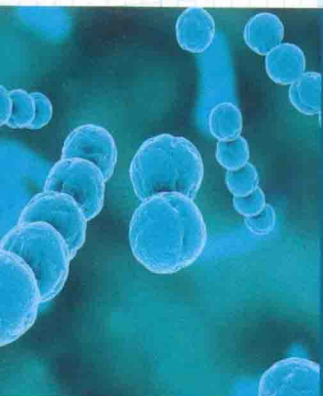




全国高等医药院校医学检验专业“十二五”规划教材

供医学检验等专业使用

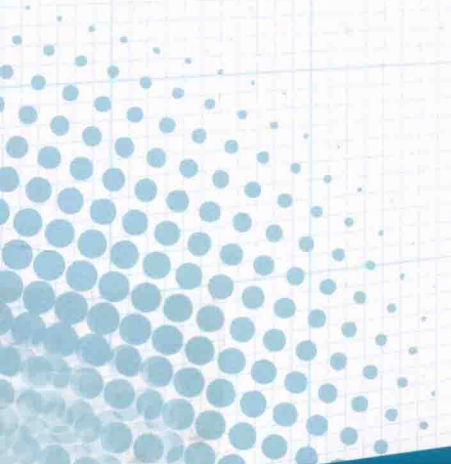
付玉荣 张文玲 ◆ 主编



临床微生物学检验实验

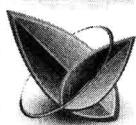
..... ·

LINCHUANG WEISHENGWUXUE JIANYAN SHIYAN



华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>



全国高等医药院校医学检验专业“十二五”规划教材

供医学检验等专业使用

临床微生物学检验实验

主 编 付玉荣 张文玲

副主编 刘永华 唐 玲 张玉妥 李继红

编 者 (以姓氏笔画为序)

王 欣 广东医学院

付玉荣 潍坊医学院

吕厚东 济宁医学院

刘永华 包头医学院

刘靳波 泸州医学院

李秀真 济宁医学院

李继红 河北医科大学

杨维青 广东医学院

张欠欠 延安大学医学院

张文玲 中南大学湘雅医学院

张玉妥 河北北方学院

张美英 包头医学院

陈艺林 蚌埠医学院

胡佳杰 湖北中医药大学

钟志宏 湖南师范大学医学院

唐 玲 成都中医药大学

陶元勇 潍坊医学院

蒋月婷 广州医学院

程 曦 成都医学院

廖 涛 川北医学院



华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>

中国·武汉

内 容 提 要

本书是全国高等医药院校医学检验专业“十二五”规划教材。

全书共分7章,包括25个实验。根据临床微生物学检验的教学要求,遵循科学性、实用性、启发性和先进性的原则,密切以临床实际工作为导向,既系统全面地介绍了微生物检验基本技术,临床常见细菌、真菌、病毒的微生物学检验,又与时俱进,淘汰陈旧实验内容,增加许多新的实验内容,如增加了质量控制相关内容,并将质量控制的观念渗透到每个实验内容中;同时增加了研究创新型实验等内容,强化学生综合分析问题的能力、解决临床实际问题的能力以及创新能力。

本书可供医学检验等专业使用。

图书在版编目(CIP)数据

临床微生物学检验实验/付玉荣 张文玲 主编. —武汉:华中科技大学出版社,2013.8
ISBN 978-7-5609-9079-8

I. 临… II. ①付… ②张… III. 微生物学-医学检验-医学院校-教材 IV. R446.5

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 113642 号

临床微生物学检验实验

付玉荣 张文玲 主编

策划编辑:柯其成

责任编辑:柯其成

封面设计:范翠璇

责任校对:封力焯

责任监印:周治超

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉)

武昌喻家山 邮编:430074 电话:(027)81321915

录 排:华中科技大学惠友文印中心

印 刷:华中理工大学印刷厂

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:14.5

字 数:353千字

版 次:2013年8月第1版第1次印刷

定 价:35.00元



华中科技

本书若有印装质量问题,请向出版社营销中心调换
全国免费服务热线:400-6679-118 竭诚为您服务
版权所有 侵权必究

全国高等医药院校医学检验专业 “十二五”规划教材

编委会

主任委员 尹一兵 徐克前

委员(按姓氏笔画排序)

王庆林	湖南师范大学医学院	陈育民	河北工程大学医学院
王晓娟	佛山科学技术学院医学院	郑芳	武汉大学医学院
尹一兵	重庆医科大学	姜悦	中山大学中山医学院
刘永华	包头医学院	胡志坚	九江学院临床医学院
刘晓斌	延安大学医学院	赵建宏	河北医科大学
权志博	陕西中医学院	夏薇	北华大学
邢艳	川北医学院	徐克前	中南大学湘雅医学院
阮萍	绍兴文理学院医学院	贾天军	河北北方学院
吴俊英	蚌埠医学院	陶元勇	潍坊医学院
吴晓蔓	广州医科大学	陶华林	泸州医学院
张展	郑州大学第三附属医院	高荣升	佳木斯大学检验医学院
李艳	吉林医药学院	梁统	广东医学院
肖露露	南方医科大学附属南方医院	曾照芳	重庆医科大学
陈昌杰	蚌埠医学院		

总序

ZONGXU

2011年《国家中长期教育改革和规划纲要(2010—2020年)》的颁发宣告新一轮医学教育改革的到来。教育部要求全面提高高等教育水平和人才培养质量,以更好满足我国经济社会发展和创新型国家建设的需要。近年来,随着科学技术的进步,大量先进仪器和技术的采用,医学检验也得到飞速发展。医学检验利用现代物理的、化学的、生物的技术和方法,为人类疾病的预防、诊断、治疗以及预后提供重要的信息。它在临床医学中发挥着越来越重要的作用。据统计,临床实验室提供的医学检验信息占患者全部诊疗信息的60%以上,因此医学检验已成为医疗的重要组成部分,被称为临床医学中的“侦察兵”。基于此,国家教育部2012年颁布的专业目录将医学检验专业人才培养定位于高水平医学检验技术人才的培养。

这些转变都要求教材的及时更新,以适应新形势下的教学要求和临床实践。但是已经出版的医学检验教材缺乏多样性、个性和特色,不适应新的教学计划、教学理念,与临床实践联系不够紧密。已出版的相关教材与新形势下的教学要求和人才培养不相适应的矛盾日益突出,因此,加强相关教材建设已成为各相关院校的目标和要求,新一轮教材建设迫在眉睫。

为了更好地适应医学检验专业的教学发展和需求,体现最新的教学理念,突出医学检验的特色,在认真、广泛调研的基础上,在医学检验专业教学指导委员会相关领导和专家的指导和支持下,华中科技大学出版社组织了全国40所医药院校的近200位老师编写了这套全国高等医药院校医学检验专业“十二五”规划教材。本套教材由国家级重点学科的教学团队引领,副教授及以上职称的老师占85%,教龄在20年以上的老师占70%。教材编写过程中,全体参编人员进行了充分的研讨,各参编单位高度重视并大力支持教材的编写工作,各主编及参编人员付出了辛勤的劳动,这确保了本套教材的编写质量。

本套教材充分反映了各院校的教学改革成果和研究成果,教材编写体系和内容均有所创新,在编写过程中重点突出以下特点。

(1) 教材定位准确,体现最新教学理念,反映最新教学成果,紧密联系最新的教学大纲和临床实践,注重基础理论和临床实践相结合,体现高素质复合型人才的要求。

(2) 适应新世纪医学教育模式的要求,注重学生的临床实践技能、初步科研能力和创新能力的培养。突出实用性和针对性,以临床应用为导向,同时反映相关学科的前沿知识和发展趋势。

(3) 实验课程教材内容包括基础实验(基础知识、基本技能训练)、综合型实验、研究创新型实验(以问题为导向性的实验)等,所选实验项目内容新、代表性好、实用性强,反映新技术和新方法。

(4) 实现立体化建设,在推出传统纸质教材的同时,很多教程立体化开发各类配套电子出版物,打造为教学服务的共享资源包,为学校的课程建设服务。

本套教材得到了医学检验专业教学指导委员会相关领导专家和各院校的大力支持与高度关注,我们衷心希望这套教材能为高等医药院校医学检验教学及人才培养作出应有的贡献。我们也相信这套教材在使用过程中,通过教学实践的检验和实际问题的解决,能不断得到改进、完善和提高。

**全国高等医药院校医学检验专业“十二五”规划教材
编写委员会**

前言

QIANYAN

临床微生物学检验是医学检验专业本科、专科生的专业必修课程。临床微生物学检验近年来发展很快,新方法、新技术、新问题不断涌现,如各种耐药性细菌不断增多、医院感染越来越常见、引起临床感染的病原菌谱发生了较大改变等。为适应国内外新的形势和发展要求,有必要对临床微生物学检验实验内容进行改进和完善。根据高等医学院校医学检验专业临床微生物学检验专业理论课的教学需要,我们编写了这本《临床微生物学检验实验》作为与理论课配套的实验课教材,供医学检验专业本科、专科生使用,同时也可作为医学检验科工作人员和进修生、实习生的参考用书。

本实验教材的编写力求突破以往实验教材只是作为理论教材教学内容“求证”的旧模式,提出更高、更先进的目标理念与设计思路:密切以临床应用为导向;突出实验的实用性与时代性;弱化验证性实验,强化综合性实验,实验内容难度循序渐进,除了要求学生掌握临床微生物学基本实验技术之外,更强调学生综合分析问题的能力、解决临床实际问题的能力与创新能力的培养。

全书共分7章,包括25个实验。根据教学要求,遵循科学性、实用性、启发性和先进性的原则,密切以临床实际工作为导向,既系统、全面地介绍微生物学检验基本技术,临床常见细菌、真菌、病毒的微生物学检验等内容,又与时俱进,淘汰陈旧实验内容,增加许多新的实验内容,如增加了质量控制相关内容,并将质量控制的理念渗透到每个实验内容中;同时增加了研究创新型实验等内容,强化学生综合分析问题的能力、解决临床实际问题的能力以及创新能力。本书还在附录中列举了常见培养基、常用试剂和染液的配制等内容。

本教材的编写工作得到了各位编者和华中科技大学出版社的大力支持,同时也得到了临床微生物学检验界前辈们的热心指导和帮助,在此一并表示衷心的感谢。由于我们的学术水平和编写能力有限,尽管做了最大努力,但不足之处仍在所难免,恳请广大师生和读者批评指正。

付玉荣

2013年7月

目录

MULU

第一章 临床微生物学实验室规则与生物安全及应急处理措施	/ 1
第二章 临床细菌检验的基本技术与方法	/ 6
实验一 细菌分离培养技术	/ 6
实验二 细菌鉴定技术	/ 20
实验三 细菌药敏试验与耐药性检测	/ 39
实验四 医院感染的微生物监测	/ 49
实验五 临床微生物学检验的质量控制	/ 54
第三章 临床常见细菌培养与鉴定	/ 58
实验六 球菌	/ 58
实验七 肠杆菌科	/ 72
实验八 不发酵革兰阴性菌	/ 78
实验九 弧菌属和气单胞菌属	/ 83
实验十 革兰阳性杆菌	/ 87
实验十一 分枝杆菌属	/ 93
实验十二 厌氧性细菌	/ 98
实验十三 螺旋体	/ 106
实验十四 支原体、衣原体及立克次体	/ 116
第四章 临床常见真菌的培养与鉴定	/ 132
实验十五 临床真菌检验的基本技术和方法	/ 132
实验十六 临床常见真菌的鉴定	/ 138
第五章 临床常见病毒的培养与检测	/ 145
实验十七 临床病毒检验的基本技术和方法	/ 145
第六章 临床标本的微生物学检验	/ 155
实验十八 化脓与创伤标本的微生物学检验	/ 155
实验十九 尿液与粪便标本的微生物学检验	/ 161
实验二十 呼吸道标本的微生物学检验	/ 171
实验二十一 生殖道标本的微生物学检验	/ 178
实验二十二 组织标本的微生物学检验	/ 182
实验二十三 无菌体液的微生物学检验	/ 184
第七章 研究创新型实验	/ 193
实验二十四 选题、设计、实施与总结	/ 193



实验二十五 研究创新型实验参考选题	/ 196
附录 A 常用培养基的配制	/ 204
附录 B 常用试剂和染液的配制	/ 219
附录 C 临床常见细菌的菌种保存	/ 223

第一章 临床微生物学实验室 规则与生物安全及 应急处理措施

一、临床微生物学实验室规则

临床微生物学实验是检验与临床感染密切相关、具有一定生物危害的病原微生物的实验课,与其他专业实验课相比,接触到的微生物种类更多、数量更多、机会更大,若对其潜在的生物危害性认识不足、防范意识不强、应急处理措施不当,可能会造成实验室污染甚至感染。故广大师生务必高度重视,在严格遵守《病原微生物实验室生物安全管理条例》和《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》(WS233—2002)相关规定的基础上,结合教学实验室的特点,要求师生进入实验室后必须严格遵守以下规则。

(1) 进入实验室前应了解生物安全基本知识,了解实验室的大致布局、流动方向,了解实验仪器和器具的使用方法,熟悉本次实验课的目的、基本过程。必须遵守实验室的有关规定,听从老师的安排和指导。

(2) 衣着整齐进入实验室。所有进入临床微生物实验室人员必须穿着隔离衣或工作服、戴帽子,必要时戴手套、口罩;尽可能不带入个人物品,可允许携带仅限于实验课所需的随身携带的纸笔等;其余物品如书籍、背包、衣物一律不得带入实验室。鞋子应防滑、防渗、不露脚趾,尽可能不穿高跟鞋进入。

(3) 实验室内物品应摆放整齐,保持清洁卫生,每天随时进行整理。实验台面、地面等用消毒剂擦拭,并每天用紫外灯照射进行空气消毒。

(4) 实验进行过程中不得拨打、接听手机、电话,不得用手机接发短信和上网,应将其关闭或设置为静音状态。

(5) 实验室工作区内绝对禁止吸烟,点燃的香烟是易燃液体的潜在火种,香烟、雪茄或烟斗都是传染细菌和接触毒物的途径。

(6) 实验工作区内禁止使用化妆品进行化妆,但允许并建议经常洗手的实验人员使用护手霜。不得佩戴戒指、耳环、手镯、项链等首饰和手表。

(7) 实验过程中,指导老师必须注意力高度集中,全身心投入学生实验中,并随时解答疑问,指导技术操作,除非特殊情况外,一般不得擅自离岗,如到办公室休息、饮水、会客等。实验小组内各同学之间应分工明确、团结协作、互相学习,认真观察实验现象,记录、分析数据,不得嬉戏打闹、大声喧哗。

(8) 微生物实验室的教学用标本、菌株必须进行详细登记。一般不采用有传染性的标本,上实验课期间与教学无关人员非经允许不得入内。

(9) 微生物实验课进行过程中,学生应按照实验步骤要求有序进行,非经老师许可一



般不得改变、增减操作程序、步骤,确有必要临时变更操作时,需向老师说明自己的意图,并在老师指导下进行。

(10) 实验工作区内不得有食物、饮料及存在“手-口”接触可能的其他物质,实验室内的冰箱禁止存放食物。专用存放食物的冰箱应放置在允许进食、喝水的休息区内。

(11) 大型仪器、设备、精密仪器由专人负责保管、登记、建档,仪器设备的使用者需经专业技术培训。仪器设备应在检定和校准的有效期内使用,并按照检定周期的要求进行自检或强检,对使用频率高的仪器按规定在检定周期内进行期间核查。

(12) 处理腐蚀性或毒性物质时,须使用安全镜、面罩或其他保护眼睛和面部的防护用品;工作人员在实验室的危险区内不要佩戴隐形眼镜,除非同时使用护目镜或面罩;使用、处理能够通过黏膜和皮肤感染的试剂,或有可能发生试剂溅溢的情况时,必须佩戴护目镜、面罩或面具式呼吸器。

(13) 及时处理在实验过程中产生的污染物,严防病原微生物的扩散,微生物实验室的废弃物必须高压灭菌。必须在生物安全柜内进行细菌暴露性操作,严防操作产生可能含有高浓度的致病菌或真菌的气溶胶。

(14) 学生应掌握“六步洗手法”,在实验完成以后,用液体洗手液仔细洗手,不要使用肥皂,洗手后甩干或用卫生纸巾擦手,或用吹干机吹干,不得使用公用毛巾。

(15) 微生物实验室应建立生物安全事故处理预案,并定期进行考核、演练,并有启动预案的机制。

二、临床微生物学实验室的生物安全

(1) 实验室的设立单位应成立实验室生物安全委员会,并制订科学、严格的管理制度、职责、规程,定期对有关生物安全规定落实情况进行检查,定期对实验室设备、设施、材料等进行检查、维护和更新,确保实验室生物安全工作符合国家标准。

(2) 微生物实验室分区 为确保实验人员的生物安全,必须有良好的工作环境。根据实验室的具体工作情况将其分为“清洁区”和“非清洁区”,在“清洁区”和“非清洁区”之间设“缓冲区”。

被指定为“清洁区”的区域,应保持清洁,并规范预防措施,防止电话、视频显示器终端、键盘、门柄及其他经常被手或手上的手套触摸的物品的污染,要求工作人员在触摸设备前取下手套,制订仪器设备和工作面的常规消毒和清洁制度和对严重污染的紧急处理措施办法。被指定为“非清洁区”的区域,允许戴手套接触所有物品(如电话、门柄、计算机终端和其他物品),所有这些物品的表面都被认为是不清洁的。未戴手套的人员如果使用该区域内的电话、计算机终端或其他设备,应该戴上手套,或在使用后立即彻底洗手。“清洁区”和“非清洁区”都应保持整洁。实验台应至少每天清洁、消毒一次,如有必要可以多次清洗、消毒。在处理溅溢的样品或严重污染的工作面时,应戴上手套和其他个人防护装备、使用相应合适的清洁剂清除所有的溅溢物。

(3) 实验室感染 在实验室操作过程中,可能接触而被感染的微生物有:病毒、细菌、真菌、支原体、螺旋体等。感染途径如下。

① 空气传播:实验过程中产生的气溶胶,可通过空气传播。产生气溶胶的环节有:取下装有标本试管的塞子、溶液洒落台面、用未加塞子的试管进行离心、菌液制备、细菌接种

等。

② 经口传播:用口吸移液可能导致微生物进入人体引起传染。传染也可通过间接途径,如饮食或吸烟前没有彻底洗手引起“手-口”传染。

③ 意外损伤:偶然的针刺、碎玻璃划伤和动物咬伤均可通过直接接种引起传染。

④ 黏膜接触一些病原体:包括肝炎病毒和人类免疫缺陷病毒(HIV),能够通过与黏膜(如眼结膜)的直接接触进入人体,所以在擦拭眼睛、更换隐形眼镜或使用化妆品前应彻底洗手。

⑤ 节肢动物媒介:蚊、蜱、蚤和其他体外寄生虫都是潜在的传染源,特别是当室内喂养动物时。

(4) 生物安全基本要求。

① 细菌培养常规操作过程中会产生气溶胶,这些操作包括混匀、超声雾化和剧烈搅拌等,故应使用生物安全柜。

② 实验室应使用机械移液装置,绝对禁止用口吸移液。

③ 使用注射器和针具时应防止受伤。所有锐利物品在使用后都应放入专用锐器盒内,用完后拧紧盖子整体按照医疗废物进行处理。

④ 血液或其他体液发生泄漏,以及实验完成后,应使用适宜的消毒剂(如含氯消毒剂等)对实验室工作台面进行表面消毒。

⑤ 被血液或其他体液污染的设备在实验室内或外送商家进行维修之前,应先进行清洁和消毒。无法彻底消毒的设备必须贴上生物危害的标签。

⑥ 手或皮肤在接触血液或其他体液后必须立即彻底清洗,实验结束后或取下手套后应立即洗手,在离开实验室之前应脱下隔离衣等所有的个人防护装备,并存放在指定地方。

(5) 生物安全柜 生物安全柜是操作具有感染性的实验材料时,用于保护操作者本人、实验内外环境及实验材料,使其避免暴露于上述过程可能产生气溶胶和溅出物而设计的一种实验室安全防护设备。它是临床微生物实验课教学控制生物危害所必需的设备之一,可根据需要选择合适的型号,并应根据不同型号产品要求进行安装、使用和维修。标本划线接种、细菌琼脂涂布、细菌涂片、菌液制备、标本离心、匀浆涡旋振荡等是产生气溶胶的重要环节。所以进行这些操作时务必小心谨慎,尽可能在生物安全柜内进行。实验室应制订生物安全柜的维护规程,并适时更换滤器。生物安全柜应放置在远离气流不稳定的地方。

(6) 其他安全要求 实验室应有自动烟雾和热量探测及报警系统,并确保正常运行。消防器材位于固定位置并能正常使用,应定期对重点防火部位、易燃易爆化学品使用情况进行检查,及时消除隐患,并定期进行火灾紧急事件处置的培训和演练。实验室内禁止乱拉临时电源线,应定期对实验室电气安全、仪器设备等进行检查,及时发现、排除安全隐患。

三、临床微生物学实验室应急处理措施

为预防微生物实验室职业暴露发生,规范发生职业暴露时处理原则、报告和登记流程等,制订临床微生物学实验室应急处理措施。并要求所有参与实验课教学人员认真遵守。

1. 职责

(1) 实验室操作人员在工作中发生职业暴露,须按照本规定进行处理和报告。



- (2) 实验室负责人按照规定组织和进行职业暴露发生后的控制。
- (3) 实验室负责人负责组织实验人员职业暴露处理的培训和考核,并保存有关记录。
- (4) 实验室生物安全检查人员负责督察日常工作中生物安全工作的执行情况。

2. 步骤

(1) 实验室发生职业暴露后,按照既往进行的该种污染物的生物安全危害度评估结果,快速有效地对意外暴露人员进行紧急医学处置;对污染区域进行有效控制,最大限度地清除和控制污染物对周围环境的污染和扩散;进行流行病学调查并按照暴露人员的医学观察等的原则和步骤进行处理。

(2) 根据既往进行的生物安全危害度的评估和暴露的程度,及时进行现场紧急医学处置,消除或最大限度降低病原微生物对暴露人员的伤害;同时,有效地对污染区域进行防控,最大限度地防止污染物对周围人员和环境的污染。

(3) 一般性的小型事故可在紧急医学处置后,立即向实验室负责人和实验室生物安全领导小组报告事故情况和处理方法,以及时发现处理中的疏漏之处,使处理尽量完善妥当。

(4) 当重大事故发生时,在进行紧急医学处置的同时,要立即向实验室负责人和系领导、校领导报告情况,并立即协调现场紧急处理和周围环境污染防控,协调医学专家评估职业暴露的危害性和对暴露人员的伤害程度,对药物可以治疗和预防该污染物感染的,力争在暴露后最短时间内开始预防性用药;留取暴露人员相应的标本备检,并同时同时进行医学观察。

3. 评估暴露级别

(1) 一旦发生意外事故,实验室负责人和教师应立即到达现场,并对事故进行详细登记,记录事故发生的时间、地点、经过、暴露方式、损伤部位、程度,接触物种类(培养液、血液或其他体液)和含有 HIV 的情况,处理方法及处理经过等。

(2) 评估是否采用药物预防疗法。若是,则详细记录治疗用药情况、首次用药时间(暴露后几小时或几天)、药物毒副作用情况(包括肝、肾功能化验结果),定期检测的日期、检测项目和结果。

(3) 记录对暴露现场和周围环境防控污染的方法、实施形式、人员、范围,评估防控处理的效果;总结和评估病原微生物实验室工作程序中是否存在不当,发生暴露人员实验操作等过程是否存在失误,以及整改措施。

(4) 意外事故现场处理方法:工作人员发生意外事故时,如针刺损伤、感染性标本溅及体表或口鼻眼内,或污染实验台面等均视为安全事故,应立即进行紧急医学处置(根据事故情况采用相应的处理方法)。根据生物安全危害度和暴露程度,现场初步评估职业暴露危害程度和选择处理方式。

4. 化学污染

- (1) 立即用流动清水冲洗被污染部位。
- (2) 立即到急诊室就诊,根据造成污染的化学物质的不同性质用药。
- (3) 在发生事件后的 48 h 内向有关部门汇报,并报告感染管理科。

5. 针刺伤

(1) 被血液、体液污染的针头或其他锐器刺伤后,应立即用力捏住受伤部位,向离心方向挤出伤口的血液,不可来回挤压,同时用流动水冲洗伤口。

- (2) 用 75% 酒精或碘伏消毒伤口,并用防水敷料覆盖。
- (3) 意外受伤后必须在 48 h 内报告系领导,并作 HIV、HBV 等的基础水平检查。
- (4) 可疑被 HBV 感染的锐器刺伤时,应尽快注射抗乙肝病毒高效价抗体和乙肝疫苗。
- (5) 可疑被 HCV 感染的锐器刺伤时,应尽快在被刺伤后做 HCV 抗体检查,并于 4~6 周后检测 HCV 的 RNA。
- (6) 可疑被 HIV 感染的锐器刺伤时,应及时找相关专家就诊,根据专家意见预防性用药,并尽快检测 HIV 抗体,然后根据专科医生建议行周期性复查(如 6 周、12 周、6 个月等)。在跟踪期间,特别是在最初的 6~12 周,绝大部分感染者会出现症状。

6. 皮肤、黏膜、角膜被污染

- (1) 皮肤若意外接触到血液、体液或其他化学物质时,应立即用肥皂和流动水冲洗。
- (2) 若患者的血液、体液意外进入眼睛、口腔,立即用大量清水或生理盐水冲洗。
- (3) 及时到医院急诊室就诊,请专科医生诊治并向系领导报告。

7. 微生物污染处理

- (1) 棉质工作服、衣物有明显污染时,可随时用有效氯 500 mg/L 的消毒液,浸泡 30~60 min,然后冲洗干净。
- (2) 各种表面若被明显污染,用 1000~2000 mg/L 有效氯溶液擦拭污染表面,并使消毒液浸过污染表面,保持 30~60 min,再擦除,拖把或抹布用后浸于上述消毒液内 1 h。
- (3) 仪器污染应考虑消毒方法对仪器的损伤和对检测项目的影响,选用适当的方法。

(陶元勇 李秀真)

第二章 临床细菌检验的基本技术与方法

实验目的 实验原理 实验材料 实验步骤 实验结果 实验讨论

随着现代医学及相关科学技术的发展,各学科之间相互交叉、渗透,临床细菌检验技术也已经深入到细胞、分子和基因水平,许多新技术、新方法、新设备已在临床细菌检验中得到广泛的应用。尽管如此,在绝大多数情况下,通过细菌分离培养和鉴定,对细菌感染性疾病进行病原学诊断仍然发挥着极其重要的作用。利用临床细菌检验的基本技术与方法,准确、快速检验和鉴定临床标本中的感染细菌,并对其进行药敏试验和耐药性监测,可为感染性疾病的临床诊断、治疗和流行病学调查研究等提供科学依据。因此,系统学习和掌握临床细菌检验的基本技术与方法是非常必要的。



实验一 细菌分离培养技术

细菌分离培养技术主要包括培养基的制备技术、接种技术、培养方法以及生长现象的观察和细菌计数等,主要用于临床标本(如血液、痰、粪便等)或培养物中有多种细菌时对某一种细菌的分离。通过分离,可使细菌在平板上分散生长,便于观察单个菌落特性,也易于挑取单个菌落,进行生化鉴定。

一、常用培养基的制备技术及应用

(一) 目的要求

- (1) 掌握培养基的概念和分类。
- (2) 掌握常用培养基制备的一般程序。
- (3) 熟悉常用培养基的制备技术和用途。

(二) 试验原理

培养基(culture medium)是根据微生物生长繁殖所需要的一定比例的营养物质(碳源、氮源等)、氢离子浓度(pH 值)及渗透压等条件,用人工方法制成的无菌营养基质。主要用于微生物分离培养、生化鉴定、药敏试验和保存菌种等。

培养基按物理性状的不同,可分为固体、半固体和液体培养基;按性质和用途的不同,又可分为基础培养基、营养培养基、鉴别培养基、选择培养基和特殊培养基。根据物理性状和用途等的不同,常将培养基分装于试管或平皿等容器中。

常用培养基制备的一般程序:调配成分→溶解→校正 pH 值→过滤→分装→灭菌→质量检验→保存。配制培养基时可以按照培养基配方调配各种基本成分,也可购买半成品的

商品培养基干粉制剂直接配制。

(三) 器材与试剂

1. 试剂

普通营养琼脂干粉、脱纤维羊血、半固体培养基干粉、SS 培养基干粉、克氏双糖铁培养基干粉、1 mol/L NaOH 溶液、麦康凯培养基成分(蛋白胨、氯化钠、胆盐、乳糖、5 g/L 中性红水溶液、琼脂粉)、蒸馏水。

2. 器材

小型药物天平、药匙、称量纸、三角烧瓶、量筒、吸管、精密 pH 值试纸、试管、硅胶塞、牛皮纸(或报纸)、棉线、玻璃棒、玻璃纸、无菌平皿、高压蒸汽灭菌器、微波炉等。

(四) 步骤与方法

1. 常用培养基制备的一般程序及方法

1) 调配成分 根据培养基配方或用法,准确计算、称量所需培养基各基本成分或干粉制剂,装于三角烧瓶中,加入定量蒸馏水充分混合。

2) 溶解 将盛有混合物的三角烧瓶置于水浴锅(或流动蒸汽灭菌器、微波炉)中加热溶解,使之呈半透明状。

3) 校正 pH 值 即将培养基 pH 值校正到适合细菌生长的最适 pH 值,一般病原菌的最适 pH 值为 7.2~7.6。常用 1 mol/L NaOH 溶液和 1 mol/L HCl 溶液校正培养基的 pH 值(注意:高压灭菌后,培养基的 pH 值可能会波动 0.1~0.2);校正培养基 pH 值的方法常用精密 pH 值试纸法、比色法和电子 pH 计法等。

4) 过滤 培养基中若存在杂质或沉淀物,则需要过滤澄清。液体培养基用滤纸趁热过滤,固体培养基用双层纱布夹脱脂棉趁热过滤(目前使用的培养基干粉一般略去此步骤)。

5) 分装

(1) 液体培养基、半固体培养基 灭菌前分装于洁净试管中,分装到试管的下 1/4~1/3 处,加塞,取 5~10 支试管,用牛皮纸盖帽,棉线扎捆,标明培养基名称、制作日期,灭菌后直立放置。

(2) 固体斜面培养基 灭菌前分装于洁净试管中,分装到试管的下 1/3~1/2 处,加塞,取 5~10 支试管,用牛皮纸盖帽,棉线扎捆,标明培养基名称、制作日期。灭菌后趁热摆成斜面,斜面长度为试管长度的 2/3,并保持斜面下端距离试管底有 1 cm 以上的柱高,同时斜面上端距离试管塞 1 cm 以上。

(3) 琼脂高层培养基 灭菌前分装于洁净试管中,分装到试管的下 2/3 处,加塞,取 5~10 支试管,用牛皮纸盖帽,棉线扎捆,标明培养基名称、制作日期,灭菌后直立放置。

(4) 固体平板培养基 将培养基分装于三角烧瓶(培养基的量要小于三角烧瓶最大容量),先用玻璃纸或棉塞封口,再用牛皮纸盖帽、棉线扎口。灭菌后将培养基冷却至 50℃ 左右,以无菌操作,倾注于平皿内(内径为 9 cm 的平皿倾注 15~20 mL 培养基),立即水平旋转 1~2 周,使培养基均匀平铺于皿底。待培养基凝固后,在皿底面上标明培养基名称、制作日期,底上盖下倒置保存。

6) 灭菌 根据培养基中营养物质耐热性的不同,分别采取相应的物理灭菌法。



(1) 培养基成分均耐高温时,常用高压蒸汽灭菌法,这是最常用、最可靠的培养基灭菌方法。常用灭菌条件为 103.43 kPa (121.3 °C) 15~20 min;含糖培养基用 68.95 kPa (115.6 °C) 10~15 min,以免破坏糖类物质。

(2) 培养基中含有不耐高热营养物质(如糖类、明胶和牛乳等)时,常用流动蒸汽灭菌法,方法是 80~100 °C 加温 30 min,每天 1 次,连续 3 d。

(3) 培养基中富含蛋白质(如血清或鸡蛋清)时,需用血清凝固器灭菌,方法是将待灭菌的培养基摆放在血清凝固器内(一般做成斜面),第一天 75 °C 加热 30 min,第二天 80 °C 加热 30 min,第三天 85 °C 加热 30 min,在 3 次灭菌间隙将培养基取出,置于 35 °C 恒温箱中过夜。

(4) 对液态高营养的不耐热培养基,如血清、细胞培养液等,可采用滤过除菌。

7) 质量检验 制备好的培养基须经性状检查、无菌检验和效果检验,均合格才可使用。

(1) 性状检查 液体培养基外观应清澈透明;半固体培养基应质地均匀,呈半固态;固体斜面培养基应质地均匀,凝固后斜面稳定,不下滑;平板培养基应质地均匀,表面光滑、平整,薄厚适宜。

(2) 无菌检验 将制备好的培养基置于 35 °C 培养 24 h,以无任何细菌生长为合格。

(3) 效果检验 将已知的标准菌株接种于待检培养基中,经培养后检查标准菌的生长繁殖状况和生化反应是否与预期的结果符合。

8) 保存 制备好且标记清楚的培养基置于 4 °C 冰箱保存备用,严格灭菌后的培养基一般可保存 1 周以上,但不宜过久。注意,平板培养基应底上盖下倒置保存,以防止盖内水蒸气落在培养基表面,使得培养基表面黏滞易污染且不易接种;液体、半固体等培养基应直立保存。

2. 常用培养基的制备技术

1) 营养肉汤培养基 用量筒准确量取所需蒸馏水,先倒入三角烧瓶一部分,随后按照营养肉汤成分配方(见附录 A)或干粉制剂说明书用法准确计算、称量所需粉剂,置于已经盛有部分蒸馏水的三角烧瓶中,最后将量筒内剩余蒸馏水全部倒入三角烧瓶,充分混匀、加热溶解后,用 1 mol/L NaOH 溶液校正 pH 值到 7.5~7.6(高压后可降到培养基要求的 7.4),分装于试管中,加塞扎捆标记后,高压蒸汽 121 °C 灭菌 20 min。取出后直立放置,待冷却后置于 4 °C 保存备用。可用于一般细菌的增菌培养。

2) 营养琼脂培养基 用量筒准确量取所需蒸馏水,先倒入三角烧瓶一部分,之后按照营养琼脂成分配方(见附录 A)或干粉制剂说明书用法准确计算、称量所需粉剂,置于已经盛有部分蒸馏水的三角烧瓶中,最后将量筒内剩余蒸馏水全部倒入三角烧瓶,充分混匀,加热煮沸溶解后呈半透明状,校正 pH 值到 7.2~7.4。若制作固体斜面则先分装于试管中,加塞扎捆标记后高压蒸汽 121 °C 灭菌 20 min,趁热摆成斜面,凝固后置于 4 °C 保存,可用于一般细菌菌种的传代保存;若制作固体平板,则直接封装在三角烧瓶中,高压蒸汽 121 °C 灭菌 20 min,灭菌后以无菌操作倾注平板,待凝固后标记,倒置于 4 °C 保存,可用于对营养要求不高细菌的分离培养和纯化。

3) 半固体营养琼脂培养基 配方见附录 A,具体做法同肉汤培养基。可用于观察细菌的动力和保存菌种。