



卫生部“十一五”规划教材

全国高等医药教材建设研究会规划教材

全国高等学校配套教材★供医学检验专业用

临床微生物学与检验 实验指导

第3版



主 编 / 吴爱武



人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

全国高等学校配套教材

供医学检验专业用

临床微生物学与检验 实验指导

第3版

主 编 吴爱武

编 者 (以姓氏笔画为序)

刘文恩 (中南大学湘雅医院)	陈艺林 (蚌埠医学院)
孙自镛 (华中科技大学同济医学院)	郑丛龙 (大连大学医学院)
李向阳 (温州医学院)	徐元宏 (安徽医科大学)
吴爱武 (广州医学院)	陶传敏 (四川大学华西临床医学院)
汪正清 (第三军医大学)	蒋月婷 (广州医学院)
邵世和 (江苏大学医学技术学院)	韩立中 (上海交通大学医学院)
陈 端 (昆明医学院)	褚云卓 (中国医科大学)

人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目(CIP)数据

临床微生物学与检验实验指导/吴爱武主编. —3版.
—北京:人民卫生出版社,2007.8
ISBN 978-7-117-08862-6

I. 临… II. 吴… III. ①病原微生物-微生物学-实验-
医学院校-教学参考资料②病原微生物-医学检验-医学
院校-教学参考资料 IV. R37-33 R446.5

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 094132 号

吴爱武 主 编

吴爱武 主 编

(有关医学文献) 参 考

(医学微生物学) 林艺莉

(医学微生物学) 吴文欣

(医学微生物学) 张丛联

(医学微生物学) 谢自怀

(医学微生物学) 宋元菊

(医学微生物学) 田向平

(医学微生物学) 廖洪刚

(医学微生物学) 吴爱武

(医学微生物学) 郭良群

(医学微生物学) 谢玉珍

(医学微生物学) 中立群

(医学微生物学) 谢世强

(医学微生物学) 卓云群

(医学微生物学) 谢世强

临床微生物学与检验实验指导

第 3 版

主 编: 吴爱武

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 010-67616688)

地 址: 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

邮 编: 100078

网 址: <http://www.pmph.com>

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-67605754 010-65264830

印 刷: 北京市文林印务有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 13.75

字 数: 317 千字

版 次: 1999 年 7 月第 1 版 2007 年 8 月第 3 版第 13 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-08862-6/R·8863

定 价: 19.00 元

版权所有, 侵权必究, 打击盗版举报电话: 010-87613394

(凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换)

前 言

《临床微生物学与检验》是医学检验专业本科生和专科生的主要必修课程之一。由于临床微生物检验近年来发展较快,如医院感染越来越多见、耐药性细菌不断增加、引起临床感染的病原菌的菌群分布发生了改变等等,再版相应的实验指导是非常必要的。根据高等医学院校医学检验专业《临床微生物学与检验》(第4版)专业理论课教学需要,在卫生部教材办公室的组织领导下,我们在第2版《临床微生物学和微生物检验实验指导》的基础上,编写了这本《临床微生物学与检验实验指导》作为理论课配套的实验课教材,供医学检验专业本科和大专师生使用,同时也可作为各级医院检验科工作人员和进修生、实习生的参考用书。本书章节等框架结构基本与第2版相同,也是分为5章30节,根据临床微生物学检验的教学要求,遵循科学性、实用性、启发性和先进性的原则,较为系统和全面地介绍了细菌检验基本技术、临床常见细菌的培养和鉴定、临床常见真菌的培养和鉴定、临床常见病毒的培养和检测以及临床标本的细菌学检验等。为方便读者,本书在附录中列举了常见培养基、试剂、染色液、缓冲液、清洁液、指示剂等配制以及药敏试验时抗生素的选择、药敏质控范围等内容。

教材是为课程服务的,因此我们在编写过程中强调对学生的“三基”训练,让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,掌握临床常见微生物的生物学性状、培养鉴定方法,而且培养学生发现问题、分析问题和解决问题的能力,为今后走上临床工作岗位打下必要的基础。同时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。

本教材是卫生部教材办公室组织编写的全套医学教材之一,在编写过程中得到了各参编单位、第2版主编洪秀华教授、广州医学院领导和教务处的大力支持和关心,在此一并表示衷心的感谢。虽然编写者已尽心努力地完成编写任务,但限于我们的学术水平和编写能力,本版教材的内容和安排上肯定有不少欠缺和疏漏,恳请广大师生指正。

吴爱武

2007年3月

目 录

临床微生物学与检验教学实验室规则与应急处理措施	1
一、临床微生物学与检验教学实验室规则	1
二、实验室意外应急处理措施	2
第一章 细菌检验的基本技术和方法	4
第一节 细菌形态学检查	4
一、常用显微镜使用	4
二、不染色标本检查	6
三、细菌涂片制作、革兰染色和细菌基本形态观察	7
四、细菌的特殊染色技术和观察	10
第二节 医院感染的微生物监测	12
一、消毒灭菌效果的监测	12
二、中心静脉导管的细菌监测 (Maki 半定量法)	14
第三节 细菌分离培养技术	14
一、培养基制备技术	14
二、培养方法	17
三、分离培养和接种技术	19
四、细菌计数	22
五、细菌生长现象观察	25
六、细菌菌种保存	25
第四节 细菌鉴定技术	28
一、生物化学鉴定	28
二、数字编码鉴定	33
三、血清学鉴定	34
四、临床常见细菌的鉴定流程	36
五、动物实验与细菌毒素检测	38
第五节 抗菌药物敏感性试验与细菌耐药性检测	42
一、纸片扩散法	42
二、稀释法	45
三、E 试验	48

目 录

四、联合药敏试验	49
五、特殊耐药菌及耐药酶的表型检测	49
第二章 临床常见细菌的培养和鉴定	55
第一节 球菌	55
一、葡萄球菌属	55
二、链球菌属	59
三、肠球菌属	63
四、奈瑟菌属和布兰汉菌属	64
第二节 肠杆菌科细菌	66
一、肠杆菌科及科内菌属的鉴别	66
二、埃希菌属	67
三、沙门菌属和志贺菌属	69
四、枸橼酸杆菌属	72
五、克雷伯菌属、肠杆菌属和沙雷菌属	73
六、变形杆菌属和摩根菌属	75
七、小肠结肠炎耶尔森菌	76
第三节 不发酵菌和其他革兰阴性杆菌	76
一、假单胞菌属	76
二、窄食单胞菌属	77
三、产碱杆菌属	78
四、不动杆菌属	79
五、莫拉菌属	80
六、嗜血杆菌属	81
第四节 弧菌属、弯曲菌属和螺杆菌属	82
一、弧菌属	82
二、空肠弯曲菌	84
三、幽门螺杆菌	85
第五节 需氧革兰阳性杆菌	86
一、需氧芽胞杆菌属	86
二、产单核李斯特菌	90
三、阴道加德纳菌	91
四、棒状杆菌属	91
第六节 分枝杆菌属、放线菌属和诺卡菌属	94
一、结核分枝杆菌	94
二、麻风分枝杆菌	96
三、放线菌属	97
四、诺卡菌属	97
第七节 厌氧菌	97

一、厌氧芽胞梭菌	97
二、无芽胞厌氧菌	101
第八节 螺旋体	105
一、染色和形态观察	105
二、问号钩端螺旋体培养技术和显微镜凝集试验	106
三、梅毒螺旋体血清学试验	108
第九节 支原体、衣原体和立克次体	110
一、支原体和脲原体	110
二、衣原体	112
三、立克次体	114
第三章 临床常见真菌的培养和鉴定	116
第一节 真菌检验基本技术	116
一、真菌染色技术和形态结构观察	116
二、真菌分离培养和鉴定	117
第二节 临床常见浅部真菌培养和鉴定	119
一、毛癣菌属	119
二、小孢子菌属	120
三、表皮癣菌属	120
第三节 临床常见深部真菌培养和鉴定	121
一、假丝酵母菌属	121
二、隐球菌属	122
三、曲霉菌属	123
四、卡氏肺孢菌	123
五、马尔尼菲青霉菌	124
六、镰刀菌	124
第四章 临床常见病毒的培养和检测	126
第一节 病毒的培养	126
一、鸡胚接种	126
二、组织细胞培养	129
三、动物培养	131
第二节 呼吸道病毒	132
一、流行性感冒病毒	132
二、呼吸道合胞病毒抗原的检测	135
第三节 肝炎病毒	135
一、乙型肝炎病毒	135
二、丙型肝炎病毒	136
第四节 疱疹病毒	137

目 录

一、单纯疱疹病毒	137
二、巨细胞病毒	138
三、EB 病毒	139
第五节 其他病毒	140
一、轮状病毒	140
二、人类免疫缺陷病毒	141
第五章 临床标本的细菌学检验	146
第一节 血液及骨髓标本的细菌学检验	146
第二节 尿液标本的细菌学检验	150
第三节 生殖道标本的细菌学检验	153
第四节 粪便标本的细菌学检验	155
第五节 呼吸道标本的细菌学检验	160
第六节 脑脊液标本的细菌学检验	165
第七节 脓液及穿刺液的细菌学检验	167
第八节 组织标本的细菌学检验	170
附录 1 培养基	172
附录 2 试剂和染色液	189
附录 3 其他	193

临床微生物学与检验教学实验室 规则与应急处理措施

一、临床微生物学与检验教学实验室规则

临床微生物学与检验教学实验室是一个病原微生物高度集中的场所，其实验对象大都是病原微生物，具有传染性。为了防止病原微生物感染自身、污染环境以及扩散传播，要求同学们进入实验室必须严格遵守以下规则：

1. 进入实验室必须先穿实验服，必要的实验指导、书籍和文具等带入后，应放在指定的非操作区，其他个人物品一律不得带入实验室；在实验室，应穿舒适、防滑、防渗不露脚趾的鞋；实验室内应保持安静，不得高声谈话、打闹嘻笑或随意走动。
2. 实验室内禁止饮食、吸烟、处理隐形眼镜、随意以手抚摸头面部等行为，不可把任何东西放入嘴中，操作时不得佩戴戒指、手镯、腕表等，长发必须束在脑后。
3. 每项微生物学实验，都要坚持无菌操作，这样既防止临床标本及纯培养物被污染，又防止临床标本或纯培养中的病原微生物感染人体或污染环境；使用接种环刮琼脂平板、吸带菌液体、制作细菌涂片、打开培养物等操作都有可能产生气溶胶，操作者有吸入病原体的危险，因此所有的操作应降低气溶胶或泡沫的生成，无菌操作时禁止开风扇。感染性材料的离心操作应使用安全的离心杯或密封的离心机转子，在生物安全柜中开启、装载或关闭感染性材料；禁止用嘴吸取液体，除了注射药物或从动物体内抽吸液体以外，不应使用注射器，因为使用注射器等锐器有可能致表皮破损，使病原微生物通过皮肤粘膜引起感染。
4. 用过的吸管、滴管、试管、玻片等带菌器材，应放在指定的地方或含消毒液的容器内，禁止放在桌面上或水池内，禁止将带菌液体倾入水槽；禁止酒精灯互相点

燃,以防发生意外。

5. 若发生割破手指,菌液进入口、眼,或遇带菌材料破损、污染环境和物品等事故时,应立即报告老师,及时进行预防处理。

6. 不可擅自搬动示教、实验器材或室内设施;节约使用实验材料,爱护公物,如有损坏,应立即向指导教师报告,并主动登记。

7. 实验完毕,应清理桌面,把用过的物品放回原处(如显微镜、接种环、染色液、擦镜纸、香柏油、火柴等),需培养的物品做好标记后按要求放入培养箱。

8. 离开实验室前,应脱下实验服,反折放入专用容器内,在消毒液中将手浸泡5~10分钟,并用自来水冲洗干净,关好水、电、门、窗后方可离室;禁止在实验室以外的场所(教室、图书馆、宿舍、厕所等)穿曾在微生物实验室穿过的实验服;穿过的实验服应定期清洗消毒,被污染的实验服应立即更换,先消毒灭菌后再洗涤;实验服不应与生活服装放在一起。

9. 未经许可,不得将实验室内任何物品(特别是菌种)带出室外。

二、实验室意外应急处理措施

1. 皮肤刺伤、切割伤或擦伤:受伤人员应当脱下实验服,清洗双手,尽可能挤出损伤处的血液,除尽异物,用肥皂和清水冲洗伤口或沾污的皮肤;如果黏膜破损,应用生理盐水(或清水)反复冲洗。伤口应使用适当的皮肤消毒剂(如70%酒精、0.2%次氯酸钠、0.2%~0.5%过氧乙酸、0.5%碘伏等)浸泡或涂抹消毒,必要时进行医学处理。

2. 化学药品腐蚀伤:若为强酸,先用大量清水冲洗,再以5%碳酸氢钠或5%氢氧化铵溶液中和之;强碱腐蚀则先以大量清水冲洗后,再以5%醋酸或5%硼酸洗涤中和。

3. 眼睛溅入液体:立即用生理盐水连续冲洗至少10分钟,避免揉擦眼睛,然后再进行相应的医学处理。

4. 衣物污染:①尽快脱掉实验服以防止感染物污染皮肤及进一步扩散,然后洗手并更换实验服。②将已污染的实验服进行高压蒸汽灭菌。③清理发生污染的地方及放置实验服的地方。④如果个人衣物被污染,应立即将污染处浸入消毒剂,并更换干净的衣物或一次性衣物。

5. 吸入病原菌菌液:立即将口腔中的菌液吐入容器内消毒,并用大量清水漱口;然后根据菌种不同,服用抗菌药物予以预防(在医生的指导下进行)。

6. 菌液流洒桌面:应倾倒适量消毒液于污染面,让其浸泡半小时后抹去;若手上沾有活菌,亦应浸泡于上述消毒液10分钟后,再以肥皂及水清洗干净。

7. 容器破碎及感染性物质的溢出:破碎的容器和被溅的地方用经消毒剂浸泡的吸水物质(布、纸等)覆盖,消毒剂起作用10~15分钟后,以可行的方法移走吸水性物质和破碎的容器(玻璃碎片应用镊子清理),这些吸水性物质和破碎的容器应当放在盛放污染性废弃物的容器内,高压灭菌或用有效的消毒剂浸泡;然后再用消毒剂冲洗清理该污染的地方。在所有这些操作过程中都应戴手套。

8. 实验书籍、表格或其他打印或手写材料被污染:应将这些信息复制,并将原

件置于盛放污染性废弃物的容器内，高压灭菌处理。

9. 在生物安全柜以外发生有潜在危害性的气溶胶释放：所有人员必须立即撤离相关区域，并通知实验室负责人，任何暴露人员都应接受医学咨询。为了使气溶胶排出和较大的粒子沉降，在一定时间内（如 1h 内）严禁人员入内。如果实验室没有中央通风系统，则应推迟进入实验室（如 24h）。应在实验室门上张贴“禁止进入”的标志。过了相应时间后，在相关人员的指导下清除污染。

10. 严防火灾：如发生火灾应沉着处理，切勿慌张。立即关闭电源，如系酒精、二甲苯、乙醚等起火，切忌用水，应迅速用沾水的布类和沙土覆盖扑火。

11. 感染的实验动物逃跑：应立即抓回，并对污染区进行处理。

(吴爱武)

临床微生物学与检验教学实验室规则与应急处理措施

临床微生物学与检验教学实验室规则与应急处理措施

临床微生物学与检验教学实验室规则与应急处理措施

临床微生物学与检验教学实验室规则与应急处理措施

临床微生物学与检验教学实验室规则与应急处理措施

临床微生物学与检验教学实验室规则与应急处理措施

临床微生物学与检验教学实验室规则与应急处理措施

临床微生物学与检验教学实验室规则与应急处理措施

临床微生物学与检验教学实验室规则与应急处理措施

临床微生物学与检验教学实验室规则与应急处理措施

临床微生物学与检验教学实验室规则与应急处理措施

临床微生物学与检验教学实验室规则与应急处理措施

临床微生物学与检验教学实验室规则与应急处理措施

临床微生物学与检验教学实验室规则与应急处理措施

临床微生物学与检验教学实验室规则与应急处理措施

临床微生物学与检验教学实验室规则与应急处理措施

临床微生物学与检验教学实验室规则与应急处理措施

临床微生物学与检验教学实验室规则与应急处理措施

临床微生物学与检验教学实验室规则与应急处理措施

临床微生物学与检验教学实验室规则与应急处理措施

1

第一章

(张雪吴)

细菌检验的基本技术和方法

第一节 细菌形态学检查

一、常用显微镜使用

目的要求

1. 掌握普通光学显微镜油镜的使用和保护。
2. 熟悉普通光学显微镜的结构及各部分的功能。

仪器和方法

1. 普通光学显微镜的基本结构和功能 普通光学显微镜由光学放大系统和机械装置两部分组成，光学系统一般包括目镜、物镜、聚光器、光源等；机械系统一般包括镜筒、物镜转换器、镜台、镜臂、底座等（图 1-1-1）。

标本的放大主要由物镜完成，物镜放大倍数越大，它的焦距越短，物镜的透镜与玻片间的距离（工作距离）也越小。油镜的工作距离很短，使用时需格外注意。目镜只起放大作用，不能提高分辨率，标准目镜的放大倍数是十倍。聚光镜能使光线照射标本后进入物镜，形成一个大角度的锥形光柱，因而对提高物镜的分辨率是很重要的。聚光镜可以上下移动，以调节光的明暗。可变光阑可以调节入射光束的大小。

显微镜的放大效能（分辨率）是由所用光波长短和物镜数值口径决定的，缩短使用的光波波长或增加物镜的数值口径均可提高显微镜的分辨率，由于可见光的光波波长比较窄，所以利用减小光波波长来提高光学显微镜分辨率是有限的，提高物镜数值口径是提高分辨率的理想措施。要增加数值口径，可以通过提高介质的折光率来实现。显微镜的放大倍数是目镜和物镜放大倍数的乘积，物镜的放大倍数越高，分辨率

越高。

2. 普通光学显微镜油镜的使用方法 及注意事项

(1) 普通光学显微镜的接物镜有三种，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×的标记。当接目镜倍数为10×，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。显微镜的光源，用自然光和灯光均可。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），使光线集中于聚光器。目前很多显微镜都带有显微镜灯，常常使用卤素灯作为光源。

(4) 根据所观察的标本，升降聚光器，缩放光圈，以获得最佳光度。当用油镜检查染色标本时，光线宜强，可将聚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，下降聚光器，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，在标本欲检部位滴一滴香柏油，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。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。对于带有自动升降装置的显微镜，也可在载玻片待检部位加一滴香柏油后，直接将油镜镜头下移到香柏油中，到停止下降为止，然后用细调节器向上调准焦点。

(7) 观察标本时应两眼同时睁开，以减少眼睛疲劳。如果是单目显微镜，用左眼窥镜，右眼管书绘。如果是双目显微镜，可调节两个目镜之间的距离直至获得最佳视物效果。

为了提高介质的折光率，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（空气的折光率为1），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

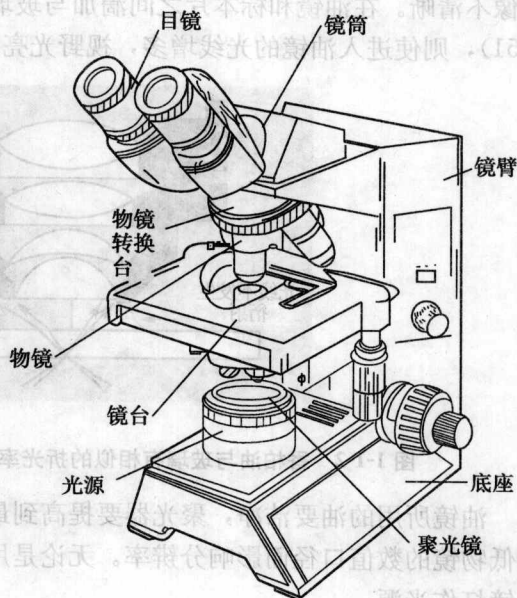


图 1-1-1 普通光学显微镜主要结构

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 ($n=1.51$), 则使进入油镜的光线增多, 视野光亮度增强, 物像清晰 (图 1-1-2)。

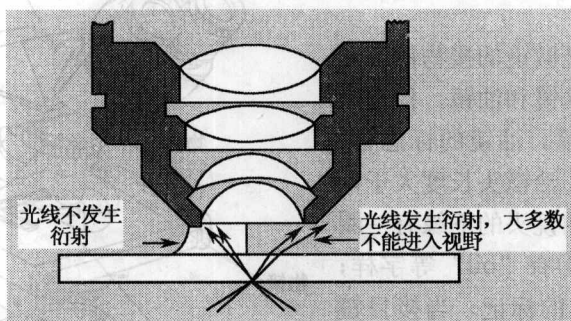


图 1-1-2 香柏油与玻璃有相似的折光率, 可避免光线衍射而不能进入视野

油镜所用的油要洁净, 聚光器要提高到最高点, 并放大聚光镜下的光圈, 否则会降低物镜的数值口径而影响分辨率。无论是用油镜或高倍镜观察, 都宜用可调节的显微镜灯作光源。

3. 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(图 1-1-3)。

(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。

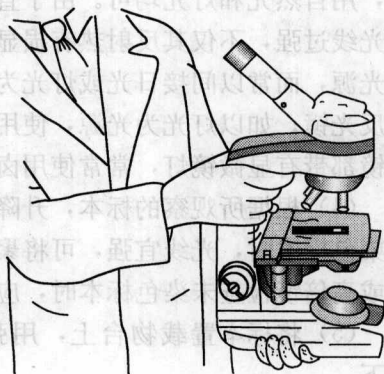


图 1-1-3 显微镜的正确拿法

(4) 镜头必须保持清洁, 只能用软而没有短绒毛的擦镜纸擦拭。擦镜纸要放在纸盒中, 以防沾上灰尘。切勿用手绢或纱布等擦镜头。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, 掌握细菌鞭毛与动力的关系。
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、葡萄球菌幼龄 (6~12h) 肉汤培养物。
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) 取洁净凹玻片一张，在凹窝四周涂凡士林少许。
- (2) 用接种环取一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 1-1-4)。

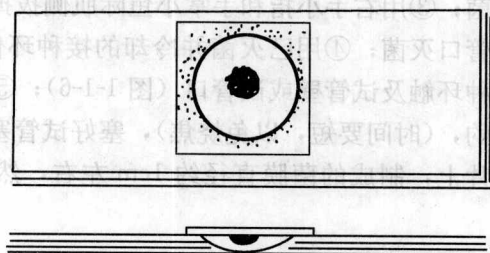


图 1-1-4 悬滴法示意图

(5) 先用低倍镜找到悬滴的边缘，再换高倍镜 (因凹玻片较厚，而油镜焦距很短，一般不能用油镜来检查)。因为是不染色标本，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，再换高倍镜或油镜观察细菌的运动。

观察不染色标本中细菌的运动，除用光学显微镜外，还可利用暗视野显微镜和相差显微镜。

三、细菌涂片制作、革兰染色和细菌基本形态观察

目的要求

1. 掌握细菌涂片制作方法。
2. 掌握革兰染色法和细菌的基本形态。

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、肉汤培养基。

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、接种环、记号笔。

步骤和方法

1. 细菌涂片标本的制作 作细菌染色检查，首先要制备细菌涂片，制备细菌涂片一般包括涂片、干燥、固定三步。

(1) 涂片：取洁净载玻片一张，用玻璃铅笔于玻片上划两个直径 1.5cm 左右的圆圈后，按以下步骤操作。

1) 肉汤培养物涂片：①右手拿接种环的黑色胶柄部分，左手托持试管；②接种环以 15°角置于酒精灯外焰中烧灼灭菌，直到金属丝烧红（图 1-1-5），然后将金属柄也回旋通过火焰烧灼灭菌；③用右手小指和手掌小鱼际肌侧拔掉左手所持试管的试管塞，并立即火焰烧灼试管口灭菌；④用已灭菌并冷却的接种环伸入试管中取出菌液，注意勿使沾有菌液的接种环触及试管壁或试管口（图 1-1-6）；⑤再次灭菌试管口，将试管塞在火焰上略加烧灼，（时间要短，以免烧焦），塞好试管塞，放回原处；⑥将接种环上的菌液涂于载玻片上，制成的菌膜直径约 1cm 左右，然后将接种环火焰烧灼灭菌。



图 1-1-5 接种环的火焰灭菌

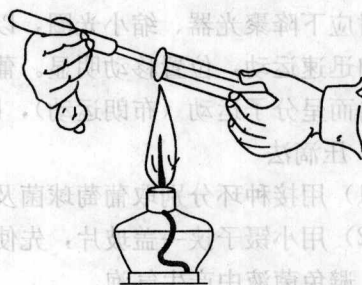


图 1-1-6 细菌培养物的取材

液体标本（如脓液、痰液等）均可照此法涂片。

2) 固体培养物涂片：先用灭菌的接种环取 1~2 环无菌生理盐水涂于载玻片上。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 1cm² 左右为宜。每次取菌前后注意将接种环灭菌。如果是多个标本同时进行同样的染色，可用蜡笔在玻片上画出数格，做好标记再分别进行涂片，以免混淆。

(2) 干燥：涂片最好在室温下自然干燥，或将标本面向上，置于酒精灯火焰半尺高处慢慢烘干，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, 染色时不致于被染液和水冲掉, 同时固定可凝固细胞质, 改变细菌对染料的通透性。

(4) 注意事项: 用火焰烧灼沾有菌液的接种环时, 为防止菌液受热溅散污染环境, 接种环灭菌前, 须先将接种环靠近火焰或放内焰中烤干, 然后再在外焰中烧红灭菌, 杀死残留的细菌。

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 ($pI 2 \sim 3$), 革兰阴性菌等电点较高 ($pI 4 \sim 5$), 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, 呈散在的排列。

(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, 呈紫蓝色, 且排列不规则堆积成团如葡萄状;

革兰阴性球菌——淋病奈瑟菌: 镜下菌体球形, 呈红色, 且多成对排列。