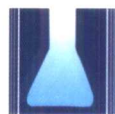


全国高等医药教材建设研究会规划教材·全国高等医药院校配套教材



供医学检验专业用

# 临床微生物学和微生物 检验实验指导

第2版

WBC	50.0		WBC	50.0	
LY%	13.5		LY%	13.5	
MO%	36.6	L	MO%	36.6	L
GR%		H	GR%		H
LY#		H	LY#		H
MO#		H	MO#		H
GR#		H	GR#		H
RBC	4.45		WBC		
HGB	14.2		LY%	50.0	
HCT	42.6		MO%	13.5	
MCV	95.8		GR%	36.6	L
MCH	31.9		LY#		H
MCHC	33.3		MO#		H
RDW	12.0		GR#		H

主编 洪秀华

 人民卫生出版社

全国高等医药院校配套教材

供医学检验专业用

# 临床微生物学和微生物 检验实验指导

(第2版)

主 编 洪秀华

编 者 (以姓氏笔画为序)

王 跃 (重庆医科大学)

李向阳 (温州医学院)

李建英 (天津医科大学)

吴爱武 (广州医学院)

张玉妥 (张家口医学院)

邵世和 (北华大学医学院)

洪秀华 (上海第二医科大学)

黄锡全 (江苏大学医学技术学院)

人 民 卫 生 出 版 社

## 图书在版编目 (CIP) 数据

临床微生物学和微生物检验实验指导/洪秀华主编.  
2版. —北京: 人民卫生出版社, 2003  
ISBN 7-117-05631-2

I. 临… II. 洪… III. 微生物学-医学检验-实验-医学院校-教学参考资料 IV. R446.5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 053190 号

## 临床微生物学和微生物检验实验指导 (第 2 版)

主 编: 洪秀华  
出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 67616688)  
地 址: (100078) 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼  
网 址: [http://www. pmph. com](http://www.pmph.com)  
E - mail: [pmph @ pmph. com](mailto:pmph@pmph.com)  
印 刷: 三河市宏达印刷有限公司  
经 销: 新华书店  
开 本: 787 × 1092 1/16 印张: 12.75  
字 数: 280 千字  
版 次: 1999 年 7 月第 1 版 2003 年 8 月第 2 版第 6 次印刷  
标准书号: ISBN 7-117-05631-2/R·5632  
定 价: 17.00 元

著作权所有, 请勿擅自用本书制作各类出版物, 违者必究  
(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

# 序 言



根据高等医学院校医学检验专业“临床微生物学和微生物检验”(第3版)和全国医学专科学校医学检验专业“微生物学检验”(第2版)专业课教学需要,在卫生部教材办公室的组织领导下,编写了“临床微生物学和微生物检验实验指导”作为实验课教材,供医学检验专业本科和大专师理论课教材配套使用。全书共分为五个章30个节,介绍细菌学检验基本技术、常见病原性细菌的培养和鉴定、常见致病性真菌的培养和鉴定、常见致病性病毒检测技术和临床标本微生物学检验。每节为一个相对独立的教学单位(三学时),每节包含数个教学内容,每个内容又有几项具体实验。

编写本教材目的是要求学生在学习专业理论的过程中,通过实验课的动手操作,不仅得到规范的微生物学基本操作技术训练,掌握无菌操作技术,树立无菌观念;同时熟悉常见病原学微生物的生物学性状、培养鉴定方法和当代检测感染性病原体先进的免疫学、分子生物学方法。通过各种临床标本微生物的检测,培养学生将理论知识应用于临床实践及评价检验方法诊断价值的综合能力。

本实验教材为医学检验本、专科微生物学教材的配套教材,本科和专科根据各自理论教材的内容、范围和深度,选择相应的实验项目,力争达到本科学生偏重临床应用的方法评估,专科致力于检验方法和操作技能。除医学检验专业学生教学用书之外,本教材还可作为医学检验科的工作人员和进修生、实习生参考用书。

本教材是卫生部教材办公室组织编写全套医学教材之一,在编写过程中得到各参编单位、医学检验专业“临床微生物学组”、第1版编委和绘图者张国英老师的大力支持,在此一并感谢。虽然编写者尽心努力完成编写任务,限于我们的学术水平和编写能力,本版教材还会有错误和不妥之处,盼请广大师生在本教材使用过程中多提宝贵意见,以便修订和完善。

洪秀华

2002年11月

# 目 录



临床微生物学和微生物学检验实验的目的要求.....	(1)
临床微生物学实验室规则及注意事项.....	(2)
一、临床微生物学实验室规则 .....	(2)
二、实验室意外的紧急处理办法 .....	(2)
三、实验时的注意事项 .....	(3)
<b>第一章 细菌学检验基本技术</b> .....	(4)
<b>第一节 细菌形态学检查</b> .....	(4)
一、显微镜检查 .....	(4)
二、不染色标本检查 .....	(6)
三、革兰染色和细菌基本形态观察 .....	(6)
四、特殊结构染色和观察 .....	(8)
五、细菌 L 型检查 .....	(9)
<b>第二节 细菌的分布与消毒灭菌</b> .....	(10)
一、细菌的分布.....	(10)
二、物理消毒灭菌法.....	(11)
三、化学消毒法.....	(13)
四、消毒灭菌效果的评价.....	(14)
<b>第三节 细菌分离培养技术</b> .....	(15)
一、培养基制备技术.....	(15)
二、培养方法.....	(18)
三、分离培养和接种技术.....	(20)
四、倾注培养和活菌计数.....	(23)
五、生长现象的观察.....	(25)
<b>第四节 细菌鉴定技术</b> .....	(26)
一、生物化学鉴定.....	(26)
二、数字编码鉴定.....	(30)

三、血清学鉴定	(32)
四、分子生物学鉴定	(33)
第五节 动物实验与细菌毒素检测技术	(34)
一、实验动物接种技术	(34)
二、实验动物采血技术	(37)
三、内毒素毒性检测	(38)
四、外毒素毒性检测	(39)
第六节 抗菌药物敏感性试验与耐药检测	(39)
一、纸片扩散法	(39)
二、稀释法	(42)
三、E 试验	(45)
四、琼脂筛选试验	(46)
五、联合药敏试验	(47)
六、 $\beta$ -内酰胺酶和超广谱 $\beta$ -内酰胺酶检测	(47)
第二章 常见致病性细菌的培养和鉴定	(49)
第一节 球菌	(49)
一、葡萄球菌属	(49)
二、链球菌属	(52)
三、肠球菌属	(56)
四、奈瑟菌属和布兰汉菌属	(58)
第二节 肠道细菌	(60)
一、埃希菌属	(60)
二、沙门菌属和志贺菌属	(61)
三、克雷伯菌属、肠杆菌属、枸橼酸菌属和沙雷菌属	(64)
四、变形杆菌属和摩根菌属	(66)
五、小肠结肠炎耶尔森菌	(67)
第三节 弧菌属、弯曲菌属和螺杆菌属	(68)
一、弧菌属	(68)
二、空肠弯曲菌	(70)
三、幽门螺杆菌	(71)
第四节 非发酵菌和其他革兰阴性杆菌	(72)
一、假单胞菌属	(72)
二、窄食单胞菌属	(73)
三、产碱杆菌属	(74)
四、不动杆菌属	(75)
五、军团菌属	(76)
六、嗜血杆菌属	(78)

第五节 需氧革兰阳性杆菌 ..... (79)

- 一、棒状杆菌属 ..... (79)
- 二、需氧芽胞杆菌属 ..... (82)
- 三、产单核李斯特菌 ..... (86)

第六节 分枝杆菌属、放线菌属和诺卡菌属 ..... (87)

- 一、结核分枝杆菌 ..... (87)
- 二、麻风分枝杆菌 ..... (89)
- 三、放线菌属 ..... (89)
- 四、诺卡菌属 ..... (90)

第七节 厌氧菌 ..... (90)

- 一、厌氧芽胞梭菌 ..... (90)
- 二、无芽胞厌氧菌 ..... (93)

第八节 螺旋体 ..... (96)

- 一、染色和形态观察 ..... (96)
- 二、钩端螺旋体培养技术和显微凝集试验 ..... (97)
- 三、梅毒螺旋体血清学试验 ..... (98)

第九节 支原体、衣原体和立克次体 ..... (99)

- 一、支原体 ..... (99)
- 二、衣原体 ..... (101)
- 三、立克次体 ..... (102)

**第三章 常见致病性真菌的培养和鉴定** ..... (104)

第一节 真菌学检验基本技术 ..... (104)

- 一、真菌染色技术和形态结构观察 ..... (104)
- 二、真菌分离培养和鉴定 ..... (106)

第二节 常见浅部真菌培养和鉴定 ..... (108)

- 一、毛癣菌属 ..... (108)
- 二、小孢子菌属 ..... (108)
- 三、表皮癣菌属 ..... (109)

第三节 常见深部真菌培养和鉴定 ..... (109)

- 一、假丝酵母菌属 ..... (109)
- 二、隐球菌属 ..... (110)

**第四章 常见致病性病毒检测技术** ..... (112)

第一节 病毒培养和检测技术 ..... (112)

- 一、鸡胚接种 ..... (112)
- 二、组织细胞培养 ..... (115)
- 三、免疫学检测 ..... (117)

四、分子生物学检测 .....	(118)
第二节 呼吸道病毒 .....	(121)
一、流行性感冒病毒 .....	(121)
二、呼吸道合胞病毒 .....	(123)
第三节 肝炎病毒 .....	(124)
一、乙型肝炎病毒 .....	(124)
二、丙型肝炎病毒 .....	(124)
第四节 疱疹病毒 .....	(125)
一、单纯疱疹病毒 .....	(125)
二、巨细胞病毒 .....	(125)
三、EB 病毒 .....	(126)
第五节 其他病毒 .....	(127)
一、轮状病毒 .....	(127)
二、人类免疫缺陷病毒 .....	(127)
<b>第五章 临床标本的细菌学检验 .....</b>	<b>(132)</b>
第一节 血液及骨髓标本的细菌学检验 .....	(132)
第二节 尿液标本的细菌学检验 .....	(136)
第三节 生殖道标本的细菌学检验 .....	(139)
第四节 肠道标本的细菌学检验 .....	(141)
第五节 呼吸道标本的细菌学检验 .....	(146)
第六节 脑脊液标本的细菌学检验 .....	(151)
第七节 脓液及穿刺液的细菌学检验 .....	(153)
第八节 组织标本的细菌学检验 .....	(155)
<b>附录 .....</b>	<b>(158)</b>





## 临床微生物学和微生物学检验实验的目的要求

1. 通过学生亲自动手操作,掌握比较全面的微生物学基本操作技术。
2. 通过微生物学实验,使学生建立无菌观念,掌握无菌操作技术。
3. 帮助学生掌握和熟悉常见病原微生物的生物学性状、分离培养和鉴定的方法以及各种临床标本的微生物学检查的基本程序。
4. 熟悉病原微生物的先进检测技术。
5. 在实验过程中培养学生独立操作、独立思考、分析问题和解决问题的能力。



# 临床微生物学实验室规则及注意事项

## 一、临床微生物学实验室规则

1. 进入实验室必须穿白大衣,离室时脱下反折;无菌操作时须戴口罩。
2. 不必要物品勿带入实验室,必要的文具、实验指导和笔记本应放在指定的操作区。
3. 实验室内禁止饮食、抽烟,不得高声谈笑或随便走动。
4. 需培养的物品应做好标记放在指定地点。用过的有菌器材必须放在消毒缸内,小心处理传染材料、培养物和污染的物品。
5. 避免任何有菌材料的溅出,若不慎污染工作台、手、眼、衣服和地面等处,应立即报告老师及时作适当处理。
6. 实验完毕后物归原处,并清洁和消毒桌面;肥皂洗手、消毒液浸泡洗净后,关闭水、电、煤气和门窗方可离开实验室。

## 二、实验室意外的紧急处理办法

1. 皮肤破损 先除去异物,用蒸馏水或生理盐水洗净后,涂2%红汞或2%碘酒。

2. 烧伤 局部涂凡士林、5%鞣酸或2%苦味酸。
3. 化学药品腐蚀伤 若为强酸,先用大量清水冲洗,再以5%碳酸氢钠溶液中和;强碱腐蚀伤时先以大量清水冲洗后,再用5%醋酸或5%硼酸溶液中和。若受伤处是眼部,经过上述步骤处理后,再滴入橄榄油或液体石蜡1~2滴。
4. 菌液误入口中 应立即吐入消毒容器内,并用1:1000高锰酸钾溶液或3%双氧水漱口;并根据菌种不同,服用抗菌药物预防感染。
5. 菌液流洒桌面 将适量2%~3%来苏儿或0.1%新洁尔灭倒于污染面,浸泡半小时后抹去。若手上有活菌,亦应浸泡于上述消毒液3分钟后,再用肥皂和水清洗。
6. 火警 如发生火警险情时须沉着处理,切勿慌张,应立即关闭电闸和煤气阀门。如酒精、乙醚、汽油等有机溶液起火,切忌用水扑救,可用沙土等扑灭火苗。

### 三、实验时的注意事项

#### (一) 严格遵循实验指导

1. 在开始做实验以前,须仔细阅读实验指导,进行独立思考,并根据实际情况,作出实验的具体安排和打算。
2. 合理安排时间和实验材料,尽量避免出错,力求取得理想的结果。

#### (二) 认真完成实验操作

1. 认真听取指导老师实验前的讲解。
2. 细心操作,若发现问题,在独立思考分析原因的基础上找老师帮助。
3. 在自己的实验材料上做好标记,包括班级、姓名、菌名、日期等。
4. 认真观察自己的实验结果,将其纪录在实验报告中(根据需要要用彩色笔绘图记录),并回答实验报告中所有的问题。
5. 遇到实验结果与理论不符的情况,应仔细分析原因,培养自己独立思考、分析问题和解决问题的能力。

#### (三) 充分利用参考资料

1. 在教科书和参考书中核对有关的数据和资料。
2. 认真观摩示教和影像、多媒体等电化教材。

(洪秀华)

# 第一章



## 细菌学检验基本技术

### 第一节 细菌形态学检查

#### 一、显微镜检查

##### 目的要求

1. 掌握显微镜油镜的使用和保护。
2. 熟悉显微镜的结构及各部分的功能。

##### 器材和方法

##### 1. 显微镜油镜的使用方法

(1) 普通光学显微镜(图 1-1)的接物镜有三种,即低倍镜、高倍镜和油镜。检查微生物时常用的是油镜。油镜的标志是:①透镜直径最小;②油镜头长度大于低倍镜和高倍镜;③油镜头的下缘有一圈黑线或两圈红线;④有“oil”等字样;⑤有放大倍数  $100\times$  的标记。当接目镜倍数为  $10\times$ ,接物镜用油镜时,则显微镜的放大倍数为 1000 倍。

(2) 显微镜在使用时应平放在实验台的适宜处。用油镜时,勿将镜臂和载物台倾斜,以免镜油流出,影响观察。

(3) 先用低倍镜对光。由于直接阳光光线过强,不仅其反射热有损显微镜的光学装置,而且不易看清物像,因此不能作为光源,而常以间

接日光或灯光为光源。转动反光镜(以间接日光为光源时,使用平面反光镜;如以灯光为光源,使用凹面反光镜),使光线集中于集光器。

(4)根据所观察的标本,升降集光器,缩小光圈,以获得最佳光度。当用油镜检查染色标本时,光线宜强,可将集光器上升到最高位置,把光圈完全打开;当用低倍镜或高倍镜检查未染色标本时,应适当缩小光圈,下降集光器,使光度减弱。

(5)将标本置载物台上,用弹簧夹或标本推进器固定,将待检部位移于接物镜下。

(6)先用低倍镜找出标本的位置,然后提高镜筒,在标本欲检部位滴1滴香柏油,然后转换成油镜。从侧面观察,缓慢转动粗调节器,使油镜头浸没在油滴内,当油镜头几乎接触玻片时停止转动。用肉眼观察接目镜,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),待看到模糊物像时,再调节细调节器,直至清晰看到细菌等微生物形态。如果油镜末端已离开油面,应按上述过程重复操作。

(7)观察标本时应两眼同时睁开,以减少眼睛疲劳。用左眼窥镜,右眼管书绘。

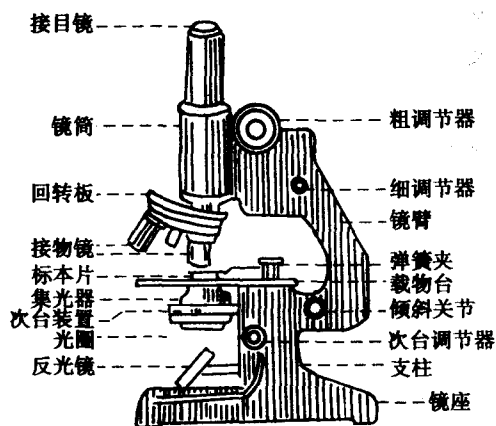


图 1-1 显微镜结构

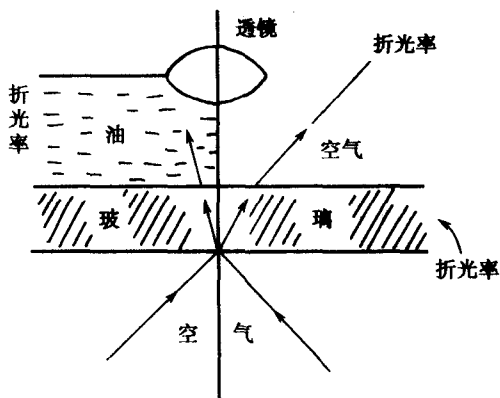


图 1-2 油镜原理示意图

使用油镜时需要在玻片上滴加香柏油,这是因为:油镜的透镜很小,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而不能进入接物镜,致使射入光线较少,使物像不清晰。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( $n=1.515$ ),则使进入油镜的光线增多,视野光亮度增强,物像清晰(图 1-2)。

## 2. 显微镜的保护

(1)显微镜是精密的光学仪器,在使用时应注意爱护,各部分结构不得随意拆卸,以免损坏。

(2)取送搬移显微镜时,要一手持镜臂,一手托镜座,平端在胸前,轻拿轻放。

(3)避免强酸、强碱、氯仿、乙醚、酒精等对机件有损坏作用的化学药品与显微镜接触。目镜、物镜、反光镜等光学部分,必须保持清洁,且避免日光直接照射。细调节器是显微镜精细而脆弱的部分,不要向一个方向连续转动数周,应轻微地来回旋转。

(4)镜头必须保持清洁,油镜使用后应立即用擦镜纸拭去镜油。若油镜头上的油迹未擦干净,应先将二甲苯滴在擦镜纸上擦拭镜头,再用干净擦镜纸擦去镜头上残留的二甲

苯。二甲苯应尽量少用,以免渗入油镜内溶解用以粘固透镜的胶质,造成透镜移位或脱落。

(5)显微镜擦净后,接物镜转成“品”字形并降低,下降聚光器,用软绸拭净各部件后覆盖于接目镜上,放入镜箱内或送至显微镜室。

## 二、不染色标本检查

### 目的要求

1. 熟悉细菌不染色检查法。
2. 了解不染色检查法的临床意义。

### 器材和试剂

1. 菌种 变形杆菌、葡萄球菌。
2. 培养基 肉汤培养基。
3. 其他 载玻片、凹玻片、盖玻片、凡士林、小镊子。

### 步骤和方法

#### 1. 悬滴法

(1)取洁净凹玻片 1 张,在凹窝四周涂凡士林少许。

(2)用接种环取 1 环变形杆菌或葡萄球菌 6~12h 肉汤培养物于盖玻片中央。

(3)将凹玻片倒合于盖玻片上,使凹窝中央正对菌液。

(4)迅速翻转载玻片,用小镊子轻压盖玻片,使之与凹窝边缘粘紧封闭,以防水分蒸发(图 1-3)。

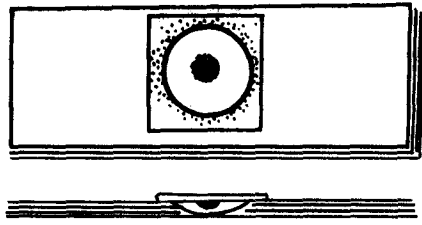


图 1-3 悬滴法

(5)先用低倍镜找到悬滴,再换高倍镜。因是不染色标本,背景稍暗些易于观察,因此,在观察时应下降聚光器、缩小光圈,以减少光亮。变形杆菌有鞭毛,运动活泼,可向不同方向迅速运动,位置移动明显。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),即在一定范围内作往复颤动,位置移动不大。

#### 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,避免菌液中产生气泡。

(3)先用低倍镜找到观察部位,再换高倍镜观察细菌的运动。

观察不染色标本中细菌的运动,除用光学显微镜外,还可用暗视野显微镜。

## 三、革兰染色和细菌基本形态观察

### 目的要求

1. 掌握革兰染色法和细菌的基本形态。

2. 熟悉细菌涂片的制备。

### 器材和试剂

1. 菌种 葡萄球菌、大肠埃希菌。
2. 培养基 普通琼脂斜面。
3. 示教片 细菌基本形态示教片。
4. 试剂 革兰染色液。
5. 其他 载玻片、生理盐水。

### 步骤和方法

#### 1. 细菌涂片标本的制作

(1)涂片:取洁净载玻片1张,用玻璃铅笔于玻片上划两个直径1.5cm左右的圆圈。用接种环在圆圈内各加1~2环生理盐水。接种环灭菌后,分别取葡萄球菌和大肠埃希菌培养物少许,在各自盐水中磨匀,呈轻度混浊。涂好的菌膜大小一般以1cm×1cm左右为宜。每次取菌前后注意将接种环灭菌。如果是液体培养物可直接涂抹于洁净的载玻片上。

(2)干燥:涂片最好在室温下自然干燥,或将标本面向上,置于酒精灯火焰高处慢慢烘干,切不可在火焰上烧干。

(3)固定:细菌的固定常用火焰加热法,即将上述已干的涂片在酒精灯火焰中通过3次。固定的目的在于杀死细菌,并使菌体与玻片粘附牢固,染色时不至于被染液和水冲掉,同时固定可凝固细胞质,改变细菌对染料的通透性。

#### 2. 革兰染色法

##### (1)原理

1)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;而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(pI2~3),革兰阴性菌等电点较高(pI4~5),在相同pH条件下,革兰阳性菌所带阴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且不易脱色。

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。

##### (2)方法

1)初染:将结晶紫染液加于制好的涂片上,染色1min,用细流水冲洗,甩去积水。

2)媒染:加卢戈碘液作用1min,用细流水冲洗,甩去积水。

3)脱色:滴加95%酒精数滴,摇动玻片数秒钟,使均匀脱色,然后斜持玻片,再滴加酒精,直到流下的酒精无色为止(约0.5min),用细流水冲洗,甩去积水。

4)复染:加稀释石炭酸复红染0.5min,用细流水冲洗,甩去积水。

待标本片自干或用吸水纸吸干后,在涂片上滴加镜油,置油镜下检查。

(3)结果:葡萄球菌染成紫色,为革兰阳性菌,呈葡萄状排列;大肠埃希菌染成红色,为革兰阴性菌,呈散在的杆状。

#### (4) 影响因素

1) 操作因素: 涂片太厚或太薄, 固定时菌体过分受热, 以及脱色时间长短, 都会影响染色结果。

2) 染液因素: 所有染液应防止染液蒸发而改变浓度, 特别是卢戈碘液久存或受光作用后易失去媒染作用; 涂片积水过多会改变染液浓度, 影响染色效果, 如脱色用的乙醇以 95% 为宜, 浓度降低会增强其脱色能力。

3) 细菌因素: 细菌的菌龄不同, 革兰染色结果也有差异, 一般以 18~24h 的培养物染色效果最好, 菌龄过长影响细菌染色性。

#### 3. 细菌的基本形态观察(示教)

(1) 球形: 革兰阳性球菌——葡萄球菌: 镜下菌体球形, 呈紫色, 且排列不规则堆积成团如葡萄状; 革兰阴性球菌——脑膜炎奈瑟菌: 镜下菌体球形, 呈红色, 且多成对排列。

(2) 杆形: 革兰阳性杆菌——炭疽芽胞杆菌: 菌体呈紫色, 粗大杆状, 两端截平, 排列呈竹节状; 革兰阴性杆菌——大肠埃希菌: 菌体呈红色细杆状, 排列无规则。

(3) 弧形: 革兰阴性弧菌——霍乱弧菌: 镜下菌体呈红色只有一个弯曲, 呈弧形或逗点状。

## 四、特殊结构染色和观察

### 目的要求

1. 掌握细菌特殊结构的染色方法。
2. 熟悉细菌特殊结构观察的临床意义。

### 器材和试剂

1. 菌种 变形杆菌、炭疽芽胞杆菌、肺炎链球菌。
2. 培养基 1.4% 的软琼脂平板、普通琼脂斜面。
3. 试剂 魏曦鞭毛染色液、芽胞染色液、黑斯(Hiss)荚膜染色液。
4. 其他 小鼠、载玻片、玻片夹、蒸馏水、生理盐水等。

### 步骤和方法

#### 1. 魏曦鞭毛染色法

##### (1) 制片

1) 将变形杆菌在 1.4% 的软琼脂上传两代, 形成迁徙生长现象。

2) 取洁净玻片 1 张, 于玻片一侧滴加蒸馏水 1 滴, 然后取上述迁徙生长边缘的细菌少许, 轻轻点于蒸馏水中, 不要研磨, 以免鞭毛脱落。缓慢倾斜玻片, 使菌顺水流自然扩散, 将玻片置 37℃ 温箱内让其自然干燥, 切勿火焰固定。

(2) 染色方法: 于标本上滴加鞭毛染液, 染色 0.5~1min, 轻轻水洗, 干后镜检。

(3) 结果: 菌体与鞭毛均呈红色, 且菌体着色比鞭毛深。染色时间越长, 鞭毛越粗。

#### 2. 芽胞染色法

(1) 制片: 用炭疽芽胞杆菌斜面培养物涂片, 干燥后经火焰固定。

##### (2) 染色方法

1) 初染: 于制好的涂片上滴加石炭酸复红染液, 用微火加热, 使染液冒蒸气(切勿煮



沸),持续约 5min,加热过程中要随时添加染液,勿让标本干涸,冷却后用水冲洗。

2)脱色:用 95%酒精脱色约 1min,水洗。

3)复染:加碱性美蓝染液染 1min,水洗,干后镜检。

(3)结果:芽胞染成红色,菌体呈蓝色。

### 3. 黑斯(Hiss)荚膜染色法

(1)制片:提前数日于小白鼠腹腔注射肺炎链球菌菌液 0.2ml,小鼠死亡后解剖,取腹腔液印片。印片在空气中自然干燥,无需加热固定。

(2)染色方法

1)滴加结晶紫染液,于火焰上加温染色,使冒蒸气为止,勿水洗。

2)以 20%  $\text{CuSO}_4$  溶液冲洗染液,勿水洗,干后镜检。

(3)结果:菌体呈现紫色,荚膜呈淡紫色。

## 五、细菌 L 型检查

### 目的要求

1. 熟悉细菌 L 型的形态染色和菌落特点。
2. 了解细菌 L 型的诱导方法。

### 器材和试剂

1. 菌种 金黄色葡萄球菌 Cowan I 菌株。
2. 培养基 L 型琼脂平板。
3. 试剂 革兰染色液、细胞壁染色液、Diene 染色液。
4. 其他 新型青霉素 II 药敏纸片(40 $\mu\text{g}$ /片)、 $\text{CO}_2$  培养箱、无菌 L 型玻璃棒、小镊子。

### 步骤和方法

#### 1. 抗生素诱导金黄色葡萄球菌 L 型

(1)原理:细菌在抗生素、溶菌酶、胆盐等作用下,细胞壁的肽聚糖结构受到破坏或合成被抑制,而成为细胞壁缺陷型细菌。革兰阳性菌细胞壁主要成分是肽聚糖,一般多采用青霉素、新型青霉素 II 及先锋霉素等作诱导剂。

(2)方法

1)取 L 型平板 1 块,用无菌滴管滴加金黄色葡萄球菌 Cowan I 6~8h 肉汤培养物 1 滴,用无菌 L 型玻璃棒均匀涂开。

2)用灭菌小镊挟取新型青霉素 II 药敏纸片 1 张贴于涂布金黄色葡萄球菌的 L 型平板上。

3)平板置于 35 $^{\circ}\text{C}$ 、5%~10% $\text{CO}_2$  中培养,逐日于低倍镜下观察抗生素纸片抑菌圈内有无 L 型细菌生长。

2. L 型细菌的菌落观察 一般培养 2~7 天后,抗生素纸片周围的抑菌圈内于低倍镜下可见 L 型菌生长。L 型细菌的菌落有三种:

L 型:菌落中心致密、较厚、透光度差,由细颗粒组成。周边较宽、由透明颗粒组成,呈花边状。

G 型:无上述核心,菌落全由透明粗颗粒组成;