



病原生物学与免疫学

实 验 指 导

主编 曾令娥



西安交通大学出版社
XI'AN JIAOTONG UNIVERSITY PRESS

病原生物学与免疫学

实验指导

主编 曾令娥
副主编 潘凤兰 魏秋芬
编者 (以姓氏拼音为序)
陈晓芹 关翔宇
孔军伶 谢芳



西安交通大学出版社
XI'AN JIAOTONG UNIVERSITY PRESS

图书在版编目(CIP)数据

病原生物学与免疫学实验指导/曾令娥主编. —西安:
西安交通大学出版社, 2014. 6

ISBN 978-7-5605-6132-5

I. ①病… II. ①曾… III. ①病原微生物-实验-医
学院校-教学参考资料②免疫学-实验-医学院校-教学
参考资料 IV. ①R37-33②R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 080251 号

书 名 病原生物学与免疫学实验指导
主 编 曾令娥
责任编辑 王华丽 杜玄静

出版发行 西安交通大学出版社
(西安市兴庆南路 10 号 邮政编码 710049)

网 址 <http://www.xjtpress.com>

电 话 (029)82668357 82667874(发行中心)
(029)82668315 82669096(总编办)

传 真 (029)82668280

印 刷 陕西新世纪印刷厂

开 本 787mm×1092mm 1/16 印张 6 字数 139 千字

版次印次 2014 年 6 月第 1 版 2014 年 6 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-5605-6132-5/R·446

定 价 12.80 元

读者购书、书店添货、如发现印装质量问题,请与本社发行中心联系、调换。

订购热线:(029)82665248 (029)82665249

投稿热线:(029)82668803 (029)82668804

读者信箱:xjtmpress@163.com

版权所有 侵权必究

本书是根据高等学校临床医学专业本科和高职高专医学生培养要求,并结合本学院教学需求和发展来编写的病原生物学与免疫学实验教材,适用于本学院临床医学专业五年制本科和三年制专科学生,其他相关专业也可选择使用。

本学院主要培养农村基层卫生人才,坚持“服务基层、服务社区、服务农村”的宗旨。在此思想指导下,补充基础理论和技能以“必需、够用”为原则,选取可以满足学生未来职业所需的临床病原生物与免疫学常规鉴定最基础、最常用的技术与实验,并对病原生物实验室安全知识进行了介绍。

全书分为医学微生物学、医学免疫学、人体寄生虫学三大实验部分,共 28 个实验项目,其中医学微生物学部分包括病原微生物形态学检查、微生物分布与环境影响因素检测、细菌培养与鉴定、病毒及其他微生物观察、临床标本的病原学鉴定等项目;医学免疫学部分包括常见感染性疾病及健康体检常用的免疫检测技术,如玻片凝集技术、酶联免疫吸附试验、HCG 检测等;人体寄生虫学部分主要介绍了病原学检测中蠕虫的形态学鉴定及原虫的形态学鉴定等。附录部分包括常用染色液与染色方法、常见微生物形态彩图、常见人体寄生虫虫卵及医学原虫彩图,供学生学习参考。

本书的编写过程中,编者借鉴了前辈老师的教学经验,并得到了学院领导的大力支持,在此一并表示感谢。因水平有限,书中难免有纰漏之处,恳请各位老师和学生在使用过程中提出宝贵意见,以便我们进一步修改和完善。

曾令娥

2014 年 3 月

第一篇 医学微生物学实验	37
实验一 抗原反应	(37)
实验二 凝集反应	(41)
实验三 人绒毛膜促性腺激素(HCG)检测技术	(46)
实验四 酶联免疫吸附试验(ELISA)	(49)
实验五 体外抗体形成细胞检测——豚鼠实验	(50)
第二篇 医学免疫学实验	53
实验一 抗原	(53)
实验二 抗体	(57)
实验三 免疫	(61)
实验四 免疫缺陷病	(64)
第三篇 人体寄生虫学实验	67
实验一 蠕虫	(67)
实验二 原虫	(71)
实验三 节肢动物	(75)
实验四 人体寄生虫病原学	(79)

实验课要求及实验室规则

CONTENTS

目录

病原生物学与免疫学实验的对象多为病原微生物,有一定的危险性,一旦发生意外,不仅影响实验效果,且有可能污染环境,甚至将病原体传播给他人。因此,在实验过程中,应遵守下列规则,防止实验室污染。

实验课要求及实验室规则..... (1)

第一篇 医学微生物学实验..... (2)

- 实验一 显微镜油镜的使用..... (2)
- 实验二 细菌的形态与结构的观察..... (4)
- 实验三 细菌标本的染色检查..... (6)
- 实验四 细菌标本的不染色检查..... (8)
- 实验五 细菌的接种与培养..... (9)
- 实验六 细菌分布的检查与外界因素对细菌的影响..... (12)
- 实验七 细菌的药物敏感实验..... (15)
- 实验八 细菌的生化反应..... (20)
- 实验九 病原性球菌的分离鉴定..... (23)
- 实验十 肠道杆菌的分离鉴定..... (27)
- 实验十一 病毒及其他微生物的鉴定..... (29)
- 实验十二 综合实验:人体咽部病原性球菌检查..... (33)
- 实验十三 综合实验:人粪便标本中肠道致病菌的分离鉴定..... (35)

第二篇 医学免疫学实验..... (37)

- 实验一 沉淀反应..... (37)
- 实验二 凝集反应..... (41)
- 实验三 人绒毛膜促性腺激素(HCG)检测技术..... (46)
- 实验四 酶联免疫吸附试验(ELISA)..... (48)
- 实验五 体外抗体形成细胞检测——溶血空斑实验..... (50)

第三篇 人体寄生虫学实验..... (53)

- 实验一 线虫..... (53)
- 实验二 吸虫..... (57)
- 实验三 绦虫..... (61)
- 实验四 根足虫纲原虫..... (64)

实验五	鞭毛虫纲原虫	(66)
实验六	孢子虫纲原虫	(68)
实验七	医学节肢动物	(70)
实验八	粪便标本人体寄生虫鉴定技术	(73)
实验九	血液标本人体寄生虫鉴定技术	(78)
实验十	其他分泌物标本的人体寄生虫鉴定技术	(80)

参考文献	(83)
------------	------

附录一	常用染色方法及染色试剂的配制	(84)
-----	----------------------	------

附录二	常见微生物形态彩图	(89)
-----	-----------------	------

附录三	常见寄生虫虫卵及医学原虫彩图	(90)
-----	----------------------	------

(1)	第一卷
(2)	第二卷
(3)	第三卷
(4)	第四卷
(5)	第五卷
(6)	第六卷
(7)	第七卷
(8)	第八卷
(9)	第九卷
(10)	第十卷
(11)	第十一卷
(12)	第十二卷
(13)	第十三卷
(14)	第十四卷
(15)	第十五卷
(16)	第十六卷
(17)	第十七卷
(18)	第十八卷
(19)	第十九卷
(20)	第二十卷
(21)	第二十一卷
(22)	第二十二卷
(23)	第二十三卷
(24)	第二十四卷
(25)	第二十五卷
(26)	第二十六卷
(27)	第二十七卷
(28)	第二十八卷
(29)	第二十九卷
(30)	第三十卷
(31)	第三十一卷
(32)	第三十二卷
(33)	第三十三卷
(34)	第三十四卷
(35)	第三十五卷
(36)	第三十六卷
(37)	第三十七卷
(38)	第三十八卷
(39)	第三十九卷
(40)	第四十卷
(41)	第四十一卷
(42)	第四十二卷
(43)	第四十三卷
(44)	第四十四卷
(45)	第四十五卷
(46)	第四十六卷
(47)	第四十七卷
(48)	第四十八卷
(49)	第四十九卷
(50)	第五十卷
(51)	第五十一卷
(52)	第五十二卷
(53)	第五十三卷
(54)	第五十四卷
(55)	第五十五卷
(56)	第五十六卷
(57)	第五十七卷
(58)	第五十八卷
(59)	第五十九卷
(60)	第六十卷
(61)	第六十一卷
(62)	第六十二卷
(63)	第六十三卷
(64)	第六十四卷
(65)	第六十五卷
(66)	第六十六卷
(67)	第六十七卷
(68)	第六十八卷
(69)	第六十九卷
(70)	第七十卷
(71)	第七十一卷
(72)	第七十二卷
(73)	第七十三卷
(74)	第七十四卷
(75)	第七十五卷
(76)	第七十六卷
(77)	第七十七卷
(78)	第七十八卷
(79)	第七十九卷
(80)	第八十卷
(81)	第八十一卷
(82)	第八十二卷
(83)	第八十三卷
(84)	第八十四卷
(85)	第八十五卷
(86)	第八十六卷
(87)	第八十七卷
(88)	第八十八卷
(89)	第八十九卷
(90)	第九十卷

实验课要求及实验室规则

病原生物学与免疫学实验的对象多为病原微生物,有一定的危险性,一旦发生意外,不仅可能招致自身感染,且有可能污染环境,甚至将病原生物传染给他人。因此,进入实验室必须遵守下列规则,防止实验室传染。

一、进入实验室须穿好工作服,除了必要的课本文具及实验记录本外,其他物品不得带入。带入实验室的物品须放在指定的位置。

二、在实验室内要保持安静,不得高声谈笑或随意走动,以免影响他人。

三、实验室内禁止吃喝、吸烟等与实验无关的行为。

四、遇有毒的试剂或有传染性的菌种或虫种破损或污染环境时,应及时报告老师进行处理,不得自行处理。

五、正确使用酒精灯。酒精灯不可相互直接点燃,添加酒精时要小心,避免烧伤自己或他人。

六、爱护实验器材,节约实验用品。实验器材损坏时,应及时报告老师进行登记。

七、认真、如实记录实验结果,对实验的结果能做出正确的分析,对实验中出现的问能做出合理的解释和处理。

八、实验结束时,清理实验台面。用过的带菌、带毒、带虫材料、实验动物等,应放入指定的消毒容器内或指定地点,不得随意丢弃或置于水槽内。需收回的物品按要求摆放到实验筐内。用清洁剂洗手后方可离开实验室。

九、值日生做好值日,打扫实验室卫生,填写实验记录册以及仪器使用记录册,用清洁剂洗手后离开实验室。离开前关好门、窗、水源及照明设备。

第一篇

医学微生物学实验

实验一 显微镜油镜的使用

用显微镜观察细菌标本时,需要使用显微镜油镜。显微镜油镜的使用是病原生物学与免疫学实验中必须掌握的基本技术。

【实验目的】

1. 掌握显微镜油镜的使用及维护的基本知识。
2. 了解、熟悉油镜的使用和使用原理。

【实验原理】

当光线从标本玻片经空气进入镜头时,由于介质密度不同,会发生折射现象,光线不能全部进入物镜中,物像显现不清。在使用高、低倍物镜时,透镜的孔径比较大,影响尚不显著;但用油镜头时,因透镜孔径小,进入镜筒的光线少,因而视野较暗,物体观察不清楚。如在透镜与玻片之间滴加折光率和玻璃折射率($n=1.52$)相近的香柏油($n=1.515$),则使进入油镜的光线增多,视野亮度增强,获得清晰的物像。近年来多用液体石蜡($n=1.48$)代替香柏油,可消除因在使用油镜过程中用二甲苯擦香柏油对人体的危害。

【实验材料】

1. 器材 普通光学显微镜(带油镜)、香柏油、二甲苯、擦镜纸。
2. 细菌基本形态标本片 葡萄球菌、链球菌、肺炎链球菌、脑膜炎奈瑟菌、大肠埃希菌、炭疽芽胞杆菌、痢疾志贺菌、霍乱弧菌的染色玻片标本。

【实验方法】

1. 显微镜油镜的识别

- (1)放大倍数是 $100\times$ 。
- (2)镜头下缘一般刻有一圈黑线或白线。
- (3)刻有“HI”“ $100\times$ ”“oil”或“油”等字样。

2. 油镜的使用

- (1)显微镜放置 使用油镜时须将显微镜直立于实验台上,勿将镜臂和载物台倾斜,以免

镜油流出或菌液流淌外溢,影响观察,造成污染。

(2)采光 接通电源,打开显微镜上的电源开关,内置光源灯亮,并可调节亮度。使用油镜检查染色标本时,光线宜强,可将光圈开大,集光器升至最高;检查未染色标本时,光线宜弱,可缩小光圈、降低集光器。若无内置光源,以天然光为光源时宜用反光镜的平面,采用人工灯光时宜用反光镜凹面。

(3)标本观察 标本置于载物台上,用弹簧夹固定,调至适当位置,并把待检标本移置物镜下。

先用低倍镜找出标本的范围,然后转换“40×”物镜头选取合适视野,接着顺时针转到八字状,在标本的待检部位加一滴镜油(液体石蜡),接着将油镜头正对油滴,轻缓旋转细调节器至清楚观察到物像为止。

如果油镜前端已离开镜油仍未观察到清晰的标本,则从镜筒侧方注视物镜,转动粗调节器,使油镜头浸没在镜油内,几乎与标本完全接触,然后从目镜中边观察边慢慢轻微顺时针转动细调节器,下调载物台,直到所观察物像完全清楚为止。

(4)观察完毕,转动粗调节器将载物台下降,取下标本片,用擦镜纸将油镜前端及标本片上的镜油擦干净。

(5)显微镜擦净后,降低物镜并将其转成八字形,集光器下降,反光器推平,光圈关上,归还显微镜室。

3. 光学显微镜的维护

(1)防潮 显微镜应放置在透风干燥,灰尘少,不受阳光直接曝晒的地方。不使用时,用有机玻璃或塑料布防尘罩罩起来。也可在套上布罩后放进显微镜箱内或显微镜柜内。

(2)防尘 显微镜观察室内应保持清洁,尽量避免尘土。目镜和物镜如有尘污应用擦镜纸擦净。

(3)防腐蚀 显微镜不要与挥发性药品及酸、碱类药品接触,以免受腐蚀。

(4)防热 显微镜不要放在日光下曝晒,也不可放在靠近火炉、电路或暖气片的地方。

【结果判定】

用显微镜油镜观察细菌标本片时,以物像清晰,可清楚观察细菌大小、形态、排列及其染色性为合格。

【注意事项】

1. 不能把高倍镜当作油镜使用。
2. 油镜使用完毕,立即用擦镜纸拭去镜油。
3. 内置光源显微镜在关闭电源开关前要先将亮度调至最暗。

(关翔宇)

【实验结果】

实验目的:掌握油镜的使用方法。

实验器材:显微镜、擦镜纸、擦镜油、载玻片、盖玻片、细菌标本片。

实验二 细菌的形态与结构的观察

【实验目的】

观察并识别细菌的基本形态和特殊结构。

【实验原理】

细菌有三种基本形态,即球状、杆状和螺旋状,采用适当染色法在油镜下即可观察到。某些细菌还有荚膜、芽胞、鞭毛和菌毛等特殊结构,前三种特殊结构经特殊染色法染色后在油镜下就能观察到,而菌毛则需在电子显微镜下观察。

【实验材料】

1. 细菌基本形态(染色标本片) 球菌(葡萄球菌、链球菌、肺炎链球菌、脑膜炎奈瑟菌)、杆菌(大肠埃希菌、痢疾杆菌、伤寒杆菌等肠道杆菌和炭疽芽胞杆菌)和弧菌(霍乱弧菌)。
2. 细菌特殊结构(染色标本片) 荚膜(肺炎链球菌和产气荚膜梭菌)、芽胞(破伤风梭菌)和鞭毛(伤寒沙门菌和铜绿假单胞菌)。
3. 器材 普通光学显微镜、擦镜纸、二甲苯等。

【实验方法】

1. 细菌基本形态染色标本片的观察

使用油镜观察细菌的基本形态,比较不同细菌的形态、大小、排列和染色等特点。遵循从低倍到高倍的原则逐渐调换物镜头并选择合适的视野,在40倍物镜头下观察到细菌后,顺时针把物镜头转到八字状,在盖玻片上滴一滴液体石蜡,旋转对准油镜头,调节微调进行观察。

(1) 球菌染色标本片的观察 葡萄球菌、链球菌、肺炎链球菌、脑膜炎奈瑟菌。

(2) 杆菌染色标本片的观察 大肠埃希菌、痢疾杆菌、伤寒杆菌等肠道杆菌和炭疽芽胞杆菌。

(3) 弧菌染色标本片的观察 霍乱弧菌。

2. 细菌特殊结构染色片的观察

观察细菌特殊结构,注意细菌特殊结构的形态、大小、位置等特点。

(1) 荚膜染色标本片的观察 肺炎链球菌和产气荚膜梭菌。

(2) 芽胞染色标本片的观察 破伤风梭菌。

(3) 鞭毛染色标本片的观察 伤寒沙门菌和铜绿假单胞菌。

3. 将观察到的结果绘图,并用文字加以适当的描述。

【结果判定】

1. 细菌基本形态染色标本片的观察

(1) 球菌的形态特征 葡萄球菌菌体呈球形,革兰阳性,紫色,葡萄串状排列;链球菌菌菌

实验三 细菌标本的染色检查

【实验目的】

1. 了解革兰染色的原理及染色结果的诊断和临床意义。
2. 掌握并熟悉革兰染色的操作方法。

【实验原理】

1. 革兰染色法

革兰染色的原理在于两类细菌细胞壁的成分与结构的不同。革兰阴性菌细胞壁中含有较多的类脂质，而肽聚糖含量较少，当用酒精脱色时，类脂质溶解，细胞通透性增加，使结晶紫和碘的复合物易于渗出，经复染后，染上复染液的颜色。而革兰阳性菌细胞壁中肽聚糖含量多且交联度大，类脂质含量少，经酒精脱色后，肽聚糖层的孔径变小，通透性降低，不易脱去紫色，复染后细菌细胞仍保留结晶紫的颜色。

革兰染色的意义：①鉴别细菌，即通过革兰染色可将所有细菌分为革兰阳性菌和革兰阴性菌两大类，因而可初步识别细菌，缩小范围，有助于进一步鉴别细菌；②为临床选择抗生素治疗提供参考；革兰阳性菌与阴性菌在细胞壁等结构上有很大差别，对抗生素等药物的敏感性不同，临床上可根据病原菌的革兰染色性，考虑选择有效的药物及时治疗；③判定致病性，大多数革兰阴性菌的致病物质多为内毒素，而革兰阳性菌大多能产生外毒素，两者致病机制不同，可采取有针对性的方案进行治疗。

2. 抗酸染色法（见本篇实验十一）

【实验材料】

1. 菌种 葡萄球菌和大肠埃希菌 18~24h 培养物。
2. 试剂 革兰染液、抗酸染液、生理盐水。
3. 器材 普通光学显微镜、酒精灯、接种环、试管、载玻片、吸管、吸水纸、擦镜纸、火柴、消毒缸等。

【实验方法】

1. 涂片制备

(1)涂片 在洁净无油的载玻片上滴加一滴生理盐水。接种环过火灭菌，待冷后挑取少量细菌与水滴充分混匀。接种环再次过火灭菌后插入试管架。注意涂片时，生理盐水不宜过多，涂片面积以 1cm^2 为宜。如果生理盐水太多，可先用吸水纸吸去再进行涂片。

(2)干燥 涂片最好在室温下自然干燥，或将涂片置于火焰高处微热烘干，但不得直接在火焰上烘烤，以免将菌膜烤焦，细菌变形，难以观察。

(3)固定 手执玻片一端，有菌膜的一面向上，迅速通过酒精灯火焰外焰 3 次（用手指触涂片反面，以不烫手为宜）。

2. 革兰染色

- (1)初染 滴加结晶紫染液,以覆盖菌膜为度。染 1min,缓慢水流冲洗掉多余的染液。
- (2)媒染 滴加卢戈氏碘液,染 1min,缓慢水流冲洗掉多余的染液。
- (3)脱色 滴加 95%酒精,轻轻摇动玻片,直至流下的液体无色为止(约需 20~30 秒钟),缓慢水流冲洗掉多余的染液。
- (4)复染 滴加石炭酸复红稀释液染 1min,缓慢水流冲洗掉多余的染液。
用吸水纸吸干玻片表面的水分,待标本充分干燥后进行镜检。

【结果判定】

镜下观察葡萄球菌菌体为球形,呈葡萄串状排列,染成紫色,为革兰阳性;大肠埃希菌菌体为短杆状,排列不规则,染成红色,为革兰阴性。

【注意事项】

1. 选择适龄细菌培养物,以 18~24h 为宜,否则细菌生长进入衰退期影响染色结果。
2. 涂片应薄而均匀,在火焰上干燥和固定时,勿将菌膜烤焦。
3. 染色过程中,不可使染液干涸。
4. 严格掌握染色时间,尤其酒精脱色时间,不宜过长或过短。
5. 染色过程中冲洗时水流要小,不要正对着菌膜。染色完毕用吸水纸吸干时不要用力压玻片,也不要擦菌膜。
6. 观察完毕,记录结果,擦干油镜镜头,将玻片投放进消毒缸内。

(关翔宇)

【宝峰果甜】

【页零感去】

实验四 细菌标本的不染色检查

【实验目的】

掌握不染色细菌标本的检查方法。

【实验原理】

不染色细菌标本检查是指细菌不经染色直接镜检,主要用于观察细菌的动力和运动状况,且能避免由于某些染色操作而引起的细菌变形。

【实验材料】

1. 菌种 葡萄球菌、变形杆菌(或大肠杆菌)12h 肉汤培养物。
2. 器材 普通光学显微镜、载玻片、凹玻片、盖玻片、接种环、凡士林、小镊子、牙签等。

【实验方法】

1. 压滴法

(1)取载玻片两张,以无菌接种环分别取葡萄球菌及变形杆菌菌液 2~3 环,置于载玻片中央。

(2)用小镊子挟一盖玻片,先使盖玻片一端接触菌液,然后缓慢放下,覆盖于菌滴之上,避免菌液中产生气泡。

(3)先用低倍镜找到观察部位,再换用高倍镜观察细菌的运动。镜检时光线宜稍弱,可将光圈适当缩小,集光器适当下降。

2. 悬滴法

(1)取洁净凹玻片两张,在凹窝四周涂抹少许凡士林。

(2)用接种环分别取一环葡萄球菌或变形杆菌肉汤培养物于盖玻片中央。

(3)将凹玻片倒合于盖玻片上,使凹窝中央正对菌液,然后迅速翻转凹玻片,用小镊子轻压盖玻片,使之与凹窝边缘粘紧封闭,以防水分蒸发。

(4)放置悬滴标本片于光学显微镜的载物台上,先用低倍镜找到悬滴,再用高倍镜进行观察。

【结果判定】

镜下所见,变形杆菌运动活跃,葡萄球菌只停留在原位置上作分子颤动。

【注意事项】

1. 用显微镜观察细菌的不染色标本时应将聚光器下降,光圈缩小,使视野光线较暗。
2. 操作中要严格遵守无菌操作的原则。观察完毕,将玻片投放消毒缸内。

(关翔宇)

实验五 细菌的接种与培养

【实验目的】

1. 掌握细菌分离培养及纯培养的方法及无菌操作要领。
2. 观察细菌在不同培养基中的生长现象。

【实验原理】

接种细菌,是用接种环(针)沾取细菌或标本,通过划线、涂抹等方法,将细菌接种到合适的培养基上,并在一定条件下使细菌得以生长繁殖。接种的基本程序有:接种环(针)灭菌→侯冷→沾取细菌或标本→进行接种→环灭菌等五个程序。

【实验材料】

1. 菌种 葡萄球菌和大肠埃希菌 18~24h 固体平板和斜面培养物。
2. 培养基 普通琼脂平板、斜面培养基、半固体培养基和血清肉汤培养基。
3. 其他 酒精灯、接种针或接种环、火柴等。

【实验方法】

1. 平板划线法(分离培养法)

原理:通过在平板上连续划线的方法将混杂的细菌在琼脂平板表面充分地分散开来,使单个细菌能固定在一点上生长繁殖,形成单个菌落,以达到分离纯种的目的,为进一步鉴定细菌提供条件。

根据待检材料中细菌含量的多少采用不同的方法:

(1) 连续划线法

①将平皿从中间分为两部分。②接种环火焰灭菌待冷后挑取检查材料,先涂于平皿顶端,再向下连续平行划线至平皿中部。③将平皿旋转 180 度,由平皿的另一端连续平行划线至平皿中部。见图 1-5-1。

连续划线法适用于含菌量较少的标本。

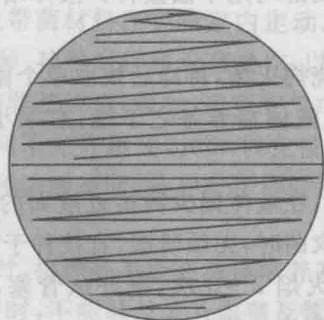


图 1-5-1 连续划线法

(2) 分区划线法

常用三区划线法:①将平皿从中间等分为三区。②右手持接种环,烧灼冷却后,取菌液一环(或取检查材料少许)。左手抓握琼脂平板(让皿盖留于桌上),在酒精灯火焰左前上方,使平板面向火焰,以免空中杂菌落入,右手将已沾菌的接种环在琼脂表面密集而不重叠地来回划线接种在 I 区。③接种环上多余的细菌可灼烧(每划完一个区域是否需要烧灼灭菌,视标本中含菌量多少而定),待冷后,在划线末端重复 2~3 根线后,再接种 II 区。④ II 区划完后可不烧灼接种环,用同样方法接种 III 区。见图 1-5-2。

接种完毕后,将平板扣入皿盖并做好标记(细菌名称、学生姓名及日期),倒置(盖在下、有培养基的一面在上)37℃温箱中培养 18~24h 后,观察是否分离出单个菌落,并记录菌落特征(如大小、形状、透明度、色素等)。

分区划线法适用于含菌量较多的标本。

2. 斜面接种法

斜面培养基接种法一般不用于细菌的分离,由于细菌繁殖、污染的机会少,常用于扩增细菌及实验室保存菌种(图 1-5-3)。

(1)右手持接种环,在火焰上烧灼灭菌待冷后挑取检查材料。

(2)左手持待接种的培养基管,斜面部应向上,勿成水平,以免管底凝结的水浸湿培养基表面或沾湿试管塞。

(3)以右手小指与无名指拔取并挟持试管塞,将管口迅速通过火焰灭菌。

(4)将接种环从斜面底部向上划一直线,然后再从底向上轻轻来回作蜿蜒划线,注意不要划破培养基表面。

(5)接种完毕,将接种环灭菌后插入试管架上。管口迅速通过火焰 2~3 次,塞好试管塞。将接种管置 37℃温箱中培养 18~24h 后观察斜面上菌苔生长情况。

3. 液体接种法

凡肉汤、蛋白胨水、各种单糖发酵均用本法接种。液体培养基多用于细菌增菌及测定生化特性。

(1)右手持接种环,在火焰上烧灼灭菌,待冷后挑取单个菌落。

(2)左手拇指、食指、中指托住液体培养基之下端,右手小指与无名指(或手掌)拔取试管塞,将管口移至火焰上旋转烧灼。

(3)将接种环移入培养基管中,在液体偏少侧接近液面的管壁上轻轻研磨,使细菌均匀分散于培养基中。如自液体培养物取菌时,无须研磨,直接种于液体中即可。

(4)接种完毕,管口迅速通过火焰 2~3 次,塞好试管塞,接种环灭菌后插入试管架。置 37℃温箱中培养 18~24h,取出观察生长情况。

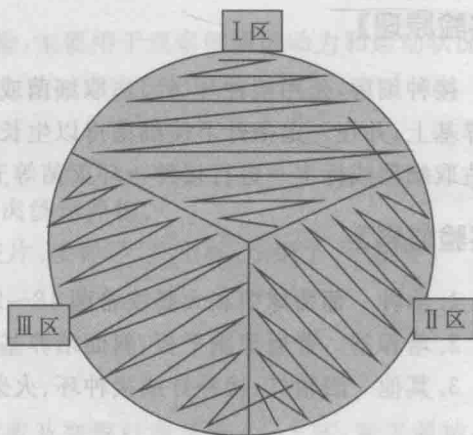


图 1-5-2 分区划线法

4. 半固体穿刺接种法

主要用于观察细菌动力,保存菌种。见图 1-5-3。

(1)右手持接种针,烧灼灭菌待冷后挑取单个菌落。

(2)左手拇指、食指、中指持半固体培养基,右手小指与无名指拔取并挟持试管塞,将管口迅速通过火焰灭菌。

(3)将接种针垂直插入半固体琼脂培养基中心,至接近管底处循原路退回。

(4)接种完毕,管口迅速通过火焰 2~3 次,塞好试管塞,接种针灭菌后插入专用接种针架中。置 37℃ 温箱中培养 18~24h 后观察生长情况。

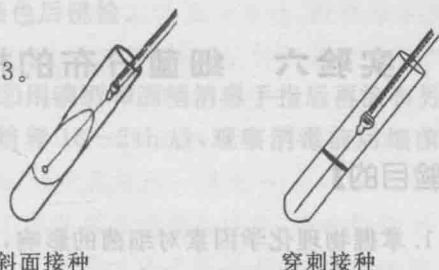


图 1-5-3 斜面接种和穿刺接种法

【结果判定】

1. 从细菌培养箱内取出培养基(不要打开平皿盖),直接观察琼脂表面生长的各种菌落。注意其大小、形态、边缘是否整齐、表面光滑或粗糙、透明度、隆起度、颜色等性状。在一般情况下,一个菌落是由单独一个细菌经不断分裂繁殖形成的。挑出一个菌落,移种到另一培养基中,所生长出来的细菌均为纯种,即纯培养。在含血液的琼脂培养基上,还可观察菌落四周有无溶血现象。

2. 细菌在琼脂斜面培养基中绝大多数呈菌苔生长,极少部分呈菌落生长。

3. 细菌在液体培养基中的生长主要有三种现象,大多数细菌呈均匀混浊生长,有的细菌沉于管底,有的在液面生长呈菌膜状。

4. 细菌在半固体培养基上的生长现象主要用于检查细菌是否有动力(即有无鞭毛)。应注意观察穿刺线是否清晰及培养基的混浊程度。具有动力的细菌能从穿刺线向四周弥散生长,使整个培养基混浊,穿刺线模糊不清;无动力的细菌,仅沿穿刺线生长,周围培养基仍然清澈透明。

【注意事项】

1. 用持笔式拿接种环,接种环在酒精灯火焰的外焰处进行烧红灭菌。

2. 接种环划线时,与培养基保持 30°~40°角。角度太小不容易操作,角度太大容易划破培养基。要求划线密集而又不能重叠,否则会影响单个菌落的形成。

3. 不允许手拿接种环、菌种及带菌材料在实验室内走动。接种细菌应坐在座位上酒精灯旁 20cm 以内,1~2min 内完成接种,接种时严格无菌操作,以免污染。

4. 在接种过程中,不要对着培养基说话、咳嗽,避免空气中的细菌落在培养基上。

5. 菌种及培养基打开盖的时间不允许超过 3min,以免被环境中的杂菌污染。

6. 实验用的半固体培养基必须清澈透明,接种时接种针不可在培养基内左右摆动,也不可插到管底。

7. 在进行液体培养基的接种时,接种环不能在液体培养基内搅拌以防外溅污染周围环境

8. 沾菌的接种环/针进出试管时,不能触及试管内壁及管口。

9. 离开实验室前勿忘用肥皂洗手。

(关翔宇 曾令娥)