

2010-9-20

小便标本的分离培养鉴定

药物敏感实验

一、小便标本的分离培养及鉴定

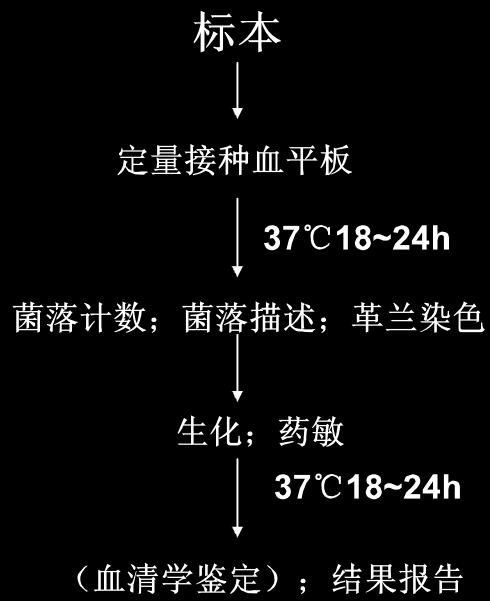
● 目的要求

掌握小便标本细菌培养及鉴定方法。

材料

- 1. 小便标本
- 2. 培养基：血平板、生化管 (IMViC、KIA) .

小便标本检验程序



实验内容

小便标本分离培养及鉴定

- 1. 取定量小便标本10ul用连续划线法接种于血平板。（每人一个血平板，取一环标本接种）
- 2. 大肠埃希菌接种生化管。KIA、IMViC（2人一套）

1. 计数菌落

1

$$\text{每毫升尿液的菌数} = \text{平板上的菌落数} \times \frac{1}{\text{接种环含尿量 (ml)}}$$

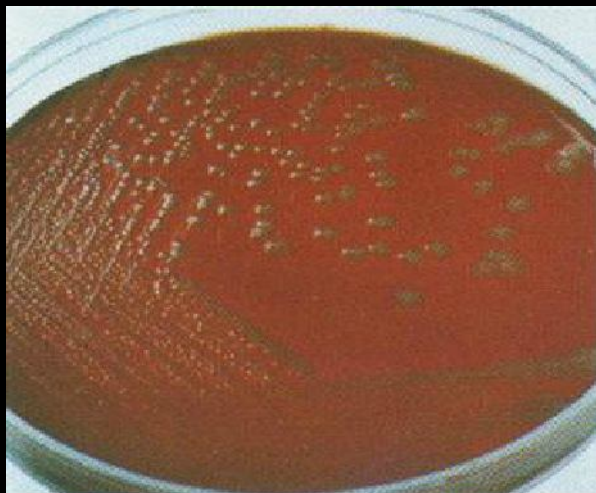


图 9-2 大肠埃希菌在血琼脂平板上的菌落特征 (18 - 24h)



SS琼脂平板

长乐检验

3. 生化鉴定: IMViC

KIA



大肠埃希菌IMViC (++)

KIA (A/A, 气体+, H₂S-)

二、药物敏感实验

- 目的要求

掌握药敏实验的原理、操作方法、结果的判读及临床意义。

原理：（K-B法）

- 将含有定量抗菌药物的纸片贴在已接种测试菌琼脂平板上，纸片中所含的药物不断向纸片周围区域扩散，形成浓度递减的梯度，在纸片周围抑菌浓度范围内测试菌的生长被抑制，从而形成无菌生长的透明圈即为抑菌圈。抑菌圈大小反映测试菌对测定药物的敏感程度，并与该药对测试菌的MIC呈负相关。

材料

1. 菌液 大肠埃希菌，金黄色葡萄球菌。
(0.5麦氏/ml)
2. 药敏纸片 青霉素G, 10u/片; 庆大霉素, 10u/片; 链霉素, 10ug/片; 诺氟沙星, 10ug/片。
3. MHA平板每两人一个, 4人/组 (2人接种大肠埃希菌, 2人接种金黄色葡萄球菌。)

方法

1. 用无菌棉签蘸取0.5麦氏单位的大肠埃希菌菌液和金黄色葡萄球菌菌液，在试管壁挤去多余的菌液，在MHA表面均匀涂布接种3次，每次旋转平板 60° ，最后沿平板内缘涂抹一周。
2. 用无菌镊子将青霉素；庆大霉素，；链霉素；诺氟沙星药片紧贴于琼脂表面， 37°C 培养18-24h。
3. 结果：量取抑菌圈直径。

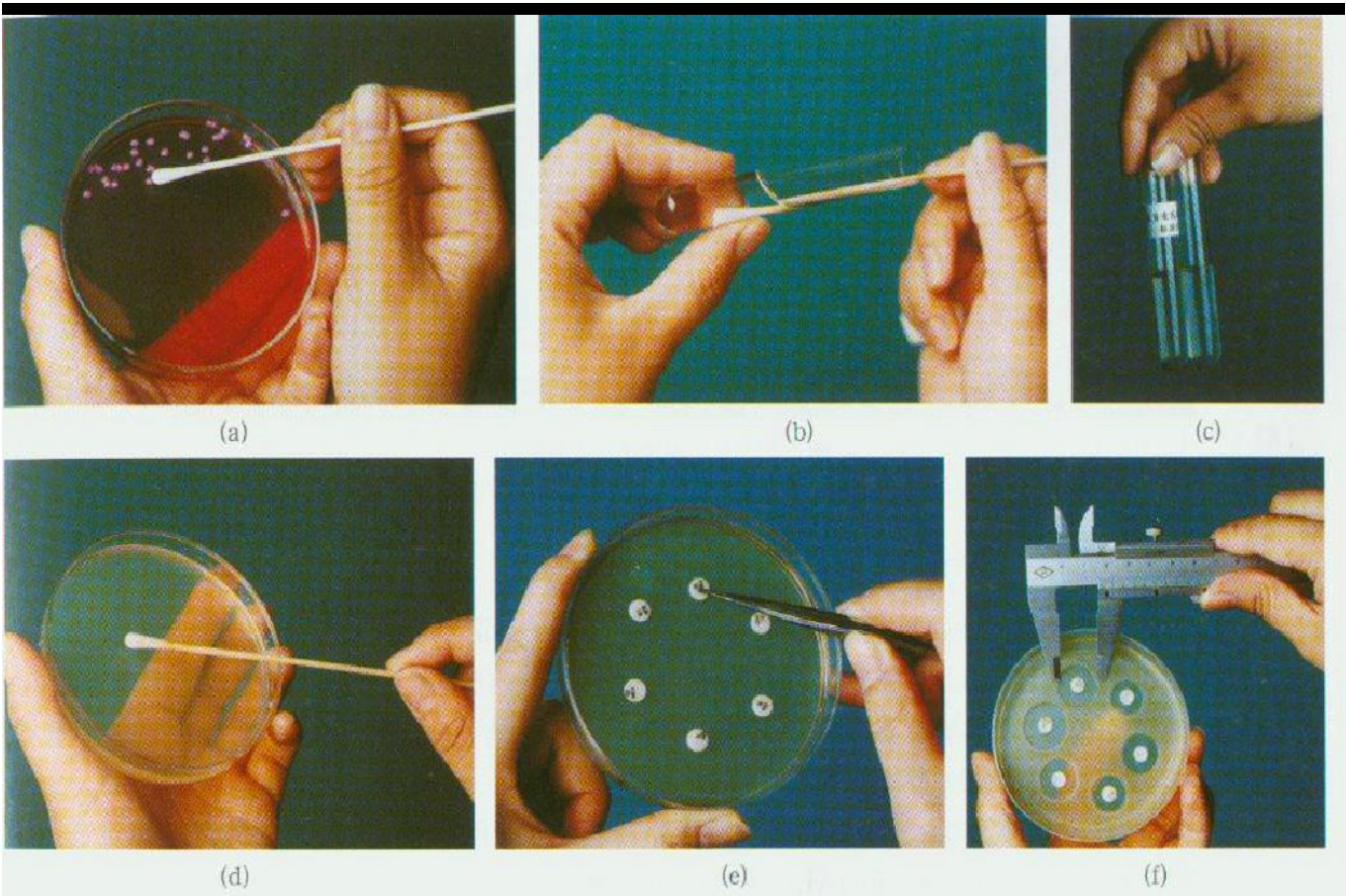


图 3-54 Kirby-Bauer 法试验程序

(a) 挑取菌落 (b) 转种肉汤 (c) 比浊 (d) 涂布平板上 (e) 放置药敏纸片 (f) 量取抑菌圈大小

抗生素	每片含药量	抑菌环直径(mm)		
		耐药	中度敏感	敏感
诺氟沙星	10ug	≤12	13-16	≥17
青霉素	10u	≤11	12-28	≥29
链霉素	10ug	≤11	12-14	≥15
庆大霉素	10ug	≤12	13-14	≥15

试管稀释法

原理

以水解酪蛋白（MH）液体培养基将抗生素做不同浓度的稀释，然后种入待检菌，定量测定抗菌药物对被测菌的最低抑菌浓度（MIC）或最低杀菌浓度（MBC）。

方法

管号	1	2	3	4	5	6
肉汤(ml)	1.8	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
青霉素(1万U/ml)	0.2	1.0	1.0	1.0	1.0	弃1.0
大肠埃希菌菌液 (ml) (或金黄色葡萄球菌菌液)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
青霉素U含量	1000	500	250	125	62.5	—

37℃ 18-24h

结果

对照管设置

1. (培养基对照)
2. (测试菌+培养基对照)
3. (测试菌+培养基+药物稀释液对照)

1 2 3

对照管 对照管 对照管

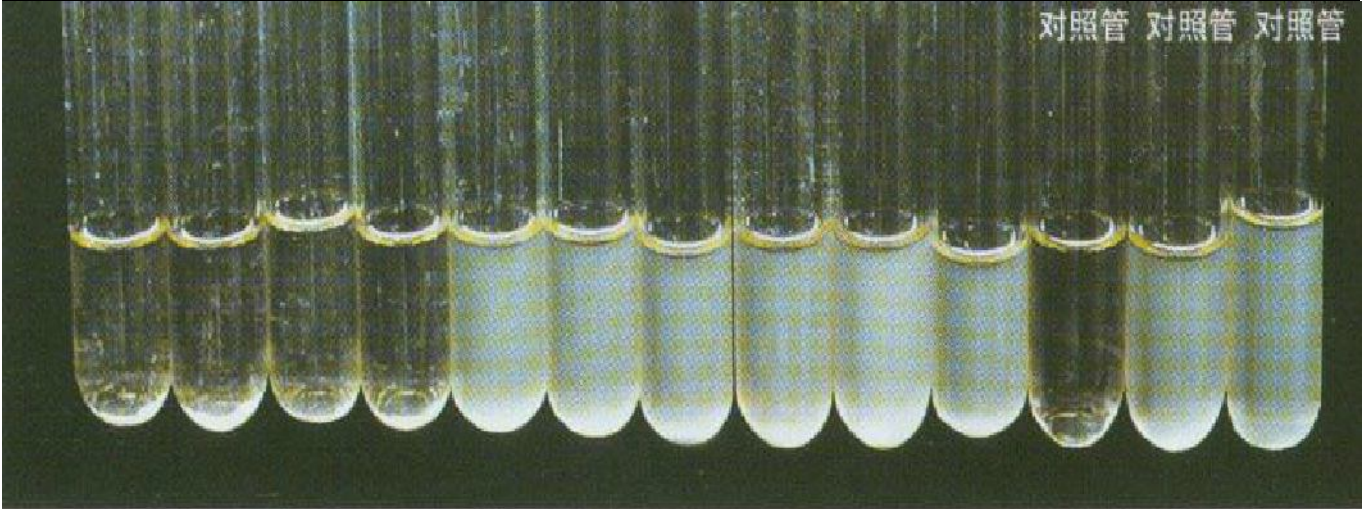


图 3-55 MIC 测定法的试验结果

• 不出现肉眼可见生长的最低药物浓度为该药对测试菌的MIC。

MIC的观察及MBC试验

- 将下列无菌生长的1~4管转平板（如图所示）

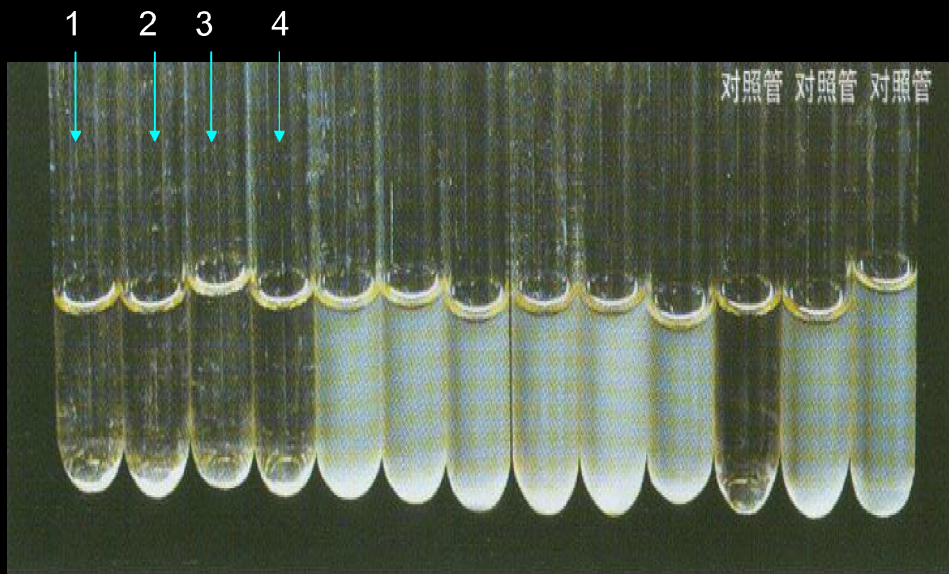
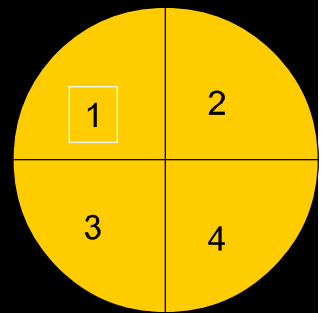
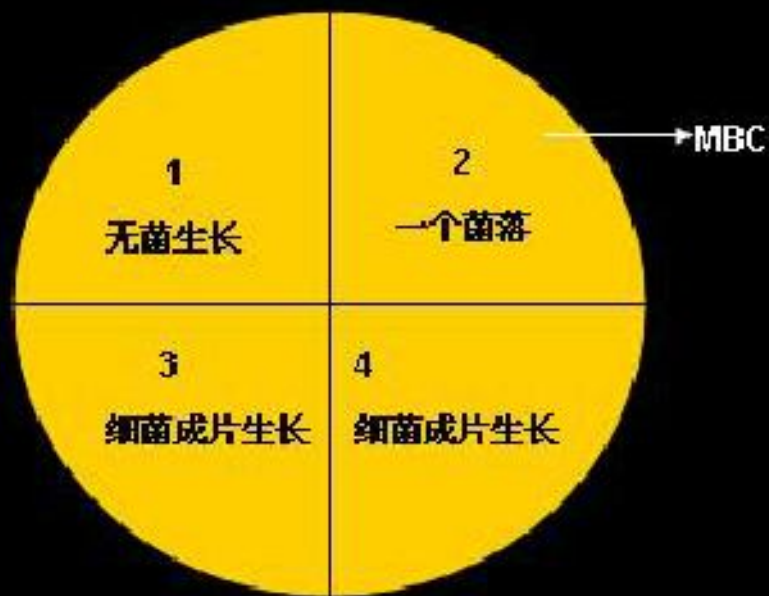


图 3-55 MIC 测定法的试验结果

左起第四管为药物最低浓度而无细菌生长，即待检菌的 MIC。



MBC结果判读



2011-11-1

- 一、小便标本分离培养鉴定
- 1. 小便标本菌落计数、革兰染色、镜检。
- 2. 观察小便生化结果
- 二、观察K-B法结果（量抑菌环直径）

1. 计数菌落

1

$$\text{每毫升尿液的菌数} = \text{平板上的菌落数} \times \frac{1}{\text{接种环含尿量 (ml)}}$$

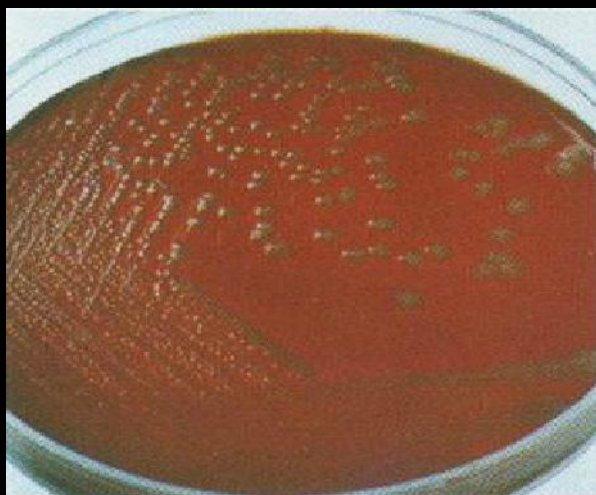


图 9-2 大肠埃希菌在血琼脂平板上的菌落特征 (18 - 24h)



SS琼脂平板

长乐检验

2. 涂片革兰染色



大肠埃希菌革兰染色

3. 生化鉴定：IMViC

KIA



大肠埃希菌IMViC (++)

KIA (A/A, 气体+, H₂S-)

二、 纸片扩散法 (K-B法)

结果：量取抑菌圈直径。

(可用直尺代替)

