等。

### 【方法】

1. 离心沉淀法 用清洁的容器采集 10~20L 水样, 小样本采用离心沉淀法收集样本, 大样本经过滤法收集样本。处理后的样本直接镜检或经涂片、固定、染色后再进行形态鉴定。

2. 压碎法或逸蚴法 日本血吸虫流行区水源的检测采用查螺的方法进行调查。

江湖洲滩环境框线距 20~50m, 其他环境框线距 5~10m, 检获框内全部钉螺, 进一步进行实验室检测。

(1) 压碎法: 将钉螺置于载玻片, 另取一张较厚的玻片轻轻压碎, 在螺体上滴一滴去氯水, 置于解剖镜下观察。

(2) 逸蚴法: 将钉螺放入水中, 置于 20~25℃光照条件下, 观察是否有尾蚴逸出(具体方法见日本血吸虫模型制备章节)。

【结果】 可能查到隐孢子虫卵囊、贾第虫或溶组织内阿米巴包囊、蠕虫卵和日本血吸虫尾蚴等。

### 【注意事项】

1. 多点、多批次、多时间采集水源, 同时保证水样安全迅速地送往实验室。

2. 实验中所用器皿及桌面等在实验后必须严格进行消毒处理。

3. 疫水中可能含有具有感染性的寄生虫, 操作者应佩戴一次性手套和口罩, 以防感染。

### 三、皮肤及其他物品表面寄生虫的分布与检查

人体皮肤常有螨虫寄生，但无临床症状。另外，有一些寄生虫虫卵（如蛔虫和蛲虫等）可黏附于儿童手部和课桌、玩具等物品，造成寄生虫在人群的流行。

【目的】 学习人体及物品表面寄生虫的检查方法。

【材料】 透明胶纸、载玻片和显微镜等。

【方法】 采用透明胶纸法粘拭皮肤或物品后，进行镜检。

【结果】 可能查到的寄生虫有蛔虫卵、钩虫卵、蛲虫卵以及蠕形螨等。

【注意事项】 采集的样本应及时检测。

【实验报告】 记录土壤中寄生虫检查的结果并分析讨论。

（何静妹 孔德龙）

## 第二节 呼吸道感染标本的病原生物检查

呼吸道感染包括上呼吸道感染和下呼吸道感染，可由多种病原体感染引起。引起鼻、咽、喉等上呼吸道感染的病原体多为细菌和病毒；引起气管、支气管及肺泡等下呼吸道感染的病原体包括细菌、病毒、肺炎支原体、肺炎衣原体、立克次体、真菌和寄生虫等。正确采集标本并进行培养鉴定对疾病的诊断具有重要意义。

### 【问题·思考】

1. 呼吸道标本如何正确取材进行病原生物学检查？
2. 若怀疑结核分枝杆菌感染，如何取材并最终鉴定？
3. 疑似呼吸道感染由病毒引起时，可以采用何种方法鉴定？

### 【目的】

1. 明确呼吸道标本的病原体检查一般程序和方法。
2. 学习呼吸道标本的采集方法。

### 【材料】

1. 标本 鼻咽拭子、咽拭子、痰液标本、患者早期的含漱液。
2. 培养基 血平板、巧克力平板、亚碲酸钾血平板、罗氏培养基、鲍-金培养基、卵黄双抗平板、沙保弱氏培养基、细胞培养基等。
3. 试剂 革兰染色液、抗酸染色液、1%胰酶溶液、氧化酶试剂、抗“O”试剂盒、10%去氧胆酸钠溶液、1%羊细胞悬液溶血素、PCR 试剂盒、2%和 10%NaOH 溶液、无菌生理盐水、青霉素（20000U/ml）、链霉素（20000U/ml）等。
4. 鸡胚与细胞 9~11d 龄的鸡胚、0.5%的鸡红细胞。
5. 其他 载玻片、盖玻片、烧杯、玻璃棒、无菌离心管、普通培养箱、CO<sub>2</sub> 培养箱、显微镜等。

呼吸道感染标本病原体检查的一般程序见图 1-2-1。

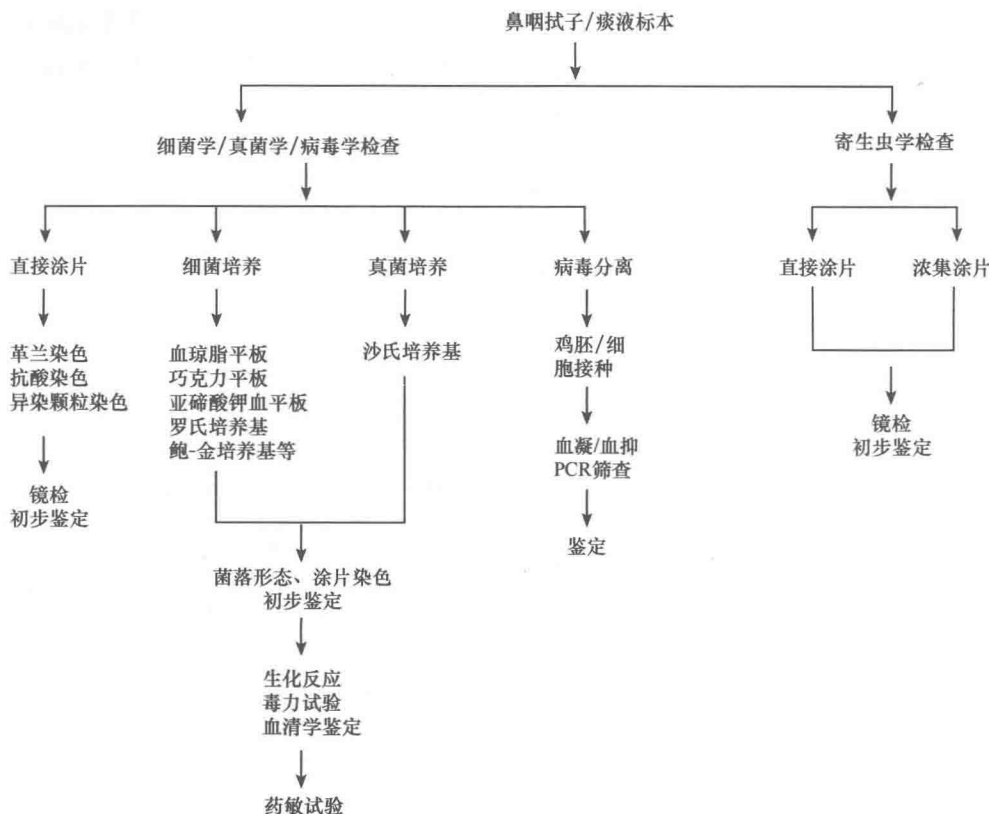


图 1-2-1 呼吸道感染标本病原体检查的一般程序

## 【方法】

### 1. 标本采集与处理

(1) 鼻咽拭子：采集时，患者先用清水漱口，用压舌板轻压舌根，取鼻咽拭子在鼻咽腔、悬雍垂后侧反复涂抹数次小心取出。

(2) 咽拭子：将拭子用无菌生理盐水湿润，用压舌板轻压舌根，先用拭子轻擦扁桃体表面后弃去，再取一支湿润的拭子轻压扁桃体，擦取挤压出的分泌物或伪膜等病变部位。

(3) 痰液标本：受检者先用清水漱口数次后，用力咳嗽，自气管深部将痰液排出至无菌容器中。对痰量少或无痰者，可雾化吸入 10%氯化钠水溶液，使痰液容易排出。对于真菌和分枝杆菌检查应收集 3 次清晨痰标本。

### 2. 形态学检查

(1) 直接涂片检查：用无菌接种环将标本制成涂片，自然干燥后固定，革兰染色或抗酸染色，观察细菌的形态结构。疑似白喉棒状杆菌，则需进行阿尔伯特异染颗粒染色。或直接挑取少许带脓血的痰液，涂成痰膜，显微镜下直接观察

虫体的形态结构。

## (2) 离心沉淀检查

1) 如疑似结核杆菌感染,在痰液标本中加入等量 2%NaOH 进行消化,高压灭菌 103.4kPa、20min,而后 3000rpm/min 离心 30min,取沉淀涂片,进行抗酸染色。

2) 如疑似寄生虫感染,在痰液标本中加入等量的 10%NaOH 溶液,置于 37℃恒温箱消化成稀液状。以 1500rpm/min 离心 5min,取沉渣涂片镜检。此法常用于肺吸虫卵、尘螨和移行至肺部的蠕虫幼虫等寄生虫的检查。

## 3. 分离培养

(1) 细菌的分离培养:采集的标本常规接种血平板、巧克力平板,37℃、CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 24~48h,观察菌落的生长情况;痰液标本常用 1%胰酶消化,放置 35℃、90min 使痰液液化,挑取痰液接种于上述相应平板。对疑是特定的致病菌,可采用以下特殊的细菌培养方法:

1) 疑似金黄色葡萄球菌、溶血性链球菌和肺炎链球菌:将标本接种在血平板,37℃孵育 18~24h。

2) 疑似脑膜炎奈瑟菌:将标本常接种于已保温在 37℃的巧克力平板或卵黄平板,37℃、5%~10%CO<sub>2</sub> 环境培养 24~48h。

3) 疑似白喉棒状杆菌:将标本接种于亚碲酸钾血平板和血清斜面或鸡蛋培养基,37℃孵育 8~10h。

4) 疑似结核分枝杆菌:将处理后的痰液悬液,用无菌吸管加 2~3 滴于罗氏培养基中,35℃孵育至 8w,每周观察一次。如有菌落生长,进行涂片,抗酸染色。

5) 疑似百日咳鲍特菌:将标本接种在鲍-金培养基上,37℃孵育 3~5d 后,如有菌落生长,涂片染色观察。

6) 疑似流感嗜血杆菌:将标本接种于血平板和巧克力平板,并在平板中央直线接种金黄色葡萄球菌(或在四角点种),37℃、5%~10%CO<sub>2</sub> 环境孵育 18~24h。

7) 疑似嗜肺军团菌:气管分泌物接种于活性炭酵母琼脂(BCYE)或费-高(F-G)平板,35℃、2.5%CO<sub>2</sub> 培养,每天用肉眼和显微镜观察,直至第 14d。其菌落在 360nm 紫外光下可见黄色荧光。

(2) 真菌的分离培养:疑似真菌,标本可接种于沙保弱氏培养基,35℃、培养 2~7d,进行鉴定。

## (3) 病毒的分离培养

1) 疑似流感病毒感染,可将抗生素处理后的标本,进行鸡胚接种,培养 72h 后,收获尿囊液,进行血凝试验和血凝抑制试验,具体参照基础篇病毒学章节。

2) 疑似呼吸道合胞病毒感染,腺病毒(ADV)、博卡病毒(HBoV)及副流

感病毒等，进行细胞培养，采用巢氏聚合酶链反应（nested - PCR）进行筛查。

**4. 生化反应及血清学鉴定** 分离培养后，挑取可疑的菌落，进一步进行生化反应、血清学反应、进行细菌的鉴别。如疑似 A 族链球菌感染可进行抗“O”（antistreptolysin, ASO）试验，风湿热患者血清中 ASO 抗体效价在 1:400 及以上有辅助诊断价值。

## 5. 毒力实验

### （1）血浆凝固酶试验

原理：金黄色葡萄球菌能产生结合型和游离型血浆凝固酶（凝聚因子），前者可使血浆中可溶性的纤维蛋白原变为不溶性的纤维蛋白，附着于细菌表面，在玻片上形成凝块，后者可使试管中血浆发生凝固。

材料：金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、1:2 稀释抗凝的人或兔血浆生理盐水、载玻片、接种环。

方法：取 1 滴蒸馏水于洁净的玻片上，用接种环挑取金黄色葡萄球菌或表皮葡萄球菌置于蒸馏水中，制成浓的菌悬液，无自凝现象。然后加 1 环抗凝的家兔或人血浆混合，10s 内观察结果。

结果：出现明显细菌凝块为血浆凝固酶试验阳性，反之，细菌在血浆中呈均匀混浊则为阴性。

注意事项：应在 10s 内观察结果，如超过 10s 可出现假阳性。必须制备浓厚的菌悬液；最好用 EDTA 抗凝的兔血浆，加血浆后不要再混摇，以免细菌凝块分散变小。生长在高盐培养基上的菌落可能出现自凝或假阳性。

### （2）胆汁溶菌试验

原理：胆汁或胆盐可溶解肺炎链球菌，可能是由于胆汁降低细胞膜表面的张力，使细胞膜破损或使菌体裂解；或者是由于胆汁加速了肺炎链球菌本身自溶过程，促使细菌发生自溶。

材料：10%去氧胆酸钠溶液、生理盐水、甲型链球菌菌种管、肺炎链球菌菌种管、刻度吸管等。

方法：甲型链球菌菌种和肺炎链球菌管各 2 支，各 0.9ml 菌液，分别加入 10%去氧胆酸钠溶液和生理盐水（对照管）0.1ml，摇匀后置 35℃水浴 10~30min，观察结果。

结果：以“加胆盐的菌种管变透明，而对照管仍混浊”判为阳性。不出现阳性反应则为阴性反应。肺炎链球菌胆汁溶菌试验为阳性，甲型链球菌胆汁溶菌试验则为阴性。

（3）豚鼠感染结核分枝杆菌试验：豚鼠腹股沟皮下注射结核分枝杆菌菌液观察腹股沟淋巴结肿大情况，肝、脾、肺、肾等脏器的病理改变（详见第二章第二节结核杆菌感染动物模型）。

**6. 核酸检测** 不同的病原体具有不同的基因组结构，可通过 PCR 技术检测

标本中的细菌、病毒等特异性的核酸片段。

**7. 病原体鉴定及药敏试验** 细菌鉴定的同时进行药物敏感试验, 选择该菌敏感的抗生素, 以指导临床用药。

**【结果】** 根据病原体的形态结构、培养特点、生化反应、血清学反应以及毒力实验等可以确定所属菌属或种。

**1. 金黄色葡萄球菌** 血平板上中等大小的圆形金黄色菌落, 有 $\beta$ -溶血环; 涂片染色镜检为革兰阳性、葡萄串状排列的球菌; 血浆凝固酶试验阳性。

**2. 溶血性链球菌** 血平板上灰白色、边缘整齐的细小菌落, 有 $\beta$ -溶血环。涂片染色镜检为革兰阳性、链状排列的球菌; 不被胆汁溶解; ASO 抗体效价在 1 : 400 及以上。

**3. 肺炎链球菌** 涂片染色镜检为革兰阳性双球菌、矛头状, 有明显荚膜, 胆汁溶菌试验阳性。

**4. 脑膜炎奈瑟菌** 巧克力平板上似露滴状菌落, 涂片染色镜检为革兰阴性双球菌, 肾形或豆形。

**5. 白喉棒状杆菌** 灰白色或淡黄色的菌落或菌苔生长, 经阿尔伯特染色镜检, 菌体呈蓝绿色, 异染颗粒蓝黑色, 位于菌体一端或两端, 同时进行毒力实验。

**6. 结核分枝杆菌** 培养 4w 后, 若可见菜花样的菌落, 经抗酸染色后, 观察到红色、细长、单个或分枝状排列的菌体; 动物实验可见豚鼠腹股沟淋巴结肿大, 肝、脾、肺、肾等脏器灰白色结节。

**7. 真菌** 白假丝酵母菌感染, 镜下可见成群革兰染色阳性的卵圆形孢子和假菌丝。在血平板或沙保氏培养基上, 培养 2~3d 后, 可见灰白乳酪样菌落。

**8. 病毒** 流感病毒感染, 血凝试验和血凝抑制试验阳性; 不同病毒感染细胞后观察细胞病变; PCR 方法筛查标本, PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳鉴定, 测序验证。

**9. 肺吸虫卵** 在高倍镜下呈金黄色, 长椭圆形, 卵壳厚薄不均, 卵盖倾斜或脱落, 卵内有 1 个卵细胞和多个卵黄细胞。

**10. 溶组织内阿米巴滋养体** 在高倍镜下可见虫体运动活泼、形态多变, 外质伸出伪足伸出, 内质颗粒状, 内有细胞核、食物泡和吞噬的红细胞等。

### 【注意事项】

**1.** 上呼吸道寄居大量的正常菌群, 咽拭子采集时, 应用清水反复漱口, 减少上呼吸道正常菌群的污染; 痰液标本勿混入唾液和鼻咽分泌物; 标本采集应于抗生素应用之前, 以晨起后采集为佳。

**2.** 疑似普通细菌性肺炎, 痰标本送检每天 1 次, 连续 2~3d; 疑似分枝杆菌感染者, 应连续收集 3d 清晨痰液送检。

**3.** 标本一般需冷藏保存、快速送检, 常规培养应在 2h 内送到实验室立即



接种。

4. 鼻咽拭子检查脑膜炎奈瑟菌通常用于带菌者的检查，采集的标本要保温35℃，防止干燥。最好床边接种，必要时使用卵黄双抗运送液。

5. 检查溶组织内阿米巴滋养体时，最好取新鲜痰液快速涂片，并注意载玻片的保温。浓集法取患者深咳出的痰液消化时，时间不宜过长，避免损伤虫体。

附：口腔、鼻咽腔的正常菌群和呼吸道标本中常见病原体，见表 1-2-1。

表 1-2-1 口腔、鼻咽腔的正常菌群和呼吸道标本中常见病原体

|        | 正常菌群                                        | 常见病原体                                           |
|--------|---------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| 革兰阳性细菌 | 表皮葡萄球菌、链球菌、四联球菌、念珠菌、白喉外的棒状杆菌、放线菌、乳酸杆菌、双歧杆菌等 | 肺炎链球菌、化脓性链球菌、金黄色葡萄球菌、白喉棒状杆菌、厌氧菌等                |
| 革兰阴性细菌 | 脑膜炎和淋病奈瑟菌外的奈瑟菌、流感嗜血杆菌外的嗜血杆菌等                | 脑膜炎奈瑟菌、流感嗜血杆菌、嗜肺军团菌、肺炎克雷伯菌、百日咳鲍特菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌等 |
| 其他     |                                             | 结核分枝杆菌、白色念珠菌、放线菌、肺吸虫、溶组织内阿米巴、蛔虫、钩虫、棘球蚴等         |

【实验报告】 以链球菌引起的呼吸道感染为例，设计检测实验流程，写出具体的操作步骤，并对实验结果进行分析与讨论。

(刘晓梅 刘转转)

### 第三节 消化道感染标本的病原生物检查

消化道感染的病原体包括志贺菌属、沙门菌属、侵袭性大肠杆菌、空肠弯曲菌、耶尔森肠炎杆菌、霍乱弧菌、副溶血性弧菌、原虫、蠕虫等。粪便检查或肛周检查是诊断消化道感染细菌或寄生虫最常用的方法。

#### 【问题·思考】

1. 粪便标本的采集应注意什么？肠热症患者标本应如何采集？为什么？
2. 引起腹泻的常见病原体有哪些？阿米巴痢疾和细菌性痢疾有哪些区别点？
3. 疑似霍乱患者标本应如何处理？

#### 【目的】

1. 知悉粪便标本病原体的一般检查程序和方法。
2. 学习肥达试验原理及其结果判断。