



临床常见细菌感染的 实验室诊断与治疗

达选秀◎著

临床常见细菌感染的实验室诊断与治疗

达选秀◎著

图书在版编目（CIP）数据

临床常见细菌感染的实验室诊断与治疗/ 达选秀著
— 长春 : 吉林科学技术出版社, 2016. 7
ISBN 978-7-5578-1019-1

I. ①临… II. ①达… III. ①细菌—感染—实验室诊断
IV. ①R510. 4

中国版本图书馆CIP数据核字(2016) 第168332号

临床常见细菌感染的实验室诊断与治疗

Linchuang changjian xijun ganran de shiyanshi zhenduan yu zhiliao

著 达选秀
出 版 人 李 梁
责任编辑 孟 波
封面设计 长春创意广告图文制作有限责任公司
制 版 长春创意广告图文制作有限责任公司
开 本 787mm×1092mm 1/16
字 数 462千字
印 张 19
版 次 2016年7月第1版
印 次 2017年6月第1版第2次印刷

出 版 吉林科学技术出版社
发 行 吉林科学技术出版社
地 址 长春市人民大街4646号
邮 编 130021
发行部电话/传真 0431-85635177 85651759 85651628
85652585 85635176
储运部电话 0431-86059116
编辑部电话 0431-86037565
网 址 www.jlstp.net
印 刷 虎彩印艺股份有限公司

书 号 ISBN 978-7-5578-1019-1
定 价 76. 00元

如有印装质量问题 可寄出版社调换
因本书作者较多, 联系未果, 如作者看到此声明, 请尽快来电或来函与编辑部联系, 以便商洽相应稿酬支付事宜。
版权所有 翻印必究 举报电话: 0431-86037565



达选秀,女,1975 年 10 月出生。主管检验医师,本科学历。毕业于宁夏医科大学医学检验专业。现为中国微生物学会临床微生物学专业委员会委员,中国执业药师协会会员。曾参与省级科研课题一项,并以第一作者发表论文数篇。

前 言

随着临床医学与基础医学的不断发展,医学检验与临床的联系日益密切,微生物学的任何新理论、新技术及重大科研成果,凡是能直接用来诊断疾病的,或早或迟都会发展成为一项检验方法,进入临床实验室,参与临床疾病的诊疗等。这一变化对检验医学工作者提出了更高的要求,它要求检验医学工作者不断地扩大自己的知识面,时时关注和学习新知识,更新旧观念以及改进技术,把有限的实验数据变为高效的诊断信息,更多地、更直观地参与临床疾病的诊断和治疗,以适应医学科学的要求,赶上现代医学发展的步伐。鉴于此,我们组织相关专业专家编写了这部《临床常见细菌感染的实验室诊断与治疗》。

根据编者的构思,本书共分四篇。第一篇细菌感染相关基础知识,内容涉及临床细菌学检验的基本技术、细菌的接种与培养技术、常见临床标本的细菌学检验、微生物检验的质量控制等内容。第二篇是临床常用抗菌药物,第三篇为常见细菌感染的实验室诊断,内容包括病原性球菌、肠杆菌科、非发酵菌的常规鉴定。第四篇内容为各系统常见感染的临床诊断与治疗,内容囊括了下呼吸道感染、心血管及全身性感染、腹腔及消化系统感染、泌尿生殖系统感染、神经系统感染及运动系统感染。

该书内容全面、层次清晰,具有很好的临床实用价值,是工作在临床第一线,特别是从事临床医学检验的广大医师必不可少的参考书。由于编者水平有限,加上检验医学范围广泛,内容日新月异,且编写时间紧迫,书中不足与错误之处在所难免,希望广大读者批评指正。

《临床常见细菌感染的实验室诊断与治疗》编委会

2016 年

目 录

第一篇 细菌感染相关基础知识	(1)
第一章 临床细菌学检验的基本技术	(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 培养基	(7)
第二章 细菌的接种与培养技术	(16)
第一节 细菌的一般接种法	(16)
第二节 细菌的培养法	(17)
第三节 基本生化鉴定试验和诊断血清	(20)
第四节 细菌对药物的敏感试验	(24)
第三章 常见临床标本的细菌学检验	(30)
第一节 从临床标本分离、鉴定细菌的基本要领	(30)
第二节 血液及骨髓标本的细菌学检验	(30)
第三节 化脓及创伤感染标本的细菌学检验	(32)
第四节 尿标本的留取、处理及细菌学检验	(36)
第五节 粪便标本的细菌学检验	(39)
第四章 细菌学检验的质量控制	(42)
第一节 临床细菌学室内质量控制	(42)
第二节 临床细菌室间质量评价	(44)
第二篇 临床常用抗菌药物	(46)
第五章 临床常用抗菌药物	(46)
第三篇 常见细菌感染的实验室诊断	(104)
第六章 病原性球菌	(104)
第一节 葡萄球菌属	(104)
第二节 链球菌属	(110)
第三节 肠球菌属	(114)
第四节 奈瑟氏菌属	(114)
第七章 肠杆菌科	(118)
第八章 非发酵菌的常规鉴定	(124)
第一节 假单胞菌属	(124)
第二节 不动杆菌属	(127)
第三节 产碱杆菌属	(128)
第四篇 各系统常见感染的临床诊断与治疗	(129)
第九章 下呼吸道感染	(129)

第一节 急性气管支气管炎 (129)

第二节 慢性支气管炎 (131)

第三节 细菌性肺炎 (137)

第四节 病毒性肺炎 (150)

第五节 肺脓肿 (155)

第十章 心血管及全身性感染 (162)

第一节 感染性心内膜炎 (162)

第二节 血管内装置感染 (176)

第三节 败血症 (178)

第四节 感染性休克 (188)

第十一章 腹腔及消化系统感染 (194)

第一节 腹膜炎 (194)

第二节 急性阑尾炎 (202)

第三节 肝脓肿 (208)

第四节 细菌性痢疾 (218)

第五节 细菌性食物中毒 (225)

第十二章 泌尿生殖系统感染 (234)

第一节 急性肾盂肾炎 (234)

第二节 慢性肾盂肾炎 (248)

第三节 膀胱炎 (254)

第四节 阴道炎 (256)

第五节 盆腔炎 (260)

第十三章 神经系统感染 (265)

第一节 脑脓肿 (265)

第二节 细菌性脑膜炎 (270)

第三节 真菌性脑膜炎 (272)

第四节 病毒性脑膜炎 (279)

第五节 结核性脑膜炎 (281)

第十四章 运动系统感染 (284)

第一节 急性化脓性骨髓炎 (284)

第二节 慢性化脓性骨髓炎 (287)

第三节 急性血源性骨髓炎 (289)

第四节 化脓性关节炎 (292)

参考文献 (295)

第一篇 细菌感染相关基础知识

第一章 临床细菌学检验的基本技术

随着临床医学的发展,给临床细菌检验工作提出了新的课题和要求,而临床细菌学的检验技术也不断地改进和创新。因此,临床微生物检验基本技术的全过程主要包括:细菌形态学检验技术;分类分离培养技术;培养基制备技术;细菌形态学的电子显微镜技术;细菌的生化试验技术等,以及近几年刚刚发展起来基因探针技术,而以上各技术均在细菌学诊断上有重要的意义。

第一节 细菌的形态与结构

单个细菌细胞很小,常以微米(μm)为测量单位,由于细菌体积微小,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。

一、形态

(一)球菌

单个球菌直径约为 $0.8\sim 1.2\mu\text{m}$,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。大的杆菌长度约 $10\mu\text{m}$ 以上,中等大小的杆菌长约 $3\mu\text{m}$,小杆菌长约 $0.5\sim 1.0\mu\text{m}$,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,也有少数呈方形或棱形,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。

二、结构

细菌细胞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,因此基本构造是所有细菌应具有的共同特征。

(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,细胞壁内有多种化学物质有规律的聚合而成,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。因此对进出物质有严格的选择作用。细菌的细胞壁分为三层,壁厚约 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,主要化学组成有粘肽、脂多糖。

(二)细菌的内部结构

细菌的内部结构主要由细胞膜、细胞质、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,膜约占全细胞重量的 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,附着和分离 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。

鞭毛长约 3 到 20nm,直径约 0.1 到 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,革兰氏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,由于细胞质脱水浓缩,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:二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和动力,为下一步的鉴定工作打下了基础。

一、不染色标本检查法

不染色标本细菌的检查,主要观察细菌的大小,形态和细菌的动力,以区分细菌真正运动与布朗运动,主要方法有悬滴法和压滴法。

(一)悬滴法

用以观察细菌的形态及动力,其方法是:

1. 取凹玻片,于凹窝周围涂凡士林油或黏度较强糨糊少许。
2. 在盖玻片中央放一接种环细菌的肉汤培养物。
3. 将凹玻片反转,使凹窝对准盖玻片中央并盖于其上,然后翻转玻片,用小镊子或接种环柄轻加压力,使盖玻片与凹窝边粘紧。
4. 将制好的悬滴标本放在显微镜载物台中央,先以低倍镜找到悬滴边缘,将集光器下降,缩小光圈,再换高倍观察。
5. 结果有鞭毛的细菌呈真正的运动,无鞭毛的细菌呈布朗运动。

(二)压滴法

1. 用接种环取菌悬液 2~3 环,置于载玻片中央。
2. 用镊子夹好盖玻片,覆盖菌液上,在放置时,先将盖玻片一边接触菌液,缓缓放下,以不产生气泡为佳。
3. 先以低倍镜找好位置,再以高倍镜观察。
4. 结果观察与悬滴法相同。

二、染色标本检查法

由于细菌个体微小,其胞浆无色透明,故将其用适当的染料染色后观察,较不染色标本更清楚地显示其大小,形态与构造;还可以借助于各种细菌染色反应的不同而鉴别细菌,和细菌初步分群,染色时又可分单染法和复染法。

(一)革兰氏染色法

1. 染色液

(1)第一液结晶紫染色液:称取 2 克结晶紫放于研钵中,加 4ml 95%乙醇,研磨后加 400ml 蒸馏水即成。

(2)第二液卢戈氏碘液:由以下各试剂配成:称取碘 5g,碘化钾 10g,蒸馏水 400ml,5%碳酸氢钠水溶液 100ml,将以上试剂混合溶解贮于棕色瓶中备用。

(3)第三液 95%酒精。

(4)第四液碱性复红饱和液:称取碱性复红 8.2%溶于 95%酒精 100ml 中。取碱性复红饱和液 10ml 加蒸馏水 90ml 或加 5%苯酚溶液 90ml 即成应用液。

2. 染色法

(1)取去脂载玻片一张,在中央部位滴一小滴生理盐水(无菌),用取菌环刮取纯培养菌落或菌苔少许,于生理盐水中涂抹均匀,空气中自然干燥,火焰固定,一般将标本面通过火焰 3 次为佳,待片子凉后。

(2)滴加第一染液 1min,水洗。

(3)滴加第二液作用 1min,水洗。

(4)用第三液即 95%酒精脱色至无紫色流出时,水洗。

(5)滴加第四液碱性复红液染 30s,水洗干燥后镜检。

3. 结果

革兰氏阳性菌呈深紫色,革兰阴性菌呈红色或淡红色。

(二)抗酸染色法

1. 染色液

(1)第一液:苯酚复红液:用碱性苯酚复红液(饱和)10ml 加 5%碳酸水溶液 90ml 配制而成。

(2)第二液:3%盐酸酒精溶液(脱色剂):取浓盐酸 3ml 加到 95%酒精 97ml 内混合配制而成。

(3)第三液:碱性亚甲蓝液(复染液),用 0.01%氢氧化钾溶液 100ml 加亚甲蓝酒精饱和液(95%酒精 100ml 加亚甲蓝 2 克)30ml 混合配制而成。

2. 染色法

(1)涂抹标本,空气中干燥或用特制的低温干燥器进行干燥,火焰固定。

(2)于标本上滴加苯酚复红染液,覆盖整个标本区,放在可调温控温的电热板上或在酒精灯上加热,在加热中不可使之沸腾,并可随时补充染液,染 6min,倾去残液水洗。

(3)用 3%酒精脱色至不再有红色液体为止,标本区域内呈浅红色,用流水冲洗。

(4)用碱性亚甲蓝液复染 3min,水洗,干燥镜检。

3. 结果

抗酸性细菌呈红色,如结核杆菌等。其他细菌及细胞染成蓝色。

(三)鞭毛染色法

1. 染色液

(1)第一液:钾明矾饱和水溶液 20ml,20%鞣酸水溶液 10ml,蒸馏水 10ml,95%酒精 15ml,碱性复红酒精饱和溶液(0.9 克碱性复红加 10ml 酒精研磨)3ml,将上述试剂及染液混合,边加边摇动混匀。

(2)第二液:亚甲蓝 0.1 克,硼砂 1 克,蒸馏水 100ml,将亚甲蓝、硼砂溶解于蒸馏水中备用。

2. 染色法

取经过去油脂的新载物玻璃片,临用前在火焰上过 3 次。供染色用的菌种先接种肉汤,放 37℃培养 12h,取肉汤培养物 2ml,加等量蒸馏水混匀,以 2000r/min 离心沉淀 5min,弃上清液,沉淀物再加蒸馏水 4ml,同样离心沉淀,反复三次,最后一次的沉淀物再加蒸馏水 0.5ml,取一滴滴到预置的玻片中央自然干燥,待染。另一种方法是:在预处理好的玻片上滴一滴蒸馏水,用取菌环从半固体上取幼龄菌落,将带有幼龄菌的取菌环往蒸馏水中轻轻一蘸即离去。不得用取菌环研磨,以免鞭毛被研磨掉,自然干燥后待检。干燥后用第一染液染 10min,水洗,二染液染 3min 水洗,干燥,用油镜检查。

3. 结果

菌体呈蓝紫色,鞭毛呈紫红色。

(四)荚膜染色法

1. 染液

3%沙黄水溶液(乳钵研磨溶解)。

2. 方法

将已固定的细菌涂片滴加染液,用火焰加温至 $60^{\circ}\text{C} \sim 80^{\circ}\text{C}$ 维持 3min,冷后水洗干燥后镜检。

3. 结果

菌体呈褐色,荚膜呈黄色。

(五)芽孢染色法

1. 染色液

(1)第一液苯酚复红液(配制见抗酸染色)。

(2)第二液 5%亚硫酸钠溶液。

(3)第三液 1%亚甲蓝溶液。

2. 染色法

(1)将已固定的细菌涂片加一液,染 3~5min,水洗。

(2)用 5%亚硫酸钠溶液处理 30s,水洗。

(3)用 1%亚甲蓝溶液复染 1min,水洗待干镜检。

3. 结果

芽孢染成鲜红色,菌体呈蓝色。

(六)异染颗粒染色法

1. 染色液

(1)第一液:甲苯胺蓝 0.15 克,孔雀绿 0.2 克,冰醋酸 1ml,95%酒精 2ml,100ml,将甲苯胺蓝和孔雀绿放在研钵内加酒精研磨使其溶解,再边研边加含醋酸的水,充分溶解后,贮于瓶中,放室温过夜,用滤纸过滤备用。

(2)第二液:碘 2 克,碘化钾 3 克,蒸馏水 300ml,混合溶解后备用。

2. 染色法

涂抹标本于载物片上,空气中自然干燥火焰固定。加第一液染 3~5min,如室温较低时还可延长一定时间,水洗。加第二液染 1~2min,水洗干燥镜检。

3. 结果

菌体呈淡绿色,异染颗粒呈黑色。

(七)亚甲蓝染色法

1. 染色液

称取亚甲蓝 2 克,溶于 95%酒精 100ml 中,使成饱和液,取饱和液 30ml,再加入蒸馏水 100ml 及 10%氢氧化钾水溶液 0.1ml 即成。

2. 染色法

将涂片固定后滴加亚甲蓝液于玻片上,染 1~2min,水洗,干燥,待检。

3. 结果

此法为单染色法,菌体染成深蓝色,细胞染成蓝色,常用于脑膜炎奈瑟氏菌、淋病奈瑟氏菌、白喉棒状杆菌。

(八)金胺染色法

1. 染色液

5%石炭酸金胺液,比例 1:1000 碱性亚甲蓝液,4%盐酸酒精液。

2. 染色法

按常规涂片,干燥后火焰固定。

(1)滴加金胺液,加温使之出现蒸气,染色 5min 后水洗。

(2)盐酸酒精液脱色 30s,水洗。

(3)以 1 : 1000 过锰酸钾液处理 5s 水洗。

(4)用亚甲蓝液染 30s 水洗干后镜检。

3. 结果

结核杆菌菌体发出黄绿色荧光,此法可用于麻风杆菌,淋球菌和某些螺旋体等。

(九)墨汁染色法

1. 染色液

墨汁,宜选印度墨汁或国产优质墨汁。

2. 染色法

取含有螺旋体的标本或含有带荚膜真菌标本,如浸出液等 1 滴与墨汁 1 滴混合制成推片和血片,待干镜检。

3. 结果

螺旋体无色发亮、背景为黑色,如带有荚膜的真菌或细菌可出现菌体无色,周围绕以无色发亮、有折光的宽广荚膜带,背景为黑色。

第三节 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、培养基制备的基本知识

(一)培养基的主要成分及作用

1. 营养物质

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、水及无机盐类等。

(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胨,后再经继续消化为蛋白胨,因此制得的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:肉浸液是和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: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°C 时可溶化,在 40°C 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,但必须在使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、煌绿、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,亚甲蓝是常用的氧化还原指示剂。

(二)培养基的分类

按其物理性状可分为固体、液体、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。

(三)培养基的制备程序

1. 各种器具的灭菌前准备

制备培养基所用的各种器具,如试管、培养皿、烧瓶、烧杯、吸管等均洗涮干净后正确包扎灭菌,其方法如下:

(1)试管:试管口必须塞上棉塞,棉塞上包上纱布,或选用经特殊处理后发泡硅橡胶塞。棉塞要求塞入试管后与管口无间隙,拔出后能保持原形,便于重塞,在选用发泡硅橡胶塞时,按试管口径规格购买即可,将塞好塞的试管放入烤箱 160°C 2 小时灭菌或 121°C 20min 高压蒸气灭菌后烤干备用。

(2)培养皿:用旧报纸或小板纸包裹或装在特制的不锈钢筒和铜制的筒中,灭菌法同上。

(3)烧瓶:用棉花塞住瓶口(外包纱布),灭菌法同上。

(4)吸管及毛细吸管:用棉花塞于吸管吸口端,以防将传染物吸入橡皮乳头,然后用纸包裹或装入试管筒中,灭菌法同上。

(5)棉拭子:用少许脱脂棉卷于竹签的一端,管口用棉花塞紧,灭菌法同上。

(6)其他:注射器可装入铝盒或用布包裹,灭菌方法同上。

2. 培养基的配制和溶解

先按培养基配方准确称取各种成分,放入灭菌烧瓶中加水放置 10min 左右,加热溶解,在加热时经常搅拌,以防止烧焦,粘在瓶底,待各成分溶解后补足水分。

3. 校正 pH 值

培养基必须有适宜的酸碱度,细菌才能在培养基中生长,因此培养基 pH 值的测定是培养基制备的重要环节,测定 pH 值的方法有两种:

(1)酸度计法:将玻璃电极夹在夹子上,使玻璃电极略高于甘汞电极以免碰坏。接上电源、进行预热约 30min 左右。调节温度补偿器,使之与测定液一致,将分档开关放到 6,将分档开关放在校正位置,调节校正调节器使指针指在满度,再调分档开关在 6 位置。

定位,在烧杯中加入缓冲液,按该溶液温度表查出该温度之 pH 值,按下读数开关,调节定位调节器,使之指示在该 PH 值。

培养基 pH 值测定,仪器经定位后,用蒸馏水洗涤电极,用滤纸吸干,换上待测培养基,使温度与定位温度相同,轻轻摇动,使电极与溶液均匀接触,按下读数按钮,指针所指的读数即是待测溶液的 pH 值,如培养基的 pH 值较成分中的偏酸或偏碱,则用氢氧化钠或盐酸校正于所需 pH 值,重复几次,直至数值不变为准。最后将电极清洗干净,用蒸馏水浸泡待用,将指针调至零,关闭电源开关。

(2)比色法:比色法是利用指示剂在不同 pH 溶液中的颜色变化,与标准比色管相比得出 pH 值。

pH 值的测定:吸取待测培养基 5ml,分别注入两支试管中,其中一管加 0.02% 酚红 0.25ml,置于比色架上,一管衬标准管用,加酚红管衬蒸馏水管,比较两边的颜色。如欲将培养基校正到所需的 pH 值,吸取 0.1mol/L 的 NaOH 逐滴加入测定管中,混合均匀,直至与标准管颜色相同,记录用去的量,每 1000ml 培养基内应加 0.1mol/L 氢氧化钠量可按下列公式计算:

$$\frac{0.1\text{MNaOHml 数} \times 1000}{5 \times 10} = 0.1 \times \text{MNaOHml/L}$$

4. 分装

分装时尽量无菌操作,分装过程中防止产生气泡,分装的量按要求,一般液体培养基约装 5ml,高层固体培养基或半固体培养基每管约装 7~8ml,小试管 2ml,以上装好后按所需的压力温度时间进行灭菌,灭菌后趁热将需做成斜面的管斜放在桌上,使其成适宜的斜面,高层及液体培养基可垂直存放。平板培养基的分装必须在严格的无菌操作中进行,方法是先将存在瓶内已灭菌的固体培养基溶化,待冷至 50℃ 左右时,去掉棉塞,用酒精灯火焰烧容器口,然后把平皿打开一小口,将适量培养基倒入平皿内覆盖皿底,厚度约 4mm,凝固后即可使用。

二、临床细菌检验常用培养基的制备

(一)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。

1. 成分

鲜牛肉浸出液 1000ml

蛋白胨 10g

氯化钠 5g

琼脂 20g

无菌脱纤羊血 50~60ml

pH7.2~7.4

2. 制法

将成分前四种混合,校 pH,置三角烧瓶内,高压灭菌 121℃15min,取出冷至 50℃,加入无菌预置的血液,充分混匀倾注平板,在混匀过程中不得出现气泡及泡沫,琼脂平板厚约 4mm。

(二)巧克力平板

某些细菌生长时需红细胞中的营养物质 X 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,奈瑟氏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。

1. 成分

鲜牛肉浸出液 1000ml

蛋白胨 10g

氯化钠 5g

琼脂 20g

无菌脱纤维兔血或羊血 50ml

pH7.2~7.6

2. 制法

除兔血或羊血外,将其他成分混匀,溶解,校正 pH,高压灭菌后,冷至约 85℃,无菌操作加入血液,摇匀后置 85%水浴 10min,使之呈巧克力色,取出置室温冷至 50℃,倾注平板即可。

(三)营养琼脂

用食品卫生,院内感染细菌总数计数用及纯化菌种,保存菌种等。

1. 成分

蛋白胨 10g

牛肉膏 5g

氯化钠 5g

琼脂 20g

蒸馏水 1000ml

pH7.2~7.4

2. 制法

将上述成分混合,校正 pH,高压蒸气灭菌分装成试管或留做菌落计数倾注培养用。

(四)中国蓝平板或伊红亚甲蓝平板

弱选择性培养基,可抑制革兰氏阳性细菌生长,仅革兰阴性菌可以生长,各种标本均可以接种于此培养基。革兰氏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