

粪便处理微生物监测技术讲习班

讲 稿

(上)

中央爱国卫生运动委员会
中华人民共和国卫生部 联合举办
世 界 卫 生 组 织

一九八四年十一月

中 国 · 北 京

前 言

急性肠道感染几乎在所有发展中国家都是儿童发病和死亡的一个重大原因。大约10年前急性腹泻能查到病原的只约有15~20%。这种状态在今天已有所改观。有适当装备的实验室已能对80%左右收治的急性腹泻病人作出病原学诊断。病原的肯定有助于更有力的监测和早期识别流行或非常传染。从而得以采取专门的预防措施。同时，虽不要求每个病人都做粪便培养，有时也会促使病人注意。期望通过此手册增加实验室对主要肠道传染病病原因子的分离和鉴定能力，从而对这些病的控制和研究能力有一个更有力的支持。

为使本手册有利于边远地区装备不多的实验室，也能有利于进行咨询和研究工作装备良好的实验室。本手册的重点放在相对简单和可靠的操作方法。有些试验提出了不止一个方法，使实验室有选择最适当最符合目的的方法的余地。

诚然，许多实验室不总是能买得到脱水培养基或鉴定系统，所以提出用大多数实验室都能得到试剂能够制作出来的代用培养基。在某些条件下，开始时代用培养基得不到最佳结果，但可以认为这种情况可随充分的质量控制，如手册中所记载的那样，会有所改善。

1. 原 粪 便 检 验

1.1 标本的采集

粪便标本应在病之早期采集。此时病菌通常于粪便中数量很高。并且应尽量在用抗菌素之前采取。理论上直接采取粪便比用直肠拭子为好。但实际上有时必须采取直肠拭子。如在下述情况：希望立即取到粪便标本或用粪便标本转送有问题时：粪便标本转送到实验室有可能耽误时。对于有些侵犯低位肠粘膜之细菌（如志贺氏菌），用直肠拭子小心采取标本较好因为直接拭子是通过擦肠粘膜的方法采样的。直肠拭子采取标本必须专心致志。这一点十分重要。

1.1.1 粪便及大便拭子之收集

——收集粪便可用一个清洁而适当大小的容器。它有一个能盖得紧并能防漏泄之盖。

——使用前用沸水洗烫或高压消毒。

——当收集的粪便取回实验室后。要尽快地处理完毕不得超过收集后 2 小时。

——处理前如一定要保存 2 小时以上。则要用棉拭子插入粪便

转动一下〔大便拭子〕取少量种入转送培养基〔1.3节〕中。若有粘液及脱落上皮，则须把这些材料种入转送培养基之中。

1.1.2 直肠拭子的收集

——棉拭子：如在当地制作，必须保证棉花紧紧地缠绕于棉棍上。

——用无抑菌作用的液体或转送培养基（切忌用润滑剂）湿润棉拭后，通过肛门括约肌，旋转一下然后取出。看看有否粪便。拭子数视调查之类型而定。如此取得之拭子标本亦可用于原虫的显微镜检查，但以新鲜粪便为宜。

——若在2小时内就能处理，则将拭子放入有棉塞或螺帽的无菌试管，如果保存2小时以上则须接种转送培养基〔1.3节〕。

1.1.3 用于轮状病毒监测之粪便

——取大约一克粪便（粪便或棉拭，以粪便为佳）悬浮于9ml PBS〔11.2节〕中制成约10%之悬液。最好以2000g 15分离心去除悬浮物质和细菌。上清放置于-20℃保存（若无-20℃则在4℃）。

1.2 显微镜检查：

1.2.1 粪便中的白血球

——将粪便标本或棉拭及其可能伴有之小块脱落粘膜制成稀悬液。加入2滴美蓝染液。置于清洁之玻片上充分混合之(11.2节)

——放上盖片。2—3分钟后待白血球被充分染色后即作镜检。

——要注意那些清晰鉴别出细胞是单核还是多形核的细胞要区分白细胞及上皮细胞。而退变已不能辨认者不计。在志贺氏感染病例其粪便白血球很多(强倍镜下每视野30个以上)。而沙门氏菌感染伤寒及侵袭性大肠杆菌患者粪便中存在白血球较少。此类病人之粪便液渗出液主要为多形核细胞。而伤寒时则为单核细胞。而霍乱或大肠杆菌(ETEC)患者。粪便中很少有白血球(每强倍镜视野下不超过2~5个)。白血球较少而又微稠痰的渗出液。如检查一下新鲜大便标本(20分内)还可能发现是弯曲杆菌病。

1.2.2 寄生虫

作寄生虫检查。最好将新鲜粪便标本(不超过1小时最好)直接制成湿片镜检。尽可能使用带脓血部分。

——在玻片之一端滴一滴生理盐水及另一端滴一滴碘液(11.2节)。

——用小棍或牙签挑取微小一部分粪便(2毫克)用生理盐水制成悬液。再取用另一部分制成碘悬液。避免含大颗粒。使易于复盖盖片。并放入足量的液体。避免产生气泡。另一方面液体不要

太多。以防盖片在粪便悬液上漂浮。

——用等量石蜡及凡士林溶化的混合物封住标本以免干燥。这样利于重复或作后来检查。如此制片至少可保持2—3天。

——先检查用生理盐水制作或未染色标本。* 因为其中蛔虫卵及幼虫很易于鉴定。原虫包囊及滋养体亦易于检出。摄入的红血球及活动滋养体如果标本新鲜亦能见到。

——检查完了盐水标本之后。应对碘液制备之标本作原虫包囊检查。碘能对包囊之核着色。而很易鉴定。

——用低倍(10x)检查虫卵。幼虫。包囊及滋养体。用高倍(40x)鉴别种属。作低倍检查需降低光之亮度。因为大部分虫体在强光下会被看脱。调节光之亮度。使大便中细胞成份易于辨认。

——若在盐水标本中见到或怀疑有阿米巴滋养体。则用缓冲美蓝染色进一步鉴定其核的结构。在玻片上置一滴缓冲美蓝(BMB)(11.2%)然后按上述盐水及碘液标本制法制作。10分后。使滋养体充分染色。BMB染色若染色30'则易过染。所以应在做好后10~30分之内作检查。盐水标本中见不到核结构。此时在染液中应见到清晰之核结构。MIF(methiolate-Iodine 福尔马林)溶液亦可用作原虫包囊及滋养体之染色。其法为:

——以标准医用滴管在玻片上滴一滴蒸馏水。

——加一滴MIF染液。

——把一点粪便样品放在此混合物中混匀。

——用盖玻片涂片，盖封，然后镜检。此标本可在数小时后镜检。其着色或微细结构不变。

为将含原虫的粪便标本固定，保存和转送以便进一步检查，使用10%中性福尔马林或MIF液。

1.8 保存及转送培养基：

需妥放入转送培养基中的拭子数是根据试验中待查的致病病原数量而定。一般说，至少放入二支棉拭。不能在采集后2小时内培养的标本应放入转送培养基中放入转送培养基中之致病病原之存活时间如未放入冰箱保存则比放在室温为长。特别是志贺氏菌及空肠弯曲杆菌这尤为关键。除了这两种菌以外的大多数致病病原，都能在室温中存活一个短时间。但当拭子放入转送培养基中若需要保存较长时间，则需尽早放入冰箱。对绝大多数致病菌而言，放置一个星期或更多时间（即使放入冰箱中的标本或者标本有能查觉出来的干燥都是不合适的。

1.8.1 转送培养基

Cary~Blair 转送培养基，有助于沙门氏、大肠、志贺、弧菌、弯曲杆菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌之保存及运送。此培养基十

分稳定。密封容器中可长期保存。其他运送培养基能与之比美的当推Amies及Stuart的运送培养基。缓冲甘油盐水对转送沙门氏、志贺及大肠菌很有价值，但不适合于弧菌及弯曲杆菌。碱性蛋白水对转送各种弧菌（见1.4.8）亦很优越。

Cary-Blair培养基之制备方法见11.1节；分发此培养基要给予特殊注意。

Cary-Blair之接种方法：

插入2或更多支无菌棉拭或直拭子直至培养基底部。

折去拭子杆与手指接触的部分。

盖紧盖子。

冷藏 若不能冷藏，最好放在28℃而不放在35℃。

1.3.2 运 送

仔细包扎运送管，并放置在一个适当的双层容器中，以免运输过程中破碎。若用邮寄则须按国际邮政规定办理，在套盒中包好，内层必须防震，外层必须抗撞击。每个标本必须附带病人有关资料。

1.4 初代分离培养基的接种：*

标本到达实验室后即须立即接种平板；若不可能，必须在4℃

* 此处所述各种培养基的制备，请阅读11.1节。

中保存。对于志贺氏菌和弯曲杆菌之分离采取即刻接种方法极有帮助。有几种不同选择性的很好培养基能使某些肠道病菌生长而抑制革蓝氏阳性细菌和某些革蓝氏阴性细菌的生长。在这些培养基上亦可根据菌落之形态对细菌种属作初步鉴别(表1)。有高度选择性的培养基必须种比较多之粪便。而选择能力较低之培养基,则接种量应较少。在许多实验室将平板直接用直肠拭子或粪便拭子接种。其接种量之多少视培养基之不同而须小心地加以区别。但最好是把一个标本接种至少三个平板。或将粪便制成盐水悬液再用接种环接种平板,都是很好的方法。这样做亦有助于避免将大量有机物冲入平板而妨碍菌落出现。

1.4.1 粪便悬液的制备

——用新鲜或放置在Oary — Blair培养基中的直肠拭子或粪便拭子放在盛有无菌生理盐水之试管中制作悬液。每一拭子用1 ml生理盐水。在盐水中充分洗涤拭子,沿管壁转动并挤压,使拭子中的液体充分压出。

——部分固体粪便也要在生理盐水中悬浮使悬液混浊。液体粪便不需再加盐水。

1.4.2 琼脂平板的直接接种

高度选择性培养基的接种要用大量(3接种环)。而选择性较低之培养基接种要用少量(1接种环)。接种须用划线法。使用一种环形金属线。以能形成大量单个菌落的方法划线。图1为许多实验室常用的方法。在每一半划线之间不烧接种环。高选择性之培养基。需更多的划线交叉。除非另有说明。接种后一般置35—37℃培养。

每一批新培养基。必须在常规使用前作质量控制。即用已知参考菌株作生长及菌落特性之测验。

——为了分离志贺、沙门氏、大肠及耶尔森氏菌通常用选择性较小的平板接种。麦康凯琼脂一般少量接种。35—37℃培养18—24小时。分离耶尔森菌时则在35—37℃一天后。移置入室温(22—29℃)至少一天。因为此菌在选择培养基上30℃或以上之温度生长不良。室温超过30℃时要把孵箱温度控制在30℃以下是不可能的。则可35—37℃中多培养24小时。而且仔细地检查平板象对待肠球菌那样的小菌落。

——分离志贺及沙门氏菌要接种一种中等或高度选择性培养基。推荐用XLD琼脂也可用去氧胆盐枸橼酸琼脂(DCA)或SS琼脂。接种量要适中。即用2—3环粪便悬液。在35—37℃

中培养18—24小时。

SS琼脂对痢疾及宋内菌之培养并不理想。但可能如果放在室温如上述麦康凯琼脂时那样可做为分离耶尔森菌之用。

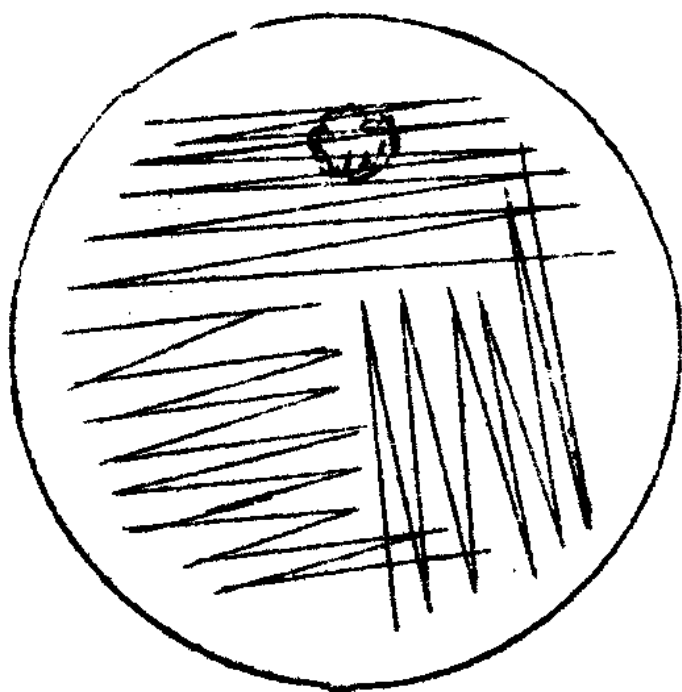


图1. 为分离肠道细菌
在平板培养基上划线的方法

表1 選擇性与鉴别性平板培养基及菌落形态

培养基	培养基名称	XLD培养基	生长培养基		BB培养基	显绿培养基	TGB	TIG
			何氏培养基	显绿培养基				
选择培养基	无血清 元色 2—3mm	红色 无血清 1—2mm	无血清 半透明 2—3mm	—	无血清 半透明 1—2mm	—	—	—
鉴别培养基	同上	红色 无血清 1—2mm	红色上有 黑色点 面绿	中心 边缘半透明。 边缘周围有黑环 有金属光泽(48小时)	无血清 半透明 1—2mm	粉红色 不透明 1—2mm	—	—
鉴别培养基	同上	红色 无血清	0.5—1mm 无血清 有黑点	边缘呈黑色。 边缘有金属光泽 (48小时)	无血清 半透明 1—2mm	—	—	—
鉴别培养基	红色 1—2mm	小透明 无血清	透明 中心透明 面绿 1—2mm	—	小透明 粉红色 1—2mm	—	—	—
小透明培养基	无血清 1—2mm	—	—	—	无血清 半透明 (48小时)	—	—	—
无血清培养基	无血清 半透明	—	—	—	—	—	无血清 有光点 2—3mm	无血清。1—2mm 周围有不透明环
无血清培养基	同上	—	—	—	—	—	无血清 2—3mm	无血清。1mm 边缘有不透明环

——分离沙门氏伤寒【对其他沙门氏亦同样有效】可接种亚硫酸铋琼脂。接种之量须大。并培养48小时。

——用TCBS分离各种弧菌（霍乱及付溶血性弧菌）；亚碲酸牛磺胆酸（tellurite taurocholate）明胶（TTG）琼脂是另一个好选择培养基。对于霍乱病例，其大便中弧菌极多。简单而又便宜的碱性营养琼脂也可以用。许多实验室改进了这种培养基。加入了0.5%牛磺胆酸钠或胆酸盐（胆盐琼脂）并取得极好效果。TCBS及TTG之接种量可大。而其它培养基的接种量要少。一般培养18—24小时。

接种弯曲杆菌琼脂。它是一种选择培养基专门为分离空肠弯曲杆菌和结肠弯曲杆菌而设计的。通常应用的有二种：Butzler氏琼脂及Campy—BAP。要大量接种，42℃培养于烛罐之中或在5—10% O₂及5—10% CO₂之大气中培养。烛罐培养时切勿放置平板多过。过多会影响罐内体自由流通。使氧不易在烛熄之后充分减少。二天后观察结果。若无42℃菌落则培养于37℃。但嗜热性弯曲杆菌在此温度生长较慢（三天后观察）。与其共生菌抑制较少。每日观察共3天。

接种程序归纳如图2

图2. 非假膜菌分离的接种流程

沙门氏菌、志贺氏菌、大肠埃希氏菌、及小肠结肠炎耶尔森氏菌

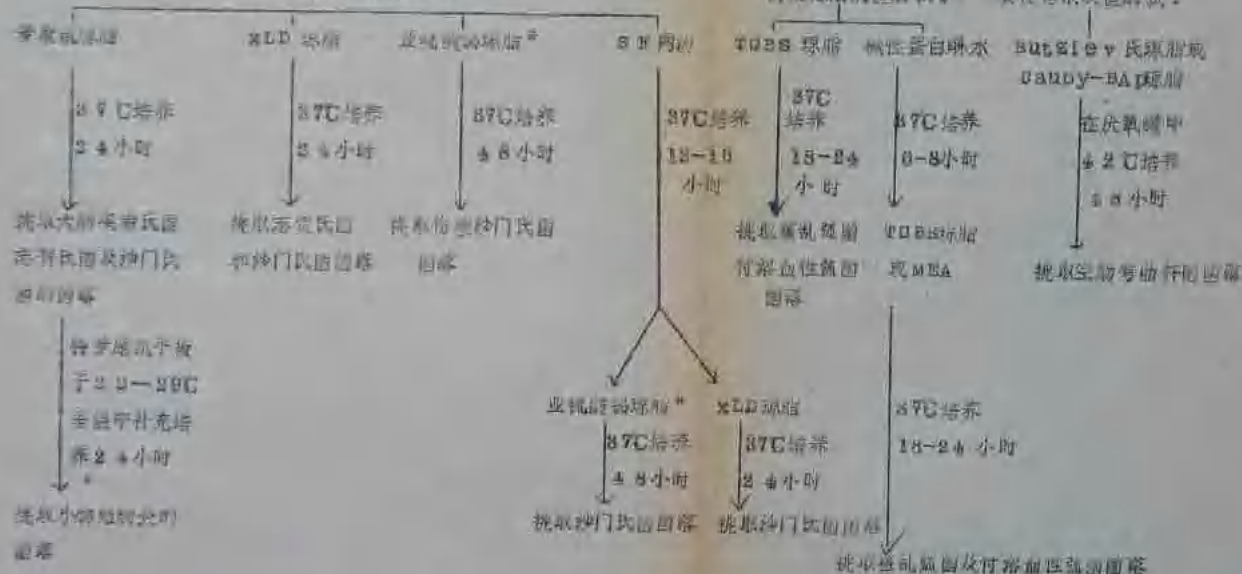
非假膜菌或假膜拭子

鼠菌

动物弯曲杆菌

非假膜菌或直链拭子

非假膜菌或直链拭子



* 此琼脂用于沙门氏菌的分离。有些假膜菌与气单胞菌可在此培养基上生长，产生粉红色菌落。

1.4.3 增菌培养基的接种

——供分离沙门氏菌的亚硫酸盐肉汤(SP)：对急性期及恢复期患者的粪便均可用亚硫酸盐肉汤增菌分离沙门氏菌属。大剂量接种，接种三接种环粪便悬液或一只直肠拭子。培养18小时。传代时用上节所述一环肉汤在琼脂平板上划线的方法。用两种琼脂。亚硫酸盐琼脂及XLD琼脂。对沙门氏菌有高度选择性的一种最好的代用平板是煌绿琼脂。但沙门氏伤寒在此培养基上生长不良。培养24小时。若用亚硫酸盐则培养48小时。

——碱性蛋白胨水(APW)用于分离弧菌：对恢复期病人及带菌者用液体增菌分离。但对急性患者并非必需。从粪便取2或3环接种或一只直肠拭子。培养6~8小时。从液面取一环转种至平板培养基。如1.4.2中所介绍方法。用APW培养基切勿超过8小时。弧菌在此培养基上生长很快。在6~8小时它比非弧菌的数目更多。而超过8小时。其他微生物的生长会超过弧菌。因此在这种情况下*应取2~3环转种入新鲜APW培养基中。培养6~8小时再作平板接种。

——小肠结肠炎耶尔森氏菌的PBS或盐水增菌选择分离液：对常见的致病性O:3及O:9型血清型耶尔森氏菌。不需要增菌。

*此培养基也可供作转送培养基

菌。但对其他血清型则需要。但冷增菌须2或3周。因此不能及时报告。对治疗病人不利。但对公共卫生工作有价值。接种量为3环。将培养物保存在冰箱（4~5℃）2~3周。用接种环划线传代。最好用 MACConkey 及SS琼脂两种培养基。22~29℃培养。

目 录

前 言	0 - 1
1. 原类假检验	0 - 2
1.1 标本的采集	0 - 2
1.2 显微镜检查	0 - 3
1.3 保存及运送培养基	0 - 6
1.4 原代分离培养基的接种	0 - 7
2. 分离物的鉴定	0 - 16
2.1 沙门氏菌、志贺氏菌、弧菌及大肠杆菌 的生化试验	0 - 17
2.2 是否为沙门氏、志贺氏、弧菌培养物生 长时血清学试验	0 - 20
2.3 小肠结肠炎耶尔森氏菌的鉴定	0 - 31
2.4 弯曲菌的鉴定	0 - 32
3. 肠道致病菌的血培养	1
4. 抗生素的敏感性试验	3
5. 食物传播细菌性疾病的调查研究	13
5.1 标本的采集和运送	13
5.2 沙门氏菌	14
5.3 葡萄球菌食物中毒	15
5.4 梭状芽胞杆菌、产气荚膜杆菌食物中毒	18
5.5 腊样芽胞杆菌食物中毒	21
6. 大肠杆菌血清型的特异性试验	25