

临床检验操作技术系列丛书

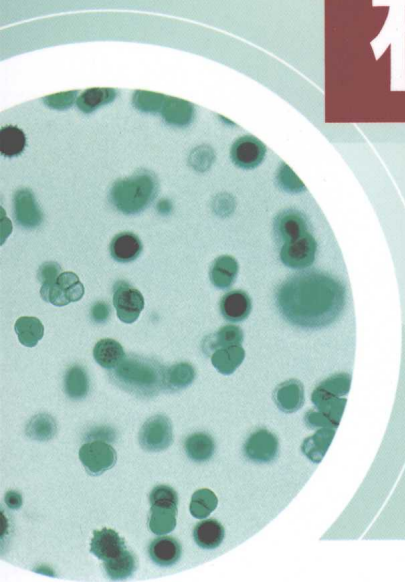
LINCHUANG JIANYAN CAOZUO
JISHU XILIE CONGSHU

梁 冰 李 慧 吴振军/主编

微生物学

检验分册

W EISHENGWUXUE
JIANYAN FENCE



军事医学科学出版社

· 临床检验操作技术系列丛书 ·

微生物学检验分册

主 编 梁 冰 李 慧 吴振军
副主编 王 军 李晓斐 黄卫青
苏维奇 刘蓬蓬 孙迎娟
编 委 (按姓氏笔画为序)

卜祥茂	马书丽	王 军
王华强	孙迎娟	孙英姿
冯 健	苏维奇	刘蓬蓬
李 慧	李晓斐	吴振军
辛 萍	张 旋	张璞玉
苑同业	周丽萍	施永新
禹华玮	郭学彬	姜美娟
袁晓路	梁 冰	梁继伟
黄卫青	董全江	董争鸣

军事医学科学出版社

· 北 京 ·

图书在版编目(CIP)数据

临床检验操作技术系列丛书——微生物学检验分册/梁冰,李慧,吴振军主编.

-北京:军事医学科学出版社,2006

ISBN 978-7-80121-891-9

I. 微… II. ①梁… ②李… ③吴… III. ①临床医学-医学检验
②微生物学-医学检验 IV. R446.1

中国版本图书馆CIP数据核字(2006)第022490号

出 版:军事医学科学出版社

地 址:北京市海淀区太平路27号

邮 编:100850

联系电话:发行部:(010)63801284

63800294

编辑部:(010)66884418,66884402 转 6213,6216,6315

传 真:(010)63801284

网 址:<http://www.mmssp.cn>

印 装:廊坊市金盛源印务有限公司

发 行:新华书店

开 本:850mm×1168mm 1/32

印 张:17.625

字 数:455千字

版 次:2007年4月第1版

印 次:2007年4月第1次

定 价:35.00元

本社图书凡缺、损、倒、脱页者,本社发行部负责调换

内 容 提 要

本书是临床检验操作技术系列丛书之一,介绍了临床微生物标本培养的规范化操作;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;抗微生物药物敏感性试验规范;临床微生物学检验的质量控制及实验室管理;分子生物学技术在微生物检测中的应用等。适合从事临床微生物学的医务工作者阅读。

《临床检验操作技术系列丛书》编委会

总 主 编 宋卫青

副总主编 (以姓氏笔画为序)

于修文 于维林 丑广程

朱召明 孙明强 李世荣

李 慧 吴振军 辛苏宁

陈占良 施俊英 赵 超

徐 力 梁 冰 梁淑新

《临床检验操作技术系列丛书》

总前言

临床检验医学目前正以日新月异的速度飞快发展,新技术、新方法、新仪器不断推出。各医疗卫生单位的医学检验部门在疾病的诊疗方面发挥着举足轻重的作用,特别是电子计算机技术及生物医学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,而大量的检验数据的复杂处理也带动了医学检验信息管理系统的发展与运用,从而将检验医学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,使各级各类临床实验室实现又好又快的发展,我们组织专家编写了《临床检验操作技术系列丛书》,本书包括七个分册,分别为质量管理、体液与脱落细胞检验、微生物学检验、生物化学检验、血液学检验、免疫学检验、分子生物学检验与新技术分册。各分册的内容均以比较成熟并得到公认的临床检验技术为主,同时增加了许多新的方法和技术。本丛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,编著人员较多,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。

本丛书的编者均为从事临床一线检验工作的中青年专家,他

们基础知识扎实,经验丰富,专业技术熟练,该丛书是他们多年来辛勤劳动的结晶。在本丛书的编著过程中,得到多方面的关心和支持,在此一并表示感谢!

宋卫青

2007 年 1 月 12 日

目 录

第一章 微生物检验绪论	(1)
第一节 微生物检验概论	(1)
第二节 微生物检验技术简介	(3)
第二章 临床微生物标本培养的规范化操作	(7)
第一节 标本采集和处理的原则	(7)
第二节 血液培养的操作规范	(10)
第三节 下呼吸道标本培养的操作规范	(16)
第四节 尿液标本培养的操作规范	(22)
第五节 粪便标本培养的操作规范	(26)
第六节 生殖道标本培养的操作规范	(33)
第七节 化脓和创伤标本培养的操作规范	(40)
第八节 穿刺液标本培养的操作规范	(44)
第九节 眼、耳、鼻、咽拭子标本培养的操作规范	(49)
第十节 导管等标本培养的操作规范	(51)
第十一节 组织标本培养的操作规范	(53)
第三章 临床细菌室基本染色技术	(57)
第一节 革兰染色	(59)
第二节 抗酸染色	(61)
第三节 鞭毛染色	(64)
第四节 异染颗粒染色	(66)
第五节 墨汁荚膜染色	(68)
第四章 临床细菌室常用培养基、试剂与诊断血清	(70)
第一节 常用基本分离培养基	(70)
第二节 基本的生化鉴定培养基	(132)

第三节 常用诊断血清	(174)
第五章 需氧菌及兼性厌氧菌的常规鉴定	(194)
第一节 葡萄球菌属鉴定	(194)
第二节 链球菌属鉴定	(199)
第三节 肠球菌属鉴定	(203)
第四节 奈瑟菌属鉴定	(206)
第五节 棒状杆菌属鉴定	(209)
第六节 李斯特菌属鉴定	(212)
第七节 奴卡菌属鉴定	(215)
第八节 军团菌属鉴定	(218)
第九节 弧菌属鉴定	(220)
第十节 气单胞菌属鉴定	(227)
第十一节 邻单胞菌属鉴定	(229)
第十二节 布兰汉菌亚属鉴定	(230)
第十三节 假单胞菌属鉴定	(232)
第十四节 莫拉菌属鉴定	(236)
第十五节 肠杆菌科鉴定	(238)
第六章 常见厌氧菌的分离与鉴定	(259)
第一节 概述	(259)
第二节 分离与鉴定	(261)
第三节 各类厌氧菌一般鉴定	(266)
第七章 分枝杆菌分离与鉴定	(282)
第一节 分枝杆菌分类	(283)
第二节 分枝杆菌的微生物学检查	(285)
第三节 其他诊断技术	(291)
第八章 真菌学分离与鉴定	(294)
第一节 标本采集	(294)
第二节 常规检验	(294)
第三节 常见真菌检验	(301)

第九章 常见致病性病毒检验技术	(311)
第一节 病毒的检测方法概述	(311)
第二节 常见的病毒与临床	(317)
第十章 其他微生物检验技术	(328)
第一节 支原体的实验室诊断	(328)
第二节 衣原体的实验室诊断	(333)
第三节 立克次体的实验室诊断	(338)
第四节 缺壁细菌(L型细菌)的分离与鉴定	(346)
第十一章 抗微生物药物敏感性试验规范	(350)
第一节 抗菌药物敏感试验概述	(350)
第二节 抗菌药物敏感试验指南	(355)
第三节 苛养菌的体外抗菌药物敏感试验	(378)
第四节 厌氧菌的体外抗菌药物敏感试验	(381)
第五节 酵母样真菌体外药敏试验	(384)
第六节 联合抗菌药物体外抗菌药物敏感试验	(389)
第七节 体内抗菌药物浓度及活性检测	(391)
第八节 细菌耐药性检测	(392)
第九节 临床经验	(415)
第十二章 细菌检验中的自动化技术	(418)
第一节 自动化细菌鉴定系统	(418)
第二节 自动血培养分析仪	(421)
第十三章 临床微生物学检验的质量控制及实验室管理	(427)
第一节 临床微生物实验室质量保证	(427)
第二节 菌株的保存与管理	(445)
第三节 临床微生物实验室标准化操作手册的编写与执行	(448)
附 医疗机构临床实验室管理办法	(453)

第十四章	分子生物学技术在微生物检测中的应用	····· (461)
第一节	概述	····· (461)
第二节	分子诊断技术在病原学诊断中的应用	····· (477)
第三节	PCR 技术的常规应用	····· (480)
第十五章	医院感染管理中的微生物学监测	····· (485)
第一节	医院感染的病原学及流行病学监测	····· (485)
第二节	传染源及医院环境卫生学监测	····· (490)
第三节	消毒灭菌效果生物监测	····· (494)
第四节	重症监护病房医院感染的监测	····· (502)
第五节	医院感染暴发的实验室工作	····· (504)
第六节	医院临床微生物实验室在医院感染管理中的作用	····· (504)
第十六章	临床微生物实验室生物安全的管理与实施	·· (508)
第一节	临床微生物实验室生物安全管理要求	····· (508)
第二节	意外事故应对方案和应急程序	····· (519)
第三节	生物安全柜的正确应用	····· (522)
第四节	实验室安全的培训计划	····· (530)
附	病原微生物实验室生物安全管理条例	····· (534)

《《第一章

微生物检验绪论

第一节 微生物检验概论

微生物(microorganism)是广泛存在于自然界中的一群肉眼看不见,必须借助光学显微镜或电子显微镜放大数百倍、数千倍甚至数万倍才能观察到的微小生物的总称。它们具有体形微小、结构简单、繁殖迅速、容易变异及适应环境能力强等特点。

微生物种类繁多,至少有十万种以上。按其结构、化学组成及生活习性等差异可分成3大类。

1. 真核细胞型微生物 细胞核的分化程度较高,有核膜、核仁和染色体;胞质内有完整的细胞器(如内质网、核糖体及线粒体等)。真菌属于此类型微生物。

2. 原核细胞型微生物 细胞核分化程度低,仅有原始核质,没有核膜与核仁;细胞器不很完善。这类微生物种类众多,有细菌、螺旋体、支原体、立克次体、衣原体和放线菌。

3. 非细胞型微生物 没有典型的细胞结构,亦无产生能量的酶系统,只能在活细胞内生长繁殖。病毒属于此类型微生物。

微生物在自然界中的分布极为广泛,空气、土壤、江河、湖泊、海洋等都有数量不等、种类不一的微生物存在。在人类、动物和植物的体表及其与外界相通的腔道中也有多种微生物存在。

绝大多数微生物对人类和动、植物的生存是有益而必需的。自然界中氮、碳、硫等多种元素循环靠微生物的代谢活动来进行。

即使是许多寄生在人类和动物腔道中的微生物,在正常情况下也是无害的,而且有的还具有拮抗外来菌的侵袭和定居,以及提供人类必需的营养物质(如多种维生素和氨基酸等)的作用。

有一小部分微生物能引起人类或动、植物的病害,这些具有致病性的微生物称为病原微生物。有些微生物在正常情况下不致病,而在特定条件下可引起疾病,称为条件性病原微生物。

微生物学(microbiology)是生物学的一个分支,是研究微生物的进化、分类,在一定条件下的形态、结构、生命活动规律及其与人类、动物、植物、自然界相互关系等问题的科学。随着研究范围的日益扩大和深入,微生物学又逐渐形成了许多分支学科,着重研究微生物学基本问题的有普通微生物学、微生物分类学、微生物生理学、微生物生态学、微生物遗传学、分子微生物学等。按研究对象可分为细菌学、真菌学、病毒学等。按研究和应用领域可分为农业微生物学、工业微生物学、医学微生物学、兽医微生物学、食品微生物学、海洋微生物学、土壤微生物学等。

医学微生物学是微生物学的一个分支,亦是医学的一门基础学科。它主要研究与人类疾病有关的病原微生物的形态、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。医学微生物学的研究目的在于了解病原微生物的生物学特性与致病性;认识人体对病原微生物的免疫作用,感染与免疫的相互关系及其规律;了解感染性疾病的实验室诊断及预防原则;致力于提出控制和消灭传染性疾病的方法和措施。

临床微生物学着重于利用微生物作为工具或从微生物遗传学方面从事分子生物学理论和实践的研究;着重于进行病原微生物的生物学特性与机体的相互作用,特别是其致病机制和防治的研究;着重于紧密联系临床,利用医学微生物学的知识和技术,研究感染性疾病的病原学检验,不断提高诊断的快速性和准确性,探讨控制细菌耐药性发展的对策和防治医院内交叉感染的措施。临床微生物学的主要任务概括为研究感染性疾病的病原体特征;提供

快速、准确的病原学诊断;指导合理应用抗菌药物。

临床微生物学在检验医学中的地位十分重要。它担负着临床医学中有关疾病诊断、治疗决策、疗效监测、预后判断等实验室研究的重要任务。鉴于近年来临床感染的特点和医院感染的日益严重,使临床微生物学与临床各科密切相关。从事临床微生物学,必须深刻理解病原学诊断水平的提高是临床治疗水平提高的前提;必须认真学习先进技术,开拓创新,努力加强实验室建设,做好实验室生物安全工作,为提高感染性疾病的正确诊断率和治愈率,防止感染性疾病的传播做出自己的贡献。

第二节 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瘀斑刺破涂片,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。

(梁 冰 周丽萍)