

 全国高等医药院校医学检验技术（医学检验）专业规划教材

临床微生物学检验 实验指导

（第2版）

主编  彭奕冰

中国医药科技出版社

The illustration at the bottom of the cover depicts a DNA double helix structure. A yellow circular area highlights a section of the DNA where the strands are being synthesized. The text 'Okazaki Fragments' is written in the center of this yellow area. The DNA strands are labeled with '5'' and '3'' at various points, indicating the direction of synthesis. The background is a green grid pattern.

· 全国高等医药院校医学检验技术(医学检验)专业规划教材 ·

临床微生物学检验实验指导

(第2版)

主 编 彭奕冰

编 者 (以姓氏笔画为序)

王豫萍 (贵州医科大学)

刘晓一 (清华大学)

宋 珍 (上海交通大学医学院)

张 敏 (西藏民族大学医学院)

张竹君 (第三军医大学)

周爱萍 (同济大学)

晏 群 (中南大学湘雅医学院)

彭奕冰 (上海交通大学医学院)

谢 轶 (四川大学华西临床医学院)

秘 书 宋 珍

中国医药科技出版社

内 容 提 要

本书根据全国高等医学院校医学检验技术（医学检验）专业最新教学大纲要求，结合编者自身的教学和临床经验进行编写。本书以实验技术为主线，共分7个单元、32个实验，较为系统地介绍了细菌学检验基本技术、常见病原菌的培养和鉴定、常见病原性真菌的培养和鉴定、抗菌药物敏感性试验与耐药性检测、常见病毒检测技术及常见临床标本的细菌学检验等内容。

本书适合医学检验技术（医学检验）专业本科和大专院校师生教学使用。

图书在版编目（CIP）数据

临床微生物学检验实验指导/彭奕冰主编. —2版. —北京：中国医药科技出版社，2015.7

全国高等医药院校医学检验技术（医学检验）专业规划教材

ISBN 978 - 7 - 5067 - 7600 - 4

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

中国版本图书馆CIP数据核字（2015）第174257号

美术编辑 陈君杞

版式设计 郭小平

出版 中国医药科技出版社

地址 北京市海淀区文慧园北路甲22号

邮编 100082

电话 发行：010 - 62227427 邮购：010 - 62236938

网址 www.cmstp.com

规格 889 × 1194mm¹/₁₆

印张 11

字数 263千字

初版 2010年2月第1版

版次 2015年7月第2版

印次 2015年7月第1次印刷

印刷 三河市国英印务有限公司

经销 全国各地新华书店

书号 ISBN 978 - 7 - 5067 - 7600 - 4

定价 24.00元

本社图书如存在印装质量问题请与本社联系调换

全国高等医药院校医学检验技术（医学检验）专业规划教材

建设委员会

主任委员 丛玉隆（中国人民解放军总医院）

副主任委员（以汉语拼音为序）

樊绮诗（上海交通大学医学院）

胡丽华（华中科技大学同济医学院）

刘新光（广东医学院）

吕建新（温州医学院）

王 前（南方医科大学）

吴忠道（中山大学中山医学院）

姚 智（天津医科大学）

尹一兵（重庆医科大学）

委 员（以汉语拼音为序）

陈育民（河北工程大学医学院）

洪秀华（上海交通大学医学院）

胡建达（福建医科大学）

胡翊群（上海交通大学医学院）

李咏梅（北华大学医学部）

刘 辉（大连医科大学）

刘成玉（青岛大学医学院）

吕世静（广东医学院）

王 辉（新乡医学院）

徐克前（中南大学湘雅医学院）

姚群峰（湖北中医药大学）

张进顺（河北北方学院）

吴俊英（蚌埠医学院）

郑铁生（江苏大学医学院）

秘 书 长 匡罗均（中国医药科技出版社）

办 公 室 罗万杰（中国医药科技出版社）

尚亭华（中国医药科技出版社）

全国高等医药院校医学检验技术(医学检验)专业规划教材

出版说明

全国高等医药院校医学检验专业规划教材,于20世纪90年代开始启动建设。是在教育部、原国家食品药品监督管理局的领导和指导下,在广泛调研和充分论证基础上,由中国医药科技出版社组织牵头江苏大学、温州医科大学、中山大学、华中科技大学同济医学院、中南大学湘雅医学院、广东医学院、上海交通大学医学院、青岛大学医学院、广西医科大学、南方医科大学、301医院等全国20多所医药院校和部分医疗单位的领导和专家成立教材建设委员会共同规划下,编写出版的一套供全国医学检验专业教学使用的本科规划教材。

本套教材坚持“紧扣医学检验专业本科教育培养目标,以临床实际需求为指导,强调培养目标与用人需求相结合”的原则,10余年来历经二轮编写修订,逐渐形成了一套行业特色鲜明、课程门类齐全、学科系统优化、内容衔接合理的高质量精品教材,深受广大师生的欢迎,为医学检验专业本科教育做出了积极贡献。

本套教材的第三轮修订,是在我国高等教育教学改革的新形势和医学检验专业更名为医学检验技术、学制由5年缩短至4年、学位授予由医学学士变为理学学士的新背景下,为更好地适应新要求,服务于各院校教学改革和新时期培养医学检验专门人才需求,在2010年出版的第二轮规划教材的基础上,由中国医药科技出版社于2014年组织全国40余所本科院校300余名教学经验丰富的专家教师不辞辛劳、精心编撰而成。

本轮教材含理论课程教材10门、实验课教材8门,供全国高等医药院校医学检验技术(医学检验)专业教学使用。具有以下特点:

1. 适应学制的转变 第三轮教材修订符合四年制医学检验技术专业教学的学制要求,为目前的教学提供更好的支撑。

2. 坚持“培养目标”与“用人需求”相结合 紧扣医学检验技术专业本科教育培养目标,以医学检验技术专业教育纲要为基础,以国家医学检验技术专业资格准入为指导,将先进的理论与行业实践结合起来,实现教育培养和临床实际需求相结合,做到教师好“教”、学生好“学”、学了好“用”,使学生能够成为临床工作需要的人才。

3. 充实完善内容,打造教材精品 专家们在上一轮教材基础上进一步优化、精炼和充实内容。坚持“三基、五性、三特定”,注重整套教材的系统科学性、学科的衔接性。进

一步精简教材字数，突出重点，强调理论与实际需求相结合，进一步提高教材质量。

编写出版本套高质量的全国高等医药院校医学检验技术（医学检验）专业规划教材，得到了相关专家的精心指导，以及全国各有关院校领导和编者的大力支持，在此一并表示衷心感谢。希望本套教材的出版，能受到全国本科医学检验技术（医学检验）专业广大师生的欢迎，对促进我国医学检验技术（医学检验）专业教育教学改革和人才培养做出积极贡献。希望广大师生在教学中积极使用本套教材，并提出宝贵意见，以便修订完善，共同打造精品教材。

全国高等医药院校医学检验技术（医学检验）专业规划教材建设委员会

中国医药科技出版社

2015年7月

前言

近年来,随着临床医学和相关检测技术的不断发展,对医学检验人员的理论知识和操作技能提出了更高的要求。临床微生物学检验作为医学检验技术(医学检验)专业的主干课程之一,对学生的基础理论知识和基本实验技术展开教学和训练,并更侧重于培养学生的实验技能,为其今后从事检验相关领域的工作打下基础。本书全体编委根据全国高等医药院校医学检验技术(医学检验)专业《临床微生物学检验》(第3版)教学大纲的要求,总结自身的教学和临床经验,编写了这本《临床微生物学检验实验指导》(第2版),可作为相应理论课程的配套实验教材,主要供医学检验技术(医学检验)专业本科和大专的师生教学使用,旨在培养学生临床微生物学的实验操作技能以及分析、解决实际问题的基本能力。

本教材以实验技术为主线,基本框架结构与上一版类似,共分为7个单元,由32个实验组成,较为系统地介绍了细菌学检验基本技术、常见病原菌的培养和鉴定、常见病原性真菌的培养和鉴定、抗菌药物敏感性试验与耐药性检测、常见病毒检测技术以及常见临床标本的细菌学检验等内容。其中,每个实验的编写内容包括实验目的、实验器材、实验方法、实验结果、注意事项等部分,还特别设置了相应的思考题,有助于学生的理解和学习,并启发其对关键问题的思考。本书在强调对学生基本理论知识和技能训练的同时,也希望通过一些设计性实验和综合性实验来培养学生的创新思维,并引导他们运用所学知识来分析与解决临床问题。教材内容注重基础与临床相结合,突出理论联系实际的原则,兼顾科学性、系统性、实用性和启发性,以期在有限的实验教学时数内取得良好的教学效果。为方便读者,本书在附录中列举了常用培养基、常用染液与试剂的配方和用途,以及临床标本检验实验记录表和常用仪器设备等。

本教材在编写过程中得到了各参编单位的支持和帮助及上海交通大学医学院洪秀华教授的悉心指导,在此表示衷心的感谢。尽管全体编者已努力尽心地去完成编写工作,但由于我们的学术水平和编写能力有限,在教材的内容和编排上难免存在缺点和错漏,敬请广大读者批评指正。

编者

2015年5月



目录

第一单元 临床微生物实验室的生物安全防护与实验室守则	(1)
一、临床微生物实验室的生物安全防护.....	(1)
二、临床微生物教学实验室守则	(1)
三、实验室意外应急处理措施	(2)
第二单元 细菌检验基本技术	(4)
实验一 细菌形态检查	(4)
一、不染色标本细菌检查	(4)
二、细菌涂片制作和革兰染色	(4)
三、细菌特殊染色	(6)
实验二 细菌分离培养和保存技术	(7)
一、培养基制备	(7)
二、细菌接种与分离	(9)
三、细菌培养.....	(11)
四、细菌生长现象观察	(12)
五、细菌菌种保存.....	(13)
实验三 细菌鉴定	(14)
一、生物化学鉴定.....	(14)
二、数字编码鉴定及自动化鉴定	(20)
三、血清学鉴定(玻片凝集试验)	(22)
四、分子生物学鉴定(DNA 体外扩增及测序试验)	(22)
五、质谱鉴定.....	(24)
实验四 感染性疾病动物模型与细菌毒素检测	(25)
一、感染性疾病动物模型建立	(25)
二、实验动物采血技术	(26)
三、细菌内毒素的检测	(27)
四、细菌外毒素的毒性检测	(27)
实验五 细菌遗传与变异(大肠埃希菌转化实验)	(28)
实验六 细菌分布与消毒灭菌	(29)
一、细菌的分布.....	(29)
二、物理消毒灭菌法(紫外线杀菌试验)	(31)
三、消毒灭菌效果的评价(高压蒸汽灭菌试验)	(32)



第三单元 常见病原菌检验	(33)
实验七 球菌	(33)
一、葡萄球菌属	(33)
二、链球菌属	(35)
三、肠球菌属	(38)
四、奈瑟菌属和卡他莫拉菌属	(40)
实验八 肠杆菌科	(41)
一、埃希菌属	(41)
二、志贺菌属和沙门菌属	(43)
三、枸橼酸杆菌属、克雷伯菌属、肠杆菌属和沙雷菌属	(46)
四、变形杆菌属、摩根菌属和普罗威登斯菌属	(48)
五、耶尔森菌属及哈夫尼亚菌属	(49)
实验九 非发酵菌	(50)
一、假单胞菌属和产碱杆菌属	(50)
二、不动杆菌属和窄食单胞菌属	(52)
实验十 弧菌属、气单胞菌属、弯曲菌属和螺杆菌属	(53)
一、弧菌属	(53)
二、气单胞菌属	(55)
三、弯曲菌属	(56)
四、螺杆菌属	(58)
实验十一 苛养菌	(59)
一、嗜血杆菌属	(59)
二、军团菌属	(60)
实验十二 需氧革兰阳性杆菌	(62)
一、棒状杆菌属	(62)
二、需氧芽胞杆菌属	(64)
三、李斯特菌属	(67)
四、加德纳菌属	(68)
五、需氧放线菌属和诺卡菌属	(69)
实验十三 分枝杆菌属	(70)
一、结核分枝杆菌	(70)
二、非结核分枝杆菌	(73)
实验十四 厌氧菌	(74)
一、厌氧芽胞梭菌	(74)
二、无芽胞厌氧菌	(77)
实验十五 螺旋体和支原体	(79)
一、钩端螺旋体	(79)
二、梅毒螺旋体	(81)
三、支原体	(83)
实验十六 衣原体和立克次体	(85)
一、衣原体	(85)
二、立克次体	(87)



第四单元 真菌检验基本技术和常见病原性真菌的培养与鉴定	(89)
实验十七 真菌检验基本技术	(89)
一、真菌形态结构观察和染色技术	(89)
二、真菌分离培养和鉴定	(90)
实验十八 单细胞真菌的培养和鉴定	(91)
一、念珠菌属	(91)
二、隐球菌属	(92)
三、毛孢子菌属	(93)
实验十九 丝状真菌培养和鉴定	(93)
一、常见浅部真菌的培养和鉴定	(93)
二、曲霉菌属、毛霉菌属的培养和鉴定	(94)
实验二十 双相型真菌的培养与鉴定	(95)
第五单元 抗菌药物敏感性试验与耐药性检测	(97)
实验二十一 纸片扩散法药物敏感性试验和联合药敏试验	(97)
一、细菌及念珠菌纸片扩散法药物敏感性试验	(97)
二、联合药敏试验	(99)
实验二十二 稀释法药物敏感性试验和 E - 试验	(100)
一、细菌琼脂稀释法药物敏感性试验	(100)
二、细菌及念珠菌肉汤稀释法药物敏感性试验	(102)
三、E - 试验	(105)
实验二十三 特殊耐药菌及耐药酶的表型检测	(106)
一、 β - 内酰胺酶的检测	(106)
二、超广谱 β - 内酰胺酶 (ESBL) 的检测	(106)
三、碳青霉烯酶的检测	(108)
四、耐甲氧西林葡萄球菌 (MRS) 的检测	(109)
五、葡萄球菌诱导性克林霉素耐药的检测 (D - Test)	(110)
六、耐万古霉素肠球菌的检测	(111)
七、耐青霉素肺炎链球菌的检测	(111)
第六单元 常见病毒检验技术	(113)
实验二十四 病毒培养技术	(113)
一、鸡胚接种	(113)
二、动物接种	(115)
三、组织细胞培养	(116)
实验二十五 病毒快速检测技术	(119)
一、电镜负染观察病毒	(119)
二、病毒抗原检测	(120)
三、PCR 法检测 HBV - DNA	(121)
第七单元 常见临床标本的细菌学检验	(123)
实验二十六 血液及骨髓标本的细菌学检验 (综合性实验)	(123)



实验二十七 尿液标本的细菌学检验 (综合性实验)	(125)
实验二十八 生殖道标本的细菌学检验 (综合性实验)	(128)
实验二十九 肠道标本的细菌学检验 (综合性实验)	(130)
实验三十 呼吸道标本的细菌学检验 (综合性实验)	(132)
实验三十一 脑脊液标本的细菌学检验 (综合性实验)	(135)
实验三十二 脓液、创伤感染分泌物、胸腹水及穿刺液标本的细菌学检验 (综合性实验)	(137)
附录	(140)
一、常用培养基	(140)
二、常用染液和试剂	(156)
三、临床标本检验实验记录表	(160)
四、临床微生物实验室常用仪器设备	(161)



第一单元 临床微生物实验室的生物安全防护与实验室守则

一、临床微生物实验室的生物安全防护

临床微生物实验的对象为病原微生物，对实验室内工作人员和周围环境具有一定的潜在生物危害性，操作不慎有可能造成感染，因此做好临床微生物实验室的生物安全防护对保护实验室工作人员及室内外的环境非常重要。实验室生物安全防护（biosafety containment for laboratories）是指在实验室环境下处理和保存感染性物质的过程中采取的一系列防护措施，其主要内容包括实验室特殊设计和建设要求、实验室安全设备、个人防护装置和措施，以及标准化的操作技术和流程。

1. 实验室生物安全防护水平分级 根据实验室对所处理微生物及其毒素采取的防护措施不同，将实验室生物安全防护水平（biosafety level, BSL）分为四级，分别以 BSL-1、BSL-2、BSL-3、BSL-4 表示，一级防护水平低，四级防护水平最高。一般教学用的普通微生物实验室属于 BSL-1，其实验室设计和结构、安全设备、安全操作规程等适用于对健康成年人已知无致病作用的微生物。而临床微生物实验室属于 BSL-2，其实验室设计和结构、安全设备、安全操作规程等适用于对人和环境具有中等潜在危害的微生物。不同等级的生物安全防护水平，对实验室的设计和结构、安全设备、个人防护、实验室的安全操作规程等均有具体而详细的要求和规定 [参照世界卫生组织（WHO）编写出版的《实验室生物安全手册》]。

2. 实验室内产生生物危害的设备 某些设备在使用时有潜在的生物危害，了解能产生生物性危害的器材和设备有助于有针对性地进行防范。常见的包括注射针、离心机、振荡器、摇床、搅拌器、水浴箱等，实验过程中正确使用和维护这些设备，以防实验室获得性感染及保护环境免受污染。

3. 实验室的安全设备 临床微生物实验室常见的安全防护设备包括生物安全柜、高压灭菌器、洗眼器、冲淋装置等，实验过程中正确使用和维护这些设备，对防止实验室获得性感染，保护环境免受污染具有至关重要的作用。

4. 实验室的个人防护用品 常用的包括口罩、工作帽、实验室防护服、护目镜（安全眼镜）、面罩、手套、防护鞋等。

5. 实验室设计和建设 考虑新建实验室或计划对已建的实验室进行结构改造时，应根据拟建（改造）实验室的生物安全防护水平，依据我国《生物安全实验室建筑技术规范》进行实验室的设计和建设。

有关详细内容和要求可参考 WHO 编写出版的《实验室生物安全手册》。

二、临床微生物教学实验室守则

为防止遭受临床微生物学实验室病原微生物的感染，以及保护实验室内外环境，要求同学们进入实验室后必须严格遵守以下规则。

(1) 必要的实验指导、书籍和文具等带入后，应放在指定的清洁区；在实验室，应穿防



滑、防渗不露脚趾的鞋。

(2) 进入实验室必须先穿实验服，不得佩戴戒指、手镯、腕表等，长发必须束在脑后。

(3) 实验室内禁止饮食、吸烟。

(4) 每项微生物学实验都要坚持无菌操作，这样既可防止临床标本及纯培养物被污染，又可防止临床标本或纯培养中的病原微生物感染人体或污染环境；使用接种环刮琼脂平板、吸带菌液体、制作细菌涂片、打开培养物等操作都有可能产生气溶胶，操作者有吸入病原体的危险，因此所有的操作应降低气溶胶或泡沫的生成，无菌操作时禁止开风扇。感染性材料的离心操作应使用安全的离心杯或密封的离心机转子，在生物安全柜中开启、装载或关闭感染性材料；禁止用嘴吸取液体，除了注射药物或从动物体内抽吸液体以外，不应使用注射器，因为使用注射器等锐器有可能致表皮破损，使病原微生物通过皮肤黏膜引起感染。

(5) 用过的吸管、滴管、试管、玻片等带菌器材，应放在指定的地方或含消毒液的容器内，禁止放在桌面上或水池内，禁止将带菌液体倾入水槽；禁止酒精灯互相点燃，以防发生意外。

(6) 若发生割破手指，菌液进入口、眼，或遇带菌材料破损、污染环境和物品等事故时，应立即报告老师，及时进行预防处理。

(7) 不可擅自搬动示教、实验器材或室内设施；节约使用实验材料，爱护公物，如有损坏，应立即向指导教师报告，并主动登记。

(8) 实验完毕，应清理桌面，把用过的物品放回原处（如显微镜、接种环、染色液、擦镜纸、香柏油、火柴等），需培养的物品做好标记后按要求放入培养箱。

(9) 离开实验室前，应脱下实验服，反折放入专用容器内，在消毒液中将手浸泡 5~10 分钟，并用自来水冲洗干净，关好水、电、门、窗后方可离室；禁止在实验室以外的场所（教室、图书馆、宿舍、厕所等）穿曾在微生物实验室穿过的实验服；穿过的实验服应定期清洗消毒，被污染的实验服应立即更换，先消毒灭菌后再洗涤；实验服不应与生活服装放在一起。

(10) 未经许可，不得将实验室内任何物品（特别是菌种）带出室外。

三、实验室意外应急处理措施

1. 皮肤刺伤、切割伤或擦伤 受伤人员应脱下实验服，清洗双手，尽可能挤出损伤处的血液，除尽异物，用肥皂和清水冲洗伤口或沾污的皮肤；如果黏膜破损，应用生理盐水（或清水）反复冲洗。伤口应使用适当的皮肤消毒剂（如 70% 酒精、0.2% 次氯酸钠、0.2%~0.5% 过氧乙酸、0.5% 聚维酮碘等）浸泡或涂抹消毒，必要时进行医学处理。

2. 化学药品腐蚀伤 若为强酸，先用大量清水冲洗，再以 5% 碳酸氢钠或 5% 氢氧化铵溶液中和之；强碱腐蚀则先以大量清水冲洗后，再以 5% 醋酸或 5% 硼酸洗涤中和。

3. 眼睛溅入液体 立即用生理盐水连续冲洗至少 10 分钟，避免揉擦眼睛，然后再进行相应的医学处理。

4. 衣服污染 ①尽快脱掉实验服以防止感染物污染皮肤并进一步扩散，然后洗手并更换实验服；②将已污染的实验服进行高压蒸汽灭菌；③清理发生污染的地方及放置实验服的地方；④如果个人衣服被污染，应立即将污染处浸入消毒剂，并更换干净的衣服或一次性衣服。

5. 吸入病原菌液 立即将口腔中的菌液吐入容器内消毒，并用大量清水漱口；然后根据菌种不同，服用抗菌药物予以预防（在医生的指导下进行）。

6. 菌液流洒桌面 应倾倒适量消毒液于污染面，让其浸泡半小时后抹去；若手上沾有活菌，亦应浸泡于上述消毒液 10 分钟后，再以肥皂及水清洗干净。

7. 容器破碎及感染性物质的溢出 破碎的容器和被溅的地方用经消毒剂浸泡的吸水物质

(布、纸等)覆盖,消毒剂起作用 10~15 分钟后,以可行的方法移走吸水性物质和破碎的容器(玻璃碎片应用镊子清理),这些吸水性物质和破碎的容器应当放在盛放污染性废弃物的容器内,高压灭菌或用有效的消毒剂浸泡,然后再用消毒剂冲洗清理该污染的地方。在所有这些操作过程中都应戴手套。

8. 实验书籍、表格或其他打印或手写材料被污染 应将这些信息复制,并将原件置于盛放污染性废弃物的容器内,高压灭菌处理。

9. 在生物安全柜以外发生有潜在危害性的气溶胶释放 所有人员必须立即撤离相关区域,并通知实验室负责人,任何暴露人员都应该接受医学咨询。为了使气溶胶排出和较大的粒子沉降,在一定时间内(如 1 小时内)严禁人员入内。如果实验室没有中央通风系统,则应推迟进入实验室(如 24 小时)。应在实验室门上张贴“禁止进入”的标志。过了相应时间后,在相关人员的指导下来清除污染。

10. 严防火灾 如发生火灾应沉着处理,切勿慌张,立即关闭电源。如系乙醇、二甲苯、乙醚等起火,切忌用水,应迅速用沾水的布类和沙土覆盖扑火。

11. 感染的实验动物逃跑 应立即抓回,并对污染区进行处理。

(彭奕冰)





第二单元 细菌检验基本技术

实验一 细菌形态检查

一、不染色标本细菌检查

【实验目的】

1. 熟悉细菌不染色检查法。
2. 了解不染色标本细菌检查的临床意义。

【实验器材】

1. 菌种 变形杆菌、金黄色葡萄球菌 8~12 小时肉汤培养物。
2. 培养基 肉汤培养基。
3. 其他 酒精灯、火柴、接种针、接种环、记号笔、培养箱、载玻片、凹玻片、盖玻片、凡士林等。

【实验方法】

1. 原理 不染色标本一般用于观察细菌动力及运动情况，细菌未染色时无色透明，在显微镜下主要靠细菌的折射率与周围环境不同进行观察。有鞭毛的细菌在镜下呈活泼有方向的运动，无鞭毛的细菌则呈不规则布朗运动。

2. 步骤

(1) 悬滴法 取 1 张洁净凹玻片，在凹窝四周涂少许的凡士林；用接种环取 1 环葡萄球菌或变形杆菌肉汤培养物置于盖玻片中央；将凹玻片凹孔对准盖玻片中央并接触液滴；然后迅速翻转载玻片，用小镊子轻压盖玻片，封闭后显微镜观察，先用低倍镜找到悬滴，再换高倍镜。

(2) 压滴法 用接种环取 1 环菌悬液，置于洁净载玻片中央，用镊子夹住盖玻片覆盖于菌液上，先将盖玻片一端接触菌液缓缓放下，使玻片之间不产生气泡，防止菌液外溢。标本立即置显微镜下观察，先低倍镜找到标本，然后在高倍镜下观察。

【实验结果观察】

无论是悬滴法还是压滴法，有鞭毛的变形杆菌可见发生位移的运动现象，而无鞭毛的金黄色葡萄球菌不发生位置变化。

【注意事项】

1. 不能使用陈旧的细菌培养物，以对数生长期的培养物最佳。
2. 压滴法观察时玻片间不能产生气泡，以免影响观察。

【思考题】

不染色标本细菌检查主要用于检测哪些生物特性？

二、细菌涂片制作和革兰染色

【实验目的】

1. 掌握革兰染色技术，了解革兰染色法的临床意义。



2. 熟悉细菌涂片的制作。

【实验器材】

1. 菌种 金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌。
2. 试剂 革兰染色液。
3. 其他 玻片、生理盐水、酒精灯、接种环、显微镜等。

【实验方法】

1. 原理

(1) 革兰染色法的原理尚不完全清楚，主要有以下3种学说。

①通透性学说：革兰阳性菌细胞壁结构较致密，肽聚糖层厚，脂质含量少，乙醇不易透入。革兰阴性菌细胞壁结构疏松，肽聚糖层薄，脂质含量多，乙醇易渗入。

②等电点学说：革兰阴性菌等电点（pI 4~5）较革兰阳性菌等电点（pI 2~3）高，一般染料酸碱度在pH 7.0左右，电离后革兰阳性菌所带的负电荷比革兰阴性菌多，与带正电荷的结晶紫染料结合较牢固不易脱色。

③化学学说：革兰阳性菌菌体含大量核糖核酸镁盐，可与结晶紫和碘牢固地结合呈大分子复合物，不易被乙醇脱色；革兰阴性菌菌体内含核糖核酸镁盐很少，吸附染料量少，形成的复合物分子也较小，故易被脱色。

2. 步骤

(1) 细菌涂片标本的制作

①涂片：取洁净玻片1张，用蜡笔在玻片上划2个直径1.5cm左右的圆圈，用接种环按无菌操作取1~2环生理盐水在玻片上，分别取细菌培养物少许与各自生理盐水磨匀，涂成直径约1cm×1cm大小的区域。

②干燥：涂片一般在室温下自然干燥，或将涂片膜面朝上，在火焰上方的热空气中加温干燥，切勿在火焰上烤干。

③固定：将干燥的载玻片在酒精灯火焰上迅速来回通过3次，注意温度不能太高，以玻片反面触及皮肤热而不烫为度。固定的目的在于杀死细菌，并使菌体与玻片黏附牢固，染色时不被染液和水冲掉，同时可凝固细胞质，改变细菌胞壁对染料的通透性。

(2) 革兰染色步骤

①初染：滴加结晶紫1~2滴于涂布细菌处，1分钟后用细水流轻轻冲洗。

②媒染：滴加卢戈碘液1~2滴，1分钟后用细水流轻轻冲洗。

③脱色：滴加95%酒精数滴，轻轻晃动玻片，约30秒后用细水流轻轻冲洗。

④复染：滴加稀释石炭酸品红1~2滴，30秒后用细水流轻轻冲洗。待标本自干或用吸水纸印干后，置油镜下观察。

【实验结果观察】

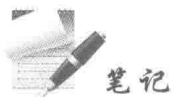
葡萄球菌是革兰阳性球菌，被染成紫色，呈葡萄串状排列；大肠埃希菌是革兰阴性杆菌，被染成红色，呈散在的排列。

【注意事项】

1. 涂片厚薄要适宜，菌膜应该薄而均匀。
2. 所有染液应防止染液蒸发而浓度改变。
3. 水洗时水流不宜过大，避免水流直接对准菌膜冲洗。
4. 菌种应选用对数期的菌种，菌龄过长影响细菌染色性。

【思考题】

革兰染色结果的影响因素有哪些？



三、细菌特殊染色

【实验目的】

1. 掌握细菌鞭毛、芽胞、荚膜染色方法的基本原理和操作方法。
2. 熟悉细菌鞭毛、芽胞、荚膜观察的临床意义。

【实验器材】

1. 菌种 变形杆菌、枯草芽胞杆菌、肺炎链球菌。
2. 培养基 1.4% 软琼脂平板、普通琼脂斜面。
3. 染色液 魏曦鞭毛染色液、芽胞染色液（石炭酸品红、95% 乙醇、碱性美蓝液）、荚膜染色液。
4. 其他 载玻片、擦镜纸、吸水纸、记号笔、镊子、接种环、显微镜等。

【实验方法】

1. 原理

(1) 鞭毛染色法 一般细菌的鞭毛都非常纤细，直径为 $0.01 \sim 0.02 \mu\text{m}$ ，只有用电子显微镜才能观察到。鞭毛染色法是借媒染剂和染色剂的沉淀作用，使染料堆积在鞭毛，使鞭毛直径加粗，同时使鞭毛着色，在普通光学显微镜下能够观察。常用的媒染剂由丹宁酸和氯化高铁或钾明矾等配制而成。

(2) 芽胞染色法 芽胞是利用细菌细胞不同部分与染料的亲和力不同，用不同染料进行着色，使芽胞和菌体呈不同的颜色而便于区别。芽胞壁厚、透性低，着色、脱色均较困难。因此，当先用石炭酸品红在加热条件下进行染色时，此染料不仅可以进入菌体，还可以进入芽胞，进入菌体的染料可经 95% 乙醇脱色，而进入芽胞的染料则难以透出，若再用碱性美蓝液进行复染，此时菌体即被染成蓝色，而芽胞难着色，仍呈红色，进而更明显地衬托出芽胞，便于观察。

(3) 荚膜染色法 由于荚膜与染料的亲和力弱，不容易着色，且可溶于水，易在用水冲洗时被除去。通常采用负染色法，使菌体和背景着色而荚膜不着色，从而在菌体周围呈一透明圈。由于荚膜的含水量在 90% 以上，故染色时一般不加热固定，以免荚膜皱缩变形。

2. 步骤

(1) 鞭毛染色法

① 载玻片的准备：将载玻片置于含适量洗衣粉水中煮沸 20 分钟，取出稍冷后用自来水冲洗、沥干，放入 95% 乙醇中脱水，用时在火焰上去除乙醇。

② 菌液的制备与制片：菌龄较老的细菌容易丢失鞭毛，为了增强细菌的动力，将细菌在新鲜配制的牛肉膏蛋白胨培养基斜面上连续培养 3~5 代。最后一代菌种培养 12~16 小时后，用接种环挑取斜面与冷凝水交接处的菌液数环，移至装有 1~2ml 无菌水的试管中，并放入 35℃ 恒温箱中静置 10 分钟，让幼龄菌的鞭毛松展开。用记号笔在洁净的玻片上划分 3~4 个相等的区域，吸取少量菌液滴在载玻片第一个小区的一端，将载玻片稍倾斜，使菌液缓慢流向另一端，平放自然干燥。

③ 染色：加染色液于第一区，使染料覆盖涂片。隔数分钟后再将染料加入第二区，依此类推。

④ 水洗：用蒸馏水轻轻地冲去染料。

⑤ 干燥：自然干燥。

⑥ 镜检：先低倍观察，再高倍观察，最后再用油镜观察。

(2) 芽胞染色法（石炭酸品红染色法）