

高等学校配套教材

供基础、临床、预防、口腔医学等专业用

# 病原生物学实验

(第2版)

主 审 谷鸿喜

主 编 钟照华 张凤民 凌 虹

副主编 商庆龙 庄 敏 张唯哲



人民卫生出版社

高等学校配套教材  
供基础、临床、预防、口腔医学等专业用

# 病原生物学实验

第2版

主 审 谷鸿喜

主 编 钟照华 张凤民 凌 虹

副主编 商庆龙 庄 敏 张唯哲

编 者 (按姓氏汉语拼音排序)

|     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 陈 阳 | 陈思佳 | 董云霞 | 房 勇 | 付英梅 | 韩 甦 |
| 姬 红 | 贾丽娜 | 考文萍 | 李 迪 | 李 妍 | 凌 虹 |
| 李爱梅 | 林乐勋 | 刘爱芹 | 刘海亮 | 钱 钧 | 商庆龙 |
| 宋武琦 | 滕 旭 | 佟 雷 | 王 慧 | 王 燕 | 吴 静 |
| 王甲业 | 王天楹 | 魏兰兰 | 徐维祯 | 姚 岚 | 杨凤坤 |
| 庄 敏 | 张凤民 | 张庆猛 | 张唯哲 | 张文莉 | 张晓丽 |
| 赵吉子 | 钟晓岩 | 钟照华 |     |     |     |

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

病原生物学实验/钟照华,张凤民,凌虹主编.—2版.—北京:  
人民卫生出版社,2018

ISBN 978-7-117-26458-7

I. ①病… II. ①钟… ②张… ③凌… 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(2018)第 083665 号

|      |               |                                |
|------|---------------|--------------------------------|
| 人卫智网 | www.ipmph.com | 医学教育、学术、考试、健康,<br>购书智慧智能综合服务平台 |
| 人卫官网 | www.pmph.com  | 人卫官方资讯发布平台                     |

版权所有,侵权必究!

病原生物学实验

第 2 版

主 编:钟照华 张凤民 凌 虹

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:010-59787592 010-59787584 010-65264830

印 刷:三河市潮河印业有限公司

经 销:新华书店

开 本:787×1092 1/16 印张:11 插页:6

字 数:268 千字

版 次:2005 年 11 月第 1 版 2018 年 5 月第 2 版

2018 年 5 月第 2 版第 1 次印刷(总第 8 次印刷)

标准书号:ISBN 978-7-117-26458-7/R · 26459

定 价:49.00 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市场营销中心联系退换)

# 前言



实验教学是高等医学教育的重要环节,它有益于加深对理论知识的理解,培养学生的动手能力,提高学生的基本科学素质。近年来,感染性疾病研究的医学微生物学实验方法及诊断技术进展很快,将其创新理念及解决问题的思路引入医学教育中是势在必行。根据国务院办公厅《关于深化医教协同进一步推进医学教育改革与发展的意见》(国办发〔2017〕63号)中要求规范和强化实践教学环节,教育教学内容与临床技术技能同步更新,以及第一版教材使用过程中的师生反馈,结合医学教育理念的进展和医学专业的发展,我们编写了第二版教材。我校病原生物学实验教学中心自2000年成立,在2007年成为教育部国家级实验教学示范中心,多年来,中心承担的实验教学体系逐步完善,逐步将教学改革和科研成果融入到实验教学中。实验教学中要求学生除了掌握基础理论知识,强调培养基本操作能力和动手实践能力,还注重培养学生科学素质、探索能力和创新能力。

教材编写原则是“以学生为中心”和“以符合人才成长规律为实验课程设计原则”。强调实用性、综合性和创新性,大幅增加创新性实验项目的比例,增加综合性实验和一些前沿的实验项目。全书分为三篇和附图,第一篇为病原学实验相关技术。在这一篇里我们提出了病原实验室的安全运行规则和急救处理原则,补充了最新的临床应用的先进仪器,还提供了大量病原学实验技术,提出了实验设计原则。这一篇作为全书的规则、仪器和基本技术支持。第二篇是综合性实验,包括涉及临床实践的系统性实验设计,增加了学生开展实验时的系统性思维 and 实践能力。第三篇是设计性实验,是以临床案例为引导的研讨、问题解决模式。学生可以自己查证资料,研讨问题,自行以小组形式设计方案,自主选择实验技术和实验仪器,开展研究,总结研究数据,撰写研究报告。附录中提供了形态学观察的图像参考。本实验教材力求简明实用,使其适合各专业层次的教学实践的需要,同时也能为医学本科生提供一些对科学问题基本的探索和研究方法。

参加编写的人员均来自教学一线,在本教材编写过程中,也得到了学校、学院领导和相关教研室的关怀和帮助,教材编写过程中参考了国内相关学校的项目设计思路,在此衷心表示感谢。由于医学教育发展迅速,我们的水平和编写能力有限,书中会有不足之处,希望使用本教材的同道不吝赐教,衷心希望得到师生和读者的批评指正。

钟照华

2018年1月7日

# 目 录



|                              |     |
|------------------------------|-----|
| 第一篇 病原学实验相关技术 .....          | 1   |
| 第一章 实验室规则与生物安全 .....         | 1   |
| 第二章 常用仪器设备及使用 .....          | 4   |
| 第三章 消毒、灭菌技术、无菌操作 .....       | 10  |
| 第四章 细菌染色法 .....              | 13  |
| 第五章 细菌的形态学观察 .....           | 20  |
| 第六章 细菌的培养法 .....             | 23  |
| 第七章 细菌质粒 DNA 的提取 .....       | 26  |
| 第八章 细菌的药物敏感性试验 .....         | 27  |
| 第九章 细菌培养基制备 .....            | 31  |
| 第十章 细菌的生化反应试验 .....          | 34  |
| 第十一章 细菌的致病性试验 .....          | 36  |
| 第十二章 血清学诊断和血清学鉴定 .....       | 38  |
| 第十三章 病毒的培养法 .....            | 40  |
| 第十四章 病毒的定量法 .....            | 46  |
| 第十五章 病毒的血清学诊断 .....          | 50  |
| 第十六章 病毒感染的快速诊断 .....         | 53  |
| 第十七章 真菌学实验 .....             | 62  |
| 第十八章 皮肤菌群的分布检测 .....         | 68  |
| 第十九章 理化因素对细菌生长繁殖的影响 .....    | 69  |
| 第二十章 人体寄生虫形态观察 .....         | 70  |
| 第二十一章 寄生虫学病原学检测技术 .....      | 82  |
| 第二十二章 寄生虫学常用及特殊免疫学检测技术 ..... | 89  |
| 第二十三章 病原学标本的采集和处理方式 .....    | 93  |
| 第二十四章 病原体感染的实验设计 .....       | 102 |
| 第二十五章 虚拟仿真实验 .....           | 105 |
| 第二篇 综合性实验 .....              | 107 |
| 第二十六章 临床标本中化脓性球菌的分离鉴定 .....  | 107 |
| 第二十七章 致病性肠道杆菌感染的实验室诊断 .....  | 111 |
| 第二十八章 流感病毒的微生物学诊断 .....      | 116 |

|                          |     |
|--------------------------|-----|
| 第二十九章 人乳头瘤病毒的快速诊断 .....  | 121 |
| 第三十章 结核分枝杆菌的微生物学诊断 ..... | 124 |
| 第三十一章 小儿腹泻的病原体检测 .....   | 128 |
| 第三十二章 支原体感染的快速诊断 .....   | 132 |
| 第三十三章 病原性真菌的检查法 .....    | 137 |
| 第三十四章 旋毛虫感染动物的鉴定 .....   | 139 |
| 第三十五章 华支睾吸虫抗体的检测 .....   | 141 |
| 第三十六章 日本血吸虫感染动物的鉴定 ..... | 143 |
| 第三十七章 疟原虫感染的检查 .....     | 145 |
| 第三十八章 弓形虫感染的免疫学检查 .....  | 147 |
| 第三十九章 人体蠕形螨的检查 .....     | 149 |
| <br>第三篇 设计性实验 .....      | 151 |
| 案例一 一例黄疸患者的检查与分析 .....   | 151 |
| 案例二 他为什么发热? .....        | 155 |
| 案例三 怎么保证手的卫生? .....      | 159 |
| 案例四 如何确定腹泻的发生原因? .....   | 160 |
| 案例五 医疗器械的卫生 .....        | 161 |
| 案例六 胃怎么了? .....          | 162 |
| 案例七 为什么感染并发了肿瘤? .....    | 163 |
| 案例八 生吃蔬菜还能得病? .....      | 164 |
| 案例九 要美味,更要健康! .....      | 166 |
| 案例十 小孩为啥总用手挠屁股? .....    | 168 |
| 案例十一 我的脸上为什么总长痘痘? .....  | 169 |
| <br>附图 .....             | 171 |
| 附图 1 细菌的基本形态与特殊结构 .....  | 171 |
| 附图 2 有鉴别意义的细菌形态与结构 ..... | 172 |
| 附图 3 其他种类病原微生物的形态 .....  | 174 |
| 附图 4 常见病毒的形态 .....       | 176 |
| 附图 5 人体常见蠕虫卵的形态 .....    | 178 |
| 附图 6 人体常见原虫的形态 .....     | 180 |

# ——第一篇 病原学实验相关技术——

## 第一章

### 实验室规则与生物安全

#### 一、实验室规则

病原生物学实验操作涉及的病原微生物和病原寄生虫具有感染性,需要预防操作人员的感染,以及实验室感染源泄漏对环境和公众健康产生威胁。参与实验的学生需要完成实验室安全培训和生物安全培训,并严格遵守以下规则:

1. 进实验室必须穿长袖实验服,必要时戴帽子和口罩,离开时脱下实验服反折保存。实验指导等必要用品应放在实验台下的抽屉里,饮水和食物等一律不得带入实验室。留长发的同学要将头发扎好,不得披散。

2. 上课时按规定位置就座,保持实验室安静,不得随意进出。

3. 各类仪器设备、电器和全部操作应严格按操作规程进行。爱护显微镜、标本及其他器材,使用显微镜的油镜头后必须擦净镜油。如有物品损坏,应立即向指导教师报告,主动登记。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。

4. 实验需进行培养的材料,应做好标记(包括接种学生姓名、菌种名称、接种时间等),放于指定的地点进行培养。实验室中的菌种、动物和物品等,未经许可,不得带出实验室。

5. 实验结束后,所用物品按规定放回原处,沾染过传染性材料的吸管、滴管、载玻片、盖玻片等在使用后放入规定的消毒桶内。需要培养的实验材料集中放置在温箱中培养。

6. 对易燃、易爆、剧毒等危险品严格管理。酒精灯不可互相点燃,以防发生意外。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. 实验结束应整理实验台,清扫桌面、地面和桌椅,将带菌的工具浸泡入消毒缸中,其他实验废弃物、垃圾整理到位;确保实验室所有仪器、门、窗、水、电、火相关设施安全关闭,最后用消毒液泡手,再用肥皂、清水洗手。

#### 【附加说明】

实验人员必须遵守国家统一颁发的《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》。



二、实验室紧急情况的应急处理

在实验过程中,要严防事故的发生,如发生意外伤害事故,应及时报告,并采取紧急处理措施。

- 1. 如果出现皮肤破损,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. 如果出现烧伤,局部涂凡士林、5%鞣酸或 2%苦味酸,或直接涂烫伤膏。
- 3. 如果出现化学药品腐蚀伤时,若为强酸腐蚀伤,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,再滴入无菌橄榄油或液状石蜡 1~2 滴。
- 4. 如果出现菌液误入口中,应立即吐入消毒容器内,并用 1 : 1000 的高锰酸钾溶液或 3%过氧化氢溶液漱口;并根据菌种不同,服用抗菌药物预防感染。
- 5. 如果出现菌液污染桌面,将适量 2%~3%甲酚或 0.1%苯扎溴铵倒于污染面,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 分钟,再用肥皂和水清洗。
- 6. 如果出现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。如乙醇、乙醚等有机溶液起火,切忌用水扑救,可用沙土等扑灭火苗。

三、生物安全的概念与病原体分级

生物安全(biosafety)是指研究评价生物危害因素对人体健康的危害以及对风险相应控制的理论与技术。

实验室的生物危害因素包括:①病原微生物(病毒、细菌、真菌、寄生虫)及相关毒素;②人或动物的血液、体液和组织等;③培养细胞、病原生物的核酸及重组 DNA 等。其中,根据感染造成的危害程度及传染性的强弱,病原微生物可以分为四类(表 1-1)。

表 1-1 病原微生物的分类\*

| 分类  | 致病性与危害                                            | 种类                                                                                                                  |
|-----|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 第一类 | 能引起极其严重疾病的病原微生物,或者我国尚未发现及已经宣布消灭的病原微生物,尚无有效预防和治疗措施 | 天花病毒、埃博拉病毒、黄热病毒、蜱传脑炎病毒(森林脑炎病毒)等                                                                                     |
| 第二类 | 能引起严重疾病,易发生人与人、人与动物以及动物与动物间的传播的病原微生物,有预防和治疗措施     | 霍乱弧菌、鼠疫耶尔森菌、炭疽芽胞杆菌、布鲁氏菌、结核分枝杆菌、人类免疫缺陷病毒(HIV)、狂犬病病毒(街毒株)、汉坦病毒、乙型脑炎病毒、严重急性呼吸综合征(SARS)冠状病毒、高致病性禽流感病毒、西尼罗病毒、脊髓灰质炎病毒、朊粒等 |
| 第三类 | 能引起人类或动物疾病,但传播风险有限,对人、动物和环境没有严重危害的病原微生物,有预防和治疗措施  | 破伤风梭菌、脑膜炎奈瑟菌、肝炎病毒、肠道病毒属、腺病毒、腺病毒伴随相关病毒、布尼亚病毒、冠状病毒、疱疹病毒科等                                                             |
| 第四类 | 各种弱毒病原微生物以及不属于第一、第二、第三类的各种低毒力的病原微生物               | 实验动物的疱疹病毒科和逆转录病毒科成员,例如豚鼠疱疹病毒、小鼠白血病病毒等                                                                               |

\* 根据原卫生部 2006 年发布的《人间传染的病原微生物名录》



四、生物安全实验室分级

生物安全实验室(biosafety laboratory)也称生物安全防护实验室,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危害,达到生物安全要求的生物实验室和动物实验室。根据处理对象的生物危险程度,把生物安全实验室分为四级,具体分级见表 1-2。

表 1-2 生物安全实验室分级及适用范围

| 分级  | 缩写    | 适用范围                                                                       |
|-----|-------|----------------------------------------------------------------------------|
| I   | BSL-1 | 生物性状清楚的非致病微生物,例如大肠埃希菌等                                                     |
| II  | BSL-2 | 对人和环境有中度危害的微生物,例如致病肠道杆菌(致病型大肠埃希菌、沙门菌等)、肝炎病毒(甲、乙、丙)、流感病毒、登革病毒、麻疹病毒等         |
| III | BSL-3 | 通过呼吸道传播并致严重疾病的微生物及毒素,多数已经有疫苗,例如炭疽芽胞杆菌、结核分枝杆菌、HIV、SARS 冠状病毒、流行性乙型脑炎病毒和汉坦病毒等 |
| IV  | BSL-4 | 极其危险的空气传播并发生致死性感染的外源性病原体,目前尚无疫苗,例如埃博拉病毒、马堡病毒等出血热病毒                         |

(钟照华 商庆龙)

## 第二章

# 常用仪器设备及使用

【实验目的】 主要了解微生物学实验室常用的仪器和设备。

### 一、油浸镜

显微镜用于观察病原微生物和人体寄生虫的形态(包括病毒包涵体形态)。一般的光学显微镜可满足常规要求,其目镜常用 $5\times$ 、 $8\times$ 、 $10\times$ ,物镜常用 $10\times$ 、 $40\times$ 和 $100\times$ (油浸镜)。细菌和某些寄生虫虫卵等形态学观察则常用油浸镜,可将视野内的菌体、虫卵等放大1000倍(由于镜头和玻片的距离非常近,应特别注意保护油浸镜镜头)。有条件的实验室还可装备暗视野显微镜、倒置显微镜、荧光显微镜以及能观察病毒形态的电子显微镜等。

### 二、火焰灯

火焰灯是接种工具灭菌及玻璃试管等物品无菌化处理的必备器材。

酒精灯、煤气灯是接种环灭菌较理想的器材,火焰的大小可根据需要自行调节。火焰柱可分为外焰和内焰,外焰接触氧气丰富,燃烧充分,温度较高,所以烧灼接种环或玻璃试管等物品时应使用外焰。

近年来,市场上出现电热接种环灭菌器、红外接种环灭菌器等适用于医用器械灭菌的仪器,使用安全、便捷,特别适于结核分枝杆菌等感染性较强的病原菌的实验室操作。

### 三、接种工具

是指将微生物接种到适宜生长繁殖的人工培养基上或活的生物体内时所使用的工具。培养细菌常用的接种工具为接种环和接种针。接种环用以挑取标本、接种细菌、涂抹平板等,直径通常为 $2\sim 4\text{mm}$ ,也可依据需要定制。接种针则用来挑取单个菌落、穿刺高层琼脂等。为了适应不同的需要,接种工具可以制作成各种形式(图2-1)。

### 四、温箱

温箱是进行细菌培养必需的设备,有隔水式和非隔水式两种类型,可调控温度范围一般在 $20\sim 60^{\circ}\text{C}$ ,其容积也可根据实际要求进行选择。

温箱应由控温仪进行温度控制,以避免由于偶然升温使细菌死

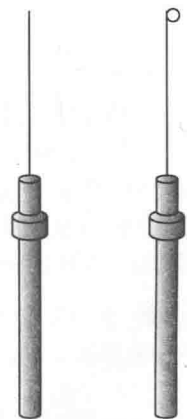


图2-1 细菌接种工具  
(前端有环者为接种环,前端无环者为接种针)

亡或增殖受影响。培养一般的细菌时,温箱的温度应设定在  $37^{\circ}\text{C}$ ,也可依据所培养的细菌的需要设定其他温度(如  $26^{\circ}\text{C}$ 、 $43^{\circ}\text{C}$  等)。

## 五、 $\text{CO}_2$ 培养设备

用于分离和培养需要  $\text{CO}_2$  气体才能生长的病原微生物。市售专用的  $\text{CO}_2$  培养箱对于常规实验室来说成本太高,一般用蜡烛罐亦可满足要求。以真空干燥罐、标本缸或厌氧培养罐作为蜡烛罐,将接种的平板和试管放在罐内,然后放入点燃的蜡烛,再将罐盖盖好并用凡士林密闭。待罐内的氧气耗尽,蜡烛自行熄灭,即可达到所需的  $5\% \sim 10\%$  的  $\text{CO}_2$  浓度,然后将蜡烛罐放入普通温箱孵育便可。也可以用化学试剂产气法,如每升  $\text{CO}_2$  气体需枸橼酸( $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) 9.3g、碳酸氢钠( $\text{NaHCO}_3$ ) 0.37g,将盛有两试剂混合物的小烧杯置于罐内,向烧杯中加入 10ml 蒸馏水并立即封闭罐口,如此产生的  $\text{CO}_2$  气体环境也比较理想。

## 六、高压灭菌设备

高压灭菌器是病原生物学实验室必备的设备,用于培养基、玻璃器皿及其他物品的消毒和灭菌。高压灭菌器有立式、卧式之分,也有便携的手提式高压灭菌器,适用于小型实验室。根据热源不同,又可分为蒸汽式和电热式,不同的实验室可根据具体情况选用。

## 七、冰箱

冰箱是病原生物学实验室用于储存制备好的培养基、菌种、需要低温保存的试剂等所必需的设备。

冰箱的种类和规格繁多,家用和医用的均可应用于实验室。 $0 \sim 4^{\circ}\text{C}$  范围的冰箱可用于储存培养基,放置抗原、抗体等试剂最好选用  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱,菌种或毒种应保存于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱。

## 八、DNA 扩增仪

DNA 体外扩增仪也称聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)仪。PCR 技术是以目的基因为模板,在人工合成特异引物和耐热 DNA 聚合酶作用下进行的体外 DNA 扩增的方法。实验过程由高温变性、低温退火和适宜温度延伸等反应步骤组成一个循环,经过若干个循环后,特异性 DNA 片段会被大量扩增,然后再用琼脂糖凝胶电泳等手段检测被扩增的 DNA 片段。

PCR 仪根据用途分为许多类型,现在已由普通 PCR 仪发展到原位 PCR 仪、定量 PCR 仪等。

## 九、Real-time PCR 仪

Real-time PCR,即实时荧光定量 PCR,是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号累积实时监测 PCR 扩增反应中每一个循环扩增产物量的变化,最后通过  $\text{Ct}$ (阈值循环,threshold cycle)值和标准曲线对起始模板进行定量分析的方法。应用此原理和方法完成检测的仪器即是 Real-time PCR 仪。

Real-time PCR 常用的方法分为 SYBR Green 法(荧光染料掺入法)和 TaqMan Probe 法(探针法)。前者是在 PCR 反应体系中加入过量 SYBR Green 荧光染料,荧光染料特异性地掺入 DNA 双链后,发射荧光信号,而未掺入的染料分子不会发出任何荧光信号,从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物的增加完全同步。TaqMan Probe 法是 PCR 扩增时在加入一对引物的同时加入一个特异性的荧光探针,该探针为一寡核苷酸,两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团。探针完整时,报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收;PCR 扩增时,Taq 酶的 5'-3'外切酶活性将探针酶切降解,使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离,从而荧光监测系统可接收到荧光信号,即每扩增一条 DNA 链,就有一个荧光分子形成,实现荧光信号的累积与 PCR 产物的形成完全同步。

Real-time PCR 技术避免了传统 PCR 技术以检测终产物进行定量而产生的偏差,提高了实验的重复性,已经被广泛用于监测细胞 mRNA 表达量的变化、比较不同组织的 mRNA 表达差异、验证基因芯片和小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 干扰的实验结果等。

## 十、生物安全柜

生物安全柜是操作具有感染性的实验材料时用来保护操作者、实验环境以及材料,使其避免暴露于操作过程中可能产生的感染性气溶胶和溅出物而设计的实验室设备。根据生物安全防护水平的要求,生物安全柜可分为一级、二级和三级,对操作者、实验环境和材料进行不同程度的保护。

一级生物安全柜可保护操作人员和实验环境但不保护检测的材料,已较少使用。二级生物安全柜目前应用最广泛,对操作者、实验环境和材料都能起到保护作用。三级生物安全柜是为 BSL-4 实验室设计的,是目前世界上最高安全防护等级的安全柜,柜体完全气密,100%全排式,所有气体不参与循环,工作人员通过连接在柜体的手套进行操作(俗称手套箱),试验品通过双门的传递箱进出安全柜以确保不受污染,适用于高风险的生物实验。

## 十一、共聚焦显微镜

从一个点光源发射的探测光通过透镜聚焦到被观测物体上,如果物体恰在焦平面的二倍焦点上,那么反射光通过原透镜应当汇聚回到光源,这就是所谓的共聚焦,简称共焦。其意义是通过移动透镜系统可以对一个半透明的物体进行三维扫描。共聚焦显微镜能提供无比精确的三维成像,以及对亚细胞结构和动力学过程的精准测试。

激光扫描共聚焦显微镜是 20 世纪 80 年代发展起来的高科技产品,它是在荧光显微镜成像基础上加装了激光扫描装置,利用计算机进行图像处理,把光学成像的分辨率提高了 30%~40%,激光扫描共聚焦显微镜能够用于观察各种染色、非染色和荧光标记的组织 and 细胞等,使用紫外或可见光激发荧光探针,从而得到细胞或组织内部微细结构的荧光图像,在亚细胞水平上观察诸如  $\text{Ca}^{2+}$ 、pH 值、膜电位等生理信号及细胞形态的变化,成为形态学、分子生物学、神经科学、药理学、遗传学等领域中新一代强有力的研究工具。

用于微生物研究的激光扫描共聚焦显微镜通常使用高倍物镜(油浸镜、放大 60 倍以上),微生物经过荧光标记,或者使用带有荧光标记的抗微生物抗体对样本中的微生物及其成分进行染色,通过激光共聚焦显微镜扫描成像。获得微生物在样本中的位置和计量信息。

## 十二、小动物活体成像系统

传统成像大多依赖于肉眼可见的身体、生理和代谢过程在疾病状态下的变化,分子成像则是利用特异性分子探针追踪靶目标并成像,应用影像学方法实现对活体内的生物过程进行细胞和分子水平的定性和定量研究。小动物活体成像系统最初主要是通过转入萤光素酶(luciferase)基因的方式,对细胞和蛋白质进行遗传标记,在腺苷三磷酸(ATP)及氧气存在时,外源(腹腔或静脉注射)给予底物萤光素(luciferin),萤光素酶催化萤光素的氧化反应并产生发光现象。萤光素酶的每个催化反应只产生一个光子,光子的信号相对较弱,只能通过制冷 CCD 相机及特别设计镜头和光路进行观测和记录。虽然转基因标记过程复杂,又存在萤光素酶基因的表达状态受基因整合在染色体上的位置、整合的拷贝数目以及动物本身生理状态等因素的影响,生物发光活体成像技术还是给基础科学领域研究者,尤其是肿瘤领域的研究者,提供了很大的研究便利,促进了一大批高水平科研成果的产生。

## 十三、飞行时间质谱

飞行时间质谱(time of flight mass spectrometer, TOF-MS)是一种很常用的质谱仪,其质量分析器是一个离子漂移管(ion drift tube)。由离子源产生的离子首先被收集,在收集器中所有离子速度变为 0,随后经脉冲电场加速后进入无场漂移管,并以恒定速度飞向离子接收器。离子质量越大,到达接收器所用时间越长,反之,离子质量越小,到达接收器所用时间越短,根据这一原理,可以把不同质量的离子按质荷比( $m/z$ )的大小进行分离。飞行时间质谱仪具有可检测的分子量范围大、扫描速度快、仪器结构简单等优点。

在病原生物学试验中,将样品与过量的基质溶液点加在样品板上,溶剂挥发后形成样品与基质的共结晶,利用激光作为能量来源辐射共结晶体,基质分子吸收能量与样品解吸附并使样品电离,经过飞行时间检测器,将不同质荷比的离子分开,形成细菌特异性的质谱图。用标准菌株或来源、分型明确的菌株建立细菌质谱图库,利用相关软件将待测细菌质谱图与细菌库进行比较,可以确定细菌的种属。

(考文萍 宋武琦)

## 十四、临床常用的检测设备

1. 手工微生物鉴定系统 国内外已有多种用于细菌鉴定的数码鉴定系统,为临床微生物学实验室对细菌的鉴定提供了简便、快速的方法。数码鉴定是通过数学的编码技术将细菌的生化反应模式转换成数学模式,给每种细菌的反应模式赋予一组数码,建立数据库。通过对未知菌进行相关生化试验,将生化反应结果转换成对应的数码,查阅数据库进行细菌的鉴定。其基本原理是计算并比较数据库内每个细菌条目对系统中每个生化反应出现的频率总和。常用的包括 API 鉴定系统、RapID 快速细菌鉴定系统、Enterotube II 鉴定系统、Micro-ID

鉴定系统。

2. 双相血液培养系统 双相血培养系统常用于一些苛养菌如脑膜炎奈瑟菌、流感嗜血杆菌、肺炎链球菌、布鲁氏菌等的微量检测。双相血培养瓶内同时包括固相和液相两种形态的培养基,提供细菌生长所需的丰富营养,包括多种生长因子、完整的氨基酸系列和复合维生素,瓶内预先充入细菌生长所需的一定浓度(常为10%)的二氧化碳,使其不仅能促进血中常见细菌的快速生长,更能支持各种苛养菌的生长。

3. 自动化血培养检测系统 自动化血培养检测系统的原理是检测细菌或真菌生长时释放的二氧化碳,作为血液中有无微生物生长的指标。检测技术包括核素标记、颜色变化(二氧化碳感受器)和均质荧光技术等。血培养瓶的种类增加以适应不同细菌的培养和鉴定需求,有需氧瓶、厌氧瓶、分枝杆菌瓶、高渗(L型菌培养)瓶、中和抗生素瓶和儿童瓶等。检测系统与恒温孵育器合二为一,接种血液样品后的血培养瓶在恒温、振荡培养的同时,机器连续、自动地监测瓶中二氧化碳的产生情况,所测得的信号传送至计算机进行分析,绘制出每个瓶中微生物的生长曲线。一旦出现阳性结果,计算机自动发出警报,指示阳性瓶的位置,并自动打印阳性结果出现的时间等参数。与手工系统相比,自动化血培养检测系统提高了细菌和真菌的阳性检出率,灵敏度高,重复性好,能节省人力,缩短检验周期。但是仪器、设备和消耗品的成本较高,检验费用相应增加。

4. 自动化微生物鉴定和药物敏感性试验系统 大多鉴定系统通过检测细菌分解底物后反应液中pH的变化、色原性或荧光原性底物的酶解、挥发或不挥发酸,或识别是否生长等方法来分析鉴定细菌。不同的细菌对底物的反应不同,这是生化反应鉴定细菌的基础,而试验结果的准确度取决于鉴定系统配套培养基的制备方法、培养物浓度、孵育条件和结果判定等。

药敏试验分析系统的基本原理是将抗生素微量稀释后,加入细菌悬液孵育,通过测定细菌生长的浊度、培养基中荧光指示剂的强度、荧光原性物质的水解程度,观察细菌的生长情况。在含有抗生素的培养基中,浊度的增加提示细菌生长,根据判断标准解释敏感或耐药。其中,半自动细菌鉴定和(或)药敏分析系统包括VITEK-ATB半自动细菌鉴定和药敏分析系统、AutoScan-4半自动细菌鉴定和药敏分析系统、BBL Crystal半自动细菌鉴定系统、AutoReader半自动细菌鉴定和药敏分析系统等。全自动细菌鉴定和药敏分析系统包括VITEK系统、MicroScan WalkAway系统、PHOENIX系统、ARIS系统、BBL Crystal Auto Reader自动细菌鉴定系统。

5. 结核分枝杆菌快速检测系统 结核分枝杆菌的经典培养方法是将标本接种在特定固体培养基上,定时观察,培养15天后生长的为可疑菌落,判定阴性需培养和观察8周时间。要完成阳性病例的鉴定、药物敏感试验需2~3个月,且阳性率低,不易标准化。近年来,发展了结核分枝杆菌的快速检测系统,主要是采用 $^{14}\text{C}$ 棕榈酸作为底物的检测系统,包括BACTEC 460TMTB、BACTEC 9000系列等。

6. API鉴定系统在细菌学检验中的应用 API是细菌数值分类的分析鉴定系统,可鉴定的细菌超过700种,是世界范围内应用最广,鉴定细菌种类最多的国际标准化产品。API以含有荧光标记的糖苷化合物或氨基酸为底物,检测细菌的胞外或胞内酶分解底物后产生的颜色变化,或加入检测试剂后的颜色变化。API 20E为肠杆菌科及某些革兰阴性杆菌鉴定系统,含糖发酵、氨基酸分解、明胶液化等20个生化测试反应。API 20NE



为非肠道革兰阴性杆菌鉴定系统,包含 8 个标准化常规测试和 12 个同化试验,主要用来鉴定革兰阴性非苛养杆菌,例如,假单胞菌属、不动杆菌属、黄杆菌属、弧菌属、气单胞菌属等。此外,还有用于鉴定链球菌及有关种类的 API 20 STREP,用于鉴定葡萄球菌和微球菌的 API STAPH,用于厌氧菌鉴定的 API 20A,用于假丝酵母菌鉴定的 API Candida 鉴定系统等。

(张凤民 付英梅)

## 第三章

# 消毒、灭菌技术、无菌操作

【实验目的】掌握各种消毒灭菌法的原理及应用;建立无菌操作观念,掌握无菌操作的原则和方法。

### 一、干热灭菌

利用热能变性蛋白质或核酸,通过破坏细胞膜以实现杀灭微生物的目的。干热灭菌包括火焰烧灼灭菌和热空气灭菌两种。火焰烧灼灭菌直接用火焰将微生物杀灭,适用于接种环、接种针或金属用具如镊子、无菌操作的试管口及瓶口等。热空气灭菌是在电烤箱内利用高温干燥空气进行灭菌,主要用于平皿、吸管、试管等玻璃器材以及瓷、金属等器材的灭菌。温度  $160\sim 170^{\circ}\text{C}$ ,维持 2 小时。灭菌后,待温度下降到  $80^{\circ}\text{C}$  以下时,再开箱取物,否则冷空气突然进入会使玻璃器材炸裂。

### 二、高压蒸汽灭菌

高压蒸汽灭菌是最常用的一种灭菌方法,利用高温加高压灭菌,不仅可杀死一般的细菌、真菌等微生物,对芽胞及孢子也有杀灭效果。主要用于能耐高温且不怕潮湿的物品,如培养基、玻璃、金属器械、手术器械、敷料、手术衣及废弃培养物等材料的灭菌。压力升至  $103.4\text{kPa}$  ( $1.05\text{kg}/\text{cm}^2$ ),温度  $121.3^{\circ}\text{C}$ ,维持  $15\sim 20$  分钟,可达到灭菌效果。

注意事项:①高压灭菌器内的包裹不要包得太密,以免妨碍蒸汽透入,影响灭菌效果;②易燃及易爆物品,如碘仿及苯类等,禁用高压蒸汽灭菌;③瓶装液体灭菌时,要用玻璃纸和纱布包扎瓶口;如有橡皮塞时,应插入针头排气。切勿在压力未下降为零前打开放气阀排气减压,以免瓶内液体冲出外溢。

### 三、滤过除菌法

滤过除菌法是用物理阻留的方法除去液体或空气中的细菌,达到除菌效果。除菌器是含有微小孔径的滤菌器,可用于血清、抗生素及糖溶液等无法用加热灭菌方法进行灭菌的试剂等。常用的滤菌器有薄膜滤菌器( $0.45\mu\text{m}$  和  $0.22\mu\text{m}$  孔径)、陶瓷滤菌器、石棉滤菌器(即 Seitz 滤菌器)、烧结玻璃滤菌器等。过滤时液体和小分子物质通过,细菌则被截留在滤膜上。实验室常用除菌器的微孔滤膜孔径为  $0.22\mu\text{m}$ ,但若要病毒除掉,则需要更小孔径的微孔滤膜。

### 四、紫外线灭菌

波长  $200\sim 300\text{nm}$  的紫外线具有杀菌作用,其中以  $265\sim 266\text{nm}$  为最强,因其与 DNA 吸

收光谱一致。其杀菌机制是使微生物 DNA 相邻的胸腺嘧啶形成二聚体, 从而破坏 DNA 结构, 干扰其正常复制, 导致微生物死亡或变异。紫外线杀菌力虽然很强, 但穿透力弱, 所以仅用于实验室、病房、手术室的空气或物体表面的消毒灭菌。

## 五、常用消毒剂

化学消毒剂种类很多, 其杀菌机制可有以下几类: ①使菌体蛋白变性或沉淀, 例如酚类(高浓度)、醇类、重金属盐类、酸碱类及醛类; ②妨碍某些代谢环节, 例如氯化剂的氯化作用、低浓度重金属盐类与巯基( $-SH$ )结合、钴( $Co$ )及硫氰基( $CN-$ )的拮抗作用; ③损害细菌细胞膜, 例如酚类(低浓度)、表面活性剂(肥皂、去污剂、胆盐类); ④影响细菌代谢, 例如染料。

【实验目的】检测 2.5% 碘酒、75% 乙醇及 3%~5% 甲酚三种消毒剂的灭菌效果。

【实验材料】

2.5% 碘酒、75% 乙醇、3% 甲酚、普通琼脂平板等。

【实验方法】

1. 用玻璃笔在琼脂平板底面划十字线, 将其分成 A1、A2、A3、A4 四区。
2. 掀开平板盖, 将手指末端掌侧面在琼脂 A1 区表面轻轻压一下, 盖好, 作为对照。
3. 选用下述方法分别消毒其余各手指末端掌侧面。
  - (1) 用 75% 酒精棉球擦拭 1 分钟, 待干, 在 A2 区轻轻压一下。
  - (2) 用 2.5% 碘酒消毒后, 再用 75% 酒精棉球擦去碘酒, 待干, 在 A3 区轻轻压一下。
  - (3) 3% 甲酚消毒 5 分钟, 待干, 在 A4 区轻轻压一下。
4. 将平皿倒置,  $37^{\circ}C$ , 培养 18~24 小时, 观察结果。

【实验结果】

观察琼脂表面各区菌落, 判断微生物生长情况及消毒剂的效果。

## 六、微生物实验室无菌操作技术

在病原生物学实验室进行实验操作, 首先要建立无菌操作观念, 严格遵循无菌操作原则, 并熟练掌握无菌操作方法, 贯彻到整个实验过程, 从而保护操作对象免受污染, 保证实验结果的准确性和科学性。

### (一) 普通微生物实验室内无菌操作

普通微生物实验室内操作时, 无菌环境通常由酒精灯或煤气灯的火焰来实现。因此, 操作时应靠近火焰, 火焰灭菌应使用外焰, 适用于处理感染性不强的病原生物。

### (二) 在生物洁净(超净)工作台内进行无菌操作

超净工作台能够保证操作野达到要求的洁净度, 避免操作对象被污染。是医疗卫生、生物工程、科学实验等领域用于动植物细胞组织培养的必需设备。

在超净工作台内进行操作的过程如下:

1. 打开无菌工作台的紫外灯, 消毒半小时以上。
2. 开始操作前先关闭紫外灯, 打开超净台风机, 等待 30 分钟以上, 以排尽臭氧。穿好工作服, 戴好口罩、帽子。
3. 用 70% 乙醇消毒手, 晾干。
4. 点燃酒精灯, 进行组织培养等操作。操作完毕后熄灭酒精灯, 将培养物放入培养箱。