

實用細菌學檢驗法

陳少伯編著

龍門聯合書局發行

實用細菌學檢驗法

(修訂本)

陳少伯編著

龍門聯合書局發行

實用細菌學檢驗法

全一冊



版權所有 翻印必究

新華書店
出版者

嚴 幼 芝

上海茂名北路三〇〇弄三號
電話 三〇二七七

發行者

龍門聯合書局

上海河南中路二一〇號
電話 一七六七四

靜安寺支店

上海愚園路二三一號
電話 三二六八六

分售處

龍門聯合書局各地分局

南京分局 太平路 267 號

北平分局 琉璃廠 103 號

重慶分局 中山一路 318 號

廣州分局 漢民北路 204 號

漢口分局 江漢一路 3 號

杭州分局 東坡路 57 號

長沙分局 府正街 33 號

台灣分銷處 台北衡陽路 12 號

基本定價金圓玖元正

外埠酌加郵運費

中華民國三十八年四月再版

謹 以 此 書 奉 獻

家 嚴 亮 孫 先 生 家 慈 孫 氏

— 少 伯 —

李 序

細菌學之檢驗法，在臨床診斷上之應用，日趨重要。但吾國今日尚缺乏專書可供參考，不第一般臨床醫師或檢驗人員極感不便，即教授與學習者亦感諸多困難。陳少伯醫師本其數年指導細菌學實習之經驗，復參外載籍之所長，編著實用細菌學檢驗法一書以問世。取材宏富，極合實用，洵足以發揮其多年研究之所得。而其裨益於吾醫學界者，更非淺鮮。

中華民國三十二年二月李振翩於軍醫學校血清研究所

胡 序

細菌學乃發見傳染病的照妖鏡，亦為預防醫學中的精髓，精確檢驗，其於臨床診斷以及防疫措施，如影隨形，如響斯應，如探海燈之照射，如過瞄準，關係密切，在應用上誠不可須臾脫離。可見在醫院在學校在檢驗場所，細菌檢驗方法的應用，應該要有一本條分縷析的紀載，藉備參資便利，實有迫切的需要。今日の後方，常感書荒，然醫學技術上的日書冊，誠如目前平價米之不可一日或缺，陳同學少伯服務於細菌學教果餘暇，勤於寫作，本其編著「醫用微生物學」之宏願，先于去年初版印，即其計劃中之第四集，今則又付再版，因社會需要而有此暢銷，其切，名不虛傳，信而可徵。陳君乃好學之士，年來學業上著有猛晉，余觀之再版，不久必能繼以三集付梓，一二年內更見一二集全部完成，遂行見日新又新，努力虛心以赴，百尺竿頭，隨日而上，勉旃勉旃。鼓勵，并為之敘。

華民國三十三年秋月胡定安識於中國預防醫學研究所時同客北碚蘇

自序

基礎醫學與臨床關係最密切者，首推細菌學，不僅闡明各種傳染病原問題，傳染方式以及治療與預防之方針；而於臨床診斷上裨益尤甚，如白喉，傷寒等之細菌培養，梅毒之血清診斷，莫不有賴細菌學以解決之。一般臨床醫師，並未專習細菌學，非僅不諳檢驗技術，即採取材料之方法不盡合理。至於細菌學檢驗人員，因缺乏參考書籍，對於檢驗材料之處如何鑑定等，每不知適當步驟，一般技術上，恆多缺陷。緣此種種，乃有編本書之動機。

細菌學工作之範圍甚廣，除臨床之細菌學血清學檢驗外，於公共衛生防疫事宜及血清疫苗製造等技術，亦多應用。本書對於細菌學之基本技術特別注重，凡從事上述工作人員，均可以此書為範本。

醫學生於讀細菌學時，雖有實習指導之專書可供參考，而實習指導僅其概要，對於各種器械之構造使用法及各項技術均不詳盡，作者管理學生細菌學實習，數年以來，深感學生之苦衷。同時，當教員者，往往於實習前同一問題而有東翻西閱之勞。用編是書，聊供各醫學院教學之助。

本書取材，以完全切合實際應用為主，至於簡易之新穎方法，如謝氏改良羅氏雙糖培養基及結核桿菌之 Pooman 氏染色法等，亦均採納。編印倉卒，掛一漏萬，在所難免，如荷海內外專家不吝指正，無任感禱。

中華民國三十二年元月常熟陳少伯序於軍醫學校血清研究所

再 版 序

去歲在安順軍醫學校血清研究所，承業師李振翩博士之贊助，本書得以初版問世。其時以經濟力量有限，未克大量印刷，孰料出版後不及兩月，已銷去十之八九。十月間著者來北碚任事，僅帶回此書百冊左右，及至今春已悉數售罄。諸友好均鼓勵再版，惟目下公教人員薪津所入尙不敷所出，安有餘力以印刷書籍？雖承教育部發給本書之甲種獎助金，而爲數極微，何補於事。時至今夏，著者鑑於各地紛紛來函詢購，深感我國醫學書籍之匱乏，實有再版之必要。適此次中國預防醫學研究所製造疫苗有所盈餘，迺商得胡總幹事之許可，先撥借五萬元作爲印刷費用，本書之所以能再版者，全賴此借款周轉耳。

本書初版，以印刷關係，魯魚豕亥之誤，不一而足。再版時已一一修正，遺漏之處亦加增補。內容方面則與初版無大出入。

著者有編輯『醫用微生物學』之計劃，擬分爲四集，先後出版。暫定第一集爲『細菌與螺旋體』；第二集爲『免疫學概論』；第三集爲『濾過毒與立氏體概論』；第四集爲『實用細菌學檢驗法』。是以本書作爲第四集先行出版，第三集即將付梓。第一第二兩集期於兩年之內絡續與讀者見面。至於寄生蟲學當亦屬微生物學範疇以內，擬洽請擅長斯學者另編寄生蟲學爲第五集。改日昇平，再彙訂成冊，以完成整個計劃。

此書再版，承軍事委員會政治部印刷所之協助並提前排印，感荷良深，用特附筆誌謝。

卅三年八月著者識於北碚國立江蘇醫學院

目次

第一章 器械	1
一 顯微鏡	1
二 滅菌器械	5
三 濾菌器	7
四 孵育箱	9
五 遠心沉澱器	10
六 玻璃器械	10
七 白金線與白金耳	13
第二章 培養基	14
一 培養基總說	14
二 培養基 PH 之測定	14
三 培養基之澄清及濾瀝法	18
四 培養基之分裝法	19
五 培養基滅菌法	20
六 培養基之組成及製備法	20
第三章 染料及染色法	40
一 染料	40
二 標本製作法	41
三 染色法	43
第四章 實驗動物	59

一 動物之養護	59
二 動物接種	61
三 動物解剖	63
四 採血	65
五 動物正常體溫	66
第五章 培養法	67
一 培養罩	67
二 移種法	67
三 分離培養法	69
四 孵育法	71
五 培養物之處置	73
六 細菌室工作人員警戒事項	74
第六章 鑑定法	75
第七章 重要致病菌之檢驗法	80
一 肺炎球菌	81
二 鏈球菌	82
三 葡萄狀球菌	84
四 淋球菌	84
五 腦膜炎球菌	85
六 白喉桿菌	86
七 結核桿菌	88
八 痲瘋桿菌	89
九 傷寒桿菌	89
十 沙門氏菌族	91
十一 痢疾桿菌族	91
十二 霍亂弧菌	93

十三	鼠疫桿菌.....	93
十四	破傷風桿菌.....	94
十五	WELCH 氏桿菌.....	94
十六	梅毒螺旋體.....	95
十七	回歸熱螺旋體.....	95
第八章 臨床血清診斷		96
一	肥達氏反應.....	96
二	外斐二氏反應.....	98
三	痢疾凝集反應.....	99
四	霍亂凝集反應.....	99
五	康氏反應.....	100
六	克萊氏試驗.....	107
七	乏色曼氏反應.....	109
八	血型檢定.....	118
第九章 診斷血清與自家菌苗之製造法		120
一	診斷血清.....	120
二	自家菌苗.....	121
第十章 水與牛乳檢查		124
一	水檢查.....	124
二	牛乳檢查.....	125
第十一章 菌種保存法		128

第一章 器 械

一 顯微鏡 (MICROSCOPE)

甲 顯微鏡之裝置

(一)機械部——(1)顯微鏡之前方有一直立之空心圓筒，曰鏡筒(Body Tube)；(2)鏡筒之上端有一可抽動之圓筒，曰抽移筒(Draw Tube)；其上刻有度數，可任意調節，有許多顯微鏡則無此裝置；(3)在鏡筒下裝有可以轉動之迴轉板(Nose Piece)，其上有三或四圓孔，備裝物鏡之用；(4)鏡之最下部，有馬蹄形之鏡座(Base)，用以載荷全部顯微鏡者；(5)鏡座與鏡筒之間有弓形鏡柱(Handle)以支持之；(6)鏡柱與鏡座之間有活動關節(Inclination Joint)相連接，以司鏡之前後傾屈；(7)鏡筒與鏡柱之間有兩個螺旋，一曰粗螺旋(Pinion Screw)，一曰微螺旋(Micrometer Screw)，以司鏡筒之升降；(8)在鏡柱下端裝有圓形或方形之載物台(Stage)，台中央有一圓孔，用以透光，台上裝有兩個鉗板(Stage Forceps)，可以固定載物玻片，為檢驗血液標本便利起見，在載物台上裝有推進機(Mechanical Stage)，具有刻度，可以前後左右移動。

(二)光學部——光學部為顯微鏡之主要部份，由於物鏡，目鏡，聚光器，光圈及反射鏡所組成。

1. 物鏡(Objectives)，係主要之光學裝置，由許多之晶片組合而成，此鏡裝於迴轉板上，其下端接近被檢物體，是以名曰物鏡。物鏡之擴大倍數不等，均有號碼註明。低倍擴大之物鏡，鏡頭與載物玻片之間，不必借助其他液體，是以曰乾燥物鏡(Dry Objectives)，而高於倍擴大之物鏡，因其鏡頭之晶片太小，則自載物玻片透過之光線往往在空氣中折光而不易射入鏡頭，致物體觀察不清，乃用一種洋杉油(Cedar Oil)介於鏡頭與載物片間，取其密度與載物玻片相彷彿(折光率為1.52)，不使透過之光線有所損失，物體

即可觀察清晰。細菌體甚微，觀察時最宜應用高倍物鏡。此物鏡名曰油浸物鏡 (Oil-immersion Objectives)。其上註有 HI, 或 Oil-immersion 字樣，初學者務加注意。

2. 目鏡 (Eyepiece or Ocular)，裝於抽移筒上端，與觀察者之目相接近，故名曰目鏡，因其擴大倍數之不同而註有各種號碼，如 $3\times$ 、 $6\times$ 、 $12\times$ 、 $15\times$ 等。為便利指示物像起見，目鏡中裝有細黑絲一根，為指針。

3. 聚光器 (Condenser)，裝於載物台下，可以上下移動，其目的在聚集光線於物體上，以增強照射之光線。

4. 反射鏡 (Mirror)，裝於鏡之最下方，具平凹兩面，可以自由翻轉，用以採取光線及調節焦點。

5. 光圈 (Iris)，裝於聚光器下，可以自由收放，其作用，宛如眼內之虹彩。

乙 顯微鏡之使用法：

顯微鏡為研究細菌之重要工具，細菌工作人員務必明瞭其構造，能靈活運用，更應善自保護，弗使此貴重器械有所損傷。

(一)採光法——顯微鏡不能受直接光線照射，以其不易觀察清晰圖像，且有損光學之裝置也。實驗室內使用顯微鏡，以北向窗下為宜，取其光線平等而無直接光線之射入。晚間可用人工光源 (燈)，惟燈光色紅黃，不合於用，乃於聚光器下裝一藍色玻片，或燈光與顯微鏡間裝一藍色液之圓形玻璃瓶。

(二)焦點之決定——使用油浸物鏡時，於焦點之決定甚感重要，在用油浸鏡前，先用乾燥物鏡，觀察者目對向目鏡，右手把持粗螺旋，左手翻動反射鏡，以見到窗外遠處物體 (如樹)，清晰投入為止，然後再換油浸物鏡。此係初學者必需之手續，老練者不在此例。

(三)觀察者之眼——觀察顯微鏡時，以用左眼為宜，兩眼務必同時睜開，如果右眼閉合，則易疲勞，不久即覺頭眩。同時，右眼睜開可以繪圖。

(四)油浸物鏡之使用——在觀察標本時，先用弱倍擴大之乾燥物鏡，尋得相當視野後，再在載物玻片上滴加洋杉油，然後將鏡筒下沉，使油浸物鏡頭與油相接觸 (在側方仔細觀察)，乃將眼移至目鏡上，細心旋動粗螺旋，下

降鏡筒，至模糊見到物像時，再旋動微螺旋，至物像清晰爲止。初學者爲謹慎起見，先將鏡頭儘量下降，以幾接載物片爲度（實際上不能接觸，恐有傷物鏡之晶片），然後上移鏡筒，先得模糊物像後，再用微螺旋以調節之。最好在右手旋轉微螺旋時，同時以左手移動標本，如有障礙，即示物鏡已與載物片接觸，不可再向下旋轉。觀察畢，上旋鏡筒，然後取去標本，用擦鏡紙浸以賽羅油（Xylol）或汽油拭去洋杉油，立即換用乾燥鏡紙，拭去鏡頭上餘剩之賽羅油，因鏡頭晶片之周圍用膠質固定，賽羅油有溶化此膠之力，若不注意，日久後，晶片可以脫落。若用汽油，則少此弊。

（五）微螺旋之使用——在使用顯微鏡前，先注意微螺旋之位置，普通在微螺旋旁上下移動之兩側，一側刻有二劃線，一側刻有一劃線，務使一側之一線在他側二線之中間，方可運用自如。較精細之顯微鏡，在微螺旋之周圍附有刻度，鏡檢前務使零度向上。

（六）反射鏡——於日光下，用平面；人工光下用凹面。檢視染色標本多用平面，檢視本色標本，多用凹面。

（七）聚光器之位置——光源遠時，將聚光器儘量上升；光源甚近時，將聚光器稍稍下降。

（八）光圈——檢視染色標本時，光圈放大；檢視本色標本時，光圈縮小。

（九）接目鏡——初學者往往愛用強擴大目鏡（ $12\times$ 或 $15\times$ ），但通常用弱擴大者（ $6\times$ ）已足，有時弱擴大者反較強擴大者爲清晰，如有特殊情形必須詳細觀察時，乃換用強擴大。

（十）推進機——在檢驗血片時，如欲計算血像，非推進機不能精確。耐檢查之細菌，推進機之有無，不足輕重，有時反以手移動標本爲方便。

丙 顯微鏡之保護：

（一）顯微鏡使用畢後，用軟綢或擦鏡紙拂淨目鏡與物鏡，以及其他各部。將物鏡成八字式再向下旋，切弗將物鏡垂直放置，惟恐物鏡與聚光器相撞而損壞。最好在載物台上鋪以厚層紗布，庶可避免強力接觸。

（二）光學部份之晶片及反射鏡，若經強烈日光照射，均易損傷，是以對於直接光應竭力避免。

（三）顯微鏡置於冷濕處，易生黴菌，苟晶片上滋生黴菌，則無法除去，是

以顯微鏡務必藏於乾燥處。

丁 顯微鏡之附帶裝置：

(一)測微計(Micrometer)——在顯微鏡下欲知物體之大小，乃利用測微計以測定之。此不特應用於細菌學，於血液學及寄生蟲學亦多用之。測微計所用之單位，為 Micron (μ)，1 Micron 等於千分之一 Millimeter。至於測定濾過性毒所用之單位為 Millimicron ($=1/1000$ Micron)，寫作 $m\mu$ 或 $\mu\mu$ ，此種測定，另有方法，不能以測微計測定之。

測微計主要用目測微計(Ocular Micrometer)以測定之，此計係一圓形玻片，中央刻有五十等分或一百等分之小格，每五小等分有一長線相隔。此每小等分之長度不定，隨目鏡與物鏡倍數之不同以及鏡筒之長短而變動。是以在計測前必先以物測微計(Objective Micrometer)以確定其每小格之長度。物測微計係一厚載物玻片，中央有一圓形覆蓋玻片，其中有一百等分刻度，每等分小格之長度為 $1/100$ Millimeter 即 (10μ)

使用時，先將目測微計裝入目鏡內之橫隔上，載物台上裝載物測微計，與平常觀察標本同樣方法，先覓得物測微計之劃線，再移動物測微計與目測微計，使兩者之第一線相合，然後計算每物測微計之小格內有目測微計之小格若干，計算時務必多數幾格，方期準確。如果一物測微計之小格內有五個目測微計之小格者，則目測微計在此種條件下，其每格之長度適等於 2μ 。

實際測定物體時，如仍在上述情況下，物體之長適為目測微計之兩小格，而其闊為半小格，則知此物體之大小為 $4 \times 1\mu$ 也。

如無測微計，可以 Thoma-Zeiss, Tuerck 或 Neubauer 血球計數器代之。因其中每小格之長度為 $1/20\text{mm}$ 。(即 50μ)，亦可為確定目測微計每小格長度之用。

(二)暗視野映光(Dark-field Illumination)——暗視野映光法，能從微細物體在暗黑之境地明耀顯現。於檢覓生活螺旋體，觀察生活菌鞭毛運動情況時，殊稱便利，近來用者極廣。

其原理，即使光線為聚光器下方中央之圓形黑盤所遮，僅由周緣進入之光線集合於載物玻片上，斜照被檢物。物體在暗視野放光顯現。

暗視野聚光器有多種，其中以拋物線聚光器(Paraboid Condenser)為

最常應用。於油浸鏡檢時，非此特殊之聚光器不可。若於弱擴大之乾燥物鏡下檢視物體時，可於普通聚光器下面晶片中央粘附一圓形黑紙，恰遮直接光線射入為度。

採用之光源，以小弧光燈 (Small Arc Lamp) 為最合用。在燈與顯微鏡之反射鏡間，可置一盛有阿摩尼亞銅液之圓瓶，以為聚光器，目的在光線均得平行射入聚光器。燈與顯微鏡間之距離約為 30—50cm。務求光線照滿平面反射鏡，否則被檢物體將不能被光線之平均照映，圖像於以不克確實。最新之暗視野聚光器，在聚光器下裝有燈，使用便利，無上述之煩瑣，良堪推薦。

使用時，在聚光器之表面，滴加洋杉油一滴，或有用甘油者，亦可以煮沸後不含氣體之水代之，然後安置載物片於載物台上。上旋聚光器，使油與載物片相接觸。注意不使油中容留氣泡。被檢驗物須置於水或油中。再覆以蓋玻片。蓋玻片與載物玻片間之水或油中，亦不容有氣泡留存。如有，可以灼熱之白金線接觸蓋玻片以消除之。

所用之載物玻片與蓋玻片，均應絕對清淨，而無裂紋。載物玻片之厚約為 1.45 至 1.55 mm，蓋玻片之厚度為 0.1 mm。兩者均有影響於焦點距離，蓋玻片之厚度如有出入，可伸縮鏡筒之長短以糾正之。

二 滅菌器械 (STERILIZERS)

甲 乾熱滅菌器 (HOT-AIR STERILIZER):

乾熱滅菌器常用於玻璃器具，如 Petri 氏皿，試管，吸管及玻瓶等之滅菌。其構造甚簡單。最好用電氣發熱者，亦有用煤氣加熱者。國難期間，前二者均不易得，著者曾改用木炭以加熱，成績尚佳，而以溫度不易調節為憾，偶一不慎，即有溫度過高之虞。用於玻璃器等之滅菌時，加熱至 150° — 160° C. 二小時即足，不能超過 180° C.。如溫度過高，可使內部之棉塞或包裹之紙張燒焦，且棉花內之油脂燒焦後，即沾污試管，甚不雅觀，有時甚至在器內焚燬，則更不堪設想。通常，經適宜之溫度滅菌後，棉花與紙張均呈淡黃色。滅菌畢，應俟冷卻至 60° C. 左右，方可開門取出滅菌器具。若立即開門，器械驟遇冷空氣有炸裂之危險。此種滅菌方法，今已少用，大多用增壓滅菌器

以代之。如須器皿絕對乾燥者，則非用此滅菌器不可。

乙 阿魯氏滅菌器 (ARNOLD'S STERILIZER)

阿氏滅菌器係利用蒸汽之滅菌，功用與 Koch 氏蒸氣滅菌器完全相同。其底層盛水，器頂加蓋，蓋中央插有溫度計。器底用火加溫，水蒸汽之溫度達 100°C ，蒸汽循流器內，促進滅菌能力，且底層之水無乾涸之虞。

滅菌時，第一日需 100°C 半小時，此時僅殺滅細菌之生育體，而不殺滅芽胞，所以將培養基取出孵育 24 小時，使其中芽胞發育為生育體，第二日再經 100°C 半小時之滅菌，其中生育體又被殺滅；惟恐其中仍有芽胞存留，乃於第三日再經 100°C 半小時以殺滅之。此種滅菌方法，曰間歇滅菌法 (Fractional Sterilization)。

通常，有許多培養基，如明膠培養基，含糖培養基及牛乳培養基等不能耐高熱，乃用阿魯滅菌器以滅菌。

丙 增壓滅菌器 (AUTOCLAVE):

增壓滅菌器之用途最廣，乃利用蒸汽在器內之壓力增高而益增高其溫度。器內之壓力可增高至二氣壓，三氣壓，四氣壓不等。此種壓力可用磅數表示之。壓力愈大溫度亦愈高，殺菌力因之增強，不特細菌生育體，即芽胞於短時間內亦可殺滅。

構造較複雜者，係雙層金屬壁之圓筒，底層盛水，內壁沿口周圍有許多小孔，底下用打氣爐或木炭爐加熱，水沸後蒸汽由口緣小孔入內。頂上有厚鐵蓋，蓋之周圍由螺旋固定，使蒸汽不致外逸。器外套有鐵壳，其旁附有磅表，可表示內部之壓力。小型者僅裝有溫度計。更附有保險器，至相當壓力即自行放汽，不使內部壓力過高。

增壓滅菌器有兩種型式：一為直立型，一為橫臥型。前者較小，用木炭或打氣爐加熱；後者較大，大多另行通入蒸汽，不直接加熱，此種用於大規模之製造所最稱便利。

凡玻璃器械，培養基，鹽水，衣服，棉棒等，均可用此滅菌器以滅菌。玻璃器械等行 20 磅 20 分鐘以滅菌。盛於試管內之培養基僅 15 磅 15—20 分鐘即可，盛於大瓶內之鹽水或培養基，應 15 磅半小時方可。至於含糖培養基於 8 磅下滅菌 15 分鐘即可。

增壓滅菌器在加熱後，應開放下部龍頭，放除器內之空氣，使器內完全充以蒸汽，器內之壓力盡為蒸氣壓力，如有空氣留存，壓力雖增而溫度不增，致滅菌不確實。按經驗，可以將放汽之龍頭沉於一杯水中，然後放汽，如有氣泡放出者，表示器內尚有空氣，至放出之汽在水內呈拍拍之聲而無氣泡，證明器內盡為蒸汽矣。

滅菌時間滿後，應徐徐放汽，俟汽放完方可開蓋取物。如急急放汽，則被滅菌之瓶內液體立即衝去瓶塞而外溢。如有衣服滅菌，應於放汽畢後半小時取出，即利用器內之熱度使衣服燥乾也。

壓力與溫度之對照，列表如次：

壓 力	溫 度
5 磅壓力	107.7°C. (227°F.)
10 磅壓力	115.5°C. (240°F.)
15 磅壓力	121.6°C. (150°F.)
20 磅壓力	126.6°C. (260°F.)
25 磅壓力	130.5°C. (267°F.)
30 磅壓力	134.4°C. (274°F.)

丁 煮沸滅菌器：

注射器與解剖器械，均可用煮沸滅菌法。煮鍋之構造至為簡單，一底一蓋而已，大多為長方形，水內可加少許碳酸鈉，一則可以防止生鏽。一則可以增高沸點以助殺菌力。有些橡皮器具不耐高熱，亦可行煮沸滅菌。煮沸五分鐘，將此器取下，緊握蓋底，傾去水，稍俟片刻，取出應用。

戊 血清凝固器 (INSPISSATOR)：

血清培養基與雞蛋培養基，不耐高熱，可用血清凝固器以滅菌，同時可使培養基凝固。此器之構造簡單，係一雙層銅質之四方箱，上有兩重蓋，一層為玻璃，一層為銅質。器之四周及底層盛水，底下用煤氣燈或酒精燈加熱。此器有四足，前二足由活動螺旋固定，可以視需要斜度幾何，而自由伸縮之。

三 濾菌器 (FILTERS)