

全国高等学校教材

供基础、临床、预防、口腔等医学类专业用

病原生物学实验指导

主编 李婉宜 陈建平



人民卫生出版社

全国高等学校教材
供基础、临床、预防、口腔等医学类专业用

病原生物学实验指导

主 编 李婉宜 陈建平

副主编 陈长春 王 昕

主 审 李明远 王雅静

编 者 (以姓氏笔画为序)

马碧书 (昆明医科大学海源学院)

王 昕 (成都医学院)

王红仁 (四川大学华西医学中心)

田 玉 (四川大学华西医学中心)

邝 玉 (四川大学华西医学中心)

李婉宜 (四川大学华西医学中心)

杨 靖 (湖北医药学院)

张 莉 (大理大学)

张 菁 (四川大学华西医学中心)

陈长春 (广元职工医学院)

陈建平 (四川大学华西医学中心)

陈琦伟 (四川大学华西医学中心)

周本江 (昆明医科大学海源学院)

黄筱钧 (湖北民族学院)

曹得萍 (青海大学医学院)

章亚惊 (成都中医药大学)

秘 书 周琳琳 (四川大学华西医学中心)

人民卫生出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

病原生物学实验指导 / 李婉宜, 陈建平主编. — 北京: 人民卫生出版社, 2016

ISBN 978-7-117-22137-5

I. ①病… II. ①李… ②陈… III. ①病原微生物 - 实验 - 医学院校 - 教学参考资料 IV. ①R37-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 076261 号

人卫智网	www.ipmph.com	医学教育、学术、考试、健康, 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!

病原生物学实验指导

主 编: 李婉宜 陈建平

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: 北京市艺辉印刷有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787 × 1092 1/16 印张: 16 插页: 1

字 数: 399 千字

版 次: 2016 年 5 月第 1 版 2016 年 5 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-22137-5/R · 22138

定 价: 36.00 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)

随着现代生命科学的飞速发展和各种新型实验技术的不断涌现,高校对医学实验教学提出了更高的要求。改革传统的实验教学模式,在实践中加强对学生创新能力的培养,是目前医学实验教学改革的首要任务。为了适应国家的学科调整和病原生物学的发展,使实验教学独立为不依赖于理论教学的体系,培养学生的创新意识和创新能力,我们在查阅国内外相关资料,参考兄弟院校的实验教程,总结多年实验课教学经验的基础上,结合本学科特点,编写了这本《病原生物学实验指导》。

本教材定位于本科实验教学,立足于多数高校的实验条件,按照各专业培养特点和要求,满足学生通过对不同板块的必选实验项目和自选实验项目相结合选修实验课程。教材依据学科特点,分为病原生物学实验室的仪器设备及常用试剂、微生物学实验、人体寄生虫学实验和综合设计性实验四篇,共 132 个实验。在每个实验之前,结合相关理论,编写一段概述或原理,使学生在实验过程中能既知其然,也知其所以然。编写中,尽量做到所列实验材料方便易得,方法切实可行,对实验结果的叙述准确清楚。在大多数实验之后,均列出相应思考题,以便于学生结合理论知识复习并思考。我们希望通过本教材的学习能使学生掌握病原生物学实验的基本方法和操作技术,强化无菌操作的观念及实验室的生物安全观念,加深学生对病原生物学基本理论的理解和认识,并启迪学生的科学思维和创新意识,培养学生独立分析和解决实际问题的能力。

本教材的理论性、实用性和系统性均较强,删去了部分不开展或重复的实验,并结合高校教学改革和科研实际,适当增加了一些比较成熟的新实验和新技术,突出了其综合性和创新性的特色。实验项目分为以下几个部分:①基本实验方法:介绍病原生物学实验的基本操作技术,包括常用仪器的使用、培养基的配制、常用实验方法等;②验证性实验:以验证病原生物学理论,加深学生感性认识的经典实验为主;③综合设计性实验:为综合病原生物学知识并结合科研而设计的一些实践性实验。本教材主要供高校医学类本科及专科生使用,也可作为本学科的研究生、进修生、青年教师和实验技术人员的参考用书。

在本教材的编写过程中,得到了各地同行和前辈专家的关心及鼎力帮助,他们提出了不少宝贵意见。本教材的出版还得到了各位编委所在单位——四川大学华西基础医学与法医学院的支持,尤其是四川大学华西医学基础实验教学示范中心的大力支持,谨在此一并致以衷心的感谢。

本教材是集体智慧的结晶,如果本书的出版和使用能促进实验教学改革的探索,能对读者的学业和事业有所帮助,我们将备感欣慰。但限于我们的学术水平和写作能力,以及医学知识不断更新的客观情况,本教材虽经反复审阅和修改,难免存在疏漏之处,殷切盼望读者在使用过程中多提宝贵意见和建议,以使本教材在修订过程中日臻完善。

李婉宜 陈建平

2016 年 2 月

目 录

病原生物实验室规则	1
绪论	2
第一篇 病原生物学实验室的仪器设备及常用试剂	
第一章 病原生物学实验室的建设	8
第二章 常规实验器材的准备	10
第三章 常见仪器的使用	14
第四章 常用试剂的配制	22
第二篇 微生物学实验	
第一章 微生物实验的基本技术	42
第一节 显微观察技术	42
实验 1 普通光学显微镜油镜的使用及保护	43
实验 2 显微镜下观察活菌运动	44
第二节 常用染色技术	46
实验 3 革兰染色法	48
实验 4 抗酸染色法	51
实验 5 细菌鞭毛染色法	52
实验 6 细菌荚膜染色法	53
实验 7 细菌芽胞染色法	54
实验 8 螺旋体镀银染色法	56
实验 9 真菌乳酸酚棉兰染色法	57
第三节 微生物培养技术	58
实验 10 基础培养基的制备	58
实验 11 细菌接种和分离技术	60
实验 12 细菌培养方法	63
实验 13 细菌计数方法	65
实验 14 真菌培养方法	67
实验 15 病毒培养方法	69
第四节 菌种保藏技术	72
实验 16 常用菌种保存方法	73
第二章 微生物学常用经典实验	79
第一节 微生物形态及结构观察	79
实验 17 细菌基本形态及特殊结构观察	79

实验 18 肺炎支原体形态及菌落观察	82
实验 19 沙眼衣原体包涵体观察	83
实验 20 钩端螺旋体形态观察	84
实验 21 真菌基本形态及结构观察	85
第二节 常用生化鉴定试验	87
实验 22 糖发酵试验	88
实验 23 甲基红试验	89
实验 24 V-P 试验	90
实验 25 枸橼酸盐利用试验	90
实验 26 吲哚试验	91
实验 27 硫化氢生成试验	92
实验 28 脲酶试验	93
实验 29 色素生成试验	94
实验 30 数字编码鉴定法	95
第三节 常用血清学鉴定试验	96
实验 31 玻片凝聚试验	97
实验 32 肥达试验	98
实验 33 荚膜肿胀试验	100
实验 34 外-斐试验	100
实验 35 显微镜凝集试验	102
实验 36 乳胶凝聚试验	103
实验 37 血凝试验及血凝抑制试验	104
实验 38 酶联免疫吸附试验法检测肺炎衣原体	107
实验 39 免疫荧光法检测人巨细胞病毒	108
实验 40 蛋白印迹法检测 HIV 抗体	109
第四节 常用分子生物学鉴定试验	112
实验 41 微生物核酸的提取	112
实验 42 聚合酶链反应检测 MRSA- <i>mecA</i> 基因	115
实验 43 斑点杂交法检测 HPV-DNA	116
实验 44 实时荧光定量聚合酶链反应检测 HBV-DNA	118
第五节 微生物毒力检测试验	120
实验 45 细菌的黏附试验	120
实验 46 荚膜致病能力的观察	121
实验 47 血浆凝固酶试验	122
实验 48 透明质酸酶试验	124
实验 49 细菌内毒素的检测	124
实验 50 细菌外毒素的检测	126
实验 51 细菌半数致死量的测定	128
实验 52 病毒 50% 组织细胞感染量的测定	129
第六节 细菌分布的检查	130

实验 53 自然界中细菌的检查	131
实验 54 皮肤正常菌群的检查	133
实验 55 口腔及咽喉部正常菌群的检查	134
实验 56 肠道正常菌群的检查	136
第七节 外界因素对细菌的影响	138
实验 57 热力灭菌试验	138
实验 58 紫外线灭菌试验	139
实验 59 滤过除菌试验	140
实验 60 常用化学消毒剂的抑菌试验	141
实验 61 酚系数的测定试验	142
实验 62 噬菌体的特异性溶菌试验	143
实验 63 细菌素的测定试验	145
实验 64 溶菌酶的灭菌试验	146
第八节 细菌的遗传与变异	147
实验 65 细菌 L 型变异的诱导及观察	148
实验 66 细菌菌落变异的诱导及观察	149
实验 67 细菌鞭毛变异的诱导及观察	150
实验 68 细菌耐药性变异的观察	151
实验 69 R 质粒传递试验	152
实验 70 质粒 DNA 转化试验	152
第九节 药学中常用的微生物学试验	154
实验 71 琼脂扩散法药物敏感试验	154
实验 72 最低抑菌浓度和最低杀菌浓度的测定	156
实验 73 E 试验	157
实验 74 抗生素的效价测定	159
实验 75 注射用药的无菌检查	161
实验 76 口服药中细菌总数的测定	162

第三篇 人体寄生虫学实验

第一章 人体寄生虫学实验基本方法	166
第一节 寄生虫标本的采集与保存	166
第二节 寄生虫标本的种类及观察方法	168
第三节 寄生虫粪便直接涂片法	168
第四节 血涂片检查法	169
第二章 人体寄生虫学基本实验	171
第一节 线虫	171
实验 77 似蚓蛔线虫	171
实验 78 毛首鞭形线虫	173
实验 79 蠕形住肠线虫	173
实验 80 十二指肠钩口线虫和美洲板口线虫	174

实验 81 旋毛形线虫	175
实验 82 班氏吴策线虫和马来布鲁线虫	176
第二节 吸虫	176
实验 83 华支睾吸虫	177
实验 84 布氏姜片吸虫	178
实验 85 卫氏并殖吸虫和斯氏狸殖吸虫	179
实验 86 肝片形吸虫	180
实验 87 日本裂体吸虫	181
第三节 绦虫	182
实验 88 链状带绦虫与肥胖带绦虫	183
实验 89 细粒棘球绦虫与多房棘球绦虫	185
实验 90 微小膜壳绦虫与缩小膜壳绦虫	186
实验 91 曼氏迭宫绦虫	188
第四节 医学原虫	188
实验 92 溶组织内阿米巴与结肠内阿米巴	189
实验 93 致病性自由生活阿米巴	190
实验 94 蓝氏贾第鞭毛虫	191
实验 95 阴道毛滴虫	192
实验 96 杜氏利什曼原虫	192
实验 97 疟原虫	193
实验 98 刚地弓形虫	194
实验 99 卡氏肺孢子虫	194
实验 100 微小隐孢子虫	195
第五节 医学节肢动物	195
实验 101 蚊	196
实验 102 蝇	197
实验 103 蚤	197
实验 104 虱	198
实验 105 臭虫	199
实验 106 蜚蠊	199
实验 107 蟑螂	200
实验 108 螨	201
实验 109 蠕形螨	201
实验 110 尘螨	202
实验 111 粉螨	202
第三章 寄生虫学提高型实验	203
实验 112 旋毛虫病动物模型的建立	203
实验 113 线虫标本的制作	204
实验 114 肺吸虫囊蚴分离法	205
实验 115 肺吸虫病动物模型的建立及解剖	206

实验 116	肺吸虫病的免疫学诊断	207
实验 117	日本血吸虫虫卵沉淀孵化法	208
实验 118	肠道寄生虫虫卵检查	208
实验 119	肠道寄生虫虫体分离检查法	217
实验 120	鼠疟原虫模型的建立	219

第四篇 综合设计性实验

第一章	水和食品的卫生细菌学检测	222
实验 121	水的卫生细菌学检验	222
实验 122	市售鲜奶的卫生细菌学检查	225
第二章	临床常见感染性疾病的微生物学检测	228
实验 123	化脓性感染的微生物学检测	229
实验 124	消化道感染的微生物学检测	231
实验 125	食物中毒的微生物学检测	232
实验 126	尿路感染的微生物学检测	234
第三章	环境微生物污染状况调查及耐药性分析	237
实验 127	医院空气中细菌种类及药敏情况的调查	237
实验 128	医院氧气湿化瓶污染情况的调查	238
第四章	寄生虫学综合设计性实验	239
实验 129	血吸虫感染的动物实验	239
实验 130	市售蔬菜的混合虫卵检测	241
实验 131	杜氏利什曼原虫的培养、核酸提取和聚合酶链反应检测	244
实验 132	弓形虫核酸的提取	246

病原生物实验室规则

病原生物学实验的对象大多为病原微生物和寄生虫,具有一定传染性,且多数个体微小,肉眼不能直接观察到,但却客观存在于我们周围。为了保证同学们的安全,培养学生严肃态度、严格作风、严密方法的科学工作习惯,保证实验效果,要求同学进入病原生物实验室必须严格遵守以下规则:

1. 除必要的书籍、笔记本和文具外,其他个人物品一律不得带入实验室。
2. 进入实验室必须先穿好隔离服,戴好帽子,必要时需戴上口罩或手套。
3. 在实验室内,禁止饮食、吸烟,以及大声喧哗或嬉戏。
4. 按照实验要求,有计划地安排要进行的实验,认真进行实验操作,严格遵守无菌操作规程,争取又快又准确地完成实验内容。
5. 对实验中所用的各种耗材、药品、试剂及水、电、气等,均要厉行节约。
6. 实验用过的污染或有菌器材,必须放在指定地点或按要求处理,不能随便乱丢乱放。
7. 如果在实验中发生有菌材料或传染性标本污染桌面或衣服、打翻菌液、割破手指等情况,应立即报告老师并及时处理,切勿隐瞒或自作主张处理。
8. 爱护实验室内的仪器,未经老师许可,不得擅自搬动实验器材和实验室内的其他设施,以及调试好的示教片。在使用显微镜及其他贵重仪器时,应严格遵守操作规程。
9. 实验完毕应将实验器材放回原处,并清理好桌面。需培养的实验材料要标记组别、姓名等,放入培养箱培育;观察结果后的培养物等要送高压灭菌室专门处理;动物尸体、玻片、器皿、垃圾应按要求放到指定地点,严禁丢入水池内,以免堵塞排水管;最后,脱下隔离服,认真洗手后再离开实验室。
10. 每次实验后均应安排学生轮流值日,做好室内清洁,关好门、窗、水、电和燃气。
11. 未经许可,不得将实验室内任何物品,特别是菌种和标本等带出实验室,以免造成污染或感染。

(李婉宜 陈建平 编写)

病原生物学是国家学位委员会在学科调整过程中将医学微生物学和医学寄生虫学整合后形成的一门新学科,专门研究与人体健康有关的病原生物的形态结构特征、生命活动规律及其与人体和外环境的相互关系。病原生物对人类健康危害极大,据世界卫生组织(WHO)统计,全世界每年约有1700多万人死于各类感染性疾病,其中危害最大的艾滋病(AIDS)每天新增感染病例约14 000例,全球似蛔线虫和钩虫的感染率均高达24%,有22亿人还生活在疟疾流行区。因此,我们必须高度重视对病原生物的研究,争取对其所致的疾病能够准确诊断,并使该类疾病得到有效控制或消灭。

病原生物学实验是基础医学的重要学科,也是一门技术性很强的实验学科,其独树一帜的实验技术在学科发展中占据着突出的位置。病原生物学实验技术包括了病原学检查、免疫学检查和分子生物学检查三大方面的各项检测技术,是医药类学生“基本技能”的重要体现,也是推动病原生物学学科发展的重要动力。因此,在学习本课程时要求掌握各项实验的基本原理和实验方法,着重锻炼自己的观察能力、操作能力、思维能力和对知识的运用能力,为将来的学习和工作奠定坚实基础。

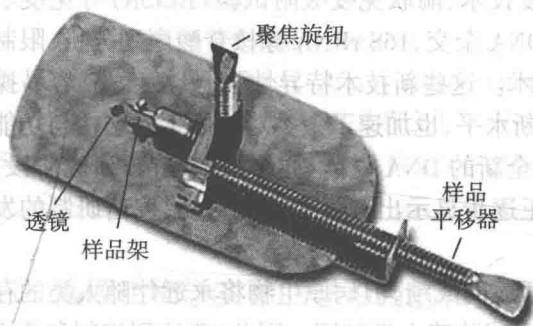
一、病原生物学实验技术的发展简史

医学学科的发展往往与其实验技术的突破和应用密切相关,病原生物学的发展也是如此。如果没有荷兰科学家列文虎克(Antony van Leeuwenhoek)磨制的第一部显微镜,就没有当今各类显微镜的存在,人们也就无法观察到各种形体微小的病原生物;如果没有德国学者科赫(Robert Koch)发明的固体培养基,人们就无法获得各种细菌的纯培养物,也就无法对细菌进行系统研究;如果没有组织或细胞培养技术,人们也就不可能对病毒进行深入研究。由此可见,病原生物学的发展与实验技术的应用密不可分。因此,在学习病原生物学理论课知识时必须重视病原生物学实验技能的学习。

纵观我国医学教育的历程,《病原生物学实验》课程开设的时间并不长,但病原生物学实验技术却始终与《医学微生物学》和《人体寄生虫学》相伴而行,有着悠久的发展历史。为了方便学习理解和掌握,我们把病原生物学的发展简史分为以下两个时期。

1. 实验时期 指人们在经验时期之后,开始运用各种实验手段对各种病原生物进行观察和研究。首先观察到微生物的是荷兰科学家列文虎克(Antony van Leeuwenhoek),他于1676年用自制的可放大266倍的一台原始显微镜(绪图-1),在牙垢、雨水、井水等标本中观察到许多呈球形、杆状或螺旋状的活动的微小生物体。他的发现为微生物的存在提供了科学依据。

19世纪60年代,法国科学家巴斯德(Louis Pasteur)在探索葡萄酒发酸变质的原因时,通过著名的“曲颈瓶实验”(绪图-2),首次证明有机物质的发酵和腐败都是由微生物引起的,发酵是酵母菌作用的结果,而葡萄酒发酸变质是葡萄基质污染了其他杂菌所致。他的研究推翻了当时占统治地位的“自然发生学说”,建立了“病菌学说”,开创了微生物学研究的生



绪图 -1 列文虎克的原始显微镜



绪图 -2 巴斯德的曲颈瓶实验

理时期,为微生物学学科的发展做出了不可磨灭的贡献。他创立的“巴氏消毒法”成功解决了葡萄酒发酸的问题,至今仍被用于酒类和牛奶的消毒。在巴斯德的启迪之下,英国外科医生李斯特(Joseph Lister)创立了石炭酸喷洒手术室、煮沸处理手术器械、术前洗手等措施,为消毒灭菌及无菌操作奠定了基础。

病原生物学实验时期的另一位杰出代表人物是德国学者科赫(Robert Koch)。他创用了固体培养基,使从标本中分离细菌的纯培养物成为可能,并创立了细菌染色方法和实验动物感染方法。在 19 世纪最后 20 年里,科赫和他带动下的一大批学者相继发现并成功分离到了许多对人致病的重要病原菌,如炭疽芽胞杆菌、白喉棒状杆菌、结核分枝杆菌、伤寒沙门菌、霍乱弧菌等。他提出的科赫法则(Koch postulates)至今仍为多种感染性疾病病原菌的发现提供着理论指导和实验依据。在这一时期,还有发现烟草花叶病的烟叶除菌滤汁可使正常烟叶出现花斑的俄国学者伊凡诺夫斯基,发现感染细菌的病毒——噬菌体的英国学者特沃特,发现青霉素的英国细菌学家弗莱明,等等。他们都是善于在实验中发现问题和解决问题的科学工作者,也都为医学微生物学的发展做出了巨大贡献。

1918 年之前,大多数寄生虫的研究都局限在其形态及生活史上,与疾病关系的研究甚少。这方面的研究人员以动物学家居多,他们的研究内容也主要停留在动物学分类方面。后来,由于生物医学的主要发展方向源于生物化学、化学和物理学,与动物学紧密联系的人体寄生虫学错过了其追踪现代生物学研究的发展机遇,这一错失和滞后在很长一段时期阻碍了人体寄生虫学的发展。1948 年 Vincke 和 Lips 分离到了首株啮齿动物疟原虫,开创了实验疟疾学新领域,成为以实验为基础的现代寄生虫学研究的标志性起点。

2. 现代时期 随着物理学、生物化学、免疫学、细胞生物学和分子生物学等学科的迅速发展,用于病原生物实验研究的技术也得到了快速发展,实验技术的发展反过来又推动了病原生物学的发展。运用这些新技术,人们发现了很多新现的病原体,包括军团菌、幽门螺杆菌、伯氏疏螺旋体等细菌,以及人类免疫缺陷病毒、西尼罗病毒、SARS 冠状病毒等。

这一时期,病原生物的基因组研究也取得了长足进步。1988 年,人们阐明了秀丽隐杆线虫的每个细胞起源,使在多细胞生命体内研究一个完整无缺的单个细胞的发育和形态成为现实,并完成了该线虫的基因组序列测定。目前已经完成 150 多种细菌 DNA 的测序工作,其中 6 种细菌 DNA 的测序工作是由我国完成的,病原生物学研究正逐步进入后基因组学时

代,这将对了解病原生物的致病机制、新型抗感染药物和疫苗的研发具有重大意义。

进入病原生物学现代时期以后,一大批快速、特异的病原生物学诊断方法相继建立,如单克隆抗体技术、免疫荧光技术、放射免疫技术、酶联免疫吸附试验(ELISA)等免疫学检测技术及聚合酶链反应(PCR)、定量 PCR、DNA 杂交、16S rRNA 寡核苷酸序列分析、限制性片段长度多态性(RFLP)分析等分子检测技术。这些新技术特异性强,灵敏度高,容易操作及普及,大大提高了感染性疾病的病原学诊断水平,也加速了人类对病原生物结构与功能的认识。同时,病原生物的疫苗研制也进入了全新的 DNA 疫苗(亦称核酸疫苗)研究阶段,而且通过基因重组技术研制的多价重组疫苗正逐步显示出其强大的生命力,疫苗研制的发展对感染性疾病的预防起到了巨大作用。

虽然病原生物学研究领域已取得了骄人的成绩,但病原生物将永远伴随人类的存在而存在,由它们引起的多种感染性疾病仍严重威胁着人类健康。因此,要达到控制和消灭危害人类健康的感染性疾病的宏伟目标,我们还任重而道远。

二、病原生物实验室的生物安全

生物安全是指避免生物危险因子造成实验室人员伤害,或避免生物危险因子污染环境、危害公众的综合性措施。病原生物实验室的生物安全涉及病原生物实验中样本的采集、运送、分离培养、鉴定和储存等多个环节,同时也包括由于实验室对生物基因的改造而产生的安全问题。

我国原卫生部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。第一类病原微生物是指能引起人类或动物非常严重的感染和疾病,也包括我国尚未发现或者已经宣布消灭又复活的微生物,如天花病毒、猴痘病毒、克里米亚-刚果出血热病毒、埃博拉病毒等;第二类病原微生物是指能引起人类或动物的严重感染和疾病,比较容易直接或者间接在人与人、动物与人、动物与动物间传播的微生物,包括 HIV、口蹄疫病毒、汉坦病毒、SARS 冠状病毒、炭疽芽胞杆菌、结核分枝杆菌、霍乱弧菌等;第三类病原微生物是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,实验室感染后引起的疾病不严重,并且具备有效治疗和预防措施的微生物,对人类致病的常见微生物属于第三类,包括肠道病毒、肝炎病毒、流感病毒、腺病毒、脑膜炎奈瑟菌、金黄色葡萄球菌、志贺菌、白假丝酵母菌等;第四类病原微生物是指在正常情况下不会引起人类或动物疾病的微生物。上述第一类和第二类病原微生物对人体危害程度非常大,被称为“高致病性病原微生物”。我们在病原生物学实验课中所涉及的微生物多属于第四类病原微生物,少数情况下可能会涉及第三类病原微生物。

保证教学、科研和临床检验等过程中生物安全的基本前提是要有符合生物安全标准的病原生物实验室。2004 年 11 月,国务院第 424 号令颁发了《病原微生物实验室生物安全管理条例》,使从事病原生物学教学和科研的机构有了明确的依据和具体的管理规章制度。根据病原体的危害程度,病原微生物实验室的生物安全防护水平(biosafety level,BSL)被分为四级,相应为 BSL1~4 级。绪表-1 简要介绍了各级实验室的要求要点及适用范围。进行不同危险程度的病原生物研究要求在相应安全防护级别的实验室中进行,以保证每位学生在病原生物学实验课程学习中的生物安全。

绪表 -1 生物安全实验室分级与适用范围

实验室级别	实验室主要条件	适合的病原微生物
BSL-1	没有特殊要求	主要适合第四类病原微生物
BSL-2	Ⅱ级生物安全柜和应急喷淋等	主要适合第三类病原微生物
BSL-3	建筑要自成隔离区,应有压力梯度并控制气流方向,Ⅱ级或Ⅲ级生物安全柜	高致病性病原微生物,主要适合第二类病原微生物
BSL-4	建筑应远离城市,有Ⅲ级生物安全柜,穿正压防护服	高致病性病原微生物,主要适合第一类病原微生物

三、病原生物学实验的学习目的和要求

1. 学习目的 病原生物学实验课是《医学微生物学》和《人体寄生虫学》课程的重要组成部分,是理论知识和实验技术相结合的具体体现,其学习目的主要表现在以下几个方面:

(1) 通过本课程的学习,加深学生对《医学微生物学》和《人体寄生虫学》理论知识的理解,验证和巩固其理论知识。

(2) 通过本课程的学习,让学生掌握病原生物学的基本实验方法和操作技术,熟悉和了解病原生物学科的科学研究的思路和研究方法,为临床感染性疾病的诊断、预防和治疗奠定良好的实验基础。

(3) 通过本课程中综合型和创新型实验设计的讨论和实验结果的分析,培养学生独立学习、独立工作的能力及观察、思考和分析问题的能力。并使学生逐步建立严格的科学学风、严肃的科学态度和严密的工作方法。

(4) 通过学生合作完成实验操作内容,培养学生互相帮助和团结协作的团队精神。

2. 学习要求 为了达到本课程的学习目的,提高病原生物学实验课的教学质量和教学效果,特提出本课程的学习要求如下:

(1) 严格遵守实验室规则和实验操作规程,牢固树立有菌观点,掌握无菌操作技术,杜绝各种实验事故的发生。

(2) 实验前做好预习,明确各实验的目的和要求,熟悉将要进行的实验内容,了解实验原理、方法和注意事项,并做好必要的准备工作。

(3) 实验操作要认真,对较复杂的实验应分工协作共同完成。客观准确地记录实验结果,联系理论知识分析实验结果。若所得实验结果与预期结果不符合,要加以分析讨论并找出原因,必要时还应做重复实验。

(4) 按照授课教师要求,认真完成实验报告和绘图作业,对所做过实验要求达到掌握的程度。

(李婉宜 编写)

病原生物学实验室的仪器设备及常用试剂

第一章 病原生物学实验室的建设

病原生物包括病原微生物(如细菌、病毒、真菌、衣原体、立克次体、螺旋体等)和病原寄生虫(如原虫、蠕虫、线虫等)。对不同危险等级病原生物的操作要求在相应安全防护等级的实验室进行。一般来说,对人和动物不致病的微生物可在一级生物安全防护水平实验室(BSL-1)进行操作,而病原生物学实验中多接触的是一些具有感染性的病原体,通常要求在二级生物安全防护水平实验室(BSL-2)或更高防护水平的实验室(BSL-3、BSL-4)中进行操作。

根据国际和国内的生物安全法规,病原生物学实验室的设计首先要考虑环境保护的要求,包括实验用水和饮用水要分开,防止实验室用水污染饮用水源等。其次要符合消防法规的规定,如紧急逃生标识要清楚醒目,实验室的电源要稳定,普通用电和动力电源要分开等。在安全方面,有条件的实验室应设置机械通风系统,使实验室内的空气单向流动;实验室的空间一般采用化学消毒剂熏蒸和紫外线照射消毒;实验室的墙壁、天花板、地面等应光滑、防滑、不起灰,并能耐消毒剂的腐蚀和紫外线的照射;实验操作台面要能够防水并能耐酸碱等化学物质的腐蚀;实验室要有足够的空间来摆放物品,避免拥挤和混乱,工作区和生活区应分开,应当有存放外衣和私人物品的专门区域,食品、饮料等实验无关用品禁止带入实验室内;每个实验室的出口处都应安装洗手池,并配备肥皂、毛巾等清洁用品;实验室应配备相应的消毒设施设备,如用于高压蒸汽灭菌的高压灭菌锅、用于空气灭菌的紫外线灯或臭氧发生器、用于干热灭菌的烤箱等。为了预防紧急事件的发生,实验室还应设有洗眼器等应急设施,并制定应急预案措施。

根据教学内容的不同,病原生物学实验室主要分为医学微生物学实验室和医学寄生虫学实验室,分别用于医学微生物学和人体寄生虫学的实验教学。其中医学微生物学实验室根据操作对象的不同可分为细菌实验室、真菌实验室和病毒实验室。根据用途不同,病原生物学实验室又可分为无菌操作间、消毒灭菌间、培养基室(无菌用品准备间)等。无菌操作间主要进行病原生物的无菌操作,消毒灭菌间主要用于污染用品、用具的高压蒸汽灭菌,培养基室主要用于制备各种无菌培养基和无菌用品。在医学实验教学中由于学生人数众多,实验用品消耗大、品种多,所用培养基等都需大量制备,所以教学实验室和教学准备室通常需分开设置。下面介绍几类常用的病原生物学实验室的相关仪器设备。

细菌实验室主要进行细菌、衣原体、立克次体、螺旋体等原核细胞型微生物的相关实验,如细菌等的接种移植、培养、形态观察、生化试验、血清学试验及动物实验等,实验室的配置要能满足这些实验的开展。该类实验室的空间消毒主要采用紫外线灯照射,要求每次实验前照射 30 分钟以上。在必要的时候也可采用熏蒸(如甲醛熏蒸、乳酸熏蒸、硫黄熏蒸等)或 5% 的石炭酸喷雾等手段进行消毒。进行细菌的接种移植,应配置有接种环、接种针、酒精灯等;进行细菌的培养,需配置温度可调的隔水式恒温培养箱;学生实验对操作物的保存要求不高,主要采用普通冰箱在 4℃ 进行培养物的保存;进行细菌的形态学观察,需配备普通光学显微镜、镜油瓶、染料(如革兰染料、抗酸染料、乳酸酚-棉兰染料等)等。此外,实验室还应配备有离心机、水浴锅、微波炉等常用设备,以及用于回收实验室污染用品(如玻璃刻度吸管