

畜牧兽医省级高水平专业群建设成果



广东茂名农林科技职业学院

Guangdong Maoming Agriculture & Forestry Technical College

## 畜牧兽医专业群核心课程技能考核方案

课程名称：动物微生物与免疫技术

制订部门：动物医学教研室

制订时间：2022年2月

广东茂名农林科技职业学院动物科学系

# 《动物微生物与免疫技术》实训项目技能考核方案

## 项目一 常用玻璃器皿及仪器的使用

### 一、技能目标

能识别、使用动物微生物检验中主要的玻璃器皿及设备

### 二、教学资源准备

#### （一）材料与工具

主要玻璃器皿：烧杯、三教烧瓶、载玻片、量筒、凹玻片、盖玻片、试管、平皿吸管、微型凝集反应板等。

主要仪器：超净工作台、电热恒温培养箱、电热恒温鼓风干燥箱、高压蒸汽灭菌器、离心机等。

#### （二）教学场所

动物微生物检验实验室

#### （三）师资配置

实训时 1 名教师指导 20 名学生，技能考核时 1 名教师指导 10 名学生。

### 三、原理与知识

#### （一）玻璃器皿

玻璃器皿的准备：用过的玻璃器皿依次经过消毒或灭菌、洗涤、干燥、包装、灭菌处理；新购入玻璃器皿的处理是在用前用 1%-2% 盐酸浸泡 1 天，然后再用洗衣粉水洗涤，最后用清水冲洗干净。

#### （二）仪器

##### 1. 电热恒温箱：

用途：培养细菌

温度范围：37-39℃

使用方法：

（1）加水

（2）接上电源插头，开启电源开关（绿灯亮，表示电源已接通）。

（3）调节温度至所需要的温度：37℃。

（4）待温度稳定，再将待培养物品放入。

（5）培养结束，取出物品，并切断电源。

（6）若长期不使用，将箱内水放出来。

##### 2. 电热恒温鼓风干燥箱

用途：用于玻璃器皿、高压物品、金属制品等的干燥。

温度范围：10-250℃

使用方法：

（1）接通电源。

（2）调节好温度 55~60℃。

（3）干燥完毕，再打开箱门，取出物品。

（4）切断电源。

##### 3. 高压蒸汽灭菌器

类型：立式

使用方法：

(1) 确认电源的正确连接，将灭菌锅右侧的电源开关打开，然后按下“POWER ON/OFF”键开机。

(2) 确认锅内压力为 0 的情况下，轻轻向下按灭菌器盖的把手，脚踏盖锁解除踏板，把盖打开。向灭菌锅内注水(蒸馏水)直到看到水漫过底盘中心孔的横杠(大约需要 2.0 升水)。

(3) 放置待灭菌的物品，盖上盖子到磁封条封好，将盖锁住。注意不要过满，不要有单独的小型颗粒。

(4) 选择运行模式(一般均选择普通灭菌模式，选其他模式需要请示安全员)。

(5) 启动灭菌程序：

a. 确定放气瓶内的水位在“HIGH”和“LOW”之间；

b. 确定排水瓶内的水位足够低，不会碰到排气管的顶端；

c. 按“START/STOP”键启动灭菌程序。

(6) 灭菌完成后，温度降至 90 度以下(锅内压力为 0)的情况下才能打开盖子，拿出灭好的物品。

(7) 按“POWER ON/OFF”键断开电源。

注意事项：

(1) 在压力到达 0 MPa 之前，不打开灭菌器盖。

(2) 压力表出现异常时，应停止使用。

(3) 打开灭菌锅锅盖时，应充分注意来自灭菌室内的蒸气，防止烫伤。

(4) 放置灭菌物品时要注意不要碰触损伤内胆中的温度探头。

(5) 当放气瓶中的水位高于“HIGH”标记时，在灭菌前将水倒出至“LOW”标记。

(6) 当锅内的水位低于底盘中心的横杠时，应当补加适量蒸馏水至漫过横杠即可。

(7) 为避免阻塞管系，应经常换水；该设备准备长时间停用时，要将灭菌锅内的水排空。

4. 电热水浴锅

用途：水域加热，例如：细菌液体。

5. 离心机

用途：用于沉淀细菌、红细胞、寄生虫卵。

使用方法：

(1) 接通电源。

(2) 放入离心管，要求对称放入离心管且离心管重量相等。

(3) 盖上盖子。

(4) 打开开关，开始加速，由低至高；离心结束时，转速由高至低。

(5) 取出离心管。

## 四、技能考核的内容

1. 玻璃器皿、仪器的认识

2. 玻璃器皿、仪器的使用

## 五、操作方法及考核标准

### (一) 操作方法与步骤

1. 展示动物微生物实验室常用器皿及仪器让学生识别。
2. 边展示边讲授。
3. 使用

## (二) 技能考核标准

考核内容及分数分配	操作环节与要求	评分标准		考核方法	熟练程度	时限
		分值	扣分依据			
1. 动物微生物实验室常用玻璃器皿及仪器的认识 2. 玻璃器皿、仪器的使用	1. 玻璃器皿、仪器的认识	40	任意四个设备识别，每错一个扣5分	单人操作考核	熟练掌握	40min
	2. 常用玻璃器皿及仪器的使用	60	任意两个玻璃器皿及任意四个仪器使用，每错一个扣10分			

## 项目二 常用培养基的制备

### 一、技能目标

能掌握培养基制备的基本程序、培养基 pH 的测定及矫正方法，能熟练制备常用培养基。

### 二、教学资源准备

#### (一) 材料与工具

电炉、天平、量筒、漏斗、试管、平皿、烧杯、三角瓶、精密 pH 试纸、纱布、牛肉膏、蛋白胨、琼脂粉、氯化钠、磷酸氢二钾、氢氧化钠等。

#### (二) 教学场所

动物微生物实验室

#### (三) 师资配置

实训时 1 名教师指导 20 名学生，技能考核时 1 名教师指导 10 名学生。

### 三、原理与知识

培养基制备的基本程序：

配料—溶解—测定及矫正 pH—过滤—分装—灭菌—无菌检验—保存备用

#### (一) 营养肉汤培养基

1. 成分：牛肉膏 3-5g，蛋白胨 10g，氯化钠 5g，磷酸氢二钾 1g，蒸馏水 1000mL。
2. 制法：于蒸馏水中加入已称量好的牛肉膏、蛋白胨、氯化钠、磷酸氢二钾，加热溶解。矫正 pH 至 7.4-7.6，过滤分装。置高压蒸汽灭菌器内，121.3℃ 经 20min 灭菌即成。
3. 用途：可供一般细菌生长，同时也是制作一般培养基的基础原料。

#### (二) 营养琼脂培养基

1. 成分：肉膏汤 1000mL，琼脂粉 18-20g。
2. 制法：将琼脂粉加入未过滤、分装及灭菌的肉膏汤内，煮沸使其完全溶解，矫正 pH 至 7.4-7.6，过滤分装于试管或三角瓶中，以 121.3℃ 灭菌 20min。可制

成试管斜面、高层培养基或琼脂平板。

3. 用途: 可供一般细菌生的分离培养、纯培养, 观察菌落特征及保存菌种等, 也可作特殊培养基的基础培养基。

#### 四、技能考核的内容

营养肉汤培养基、营养琼脂培养基的制备

#### 五、操作方法及考核标准

##### (一) 操作方法与步骤

1. 展示培养基制备常用器皿及化学试剂让学生识别。
2. 边展示边讲授。
3. 培养基制备

##### (二) 技能考核标准

考核内容及分数分配	操作环节与要求	评分标准		考核方法	熟练程度	时限
		分值	扣分依据			
1. 营养肉汤培养基的制备 2. 营养琼脂培养基的制备	1. 营养肉汤培养基的制备	50	化学试剂的选择、称量、蒸馏水取得、pH 值测定及矫正、分装、高压等, 每错一个扣 7 分			
	2. 营养琼脂培养基的制备	50	化学试剂的选择、称量、蒸馏水取得、pH 值测定及矫正、分装、高压等, 每错一个扣 7 分			

### 项目三 细菌的分离培养、移植及培养性状的观察

#### 一、技能目标

能熟练掌握病料采集的方法和利用不同被检材料进行细菌分离培养的方法; 能掌握细菌的移植、培养的方法; 能熟悉细菌的培养特性。

#### 二、教学资源准备

##### (一) 材料与工具

病料、实验用菌种、营养琼脂培养基、肉汤培养基、接种环、酒精灯等。

##### (二) 教学场所

动物微生物及检验实验室

##### (三) 师资配置

实训时 1 名教师指导 20 名学生, 技能考核时 1 名教师指导 10 名学生。

#### 三、原理与知识

##### (一) 细菌的分离培养

细菌的分离培养是细菌学诊断的重要环节。

平板划线分离法: 其目的是将被检查的材料作适当的稀释, 在琼脂平板上划线分离, 以便得到单个菌落。其操作方法如下:

- (1) 右手持接种环于酒精灯上烧灼灭菌, 待冷。

(2) 无菌操作取病料，若为液体病料，可直接用灭菌的接种环取病料一环；若为固体病料，首先将烙刀在酒精灯上灭菌，并立即用其将病料表面烧烙灭菌；然后用灭菌接种环从烧烙部位伸到组织中取内部病料。

(3) 左手持平皿，用拇指、食指及中指将皿盖打开一侧(角度大小以能顺利划线为宜，但以角度小为佳，以免空气中细菌污染培养基)，将已取被检材料的接种环伸入平皿，并涂于培养基一侧，然后自涂抹处以腕力在平板表面轻轻地分区划线，可间断划线也可连续划线，第一组作 1-3 次划线，环上的多余细菌材料烧掉后，从第一组划线引出第二组划线，接种环灭菌，再从第二组划线引出第三组划线，如此反复 3—4 组划线后，即可把整个平板表面划满。一组划线的起点只能与邻近的上一组划线重叠，这样就可在最后的 1-2 组划线上出现多量的单个菌落，以便进行纯培养。

(4) 划线完毕，烧灼接种环，将平皿盖好，用玻璃铅笔在平皿底部注明被检材料及日期，将平皿倒置于 37℃ 温箱中，培养 18-24 小时观察结果。

## (二) 细菌移植

### 斜面移植法：

(1) 左手斜持菌种管和被接种琼脂斜面管，使管口互相并齐，管底部放在拇指和示指(食指)之间，松动两管棉塞，以便接种时容易拔出。

(2) 右手持接种棒，在火焰上灭菌后，用右手小指和无名指并齐同时拔出两管棉塞。

(3) 将管口进行火焰灭菌，使其靠近火焰，将接种环伸入菌种管内，先在无菌生长的琼脂上接触使冷却，再挑取少许细菌后退出接种环立即伸入另一管斜面培养基上，勿碰及斜面和管壁，直达斜面底部，从斜面底部开始划曲线，向上至斜面顶端为止，管口通过火焰灭菌，将棉塞塞好。

(4) 接种完毕，接种环通过火焰灭菌后放下接种棒。最后在斜面管壁上注明菌名、日期，置 37℃ 温箱中培养。

### (三) 细菌在培养基中生长特性的观察

#### 1. 琼脂平板培养基 主要观察细菌在培养基上形成的菌落的特征

(1) 大小。以直径(mm)表示，小菌落如针尖大，大菌落为 5—6mm，甚至更大。

(2) 形状。有圆形、不整形、针尖状、露滴状、同心圆形及根足形等。

(3) 边缘。有整齐、波浪状、锯齿状及卷发状等。

J:

(4) 表面形状。有光滑、粗糙、同心圆、放射状、皱状及颗粒状结构等。

(5) 湿润度。有的菌落湿润、而有的菌落干燥。

(6) 隆起度和隆起形状。隆起度有隆起、轻度隆起及中央隆起等，隆起形状有脐状、扣状及扁平状等。

(7) 色泽和透明度。色泽有无色、白、黄、橙及红等；透明度有透明、半透明及不透明等。

(8) 质地。分坚硬、柔软或黏稠。

#### 2. 肉汤培养基

(1) 混浊度。有高度混浊、轻微混浊或仍保持透明者。

(2) 沉淀。管底有无沉淀，沉淀物是颗粒状或、棉絮状等。

(3) 表面。液面有无菌膜，管壁有无菌环。

(4) 色泽。液体是否变色，如绿色、红色等。

## 四、技能考核的内容

1. 病料采集
2. 细菌分离培养
3. 细菌移植
4. 琼脂平板培养基中细菌生长特性的观察
5. 肉汤培养基中细菌生长特性的观察

## 五、操作方法及考核标准

### (一) 操作方法与步骤

1. 展示病料、各种培养基、待移植细菌等。
2. 边操作边讲授。
3. 操作

### (二) 技能考核标准

考核内容及 分数分配	操作环节与 要求	评分标准		考核 方法	熟 练 程 度	时 限
		分 值	扣 分 依 据			
1. 病料采集 2. 细菌分离培养 3. 细菌移植 4. 琼脂平板培养基中细菌生长特性的观察 5. 肉汤培养基中细菌生长特性的观察	1. 病料采集	10	病料采取部位、无菌操作、手法，每错一个扣3分	单人操作考核	熟练掌握	40min
	2. 细菌分离培养	20	手持培养皿姿势，接种环消毒、酒精灯使用，细菌分离操作，每错一个扣5分			
	3. 细菌移植	20	手持试管姿势，接种环消毒、酒精灯使用，细菌移植操作，每错一个扣5分			
	4. 琼脂平板培养基中细菌生长特性的观察	25	大小、形状、边缘、表面形状、湿润度、隆起度和隆起形状、色泽和透明度、质地等，任意5个，每错一个扣5分			
	5. 肉汤培养基中细菌生长特性的观察	25	混浊度、管底有无沉淀，液面有无菌膜，管壁有无菌环、色泽等，任意5个，每错一个扣5分			

## 项目四 细菌标本片的制备及染色

### 一、技能目标

能制备细菌抹片；能进行革兰氏染色；能识别革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的染色特征。

## 二、教学资源准备

### (一) 材料与工具

细菌培养物、酒精灯、接种环、载玻片、革兰氏染色液、染色架、显微镜等。

### (二) 教学场所

动物微生物及检验实验室

### (三) 师资配置

实训时 1 名教师指导 20 名学生，技能考核时 1 名教师指导 10 名学生。

## 三、原理与知识

1. 载玻片的准备:取清洁载玻片,用纱布或吸水纸擦干净,如有油迹或污垢,用少量酒精擦拭干净。根据所检材料多少,可在玻片背面用记号笔画出方格或圆圈作为记号。

2. 抹片、触片的制备:

(1) 接种棒的使用。点燃酒精灯,右手持接种棒(握钢笔方式),先将接种棒直立,使接种环在酒精灯火焰上烧红后,再横向持棒移动烧金属柄部分,通过火焰 3~4 次,即火焰灭菌,每次使用前均需火焰灭菌。

(2) 固体培养物(平板,斜面)或脓汁、粪便等抹片的制备。用接种环取生理盐水 1 滴,置于载玻片上,再用灭菌接种环取培养物少许混合于水滴中,混匀涂成薄膜,使其呈极轻微的乳浊为度,多余材料在火焰上灭菌。

(3) 液体培养物或血液、尿液、渗出液及乳汁等抹片的制备。直接用灭菌接种环取山环或数环待检材料,置于玻片上制成涂片。

(4) 组织、脏器材料触片的制备。取病料组织一小块,以其切面在玻片表面轻轻接触几次,注意不宜触重、过厚,自然干燥,即成组织触片(或称印片)。也可用其切面轻轻接触玻片表面并移动组织块制成抹片,自然干燥。

3. 干燥固定:抹片(触片)于室温自然干燥后,将涂抹面朝上,以其背面在酒精灯火焰上通过数次,略作加热(但不能太热,以不烫手背为度)进行固定。血液、组织及脏器抹片(尤其作姬姆萨染色)常用甲醇固定,可将已于干燥的抹片浸入含有甲醇的染色缸内,取出晾干或在抹片上滴加数滴甲醇使其作用 3-5 分钟后,自然干燥。

固定目的:杀死细菌;使菌体蛋白凝固附着在玻片上,以防被水冲洗掉;改变细菌对染料的通透性,因活细菌一般不允许染料进入细菌体内。

4. 染色:固定好的涂片或抹片即可进行染色。常规染色法有革兰氏染色法、美蓝染色法、瑞氏染色法等。染色片应贴标签,注明菌名、材料、染色法和日期等/封存。

革兰氏染色。基本过程:染色—媒染—脱色—复染—干燥—镜检。

染色:在已干燥固定好的抹片上滴加草酸铵结晶紫溶液于涂、抹面上,染色 2-3 分钟,水洗。

媒染:滴加革兰氏碘液作用 2-3 分钟,水洗。

脱色:滴加 95%酒精于抹片上,脱色时间应根据涂抹面酌厚度灵活掌握,多在 20-60 秒之间,水洗。

干燥:用吸水纸吸干或自然干燥。

镜检:革兰氏阳性菌呈蓝紫色,革兰氏阴性菌呈红色。

## 四、技能考核的内容

1. 细菌抹片的制备



## 2. 革兰氏染色及结果判定

### 五、操作方法及考核标准

#### (一) 操作方法与步骤

1. 展示细菌抹片制备的材料、革兰氏染色试剂。
2. 边操作边讲授。
3. 操作。

#### (二) 技能考核标准

考核内容及分数分配	操作环节与要求	评分标准		考核方法	熟练程度	时限
		分值	扣分依据			
1. 细菌抹片的制备 2. 革兰氏染色及结果判定	1. 细菌抹片的制备	40	载玻片清洗、酒精灯使用、抹片等，每错一个扣10分	单人操作考核	熟练掌握	30min
	2. 革兰氏染色及结果判定	60	颜色判定阳性菌、阴性菌判定，每错一个扣10分			

## 项目五 显微镜油镜的使用及细菌形态的观察

### 一、技能目标

- (一) 要求学生掌握显微镜油镜的使用及保养方法。
- (二) 认识细菌的形态、基本构造和特殊构造。

### 二、教学资源准备

#### (一) 材料与工具

显微镜、细菌染色标本、香柏油、二甲苯、蜡笔、擦镜纸等。

#### (二) 教学场所

显微镜实训室

#### (三) 师资配置

实训时1名教师指导20名学生，技能考核时1名教师指导10名学生。

### 三、原理与知识

#### (一) 油镜的使用方法

##### 1. 油镜头的认识

- (1) 有100×标记
- (2) 镜头最长：接物镜的放大倍数越大，长度就越长，油镜的放大倍数最大，故油镜最长。
- (3) 有的生产显微镜厂家，在物镜上有白色圆圈等作为油镜的标记

##### 2 油镜使用原理：

油镜是接物镜的一种，使用时需在物镜和载玻片之间添加香柏油，因此称为油镜。使用油镜时加香柏油的原因如下：

(1) 油镜头晶体小：进入镜中的光线比低倍镜、高倍镜少的多，视野不明亮。

(2) 玻璃和空气折光率不同（空气为 1，玻璃的为 1.52-1.59）：光线不能通过空气射进物镜晶体，香柏油折光率是 1.52，它和玻璃的折光率相似，因此加香柏油后，光线可通过香柏油射进物镜晶体，视野变得明亮。

### 3 使用方法

(1) 接通电源。

(2) 对光：用 10×10 对光，将聚光器升至最高，将光圈放大至最大，调节显微镜亮度，然后转到 100 倍的物镜即油镜镜头。

(3) 装片：在细菌染色标本片的待检位置滴一滴香柏油后（不要涂抹，否则菌片被刮花，看不清楚），将标本片安放于载物台上，用弹簧片固定，将待检部位移至聚光器上，先用低倍镜寻找适当的视野，再换用油镜镜头观察。

(4) 调焦：调粗螺旋，缓慢升高载物台至镜头浸在油中（从一侧看，油镜头浸在油中即可，不要使劲压玻片，以免压碎玻片，损坏油镜头）。边观察边降低载物台（此时转动的是粗螺旋），待得到模糊物象时，再调细螺旋，直至物象清晰为止。

(5) 保养：油镜用毕，先用粗准焦螺旋将载物台下移或使油镜头上升，将细菌标本片取下，用擦镜纸吸去香柏油，如油已干或模糊不清者，可在擦镜纸上滴 1~2 滴二甲苯或无水乙醇后将玻片上的香柏油吸净，并立即用干擦镜纸拭去二甲苯；用同样的方法将油镜头擦拭干净，然后将低倍镜转至中央或将物镜转成“八”字形，调节粗准焦螺旋，使物镜头远离载物台。将显微镜用防尘布盖好，置于阴凉干燥处。

(二) 细菌形态的观察：

1. 细菌基本形态的观察：球菌、杆菌、螺旋菌
2. 细菌特殊构造的观察：荚膜、鞭毛、细菌芽孢

## 四、技能考核的内容

1. 油镜的使用及保养
2. 细菌形态的观察及识别

## 五、操作方法及考核标准

### (一) 操作方法与步骤

1. 展示显微镜。
2. 边使用边讲授。
3. 使用。

### (二) 技能考核标准

考核内容及分数分配	操作环节与要求	评分标准		考核方法	熟练程度	时限
		分值	扣分依据			
1. 油镜的正确使用及保养 2. 细菌形态	1. 油镜的正确使用及保养	40	镜头选择、载玻片放置、香柏油的添加、用油镜调出细菌，显微镜的保养每错一个扣 10 分	单人操作	熟练掌握	30min

的观察及识别	2. 细菌形态的观察及识别	60	球菌、杆菌、螺旋菌、革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、细菌颜色、特殊结构, 每错一个扣 10 分	考核		
--------	---------------	----	---	----	--	--

## 项目六 细菌的药物敏感试验

### 一、技能目标

能掌握细菌的药物敏感性试验的操作及结果判定。

### 二、教学资源准备

#### (一) 材料与工具

大肠杆菌和金色葡萄球菌肉汤培养物各 1 管, 灭菌棉签 1 包, 含抗生素的纸片 10 张, 直径 90mm 普通营养琼脂平板 1 个等。

#### (二) 教学场所

动物微生物及检验实验室

#### (三) 师资配置

实训时 1 名教师指导 20 名学生, 技能考核时 1 名教师指导 10 名学生。

### 三、原理与知识

#### 1. 纸片扩散试验

(1) 每组将每种菌培养物稀释到盐水中, 使其混浊度相当于所给比浊管。

(2) 混匀稀释管, 插入一个棉签沿管壁滚动, 挤去多余液体。

(3) 用含菌棉签从平板中央开始涂抹, 然后再转 90°。涂布, 使整个平板表面涂布上菌。

(4) 再用灭菌镊子将含抗生素纸片放入平板内并压实, 每个平板上可放 4 个纸片(2 个含青霉素纸片, 2 个含庆大霉素纸片)。4℃作用 2 小时。

(5) 将平板倒置放入培养箱中培养。

#### 2. 最低抑菌浓度试验

(1) 从 2 mL 含抗生素肉汤管取出 1 mL 加到第 1 管 1 mL 肉汤管中混匀, 再取 1 mL 到第 2 管, 如此连续稀释至第 7 管, 最后弃去 1 mL 含抗生素肉汤。共有 8 支 1 mL 含抗生素肉汤管(抗生素浓度从 32Hg/n]L 稀释至 0.25 件 g/mL) 和不含抗生素肉汤管 1 支。

(2) 吸取 0.1 mL 含菌量相当于麦氏比浊管第 1 管 1/2 的金色葡萄球菌悬液 U 力亿菌/mL) 到每个含抗生素管以及不含抗生素的对照管。

(3) 若有两种或两种以上抗生素和被检细菌也按上述过程进行。

#### 3. 实验结果判定

(1) 纸片扩散试验测定抑菌环的直径, 记录每种菌对某一抗生素的敏感性。

结果判读参考美国临床和实验室标准协会 (CLSI) 上的纸片扩散法抑菌圈判定标准。

药敏试验常用金色葡萄球菌作为革兰氏阳性菌的对照菌株; 用大肠杆菌作为革兰氏阴性菌的对照菌株。

(2) 最低抑菌浓度试验记录最低抑菌浓度结果。无细菌生长的最大抗生素稀释倍数管内抗生素浓度即为最低抑菌浓度。

## 四、技能考核的内容

纸片扩散试验操作及结果判定

## 五、操作方法及考核标准

### (一) 操作方法与步骤

1. 展示药敏片。
2. 边展示边讲授。
3. 操作

### (二) 技能考核标准

考核内容及分数分配	操作环节与要求	评分标准		考核方法	熟练程度	时限
		分值	扣分依据			
1. 纸片扩散试验操作 2. 结果判定	1. 纸片扩散试验操作	60	纸片制备、药敏片涂抹、手持培养皿姿势、无菌操作等，每错一个扣10分	单人操作考核	熟练掌握	40min
	2. 结果判定	40	敏感、有抗力、中度抗力，每错一个扣10分			

## 项目七 凝集试验

### 一、技能目标

能熟练掌握平板凝集试验的操作及结果判定

### 二、教学资源准备

#### (一) 材料与工具

待检动物血清、布鲁氏平板凝集抗原、布鲁氏标准阳性、阴性血清、吸管等

#### (二) 教学场所

动物微生物及检验实验室

#### (三) 师资配置

实训时1名教师指导20名学生，技能考核时1名教师指导10名学生。

### 三、原理与知识

被检血清和布鲁氏平板凝集抗原各0.03mL滴于玻板方格内，每份血清用火柴棒混合均匀，在室温4-10分钟内记录反应结果，同时用阳性、阴性血清做对照。被检血清出现任何程度凝集的，判定为阳性；完全不凝集的判定为阴性。

### 四、技能考核的内容

1. 平板凝集、试管凝集试验的操作
2. 结果判定

### 五、操作方法及考核标准

#### (一) 操作方法与步骤

1. 展示该实验要用的试剂及材料让学生识别。
2. 边展示边讲授。
3. 使用

## (二) 技能考核标准

考核内容及分数分配	操作环节与要求	评分标准		考核方法	熟练程度	时限
		分值	扣分依据			
1. 平板凝集试验操作 2. 结果判定	1. 平板凝集试验操作	60	试剂添加、载玻片选择、吸管使用等，每错一个扣10分	单人操作考核	熟练掌握	40min
	2. 结果判定	40	100%凝集、75%凝集、50%凝集、25%凝集、不凝集判定，每错一个扣5分			

## 项目八 病毒的鸡胚接种

### 一、技能目标

能学会病毒的鸡胚接种和收毒方法

### 二、教学资源准备

#### (一) 材料与工具

恒温培养箱、9-11日龄鸡胚、照蛋器、无菌操作室、1mL注射器、酒精灯、新城疫病毒悬液等。

#### (二) 教学场所

动物微生物及检验实验室

#### (三) 师资配置

实训时1名教师指导20名学生，技能考核时1名教师指导10名学生。

### 三、原理与知识

1. 选用9-11日龄发育良好的鸡胚，照蛋标出气室及胚胎位置，在气室底边胚胎附近无大血管处标出尿囊腔注射部位。
2. 在气室及标记处先后用碘酊和酒精棉球消毒蛋壳表面。
3. 在距离气室底边0.5cm处蛋壳上打一小孔，由此孔进针注射新城疫病毒0.1-0.2mL。
4. 注射完毕，用熔好的石蜡封闭气室孔，气室孔朝上于35℃-37℃温箱中孵育。
5. 取出48-72小时的活鸡胚，置4℃冰箱过夜。
6. 取出冷却的鸡胚，气室孔处消毒，用无菌镊子击破气室处蛋壳、壳膜，夹起并撕开气室中央的绒毛尿囊膜，然后用吸管吸取尿囊液和羊水，置灭菌青霉素瓶中保存备用。

### 四、技能考核的内容

1. 病毒的鸡胚接种
2. 收毒

## 五、操作方法及考核标准

### (一) 操作方法与步骤

1. 展示本试验用到的试剂、病毒液、仪器等让学生识别。
2. 边展示边讲授。
3. 操作

### (二) 技能考核标准

考核内容及分数分配	操作环节与要求	评分标准		考核方法	熟练程度	时限
		分值	扣分依据			
1. 鸡胚接种 2. 收毒	1. 鸡胚接种	60	鸡胚尿囊腔位置判定、打蛋孔, 病毒液接种、封孔等, 每错一个扣 10 分	单人操作考核	熟练掌握	40min
	2. 收毒	40	移液枪使用、毒液分离、毒液取得等, 每错一个扣 10 分			

## 项目九 病毒的血凝及血凝抑制试验

### 一、技能目标

能熟练掌握病毒的血凝及血凝抑制试验的操作规程及结果判定

### 二、教学资源准备

#### (一) 材料与工具

新城疫病毒液、1%红细胞悬液、灭菌生理盐水、被检血清、阳性血清、微量反应板、移液枪等。

#### (二) 教学场所

动物微生物及检验实验室

#### (三) 师资配置

实训时 1 名教师指导 20 名学生, 技能考核时 1 名教师指导 10 名学生。

### 三、原理与知识

#### (一) 血球凝集(HA) 试验

1. 在 96 孔微量反应板上进行, 自左至右各孔加 50μL 生理盐水。
2. 于左侧第 1 孔加 50μL 病毒液 (尿囊液或冻干疫苗液), 混合均匀后, 吸 50μL 至第 2 孔, 依次倍比稀释至第 11 孔, 吸弃 50μL; 第 12 孔为红细胞对照。
3. 自右至左依次向各孔加入 0.5% 鸡红细胞悬液 50μL, 在振荡器上振荡, 室温下静置后观察结果。
4. 结果观察: 红细胞全部凝集, 沉于孔底, 平铺呈网状, 即为 100% 凝集 (++++), 不凝集者 (-) 红细胞沉于孔底呈点状。

表1 鸡新城疫红细胞凝集(HA)试验(微量法) (单位: ml)

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
生理盐水	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.05
鸡新城疫弱毒疫苗	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	弃(0.025)
0.5%鸡红细胞悬液	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
病毒稀释倍数	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024		
作用温度与时间	振荡器上振荡混均约1min, 放入37℃恒温箱中15~30min,											
结果(例)	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-

注: +++ 表示完全凝集 ++ 表示不完全凝集 - 表示不凝集

## (二) 血球凝集抑制(HI)试验

1. 根据 HA 试验结果, 确定病毒的血凝价, 配制出 4 个血凝单位的病毒液。
2. 在 96 孔微量反应板上进行, 用固定病毒稀释血清的方法, 自第 1 孔至第 11 孔各加 50μL 生理盐水。
3. 第 1 孔加被检鸡血清 50μL, 吹吸混合均匀, 吸 50μL 至第 2 孔, 依此倍比稀释至第 10 孔, 吸弃 50μL, 稀释度分别为: 1:2、1:4、1:8 ... ; 第 12 孔加新城疫阳性血清 50μL, 作为血清对照。
4. 自第 1 孔至 12 孔各加 50μL 4 个血凝单位的新城疫病毒液, 其中第 11 孔为 4 单位新城疫病毒液对照, 振荡混合均匀, 置室温中作用 10min 。
5. 自第 1 孔至 12 孔各加 0.5% 鸡红细胞悬液 50μL, 振荡混合均匀, 室温下静置后观察结果
6. 结果判定: 待病毒对照孔(第 11 孔)出现红细胞 100%凝集(++++), 而血清对照孔(第 12 孔)为完全不凝集(-)时, 即可进行结果观察。

表2 鸡新城疫细胞凝集抑制试验操作术式(微量法) (单位: ml)

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
被检血清稀释倍数	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	红细胞对照	抗原对照
生理盐水	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.05
免疫血清	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	弃(0.025)
4单位病毒	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
0.5%鸡红细胞悬液	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025

注: - 表示不凝集 ++ 表示不完全凝集 +++ 表示完全凝集

## 四、技能考核的内容

血凝试验、血凝抑制试验及结果判定

## 五、操作方法及考核标准

### (一) 操作方法与步骤

1. 展示本试验即将用到的试剂、仪器等让学生识别。
2. 边展示边讲授。
3. 操作

## (二) 技能考核标准

考核内容及分数分配	操作环节与要求	评分标准		考核方法	熟练程度	时限
		分值	扣分依据			
1. 病毒的血凝试验 2. 病毒的血凝抑制试验 3. 结果判定	1. 病毒的血凝试验	40	移液枪使用, 微量反应板使用, 液体混合程度等, 每错一个扣5分	单人操作考核	熟练掌握	40min
	2. 病毒的血凝抑制试验	40	移液枪使用, 微量反应板使用, 液体混合程度等, 每错一个扣5分			
	3. 结果判定	20	100%凝集、75%凝集、50%凝集、25%凝集、不凝集判定, 每错一个扣4分			

## 项目十 间接血凝试验

### 一、技能目标

能掌握间接血凝试验的操作方法及其结果判定

### 二、教学资源准备

#### (一) 材料与工具

抗原、致敏红细胞、阳性、阴性血清、被检血清、稀释剂等

#### (二) 教学场所

动物微生物及检验实验室

#### (三) 师资配置

实训时 1 名教师指导 20 名学生, 技能考核时 1 名教师指导 10 名学生。

### 三、原理与知识

(1) 用微量加样器吸取稀释剂滴加至有机玻璃反应板 1-5 孔和 7 孔, 每孔 0.025 mL, 每份血清占一排孔。

(2) 用微量加样器吸取被检血清 0.025 mL 加入第 I 孔中, 吹吸混合 3 次, 再从第一孔取 0.025 mL 加入第二孔混合, 如此对倍稀释至第 5 孔, 从第 5 孔吸出 0.025 mL 加到第 6 孔作为红细胞对照。第 7 孔作抗原对照, 第 8 孔加被检血清 0.025 mL 作被检血清对照。

(3) 滴加红细胞, 从第 I 孔至第 5 孔和第 7 孔加 2% 致敏红细胞 0.025 mL, 第 6 和 8 孔加入 2% 鞣化红细胞 0.025 mL。

(4) 用同样方法各设一排孔作阳、阴性猪血清的对照。

(5) 置微型振荡器上振荡 30 秒后置室温 (18—25℃) 2 小时, 观察记录结果 18 个时后再做一次。



## 四、技能考核的内容

间接血凝试验的操作及结果判定

## 五、操作方法及考核标准

### (一) 操作方法与步骤

1. 展示本试验用到的试剂、仪器等让学生识别。
2. 边展示边讲授。
3. 操作

### (二) 技能考核标准

考核内容及 分数分配	操作环节与 要求	评分标准		考核 方法	熟练 程度	时限
		分值	扣分依据			
1. 间接血凝 试验操作 2. 结果判定	1. 间接血 凝试验操 作	60	移液枪使用，微量反应 板使用，液体混合程度 等，每错一个扣5分	单 人 操 作 考 核	熟 练 掌 握	40min
	2. 结果判 定	40	任阳性、阴性、可疑， 每错一个扣10分			