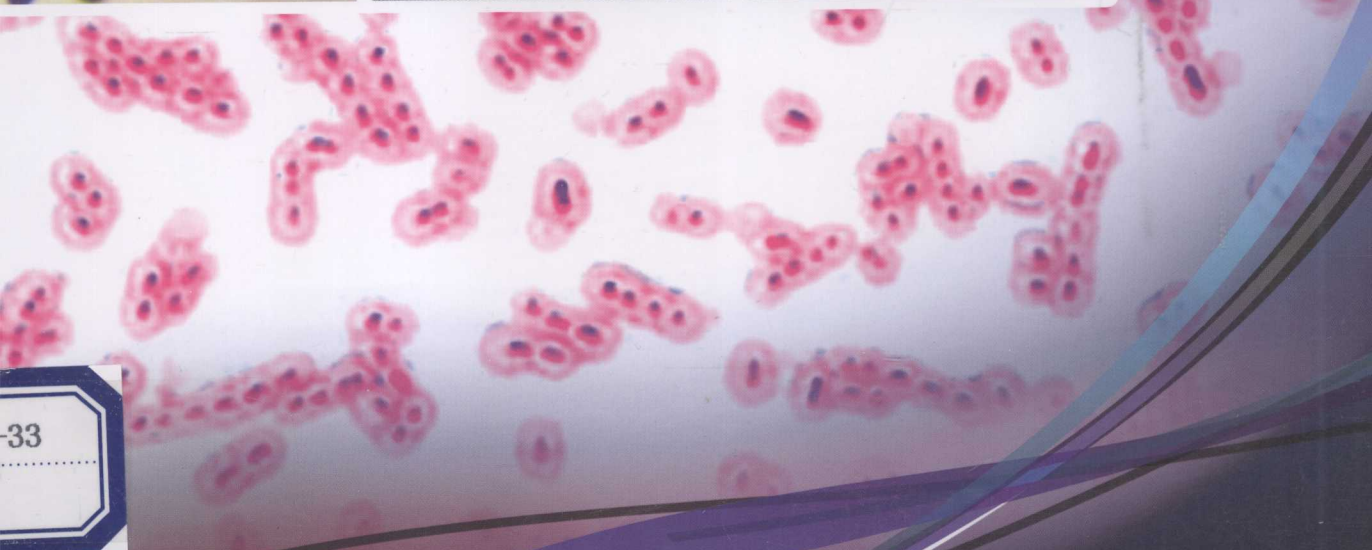
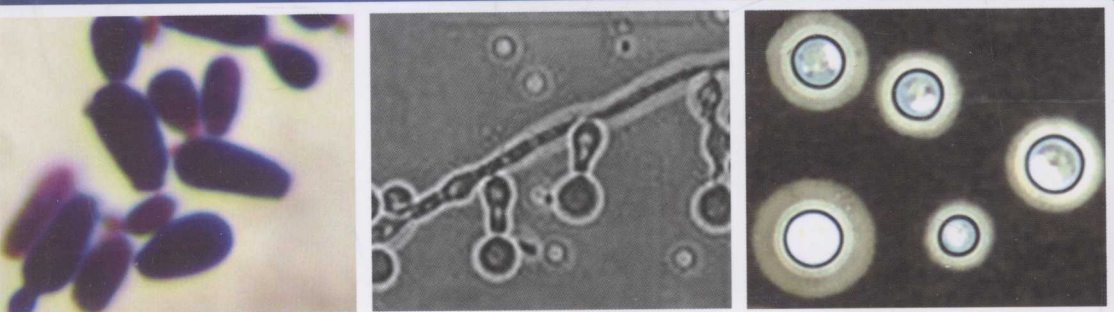


医药学常用微生物学 实验技术

主编 陈峥宏 魏 洪 康颖倩



科学出版社

医药学常用微生物学实验技术

内 容 简 介

主 编 陈峥宏 魏 洪 康颖倩

主 审 王 和

编 者 (按姓名笔画排序)

王 和 王 涛 王 菲

王梅竹 江 滢 吴晓娟

余晓玲 陈峥宏 赵 亮

康颖倩 綦廷娜 魏 洪

科 学 出 版 社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

本书根据医学和药学微生物学教学与实验室工作的基本需求,遵循科学性、实用性的基本原则,针对医学和药学微生物学教学与科研中常用的基本实验技术,进行了较系统和全面地讲解。

本书内容共分为八个部分包括绪论、六篇实验技术、附录索引,分别是绪论、细菌学基本实验技术、常见病原性细菌及其感染的检查、其他原核细胞型微生物及其感染的检查、真菌学常用实验技术、病毒学常用实验技术、微生物学实验技术在药学中的应用及附录索引。附录包括常用培养基的制备与灭菌、常用溶液及染色试剂的配制等内容。

本书作为临床医学、药学和微生物学检验及其他从事微生物学实验工作人员的技术参考,也适用于本科学生、硕士研究生的医学与药学微生物学基础课程和专业课程的实验指导。

图书在版编目(CIP)数据

医药学常用微生物学实验技术 / 陈峥宏, 魏洪, 康颖倩主编. —北京: 科学出版社, 2014. 1

ISBN 978-7-03-039471-2

I. ①医… II. ①陈… ②魏… ③康… III. ①医学微生物学-实验
IV. ①R37-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 312794 号

责任编辑:朱 华 / 责任校对:宣 慧

责任印制:肖 兴 / 封面设计:范璧合

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

骏杰印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2014 年 1 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2014 年 1 月第一次印刷 印张:12 插页:1

字数:280 000

定价:36.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

微生物学实验技术是医学和药学最常用的一项技术方法,也是医学和药学微生物学教学中重要的基本技术方法。本书根据医学和药学微生物学教学与实验室工作的基本需求,遵循科学性与实用性的基本原则,较系统和全面地介绍了医学和药学微生物学常用的基本实验技术和现代技术方法。

本书由王和教授设计和主持编写,共分为八个部分,分别是绪论、细菌学基本实验技术、常见病原性细菌及感染的检查、其他原核细胞型微生物及其感染的检查、真菌学常用实验技术、病毒学常用实验技术、微生物学实验技术在药学中的应用及附录,附录包括常用培养基的制备与灭菌、常用溶液及染色试剂的配制及索引。

本书可作为本科生、硕士研究生的医学与药学微生物学基础课程和专业课程的实验指导,亦可作为临床医学和药学微生物学检验及其他从事微生物学实验工作人员的技术参考。

编 者
2013 年 9 月

目 录

(10)	绪论	(1)
------------	----------	-----

第一篇 细菌学基本实验技术

第一章 常用实验仪器及生物安全实验	
室简介	(5)
第一节 常用实验仪器	(5)
第二节 生物安全实验室	(8)
第二章 细菌形态和结构检查法	(10)
第一节 革兰染色法	(10)
第二节 抗酸染色法	(10)
第三节 细菌细胞壁染色法	(11)
第四节 荚膜染色法	(11)
第五节 鞭毛染色法	(13)
第六节 芽胞染色法	(14)
第三章 细菌的人工培养技术	(16)
第一节 常用培养基及其组成	(16)
第二节 细菌的接种技术	(16)
第三节 细菌的培养方法	(20)
第四章 常用细菌生化反应	(22)
第一节 碳水化合物分解代谢试验	(22)
第二节 氨基酸和蛋白质分解试验	(24)
第三节 有机酸盐和铵盐利用试验	(28)
第四节 细菌酶的检测	(30)
第五章 常用细菌血清学试验	(34)
第一节 凝集试验	(34)
第二节 沉淀试验	(36)
第三节 荚膜肿胀试验	(36)
第六章 细菌毒素检查法	(38)
第一节 外毒素感染及其检测	(38)
第二节 内毒素感染及其检测	(39)

第七章 细菌变异现象与变异菌株	
检测	(40)
第一节 细菌变异现象的观察	(40)
第二节 细菌突变株的检查	(41)
第三节 细菌 L 型变异的诱导及其检测	(42)
第八章 细菌质粒指纹图谱分析法	(46)
第一节 细菌质粒分离、提取与琼脂糖凝胶电泳	(46)
第二节 质粒的限制性内切酶分析	(47)
第九章 PCR 技术	(49)
第一节 幽门螺杆菌的 PCR 检测	(49)
第二节 PCR 法检测乙型肝炎病毒	(50)
第三节 RT-PCR 技术检测丙型肝炎病毒	(51)
第十章 细菌自动化鉴定和药敏分析系统	(53)
第一节 Vitek-AMS 全自动细菌鉴定和药敏分析系统	(53)
第二节 VITEK® MS 全自动快速微生物质谱检测系统	(54)
第十一章 气相色谱技术分析细菌代谢产物	(55)
第十二章 高效液相色谱技术检测细菌 G+C 摩尔百分比	(56)
第十三章 水中细菌的检查法	(57)

第十四章 空气中细菌的检查法	(59)	第三节 咽喉部细菌的检查	(63)
第十五章 土壤中细菌的检查法	(60)	第十八章 理化及生物因素对细菌的	
第十六章 物体表面细菌的检查	(61)	影响	(64)
第十七章 正常人体细菌的检查	(62)	第一节 物理因素对细菌的影响 ...	(64)
第一节 皮肤上细菌的检查	(62)	第二节 化学因素对细菌的影响 ...	(67)
第二节 牙垢中细菌的检查	(62)	第三节 生物因素对细菌的影响 ...	(68)

第二篇 常见病原性细菌及其感染的检查

第十九章 葡萄球菌属	(73)	第二十六章 肠道杆菌感染的检查 ...	(93)
第一节 葡萄球菌的形态及染色性		第一节 粪便标本的细菌学检查 ...	(93)
观察	(73)	第二节 尿标本的定量培养法	(94)
第二节 葡萄球菌的生长特性观察		第二十七章 厌氧芽胞梭菌	(95)
.....	(73)	第一节 形态与生长特性的观察 ...	(95)
第三节 原性葡萄球菌的鉴定	(74)	第二节 产气荚膜梭菌的鉴定	(95)
第二十章 链球菌属	(78)	第二十八章 无芽胞厌氧菌	(97)
第一节 链球菌的形态及染色性		第一节 形态与生长特性	(97)
观察	(78)	第二节 无芽胞厌氧菌的分离与	
第二节 链球菌的生长特性观察 ...	(78)	鉴定	(97)
第三节 病原性链球菌的鉴定	(79)	第二十九章 螺杆菌	(99)
第二十一章 奈瑟菌属	(82)	第一节 幽门螺杆菌形态与生长	
第一节 奈瑟菌的形态及染色性		特性	(99)
观察	(82)	第二节 幽门螺杆菌的鉴定	(99)
第二节 奈瑟菌的生长特性观察 ...	(82)	第三节 幽门螺杆菌感染的微生物	
第三节 病原性奈瑟菌的鉴定	(82)	学检查	(100)
第二十二章 病原性球菌感染的检查		第三十章 弧菌属	(101)
.....	(84)	第一节 霍乱弧菌的鉴定	(101)
第二十三章 埃希菌属	(86)	第二节 副溶血性弧菌的鉴定 ...	(102)
第一节 形态与生长特性	(86)	第三十一章 需氧芽胞杆菌	(103)
第二节 生化反应	(86)	第一节 需氧芽胞杆菌的形态与生	
第二十四章 志贺菌属	(88)	长特性	(103)
第一节 形态与生长特性	(88)	第二节 炭疽芽胞杆菌的鉴定 ...	(103)
第二节 生化反应	(88)	第三十二章 棒状杆菌属	(105)
第二十五章 沙门菌属	(90)	第一节 白喉棒状杆菌的形态与生	
第一节 沙门菌的形态、培养和生化		长特性	(105)
反应	(90)	第二节 白喉棒状杆菌的微生物学	
第二节 沙门菌的血清型鉴定	(91)	鉴定	(105)
第三节 肠热症的血清学诊断(肥达		第三十三章 分枝杆菌属	(107)
试验)	(91)	第一节 肺结核患者痰标本的抗	

酸染色镜检	(107)	第一节 感染标本的细菌 L 型检查	(108)
第二节 结核分枝杆菌的分离培养	(107)	第二节 实验材料的细菌 L 型检查	(111)
第三十四章 细菌 L 型的检查法 ...	(108)		

第三篇 其他原核细胞型微生物及其感染的检查

第三十五章 衣原体感染的检查法	(113)	第三十七章 支原体感染的检查法	(117)
第三十六章 立克次体感染的检查法	(115)	第三十八章 螺旋体感染的检查 ...	(120)
第一节 斑疹伤寒立克次体感染的形态学检查法	(115)	第一节 螺旋体的形态学检查法	(120)
第二节 外斐试验	(115)	第二节 螺旋体的分离培养和鉴定	(121)

第四篇 真菌学常用实验技术

第三十九章 真菌的形态与培养 ...	(123)	观察	(124)
第一节 微生物真菌的镜下形态观察	(123)	第四十章 浅部感染真菌的检查 ...	(126)
第二节 微生物真菌的菌落形态观察	(124)	第四十一章 深部感染真菌的检查	(127)
第三节 微生物真菌的生长特性		第一节 白念珠菌的检查	(127)
		第二节 新生隐球菌的检查	(128)

第五篇 病毒学常用实验技术

第四十二章 病毒的形态学检查法	(129)	第四十四章 病毒计数法	(143)
第一节 电子显微镜检查法	(129)	第一节 TCID ₅₀ 测定	(143)
第二节 包涵体检查法	(131)	第二节 空斑形成试验	(144)
第四十三章 病毒的分离培养与鉴定	(133)	第四十五章 病毒感染的血清学检查方法	(145)
第一节 动物接种技术	(133)	第一节 中和试验	(145)
第二节 鸡胚接种技术	(135)	第二节 血凝和血凝抑制试验 ...	(147)
第三节 组织细胞培养技术	(139)	第三节 补体结合试验	(148)

第六篇 微生物学实验技术在药学中的应用

第四十六章 药物敏感性试验	(151)	外抗菌药物敏感试验 ...	(151)
第一节 需氧和兼性厌氧菌的体		第二节 厌氧菌的体外抗菌药物	

敏感试验	(153)	第一节 药品中金黄色葡萄球菌的	
第三节 真菌的体外抗菌药物敏感		检测	(162)
试验	(154)	第二节 药品中大肠埃希菌的检测	
第四节 E-test 试验	(156)		(163)
第四十七章 抗生素效价的微生物检		第三节 药品中沙门菌的检验 ...	(164)
定法	(157)	第四节 药品中铜绿假单胞菌的	
第一节 管碟法	(157)	检测	(165)
第二节 比浊法	(158)	第五节 药品中破伤风梭菌的检测	
第四十八章 注射剂的无菌检验 ...	(159)		(167)
第四十九章 药品染菌量的检查 ...	(160)	第五十一章 注射剂细菌内毒素的	
第五十章 药品中控制菌检查法 ...	(162)	检查	(168)
主要参考文献	(169)		
附录一 常用溶液的制备	(170)		
附录二 常用染色液的制备	(173)		
附录三 常用培养基的制备和灭菌	(176)		
索引	(183)		

彩图

彩图	(183)
----------	-------

附录五 常用培养基配方

.....	章四十四第		章二十四第
.....	章一第		章一第
.....	章二第		章二第
.....	章五十四第		章三十四第
.....	章一第		章一第
.....	章二第		章二第
.....	章三第		章三第

附录六 常用培养基配方

.....	章六十四第
.....	章一第

绪 论

医学与药学微生物学实验技术是对医学相关微生物的生物学特性与致病性、宿主抗感染免疫机制进行检测、研究和分析的技术方法。医学与药学微生物学实验技术通过体外和体内的实验研究,可进一步了解和阐明微生物的生物学特性、感染与抗感染免疫机制,对感染性疾病进行早期、快速和特异性诊断以及有效治疗和预防以及药物的生产与质量控制,达到控制和消灭各种微生物引起的感染和感染相关疾病以及提高人类的健康水平之目的。

在医学与药学相关的微生物中,病原性微生物(pathogenic microorganism)可外源性感染人体,引起宿主发生感染性疾病以及免疫病理等感染相关的疾病;非病原性微生物(non-pathogenic microorganism)可寄居于正常人体的体表以及与外界相通的腔道内,成为宿主不可或缺的正常菌群和维护人类健康的最重要生物因素之一,但在某些特定条件下也可内源性感染而引起宿主的机会感染性疾病;某些微生物也可影响药物的生产、质量及应用。不同种类甚至不同菌株的微生物可具有不同的生物学特性及药物敏感性,可导致不同的抗菌药物治疗反应或效果。因此,对于感染性疾病及其各种影响因素的诊断和鉴别诊断,不仅需要临床医生对患者的症状、体征、病史等情况进行充分的调查与了解,也需要依赖医学微生物学实验技术对患者标本的实验室检查。对于药物的生产及其质量控制,也需了解相关微生物的生物学特性及其检查方法。

一、微生物学实验室诊断的原理

感染性疾病的微生物学实验室诊断也称为病原学诊断(etiological diagnosis),是通过病原体分离鉴定、病原体的抗原及其免疫效应物质检测、病原体特异性分子物质检测,对感染性疾病的发生、发展及预后进行分析、诊断和预测的策略与方法。任何感染性疾病的发生,都有病原体(或)其代谢产物及分子物质在患者体内存在,患者体内也可产生病原体特异性的抗体和(或)致敏淋巴细胞。因此采用微生物学实验室诊断技术,能够在患者体内或体外标本内分别检测到相应病原体及其相关的各种物质。

1. 患者体内有病原体及其毒性代谢产物 某种病原性微生物侵入人体生长繁殖和引起感染性疾病,这种病原体及其毒性代谢产物可在患者体内大量存在。因此采用微生物学实验技术,常常能够在患者的病灶组织内发现或检出相应病原体及其毒性代谢产物,从而对感染性疾病进行病原学诊断与鉴别诊断。

2. 患者体内有病原体抗原及其相应免疫应答产物 各种病原体都具有其特异性的抗原物质,也可具有某些共同抗原、交叉抗原或异嗜性抗原。病原体的这些抗原可刺激宿主机体产生免疫应答,引起宿主产生相应抗体和(或)致敏淋巴细胞。因此可通过检测病原体特异性抗原或其相关抗原、检测病原体特异性抗原或其相关抗原的免疫应答产物及其效价或活性,从而对感染性疾病进行免疫学诊断与鉴别诊断。

3. 患者体内有病原体特异性分子物质 各种微生物可含有其独特的或特异性的分子

物质,这些分子物质不但可随微生物感染而存在于宿主体内,也可引起宿主产生某些特异性的或相关的分子物质。微生物特异性的及其相关的分子物质可通过分子生物学方法检测,从而对感染性疾病进行分子生物学诊断与鉴别诊断。

二、微生物学实验室诊断的内容与程序

根据感染性疾病发生与发展的基本原理,微生物感染的实验室诊断内容主要包括以下四个方面:①标本采集与送检;②分离鉴定病原体(病原体检查);③检测病原体抗原及其免疫效应物质(免疫学检查或血清学检查);④检测病原体分子物质(分子检查)。

1. 标本采集与送检 感染人体的病原体在病程的不同时期可存在于宿主不同的组织或器官内,并且可通过一定的途径在宿主体内扩散或排出宿主体外。这些病原体的抗原可引起宿主产生免疫应答,使其产生特异性抗体和(或)致敏淋巴细胞。因此在患者病程的不同时期,根据病原体在患者体内的分布规律和排出途径采集不同的标本,可有助于相应病原体的检出。根据免疫应答的规律采集血清、血液等标本,可有助于特异性免疫效应物质的检测。标本采集的基本原则包括以下几方面。

(1) 做好标记:采集标本之前,须首先在标本容器(或大体标本)上做好各种相关的标记,并且在病原学检查申请书上尽可能详细地填写相关内容。所做标记必须字迹清晰、附着牢固、内容简要、含义明确、具有独特性。标本的规范标记不但能够避免标本传送过程可能造成的混淆或错误,还应有助于检验医生根据患者及其疾病的相关信息确定实验室检查的方法与重点内容,并对检验结果进行正确的分析与判断。一般来说,标记和申请书的基本内容主要包括:患者姓名、性别、年龄,疾病诊断及其相关的简要病史,门诊或住院科室、编号,标本采集日期,检查内容、抗菌药物使用及其毒副反应史,其他相关或特殊要求。

(2) 无菌操作:外界环境及人体的微生物可在采集标本的过程中污染标本或其容器,因此需要严格的无菌操作以减少、防止和避免这些微生物污染标本。虽然消毒与灭菌可有助于减少和防止微生物污染及提高无菌操作的效果,但其绝不等于、也不能替代无菌操作。对患者局部组织消毒的过度依赖,甚至还可对病原体的分离培养产生不利影响。

(3) 及时送检:某些病原体在宿主体外容易死亡,污染标本的非致病性微生物也可大量生长繁殖而干扰病原体的检查。因此采集的标本不宜长时间放置,需要及时送到实验室并及时进行病原体的检查或分离培养。

(4) 妥善保藏:对于不能及时送检的标本需妥善保藏,但保藏的条件需根据待检微生物的性质进行选择与确定。例如,用于分离培养无芽孢厌氧菌的标本,需在厌氧条件下保藏;用于分离培养病毒的标本,需在 -20°C 以下的低温条件保藏;用于分离培养肠道杆菌的粪便标本,可置30%甘油缓冲盐水内在 4°C 条件下保藏;用于分离培养淋病奈瑟菌的标本,需立即接种于营养培养基并在 37°C 条件下保藏。

(5) 根据病原体的分布和排出途径采集标本:在病程的不同时期,病原体可大量存在于宿主不同组织或器官内并通过不同途径排出。存在于宿主组织或器官内的病原体大量生长繁殖,也常常可引起该组织或器官发生明显的病理损害。因此,根据病原体在宿主体内的分布与排出规律,采集病变明显部位的标本,可有助于提高检出率。

(6) 使用抗菌药物之前采集标本:使用抗菌药物后,患者各组织内含有较高浓度的抗菌药物,从而可抑制病原体在培养基内生长繁殖而影响分离培养效果。因此,感染性疾病的标本采集需要在患者使用抗菌药物之前。如果患者已经使用了抗菌药物,则可采用添加

相应拮抗剂或中和剂以及过滤等方法,降低或消除培养物内的抗菌药物活性。

(7) 根据免疫应答规律采集标本:检测抗体或致敏淋巴细胞,需要根据免疫应答的规律分别采集感染初期(急性期)和后期(恢复期)的标本。例如,检测抗体,只有当恢复期特异性抗体效价增高,并且达到急性期抗体效价4倍或以上时,才具有诊断意义。但如果检测血清特异性IgM抗体,感染初期(急性期)的抗体效价增高即有助于诊断。

2. 病原体检查 病原体检查是通过微生物学实验室技术方法,检查和鉴定引起感染的病原体种类,为临床进一步诊断、鉴别诊断、治疗和预防提供参考依据。分离鉴定病原体的基本内容和操作程序主要包括:①涂片镜检;②病原体分离;③病原体鉴定;④病原体药物敏感试验。

(1) 涂片镜检:标本可置于载玻片上直接镜检,也可染色后镜检。涂片镜检的意义如下所述。

1) 早期初步诊断:通过对病原体形态、结构及染色性的观察,可在形态学上初步识别病原体的类别,有助于疾病的早期初步诊断。

2) 早期治疗:通过对病原体形态学类别的初步识别,有助于临床根据病原体的类别早期选择和使用抗菌药物对患者进行治疗。

3) 分离培养结果分析:涂片镜检发现病原体,但分离培养没有发现相应病原体或没有检出相应病原体,可考虑厌氧菌感染、培养物含抑制病原体生长的因素或受到其他病原体污染的可能。

4) 治疗效果评估:病原体形态和数量的变化,有助于判断抗菌药物治疗的效果。例如,在结核患者标本涂片抗酸染色镜检中,发现不典型形态的抗酸杆菌及其数量明显减少,可提示抗结核药物治疗有效。在隐球菌患者标本涂片负染色镜检中,发现不典型形态的隐球菌及其数量明显减少,但血清或脑脊液的特异性抗体效价升高,可提示疾病进入恢复期。

(2) 病原体分离培养:病原体分离的方法包括人工培养基分离培养法和动物分离培养法,常用人工培养基分离培养法。人工培养基分离培养法是将标本接种于适当的培养基,并且在适当的温度、气体等条件下进行适当时间的培养。动物分离培养法是将标本接种于易感动物体内,从发病或濒死动物的体内分离病原体。

(3) 病原体鉴定:鉴定病原体的属、种、型或株,常用方法包括以下几种。

1) 生物学方法:常用生化反应的方法,检测病原体的酶及代谢活性。

2) 血清学方法:常用特异性抗血清,通过凝集试验、沉淀试验、补体结合试验、标记抗体试验等方法,检测病原体的相应抗原。

3) 分子生物学方法:常用聚合酶链反应、分子印记、分子杂交等技术方法,检测病原体特异性的核苷酸序列或蛋白质分子。

4) 动物实验方法:将病原体感染实验动物,检测病原体的致病性或毒力。

(4) 药物敏感性试验:通过测试病原体的药物敏感性,检测病原体耐药性相关酶类或耐药性相关基因,分析和判断病原体的药物敏感性。临床常用琼脂纸片扩散法(K-B法)检测病原体的药物敏感性,用稀释法检测病原体的药物敏感性程度(MIC与MBC);用生物化学的技术方法,检测病原体的耐药性相关酶类及其活性;用分子生物学的技术方法,检测病原体的耐药性相关基因或耐药性相关蛋白质分子。

3. 免疫学检查 免疫学诊断的基本原则是检测病原体特异性的或相关的抗原、抗体和(或)致敏淋巴细胞,为临床进一步诊断和鉴别诊断以及治疗与预防提供参考依据。免疫学

诊断的基本内容和常用方法包括以下几方面。

(1) 抗原检查:用已知特异性抗血清,体外或体内检测病原体的特异性抗原。体外检测病原体抗原的常用方法包括 Ascoli 试验、玻片凝集试验 (slide agglutination test)、试管凝集试验 (tube agglutination test)、荚膜肿胀试验 (capsule swelling test)、补体结合试验 (complement fixation test)、ELISA 试验、病毒血凝抑制试验 (virus hemagglutination inhibition test)、生长抑制试验 (growth inhibition test)、代谢抑制试验 (metabolic inhibition test)、免疫荧光试验 (immunofluorescence test)、间接血凝试验 (indirect hemagglutination test) 等。体内检测病原体抗原的常用方法为狄克试验 (Dick test)。

(2) 抗体检查:用已知的病原体抗原,体内或体外检测病原体抗原的相应抗体。体内检测抗体的常用方法包括锡克试验、速发型皮肤试验;体外检测抗体及其效价的常用方法包括沉淀试验 (precipitation test)、肥达试验 (widal test)、抗 O 试验 (anti-O test)、补体结合试验 (complement fixation test)、ELISA 试验、微量免疫荧光试验 (microimmunofluorescence test)、间接血凝试验 (indirect hemagglutination test)、显微镜凝集试验 (microscopic agglutination test)、病毒血凝抑制试验 (virus hemagglutination inhibition test)、冷凝集试验 (cold agglutination test)、链球菌 MG 凝集试验 (*Streptococcus* MG agglutination test)、凝集素吸收试验 (agglutinin-absorption test)、华氏反应 (wassermann reaction)、康氏反应 (Kahn's test)、间接凝集试验 (indirect agglutination test)、间接荧光抗体试验 (indirect fluorescent antibody test)、外斐试验 (Weil-Felix test) 等。

(3) 致敏淋巴细胞检查:用已知的病原体抗原,体外或体内检测病原体抗原的相应致敏淋巴细胞活性和(或)数量。体内检测致敏淋巴细胞的常用方法包括结核菌素试验、麻风菌素试验、布氏菌素试验;体外检测抗体及其效价的常用方法包括淋巴细胞转化试验 (lymphocyte transformation test)、移动抑制试验 (migration inhibition test)、细胞毒试验 (cytotoxicity test)、T 细胞亚群检测 (detection of T-cell subgroups) 等。

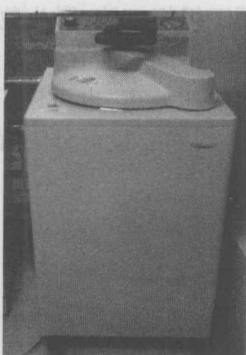
4. 分子检查 分子诊断的基本原则是从患者或感染者体内检测病原体特异性分枝物质,为临床进一步诊断和鉴别诊断以及治疗与预防提供参考依据。基本内容和常用方法包括以下两方面。

(1) 核酸分子检测:体外检测标本内病原体 DNA 分子的特异性核苷酸片段或 RNA 分子。常用方法包括聚合酶链反应 (PCR)、核苷酸序列测定 (nucleotide sequencing)、基因芯片技术 (gene chip technology)、核酸指纹图谱 (DNA fingerprinting)、核酸原位杂交 (nucleic acid in situ hybridization)、核酸酶切图谱 (nuclease digestion patterns)、Southern 印迹杂交 (southern blotting)、Northern 印迹杂交 (northern blotting) 等。

(2) 蛋白质分子检测:体外检测标本内病原体的特异性蛋白质或多肽分子。常用方法包括 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)、Western 免疫印迹 (western blotting)、蛋白质芯片 (protein chip)、蛋白质序列测定 (protein sequencing) 等。

第一节 常用实验仪器

高压蒸汽灭菌器式样很多,根据外形又可分为手提式、卧式、立式等高压蒸汽灭菌器;根据其冷空气排放方式不同可分为外排式与内排式蒸汽灭菌器。实验室常用的外排式高压蒸汽灭菌器有手提式高压蒸汽灭菌器和下排气式高压蒸汽灭菌器(图 1-1),内排式高压蒸汽灭菌器包括预真空和脉动真空高压蒸汽灭菌器。



下排气式高压蒸汽灭菌器

图 1-1 不同类型的高压蒸汽灭菌器

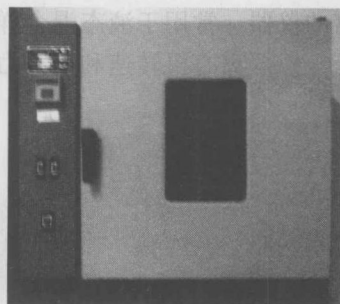


图 1-2 电热恒温干燥箱

4. 二氧化碳培养箱 二氧化碳培养箱(图 1-4)是一种可在其箱体内形成类似于生物体内稳定的温度、CO₂ 浓度、酸碱度、湿度等环境,以对细胞或组织进行体外人工培养的装置。

其主要是由箱体、CO₂ 调节器、温度控制系统以及湿度调节器等部件组成。常应用于细胞组织体外培养以及某些对 CO₂ 环境要求较高的微生物,如脑膜炎奈瑟菌、淋病奈瑟菌、布鲁菌的初次分离和传代培养。

5. 恒温水浴箱 恒温水浴箱(图 1-5)一般为金属结构的长方形容器,主要通过电热管加热箱内的蒸馏水达到恒温的目的。水浴箱的温度调节范围通常为 30 ~ 100℃。在微生物学中恒温水浴箱常用于水浴恒温及加热试验,也可用于化学药品或生物制品的干燥、浓缩、蒸馏等。

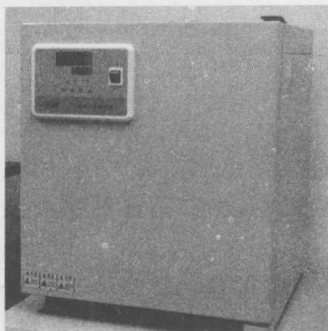


图 1-3 普通恒温培养箱



图 1-4 二氧化碳培养箱

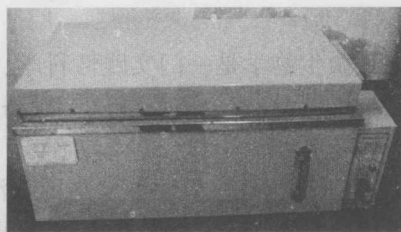


图 1-5 恒温水浴箱

6. 超低温冰箱 超低温冰箱(图 1-6)体积比普通冰箱大,由箱体和制冷系统组成,有效容积一般为 200 ~ 500L 左右。超低温冰箱采用了双层门保温隔离,箱体有高密度保温材料和密封结构,隔热性能良好,能够有效地保持箱内温度,使箱内温度可恒定为 -150 ~ -40℃。内层储物箱分为多层,每层箱门均可独立开关。常应用于各种菌毒种、生物制品的低温保存。

7. 液氮罐 液氮罐(图 1-7)具有良好的隔热性能,可避免液氮在短时间内气化,用于储存液氮。液氮是一种超低温的液体,温度约为 -196℃。液氮的超低温冷冻能力,可使多数细菌、病毒停止代谢但不能杀死,因此常用于组织细胞、微生物及生物制品等的长期保存。

8. 离心机 离心机(图 1-8)是一种根据不同物质在离心力场中沉淀速度的差异,实现样品分离的仪器。常用于液态混合样品的快速分离,也可用于分析及测定分离物的分子量及纯度等。根据离心机转速和离心力场不同,离心机可分为普通转速离心机(转速 < 8000)、

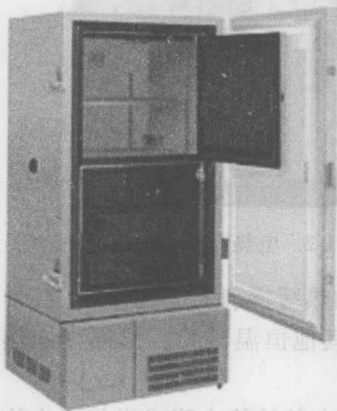


图 1-6 超低温冰箱



图 1-7 液氮罐



图 1-8 离心机

高速离心机(转速 8000 ~ 30 000)、超速离心机(转速 30 000 ~ 80 000)以及超高速离心机(转速 >80 000)四类;还可根据离心机内部温度的不同分为普通离心机和冷冻离心机。

9. PCR 扩增仪 PCR 扩增仪(图 1-9)又称基因扩增仪或核酸扩增仪,它是利用 PCR 技术对特定基因在体外进行大量合成设备,可用于以检测 DNA 或 RNA 为目的的各种基因分析。PCR 技术的原理是通过人工设计目的 DNA 片段两端的寡核苷酸引物,经过高温变性、低温退火以及恒温延伸三个变温过程形成一个扩增循环,使待检样品中的核酸拷贝数呈指数级扩大,以致能从样品中检测出微量的核酸成分。从 PCR 反应原理可知,PCR 扩增仪是一个精密的温度控制仪。目前,PCR 扩增仪包括普通 PCR 扩增仪、荧光 PCR 扩增仪、梯度 PCR 扩增仪、原位 PCR 扩增仪等类型。



图 1-9 PCR 扩增仪

10. 电泳仪和电泳槽 电泳仪和电泳槽(图 1-10)是对核酸、蛋白质进行电泳分离纯化、检测和分析的仪器,其原理是根据生物大分子在一定的 pH 条件下形成带电荷离子,在有电场的介质中向相反的方向泳动,由于大分子的电荷、质量、二级结构等差异使其在电场中形成不同的迁移速度。经过一定时间,介质中的各类分子被逐渐分开,达到分离的目的。

11. 凝胶图像分析系统 蛋白质、核酸等经凝胶电泳分离后不能直接观察。凝胶图像分析系统(图 1-11)采用摄像头将置于暗箱内的 DNA、RNA、蛋白质电泳凝胶在紫外光或白光照射下所产生的影像输入计算机,并通过相应的析软件对其分子量、样品总量等的进行分析测定。常应用于电泳凝胶图像的分析研究、分子杂交、细胞遗传学中染色体核型分析等技术。

12. 纯水仪 纯水制备仪(图 1-12)是一种通过反渗透等办法,对普通水进行一系列处理后制得高纯度水的装置。在精度要求高的分析实验、分子生物学实验中,常常使用纯水仪获取高质量的纯水作为实验溶剂。

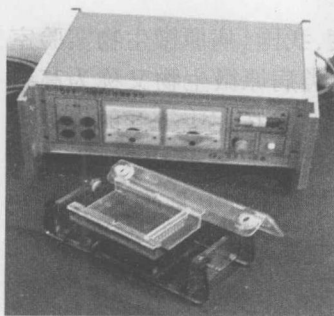


图 1-10 电泳仪和电泳槽

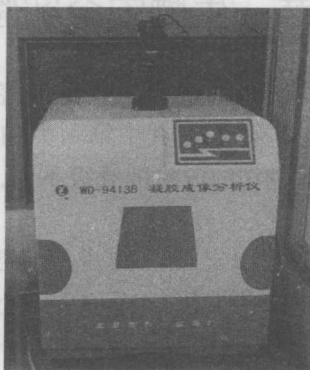


图 1-11 凝胶图像分析系统



图 1-12 纯水仪

13. 超净工作台 医学用超净工作台(图 1-13)是一种改善局部环境空气洁净度的净化设备,常用于进行无菌操作。它是利用可调风量的风机系统,通过调节风机驱动空气,经过高效过滤器净化后,形成洁净气流,洁净气流以均匀的断面风速流经工作区,形成高洁净的工作环境。

14. 生物安全柜 生物安全柜(图 1-14)是为操作原代培养物、菌毒株以及诊断性标本等具有感染性的实验材料时,用来保护操作者本人、实验室环境以及实验材料,使其避免暴露于上述操作过程中可能产生的感染性气溶胶和溅出物而设计的。在生物安全柜内操作,可以有效减少由于气溶胶暴露所造成的实验室感染以及培养物交叉污染,同时也能保护工作环境。生物安全柜可分为一级、二级和三级三大类。目前,二级生物安全柜是应用最为广泛的。

15. 冷冻真空干燥仪 冷冻真空干燥仪(图 1-15)的工作原理是在高真空状态下,使被处理物中预先冻结的水分直接从固态升华为水蒸气而被除去,从而使被处理物干燥。冷冻真空干燥常用于微生物菌种保藏,该方法可使微生物细胞始终处于干燥、缺氧的条件下而抑制其代谢繁殖,但不会引起微生物细胞死亡,因而它是迄今为止最有效的菌种保藏法之一。此外,冷冻真空干燥是在较低的温度下进行,采用该方法对一些热敏感性的物质(如蛋白质、抗生素等生物制品)进行干燥,不会使其变性或失去活性,因此广泛应用于医药、食品等行业。

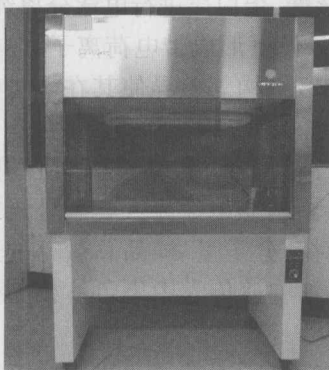


图 1-13 超净工作台

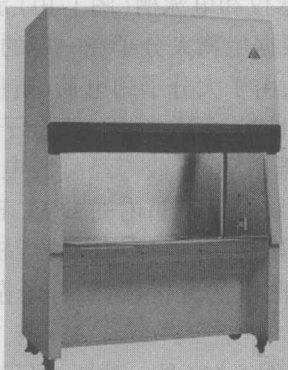


图 1-14 生物安全柜

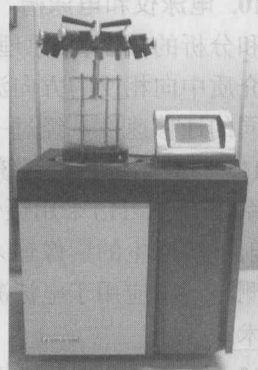


图 1-15 冷冻真空干燥

第二节 生物安全实验室

根据病原微生物的传染性、感染后对个体或群体的危害程度,我国《病原微生物实验室生物安全管理条例》将病原微生物分为四类,其中第一类和第二类病原微生物又称为高致病性病原微生物。由于各种病原微生物的危险度等级不同,因此必须在相应等级的生物安全实验室才能开展有关实验活动。

生物安全实验室是具有一定生物安全防护水平的实验室,包括生物安全实验室(biosafety laboratory, BSL)和动物安全实验室(animal biology security laboratory, ABSL)其生物保护作用主要是通过标准化的建筑、生物安全设备配置、个人防护、详细的操作程序和严格的管理来实现的。

根据 WHO《实验室生物安全手册》和我国卫生部颁布的《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》生物安全实验室共分为四级:一级防护水平最低,四级防护水平最高。以 BSL-1(ABSL-1)、BSL-2(ABSL-2)、BSL-3(ABSL-3)和 BSL-4(ABSL-4)表示实验室的相应生物安全防护水平。医学实验室因可能接触含有致病微生物的标本或样品,通常应达到二级生物安全防护实验室要求。根据《实验室生物安全认可准则》二级生物安全(BSL-2)实验室

(图 1-16)结构设施需符合以下基本条件:

(1) 实验室需具有防止节肢动物和啮齿动物进入的设计,有可开启的窗户,有纱窗,实验室门有可视窗带锁并能自动关闭。

(2) 实验室均应设置洗手池,应设置在靠近出口处。

(3) 实验室内墙壁、地面应平整、防滑、易于清洁,不适宜用地毯。

(4) 实验台面应能防水、耐腐蚀、耐热。

(5) 实验室内应保证工作照明,避免反光和强光。有可靠的电力供应和应急照明。

(6) 实验室内有适当的消毒设施,如高压蒸汽灭菌器,并设置洗眼装置、应急喷淋装置、急救药箱、灭火器等。

(7) 在实验室内应穿戴隔离衣、帽、手套,必要时戴防护眼镜。实验室应有生物安全柜。

(8) 在实验室入口处和装有传染性物质的设备表面贴有生物危险标志。

(9) 在实验室出口处设有在黑暗中可明确辨认方向、通道的标识。

(10) 实验室工作区域外有足够的存储空间及摆放个人衣物的设施。

《人间传染的病原微生物名录》已由我国卫生部于 2006 年制定并实施,该文件对不同病原微生物的危害程度及其相关实验活动需要达到的生物安全实验室级别做了详细规定,进行病原微生物相关实验均需参照该标准执行。

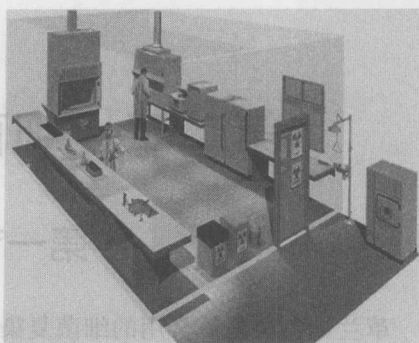


图 1-16 BSL-2 实验室结构图

摘自 WHO《实验室生物安全手册》

(王 涛)