



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

全国高等学校医学规划教材（供医学检验等专业用）



临床检验病原生物学 实验指导

主编 刘运德



高等教育出版社
Higher Education Press

普通高等教育“十一五”国家级规划教材
全国高等学校医学规划教材

(供医学检验等专业用)

临床检验病原生物学 实验指导

主 编 刘运德



高等教育出版社
Higher Education Press

内容简介

本教材为《临床检验病原生物学》的配套教材。书中汇集了全国数个高等医药院校检验专业病原生物学教学改革成果。全书分四篇十一章,分别介绍细菌学检验基本技术、真菌学检验基本技术、病毒学检验技术、常见致病性细菌的检验、常见致病性真菌的检验、常见病毒检验技术、临床标本的细菌学检验、常见致病性原虫的检验、常见致病性蠕虫的检验及常见致病性节肢动物的检验等内容。第四篇增加了4个综合设计性实验。教材的最后部分附有培养细菌的常用培养基,供教师、学生实验课参考使用。本教材可供检验专业本科、专科学生及临床检验医师学习、参考。

图书在版编目(CIP)数据

临床检验病原生物学实验指导/刘运德主编. —北京:
高等教育出版社,2006.12
ISBN 7-04-020244-1

I. 临... II. 刘... III. 病原微生物-医学检验-
实验-医学院校-教材 IV. R37-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2006)第131176号

策划编辑 刘晋秦 冯娟 责任编辑 孙葵葵 封面设计 张楠 责任绘图 朱静
版式设计 张岚 责任校对 王超 责任印制 朱学忠

出版发行	高等教育出版社	购书热线	010-58581118
社 址	北京市西城区德外大街4号	免费咨询	800-810-0598
邮政编码	100011	网 址	http://www.hep.edu.cn
总 机	010-58581000		http://www.hep.com.cn
经 销	蓝色畅想图书发行有限公司	网上订购	http://www.landaco.com
印 刷	北京鑫海金澳胶印有限公司		http://www.landaco.com.cn
		畅想教育	http://www.widedu.com
开 本	850×1168 1/16		
印 张	15	版 次	2006年12月第1版
字 数	460 000	印 次	2006年12月第1次印刷
插 页	4	定 价	29.80元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 20244-00

《临床检验病原生物学实验指导》编写委员会

(以姓氏拼音为序)

陈盛霞	江苏大学
陈文昭	四川大学华西临床医学院
杜季梅	温州医学院
刘晓春	天津医科大学
刘运德	天津医科大学
卢致民	河北北方学院
罗进勇	重庆医科大学
梅亚宁	南京医科大学
彭礼飞	广东医学院
王艾琳	北华大学医学院
詹志农	海南医学院

全国高等学校医学规划教材(供医学检验等专业用)

编写指导小组名单

组长 涂植光

重庆医科大学

成员 (排名不分先后)

樊琦诗

上海交通大学医学院

刘新光

广东医学院

刘 辉

大连医科大学

邹 雄

山东大学医学院

徐克前

中南大学湘雅医学院

刘运德

天津医科大学

李 萍

四川大学华西临床医学院

毕胜利

北华大学医学院

许文荣

江苏大学医学技术学院

周 新

武汉大学医学院

张进顺

河北北方学院

刘成玉

青岛大学医学院

张学宁

昆明医学院

童明庆

南京医科大学

杨国珍

贵阳医学院

章 尧

蚌埠医学院

尹一兵

重庆医科大学

钱士匀

海南医学院

蒲晓允

第三军医大学

吕建新

温州医学院

胡建达

福建医科大学

陈芳梅

广西卫生干部管理学院

张纯洁

四川省卫生干部管理学院

宁 勇

湖北中医学院

秘书 尹一兵

编者的话

医学检验(laboratory medicine)又称检验医学,是细胞病理学、化学病理学、分子病理学与临床医学有机结合,以生物分析化学、分子生物学、免疫学、病原生物学、细胞学技术、生物信息学等为技术支撑的交叉学科。其任务是为疾病诊断、病情判断和治疗决策提供信息,为临床和科研提供实验室方法和数据。我国高等医学检验教育始于1983年,到2006年为止,已有70余所高等院校相继建立了医学检验本科专业。23年的探索发展历程中,其培养目标和要求已趋统一。教育部本科专业目录中对该专业的培养目标是:“具有基础医学、临床医学、医学检验等方面的基本理论知识和基本能力,能在各级医院、血站及防疫部门从事医学检验及医学类实验室工作的医学高级专门人才。”业务培养要求为:“本专业学生主要学习基础医学、临床医学、医学检验等方面的基本理论知识,受到医学检验操作技能系统训练,具有临床医学检验及卫生检验的基本能力。”

作为特殊的知识载体和教学基本要素的教材,必须体现服务于培养目标,遵循其培养人才的业务要求的基本属性。由国内18所有影响的院(校)医学检验系(学院)参与,进行的国家“十五”重点立项课题——“21世纪中国高等学校人才培养体系的创新与实践”子课题“21世纪中国高等学校医学检验专业课程体系与教学内容的创新与实践”中,将教材建设作为主要内容之一。在此教学改革研究的基础上,经过全国高等医学检验教育界同仁的努力,在高等教育出版社的大力支持下,编写出版了此套体现上述教学改革研究成果的高等医学检验专业教材。该套教材有以下特点:

1. 适应现代教育思想和观念,突出调动学生主动学习积极性,培育学生应用所学知识解决问题能力和创新精神。充分体现教学改革研究课题形成的办学模式、课程体系、教学内容和手段的改革成果。

2. 应用现代化教学手段,坚持教材的一体化建设,使教材成为教学全过程的资源库。该套教材除文字教材外,每本均附包括教学大纲、多媒体教案、模拟试题、案例分析、扩展知识和参考材料、典型实验规范化实验操作的视频材料等的教学光盘。既有利于教师组织教学,亦可为学生主动学习,进一步发展提供帮助,是一套真正的立体化教材。

3. 基于医学检验是以生物分析化学、分子生物学、免疫学、病原生物学、遗传学、细胞学技术、生物信息等技术为支撑,而上述技术在各亚专业中均交叉应用。因此,本套教材单独编写了《基本检验技术及仪器学》一书,将医学检验涉及的通用性基本技术集中介绍。这既符合教育部对实验教学改革的要求,有利于学生在掌握基本技术后举一反三,也避免了各亚专业肤浅地重复介绍,更有利于学生能力和技能的培养。

4. 在借鉴国内外同类教材基础上,除坚持基本理论、基本知识、基本技能,思想性、科学性、先进性、启发性、适用性原则外,本套教材注重突出医学检验专业教材的特点。与现有同类教材相比,内容上除根据学科发展,进行了必要的增、减调整外,尤其注意避免片面追求理论系统性而大量、系统重复已学知识的弊病,根据专业特点,重点介绍检验项目的依据、怎样做和做好、项目的临床意义等。力求重点突出、深入浅出、图文并茂。每章前以Key Points概括了该章的知识要点,章末客观介绍了存在问题与发展趋势,并附有主要参考资料及网站,有利于学生主动学习,培养创新能力。这是本套教材的又一鲜明特点。

本文完成之际,欣悉本套教材有10本遴选入“普通高等教育‘十一五’国家级规划教材”,这是对本套教材的充分肯定和认可,也是对广大编写人员的鞭策和鼓励。

全国高等学校医学规划教材(供医学检验等专业用)编写指导小组

2006年9月

前 言

随着 21 世纪,新知识、新技术的不断涌现,为了追赶世界科学技术的潮头,迫切需要加快知识的更新步伐,特别是目前教育部大力倡导创新性教育,推行双语教学和多媒体教学,其根本目的就在于能够与世界接轨。

《临床检验病原生物学实验指导》是“21 世纪中国高等学校医学检验专业课程体系与教学内容的创新与实践”教学改革课题的组成部分。是教改课题形成的教学内容和手段的改革成果。根据医学检验专业的培养目标,确立适于教师讲课和学生自学,乃至对学生毕业后临床工作有一定指导作用的编写思路。教材以夯实基础理论为原则,以培养实际操作能力为目的,以方便教师授课和学生进行实验为落脚点,充分体现“三基”的编写思路。根据本专业的学时要求和教材系统性、完整性的需要,在对字数进行适当控制的同时,尽可能地把实验原理、试剂与器材、操作步骤、临床意义、注意事项和方法评价等全面阐述,特别详细介绍了操作步骤,每个实验后还附有思考题。

根据教材编写小组的意见和配套理论教材的需要,我们将临床微生物学检验和寄生虫学检验合并编写,但分别成篇,形成了四篇十一章的框架。在注重理论性、实用性和系统性相结合的前提下,删去了个别较少开展的或重复的内容,适当增加了一些比较成熟的新实验和新技术,如分子生物学技术等。并力求通过增加编写综合设计性实验,系统地训练和培养学生独立分析和解决问题的能力。也便于教师在指导学生开设相关实验时参考和使用。本教材还配套了多媒体教学光盘,典型实验操作的视频材料等。为更好地促使学生参与教学互动和自主学习提供帮助。

本书在编写过程中借鉴了其他相关教材宝贵的经验,也得到了多方面的大力支持和帮助,各位编委本着严谨科学的态度,付出了辛勤的劳动,在此一并致以衷心的感谢。但由于检验医学的飞速发展,内容不断更新,也限于本人水平,书中肯定会有欠缺之处,真诚期望师生和读者在使用过程中提出宝贵意见和建议。

刘运德

2006 年 7 月 10 日

郑重声明

高等教育出版社依法对本书享有专有出版权。任何未经许可的复制、销售行为均违反《中华人民共和国著作权法》，其行为人将承担相应的民事责任和行政责任，构成犯罪的，将被依法追究刑事责任。为了维护市场秩序，保护读者的合法权益，避免读者误用盗版书造成不良后果，我社将配合行政执法部门和司法机关对违法犯罪的单位和个人给予严厉打击。社会各界人士如发现上述侵权行为，希望及时举报，本社将奖励举报有功人员。

反盗版举报电话：(010) 58581897/58581896/58581879

传 真：(010) 82086060

E - mail: dd@hep.com.cn

通信地址：北京市西城区德外大街4号

高等教育出版社打击盗版办公室

邮 编：100011

购书请拨打电话：(010)58581118

目 录

第一篇 临床微生物学总论

第一章 细菌学检验基本技术	3	实验 23 琼脂筛选试验	49
第一节 细菌形态学检查	3	实验 24 联合药敏试验	50
实验 1 光学显微镜	3	实验 25 β -内酰胺酶和超广谱 β -内酰胺酶检测	51
实验 2 不染色标本检查法	4	实验 26 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)检测	53
实验 3 染色标本检查法	4	实验 27 其他常见耐药菌的检测	54
实验 4 特殊染色检查法	5	实验 28 厌氧菌体外抗菌药物敏感性试验	55
第二节 消毒与灭菌	6	实验 29 真菌体外抗菌药物敏感性试验	56
实验 5 物理消毒灭菌法	6	第二章 真菌学检验基本技术	59
实验 6 化学消毒法	9	实验 30 基本形态及结构观察	59
第三节 细菌分离培养技术	11	实验 31 染色检查	60
实验 7 培养基制备	11	实验 32 分离培养和鉴定	60
实验 8 接种和分离技术	14	第三章 病毒学检验基本技术	64
实验 9 细菌的培养方法	16	第一节 病毒的形态学检查	64
实验 10 细菌计数	19	实验 33 电子显微镜观察	64
实验 11 细菌的生长现象	23	第二节 病毒的分离培养	65
实验 12 常用菌种保存技术	24	实验 34 动物接种	65
第四节 细菌鉴定技术	26	实验 35 鸡胚接种和培养	66
实验 13 生物化学鉴定方法	26	实验 36 组织细胞培养	68
实验 14 编码鉴定方法	33	实验 37 空斑形成试验	70
实验 15 血清学鉴定方法	34	第三节 病毒血清学试验	71
第五节 动物实验与细菌毒素检测技术	36	实验 38 血凝试验和血凝抑制试验	71
实验 16 动物接种	36	实验 39 中和试验	73
实验 17 常用实验动物采血技术	38	第四节 免疫学技术	74
实验 18 内毒素检测	39	实验 40 免疫荧光技术	74
实验 19 外毒素检测	41	第五节 分子生物学技术	76
第六节 抗菌药物敏感性试验与耐药性检测	42	实验 41 分子杂交技术	76
实验 20 纸片扩散法	42	实验 42 聚合酶链反应	78
实验 21 稀释法	45		
实验 22 E 试验	48		

第二篇 临床微生物学检验

第四章 常见致病性细菌的检验	85	实验 43 葡萄球菌属	85
第一节 球菌	85	实验 44 链球菌属	89

实验 45 肠球菌属 94

实验 46 奈瑟菌属和布兰汉菌属 96

第二节 肠杆菌科细菌 99

实验 47 埃希菌属 99

实验 48 沙门菌属 102

实验 49 志贺菌属 104

实验 50 枸橼酸杆菌属和小肠结肠炎耶尔森菌 106

实验 51 克雷伯菌属、肠杆菌属和沙雷菌属 108

实验 52 变形杆菌属、普罗威登斯菌属和摩根菌属 110

第三节 弧菌属和螺杆菌属 112

实验 53 弧菌属 112

实验 54 幽门螺杆菌 115

第四节 非发酵菌和其他革兰阴性杆菌 117

实验 55 假单胞菌属 117

实验 56 窄食单胞菌属 119

实验 57 产碱杆菌属 120

实验 58 不动杆菌属 121

实验 59 军团菌属 122

第五节 嗜血杆菌属 123

实验 60 嗜血杆菌属 123

第六节 需氧革兰阳性菌 125

实验 61 棒状杆菌属 125

实验 62 需氧芽胞杆菌属 126

实验 63 产单核李斯特菌 127

第七节 分枝杆菌属、放线菌属和诺卡菌属 128

实验 64 结核分枝杆菌 128

实验 65 放线菌属 131

实验 66 诺卡菌属 132

第八节 厌氧菌 132

实验 67 厌氧芽胞梭菌 133

实验 68 无芽胞厌氧菌 135

第九节 螺旋体 137

实验 69 钩端螺旋体 137

实验 70 梅毒螺旋体 139

第十节 支原体、衣原体和立克次体 141

实验 71 支原体 141

实验 72 衣原体 142

实验 73 立克次体 143

第五章 常见致病性真菌的检验 145

第一节 常见浅部真菌培养和鉴定 145

实验 74 毛癣菌属 145

实验 75 小孢子菌属 145

实验 76 表皮癣菌属 146

第二节 常见深部真菌培养和鉴定 146

实验 77 假丝酵母菌属 146

实验 78 隐球菌属 147

实验 79 曲霉菌属 147

第六章 常见病毒的检验 149

第一节 呼吸道病毒 149

实验 80 ELISA 夹心法检测呼吸道合胞病毒抗原 149

第二节 肝炎病毒 150

实验 81 双抗体夹心 ELISA 法检测乙型肝炎病毒 HBsAg 150

第三节 其他病毒 150

实验 82 间接免疫荧光法检测 HSV - IgM 抗体 151

实验 83 人类免疫缺陷病毒抗体的检测 151

第七章 临床标本的细菌学检查 155

实验 84 临床标本的细菌学检查 155

第三篇 寄生虫学检验

第八章 常见致病性原虫的检验 163

实验 85 叶足虫检验 163

实验 86 鞭毛虫检验 165

实验 87 孢子虫检验 167

实验 88 纤毛虫检验 171

第九章 常见致病性蠕虫的检验 173

实验 89 线虫检验 173

实验 90 吸虫检验 177

实验 91 绦虫检验 182

第十章 常见致病性节肢动物的检验 185

实验 92 节肢动物检验 185

第四篇 综合设计性实验

第十一章 综合设计性实验	191	实验	195
实验 93 设计物理因素对细菌的影响		实验 95 临床标本的细菌学检验	197
实验	191	实验 96 肠道寄生虫感染的实验诊断	199
实验 94 设计化学因素对细菌的影响				
附录 1 培养细菌的常用培养基				203
附录 2 实验室规则				223
彩图				

第一篇 临床微生物学总论

第一章 细菌学检验基本技术

第一节 细菌形态学检查

实验1 光学显微镜

【试剂与器材】

1. 试剂 香柏油、二甲苯。
2. 其他 普通光学显微镜、擦镜纸、细菌革兰染色玻片标本等。

【操作步骤】

1. 普通光镜的使用方法

(1) 首先将显微镜平放于实验台上,转动物镜转换器使低倍镜与镜筒垂直到位。然后将反光镜凹面对着光源转动,使光线集中于集光器,目镜观察视野明亮即说明对光完成。如果此时视野不够明亮,应检查聚光器的光圈是否打开,聚光器是否升至最高。

(2) 对好光后即可将标本(细菌革兰染色玻片标本)置载物台上,用标本推进器固定。将欲检部位移至物镜下,将镜头降至离标本最近的位置,左眼从目镜观察(右眼不应闭合),转动粗调节器使镜头上移直至看到模糊物像时再换细调节器,调节至物像清晰为止。

2. 油镜的使用方法

(1) 将标本置载物台上,用标本推进器固定,将待检部位移于物镜下。先用低倍镜找出标本位置,然后提高镜筒,在标本欲检部位滴1滴香柏油后转换成油镜。

(2) 从侧面观察着缓慢转动粗调节器,使镜头下移,直至油镜头浸没在油滴内接近玻片时为止。将眼睛移至接目镜,一边观察,一边缓慢调节粗调节器,使镜筒上升(只能上升,不能下降,以防压碎标本片和损坏油镜),待看到模糊物像后再调节细调节器,直至清晰看到细菌等微生物形态时为止。如果油镜末端已离开油面,未看到清晰物像,可按上述过程重复操作。

使用油镜时需要在玻片上滴加香柏油,这是因为:油镜的放大倍数高而透镜很小,自标本片透过的光线,因玻片和空气介质密度不同,而使部分光线经载玻片和空气折射后不能进入透镜,入射光线较少,物像不清晰。在油镜和标本片之间滴加与玻璃折光率($n = 1.52$)相近的香柏油($n = 1.515$),使进入油镜的光线增多,视野光亮度增强,物像清晰。

【注意事项】

1. 显微镜是精密的光学仪器,在使用时应小心爱护,不可随意拆开。
2. 取送显微镜时,要右手持镜臂,左手托镜座,平端在胸前,轻拿轻放。
3. 镜头必须保持清洁,油镜用毕应立即用擦镜纸擦去香柏油。如油已干,可加一滴二甲苯在擦镜纸上,用此擦镜纸擦拭油镜头,随即用干擦镜纸擦去镜头上的二甲苯,以防止二甲苯将黏固透镜的胶质溶解,造成镜片移位或脱落。
4. 避免强酸、强碱、氯仿、乙醚、乙醇等化学药品接触显微镜。目镜、物镜、反光镜等光学部分必须保持清洁,且避免日光直射,在擦拭镜头时绝不可用其他硬纸或镜布擦拭,以免损伤镜头。
5. 显微镜用毕,用软绸拭净各部件后,将接物镜转成“品”字形并降低,下降集光器,然后放入镜箱内或送至显微镜室。

【思考题】

1. 油镜有哪些标志? 如何使用油镜? 为什么用油镜要等标本干后才能滴香柏油?
2. 如果视野中光线太强或太弱, 应该怎么做?

实验 2 不染色标本检查法**【原理】**

有鞭毛的细菌在液体培养基中可运动, 而无鞭毛的细菌只发生颤动, 以此可观察了解细菌的运动能力及是否具有鞭毛结构。

【试剂与器材】

1. 菌种 变形杆菌 6~12 h 肉汤培养物、葡萄球菌。
2. 其他 普通光学显微镜、载玻片、凹玻片、盖玻片、接种环、凡士林、小镊子等。

【操作步骤】

1. 悬滴法

(1) 取洁净凹玻片一张, 在凹窝四周涂凡士林少许。

(2) 用接种环取一环葡萄球菌或变形杆菌培养物置于盖玻片中央, 若检查的标本是固体培养物或脓汁等, 应先滴加一滴无菌生理盐水于盖玻片中央, 然后以接种环取材与之混匀。

(3) 将凹玻片倒合于盖玻片上, 使凹窝中央正对菌液。迅速翻转凹玻片, 用小镊子轻压, 使盖玻片与凹窝边缘粘紧封闭, 以防水分蒸发。

(4) 先用低倍镜找到悬滴, 再换高倍镜。观察时应下降聚光器, 缩小光圈, 减少光亮, 使背景较暗易于观察。变形杆菌有鞭毛, 可向不同方向迅速运动, 而葡萄球菌无鞭毛, 不能做真正的运动, 但受水分子的撞击而呈分子运动(布朗运动), 即在一定范围内做位移不大的颤动。

2. 压滴法

(1) 用接种环分别取葡萄球菌及变形杆菌菌液 2~3 环, 置于洁净载玻片中央。

(2) 用小镊子挟一盖玻片, 先使盖玻片一边接触菌液, 然后缓缓放下, 覆盖于菌液上, 以免产生气泡。

(3) 先用低倍镜找到观察部位, 再换高倍镜观察细菌运动。

【思考题】

常用的不染色标本检查法有哪些?

染色标本检查法**【原理】**

1. 单染色法 单染色是用一种染料, 如亚甲蓝或苯酚复红稀释液等, 将细菌染成一种颜色。该法只能显示细菌的形态大小, 但对细菌无鉴别价值。

2. 革兰染色法

(1) 革兰阳性细菌细胞壁结构较致密, 肽聚糖层厚, 脂质含量少, 乙醇不易渗入; 革兰阴性菌细胞壁结构较疏松, 肽聚糖层少, 脂质含量多, 乙醇易渗入。

(2) 革兰阳性菌的等电点低, 革兰阴性菌的等电点较高, 在相同 pH 条件下, 革兰阳性菌所带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) 革兰阳性菌细胞内含有大量核糖核酸镁盐, 可与结晶紫和碘牢固地结合成大分子复合物, 不易被乙醇脱色; 而革兰阴性菌细胞内含极少量的核糖核酸镁盐, 吸附染料量少, 形成的复合物分子也较小, 故易被乙醇脱色。

【试剂与器材】

1. 试剂 碱性亚甲蓝、稀释苯酚复红、革兰染液、生理盐水等。

2. 菌种 金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌。
3. 其他 载玻片、玻片夹、酒精灯、接种环、标记笔。

【操作步骤】

1. 单染色法

(1) 涂片:取洁净的载玻片一张,用标记笔一分为二,用接种环取生理盐水 2 环,分别置于玻片的两端,接种环烧灼灭菌后,取金黄色葡萄球菌斜面培养物少许与盐水混匀,呈轻度混浊即可,并涂成均匀的薄膜涂片。接种环灭菌后以同样的方法再取大肠埃希菌少许,与另一端的生理盐水混匀后涂成均匀薄膜。如用液体材料,如痰、尿液、脓汁等可直接涂片,不必加生理盐水。

(2) 干燥:涂片最好在室温下自然干燥,必要时可将标本面向上,小心间断地在弱火高处烘干,但切勿紧靠火焰将涂膜烤枯。

(3) 固定:涂片干燥后,将标本片在酒精灯上快速地来回通过三次,共约 2~3 s,注意温度不可太高,以涂片涂膜的背面触及皮肤时有轻微烫觉即可。固定的目的:① 杀死细菌;② 使菌体与玻片黏附较牢,在染色时不至于被染液和水冲掉;③ 菌体蛋白变性易着色。

(4) 染色:滴加碱性甲亚蓝或稀释苯酚复红液 1~2 滴,使染液盖满涂片,染 1~2 min 后,用细流水冲去染液,吸水纸吸干,干后用油镜镜检。

(5) 在油镜下无论是葡萄球菌还是大肠埃希菌,都染成一种颜色(蓝色或者红色)。

2. 革兰染色法

(1) 标本的涂片、干燥和固定同上。

(2) 染色:在已固定的细菌涂片上滴加结晶紫染液数滴,室温作用 1 min 后,用细流水轻轻冲洗,甩去积水。再滴加碘液数滴,室温作用 1 min 后,用细流水冲洗。然后滴 95% 乙醇数滴,轻轻摇动玻片几秒钟,使均匀脱色,然后斜持玻片,使脱掉的染料随乙醇流去,再滴加乙醇,直到流下的乙醇无色为止(约需 30 s),立即用细流水将乙醇冲掉,甩去积水。再滴加稀释苯酚复红液复染约 1 min 后,用细流水冲洗并甩去积水。

(3) 标本染色后,晾干或用吸水纸吸干,滴香柏油后用油镜观察。

【临床意义】

紫色为革兰阳性菌,红色为革兰阴性菌。

【注意事项】

1. 在标本制备时,涂片不可过厚,一定要涂成薄膜。
2. 革兰染色时,关键的环节是脱色。脱色不够,革兰阴性菌可染成阳性菌;脱色过度,革兰阳性菌可呈现革兰阴性菌的结果。恰当的脱色需要通过实践掌握。
3. 革兰染色结果也受细菌菌龄影响,一般以 18~24 h 的培养物染色效果最好,菌龄过长也会影响细菌的染色性。

【思考题】

革兰染色为何称为鉴别染色法?它有何实际意义?

特殊染色检查法

【原理】

1. 鞭毛染色法 细菌的鞭毛能被碱性复红乙醇饱和溶液着色,是因为在染色过程中随着乙醇的挥发其染料沉积在鞭毛上,使鞭毛着色。碱性复红作为主要染料,而丹宁酸为媒染剂。

2. 芽胞染色法 芽胞具有高度的折光性,外膜致密,渗透性低,故普通染色法不易使其着色,若加温可使其渗透性增强,可以吸收碱性染料而着色,着色后一般不易脱色。

3. 荚膜染色法 荚膜为细菌细胞壁外围的黏液层,对染料的亲和力很低,用一般染色不易着色,必须

通过荚膜染色方法或衬托染色,方能清晰辨认出荚膜。

【试剂与器材】

1. 试剂 鞭毛染色液、芽胞染色液、荚膜染色液、生理盐水、蒸馏水。
2. 菌种 变形杆菌培养物、炭疽芽胞杆菌斜面培养物、有荚膜的细菌培养物。
3. 其他 载玻片、玻片夹、酒精灯、接种环、毛细滴管等。

【操作步骤】

1. 鞭毛染色法

(1) 采用点种法接种变形杆菌(或其他鞭毛菌)。离接种点近的菌,鞭毛细,菌体较短;远离接种点的菌,鞭毛粗,菌体长。用无菌接种环取远离接种点的菌混悬于盛有无菌蒸馏水的平皿内,不要研磨(以免鞭毛脱落),置室温放置 10~15 min,使鞭毛膨大。

(2) 用毛细滴管将菌液滴于洁净的玻片上,缓慢倾斜玻片任菌液流开,使之成为均匀薄膜,将玻片置 37℃ 温箱内,任其自然干燥,切勿用火焰固定。

(3) 在干燥标本片上滴加鞭毛染色液 1~2 滴,使覆盖于薄膜上,作用 1~2 min 后轻轻用水冲,干后镜检观察。

2. 芽胞染色法

(1) 用炭疽芽胞杆菌斜面培养物涂片,自然干燥,火焰固定。

(2) 滴加苯酚复红染液于涂片上,并用微火加热,使冒蒸汽,但勿煮沸,持续约 5 min,加热过程中要随时添加染液,勿让标本干涸,冷后水洗。再用 95% 乙醇脱色 2 min,水洗,然后用碱性亚甲蓝复染 1 min,水洗。

(3) 室温下待标本片干后,加香柏油用油镜观察。

3. 荚膜染色法 用有荚膜的细菌培养物涂片,火焰固定(方法同前),固定标本后加 1% 结晶紫染液,室温保持 1 min 后,倒去染液,然后用 20% 硫酸铜水溶液冲洗染液,勿水洗。待干后镜检观察。

【临床意义】

1. 鞭毛染色法 菌体染成红色(或深紫色),鞭毛染成淡红色(或淡紫色)。染色时间越长,鞭毛越粗。

2. 芽胞染色法 菌体为蓝色,芽胞为红色。

3. 荚膜染色法 菌体为深紫色,荚膜为无色或淡紫色。

【思考题】

在细菌的特殊结构中哪些结构染色后光镜下可观察?

(刘运德)

消毒与灭菌

微生物在理化因素的作用下能被杀灭或抑制。在临床上可采用物理和化学方法进行消毒、灭菌和除菌。物理方法多用于培养基、试剂、医疗器械、玻璃器皿、药品、物品等的灭菌或消毒,化学方法多用于皮肤、物体表面的消毒。空气消毒可用紫外线照射消毒,也可用化学药品(如甲醛熏蒸)消毒。

本节实验要求掌握热力灭菌,尤其是高压蒸汽灭菌法的操作和应用,熟悉紫外线在消毒中的作用和局限,了解除菌滤器的除菌作用和芽胞在消毒作用中的重要性。

物理消毒灭菌法

【试剂与器材】

1. 试验菌种 枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*) 48 h 固体培养物(临用前配制成悬液)、大肠埃希菌