



临床医学微生物检验 基础与诊断技术

LINCHUANG YIXUE WEISHENGWU JIANYAN
JICHU YU ZHENDUAN JISHU

安娜 编著

 科学技术文献出版社
SCIENTIFIC AND TECHNICAL DOCUMENTATION PRESS

临床医学微生物检验基础与诊断技术

安娜 编著

 科学技术文献出版社
SCIENTIFIC AND TECHNICAL DOCUMENTATION PRESS

·北京·

图书在版编目 (CIP) 数据

临床医学微生物检验基础与诊断技术/ 安娜编著. —北京: 科学技术文献出版社, 2014.7

ISBN 978-7-5023-9209-3

I. ①临… II. ①安… III. ①病原微生物—医学检验 IV. ①R446.5

中国版本图书馆CIP数据核字 (2014) 第153147号

临床医学微生物检验基础与诊断技术

策划编辑: 薛士滨 责任编辑: 杜新杰 责任校对: 赵 瑗 责任出版: 张志平

出 版 者 科学技术文献出版社
地 址 北京市复兴路15号 邮编 100038
编 务 部 (010) 58882938, 58882087 (传真)
发 行 部 (010) 58882868, 58882874 (传真)
邮 购 部 (010) 58882873
官 方 网 址 www.stdp.com.cn
发 行 者 科学技术文献出版社发行 全国各地新华书店经销
印 刷 者 天津午阳印刷有限公司
版 次 2014年7月第1版 2014年7月第1次印刷
开 本 787×1092 1/16
字 数 370千
印 张 15.5
书 号 ISBN 978-7-5023-9209-3
定 价 48.00元



版权所有 违法必究

购买本社图书, 凡字迹不清、缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责调换

前 言

目前，临床检验医学正以日新月异的速度飞快发展，新技术、新方法、新仪器不断推出。各医疗卫生单位的医学检验部门在疾病的诊疗方面发挥着举足轻重的作用，其中临床微生物学检验是医学检验专业的重要分支。为了进一步推动各医疗卫生单位的医学检验技术的发展，规范临床微生物检验操作，笔者编写了《临床医学微生物检验基础与诊断技术》一书，可供临床检验工作者、临床医学工作者参考。

本书分三篇共三十章，包括细菌学、真菌学、病毒学三篇，每篇中的第一章为概述，然后每个小节对每个具体微生物的描述依照分类、微生物学检验、临床意义的次序展开。本书的编写着重于实用性与先进性兼顾，法规性与参考性并存，文字简明，表达准确，便于读者理解。

由于编者时间非常紧张，且笔者学术水平和编写能力有限，尽管编者作了最大的努力，但书中缺点和错误仍在所难免，在此恳请同道和读者给予批评和指正。

安 娜

目 录

第一篇 细菌学

第一章 细菌学概述	1
第一节 细菌的形态与结构	1
第二节 细菌的形态学检查	3
第三节 细菌的分离培养与鉴定	4
第二章 细菌耐药性检测	20
第一节 抗菌药物	20
第二节 细菌对药物的敏感试验	23
第三节 细菌的耐药机制及耐药性检测	26
第三章 临床微生物检验标本的采集	29
第一节 标本的采集与处理的原则	29
第二节 血液标本的采集	30
第三节 脑脊液标本的采集	32
第四节 呼吸道标本的采集	33
第五节 胆汁标本的采集	34
第六节 尿液标本的采集	35
第七节 粪便标本的采集	37
第八节 生殖器官分泌物标本的采集	38
第九节 化脓及创伤感染标本的采集	39
第十节 眼、耳、鼻、喉拭子标本的采集	42
第四章 球菌	44
第一节 葡萄球菌属	44
第二节 链球菌属	46
第三节 肠球菌属	49
第四节 奈瑟菌属和布兰汉菌属	50
第五章 肠杆菌科	52
第一节 埃希菌属	52
第二节 沙门菌属	54
第三节 志贺菌属	55
第四节 克雷伯菌属	57
第五节 肠杆菌属	59
第六节 枸橼酸杆菌属	60

第七节	沙雷菌属	61
第八节	变形杆菌属、普罗威登斯菌属和摩根菌属	63
第九节	耶尔森菌属	65
第六章	不发酵革兰阴性杆菌	68
第一节	假单胞菌属	68
第二节	伯克霍尔德菌属	73
第三节	窄食单胞菌属	75
第四节	不动杆菌属	76
第五节	寡养单胞菌属	77
第六节	产碱杆菌属	78
第七节	黄杆菌属	79
第八节	莫拉菌属	80
第九节	军团菌属	81
第七章	其他革兰阴性杆菌	83
第一节	嗜血杆菌属	83
第二节	巴斯德菌属	85
第三节	鲍特菌属	87
第四节	布鲁菌属	88
第八章	弧菌属	91
第一节	霍乱弧菌	91
第二节	副溶血弧菌	94
第九章	气单胞菌属和邻单胞菌属	96
第一节	气单胞菌属	96
第二节	邻单胞菌属	97
第十章	弯曲菌属	99
第十一章	螺杆菌属	101
第十二章	革兰阳性需氧杆菌	103
第一节	炭疽芽孢杆菌	103
第二节	蜡样芽孢杆菌	105
第三节	李斯特菌属	107
第四节	红斑丹毒丝菌	108
第五节	加特纳菌属	109
第六节	白喉棒状杆菌属	110
第十三章	分枝杆菌属	112
第一节	结核分枝杆菌	112
第二节	非结核分枝杆菌	114
第三节	麻风分枝杆菌	116
第十四章	放线菌属与诺卡菌属	118
第一节	放线菌属	118

第二节	诺卡菌属	119
第十五章	厌氧菌	121
第一节	概述	121
第二节	厌氧球菌	122
第三节	梭状芽孢杆菌	123
第四节	肉毒梭状芽孢杆菌	125
第五节	艰难梭状芽孢杆菌	126
第六节	革兰阴性无芽孢厌氧杆菌	127
第七节	革兰阳性无芽孢厌氧杆菌	129
第十六章	螺旋体	132
第一节	钩端螺旋体属	132
第二节	疏螺旋体属	134
第三节	密螺旋体属	137
第十七章	支原体	139
第一节	概述	139
第二节	肺炎支原体	141
第三节	溶脲脲原体	143
第十八章	衣原体	145
第一节	沙眼衣原体	145
第二节	肺炎衣原体	148
第三节	鹦鹉热衣原体	149
第十九章	立克次体	151
第一节	概述	151
第二节	立克次体属	151
第三节	东方体属	155
第四节	埃立克体属	156
第五节	柯克斯体属	158
第六节	汉赛巴通体	159

第二篇 真菌学

第二十章	真菌学概述	161
第二十一章	皮肤和皮下组织感染真菌	167
第一节	毛癣菌属	167
第二节	表皮癣菌属	168
第三节	小孢子菌属	168
第二十二章	引起侵袭性感染的真菌	170
第一节	念珠菌属	170

第二节	新生隐球菌属	171
第三节	曲霉菌属	172
第四节	组织胞浆菌属	173
第五节	肺孢子菌属	175
第六节	毛霉目真菌	175
第七节	马尔尼菲青霉	177

第三篇 病毒学

第二十三章	病毒学概述	178
第一节	病毒的基本性状	178
第二节	病毒的感染	186
第三节	病毒感染的微生物学检验	189
第二十四章	肝炎病毒	194
第一节	甲型肝炎病毒	194
第二节	乙型肝炎病毒	196
第三节	丙型肝炎病毒	200
第四节	丁型肝炎病毒	202
第五节	戊型肝炎病毒	203
第二十五章	呼吸道病毒	205
第一节	正黏病毒科	205
第二节	副黏病毒科	208
第三节	其他呼吸道病毒	211
第二十六章	肠道感染病毒	215
第一节	人类肠道病毒	215
第二节	轮状病毒	217
第二十七章	出血热病毒	219
第一节	汉坦病毒	219
第二节	克里米亚-刚果出血热病毒	221
第二十八章	疱疹病毒	223
第一节	单纯疱疹病毒	223
第二节	水痘-带状疱疹病毒	224
第三节	EB 病毒	225
第四节	巨细胞病毒	226
第五节	其他人类疱疹病毒	227
第二十九章	逆转录病毒	229
第一节	人类免疫缺陷病毒	229
第二节	人类嗜 T 细胞病毒	231

第三十章 其他病毒和朊粒·····	233
第一节 狂犬病毒·····	233
第二节 人乳头瘤病毒·····	234
第三节 朊粒·····	236
参考文献·····	239

第一篇 细菌学

第一章 细菌学概述

第一节 细菌的形态与结构

单个细菌细胞体积很小，常以微米为测量单位，必须借助显微镜放大几百倍、上千倍、上万倍才能看得到。不同种类的细菌大小很不一致，同一种细菌受其环境和菌龄等多方因素影响大小也不相同。根据细菌外形的不同，将细菌分成了三种基本形态，即球形菌、杆菌、螺形菌。

【形态】

（一）球菌

单个球菌直径为 $0.8\sim 1.2\mu\text{m}$ 呈圆球状，按其分裂方式和分裂后的排列形式不同又分为：双球菌、链球菌、葡萄球菌。

- 1.双球菌在一个平面上分裂，分裂后两个菌体成对排列，如脑膜炎双球菌。
- 2.链球菌分裂后的菌体呈链状排列。
- 3.葡萄球菌在多个不同角度的平面上分裂，分裂后堆积成葡萄串样。

（二）杆菌

各种杆菌的大小很不一致。大的杆菌长度在 $10\mu\text{m}$ 以上，中等大小的杆菌长约 $3\mu\text{m}$ ，小杆菌长 $0.5\sim 1.0\mu\text{m}$ ，杆菌的形态基本呈杆状，有的是直的，有的是弯曲的，大多数杆菌两端呈纯圆，也有少数呈方形或菱形，有的杆菌末端膨大呈棒状，称棒状杆菌，有的杆菌呈分枝，称分枝杆菌，杆菌的形态也是多样化的，偶有成对或成链排列的。

（三）螺形菌

菌体弯曲，可分为两类。

- 1.弧形菌菌体只有一个弯曲，呈逗点状。
- 2.螺形菌菌体有数个弯曲，如鼠咬热螺菌。

【结构】

细菌细胞的基本构造是所有细菌所具有的共同特征和某些细菌所特有的特殊构造一起构成细菌。

（一）细菌细胞壁结构

细菌主要是由坚韧的细胞壁保持其正常形态，保护其很脆弱的细胞膜及其内含物，

避免渗透压异常引起破裂，细胞壁由多种化学物质有规律地聚合而成，聚合的细胞壁成分构成了复杂的多层结构，细胞壁成分为带电的高分子聚合物。因提供了一种离子交换机制来帮助离子和营养物质的吸收及某些物质的排出，细菌的细胞壁是一种天然有效的分子筛，对进出物质有严格的选择作用。细菌的细胞壁分为三层，壁厚 10~25nm，壁上有微孔，允许小于 1nm 的可溶性分子通过，其化学组成可因细菌的种类不同而有所不同，主要化学组成有黏肽、脂多糖。

(二) 细菌的内部结构

细菌的内部结构主要由细胞膜、细胞浆、核质等组成。

1. 细胞膜 细菌的细胞膜与真核细胞中细胞器的某些功能相同，同时具有其生物膜的膜单位，膜占全细胞重量的 30%以上，细胞膜中 60%~70%为蛋白质，20%~30%为类脂，此外还有少量多糖，主要成分为磷酸乙醇胺和甘油类脂。胞膜功能是多方面的，对维持细胞的功能和生存是必要的，并涉及菌体的生长与分裂，其表现为：维持渗透压梯度和溶质转移，合成细胞壁的基本场所，附着与分离 DNA，参与细胞分裂，是氧化代谢与能量产生的部位，鞭毛附着基础。

2. 中介体 是胞浆中主要膜状结构，它由细胞膜内折而成，在电镜下才能看到，中介体分为两型：即横隔中介体、侧中介体。中介体的功能是：可以增大细胞的面积以增大酶的含量，中介体还具有线粒体的作用，中介体含有细胞色素和琥珀酸脱氢酶，为细胞提供呼吸酶，因此亦称拟线粒体。

3. 核质 细菌的细胞核没有核膜、核仁和有丝分裂器。核区域充满 DNA 纤丝，是一个单一的染色体。细菌细胞核具有生物细胞核的共同功能，是细菌新陈代谢、生长繁殖必需的物质，与遗传变异有密切关系。

(三) 细菌的特殊构造

所谓特殊构造是指某些种细菌才有的构造，而绝大多数细菌所不具有，对于鉴别细菌的种属是非常重要的特征，在医学上和生物学上占有重要的位置，其特殊构造主要有：鞭毛、菌毛、荚膜、芽孢、质粒。

1. 鞭毛 有些杆菌、弧菌、螺菌在菌体上附有细长呈波状弯曲原丝状物称鞭毛，一般认为鞭毛是细菌的运动器官，鞭毛的排列，根据鞭毛的数目和排列特点，可将鞭毛分成三种类型。

(1) 单鞭毛：只有一根鞭毛，位于细菌的顶端。

(2) 丛鞭毛：位于菌体的顶端有一束鞭毛。

(3) 周鞭毛：菌体的周围有数量不等的鞭毛。

鞭毛长 3~20nm，直径约 0.1~0.013nm，鞭毛呈波状，细菌的鞭毛很容易从菌体脱落，不易染色，必须用特殊的染色法染色才能用光学显微镜观察到。

2. 菌毛 菌毛主要生长在革兰氏阴性菌的菌体上，在电镜下可见到细菌表面有数目不等的线状附着物，与鞭毛不同称其为菌毛，按生物学特点又分为普通菌毛和性菌毛，后者主要见于进行接合的细菌，性菌毛较普通菌毛长得多，长度介于鞭毛和普通菌毛之间，每个细菌细胞只有 1~2 根性菌毛，革兰阳性菌除棒状杆菌属中个别菌种发现菌毛外，其他均未发现。

3. 荚膜 许多种细菌在细胞壁外面，包围一层黏液物质，称荚膜，荚膜不易着色，

对碱性染料亲和力弱,用普通方法染色只在菌体周围有一条狭窄透明带,因此只能用特殊染色法和墨汁,负染法进行观察。荚膜能保护细胞免受各种有害物质对细菌的损伤,同时能抵抗宿主的杀菌物质及吞噬细胞的吞噬作用,荚膜多糖还可抑制体液中溶菌酶的作用,从而增加细菌对宿主的侵袭力。

4.芽孢 某些细菌在一定环境和条件下,由于细胞浆脱水浓缩,在菌体内形成一个折光性强的圆形或椭圆形小体,称芽孢。芽孢位于细菌的中心或末端,有些细菌的芽孢直径比菌体横径小,或比细菌横径大,成熟的芽孢是一个多层膜的结构,芽孢内部含有DNA、RNA和蛋白质。

芽孢的形成需要一定条件,并因菌种不同所需条件也不同,有些细菌需在有氧条件下才形成芽孢,有些细菌只有在无氧条件下才能形成,此外芽孢的形成与温度、湿度、pH、碳源、氮源以及某些离子存在均有关。有多种因素又使芽孢发芽,如温度湿度及pH值的改变。

细菌的芽孢对热、干燥,化学消毒剂及辐射均有较强的抵抗力,因此芽孢在医学上的重要意义,一方面由于抵抗力强,所以在处理污染的医疗用品时进行高压灭菌,另一方面可以作为细菌鉴定的根据。

5.质粒 质粒是存在胞浆内的一类微小染色体外遗传物质,许多种细菌表现出除了染色体外,还存在另一类遗传物质,即与染色体无关的质粒,根据质粒复制控制分类,可分为严紧型和松弛型;根据质粒的接合转移能力分类,可分为接合型或非接合型;根据质粒的不相容性分类,两个亲缘关系密切质粒不能稳定保持在一个菌体内,同一类群内质粒彼此不相容,而不同类群的质粒是相容的。

第二节 细菌的形态学检查

细菌形态学检查在细菌初步鉴定中起到非常重要的作用,通过不同的形态学检查方法可以对细菌进行简单分类,可鉴别细菌有无鞭毛、动力,为下一步的鉴定工作打下基础。

【不染色细菌】

可以观察细菌的动力及运动等活体状况,由于细菌的折光性不强,镜下不能清楚地看到细菌的形态特征和结构。标本的制作悬滴法、压滴法和毛细管法,后者主要用于厌氧菌的动力观察。用普通光学显微镜、暗视野显微镜或位相差显微镜观察。

【染色标本的形态检查】

细菌的染色可能是由于毛细管现象和染料的渗透作用、染料的溶解和吸收作用使染料进入细胞内,或由于电荷的吸附和结合使细菌着色。也可能与细菌细胞内的化学成分有关。此外细菌的染色性与细菌细胞膜的通透性、细胞结构的完整性,以及培养基的种类、菌龄、染色液的离子强度、pH、染色温度等密切相关。

【染色方法】

(一)单染色法

利用单一染料对细菌进行染色的一种方法,此法操作简便,适用于菌体一般形状和细菌排列的观察。常用碱性染料进行简单染色,因为在中性、碱性或弱酸性溶液中,细

菌细胞通常带负电荷，而碱性染料在电离时，其分子的染色部分带正电荷；酸性染料电离时，其分子的染色部分带正电荷，因此碱性染料的染色部分很容易与细菌结合使细菌着色。染色后的细菌细胞与背景形成鲜明的对比，在显微镜下更易于识别。常用作简单染色的染料有：美兰、结晶紫、碱性复红等。使用草酸铵结晶紫染色液，染色迅速，着色深，菌体呈紫色。

（二）复合染色法

1. 革兰染色法 染液由革兰结晶紫染液、革兰碘液、95%乙醇和稀释石炭酸复红（沙黄）组成。革兰阳性菌为紫色，革兰阴性菌呈红色。

影响因素：涂片过厚将使脱色不完全，乙醇脱色时间过长将导致过度脱色；染液储存过久由于蒸发而影响浓度，特别是碘液久存或见光而形成碘酸，失去媒染作用；95%乙醇如果密封不佳易挥发，失去脱色作用；细菌形态学检查以对数生长期的细菌形态最为典型，菌龄过长易致阴性。

2. 抗酸染色法 染液由石炭酸复红、3%盐酸乙醇和美兰组成。抗酸菌呈红色，非抗酸菌和细胞呈蓝色。

本法主要用于结核分枝杆菌和麻风分枝杆菌的检查，每张载玻片上只能涂1份标本，最好使用新玻片，否则必须彻底清洗干净。染色使不得使用染色缸，吸水纸1片1张不得重复使用。脱色时间不得过短。为了防止实验室感染可将标本先进行高压蒸气灭菌，然后进行抗酸染色。

第三节 细菌的分离培养与鉴定

【培养基】

培养基是细菌检验工作中不可缺少的一个重要组成部分，细菌培养要获得正确的结果，必须有适合细菌生长的培养基，不同种类的细菌对培养基有不同的要求，培养基是用不同的方法将多种营养物质根据细菌生长的需要而合成的一种混合营养料，培养基中一般含有被细菌利用的氮源、碳源、无机盐类和水等物质，细菌对未经消化的蛋白利用较差，而需要比较简单的含氮物质，如多肽类、蛋白胨及氨基酸等，某些细菌还需要类似维生素的辅助生长因素或某些特殊因子方能生长，培养基主要作为繁殖细菌和分离细菌，研究细菌和制造生物工程等多方面应用。

（一）培养基的分类

按其物理性状可分为固体、液体和半固体三种。按形式可分为平板、斜面、高层培养基，按其作用可分为基础、营养、鉴别、选择及专用培养基；按成分可分为合成及非合成培养基；按制备可分为实验室自行制备的培养基、干燥培养基和整套系列培养基。

（二）培养基的主要成分及作用

培养基的营养直接影响细菌生长，如果培养基的成分不适合细菌生长需要，则细菌就不能生长，通常所用的培养基成分，需要和人体组织或体液成分类似，所以细菌所用的物质有氮源、碳源、生长因子、水及无机盐等。

1. 蛋白胨 在细菌培养基中最常加入的是蛋白胨，主要作为氮源，也可以作为碳源，

蛋白胨是由蛋白质经酶或酸碱分解而成，在制备过程中先制备成胰胨，后再经继续消化为蛋白胨，因此制得的胰胨和胨营养差别很大，而最优的蛋白胨应属胰蛋白胨，因为胰胨含有大量的氨基酸，最易被细菌所利用，蛋白胨易溶于水，煮沸时不凝固，受酸的作用不沉淀。

2.肉浸液及牛肉膏肉浸液 是将无脂肪牛肉绞碎后水浸出液，肉浸液中几乎不含蛋白质，只有一小部分氨基酸和其他含氮物质，如肌酸、黄嘌呤、尿酸和核苷酸等。牛肉膏系肉浸液在低温减压而成，或经蒸发掉水分而成，其营养价值次于肉浸液，但应用方便，易于保存，可代替肉浸液做各种培养基。

3.糖醇类 含有碳源，制备培养基所用的糖醇种类很多，常用的糖主要是单糖类、双糖类，多糖醇类主要是甘露醇和卫矛醇。

4.血液 可增加培养基中的蛋白质，多种氨基酸，糖及无机盐等营养物质，且能提供辅酶等生长因子，亦可测定细菌的溶血情况。

5.无机盐 可构成细菌体内酶的激活剂，并可维持一定的渗透压及核苷酸，并可起到缓冲作用，如磷酸盐。

6.生长因子 在配制培养基时常加入某些氨基酸、维生素、嘌呤碱等物质，以促进某些细菌的生长。

7.琼脂 是由海藻中提炼出来的一种产物，此物是细菌所不能利用的多糖类，不含氮，加热 100℃时可溶化，在 40℃以下时自行凝固，是一种凝固剂。

8.水分 制备培养基常用蒸馏水，也可以用无氯的自来水、井水、河水，但必须在用前煮沸过滤后可使用，也是培养基主要成分。

9.抑制剂 在配制培养基时需加入一定种类的抑制剂，来抑制非检出菌的生长，根据培养标本要求来源不同而选用不同抑制剂，常用的抑制剂有胆盐、亚硫酸钠、亚硒酸钠、某些染料及多种抗生素等物质，这些物质具有选择性的抑制作用。

10.指示剂 为了便于了解和观察细菌是否利用分解糖类等物质，常在某些培养基中加入指示剂，如酚红、溴甲酚紫、中性红、中国蓝、甲基红等酸碱指示剂，美兰是常用的氧化-还原指示剂。

(三) 培养基的选择

1.血平板 适用于大多数细菌生长，在标本初期培养时一般均接种血平板，制作血平板的血液一般用羊血、马血或兔血，用量为 5%~7%，在血平板可观察到细菌菌落形态，又可观察细菌的溶血情况。

2.巧克力平板 某些细菌生长时需红细胞中的营养物质 X 因子及 V 因子，培养基通过徐徐加热可消除对某种菌的有害作用，嗜血杆菌，奈瑟菌在此培养基上生长良好，对血培养后有细菌生长，需转种时，接种到巧克力平板，有利于分离到各类细菌。

3.营养琼脂 用以院内感染细菌总数计数用及纯化菌种，保存菌种等。

4.中国蓝平板或伊红，美兰平板 弱选择性培养基，可抑制革兰阳性细菌生长，仅革氏阴性菌可以生长，各种标本均可以接种于此培养基。革兰阴性杆菌因分解乳糖能力不同，因此在此平板上菌落亦可不同，中国蓝蔷薇酸在培养基中起到了指示剂的作用，又因为这种培养基中不含胆盐而有利于志贺菌、沙门菌生长，有利于志贺氏菌和沙门菌的分离。

5.S 琼脂平板 此培养基主要用于志贺菌和沙门菌分离用,该培养基对大肠埃希菌,革兰阳性菌有较强的抑制作用。

6.麦康凯平板 此培养基内有胆盐,除肠杆菌科及一些发酵细菌能生长繁殖,有些革兰阴性菌不能生长,因此把非发酵菌是否在麦康凯平板上生长作为一项重要的鉴定指标,如果以麦康凯作为分离选择性培养基时,应注意观察该标本血平板上的细菌分离情况,以免漏掉部分非发酵细菌。

7.碱性琼脂平板 供作分离霍乱弧菌及 ELTor 弧菌用,因其具有较高 pH,能抑制其他肠道细菌生长,而有利于霍乱弧菌及 ELTor 弧菌生长。

8.药物敏感试验 用平板因其培养基营养较丰富,对细菌产生的毒性小,易于药物扩散,适用大多数细菌生长等优点(亦可用市售 M-H),专用于药敏试验。

9.克氏铁琼脂 用于细菌是否分解葡萄糖和乳糖,以及是否分解蛋白质而产生硫化氢,有利于细菌的初步鉴定。

【细菌的一般接种法】

在接种时通常右手以执笔式持接种环(针),左手拿培养基配合操作。其接种程序依次为:火焰灭菌接种环(针),即先烧红金属丝部分,再转动杆部通过火焰 3~5 次(尤其针与杆接头处),即离开火焰,自然冷却,以不烫死细菌为度,可接触含琼脂培养基,如不溶化即已冷却,蘸取细菌或标本,接种,接种后火焰灭菌接种环(针),先将金属丝中部置火焰中,使热自然地传向环或针尖端,待残留的菌液标本干涸后,再将接种环(针)垂直置于火焰外层中烧红灭菌,以防突然高热致使残余菌液标本爆裂四溅,污染环境,最后转动杆部通过火焰 3 次。常用接种方法有如下 5 种:

(一) 平板画线接种法

对混有多种细菌的临床标本,采用画线分离和培养,使原来混杂在一起的细菌沿画线在琼脂平板表面分离,得到分散的单个菌落,以获得纯种。临床送检的标本如痰液、咽拭子、泌尿生殖道的分泌物和粪便等细菌检验均需要借助琼脂平板画线分离目的菌。平板画线分离法通常有两种方法:

1.分区画线分离法 此法常用于含菌量较多的标本如痰、泌尿生殖道的分泌物和粪便或混合细菌的分离。先用接种环挑取标本涂布于琼脂平板 1 区(占培养基总面积的 1/4)并做数条画线,再于 2、3、4 区依次画线。每划完一个区域,均将接种环烧灼灭菌 1 次,冷却后再划下一区域,每一区域的划线均与上一区域的画线交接 1~3 次。一个成功分区画线的平板,培养后分别观察 1 区形成菌苔,2 区菌落连成线,3 区和 4 区可分离到单个菌落。

2.连续划线分离法 此法常用于含菌量不多的标本或培养物中的细菌分离培养。方法是先将接种物在琼脂平板上 1/5 处轻轻涂抹,然后再用接种环或拭子在平板表面曲线连续画线接种,直至划满琼脂平板表面。

(二) 琼脂斜面接种法

主要用于菌落的移种,以获得纯种进行鉴定和保存菌种等。用接种环(针)挑取单个菌落或培养物,从培养基斜面底部向上画一条直线,然后再从底部沿直线向上曲折连续划线,直至斜面近顶端处止。生化鉴定培养基斜面接种,用接种针挑取待鉴定细菌的菌落,从斜面中央垂直刺入底部,抽出后在斜面上由下至上曲折画线接种。

（三）穿刺接种法

此法多用于半固体培养基或双糖铁、明胶等具有高层的培养基接种，半固体培养基的穿刺接种可用于观察细菌的动力。接种时用接种针挑取菌落，由培养基中央垂直刺入至距管底 0.4cm 处，再沿穿刺线退出接种针。双糖铁等有高层及斜面之分的培养基，穿刺高层部分，退出接种针后直接划线接种斜面部分。

（四）液体培养基接种法

用于各种液体培养基如肉汤、蛋白胨水、糖发酵管等的接种。用接种环挑取单个菌落，倾斜液体培养管，在液面与管壁交界处研磨接种物（以试管直立后液体淹没接种物为准）。此接种法应避免接种环与液体过多接触，更不应在液体中混匀、搅拌，以免形成气溶胶，造成实验室污染。

（五）倾注平板法

此法主要用于饮水、饮料、牛乳和尿液等标本中的细菌计数。取纯培养物的稀释或原标本 1ml 至无菌培养皿内，再将已融化并冷却至 45~50℃ 的琼脂培养基 15~20ml 倾注入该无菌培养皿内，混匀，待凝固后置 35℃ 培养，长出菌落后进行菌落计数，以求出每毫米标本中所含菌数。先数 6 个方格（每格为 1cm²）中菌落数，求出每格的平均菌落数，并算出平皿直径，然后按下列公式计数，求出每毫米标本中的细菌数。

$$\text{全平板菌落数} = \text{每方格的平均菌落数} \times \pi r^2$$

$$\text{每毫米标本中的细菌数} = \text{全平板菌落数} \times \text{稀释倍数}$$

（六）涂布接种法

此法多用于纸片扩散法药敏试验的细菌接种。将一定量或适量的菌液加到琼脂培养基表面，然后用灭菌的 L 型玻璃棒或棉拭子于不同的角度反复涂布，使被接种液均匀分布于琼脂表面，然后贴上药敏纸片，或直接培养，此法经培养后细菌形成菌苔。

【细菌的培养方法】

根据不同的标本及不同的培养目的，可选用不同的培养方法。通常把细菌的培养方法分为需氧培养、二氧化碳培养、微需氧培养和厌氧培养 4 种。

（一）需氧培养

指需氧菌或兼性厌氧菌在有氧条件下的培养，将已接种好的平板、斜面、液体培养基等在空气中置 35℃ 孵育箱内孵育 18~24h，无特殊要求的细菌均可生长。少数生长缓慢的细菌需要培养 3~7d 甚至 1 个月才能生长。为使孵育箱内保持一定的湿度，可在箱内放置 1 杯水。对培养时间较长的培养基，接种后应用棉塞或硅胶塞塞好试管口后用石蜡一凡士林封固，以防培养基干裂。

（二）二氧化碳培养

某些细菌，如肺炎链球菌、淋病奈瑟菌、脑膜炎奈瑟菌、布氏菌和流感嗜血杆菌等的培养，特别是在初次分离时，须在 5%~10% 二氧化碳环境中培养才能生长。常用的培养法如下：

1. 二氧化碳培养箱法 二氧化碳孵箱能自动调节二氧化碳的含量、温度和湿度，培养物置于孵育箱内，孵育一定时间后可直接观察生长结果。

2. 烛缸培养法 取有盖磨口标本缸或玻璃干燥器，将接种好的培养基放入缸内，点燃蜡烛后放在缸内稍高于培养物的位置上，缸盖或缸口均涂以凡士林，加盖密闭。因缸

内蜡烛燃烧氧逐渐减少,数分钟后蜡烛自行熄灭,此时容器内二氧化碳含量占5%~10%。将缸置于35℃普通孵育箱内孵育。

3.气袋法 选用无毒透明的塑料袋,将已接种标本的培养皿放入袋内,尽量去除袋内空气后将开口处折叠并用弹簧夹夹紧袋口。使袋呈密闭状态,折断袋内已置的二氧化碳产气管(安瓿)产生二氧化碳,数分钟内就可达到需要的二氧化碳培养环境,置于35℃孵育箱内孵育。

4.化学法 常用碳酸氢钠-盐酸法。按每升容积称取碳酸氢钠0.4g与浓盐酸0.35ml比例,分别置容器内,连同容器置于玻璃缸内,盖紧密封,倾斜缸位使盐酸与碳酸氢钠接触而生成二氧化碳,于35℃孵育箱内孵育。

(三) 微需氧培养

微需氧菌培养在大气中及绝对无氧环境中均不能生长,在含有5%~6%氧气,5%~10%二氧化碳和85%氮气的气体环境中才可生长,将标本接种到培养基上,置于上述气体环境中,35℃进行培养即微需氧培养法。

(四) 厌氧培养

厌氧菌对氧敏感,培养过程中需造成低氧化还原电势的厌氧环境。

1.厌氧培养基法

(1) 庖肉培养法:庖肉培养法是利用肉渣等动物组织耗氧的方法。因肉渣等组织中含有谷胱甘肽,可发生氧化-还原反应,从而降低环境中的氧化势能,此外肉渣中还含有不饱和脂肪酸,经肌肉中的正铁血红蛋白触酶作用后,能吸收环境中的氧气。加之培养基的液面用凡士林封闭使之与空气隔绝而造成缺氧环境,有利于厌氧菌生长。

接种时,首先将庖肉培养基表面凡士林加热稍融化,斜持试管片刻,使凡士林黏附于管壁一侧,然后立即进行接种,使之与肉渣充分混合,再将凡士林块稍加融化,直立放置,使其自凝以覆盖在培养基液面上,置(35±1)℃培养2~4d后观察结果或移种。如果分离厌氧芽孢杆菌,可先将已接种的庖肉培养基置于80~85℃水浴内10min,然后再放入孵箱内培养。

(2) 硫乙醇酸钠法:硫乙醇酸钠是还原剂,加入培养基中可除去其中氧气或使氧化型物质还原,有利于厌氧菌生长。其方法是先将标本接种于含有1g/L的硫乙醇酸钠肉汤培养基中,然后于(35±1)℃直立放置24~48h后观察结果,如有专性厌氧菌生长,则于培养基底部呈现浑浊或有灰白色颗粒沉淀,而上层清晰;如有专性需氧菌生长,则底部澄清上层浑浊;如有兼性厌氧菌生长,则全管呈现浑浊生长现象。

2.焦性没食子酸法 焦性没食子酸在碱性溶液中能形成焦性没食子橙,可吸收空气中的氧气,从而造成缺氧环境,以利于厌氧菌生长。

3.厌氧罐、箱、袋法

(1) 厌氧罐法:目前应用很广泛的一种方法,具体又分为:

1) 抽气-换气法:本法特点是比较经济并能迅速建立厌氧环境,适用于一般实验室采用。标本接种后,首先将平板放入厌氧罐拧紧盖子,然后用真空泵抽去罐中空气,使压力真空表至-79.98kPa,停止抽气,充入高纯氮气使压力真空表指针回0位。如此反复3次,最后在罐内-79.98kPa的情况下,充入70%N₂、20%H₂、10%CO₂(有人改用20%CO₂及80%H₂亦获得好结果)。罐中放有冷催化剂钯粒,可催化罐中残余的O₂和H₂