

# 微生物学检验实训指导

黑龙江护理高等专科学校

## 《微生物学检验实训指导》编委会

主 编 关静岩

主 审 曹德明

编 委（以姓氏笔画为序）

白景纯（黑龙江护理高等专科学校检验系）

丛瑞华（黑龙江护理高等专科学校检验系）

刘凤仙（黑龙江护理高等专科学校检验系）

李晓华（黑龙江护理高等专科学校检验系）

齐桂云（哈尔滨医科大学附属第二医院检验科）

关静岩（黑龙江护理高等专科学校检验系）

沈丽明（黑龙江护理高等专科学校检验系）

赵秀梅（黑龙江护理高等专科学校检验系）

徐丽丹（黑龙江护理高等专科学校检验系）

黄庆荣（黑龙江护理高等专科学校检验系）

袁 峰（黑龙江省电力医院检验科）

# 前 言

《微生物学检验》是医学检验专业的一门专业核心课程，其岗位要求学生既要掌握基本理论知识，有够用的理论支撑，又需要学生有较强的实践能力，能独立完成基本的微生物检验工作。但从医院对实习学生反馈的结果显示，学生虽然掌握了一定的理论知识和技能，但不能将其与临床岗位有效地结合。为了能在有限的教学时间内使学生高效地掌握本门课的精髓，真正实现毕业就业岗位零距离，我们开展了一系列教学改革工作，进行了“教学做一体化”的教学模式的实践，力争将《微生物学检验》打造成精品课程。

为了更好地配合“教学做一体化”教学，我们课程团队专任教师与医学检验行业专家合作，共同编写了《微生物学检验实训指导》校本特色教材。在课程设计上，根据微生物检验岗位的能力需求和任职要求，着重培养学生对临床常见标本进行微生物的分离培养与鉴定，以及药物敏感试验等专业核心技能。教材依据临床微生物学检验岗位实际工作过程，按照六大学习任务 21 个学习项目进行编写，在教材内容的选取上以培养学生职业能力为目标，贴近岗位实际和行业标准，适当反映微生物学检验的新知识、新技术。在教材内容的编排顺序上以能力培养为主线，强化职业技能的训练，学习项目涵盖了临床微生物学检验岗位所需的知识、能力及素质等要求，同时为学生可持续发展奠定良好的基础。

为了便于学生学习，教师指导，本书以附录形式编写了常用培养基的配制及用途、细菌常见的生化反应试验、“一口清、一手精”项目标准和常用指示剂的变色范围和配制四项内容。

同时，为了使学生更好地掌握各学习项目的重点，化解难点，为临床医学检验技术资格考试奠定基础，本书在各学习项目后编写了与职考相同题型的职考测试题，并附有答案。

限于我们的水平和能力，书中难免有不妥之处，恳请同行和读者提出宝贵意见，以便使之日臻完善。

关静岩

2015. 2. 26

# 目 录

微生物学检验工作须知.....	1
临床标本的采集、送检及处理原则.....	3
任务一 细菌分布的检测与控制.....	6
【项目 1】 培养基制备.....	6
【项目 2】 空气、人和物体表面细菌的检测.....	9
【项目 3】 细菌形态学检查-革兰染色法.....	14
【项目 4】 细菌接种与培养.....	18
【项目 5】 细菌生物化学试验.....	23
【项目 6】 细菌控制技术.....	26
任务二 病原性球菌的常规检验.....	32
【项目 1】 脓汁标本中葡萄球菌的分离培养与鉴定.....	32
【项目 2】 葡萄球菌的药物敏感试验.....	35
【项目 3】 咽拭子中链球菌的分离培养与鉴定.....	39
任务三 肠杆菌科的常规检验.....	42
【项目 1】 粪便标本的分离培养与鉴定.....	42
【项目 2】 血清学鉴定.....	47
【项目 3】 肥达反应.....	49
【项目 4】 大肠埃希菌的药物敏感试验.....	49
任务四 铜绿假单胞菌的常规检验.....	52
【项目 1】 鞭毛染色法.....	52
【项目 2】 铜绿假单胞菌的鉴定.....	53

【项目 3】	铜绿假单胞菌的药物敏感试验.....	54
任务五	结核分枝杆菌的常规检验.....	56
【项目 1】	痰标本结核分枝杆菌的检查-抗酸染色法.....	56
【项目 2】	痰标本结核分枝杆菌的分离培养.....	57
任务六	病原性真菌的常规检验.....	61
【项目 1】	皮肤癣菌的鉴定.....	61
【项目 2】	白假丝酵母菌的鉴定.....	62
【项目 3】	新型隐球菌的鉴定.....	64
附录 1	常用培养基的配制及用途.....	67
附录 2	细菌常见的生化反应试验.....	80
附录 3	“一口清、一手精”项目标准.....	92
附录 4	常用指示剂的变色范围及配制.....	96

## 微生物学检验工作须知

微生物学检验工作者应熟知并严格遵守微生物学检验规则，此为防止自身感染，保证检验结果准确性的首要前提。临床细菌室和无菌室是微生物学检验的实验场所，与其他实验室相比，有其特殊性，了解其注意事项至关重要。

### 【微生物学检验工作者的基本条件】

1. 细菌检验人员应具有严谨、一丝不苟的科学作风和高度负责的工作态度。
2. 熟悉并遵守细菌学检验规则。
3. 主管细菌鉴定和签发报告者应由熟悉和掌握微生物学检验全面知识的、具有医学检验医（技）师以上专业技术职称的医学检验工作者担任。
4. 细菌室的一般工作者应熟知细菌传染及自身防护、消毒、灭菌等基础微生物学知识。
5. 定期或不定期与临床医师取得联系，了解病情及治疗情况，使细菌学检验与临床诊治密切配合。
6. 细菌检验工作者应身体健康，凡抵抗力低下者不应从事微生物学检验工作。

### 【微生物学检验工作守则】

医学微生物学检验工作的对象多为病原微生物，同时在制备培养基及微生物鉴定工作中又经常使用电器和易燃物品等，因此防止实验室内感染、火灾、烧伤和触电等意外事故显得十分重要。

1. 实验前必须了解实验相关的生物安全要求，按《全国临床检验操作规程》进行规范操作。

2. 未经批准，无关人员不得擅自进入实验室工作区。BSL-2 实验室门上应有国际通用的生物危害警示标志、负责人以及进入实验室的特殊要求等。

3. 凡接触微生物（尤其是致病性强的病原微生物）的实验活动，应谨慎进行，确保自身和环境安全，实验后应用消毒剂消毒手和台面。

4. 在实验室工作时，必须穿着合适的工作服或防护服。在无菌室操作时，必须穿戴经消毒过



的工作帽、口罩，以免污染。在进行可能接触到具有潜在感染性的材料或感染性动物的操作时，应戴上合适的防护设备和手套。手套用完后，应先消毒再摘去，随后必须洗手。

5. 禁止把水、食物、食具带进实验室工作区域。严禁穿着实验室防护服离开实验室工作区域。只有保证在实验室内没有受到污染的文件纸张才能带出实验室。

6. 严禁用口吸、或反复吹吸移液管内液体，最好用一次性的无菌塑料吸管。不能向含有感染性物质的溶液中吹入气体。严禁将实验材料置于口内或舔标签。

7. 实验室应保持清洁整齐，并定期进行微生物实验室空气、实验台面消毒处理。定期对实验室设施、设备、材料进行检查，以确保符合国家有关标准。定期检查生物安全防控、菌（毒）种和标本的保存与使用、安全操作、实验室排放的废气、废水及其他废物处置等制度的落实情况。

8. 所有的实验操作要按尽量减少气溶胶和微小液滴形成的方式来进行。

9. 实验室内应保持肃静，尽量减少室内活动，以免引起风动，无关人员禁入。工作人员不得高声谈话、不准吸烟、吃东西或用嘴吮吸铅笔及标签等，也不要以手抚摸头面部，以免感染。

10. 接种环用完后应立即于酒精灯火焰上烧灼灭菌。染菌的吸管、载玻片等用后应分别浸泡在盛有消毒液的筒或缸内，其他已污染的试管、器皿等也必须置于专用盛器内，经灭菌后再行洗涤。

11. 在实验过程中，切忌使乙醇、乙醚、丙酮等易燃试剂接近酒精灯，如遇火险，用湿布阻燃灭火，必要时使用灭火器。

12. 若出现着火情况，应沉着处理，切勿慌张，立即关闭电闸、煤气阀门，以湿布或砂土将其掩盖。

13. 烤箱、电炉和酒精灯等用后应立即切断电源或熄灭。工作结束时注意关好实验室门窗，检查温箱、冰箱等温度是否适宜或箱门是否关闭，自来水龙头是否拧紧，操作台用浸有消毒液之抹布擦拭干净。并将试剂、用具等放回原处，摆放整齐。

14. 工作人员应将双手用消毒液、肥皂与清水刷洗干净方可离室。

## 临床标本的采集、送检及处理原则

标本采集是保证微生物检验结果准确的首要条件，因此，标本采集的质量至关重要。为避免假阳性、假阴性结果的出现，应规范标本采集、送检、保存各环节，以确保检验结果的可靠。

### 【临床标本的采集】

人体的体表以及与外界相通的腔道如口腔、肠道等存在正常菌群，故采集和分离标本时，应了解标本的来源，区别标本中是正常菌群污染还是致病菌，有助于对病原菌的正确判断。如痰标本，由于咳出时经过口咽部，而口咽部又存在大量的正常菌群，标本必然混杂有正常菌群，故分离致病菌时要注意与正常菌群加以区别。另外，机体的某些部位是无菌的，如检测到细菌，可视为致病菌，如血液、脑脊液、骨髓等标本要求在采集过程中，按照操作规程采集，避免标本被其他细菌，特别是条件致病菌污染，必要时重复取样。

1. 细菌学检验单 认真检查检验单上的患者姓名、性别、年龄、临床诊断或症状、标本类型、来源、送检目的以及是否使用抗生素等内容。

2. 标本容器 标本要使用无菌容器盛装、送检。容器灭菌应采用干热、湿热、紫外线等物理方法。尽量避免纸质或其它吸水性较强的容器。容器上应贴上标签，注明患者姓名、床号。

3. 采集时间和部位 应尽量在病程早期、急性期或症状典型时和在使用抗生素之前采集标本，如病人使用过有关药物，采集标本时应作相应处理，以免影响培养结果。另外，应根据不同病症，选择适当的部位采集标本。有些检验项目需在疾病早、晚期采集血清。同时，应注意标本采集的量，以满足检验项目的需要。

4. 无菌操作 在采集血液、脑脊液、穿刺液、骨髓时，应严格注意无菌操作，避免杂菌污染标本以及对环境的污染。某些临床标本，如粪便、痰液、咽拭子、肛拭子标本等，在采集时要尽量避免污染。

### 【临床标本的送检】

标本采集后应立即送检，并将检验单随同标本送到实验室。如不能及时送检，可将标本放入运送培养基或保存液中。

1. 标本采集后，一般在不超过 1h 内送交临床细菌室，延迟送检影响病原菌检出。
2. 常规性细菌培养标本在 4℃ 条件下保存不能超过 24h，否则会影响病原菌的检出率。
3. 厌氧菌培养的标本，运送时间与原始标本的量有关，标本量少应加快运送，在 15～



30min 内送达。不能及时送检的组织标本必须保存在厌氧环境条件下，25℃，可以保存 20～24h。厌氧性标本应放在专门的运送瓶或试管内运送，有时可直接用抽取标本的注射器运送或床旁接种。

4. 如疑似对低温敏感的淋病奈瑟菌、脑膜炎奈瑟菌、流感嗜血杆菌感染标本应立即处理。标本不宜冷藏。

5. 任何临床标本，包括拭子、体屑、体液或组织块等，因可能含有被分离的致病菌，都是潜在性的生物危险材料。送检时，严格执行有关病原微生物标本运送规定，标本切勿污染容器的瓶口和外壁，容器必须包装好，防止送检过程中倒翻或碰破流出。标本应标记清楚，注意包装完整和运输中保护，指定专人运送，并提供运输用具。对于高致病性传染病标本运送时，应按照生物安全有关规定包装，由专人运送。

6. 了解标本的来源及临床信息，以保证有目的地检出病原菌，因此，送检至细菌室的标本必须同时有一完整、清楚的应用单，包括标本来源、是否用过抗生素和采集时间、部位和方法等，否则临床细菌室可予以退回标本。

### 【临床标本的处理】

检验人员收到细菌标本后，应立即作适当的处理。如有所拖延，将影响随后病原菌的分离与鉴定。

如果细菌标本用运送培养基或无菌容器送达，检验人员应先检查标本是否符合要求。如不符合要求，应先查明标本收集不当的原因，才能丢弃。

原则上，标本应立即接种于合适的培养基（培养基的温度应达到室温，因有些病原菌对温度非常敏感），然后置于适宜的环境培养。在处理时，检验人员应以标本的情况决定优先顺序。应立即接种的标本，包括作脑膜炎病原菌分离用的脑脊液标本、厌氧培养及体液标本、胃洗液、肺的活体组织检查标本、肺的分泌液、未直接接种的血液标本、骨髓标本及化脓性真菌感染标本。有些标本如浅表性伤口标本（不作厌氧培养）、咽喉、直肠拭子、粪便或痰等标本可在冰箱放置 2～3h 而不会导致病原菌死亡。

个别标本处理方式说明如下：

1. 组织 用无菌刀片将组织切碎，然后在无菌研钵中磨细，可加生理盐水制成 10%～20% 悬浮液，再进行接种。

2. 体液 脑脊液、胸腔液、腹腔液、关节液，先接种到适宜的培养基上，或先 3000r/min 离心 10min 后，再进行接种。

3. 棉拭子 棉拭子收集的标本，通常置于运送培养基送至检验室，取出时要避免污染，

先接种适当平板及液体培养基。如果必要，再作革兰染色，涂片操作后标本会受到污染，不可再用于接种。

4. 粪便 肉眼检查标本是否带脓、血及粘液，再以接种环挑取这些部分接种。

5. 痰 常规培养时肉眼检查标本是否有血液、脓液或含有颗粒，应选取异常部分接种。

6. 厌氧菌培养标本 判断标本的检验项目、运送方式是否适合厌氧菌的分离培养，尽早接种合适培养基，并置于厌氧环境培养。

7. 血液 在采集后应立即加至血液增菌培养基中。

## 职考测试题

### A 型题

1. 标本采集的一般原则，不包括

- A.早期采集                      B.无菌采集                      C.尽量在应用抗生素之前采集  
D.采集适量标本                E.每天清晨采集

2. 不能及时送检的标本，一般应保存的温度

- A.25℃                      B.20℃                      C.18℃                      D.10℃                      E.4℃

3. 一般情况下，用于细菌培养的标本在 4℃ 保存时间不超过

- A.24 小时                      B.48 小时                      C.72 小时                      D.12 小时                      E.2 小时

4. 在标本送检过程中应注意保温，接种时培养基最好先预温的细菌是

- A.葡萄球菌                      B.乙型溶血性链球菌                      C.肠球菌  
D.脑膜炎双球菌                E.肺炎链球菌

5. 需立即接种的标本不包括

- A.脑脊液标本                      B.厌氧培养标本                      C.体液标本  
D.咽拭子标本                      E.化脓性真菌感染标本

### 参考答案

1.E 2.E 3.A 4.D 5.D

## 任务一 细菌分布的检测与控制

### 【项目 1】 培养基制备

#### （一）材料准备

1. 试剂 蛋白胨、牛肉膏、氯化钠、蒸馏水、琼脂等。
2. 玻璃器材 三角瓶、烧杯、试管、玻棒、量筒、培养皿、吸管等。
3. 其他 天平、滤纸、纱布、棉塞、pH 试纸、酒精灯、电炉、高压蒸汽灭菌器等。

#### （二）内容及方法

##### 1. 培养基的成分及作用

###### （1）营养物质

1) 蛋白胨：是动植物蛋白经酶或酸碱分解而成的分子片段混合物。是培养基中的主要氮源，同时具有缓冲作用。其特点是高温不凝固、遇酸不沉淀、易潮解。

2) 牛肉膏：其营养价值低于肉浸液，但因无糖可用作肠道鉴别培养基的基础成分。

3) 糖与醇类：为细菌生长提供碳源和能量，也可用于鉴别细菌。制备培养基常用的糖有葡萄糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、甘露醇等。糖类物质不耐热，宜用  $68.95\text{kPa}/\text{cm}^2$  压力灭菌。

4) 血液：血液中不但含有蛋白质、氨基酸、糖类及无机盐等营养物质，还能提供细菌生长所需的辅酶（如 V 因子）、血红素（X 因子）等特殊生长因子。培养基中加入血液，适用于营养要求较高细菌的培养。含血液的培养基还可检测细菌的溶血特性。

5) 无机盐类：提供细菌生长所需要的化学元素。常用的无机盐有氯化钠和磷酸盐等。氯化钠可维持细菌酶的活性及调节菌体内渗透压，磷酸盐是细菌生长良好的磷源，并且在培养基中起缓冲作用。

（2）水：水是细菌代谢过程中重要的物质，许多营养物质必须溶于水才能被细菌吸收。制备培养基常用不含杂质的蒸馏水或离子交换水。

（3）凝固物质：最常用的凝固物质为琼脂。琼脂是从石花菜中提取的一种胶体物质，其成分主要为多糖（硫酸酚酯半乳糖）。该物质在  $98^\circ\text{C}$  以上时可溶于水， $45^\circ\text{C}$  以下时则凝固成凝胶状态，且无营养作用，不被细菌分解利用，是一种理想的固体培养基赋形剂。

（4）指示剂：在培养基中加入指示剂，可观察细菌是否利用或分解培养基中的糖、醇类物质。常用的有酚红、溴甲酚紫、溴麝香草酚蓝、中性红、中国蓝等酸碱指示剂及亚甲基蓝等氧化还原指示剂（见附件 4）。

(5) 抑制剂：某种化学物质具有抑制非目的菌生长而利于目的菌生长的作用，此类物质称抑制剂。抑制剂必须具有选择性抑制作用，在制备培养基时，根据不同的目的选择不同的抑制剂。常用的有胆盐、煌绿、玫瑰红酸、亚硫酸钠、抗生素等。

## 2. 培养基的种类

(1) 根据物理性状，把培养基分为三类：

1) 液体培养基：不含凝固物质（琼脂）。常用于增菌培养或纯培养后观察细菌生长现象。

2) 半固体培养基：含 0.2%~0.5% 的琼脂。常用于保存菌种及观察细菌的动力。

3) 固体培养基：含 2%~3% 的琼脂。常用于细菌的分离纯化、鉴定及药敏试验等，注入试管中则可制成斜面而用于菌种的保存。

(2) 按用途可分为：

1) 基础培养基：含有细菌生长所需的基本营养成分，如肉浸液，普通琼脂平板等。

2) 营养培养基：在基础培养基中加入血液、血清、生长因子、葡萄糖等特殊成分，即制成营养培养基，如血琼脂平板、巧克力色血琼脂平板等。

3) 鉴别培养基：在培养基中，加入糖（醇）类、蛋白质等底物及指示剂，用以观察细菌的生化反应，从而鉴定和鉴别细菌。如糖发酵培养基等。

4) 选择培养基：在基础培养基中加入抑制剂，抑制非目的菌生长，选择性促进目的菌生长。如 SS 琼脂等。

5) 特殊培养基：特殊培养基包括厌氧培养基和 L 型细菌培养基。

## 3. 培养基制备的基本流程

培养基种类虽多，但各种培养基配制的方法和流程基本相似，即包括调配、溶化、调节 pH、过滤、分装、灭菌、检定及保存等步骤。

(1) 调配 按培养基的配方准确称取各种原料于适当容器中，某些物质如指示剂、琼脂等应在 pH 调节适宜后加入。

(2) 溶化 加入适量蒸馏水，加热溶解。待原料溶解完全后，需补足蒸发掉的水分。溶化时火力不宜太大，同时要时常搅拌，以防培养基结焦，溶化琼脂时要注意防止外溢。

(3) 调节 pH 用酸度计或 pH 试纸测试培养基的酸碱度，根据培养物对 pH 的要求，用 NaOH 或 HCl 溶液调节至适宜的 pH。含琼脂的培养基，应先调 pH 后再加入，以免琼脂凝固影响 pH 调节。一般培养基调节至 pH7.4~7.6，也有个别微生物需酸性或碱性的培养基。由于培养基经高压灭菌后，pH 会降低约 0.1~0.2，故在调节 pH 时应比实际需要的 pH 高 0.1~0.2。

(4) 过滤 培养基中往往含有杂质或沉淀,需过滤澄清后方可使用。液体培养基直接用滤纸过滤;半固体或固体培养基可用两层纱布夹薄层脱脂棉趁热过滤。若培养基量较大,可采用自然沉淀法。

(5) 分装 根据需要将过滤后的培养基分装于适当的容器中。若是制作液体、半固体或斜面培养基,则分装于试管中;若是制作平板培养基,则装于锥形瓶中。分装量不得超过容器容量的 2/3。分装完毕后,须用硅胶塞或棉塞堵住管口或瓶口,再用牛皮纸包扎,用标记笔标记培养基名称及配制日期,以备灭菌。

(6) 灭菌 根据培养基的成分、化学性质等选用适当的方法进行灭菌,以保证灭菌效果的同时又不破坏培养基中的营养成分。普通基础培养基一般用高压蒸气灭菌(103.4kpa/cm<sup>2</sup>) 15~30min。含糖、明胶培养基,则以 68.45kpa/cm<sup>2</sup> 的压力灭菌 15min 为宜。培养基中如含有血清、牛乳、鸡蛋等不耐高温高压的物质则选用间歇蒸气灭菌法灭菌。灭菌后,应检查培养基有无异样,如瓶身破损、水分浸入、棉塞松动等,均应挑出弃之。

(7) 检定 培养基制备后是否符合要求,需要进行质量检查。检查内容包括无菌试验和效果检测。无菌试验是将制备好的培养基置于 35℃ 环境培养 18~24h,若无菌生长说明被检培养基无菌。效果检测则用标准菌株接种在被检培养基上,观察细菌在该培养基上生长的菌落、形态等是否典型。

(8) 保存 将制备好的培养基置于 4℃ 冰箱保存,要注意防止培养基干涸、变质和污染。当再次取用时,要注意查看培养基有无异样改变,质量检查合格后方可使用。

(三) 常用培养基配制(见附录 1)。

## 职考测试题

### A 型题

1. 与细菌营养无关的成分是

A. 蛋白胨      B. 牛肉膏      C. 氯化钠      D. 水      E. 琼脂

2. 常用于观察细菌动力的培养基中琼脂的含量是

A. 0.2%~0.5%      B. 2%~5%      C. 2%~3%      D. 20%~50%      E. 不含琼脂

3. 琼脂在培养基中的作用是

A. 提供碳源      B. 提供氮源      C. 提供能量      D. 是赋形剂      E. 缓冲作用

4. 牛肉膏常用作肠道鉴别培养基的基础成分的原因是

A. 不含碳源      B. 不含氮源      C. 不含糖      D. 不含水      E. 不含盐

5. 在基础培养基中加入抑制剂制成的培养基是

A.营养培养基      B.选择培养基      C.鉴别培养基      D.特殊培养基      E.厌氧培养基

6. 属于鉴别培养基的是

A.糖发酵培养基      B.肉汤培养基      C.血平板      D.SS 培养基      E.普通琼脂

7. 关于培养基的制备错误的是

A.琼脂和指示剂一般在调完 pH 后加入

B.调节 pH 时应比实际需要的 pH 高 0.1~0.2

C.所有培养基必须采用高压蒸汽灭菌法（103.4kPa/cm<sup>2</sup>）灭菌

D.培养基制备好后需进行无菌试验和效果检测

E.制备好的培养基置于 4℃冰箱保存

8. 制备普通琼脂培养基，灭菌的方法宜采用

A.煮沸法      B.巴氏消毒法      C.流通蒸汽灭菌法      D.高压蒸汽灭菌法      E.间歇灭菌法

B 型题

（9~11 题共用备选答案）

A.鉴别培养基      B.选择培养基      C.基础培养基      D.营养培养基      E.特殊培养基

9. 只含有细菌需要的最基本营养成分的培养基

10. 在培养基中加入某化学成分以抑制某些细菌的生长而有助于目的菌生长，此培养基称为

11. 在培养基中加入底物和指示剂，用以观察细菌的生化反应，此类培养基称为

## 【项目 2】 空气、人和物体表面细菌的检测

### 一、空气污染与消毒效果检测

（一）材料准备

1. 培养基 培养皿直径为 9cm 的营养琼脂平板。

2. 器材 培养箱

（二）内容及方法

1. 监测对象 实验室空气或医院各科室的空气。

2. 采样方法

（1）采样时间：选择消毒处理后与进行医疗活动之前期间进行采样。

（2）采样高度：与地面垂直高度为 80~150cm 处。

（3）布点方法：室内面积 < 30m<sup>2</sup> 时，可设内、中、外对角线 3 点；内和外部位，距离墙壁 1m 处。室内面积 ≥ 30m<sup>2</sup>，设东、南、西、北、中 5 点，亦可根据室内面积布点大于 5 点，各点间距为 1m。

(4) 平皿暴露采样：将培养基平皿打开，并将其盖向下扣放，防止平皿盖人为污染影响检查结果，暴露 5~10min，并标记时间、地点、位置，以及采样时环境条件(如温度、湿度等)，盖好平皿，置于 35℃培养 24~48h，计算菌落数。

(5) 送检时间：采样后必须尽快对样品进行相应指标的检测，送检时间不得超过 6h，若样品保存于 0℃~4℃条件时，送检时间不得超过 24h。

3. 计数方法：采用营养琼脂平板和血琼脂平板作平皿暴露法采样，记录每只平板上的菌落数，按奥梅梁斯基计算法，即在面积 A 为 100 cm<sup>2</sup> 的培养基表面，5min 沉降下来的细菌数相当于 10L 空气中所含的细菌数。

$$\text{细菌数 (cfu / m}^3\text{)} = 1000 \div (A/100 \times t \times 10/5) \times N$$

将上述公式化简后得：

$$\text{细菌总数 (cfu / m}^3\text{)} = (50000/At) \times N$$

公式中的 N=平均菌落数 (cfu)；A=平皿面积(cm<sup>2</sup>)；t：平皿暴露于空气中的时间(min)。

4. 结果判定：参见表 1-1，表 1-2，表 1-3。

表 1-1 各类环境空气、物体表面、医护人员手细菌菌落总数卫生标准

环境类别	范围	标准			特殊菌的检查
		空气 cfu/m <sup>3</sup>	物体表面 cfu/cm <sup>2</sup>	医护人员手 cfu/cm <sup>2</sup>	
I 类	层流洁净手术室、层流洁净病房	≤10 或 0.2cfu/ 皿	≤5	≤5	不得检出 A、B、 C、D
II 类	普通手术室、产房、婴儿室、早产儿室、普通保护性隔离室、供应室无菌区、烧伤病房、重症监护病房	≤200 或 4cfu/皿	≤5	≤5	不得检出 A、B、 C、D、E
III 类	儿科病房、妇产科检查室、注射室、换药室、治疗室、供应室清洁区、急诊室、化验室、各类普通病房和房间	≤500 或 10cfu/皿	≤10	≤10	不得检出 A、B、 D、E
IV 类	传染病科及病房	-	≤15	≤15	不得检出 A、B

注：A：金黄色葡萄球菌；B：大肠埃希菌；C：铜绿假单胞菌；D：溶血性链球菌；E：母婴室、早产儿室、婴儿室、新生儿室及儿科病房的物体表面、医护人员手上还不得检出沙门菌。F：I、II、III类区域空气监测中不得检出金黄色葡萄球菌和溶血性链球菌

表 1-2 医院传染病科及病房的静态和动态空气细菌总数要求

环境类别	范围	区域	静态空气细菌总数 cfu/m <sup>3</sup>	动态空气细菌总数 cfu/m <sup>3</sup>
IV 类	传染病科 及病房	清洁区	≤750	≤1500
		半污染区	≤1000	≤2000

污染区	≤1250	≤2500
-----	-------	-------

表 1-3 以细菌总数评价空气的卫生标准 (cfu/m<sup>3</sup>)

清洁程度	细菌总数
最清洁的空气 (有空调)	1~2
清洁空气	<30
普通空气	31~125
临界环境	126~150
轻度污染	<300
严重污染	>301

### (三) 注意事项

1. 空气消毒后整个检测过程必须严格地按无菌操作规程进行, 防止操作过程中微生物的再污染而影响检验结果。
2. 采样前, 关好门窗, 在无人走动情况下, 静置 10min 进行采样。
3. 奥式公式没有考虑尘埃粒子大小、数量、气流情况、人员密度和活动情况, 可能出现计算的浮游细菌数比实测的浮游细菌少的情况。

## 二、人和物体表面卫生监测

### (一) 材料准备

营养琼脂平板、无菌棉签、10ml 无菌生理盐水、无菌剪刀、无菌吸管、无菌规格板等。

### (二) 内容及方法

#### 1. 物体表面消毒效果监测

(1) 监测对象: 实验室内物体表面, 包括桌、椅、门及门把手、窗台、水池和洁具等。

#### (2) 采样方法

采样时间: 选择消毒处理后 4h 内进行采样。

采样面积: 被采表面 < 100 cm<sup>2</sup>, 取全部表面; 被采表面 ≥ 100 cm<sup>2</sup>, 取 100 cm<sup>2</sup>。

采样方法: ①用 5cm×5 cm 的标准灭菌规格板, 放在被检物体表面, 用浸有含相应中和剂的无菌洗脱液 (常用含 0.5% 硫代硫酸钠+0.1% 吐温 80 的 PBS) 或无菌生理盐水采样液的棉拭子 1 支, 在规格板内横竖往返各涂抹 5 次, 并随之转动棉拭子, 连续采样 4 个规格板面积, 剪去手接触部分的棉杆, 将棉拭子放入装 10ml 含相应中和剂的采样液试管中立即送检。②棉拭子直接涂擦法, 用于门把手、试管或容器的外表或内腔等不规则或小型物体采样。用棉拭子浸入无菌生理盐水, 在管壁挤去水分, 然后涂抹物表, 将手接触部份的棉杆剪掉, 然后将棉拭子放回无菌生理盐水试管。③无菌生理盐水冲洗法取样。



### (3) 检测方法

1) 细菌总数检测：将采样管在混匀器上振荡 20s 或用力振打 80 次，用无菌吸管吸取 1.0ml 待检样品接种于灭菌平皿，每一样本接种 2 个平皿，内加入已溶化的 45℃~48℃ 的营养琼脂 15~18ml，边倾注边摇匀，待琼脂凝固，置 36℃±1℃温箱培养 48h，计数菌落数。采样结果计算方法：

$$\text{物体表面细菌菌落总数}(cfu/cm^2) = \frac{\text{平均平皿菌落数} \times \text{采样液稀释倍数}}{\text{采样面积}(cm^2)}$$

小型物体表面的结果计算，用 cfu/件表示。

2) 致病菌检测：金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、沙门氏菌检测。

(4) 结果判定见表 1-1。

### 2. 手指皮肤消毒效果监测

(1) 监测对象：医务人员的手。

(2) 采样方法

采样时间：医院感染监测为洗手后，在接触病人以及医疗活动前采样（或洗手前，消毒洗手后各采样一份）。

采样方法：被检人五指并拢，将浸有无菌生理盐水采样液的棉拭子在双手指掌面从指根到指端来回涂擦各两次（一只手涂擦面积 30 cm<sup>2</sup>），并随之转动采样棉拭子，剪去手接触部位，将棉拭子放入装有 10ml 采样液的试管内立即送检。采样面积按平方厘米计算。

(3) 检测方法

1) 细菌总数检测：将采样管在混匀器上振荡 20s 或用力振打 80 次，用无菌吸管吸取 1.0ml 待检样品接种于灭菌平皿，每一样本接种 2 个平皿，内加入已溶化的 45℃~48℃ 的营养琼脂 15~18ml，边倾注边摇匀，待琼脂凝固，置 36℃±1℃温箱培养 48h，计数菌落数。采样结果计算方法：

$$\text{细菌总数}(cfu/cm^2) = \frac{\text{平皿上菌落的平均数} \times \text{稀释倍数}}{30 \times 2}$$

举例：平皿上菌落数（10，8），结果为：9.0×10/60=1.5 (cfu/cm<sup>2</sup>)

2) 致病菌检测：金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、沙门氏菌检测。

(4) 结果判定见表 1-1。

### (三) 注意事项

1. 采样要有一定的标本数量且具有代表性才能反映真实污染情况，得出的污染率才准确，有些物体需采几份标本。

2. 注意在物体表面的重点部位采样，如氧气瓶的过滤瓶中的水及胶管，手术台、治疗车、无影灯把手等。一般范围如病房的地面、墙面、门把手、床头柜、椅子、床栏杆、暖气片、暖水瓶、洗脸盆、玩具；公共设施中厕所门把手、扶梯；洗脸间内的拖把、水池、水龙头、污水；医疗器具的氧气瓶、雾化器、吸引器、输液架、治疗桌、甚至听诊器、病历夹等；在妇产科、小儿科还应包括喂奶、洗澡等器具。

3. 采样时，棉拭子处于湿润状态，如处于饱和状态可将多余的采样液在采样管壁上挤压去除。禁止使用干棉拭子采样。

4. 对化学杀菌因子消毒效果的监测，采样液应为含经鉴定合格的中和剂的洗脱液。若对非化学因子消毒效果监测，则不必加中和剂。

5. 所采样本应及时检测，室温下存放不得超过 2h；4℃冰箱存放不得超过 4h。

6. 医院感染很多是正常菌群或条件致病菌引起，不仅可涉及个体，还波及部分或整个群体，所以标本的采集不同于临床感染性疾病诊断的微生物学采样要求。标本的检验不仅提供病原诊断，而且提供流行病学方面的资料，作为调查分析的依据及工具。因此，必须按照流行病学提出的要求有针对性地去进行，而不是盲目的、随意的采集样本，以减少不必要的人力、物力浪费，在较短时间内做出判断。一般步骤是，当个体病人疑为医院感染或出现医院感染爆发时，应根据病人原发疾病诊断、治疗情况、临床表现、传播过程等进行初步流行病学分析后，然后采样。

### 职考测试题

#### A 型题

1. 关于空气污染检测的说法，错误的是

- A. 一般用直径为 9mm 的培养皿  
B. 采样的高度为 80~150cm 处  
C. 一般采用 3 点或 5 点布点法，不能超过 5 点  
D. 培养基平皿打开后，其盖应向下扣放  
E. 一般标本送检时间不得超过 6 小时

2. 若化实验室空气污染检测的结果为 200 cfu/m<sup>3</sup>，检测到金黄色葡萄球菌，说明

- A. 空气质量符合标准 B. 空气质量不符合标准 C. 不能确定 D. 普通空气 E. 重度污染

3. 关于物体表面消毒效果监测，正确的是

- A. 被采物体表面 < 100cm<sup>2</sup>，按 100cm<sup>2</sup> 计算 B. 用无菌干棉拭子采样

- C.面积超过 100cm<sup>2</sup> 物体表面的结果计算, 用 cfu/件表示
- D.小型物体表面的结果计算, 用 cfu/cm<sup>2</sup> 表示 E.所采样本室温下存放不得超过 2h
4. 若实验室台面消毒效果监测时, 平皿上菌落数是 30 和 18, 正确的计算结果是
- A. 3 (cfu/件) B.1.8 (cfu/cm<sup>2</sup>) C.2.4(cfu/cm<sup>2</sup>)
- D.2.4 (cfu/件) E.3 (cfu/cm<sup>2</sup>)
5. 关于手指皮肤消毒效果监测, 正确的是
- A.取材部位是手指掌面从指根到指端, 不包括大拇指
- B.取材面积为双手 60 cm<sup>2</sup> C.用饱和的无菌棉拭子采集标本
- D.标本最终被稀释 2 倍 E.取材面积为单手 60 cm<sup>2</sup>
6. 我国在医院环境细菌检测控制标准中, 对婴儿室的要求是
- A.不得检出沙门菌 B.不得检出任何微生物 C.不得检出葡萄球菌
- D.细菌菌落总数 < 8cfu/m<sup>3</sup> E. 细菌菌落总数 < 400cfu/m<sup>3</sup>
7. 环境监测卫生学标准中, 要求医务人员手部菌落 ≤ 5cfu/m<sup>2</sup> 的应是
- A.传染科病房 B.化验室 C.注射室 D.层流洁净病房 E.供应室清洁区

#### B 型题

(8~10 题共用备选答案)

- A.细菌总数 (cfu / m<sup>3</sup>) = (50000/At) × N
- B.细菌总数 (cfu / m<sup>2</sup>) = (菌落平均数 × 稀释倍数) / 60
- C.细菌总数 (cfu / m<sup>2</sup>) = (菌落平均数 × 稀释倍数) / 采样面积
- D.细菌总数 (cfu / m<sup>2</sup>) = (菌落平均数 × 稀释倍数) / 件
- E.细菌总数 (cfu / m<sup>2</sup>) = (菌落平均数 × 稀释倍数) / 30
8. 空气污染检测的计算公式是
9. 小件物体 (面积 < 100 cm<sup>2</sup>) 表面消毒效果监测的计算公式是
10. 手指皮肤消毒效果监测的计算公式是

参考答案

1.C 2.B 3.E 4.C 5.B 6.A 7.D 8.A 9.D 10.B

### 【项目 3】细菌形态学检查-革兰染色法

#### (一) 材料准备

1. 标本 待检细菌悬液或菌落。
2. 试剂 生理盐水、结晶紫染液、卢戈碘液、95%乙醇、沙黄或稀释复红染液。

3. 器材 载玻片、接种环、酒精灯、普通光学显微镜、香柏油等。

## (二) 操作

### 1. 制片

(1) 涂片：取洁净载玻片一张，置于实验台上。点燃酒精灯，右手执笔式持接种环，先将接种环金属丝部分垂直于酒精灯火焰烧灼灭菌，斜持接种环，将金属柄下 1/3 旋转通过火焰三次。左手斜持生理盐水试管，右手小指与小指夹持试管塞旋转拔出，试管口旋转通过火焰灭菌三次。用接种环取生理盐水一环于载玻片中央，试管口灭菌，盖塞，放回原处，接种环灭菌。左手持琼脂平板，略开盖置酒精灯火焰侧方约 5~6cm 处，用接种环轻轻刮取细菌少许，将琼脂平板倒置于实验台上，将细菌在盐水中涂成直径约 1cm 的菌膜，接种环反向灭菌，放回原处。

(2) 干燥：将涂片置室温自然干燥，也可将菌膜面向上，在酒精灯火焰上方的热空气中微微加热烘干，但切勿靠近火焰，以免标本烤焦。

(3) 固定：用手或玻片夹夹住载玻片一端，涂片面朝上，在酒精灯火焰的外焰中以钟摆速度往返通过 3 次，注意温度不能太高，以手背皮肤触碰玻片反面热而不烫为宜。目的是杀死细菌并使菌体较牢固地粘附于载玻片上，以防在染色过程中被染液和水冲掉。

### 2. 染色

(1) 初染：在制好的涂片上滴加结晶紫染液（以刚好覆盖菌膜为宜），染色 1min，倾斜载玻片，水洗。

(2) 媒染：滴加卢戈碘液，染色 1min，水洗。

(3) 脱色：滴加 95%乙醇，轻轻晃动玻片，使其脱色，需 10~30s 至无紫色脱褪为准。

(4) 复染：滴加沙黄或稀释复红染液，复染 30s，水洗。

3. 镜检 用滤纸吸干或自然干燥后，油镜下观察染色结果。

#### (1) 油镜的使用

1) 采光：将显微镜平放于实验台上，低倍物镜对准聚光器，聚光器上升至最高处，将聚光器下方的光圈完全打开，眼睛移至目镜，调节反光镜采光直至视野里获得适宜亮度。若是以日光灯作为光源，可用反光镜的凹面镜；若以自然光线作为光源，则用反光镜的平面镜；若使用电光源的显微镜，则通过底座上的螺旋调节亮度。

2.) 固定：将已涂布标本的载玻片置于载物台上，用标本夹固定，移动推进器并将欲检查的标本部分移至物镜正下方。先用低倍镜找到标本的位置，并移至视野中心，旋转物镜回旋器，使油镜镜头对准标本，并将聚光器升高，光圈放大。

3) 滴油：在载玻片上滴加 1 滴香柏油，眼睛从侧面观察油镜，并慢慢旋动粗螺旋使油镜下降，直至油镜镜头刚好浸于香柏油中，但切勿将镜头与标本玻片接触，以免镜头或玻片被损伤。

4) 调焦：注视目镜，一边观察视野，一边慢慢旋动粗螺旋，使镜头缓缓上升（或载物台缓慢下降）直至视野中看到模糊物像时，再换用微调螺旋，缓缓旋动直至出现清晰物像，选择涂片分布均匀的视野观察结果。若调节过程中镜头离开香柏油面，则重复上述操作，并注意不要压碎玻片，损伤镜头。在观察标本时，应两眼同时睁开。

5) 清理：观察结束后，将镜筒升高，从载物台上取下标本玻片，立即用拭镜纸轻轻拭去镜头上的香柏油。

(2) 油镜的维护：①搬动显微镜时，应一手稳托镜座，一手紧握镜臂，将显微镜平放于实验台上，轻拿轻放，以防显微镜碰撞或摔坏。②显微镜的镜头应保持清洁，勿使油污或灰尘附着。当镜头不干净时，用拭镜纸轻轻擦拭，若有油污，则将拭镜纸蘸少许乙醚擦拭镜头。③使用完显微镜后，应将物镜转成“八”字形，即物镜不与载物台垂直，同时下降聚光器，避免物镜与聚光器碰撞。竖起反光镜、套上镜罩或放入镜箱内防尘。④不能随意拆卸显微镜的任何部件，以防损坏。⑤平时放置显微镜时，应注意保持通风、干燥、防晒、防霉，避免与有腐蚀性的物品接触。

4. 结果 被染成紫色的为革兰氏阳性菌，被染成红色的为革兰氏阴性菌。

### (三) 意义

1. 鉴别细菌 初步鉴别细菌，缩小检查范围，并确定进一步的鉴定方法。
2. 选择治疗用药 临床上可根据病原菌的革兰染色性，选择有效的药物治疗。
3. 与细菌致病性有关 区别细菌的染色性可指导临床采用针对性的治疗方案

### (四) 注意事项

1. 涂片时，若挑取菌液，需先将菌液摇匀，以免细菌沉于管底而使挑取的菌量过多或过少；若挑取菌落，生理盐水及取菌量不宜过多。涂片尽量均匀，菌膜不宜过厚。

2. 染色时，染液以覆盖标本为宜，不宜过多。

3. 染色各环节均要严格掌握好时间，尤其是乙醇脱色环节，应根据菌膜厚薄、室温等因素掌握适当时间，否则会影响染色结果。

4. 水洗时，将玻片倾斜，以细小水流冲于玻片上端，使水流沿玻片斜面流下，切忌将水流直冲菌膜部位，以免菌膜脱落。

5. 染液最好新鲜配制，以防影响结果。

## 职考测试题

### A 型题

1. 革兰染色法所用染液不包括

- A.结晶紫    B.美兰    C.95%乙醇  
D.卢戈碘液                                        E.稀释复红

2. 革兰氏阴性菌被染成

- A.红色    B.紫色    C.兰色    D.碘黄色                                        E.无色

3. 关于革兰染色法，正确的是

- A.用蒸馏水涂片    B.用酒精灯中焰干燥  
C.固定的目的是杀死细菌并使菌体较牢固地粘附于载玻片上  
D.染色的顺序是初染、复染、脱色、媒染  
E.染色后，用吹风机迅速吹干

4. 用油浸镜观察到的细菌已被放大

- A.10 倍    B.100 倍                                        C.500 倍                                        D.1000 倍                                        E.10000 倍

5. 革兰染色的脱色液是

- A.3%的盐酸乙醇    B.75%乙醇                                        C.95%的乙醇                                        D.99%乙醇                                        E.100%无水乙醇

6. 关于显微镜的维护，正确的是

- A.当镜头不干净时，用滤纸轻轻擦拭  
B.观察时，将镜头浸入镜油中，并与标本玻片接触  
C.定期对显微镜各部件进行拆卸清洗  
D.平时放置显微镜时，物镜须与载物台垂直  
E.轻拿轻放显微镜

7. 细菌学中最经典、最常用的染色方法是

- A.荧光染色    B.抗酸染色                                        C.革兰染色                                        D.鞭毛染色                                        E.荚膜染色

8. 细菌的染色性质不同是由于

- A.细胞壁结构不同    B.细胞膜结构不同                                        C.细胞核结构不同  
D.中介体的有无    E.质粒的有无

9. 革兰染色的意义不包括

- A.初步鉴别细菌    B.选择治疗药物                                        C.与细菌致病性有关  
D.为确定进一步的鉴定方法提供依据    E.确定病原菌

## B 型题

(10~11 题共用备选答案)

A.结晶紫      B.稀释复红      C.95%乙醇      D.卢戈碘液      E.生理盐水

10. 初染用染色液

11. 媒染用液是

(12~13 题共用备选答案)

A.光栅      B.移动器      C.标本夹      D.粗螺旋      E.聚光器

12. 调节入光强度用

13. 调节标本位置用

参考答案

1.B 2.A 3.C 4.D 5.C 6.E 7.C 8.A 9.E 10.A 11.D 12.A 13.B

## 【项目 4】 细菌接种与培养技术

### 一、细菌接种技术

#### (一) 材料准备

1. 接种工具 接种环、接种针。
2. 菌种 待检细菌
3. 培养基 肉汤培养基、半固体琼脂培养基、普通琼脂平板、普通琼脂斜面等。
4. 其他 酒精灯、恒温培养箱等。

#### (二) 内容及方法

将细菌标本或培养物移种至适当培养基的过程即为接种。根据标本来源、培养目的的不同,可选择不同的接种方法,常见的有平板划线接种法、液体培养基接种法、斜面接种法、半固体穿刺接种法等。接种的基本程序是:灭菌接种环(针)→待冷→沾取细菌标本→进行接种(不同的方法此步骤略有不同)→灭菌接种环(针)→接种环(针)放回试管架。

#### 1. 平板划线接种法(或分离培养法)

(1) 连续划线法:此法适用于含菌量较少、杂菌不多的标本。方法是:①右手持接种环,烧灼灭菌接种环,待冷却后挑取少量细菌标本;②左手持平板,打开平皿盖(平皿盖与平皿底成 $45^{\circ}\sim 50^{\circ}$ ),轻轻地于平板培养基表面任一边缘处密集涂布(原始区);③将接种环与平板保持 $30^{\circ}\sim 40^{\circ}$ ,运用腕力以“Z”字形在培养基表面来回作不重叠连续划线,直至划完整个平板,注意线与线之间的距离不宜太近或太远,接种线不宜靠近平皿边缘;④接种完成后,烧灼接种环(针),放回,平皿倒置于 $37^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养(在平皿底部原始区对应

处或靠平皿边缘处贴上标签)。

(2) 分区划线法: 此法适用于杂菌量较多的标本。方法大致与连续法类似, 区别是: 将平板培养基分成 3~5 个区域进行连续划线。①用已烧灼灭菌的接种环挑取少量细菌标本, 在平板培养基表面任一边缘处涂抹, 再以“Z”字形不重叠连续划线作为第一区, 其范围不超过平板的 1/4; ②将平板旋转适当角度, 烧灼灭菌接种环, 待冷却后于第二区以相同方法再作连续划线, 在开始划线时与第一区的划线相交 2~3 次; ③将接种环烧灼灭菌, 继续按上述方法, 分别划出第三、四区; ④接种完成后, 烧灼接种环(针), 放回, 平皿置于 37℃ 培养箱中培养。

2. 液体培养基接种法 ①右手持接种环(或接种针), 烧灼后冷却, 左手握持菌种管和液体培养基管; ②用右手掌与小指、小指与无名指分别夹取两管的硅胶塞或棉塞, 然后将试管口迅速通过火焰灭菌; ③用已灭菌的接种环挑取适量菌种, 迅速将带有菌种的接种环伸进倾斜的液体培养基管内, 在接近液面的管壁上轻轻研磨; ④取出接种环并在火焰上烧灼灭菌, 两试管口再次通过火焰灭菌, 再将硅胶塞或棉塞分别塞回原试管; ⑤直立试管, 菌种即均匀地混合于液体培养基中; ⑥接种完成后, 烧灼接种环(针), 放回, 试管置于 37℃ 培养箱中培养。

3. 斜面培养基接种法 方法与液体培养基接种法相似: ①左手握持菌种管和斜面培养基管, 培养基斜面朝上; ②取下试管塞, 管口经火焰灭菌后, 右手持已烧灼灭菌的接种环(针)挑取适量菌种后, 烧灼试管口, 塞上试管塞, 将沾取有菌种的接种环迅速伸进斜面培养基管内, 先从斜面的底端轻轻向上划一直线, 然后再从斜面底端以“Z”字形轻轻连续划线至顶端; 或先从斜面正中垂直刺向试管底部, 然后抽出再在斜面划“Z”字形线; ③试管口灭菌, 塞上试管塞, 烧灼接种环(针), 放回, 将试管置于 37℃ 培养箱中培养。

4. 穿刺接种法 方法是: ①用灭菌的接种针挑取适量菌种, 从培养基表面正中, 平行于试管壁垂直刺入培养基高度的 2/3, 但不能触及管底, 然后沿原路抽出; ②试管口灭菌, 塞上试管塞, 接种环烧灼灭菌, 放回, 将试管置于 37℃ 培养箱中培养。

### (三) 注意事项

1. 细菌接种时必须严格执行无菌操作。
2. 接种所用的器具、培养基等必须经过严格的灭菌后方可使用。
3. 接种时, 刚通过火焰灭菌的接种环(针), 不能直接挑取菌种, 须冷却后方可挑取细菌, 避免烫死细菌; 使用后的接种环须经火焰灭菌后, 方可归位。
4. 平板接种时, 平皿盖不能完全打开或打开角度太大, 更不能将平皿盖直接置于实验



台面上，避免呼吸道或空气中的杂菌污染。

5. 固体培养基和斜面培养基划线接种时，不能用力过大，应运用腕力在培养基表面轻轻滑行，切忌划破培养基，影响实验结果。

6. 带菌的接种环（针）在进出试管时，动作要快速准确，不能碰及试管内壁和管口。

7. 试管接种时，应将试管稍稍倾斜，避免空气中的杂菌沉降于管内，导致污染；试管不能水平放于实验台上，以免液体流出或斜面培养基的凝固水浸湿培养基表面；试管塞不能随便在实验台上乱放。

8. 接种前后，试管口都应在火焰上灭菌。

9. 穿刺接种时，注意接种针应在培养基内直行，不要左右移动，动作要干净利落。

## 二、细菌培养技术

细菌接种后，需要在适宜的气体、温度等环境下才能生长繁殖，而不同的细菌对环境的要求稍有不同，因此，要根据菌种的要求，选择适宜的培养方法，常用的培养方法包括：

（一）需氧培养法（普通培养法） 将已接种细菌的培养基置于 37℃ 培养箱中培养 18~24h，即可观察到大部分细菌的生长现象，少数生长较缓慢的细菌，需培养 3~7 天甚至一个月才能观察到生长现象。

（二）二氧化碳培养法 适用于培养某些需要一定浓度（一般为 5%~10%）的 CO<sub>2</sub> 才能生长的细菌如脑膜炎奈瑟菌、布鲁菌等。常用的方法有：二氧化碳培养箱培养法、烛缸法、化学法等。

### （三）厌氧培养法

主要用于厌氧菌的培养。常用的有庖肉培养基法、焦性没食子酸法、厌氧罐法、厌氧气袋法和厌氧手套箱法。厌氧手套箱法是日前最先进的厌氧培养设备。厌氧培养状态监测常用的化学指示剂是亚甲蓝和刃天青。

## 三、细菌的生长现象观察

将细菌接种到适宜培养基中，经 35℃ 培养 18~24h（有的生长慢的细菌需数天或数周）后，可观察到细菌的生长现象。不同的细菌在不同的培养基中生长现象不一样，据此可鉴别细菌。

### （一）细菌在液体培养基中的生长现象

细菌在液体培养基中生长可出现三种现象。

1. 混浊 大多数细菌在液体培养基中生长后，使培养基呈现均匀混浊。

2. 沉淀 少数呈链状生长的细菌在液体培养基底部形成沉淀，培养液较清亮。如链球

菌、炭疽芽胞杆菌等。

3. 菌膜 专性需氧菌多在液体表面生长，形成菌膜。如铜绿假单胞菌等。

### (二) 细菌在半固体培养基中的生长现象

主要用于观察细菌的动力。有鞭毛的细菌在半固体培养基中可沿穿刺线扩散生长，穿刺线四周呈羽毛状或云雾状。无鞭毛的细菌只能沿穿刺线生长，穿刺线四周培养基透明澄清。

### (三) 细菌在固体培养基上的生长现象

细菌经分离培养后，在固体培养基上生长可形成菌落。菌落是由单个细菌分裂繁殖形成的肉眼可见的细菌集团。不同细菌在琼脂平板上形成的菌落特征不同，表现在菌落大小、形态、颜色、气味、透明度、表面光滑或粗糙、湿润或干燥、边缘整齐与否等方面各有差异。细菌菌落一般分下列三种类型。

1. 光滑型菌落 (S 型菌落) 菌落表面光滑、湿润、边缘整齐。

2. 粗糙型菌落 (R 型菌落) 菌落表面粗糙、干燥，呈皱纹或颗粒状，边缘不整齐。

如结核分枝杆菌菌落。

3. 粘液型菌落 (M 型菌落) 菌落表面光滑、湿润、有光泽，似水珠样。如肺炎克雷伯菌形成的菌落。

另外，细菌在血琼脂平板上生长可出现不同的溶血现象。如出现  $\alpha$  溶血 (亦称草绿色溶血)，菌落周围出现 1~2mm 的草绿色溶血环，可能为细菌代谢产物使红细胞中的血红蛋白变为高铁血红蛋白所致； $\beta$  溶血 (又称完全溶血)，菌落周围出现一个完全透明的溶血环，系由细菌产生溶血素使红细胞完全溶解所致。 $\gamma$  溶血 (即不溶血)，菌落周围培养基无变化。有些细菌在代谢过程中产生水溶性色素，使菌落周围培养基出现颜色变化，有些细菌产生脂溶性色素，使菌落本身出现颜色变化。此外，有的细菌在琼脂平板上生长繁殖后，可产生特殊气味，如铜绿假单胞菌产生生姜味、白假丝酵母菌产生酵母味等。

## 职考测试题

### A 型题

1. 不能用于接种细菌的工具是

A. 棉拭子            B. 接种环            C. 接种针            D. L 型玻棒            E. 竹签

2. 接种环的直径一般为

A. 1~2mm            B. 2~4mm            C. 1~2cm            D. 2~4cm            E. 50~80mm

3. 关于接种环灭菌，错误的是

A. 接种环常用干烤灭菌            B. 接种针或环必须烧红            C. 接种柄下 1/3 需旋转灭菌 3 次

- D. 接种环用前和用后必须灭菌      E. 取完细菌的接种环需反向灭菌
4. 关于接种管口的灭菌，错误的是
- A. 常用火焰烧灼灭菌      B. 取标本前后皆需灭菌      C. 灭菌时，胶塞需旋转拔出
- D. 胶塞拔出后，需倒置于实验台上      E. 需转动烧灼菌种管口 3 次
5. 细菌接种基本程序是
- A. 灭菌接种环--沾取细菌标本--接种--接种环灭菌
- B. 灭菌接种环--待冷沾取细菌标本--接种--接种环灭菌
- C. 灭菌接种环--待冷沾取细菌标本--接种
- D. 灭菌接种环--沾取细菌标本--接种
- E. 用接种环沾取细菌标本--接种--接种环灭菌
6. 平板分区划线的目的是
- A. 使细菌获得充分的营养      B. 减少细菌间的相互抑制
- C. 获得足够的单个菌落      D. 利于细菌的大量生长
- E. 加快细菌的生长速度
7. 关于分区划线分离法错误的是
- A. 适用于杂菌量较少的标本      B. 一般分 3~5 区      C. 每划完一区，接种环灭菌一次
- D. 每一区划线应接触上一区 2~3 次      E. 第一区约占平板 1/5 面积
8. 关于菌落的叙述，错误的是
- A. 是多个细菌聚集在一起形成的细菌集团      B. 菌落可用于细菌鉴别
- C. 一个菌落中的细菌性状是相同的      D. 不同细菌形成的菌落不同
- E. 是一个细菌在培养基上生长繁殖而形成的细菌集团
9. CO<sub>2</sub> 培养法的 CO<sub>2</sub> 浓度是
- A. 1%~5%      B. 5%~10%      C. 10%~15%      D. 15%~20%      E. 20%~25%
10. 一般不宜采用平板分区划线接种的标本是
- A. 粪便标本      B. 血标本      C. 咽拭子标本      D. 痰标本      E. 尿标本
11. 血平板上菌落的溶血现象不包括
- A. α 溶血      B. β 溶血      C. γ 溶血      D. 靶形溶血      E. δ 溶血
12. 细菌在适宜的生长条件下，形态比较典型需培养
- A. 1~4 小时      B. 4~8 小时      C. 6~10 小时      D. 18~24 小时      E. 48~72 小时
13. 厌氧培养状态监测常用的化学指示剂是

A.伊红      B.亚甲蓝和刃天青      C.溴甲酚紫      D.碱性复红      E.结晶紫

B 型题

(14~17 题共用备选答案)

A.连续划线法      B.分区划线法      C.液体培养基接种法  
D.斜面培养基接种法      E.穿刺接种法

14. 粪便标本的分离培养采用  
15. 用半固体培养基观察细菌动力应采用  
16. 用于增菌培养的接种方法是  
17. 纯培养一般采用

参考答案

1.E 2.B 3.A 4.D 5.B 6.C 7.A 8.A 9.B 10.B 11.E 12.D 13.B 14.B 15.E 16.C  
17.D

**【项目 5】 细菌生物化学试验**

(一) 材料准备

1. 菌种 已知细菌标本
2. 培养基 葡萄糖发酵培养基、乳糖发酵培养基、葡萄糖蛋白胨水、蛋白胨水、枸橼酸盐培养基、克氏双糖铁斜面、MIU 培养基
3. 试剂 靛基质试剂、V-P 试剂、甲基红指示剂
4. 器材 接种环(针)、酒精灯或红外接种环灭菌器、标记笔、试管架、恒温培养箱等。

(二) 内容及方法

1. 糖发酵试验

- (1) 接种: 以无菌操作将待检纯种细菌穿刺接种到葡萄糖、乳糖发酵培养基中。
- (2) 培养: 将已接种细菌的培养基置于 35℃ 恒温培养箱中, 培养 18~24h 后观察结果。
- (3) 结果: 如待检菌能分解葡萄糖(乳糖)产酸产气, 则培养基变黄色, 培养基中倒置小导管中有气泡(半固体培养基中有气泡或裂隙), 用“⊕”表示。若待检菌分解葡萄糖(乳糖)只产酸不产气, 则培养基变黄, 导管中无气泡(固体培养基不出现裂隙), 用“+”表示; 若待检菌不分解葡萄糖(乳糖), 发酵管不变色, 导管中无气泡(固体培养基不出现裂隙), 用“-”表示。

2. IMViC 试验

- (1) 靛基质试验: ①以无菌操作, 将待检纯种细菌接种到蛋白胨水中, 置于 35℃ 恒温

培养箱中培养 18~24h；②取出培养物，沿试管壁加入靛基质试剂（对二甲基氨基苯甲醛溶液）0.5ml；③观察结果：试剂与培养基接触面出现玫瑰红色者为阳性，用“+”表示；不出现红色者为阴性，用“-”表示。

（2）甲基红试验：①将待检纯种细菌接种于葡萄糖蛋白胨水中，置于 35℃ 恒温培养箱中培养 18~24h；②取出培养物，滴加甲基红指示剂（每毫升培养基中滴加 1 滴）；③观察结果：培养基呈红色者为阳性，用“+”表示；培养基呈黄色者为阴性，用“-”表示。

（3）V-P 试验：①将待检纯种细菌接种于葡萄糖蛋白胨水培养基中，置于 35℃ 恒温培养箱中培养 18~24h；②取出培养物，滴加 V-P 试剂（每毫升培养基滴加 V-P 试剂 0.1ml），充分混匀；③观察结果：培养基出现红色者为阳性，用“+”表示；不出现红色者为阴性，用“-”表示。

（4）枸橼酸盐利用试验：①将待检纯种细菌接种于枸橼酸盐培养基中，置于 35℃ 恒温培养箱中培养 18~24h；②观察结果：培养基呈深蓝色或有细菌生长者为阳性，用“+”表示。培养基未变色且无细菌生长者为阴性，用“-”表示。

### 3. KIA 试验

（1）接种：用接种针挑取待检细菌，穿刺接种到克氏双糖铁斜面培养基深层（距管底 3~5mm 为宜），再将接种针从深层向上提起，在斜面上由下至上 Z 字形划线。

（2）培养：将已接种细菌的克氏双糖铁斜面培养基置于 35℃ 恒温培养箱中培养 18~24h。

（3）结果：①培养基斜面变黄为发酵乳糖（即“+”或 A），变红为不发酵乳糖（即“-”或 K）；②培养基底层变黄为发酵葡萄糖（即“+”或 A），若含有气泡或出现裂隙，则为发酵葡萄糖产气（即⊕）；变红为不发酵葡萄糖（即“-”或 K）；③培养基底层有黑色沉淀，则为硫化氢试验阳性（即 H<sub>2</sub>S “+”）。

### 4. MIU 试验：

（1）接种：取待检细菌，穿刺接种到 MIU 培养基内。

（2）培养：将已接种细菌的 MIU 培养基置于 35℃ 恒温培养箱中培养 18~24h。

（3）结果：①动力试验：接种线变宽、变模糊，培养基变混浊为动力试验阳性；②脲酶试验：培养基全部呈桃红色为脲酶试验阳性；③靛基质试验：加入靛基质试剂，试剂与培养基的接触界面呈玫瑰红色为靛基质试验阳性。

### （三）注意事项

1. 制备液体糖发酵管时，内装的小倒管在接种细菌前应无气泡存在，否则不能使用。

2. 滴加靛基质试剂应沿管壁缓缓加入，稍待片刻即观察液面上是否出现红色，之后红色化合物会逐渐扩散以致不清晰。

3. 滴加 VP 试剂后要充分摇匀，静置 10min 后再观察是否有红色化合物出现。

4. MIU 试验用培养基应制成半固体状态，以观察待检细菌动力。

### 职考测试题

#### A 型题

1. 不属于鉴别培养基的是

- A.糖发酵培养基                      B.血平板                      C.蛋白胨水培养基  
D.MIU 培养基                      E.克氏双糖铁斜面

2. 鉴别培养基中不含的成分是

- A.营养物质                      B.鉴别成分                      C.指示剂  
D.抑制剂                      E.水

3. IMViC 试验不包括

- A.靛基质生成试验                      B.甲基红试验                      C.VP 试验  
D.尿素酶试验                      E.枸橼酸盐利用实验

4. 用于靛基质生成试验的培养基是

- A.糖发酵培养基                      B.血平板                      C.蛋白胨水培养基  
D.葡萄糖蛋白胨水                      E.克氏双糖铁斜面

5. 关于枸橼酸盐利用试验的叙述，错误的是

- A.枸橼酸盐培养基中不含有蛋白胨和牛肉膏                      B.常用的指示剂是 BTB  
C.标本的接种量不宜过多                      D.培养基变兰为利用试验阳性  
E.有细菌生长，但培养基仍为绿色，为利用试验阴性

6. 某细菌在 KIA 上培养的结果是斜面呈红色，底层变黄并含有气泡，有少量黑色沉淀，正确的判定是

- A.不发酵乳糖，发酵葡萄糖产酸产气，产生硫化氢  
B.发酵乳糖产酸，发酵葡萄糖产酸产气，产生硫化氢  
C.分解尿素产氨，发酵葡萄糖产酸产气，产生硫化氢  
D.不发酵乳糖，发酵葡萄糖产酸不产气，产生硫化氢  
E.发酵乳糖产酸，发酵葡萄糖产酸产气，不产生硫化氢

7. 细菌在 MIU 上培养的结果是培养基全部呈桃红色，接种线模糊不清，加入对二甲基氨基

苯甲醛，界面呈玫瑰红色。正确的判断是

- A. 甲基红试验阳性，动力试验阴性，脲酶试验阳性
- B. 动力试验阳性，靛基质试验阴性，脲酶试验阳性
- C. 靛基质试验阳性，动力试验阴性，脲酶试验阳性
- D. 靛基质试验阳性，动力试验阳性，脲酶试验阳性
- E. 甲基红试验阳性，动力试验阳性，脲酶试验阳性

**B 型题**

(8~10 题共用备选答案)

- A. 糖发酵培养基
- B. 葡萄糖蛋白胨水培养基
- C. 蛋白胨水培养基
- D. 枸橼酸盐培养基
- E. 克氏双糖铁斜面

- 8. 用于甲基红试验的培养基是
- 9. 用于 VP 试验的培养基是
- 10. 用于硫化氢生成试验的培养基是

(11~14 题共用备选答案)

- A. 脲酶试验
- B. VP 试验
- C. 靛基质生成试验
- D. 枸橼酸盐利用试验
- E. 硫化氢生成试验

- 11. 以色氨酸为底物的试验是
- 12. 以葡萄糖为底物的试验是
- 13. 以酚红为指示剂的试验是
- 14. 以对二甲基氨基苯甲醛为试剂的是

参考答案

1.B 2.D 3.D 4.C 5.E 6.A 7.D 8.B 9.B 10.E 11.C 12.B 13.A 14.C

**【项目 6】细菌控制技术**

(一) 高压蒸汽灭菌法

- 1. 材料准备 手提式高压蒸汽灭菌器、待灭菌物品、含嗜热脂肪芽胞杆菌的纸片等。
- 2. 操作 高压蒸汽灭菌法是用高压蒸汽灭菌器进行灭菌。

(1) 检查灭菌器电源、各功能阀，正常时可使用。将锅内加水至规定刻度，然后放入待灭菌物品及装有嗜热脂肪芽胞杆菌纸片的小试管(各物品间留出一定间隙，使物品均匀受热)，盖紧锅盖。

(2) 打开排气阀，接通电源开始加热，待器内冷空气排尽后，关闭排气阀。

(3) 继续加热直至压力表达达到所需压力时开始计算时间，调节热源，维持 15~30min 即可达到灭菌目的。通常灭菌器内气压在 103.4kPa/cm<sup>2</sup> 时，温度达 121.3℃，经 15~30min，可杀死所有细菌繁殖体和芽胞。

(4) 灭菌完毕关闭热源，使压力缓缓下降至指针到 0 时，方可打开排气阀，再开盖取出灭菌物品。

(5) 将嗜热脂肪芽胞杆菌的纸片放入溴甲酚紫蛋白胨水培养基中 50℃ 培养 48h，如培养基不变色表示无细菌生长，说明此次灭菌合格。

### 3. 注意事项

(1) 使用前必须检查安全阀、排气阀、压力表、锅盖是否盖紧等，以免发生危险。

(2) 待灭菌物品的包裹不要太大，也不应放置过挤，防止影响灭菌效果。

(3) 进行灭菌时，必须将容器内冷空气完全排出，否则压力表所示压力与应达到的温度不符，将影响灭菌效果。

(4) 灭菌完毕，应使压力缓慢下降至 0 时，方可打开排气阀，切不可排气太快或突然打开排气阀，以免灭菌器内液体外溢。

(5) 此法适用于耐高温高压的物品，如普通培养基、灭菌制剂、敷料、手术器械、注射器和其他玻璃器皿等的灭菌。

### (二) 干烤灭菌法

1. 材料准备 干烤箱、待灭菌物品、含枯草芽胞杆菌黑色变种菌片等。

2. 操作 干热灭菌法是用干烤箱进行灭菌。检查其电源、温控器，正常后方可使用。

(1) 将欲灭菌物品包装后放入箱内，并放入含枯草芽胞杆菌黑色变种菌片，关闭箱门，接通电源，打开鼓风机使温度均匀。

(2) 当温度升至 100℃ 时关闭鼓风机，使温度继续升至 160℃，维持 2h，关闭电源。

(3) 待箱内温度降至 40℃ 以下时，方可打开箱门取物。取出枯草芽胞杆菌黑色变种菌片，放入液体培养基，37℃ 培养 72h 观察最终消毒灭菌效果。

### 3. 注意事项

(1) 需要灭菌的玻璃器皿、试管、吸管等必须洗净并干燥后再进行灭菌。平皿、吸管等需包装、塞上胶（棉）塞。

(2) 放入箱内的物品不可排列过挤。物品包体积不应超过 10cm×10cm×20cm，装载高度不应超过烤箱高度的 2/3。

(3) 灭菌时应经常查看。灭菌温度不得超过 180℃，否则棉塞和包扎纸张可被烧焦甚



至起火。

(4) 灭菌后，让温度自然下降至 40℃ 以下时，方可开门取物，否则玻璃器材可因骤冷而爆裂。

(5) 主要用途是烤干物品或干热灭菌，适用于玻璃器材、粉剂、油剂等耐热不耐湿及蒸汽或气体不能穿透的物品的灭菌。橡胶制品及其他不耐高温干热的物品不能用此法灭菌。

### (三) 煮沸消毒法

#### 1. 材料准备

- (1) 煮沸消毒器（或可盛水加热的容器）。
- (2) 普通肉汤培养基、大肠埃希菌、枯草芽胞杆菌。
- (3) 接种环（针）、酒精灯、培养箱等。

#### 2. 操作

(1) 取 7 支肉汤培养基，编为 1、2、3、4、5、6、7 号，1、2、3 三管接种大肠埃希菌(无芽胞菌)，4、5、6 三管接种枯草芽胞杆菌(有芽胞菌)，7 号管不接种细菌作阴性对照。

(2) 将 1、4 两管同时放入 100℃ 水浴内煮沸 5min，取出置 35℃ 温箱培养 18~24h，观察细菌生长情况。

(3) 将 2、5 两管同时放入 100℃ 水浴内煮沸 1h，取出置 35℃ 温箱培养 18~24h，观察细菌生长情况。3、6 两管不加热作阳性对照，与 7 号管一并置 35℃ 恒温箱培养 18~24h 观察细菌生长情况。

3. 结果 首先观察 7 号管，应无菌生长。3 号管有菌生长，6 号管有菌生长，说明菌种是活的，可生长繁殖。若 1 号管无菌生长，4 号管有菌生长，说明 100℃ 5 分钟能杀死细菌的繁殖体，不能杀死芽胞；若 2 号管无菌生长，5 号管亦无菌生长，说明 100℃ 1h 能杀细菌芽胞，可达到灭菌效果。

### (四) 紫外线消毒法

#### 1. 材料准备

- (1) 紫外线灯。
- (2) 营养琼脂、大肠埃希菌菌液。
- (3) 接种环（针）、酒精灯、培养箱等。

#### 2. 操作

(1) 用接种环取大肠埃希菌菌液，在无菌的普通琼脂平板上做密集划线，使细菌均匀密集涂布于平板的表面。

(2) 开启平皿盖的一半(或用无菌滤纸覆盖一半培养基,暴露另一半),距离紫外线灯管 1 米以内,打开紫外线灯,紫外线照射 30min,盖好平皿盖,置 37℃,培养 24h,取出观察结果。

3. 结果 培养基纸覆盖的部分有细菌生长,暴露的部分无菌生长。说明紫外线能杀死大肠埃希菌,但不能穿透纸。

#### 4. 注意事项

- (1) 紫外线光源与被消毒物体之间不能有任何的阻隔,因玻璃、纸张会阻挡紫外线。
- (2) 紫外线光源与被消毒物品之间的距离应在 1 米以内。
- (3) 消毒的时间要足够。
- (4) 由于紫外线也可以破坏人体细胞的 DNA,所以实验者不能长时间暴露于紫外光源下,避免皮肤和粘膜的损伤。

#### (五) 消毒剂杀菌检测

##### 1. 材料准备

- (1) 培养基:普通琼脂平板。
- (2) 细菌培养物:葡萄球菌和大肠埃希菌肉汤培养物。
- (3) 消毒剂:2.5%碘酒、2%红汞、2%龙胆紫溶液。
- (4) 其他:无菌镊子、无菌滤纸片、无菌棉签、生理盐水。

##### 2. 操作

(1) 用无菌棉签蘸取葡萄球菌和大肠埃希菌肉汤培养物少许,分别均匀涂布于普通琼脂平板上,待菌液干燥。

(2) 用无菌镊子夹取已分别浸于生理盐水、2.5%碘酒、2%红汞、2%龙胆紫的无菌滤纸片,去除纸片上多余药液,分别贴在培养基表面,每张纸片的距离约为 2.5cm。

(3) 将普通琼脂平板置于 35℃温箱内孵育 18~24h,观察纸片周围有无抑菌环。分别测量不同消毒剂纸片周围抑菌环的直径,以毫米为单位记录结果。

##### 3. 注意事项

- (1) 控制好每张纸片间的距离。
- (2) 纸片碰到培养基后不能移动位置。

#### (六) 消毒剂的消毒效果测定

##### 1. 准备

- (1) 常用菌种:金黄色葡萄球菌 ATCC25923,大肠埃希菌 ATCC25922,铜绿假单胞菌

ATCC27853, 枯草芽胞杆菌黑色变种 ATCC9372, 白假丝酵母菌 ATCC10231, 实验时根据需要任选取一种, 也可选其他菌种(株)。

(2) 培养基: 营养肉汤和营养琼脂, 真菌用沙氏培养基、胰蛋白胨大豆琼脂培养基等。

(3) 其他: 缓冲液(PBS)、消毒剂、无菌试管、吸管、接种环、酒精灯、生物安全柜、培养箱等。

## 2. 操作

(1) 取 10 支试管, 每支加无菌蒸馏水 2.5ml 放入 20℃ 水浴中, 将消毒剂作倍比稀释, 最后一支不含消毒剂。

(2) 每管加用 0.03mol/L PBS 配制的菌液 2.5ml, 使最终含菌浓度为 106cfu/ml。

(3) 加菌后 5、10、15、30、60min, 从每管各取出 0.5ml 加入含中和剂的 4.5ml 营养肉汤内, 摇匀后置 35℃ 孵育 24h, 观察细菌生长情况, 无菌生长者继续培养 7 天。

(4) 以无菌生长管消毒液的最低浓度为最低杀菌浓度(MBC); 以无菌生长管的最短消毒时间为该浓度杀菌的最快有效时间。

3. 注意事项 评价消毒效果试验时, 要遵循以下原则: ①要使用国家规定的标准菌株; ②选用适宜于试验菌生长的培养基和温度进行复苏培养; ③应设对照; ④应用适合的中和剂去除残留的消毒剂; ⑤用合理的生物负荷, 如细菌量约 106cfu/ml; ⑥严格无菌操作, 防止杂菌污染。

## 职考测试题

### A 型题

1. 杀灭物体上所有微生物的方法称

A. 灭菌

B. 无菌操作

C. 消毒

D. 防腐

E. 无菌

2. 干烤灭菌法的条件是

A. 160℃ 2 小时

B. 180℃ 2 小时

C. 121℃ 1 小时

D. 240℃ 半小时

E. 100℃ 2 小时

3. 紫外线杀菌的主要机理是

A. 损坏细胞膜

B. 干扰 DNA 复制

C. 破坏细胞壁

D. 破坏酶系统

E. 干扰蛋白质合成

4. 防止微生物进入机体或物体的操作方法称

A. 灭菌

B. 无菌操作

C. 消毒

D.防腐

E.无菌

5. 关于紫外线杀菌错误的是

A.能干扰 DNA 复制

B.杀菌波长的紫外线对人体无损伤作用

C.紫外线穿透力弱

D.适用于物体表面和空气消毒

E.紫外线光源与被消毒物品之间的距离应在 1 米以内

6. 关于高压蒸汽灭菌法的叙述，错误的是

A.适用于耐高温高压的物品

B.灭菌物品的包裹不宜过大

C.灭菌效果检测常用嗜热脂肪芽胞杆菌

D.灭菌时必须排出容器内的冷空气

E.进行培养基灭菌时，可排气取物

7. 干烤灭菌效果检测常用的细菌是

A.金黄色葡萄球菌 ATCC25923

B.大肠埃希菌 ATCC25922

C.铜绿假单胞菌 ATCC27853

D.枯草芽胞杆菌黑色变种 ATCC9372

E.白假丝酵母菌 ATCC10231

8. 不宜干烤灭菌的容器是

A.烧杯

B.容量瓶

C.烧瓶

D.试管

E.试剂瓶

9. 70%~75%乙醇的消毒灭菌机制是

A.蛋白质变性凝固

B.损伤细胞膜

C.破坏 DNA

D.氧化作用

E.破坏细胞壁

10. 微生物室安装供空气消毒的紫外线灯，应置于离操作台面的高度

A.1m

B.2m

C.2.5m

D.3m

E.4m

11. 最容易被细菌 DNA 吸收的紫外线波长是

A. 265nm

B. 280nm

C. 450nm

D. 490nm

E. 650nm

12. 以下说法错误的是

A.同一温度下湿热杀菌的效果优于干热

B.干热法的穿透力强

C.湿热杀菌机制主要是使菌体蛋白质变性凝固

D.煮沸法 100℃5 分钟可杀死细菌的繁殖体，一般消毒以 5 分钟为宜

E.在水中加入 1%~2%的碳酸氢钠可防止金属生锈

B 型题

(13~16 题共用备选答案)

A.高压蒸汽灭菌法

B.过滤除菌法

C.干烤灭菌法

D.紫外线 E.灼烧

13. 普通培养基常用的灭菌方法

14. 培养皿的灭菌方法

15. 空气常用的消毒方法

16. 血清的除菌常用

(17~18 题共用备选答案)

A.2%来苏 B.0.05%氯己定 C.70%乙醇 D.10%甲醛 E.生石灰

17. 地面、桌面消毒

18. 患者排泄物消毒

(19~22 题共用备选答案)

A.消毒 B.灭菌 C.防腐 D.无菌 E.无菌操作

19. 用接种环取材前，先在火焰上烧灼，此为

20. 用 2.5%碘酒再用 75%乙醇擦拭注射部位可达到的目的是

21. 将玻璃器皿或金属器械加热 160~170℃2h 属于

22. 血清中加入 0.1%硫柳汞的方法称

参考答案

1. A 2. A 3. B 4. B 5. B 6. E 7. D 8. B 9. A 10. A 12. B 13. A 14. C 15. D 16. B

17. A 18. E 19. E 20. A 21. B 22. C

## 任务二 病原性球菌的常规检验

### 【项目 1】脓汁标本中葡萄球菌的分离培养与鉴定

(一) 材料准备

1. 菌种 脓汁(含金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌等)。

2. 培养基 血琼脂平板、高盐甘露醇平板、高盐卵黄平板、普通琼脂平板、普通肉汤，O/F 葡萄糖培养基、甘露醇发酵管等。

3. 试剂 3% $H_2O_2$  (新鲜配制)、革兰染色液、新鲜血浆、0.5 麦氏标准比浊管、无菌液体石蜡、新生霉素药敏纸片等。

4. 器材 载玻片、游标卡尺、小镊子、光学显微镜、接种环、酒精灯等。

(二) 内容及方法

1. 分离培养与生长现象观察

(1) 分离培养及菌落观察：将脓汁标本分区划线接种于血琼脂平板、高盐甘露醇平板、高盐卵黄平板、普通琼脂平板，置 35℃ 培养箱中孵育 18~24h。葡萄球菌在固体培养基上形成圆形、凸起、表面光滑、边缘整齐、湿润不透明的中等大小菌落，不同菌株可产生不同脂溶性色素如金黄色、白色、柠檬色。金黄色葡萄球菌在血琼脂平板上产生 β-溶血现象，表皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌菌落较金黄色葡萄球菌大、无溶血现象；金黄色葡萄球菌在高盐甘露醇平板上形成黄色菌落，在高盐卵黄平板上菌落周围形成白色沉淀环；表皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌菌落周围无白色沉淀环。

(2) 肉汤（血液肉汤）中生长现象观察：金黄色葡萄球菌呈混浊、溶血、胶冻状生长。

(3) 革兰染色镜检 挑取脓汁标本或分离培养基上的菌落作革兰染色，于显微镜油镜下观察：可见 G<sup>+</sup>球菌，散在或呈葡萄串状排列。

## 2. 生化反应

(1) 触酶试验：挑取普通琼脂平板上的培养物少许，置于洁净玻片上，滴加 1~2 滴 3% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，1 分钟内出现大量气泡为触酶试验阳性。葡萄球菌属细菌均呈阳性。

(2) 转种生化管：① O/F 试验：将分离到的葡萄球菌接种 O/F 葡萄糖生化管。置 35℃ 培养箱中孵育 18~24h 观察结果。葡萄球菌均为发酵型；② 甘露醇发酵试验：将分离到的葡萄球菌接种于甘露醇发酵管等微量生化管，置 35℃ 培养箱中孵育 18~24h 观察结果。金黄色葡萄球菌为阳性，表皮葡萄球菌和腐生葡萄球菌为阴性。

(3) 血浆凝固酶试验（玻片法、试管法）：金黄色葡萄球菌玻片法及试管法血浆凝固酶试验阳性，表皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌阴性。

(4) 新生霉素敏感试验：将分离到的葡萄球菌菌液（浊度与 0.5 麦氏比浊管相同），均匀涂布于 MH 平板，干燥 3min，贴上每片含 5 μg 的新生霉素纸片，35℃ 孵育 16~20h。抑菌圈直径 ≤ 16mm 为耐药，> 16mm 为敏感。金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌为敏感（S），腐生葡萄球菌为耐药（R）。

## 职考测试题

### A 型题

1. 鉴别葡萄球菌有无致病性的重要指标是

- A. 金黄色色素                      B. 溶血毒素                      C. 凝固酶  
D. 肠毒素                              E. 杀白细胞素

2. 血液增菌培养结果呈均匀混浊生长并有胶冻状凝块，细菌可能是

- A. 金黄色葡萄球菌                      B. 表皮葡萄球菌                      C. 腐生葡萄球菌

- D.乙型溶血性链球菌                      E.肺炎链球菌
3. 葡萄球菌与链球菌的主要鉴别试验是
- A.触酶试验                                      B.氧化酶试验                                      C.葡萄糖发酵试验
- D.杆菌肽敏感试验                              E.耐盐试验
4. 关于触酶试验的叙述, 错误的是
- A.触酶试剂有 3%和 30%过氧化氢两种                                      B.阳性结果是出现气泡
- C.此试验不能用血平板上的菌落                                      D.葡萄球菌触酶试验阴性
- E.30%过氧化氢仅用于淋病奈瑟菌与其他奈瑟菌的鉴别
5. 关于金黄色葡萄球菌的叙述, 错误的是
- A. 能产生凝固酶                                      B. 在血琼脂平板上产生  $\beta$ -溶血现象
- C. 能分解甘露醇                                      D. 对新生霉素耐药                                      E. 为  $G^+$ 不规则排列的球菌
6. 关于凝固酶试验错误的是
- A.凝固酶有结合型和游离型两种                      B.玻片法用于检测结合型凝固酶
- C.细菌使试管内血浆凝固呈胶冻状, 为试管法凝固酶试验阳性
- D.玻片法用稀释的血浆                                      E.主要用于金黄色葡萄球菌的鉴定
7. 腐生葡萄球菌常引起
- A.亚急性细菌性心内膜炎                                      B.类风湿性关节炎                                      C.尿路感染
- D.风湿热                                      E.蜂窝织炎
8. 鉴别表皮葡萄球菌和腐生葡萄球菌的药敏试验时
- A.苯唑西林                      B.新生霉素                      C.万古霉素                      D.青霉素                      E.头孢西丁
9. 触酶是
- A.过氧化氢酶                      B.脂酶                      C.DNA 酶                      D.溶纤维蛋白酶                      E.氧化酶

B 型题

(10~12 题共用备选答案)

- A.金黄色葡萄球菌                                      B.表皮葡萄球菌                                      C.腐生葡萄球菌
- D.A 群链球菌                                      E.B 群链球菌
10. 能产生凝固酶, 发酵甘露醇, 对新生霉素敏感的是
11. 不产生凝固酶, 不发酵甘露醇, 对新生霉素敏感的是
12. 不产生凝固酶, 不发酵甘露醇, 对新生霉素耐药的是

参考答案

1.C 2.A 3.A 4.D 5.D 6.D 7.C 8.B 9.A 10.A 11.B 12.C

## 【项目 2】葡萄球菌的药物敏感试验

### （一）材料准备

#### 1. 菌种

（1）标准对照菌：金黄色葡萄球菌 ATCC 25923

（2）分离待检菌：金黄色葡萄球菌

#### 2. 培养基 水解酪蛋白琼脂（M-H 琼脂）。

3. 试剂 无菌生理盐水、0.5 麦氏标准比浊管（相当于  $1.5 \times 10^8 \text{cfu/ml}$ ）、各专用抗菌药物纸片。

#### 4. 其他 无菌棉拭子、镊子、游标卡尺、恒温箱等。

### （二）内容及方法

1. 制备 M-H 琼脂 将配制好的 M-H 琼脂溶化，冷却到  $50^\circ\text{C}$  左右，倾注到 90mm 内径的平板内 25ml，使琼脂厚度为 4mm。配制的琼脂平板当天使用或置塑料密封袋中  $4^\circ\text{C}$  备用，使用前应将平板置  $35^\circ\text{C}$  孵育箱孵育，使其表面干燥。

#### 2. 菌液制备

（1）生长法：从培养 18~24h 纯培养琼脂平板上选取 3~5 个菌落，用接种环转移至含 4~5ml 的肉汤培养管（如胰酶消化大豆肉汤）中， $35^\circ\text{C}$  孵育 4~6h。用无菌盐水或肉汤调整菌液浊度相当于 0.5 麦氏标准。

（2）直接调制法：从孵育 18~24h 的非选择性培养基（如血琼脂）平板上，挑取单个菌落，直接用肉汤或无菌盐水制成 0.5 麦氏标准浊度的细菌悬液。

3. 接种 细菌悬液制备后 15min 内接种至 M-H 琼脂平板。用无菌棉拭蘸取细菌悬液，在试管内壁旋转挤去多余菌液后在 M-H 琼脂表面均匀涂布接种 3 次，每次旋转平板  $60^\circ$ ，最后沿平板内缘涂抹 1 周。

4. 贴药敏纸片 涂布后的平板在室温下干燥 3~5min，用纸片分配器或无菌镊子将纸片贴于琼脂表面并轻压，使纸片与琼脂表面完全接触。各纸片中心相距应大于 24mm，纸片距平板内缘应大于 15mm，纸片贴上后不能再移动位置。参照表 2-1 选择药敏纸片。

表 2-1 药敏纸片的选择

待测菌	药 物
金黄色葡萄球菌	青霉素 (P)、万古霉素 (VA)、头孢西丁 (FOX)、克林霉素 (DA)、环丙沙星 (CIP)、庆大霉素 (GN)、复方新诺明



(SXT)

5. 孵育 将平板单层倒置于 35℃孵箱（苛养菌药敏平板应放置于 5%~10%CO<sub>2</sub> 环境中 24~48h），16~18h（厌氧菌厌氧环境 48h）读取结果，葡萄球菌和肠球菌必须孵育 24h 以检测对苯唑西林和万古霉素的耐药性。

6. 结果判断 用游标卡尺量取抑菌圈直径(抑菌圈的边缘应是无明显细菌生长的区域)，先量取质控菌株的抑菌圈直径，以判断质控是否合格。然后量取试验菌株的抑菌圈直径，参照表 2-2 的标准判读结果。按敏感（S）、中介（I）、耐药（R）报告。

对某些细菌的抑菌圈判读有特殊要求：①葡萄球菌对苯唑西林的药敏试验或肠球菌对万古霉素的敏感试验，需要用透射光（将平板对着光线）量取抑菌圈，并且围绕纸片周围只要有极少细菌生长均提示为耐药；②有些菌，在抑菌圈内散在菌落生长提示可能是由菌液不纯引起，必须再分离鉴定及试验，也可能提示为高频突变株；③变形杆菌迁徙生长使抑菌圈内生成的薄层菌可忽略不计；④链球菌应检测生长抑制圈而不是溶血圈；⑤由于培养基内含有甲氧苄啶和磺胺拮抗物可使抑菌圈内有轻微细菌生长，生长层小于 20%可忽略不计。

表 2-2 纸片法药敏试验纸片含药量和结果解释

抗菌药物	纸片含药量	抑菌圈直径 (mm)		
		耐药	中介	敏感
GN	10μg	≤12	13~14	≥15
P	10units	≤28	-	≥29
FOX	1μg	≤21	-	≥22
CIP	5μg	≤15	16~20	≥21
VA	30μg	-	-	≥15
DA	2μg	≤14	15~20	≥21
SXT	1.25/23.75μg	≤10	11~15	≥16

7. 质量控制 标准菌株的抑菌圈应落在表 2-3 所示的预期范围内。如果超出该范围，应视为失控而不发报告，须及时查找原因，予以纠正。

表 2-3 质控标准菌株的抑菌圈预期值范围

抗菌药物	纸片含药量	抑菌圈直径 (mm)
		金黄色葡萄球菌 ATCC 25923
GN	10μg	19~27
P	10units	26~37
FOX	1μg	18~24
CIP	5μg	22~30
VA	30μg	17~21
DA	2μg	24~30
SXT	1.25/23.75μg	24~32

### (三) 注意事项

培养基的质量、药敏纸片的质量、接种菌量、操作技术、孵育条件、抑菌圈测量工具的精度和质控菌株本身的药敏特性等, 均能影响纸片扩散法抗生素敏感试验结果的准确性和精密度。

## 职考测试题

### A 型题

1. 药敏试验中“敏感”的含义是指
  - A. 细菌生长被抑制
  - B. 大剂量给药后, 细菌能被抑制
  - C. 小剂量给药后细菌能被抑制
  - D. 改变给药途径, 细菌能被抑制
  - E. 常规剂量给药后药物在体内感染部位达到的剂量能抑制细菌生长
2. 关于药敏试验错误的说法是
  - A. 稀释法是目前应用最广的药敏试验方法
  - B. 纸片质量是影响药敏试验结果的主要因素
  - C. 接种菌量过大, 可使抑菌圈缩小
  - D. 抑菌圈的测量范围以肉眼见不到细菌明显生长为限
  - E. 培养基中琼脂的含量、平板的厚度都会影响药敏试验的结果
3. 最低抑菌浓度的英文缩写是:
  - A. TBC
  - B. MBC
  - C. BAC
  - D. CBC
  - E. MIC
4. 目前应用最广的药敏试验方法是
  - A. K-B 法
  - B. 稀释法
  - C. E-test 法
  - D. 联合药敏试验
  - E. 自动化仪器法
5. K-B 法药敏试验所用培养基是
  - A. 普通琼脂培养基
  - B. 血平板
  - C. SS 平板
  - D. 水解酪蛋白琼脂
  - E. EMB
6. 关于药敏纸片, 错误的是
  - A. pH 中性
  - B. 直径 6.35mm
  - C. 用完应放 4℃ 冷藏
  - D. 用前应先放室温平衡 1 小时
  - E. 药敏纸片在 4℃ 保存不得超过 1 周
7. K-B 法药敏试验所用菌液含菌量为
  - A.  $1.5 \times 10^8$ /ml
  - B.  $2.0 \times 10^8$ /ml
  - C.  $2.5 \times 10^8$ /ml
  - D.  $3.5 \times 10^8$ /ml
  - E.  $4.5 \times 10^8$ /ml
8. 关于药敏试验操作正确的是
  - A. 制备好的平板从冰箱中取出即可应用
  - B. 可多个平板堆放培养
  - C. 培养温度 37℃
  - D. 接种细菌后在室温放置片刻, 再贴药敏纸片

E.接种细菌后在室温放置时间过长再贴药敏纸片,可使抑菌圈变大

9. 抑菌圈的大小与该药对待检菌的 MIC 呈

A.正相关      B.负相关      C.对数关系      D.指数关系      E.无关系

10. 不能在 M-H 培养基上生长良好的细菌是

A.肺炎链球菌      B.金黄色葡萄球菌      C.大肠埃希菌  
D.铜绿假单胞菌      E.肺炎克雷伯菌

11. 药敏试验时药敏纸片距平板内缘应大于

A.5mm      B.15mm      C.25mm      D.20mm      E.24mm

12. 链球菌做药敏试验时应在 M-H 中加入

A.葡萄糖      B.乳糖      C.氯化钠      D.脱纤维羊血      E.琼脂

13.与  $\beta$ -内酰胺类抗生素联用能增加其抗菌活性的是

A.亚胺培南      B.甲氧西林      C.红霉素      D.舒巴坦      E.克林霉素

#### B 型题

(14~16 题共用备选答案)

A.1 小时      B. <15 分钟      C.3~5 分钟      D.16~18 小时      E.18~24 小时

14. K-B 法药敏试验时,校正后的菌液接种时间

15. K-B 法药敏试验时,细菌涂布后,置室温干燥时间

16. K-B 法药敏试验培养时间

(17~19 题共用备选答案)

A. MRSA      B.MIC      C.MBC      D.AST      E.CLSI

17. 美国临床实验室标准化研究所

18. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌

19. 最低杀菌浓度

(20~22 题共用备选答案)

A.青霉素      B.红霉素      C.氯霉素      D.链霉素      E.氧氟沙星

20. 通过破坏细胞壁杀菌的是

21. 通过与细菌核糖体 50S 亚基结合,抑制细菌蛋白质合成的是

22. 通过与细菌核糖体 30S 亚基结合,抑制细菌蛋白质合成的是

参考答案

1. E    2. A    3. E    4. A    5. D    6. E    7. A    8. D    9. B    10. A    11. B    12. D    13. D    14. B    15. C

16.D 17.E 18.A 19.C 20.A 21.B 22.D

### 【项目 3】咽拭子标本链球菌的分离培养与鉴定

#### （一）材料准备

1. 菌种 咽拭子标本（学生互取）及 A 群链球菌、B 群链球菌、D 群链球菌、肺炎链球菌、甲型溶血性链球菌培养物

2. 培养基 血琼脂平板、血清肉汤、胆汁七叶苷、6.5%氯化钠肉汤、血 MH 平板等。

3. 试剂 新鲜血浆、3% $H_2O_2$ （新鲜配制）、氧化酶试剂、PYR 试剂、P 滤纸、10%去氧胆酸钠溶液、革兰染色液、杆菌肽药敏纸片、Optochin 药敏纸片等。

4. 器材 载玻片、镊子、游标卡尺、酒精灯、普通光学显微镜、生物安全柜、恒温培养箱等。

#### （二）内容及方法

##### 1. 咽拭子的分离培养

（1）标本采集：患者用清水漱口，面光而坐，头略后倾，张口发“啊”音，必要时使用压舌板。用无菌棉拭子轻柔、迅速地擦拭两腭弓、咽及扁桃体。

（2）接种与培养：将咽拭子标本连续划线接种在血平板上，或用咽拭子将标本在血平板一端反复涂抹，再用接种环分区划线。标记后，置 35℃温箱培养 18~24 小时，观察结果。

##### 2. 培养物观察

（1）菌落性状及溶血现象观察：①A、B 群溶血性链球菌在血琼脂平板上形成灰白色、光滑型小菌落，在菌落周围形成  $\beta$ -溶血现象；②D 群链球菌在血琼脂平板上可形成灰白色、光滑型小菌落，在菌落周围多数形成  $\alpha$ -溶血或  $\gamma$ -溶血，少数可形成  $\beta$ -溶血现象；③肺炎链球菌在血琼脂平板上形成灰白色、扁平、直径为 0.5~1.0mm 菌落，周围有草绿色溶血环。培养 2~3 天后，因菌体发生自溶，菌落中心凹陷呈“脐凹”状；④甲型溶血性链球菌形成灰白色、针尖大小的光滑型菌落，周围有草绿色溶血环。

（2）血清肉汤中生长现象观察：A、B 群链球菌呈沉淀生长，D 群链球菌、肺炎链球菌及甲型溶血性链球菌呈均匀混浊生长。

3. 革兰染色镜检 分别取咽拭子分离出的可疑菌、A 群链球菌、B 群链球菌、D 群链球菌、肺炎链球菌、甲型溶血性链球菌培养物涂片作革兰染色镜检：①A、B、D 群链球菌为  $G^+$  球菌，呈链状排列；②肺炎链球菌为  $G^+$ ，菌体呈矛头状，成双排列（钝端相对）；③甲型溶血性链球菌为  $G^+$  球菌，成双或呈短链状排列。

##### 4. 生化反应

(1) 触酶试验：挑取平板上的培养物（包括分离得到的可疑菌）进行触酶试验，各链球菌均为阴性。

(2) 转种生化培养基：①分别将 A 群链球菌、B 群链球菌、D 群链球菌接种于 6.5%NaCl、胆汁七叶苷等生化培养基中，置 35℃培养箱中孵育 18~24h。A、B 群链球菌两试验均为阴性，D 群链球菌 6.5%NaCl 阴性、胆汁七叶苷试验阳性；②分别将肺炎链球菌、甲型溶血性链球菌接种于菊糖培养基，置 35℃培养箱中孵育 18~24h 后观察结果。肺炎链球菌为阳性，甲型溶血性链球菌为阴性。③根据可疑菌的培养和形态特性，选择生化试验。

(3) CAMP 试验：①方法：在血琼脂平板上，用金黄色葡萄球菌划种一条直线，再分别将 A 群链球菌、B 群链球菌距金黄色葡萄球菌接种线 3mm 处呈直角接种一短线，用同样方法接种阴性和阳性对照菌，35℃培养箱中孵育 18~24h；②结果观察：B 群链球菌阳性，其他链球菌阴性。

(4) 胆盐溶菌试验：有平板法和试管法。

1) 操作：①平板法：直接将 10%去氧胆酸钠溶液滴在菌落上，置 35℃孵育 30min 后观察结果；②试管法：直接将 10%去氧胆酸钠溶液滴在血清肉汤培养物中，置 35℃孵育 15~30min 后观察结果。

2) 结果观察：肺炎链球菌菌落消失或血清培养物从混浊变澄清为胆盐溶菌试验阳性，甲型溶血性链球菌菌落不消失，血清培养物仍为混浊现象为胆盐溶菌试验阴性。

5. 胶乳凝集试验 用 A、B 和 D 3 群抗原的免疫血清分别致敏的胶乳颗粒，与链球菌进行间接胶乳凝集反应，于 10min 内观察结果，出现凝集为阳性。该试验可对链球菌作出分群鉴定。

## 6. 药敏试验

1) 方法：①杆菌肽敏感试验：分别将待检菌、A 群链球菌、B 群链球菌、D 群链球菌均匀涂布于血 MH 平板上，分别贴上 0.04U 杆菌肽药敏纸片，经 35℃孵育 18~24h；②Optochin 敏感试验：分别将肺炎链球菌、甲型溶血性链球菌均匀涂布于血 MH 平板上，分别贴上 5 μg Optochin 药敏纸片，置 35℃培养箱中孵育 18~24h。

2) 结果观察：①杆菌肽敏感试验：形成抑菌环为敏感，判断为 A 群链球菌；②Optochin 敏感试验：抑菌环直径 >14mm 为敏感，判断为肺炎链球菌。

## (三) 注意事项

(1) 进行杆菌肽试验时，被检菌的接种量要稍大，否则易出现假阳性。

(2) 进行胆盐溶菌试验（平板法）时，应认真观察菌落是否溶菌还是被试剂冲走移位。

## 职考测试题

### A 型题

- 关于肺炎链球菌的叙述错误的是  
A.是大叶性肺炎的病原菌  
B.在血琼脂培养基上形成周围有草绿色溶血环的灰白色菌落  
C.在普通琼脂培养基上形成灰白色，无溶血环的菌落  
D.典型患者痰标本呈铁锈色  
E.荚膜肿胀试验可用于肺炎链球菌的快速诊断
- 可用于风湿热辅助诊断的试验是  
A.乳糖发酵试验    B.抗“O”试验    C.肥达试验    D.凝固酶试验    E. OT 试验
- 关于 CAMP 试验错误的说法是  
A.CAMP 因子可促进金黄色葡萄球菌溶血素的活性  
B.阳性结果是在两菌交界处出现箭头状溶血  
C.试验在巧克力血平板上进行    D.用于链球菌属的鉴定  
E.B 群链球菌 CAMP 试验阳性
- 可产生自溶酶的细菌是  
A.肺炎链球菌    B.B 群链球菌    C.D 群链球菌  
D.A 群链球菌    E.C 群链球菌
- 在血平板上不能产生 $\beta$ -溶血的是  
A.金黄色葡萄球菌    B.B 群链球菌    C.D 群链球菌  
D.A 群链球菌    E.C 群链球菌
- A 群链球菌的主要鉴定试验是  
A.CAMP 试验阳性    B.PYR 试验阳性    C.对杆菌肽敏感  
D.胆汁七叶甘试验阳性    E.optochin 敏感试验阳性
- 链球菌中，致病力最强的是  
A.甲型溶血性链球菌    B.乙型溶血性链球菌    C.丙型链球菌  
D.B 群链球菌    E.D 群链球菌
- 矛头状成双排列，宽端相对的革兰阳性球菌最可能是  
A.肺炎链球菌    B.脑膜炎奈瑟菌    C.D 群链球菌  
D.A 群链球菌    E.淋病奈瑟菌

9. 下列试验对鉴别肺炎链球菌和甲链没有意义的是

- A.胆汁溶菌试验  
B.菊糖发酵试验  
C.甲型溶血  
D.菌落形态  
E.Optochin 试验

10. 奥普托欣 (Optochin) 试验属于

- A.鉴定细菌用的抑菌试验  
B.碳水化合物代谢试验  
C.呼吸酶类试验  
D.有机盐利用试验  
E.蛋白质代谢试验

**B 型题**

(11~13 题共用备选答案)

- A.CAMP 试验阳性  
B.PYR 试验阳性  
C.对杆菌肽敏感  
D.胆汁七叶甘试验阳性  
E.optochin 敏感试验阳性

11. B 群链球菌

12. D 群链球菌

13.肺炎链球菌

(14~15 题共用备选答案)

- A. G<sup>-</sup>球菌，无溶血，触酶试验阳性  
B. G<sup>+</sup>球菌，触酶试验阳性  
C. G<sup>+</sup>球菌，甲型溶血，触酶试验阴性  
D. G<sup>+</sup>球菌，乙型溶血，触酶试验阴性  
E. G<sup>+</sup>球菌，无溶血，触酶试验阴性

14. 葡萄球菌属

15. A 群链球菌

**参考答案**

1. C 2. B 3. C 4. A 5. C 6. C 7. B 8. A 9. C 10. A 11. A 12. D 13. E 14. B 15. D

## 任务三 肠杆菌科的常规检验

### 【项目 1】粪便标本的分离培养与鉴定

#### 1. 材料准备

(1) 培养基 普通琼脂平板、血琼脂平板、伊红亚甲蓝琼脂平板、麦康凯琼脂平板、SS 琼脂平板、KIA 斜面培养基、IMViC 试验用培养基、MIU 培养基等。

(2) 菌种 含目的菌的粪便标本（普通大肠埃希菌标准株、伤寒沙门菌、福氏志贺菌、普通变形杆菌、肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌）。

(3) 试剂 革兰染色液、生理盐水、氧化酶试剂。

(4) 器材 酒精灯、接种环（针）、载玻片、显微镜、培养箱、试管等。

## 2. 内容及方法

(1) 分离培养及菌落性状观察。

1) 将粪便标本用分区划线的方法接种于血平板、伊红亚甲蓝平板、麦康凯平板和 SS 平板培养基上。

2) 标记后，置于 35℃ 温箱中培养 18~24h 后观察结果。

3) 结果：六种细菌在血平板、伊红亚甲蓝平板、麦康凯平板和 SS 平板培养基上分离培养形成的菌落特性见表 3-1。

表 3-1 部分肠杆菌科细菌在血平板及肠道选择培养基上菌落特点

	血平板	EMB	SS 或麦康凯
大肠埃希菌	圆形、光滑、灰白色	红色或紫黑色有金属光泽的菌落	红色或粉红色菌落
伤寒沙门菌	圆形、光滑、半透明	透明或半透明的菌落	菌落中心常为黑色
福氏志贺菌	光滑、微隆起、半透明	无色透明或半透明	无色透明或半透明
肺炎克雷伯菌	灰白色、黏液状、可拉长丝	较大、红色、黏稠状	较大、红色、黏稠状
普通变形杆菌	波纹薄膜状生长	无色透明或半透明	菌落中心可呈黑色
阴沟肠杆菌	大而湿润、粘液状	较大的红色菌落	较大的红色菌落

(2) 革兰染色镜检 挑取分离培养获得的可疑菌落进行革兰染色后镜检，肠杆菌细菌均为革兰氏阴性杆菌。

(3) 生化反应

1) 氧化酶试验：挑取可疑菌落涂于洁净滤纸条上，滴加氧化酶试剂。10s 内菌落变红色或紫黑色为阳性，不变色则为阴性。肠杆菌科细菌氧化酶试验均为阴性。

2) 其他生化鉴定试验：取可疑菌落分别接种于硝酸盐还原试验、KIA 试验、MIU 试验、



IMViC 试验、苯丙氨酸脱氨酶试验、赖氨酸脱羧酶、β-半乳糖苷酶试验、鸟氨酸脱羧酶试验、精氨酸双水解酶试验用的培养基中，置于 35℃ 培养 18~24h 后观察结果（表 3-2 和表 3-3）。

表 3-2 部分肠杆菌科细菌主要生化特征（1）

	硝 酸 盐 还 原 试 验	KIA			IMViC			MIU			
		乳糖 发 酵	葡 萄 发 酵	硫 化 氢	吲 哚	甲 基 红	VP 试 验	枸 橼 酸 盐	动 力	吲 哚 脲 酶	
大肠埃希菌	++	A	⊕	-	+	+	-	-	+	+	-
伤寒沙门菌	++	K	⊕	+	-	+	-	+	+	-	-
福氏志贺菌	++	K	A	-	-/+	+	-	-	-	-/+	-
肺炎克雷伯菌	++	A	⊕	-	-/+	-	+	+	+	-/+	+
普通变形杆菌	++	K	⊖	+	+	+	-	-	+	+	+
阴沟肠杆菌	++	A	⊕	-	-	-	+	+	+	-	+/-

表 3-3 部分肠杆菌科细菌主要生化鉴定特征（2）

	苯丙氨酸脱氨酶	赖氨酸脱羧酶	鸟氨酸脱羧酶	精氨酸双水解酶
大肠埃希菌	-	+	+/-	-/+
伤寒沙门菌	-	+	+	+/-
福氏志贺菌	-	-	-	-
肺炎克雷伯菌	-	+	-	-
普通变形杆菌	+	-	-	-
阴沟肠杆菌	-	-	+	+

## 职考测试题

### A 型题

- 关于抑制剂的叙述，错误的是
  - 抑制非目的菌的生长
  - 利于目的菌的检出
  - 抗生素可用作抑制剂
  - 胆盐、煌绿可作为抑制剂
  - 染料不能用作抑制剂
- 属于强选择培养基的是
  - EMB
  - SS
  - MAC
  - 中国蓝
  - KIA
- 肠道选择培养基中含有的鉴别糖是
  - 葡萄糖
  - 乳糖
  - 麦芽糖
  - 甘露醇
  - 蔗糖
- 能分解乳糖，在肠道选择培养基上形成有色菌落的是
  - 大肠埃希菌
  - 伤寒沙门菌
  - 痢疾志贺菌
  - 变形杆菌
  - 爱德华菌
- 不能分解乳糖，在肠道选择培养基上形成无色菌落的是
  - 大肠埃希菌
  - 肺炎克雷伯菌
  - 阴沟肠杆菌
  - 粘液沙雷菌
  - 变形杆菌
- 硫化氢试验阴性的细菌是



- A. 发酵葡萄糖，氧化酶-，硝酸盐还原试验-
- B. 不发酵葡萄糖，氧化酶-，硝酸盐还原试验-
- C. 发酵葡萄糖，氧化酶-，硝酸盐还原试验+
- D. 发酵葡萄糖，氧化酶+，硝酸盐还原试验-
- E. 不发酵葡萄糖，氧化酶-，硝酸盐还原试验+

18. 能迟缓发酵乳糖的是

- A. 痢疾志贺菌 1 型
- B. 福氏志贺菌
- C. 鲍氏志贺菌
- D. 宋内氏志贺菌
- E. 痢疾志贺菌 2 型

19. 菌落呈粘液型，用接种环挑取呈长丝状，最有可能是

- A. 大肠埃希菌
- B. 伤寒沙门菌
- C. 肺炎克雷伯菌
- D. 普通变形杆菌
- E. 痢疾志贺菌

20. 我国引起菌痢的多是

- A. 福氏和宋内氏志贺菌
- B. 福氏和鲍氏志贺菌
- C. 痢疾和鲍氏志贺菌
- D. 痢疾和宋内氏志贺菌
- E. 宋内氏和鲍氏志贺菌

21. 血清型为 O157: H7 的大肠埃希菌是

- A. EIEC
- B. EPEC
- C. ETEC
- D. EHEC
- E. EAEC

#### B 型题

(22~23 题共用备选答案)

- A. SS
- B. EMB
- C. TCBS
- D. MIU
- E. KIA

22. 双糖铁培养基

23. 伊红亚甲蓝培养基

(24~25 题共用备选答案)

- A. EIEC
- B. EPEC
- C. ETEC
- D. EHEC
- E. EAEC

24. 引起霍乱样腹泻的是

25. 引起痢疾样腹泻的是

(26~29 题共用备选答案)

- A. 无色菌落
- B. 红色菌落
- C. 红色黏稠大菌落
- D. 紫黑色有金属光泽的菌落
- E. 无色但中心有黑色沉淀的菌落

26. 大肠埃希菌在 EMB 上形成的菌落

27. 肺炎克雷伯菌在 MAC 上形成的菌落

28. 变形杆菌在 SS 上形成的菌落

29. 痢疾志贺菌在 SS 上形成的菌落

(30~31 题共用备选答案)

A.胆盐            B.染料            C.枸橼酸钠            D.抗生素            E.亚硫酸盐

30. SS 琼脂中, 能抑制 G<sup>+</sup>菌生长的物质是

31. EMB 琼脂中, 能抑制 G<sup>+</sup>菌生长的物质是

(32~34 题共用备选答案)

A.分解乳糖产酸、产气, 有动力            B.分解葡萄糖产酸产气, 无动力

C.分解乳糖产酸不产气, 有动力            D.分解葡萄糖产酸、不产气, 无动力

E.不分解乳糖, 分解葡萄糖, 有动力

32. 大肠埃希菌

33. 福氏志贺菌

34. 伤寒沙门菌

参考答案

1.E 2.B 3.B 4.A 5.E 6.A 7.B 8.B 9.A 10.D 11.B 12.B 13.C 14.C 15.A  
16.D 17.C 18.D 19.C 20.A 21.D 22.E 23.B 24.C 25.A 26.D 27.C 28.E 29.A  
30.A 31.B 32.A 33.D 34.E

## 【项目 2】血清学鉴定

### (一) 材料准备

1. 菌种 伤寒沙门菌、甲型副伤寒沙门菌、福氏志贺菌。
2. 试剂 沙门菌属多价和单价诊断血清、志贺菌属多价和单价诊断血清。
3. 器材 酒精灯、接种环、接种针、载玻片。

### (二) 内容及方法

1. 沙门菌血清学鉴定 分别取伤寒沙门菌、甲型副伤寒沙门菌, 与沙门菌属多价血清进行玻片凝集反应, 若与 A~F 多价 O 血清凝集, 确定为 A~F 群后, 用单价 O 因子血清鉴定到具体的群, 再用 H 因子血清第一相(特异相)定型, 最后用 H 因子血清第二相(非特异相)辅助定型。沙门菌属常见菌种抗原构造见表 3-4。

如果细菌生化反应符合沙门菌, 但 A~F 多价 O 血清与细菌不产生凝集现象, 则可能是表面抗原(Vi)存在导致的假阴性, 可通过加热或传代去除 Vi 抗原后再进行凝集试验, 如去除 Vi 抗原后仍不凝集, 则可能为 A~F 以外菌群, 可送当地疾病控制中心鉴定。

表 3-4 沙门菌属常见菌种抗原构造

组	菌名	O 抗原	H 抗原	
			第 1 相	第 2 相
A	甲型副伤寒沙门菌	1、2、12	a	-
B	肖氏沙门菌	1、4、5、12	b	1、2
	鼠伤寒沙门菌	1、4、5、12	i	1、2
C	希氏沙门菌	6、7、(Vi)	c	1、5
	猪霍乱沙门菌	6、7	c	1、5
D	伤寒沙门菌	9、12 (Vi)	d	-
	肠炎沙门菌	1、9、12、	g、f	-
E	鸭沙门菌	3、10	e、h	1、6
F	阿伯丁沙门菌	11	i	1、2

2. 志贺菌血清学鉴定：取福氏志贺菌，与志贺菌属多价血清进行玻片凝集反应，如凝集反应阳性则再进一步与单价血清依次进行凝集反应从而确定血清群。

如生化特征符合志贺菌，而与 4 种多价血清不凝集的菌株，可能为 K 抗原阻断所致，可通过加热破坏 K 抗原，再进行凝集试验，如仍不凝集，则可能为 EIEC 菌株，需进一步鉴别。

### 职考测试题

#### A 型题

1. 沙门菌属的 Vi 抗原属于

- A.菌体抗原      B.鞭毛抗原      C.表面抗原      D.O 抗原      E.H 抗原

2. 下列有 Vi 抗原的沙门菌是

- A.伤寒沙门菌      B.甲型副伤寒沙门菌      C.猪霍乱沙门菌  
D.鼠伤寒沙门菌      E.肖氏沙门菌

3. 关于 Vi 抗原错误的是

- A.是不稳定抗原      B.可阻止 H 抗原与相应抗体的凝集反应  
C.加热 60℃,30 分钟可将其破坏      D.人工传代可消失  
E.伤寒沙门菌和希氏沙门菌有此抗原

4. 能与 AFO 诊断血清凝集的沙门菌属于

- A.A 群      B.B 群      C.A~F 群以外      D.A~E 群      E. A~F 群

5. 能与 O<sub>2</sub> 因子血清凝集的是

- A.甲型副伤寒沙门菌      B.希氏沙门菌      C.肖氏沙门菌  
D.伤寒沙门菌      E.不能确定

6. 能与 O<sub>9</sub> 凝集，并有 Vi 抗原的是

- A.甲型副伤寒沙门菌                      B.希氏沙门菌                      C.肖氏沙门菌  
D.伤寒沙门菌                              E.不能确定

7. 能与 O<sub>4</sub> 凝集的是

- A.鼠伤寒沙门菌                      B.希氏沙门菌                      C.肖氏沙门菌  
D.伤寒沙门菌                              E.B 群沙门菌

参考答案

1.C 2.A 3.B 4.E 5.A 6.D 7.E

### 【项目 3】肥达反应

(一) 材料准备

1. 诊断菌液 伤寒沙门菌 O 和 H 抗原、甲型和肖氏沙门菌的 H 抗原 PA 和 PB 等。
2. 器材 培养箱、离心机、微量加样器等。

(二) 内容及方法

1. 抽取静脉血约 3ml 于真空管中，3000r/m 离心 5min 分离血清。
2. 取小试管 28 支放于试管架上，共 4 排 7 列，于第一列 4 支小试管，自前而后依次标明“O”、“H”、“PA”、“PB”，分别代表 O 抗原、H 抗原、PA 抗原和 PB 抗原，见表 3-5。

表 3-5 肥达反应试验方法

	小试管（每管加 0.5ml 稀释血清）						对照管
	1: 20	1: 40	1: 80	1: 160	1: 320	1: 640	生理盐水
O 抗原	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
H 抗原	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
PA 抗原	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
PB 抗原	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
血清最终稀释倍数	1: 40	1: 80	1: 160	1: 320	1: 640	1: 1280	—

3) 取中试管一支，加生理盐水 3.8ml，取血清 0.2ml，混匀，即为 1: 20 稀释血清。分别取 1: 20 稀释血清 0.5ml 加入第一列的 4 支小试管中。

中试管中剩余 1: 20 稀释血清 2ml，再加入生理盐水 2ml，即为 1: 40 稀释血清。分别取 1: 40 稀释血清 0.5ml 加入第二列的 4 支小试管中。

同上将中试管中剩余稀释血清用生理盐水倍比稀释后，再加入下一列小试管中，直至第 6 列。

第 7 列的小试管内分别加入生理盐水 0.5ml 为对照管。

4) 在第 1 列至第 7 列的小试管中再分别加入诊断抗原 0.5ml，第 1 排至第 4 排的小试

管中分别加入伤寒沙门菌 O 抗原、伤寒沙门菌 H 抗原、甲型副伤寒沙门菌 H 抗原 PA、肖氏沙门菌 H 抗原 PB。

5) 振荡混匀后, 将试管架放于 37℃ 水浴箱 4h 或 45℃ 水浴箱 2h, 取出后不要震荡, 尽快观察; 或放 4℃ 冰箱内过夜, 第二天观察并记录结果。

6) 结果观察时, 先观察对照管, 应无凝集反应, 再观察其他小试管的凝集情况, 并与对照管比较。根据凝集块多少和液体透明度, 判断结果 (表 3-6)。

表 3-6 肥达反应结果判断标准

结果	凝集块	液体透明度
-	无细菌凝集块	液体均匀浑浊
+	管底仅有少量细菌凝集成块	上清液浑浊, 上清液澄清晰度 25%
2+	约 50% 细菌凝集成块沉于管底	上清液澄清晰度达 50%
3+	大部分细菌凝集成块沉于管底	上清液澄清晰度达 75%
4+	细菌全部凝集成块沉于管底	上清液完全澄清

一般伤寒沙门菌 O 凝集效价  $\geq 80$ , H 效价  $\geq 160$ , 副伤寒 A、B、C 的 H 效价  $\geq 80$  有意义。若 O、H 均升高, 则伤寒、副伤寒可能性大; O 不高而 H 高可能为预防接种的回忆反应; O 高而 H 不高则可能为感染早期或与伤寒沙门菌 O 抗原有交叉反应的其他沙门菌感染, 可于一周后复查, 如 H 升高则可诊断。

### 3. 注意事项

肥达试验时, 应在发病早期及恢复期分别采集血清标本进行检查, 若恢复期比初次效价  $\geq 4$  倍者有诊断价值。

## 职考测试题

### A 型题

1. 肥达反应主要用于辅助诊断

- A. 伤寒                  B. 斑疹伤寒                  C. 猩红热                  D. 风湿热                  E. 恙虫热

2. 肥达反应的原理属于

- A. 直接凝集反应                  B. 间接凝集反应                  C. 间接凝集抑制试验  
D. 协同凝集试验                  E. 间接血凝试验

3. 关于肥达反应的叙述, 错误的是

- A. 若 O、H 均升高, 则伤寒、副伤寒可能性大  
B. 若 O 不高而 H 高可能为预防接种的回忆反应  
C. 若 O 高而 H 不高则可能为感染早期

D.若 O 高而 H 不高,一周后 H 升高,则可诊断伤寒、副伤寒

E.必要时可加入 Vi 抗原的检测

4. 若肥达反应结果为 TO: 640, TH: 80, PA : 160, PB: 40, 正确的诊断是

A.甲型副伤寒      B.乙型副伤寒      C.丙型副伤寒      D.伤寒      E.伤寒早期

(5~7 题共用题干)

患者,男,23 岁。食欲不振、乏力、腹胀、发热 5 天入院。查体:体温 39.5℃,相对缓脉,肝脾略肿大,腹部见少许玫瑰疹。便中查到少量脓细胞。血常规白细胞无变化。血和便培养均未发现致病菌。肥达试验结果: TO 1:80, TH 1:80, PA 1:40, PB 1:40

5. 初步诊断是

A.肠热症                              B.急性胃肠炎                              C.细菌性痢疾  
D.假膜性肠炎                              E.急性肝炎

6. 入院第 10 天,再次采血做肥达试验,结果是 TO : 320, TH : 160, PA : 40, PB : 40, 病原菌有可能是

A.伤寒沙门菌                              B.甲型副伤寒沙门菌                              C.希氏沙门菌  
D.肖氏沙门菌                              E.肠炎沙门菌

7. 为进一步确定病原菌,应做什么检查?

A.再做肥达反应                              B.血细菌培养                              C.骨髓细菌培养  
D.肝脾 B 超                              E.粪便涂片镜检

8. 细菌培养物可与沙门菌 O9 因子血清发生凝集,该疾病的确切诊断是

A.伤寒                              B.甲型副伤寒                              C.乙型副伤寒  
D.丙型副伤寒                              E.斑疹伤寒

参考答案

1.A 2.A 3.E 4.A 5.A 6.A 7.C 8.A

### 【项目 4】大肠埃希菌的药物敏感试验

(一) 材料准备

1. 菌种 分离待检菌(大肠埃希菌)
2. 培养基 水解酪蛋白琼脂(M-H 琼脂)。
3. 试剂 无菌生理盐水、0.5 麦氏标准比浊管、各专用抗菌药物纸片。
4. 其他 无菌棉拭子、镊子、直尺(或游标卡尺)、恒温箱等。

(二) 内容及方法



1. 菌液制备 配制浊度相当于 0.5 麦氏标准管的待检菌菌液。
2. 接种 用无菌棉拭蘸取细菌悬液，在试管内壁旋转挤去多余菌液后在 M-H 琼脂表面均匀涂布接种 3 次，每次旋转平板 60°，最后沿平板内缘涂抹 1 周。
3. 贴药敏纸片 参照表 3-7 选择药敏纸片。

表 3-7 药敏纸片的选择

待测菌	药 物
大肠埃希菌	头孢唑林 (CZ)、庆大霉素 (GN)、氨苄西林/舒巴坦 (AMS)、 头孢曲松 (CRO)、环丙沙星 (CIP)、亚胺培南 (IMP)

4. 孵育 将平板单层倒置于 35℃ 孵箱中，16~18h 观察结果。
5. 结果判断 用游标卡尺量取抑菌圈直径，根据表 3-8 判定结果

表 3-8 纸片法药敏试验纸片含药量和结果解释

抗菌药物	纸片含药量	抑菌圈直径 (mm)		
		耐药	中介	敏感
GN	10μg	≤12	13~14	≥15
CZ	30μg	≤14	15~17	≥18
CRO	30μg	≤13	14~20	≥21
AMS	10/10μg	≤11	12~14	≥15
IMP	10μg	≤13	14~15	≥16
CIP	5μg	≤15	16~20	≥21

### (三) 注意事项

培养基的质量、药敏纸片的质量、接种菌量、操作技术、孵育条件、抑菌圈测量工具的精度和质控菌株本身的药敏特性等，均能影响纸片扩散法抗生素敏感试验结果的准确性和精密密度。

## 任务四 铜绿假单胞菌的常规检验

### 【项目 1】鞭毛染色法

#### (一) 材料准备

1. 标本 待检细菌培养物。
2. 试剂 甲液 (5%石炭酸10ml、鞣酸2g、饱和硫酸铝钾10ml)、乙液 (结晶紫酒精饱和液)。应用液 (甲液10份、乙液1份，混合即可，室温存放)。
3. 器材 显微镜、载玻片、接种环、酒精灯、染色架等。

#### (二) 操作方法

1. 制片 在载玻片上滴蒸馏水2滴。一张玻片可同时制2个涂片。用接种环挑取菌落少许，将细菌点在玻片上蒸馏水滴的顶部，置室温自然干燥。

2. 染色 滴加染液于涂片上，染色约10~15min后，用蒸馏水缓慢冲去多余染液。

3. 镜检 涂片自然干燥后镜检，镜检时应从涂片的边缘开始，逐渐移向中心，寻找细菌较少的视野，仔细观察。

4. 结果 铜绿假单胞菌一端有1~3根鞭毛。

### (三) 注意事项

1. 要求用新的载玻片。使用前须在95%酒精中浸泡24h以上。用时从酒精中取出，以干净纱布擦干后使用。

2. 一般只需点一下，仅允许极少量细菌进入水滴，不可搅动，以免鞭毛脱落。

3. 冲洗时应避免使染液表面的金属光泽液膜滞留在玻片上，影响镜检。

4. 细菌密集的地方，鞭毛被菌体挡住，不易观察。

## 【项目2】铜绿假单胞菌的鉴定

### (一) 材料准备

1. 菌种 铜绿假单胞菌培养物（普通平板、血平板和液体培养基）。

2. 培养基 II系列生化反应培养基。

3. 试剂 氧化酶试剂、革兰染色液、鞭毛染色液、生理盐水等。

4. 器材 显微镜、孵育箱、小试管、载玻片、盖玻片、接种针、接种环、酒精灯等。

### (二) 内容及方法

1. 培养物菌落性状观察 在普通平板上形成伸展和扁平、大小不一、边缘不整齐、光滑、湿润、且常呈融合状态的菌落。琼脂和菌落被其产生的水溶性色素青脓素染成绿色或蓝绿色，有生姜气味。在血平板上，菌落周围有透明溶血环。

#### 2. 形态结构观察

(1) 革兰染色：该菌为革兰阴性杆菌，菌体长短不一，常呈多形性。

(2) 动力检查：用悬滴或压滴法观察细菌的动力。

1) 悬滴法：取洁净凹玻片，在凹孔四周平面上涂一薄层凡士林，用无菌吸管取菌液滴至盖玻片中央，将凹玻片的凹孔对准盖玻片中央的菌液并盖于其上，迅速翻转玻片，用小镊子轻压盖玻片四周使其与凹孔边缘粘紧封闭，置普通光学显微镜油镜下观察。

2) 压滴法：用无菌吸管或灭菌接种环取少许细菌培养液至玻片中央，夹一盖玻片使其一边接触菌液边缘，然后缓慢放下覆盖于菌液上，置普通光学显微镜油镜下观察。

3) 结果：有鞭毛的细菌呈方向性位移，为真正运动；无鞭毛的细菌因水分子撞击而在原位颤动称布朗运动。

(3) 鞭毛染色：该菌一端有 1~3 根鞭毛。

3. 生化反应 将铜绿假单胞菌接种于 II 系列生化反应培养基中，35℃ 培养 18~24 小时，观察结果。铜绿假单胞菌氧化酶阳性，氧化分解葡萄糖、木糖产酸不产气，能液化明胶，还原硝酸盐并产生氮气，能利用枸橼酸盐，精氨酸双水解酶阳性。

### (三) 注意事项

1. 从临床分离的菌株中有部分不产生色素，尤其是从痰液中分离的菌落为粘液型的铜绿假单胞菌，常不产生色素，但在室温中接种数代后常可恢复典型菌落和产生色素能力。

2. 对于不产生色素的铜绿假单胞菌，可通过硝酸盐还原试验，42℃ 生长以及在含 2.0g/L 的硫酸镉琼脂生长加以确定。

## 【项目 3】铜绿假单胞菌的药物敏感试验

### (一) 材料准备

1. 菌种 铜绿假单胞菌
2. 培养基 水解酪蛋白琼脂 (M-H 琼脂)。
3. 试剂 无菌生理盐水、0.5 麦氏标准比浊管、各专用抗菌药物纸片。
4. 其他 无菌棉拭子、镊子、游标卡尺、恒温箱等。

### (二) 内容及方法

1. 制备培养基 制备直径 90mm，厚度 4mm 的 M-H 培养基。
2. 菌液制备 配制浊度相当于 0.5 麦氏标准管的待检菌菌液。
3. 接种 用无菌棉拭蘸取细菌悬液，在试管内壁旋转挤去多余菌液后在 M-H 琼脂表面均匀涂布接种 3 次，每次旋转平板 60°，最后沿平板内缘涂抹 1 周。
4. 贴药敏纸片 参照表 4-1 选择药敏纸片。

表 4-1 药敏纸片的选择

待测菌	药 物
铜绿假单胞菌	头孢他啶 (CAZ)、庆大霉素 (GN)、哌拉西林 (PRL)、阿米卡星 (AK)、氨曲南 (ATM)、环丙沙星 (CIP)、亚胺培南 (IMP)

5. 孵育 将平板单层倒置于 35℃ 孵箱中，16~18h 观察结果。
6. 结果判断 用游标卡尺量取抑菌圈直径，根据表 4-2 判定结果

### (三) 注意事项

培养基的质量、药敏纸片的质量、接种菌量、操作技术、孵育条件、抑菌圈测量工具的精度和质控菌株本身的药敏特性等，均能影响纸片扩散法抗生素敏感试验结果的准确性和精

密度。

表 4-2 纸片法药敏试验纸片含药量和结果解释

抗菌药物	纸片含药量	抑菌圈直径 (mm)		
		耐药	中介	敏感
AK	30µg	≤14	15~16	≥17
GN	10µg	≤12	13~14	≥15
PRL	100µg	≤17	-	≥21
CAZ	30µg	≤14	15~17	≥18
ATM	30µg	≤15	16~21	≥22
IMP	10µg	≤13	14~15	≥16
CIP	5µg	≤15	16~20	≥21

### 职考测试题

#### A 型题

1. 铜绿假单胞菌是

- A.兼性厌氧菌  
B.兼性需氧菌  
C.微需氧菌  
D.专性厌氧菌  
E.专性需氧菌

2. 铜绿假单胞菌可生长温度为

- A.4~42℃  
B.20~42℃  
C.35~42℃  
D.35~37℃  
E.35℃

3. 铜绿假单胞菌感染最常见于

- A.大面积烧伤  
B.尿路感染  
C.下呼吸道感染  
D.肠道感染  
E.上呼吸道感染

4. 铜绿假单胞菌特性不包括

- A.有 1~3 根鞭毛  
B.可产生水溶性色素  
C.4℃不生长  
D.培养物有生姜气味,有金属光泽  
E.氧化酶试验阴性

5. 铜绿假单胞菌 O-F 试验结果是

- A.开管闭管均变黄  
B.开管不变,闭管变黄  
C.开管变黄,闭管不变  
D.均不变色  
E.发酵葡萄糖

6. 铜绿假单胞菌硝酸盐还原试验的结果是

- A.加入试剂不变红,加入锌粉变红  
B.加入试剂变红  
C.加入试剂不变红,加入锌粉亦不变  
D.还原硝酸盐为亚硝酸盐  
E.还原硝酸盐产生氨

7. 不能判断细菌有无鞭毛的是

- A.革兰染色法                      B.鞭毛染色方                      C.压滴法  
D.悬滴法                              E.半固体穿刺接种培养法
8. 关于鞭毛染色错误的是
- A.涂片用生理盐水                      B.涂片时点种细菌                      C.不得干燥固定  
D.不得用滤纸吸干                      E.涂片用蒸馏水

参考答案

1.E 2.B 3.A 4.E 5.C 6.C 7.A 8.A

## 任务五 结核分枝杆菌的常规检验

### 【项目 1】 痰标本结核分枝杆菌的检查-抗酸染色法

#### （一）材料准备

1. 标本 待检痰标本。
2. 试剂 萘—尼抗酸染色液、40g/L NaOH 等。
3. 器材 显微镜、载玻片、接种环、酒精灯、染色架等。

#### （二）内容及方法

##### 1. 涂片

（1）直接涂片：用接种环或竹签挑取痰标本的脓性或干酪样部分约 0.01ml，制成 10mm×10mm 大小的均匀薄涂片，或取上述标本 0.1 ml，制成 20mm×15mm 大小的厚膜涂片，自然干燥，火焰固定。

（2）漂浮集菌涂片：取痰标本 2~3ml，放入 100ml 锥形瓶内，加 1~2 倍量的 40g/L NaOH，经煮沸 30min 或 103.4kPa 高压灭菌 20~25min，冷却后滴加汽油二甲苯 0.3ml，塞紧瓶口振荡 10min，加入 2% 盐水至瓶口，静置 10~15min，将抗酸菌吸附至液面。吸取液体及汽油层之间的乳油样物质置于已加温的玻片上，反复 5~6 次，制片，干燥固定后，加乙醚或纯乙醇脱脂。或在加入 2% 盐水至瓶口静置 10~15min 后，把已编号的载玻片盖于瓶口上，静置 15~20min，取下载玻片并迅速翻转使浸膜向上，自然干燥，火焰固定。

（3）沉淀集菌涂片：取痰标本 2~3ml，加 1~2 倍量的 40g/L NaOH 混匀，经煮沸 30min 或 103.4kPa 高压灭菌 20~25min，冷却后，3000r/min 离心 30min，使细菌集中于试管底部，取沉淀物涂片，自然干燥，火焰固定。

##### 2. 染色

- （1）初染：细菌标本涂片经自然干燥固定后，先滴加石碳酸复红染液覆盖痰膜，弱火

加温染色（勿煮沸或煮干）5min，冷却后水洗。

（2）脱色：用 3%盐酸酒精脱色（至无红色脱褪），水洗。

（3）复染：用亚甲蓝液复染 1min，水洗，待干燥后镜检。

3. 镜检 用油镜观察涂片，在蓝色背景下可见红色细长或略弯曲的杆菌，有分枝生长趋向，是为抗酸染色阳性菌。其它细菌或细胞均染为蓝色。直接涂片标本中，常见菌体单独存在，偶见成团成堆者。在痰液、脑脊液及胸腹水中查见抗酸菌，则诊断意义较大。抗酸染色结果按下列方式报告：

连续仔细观察至少 300 个不同视野，未发现抗酸杆菌，报告为：—

100~300 视野内发现 1~2 条抗酸菌（全部涂膜镜检三遍），报告为：±

100 视野内发现 3~9 条抗酸菌（全部涂膜镜检一遍），报告为：+

10 视野内发现 1~9 条抗酸菌，报告为：2+

每个视野内发现 1~9 条抗酸菌，报告为：3+

每个视野内发现 9 条以上抗酸菌，报告为：4+

（三）注意事项

（1）涂片一般自然干燥，在火焰固定，漂浮集菌涂片干燥固定后，须加乙醚或纯乙醇脱脂。

（2）滴加石碳酸复红染液应覆盖痰膜，弱火加热至出现蒸汽后，勿煮沸或煮干，随时补充染液以防干涸。

（3）水洗时，将载玻片倾斜，以细小水流冲于玻片上端，使水流沿载玻片斜面流下，切忌将水流直冲菌膜部位，以免菌膜脱落。

（4）脱色时直至涂片无红色染液脱下为止，但不可超过 10min。

## 【项目 2】 痰标本结核分枝杆菌的分离培养

（一）材料准备

1. 标本 待检痰标本。
2. 培养基 改良罗氏培养基培。
3. 试剂 4% NaOH 溶液。
3. 器材 接种环、酒精灯等。

（二）内容及方法

1. 标本前处理 进行分枝杆菌 L-J 培养的临床标本通常需要进行标本前处理。

（1）目的：一是除去分枝杆菌以外的杂菌（去污染），二是液化标本。

(2) 方法：在痰标本中，加入 1~2 倍体积 4% NaOH，用振荡器震荡 2~3 分钟，使标本充分液化。

(3) 注意：前处理过程中，应尽可能地减少对分枝杆菌的损害，要严格掌握前处理时氢氧化钠的浓度和时间，一般不得超过 20 分钟。

2. 接种及培养 取前处理后的标本 0.1ml，无菌操作接种于培养基斜面上，每份标本同时接种两支。接种后将培养管先平放，后直立于 35℃温箱中孵育。

3. 结果 ①3d 内有菌落，可报告非分枝杆菌（污染菌）生长；②7d 内有菌落生长，并经抗酸染色确认，可报告非结核分枝杆菌生长（快速生长型）；③7d 以后有菌落生长，并经抗酸染色确认，方可报告分枝杆菌生长；④若满 8w 仍无菌落生长，方可报告培养阴性。观察时要注意菌落的外观和色素产生情况。

4. 报告 ①分枝杆菌培养阴性：斜面无菌落生长；②分枝杆菌培养阳性（1+）：菌落生长占斜面面积的 1/4；③分枝杆菌培养阳性（2+）：菌落生长占斜面面积的 1/2；④分枝杆菌培养阳性（3+）：菌落生长占斜面面积的 3/4；⑤分枝杆菌培养阳性（4+）：菌落生长布满整个斜面。分枝杆菌培养阴性应以“培养阴性”报告，不得以“-”表示。菌落生长不足斜面面积 1/4 者，报实际菌落数。

### （三）注意事项

所有标本瓶、接种物品及培养管等应尽量采用一次性物品，使用后高压灭菌，方可处置。

## 职考测试题

### A 型题

1. 检查结核分枝杆菌最常用的染色方法是  
A. 革兰染色法      B. 吉姆萨染色法      C. 抗酸染色法      D. 镀银染色法      E. 墨汁染色法
2. 抗酸染色结核分枝杆菌染成  
A. 红色      B. 兰色      C. 紫色      D. 棕褐色      E. 黑色
3. 关于结核分枝杆菌错误的是  
A. 革兰染色呈紫色      B. 菌体细长略弯曲      C. 抗酸染色呈红色  
D. 菌体富含脂类      E. 对酸碱敏感
4. 抗酸染色常用的脱色剂是  
A. 75%乙醇      B. 95%的乙醇      C. 100%的乙醇      D. 3%盐酸乙醇      E. 3%盐酸
5. 痰标本抗酸染色前需 103.43kPa 高压灭菌 20~25min，最主要的目的是  
A. 杀死杂菌      B. 杀死结核分枝杆菌      C. 液化痰液

D.防止杂菌污染

E.菌体更易着色

6. 为了增加抗酸染色结核分枝杆菌的检出率, 最好的方法是

A.薄涂片

B.厚涂片

C.集菌涂片

D.延长染色时间

E.减少脱色时间

7. 关于抗酸染色错误的是

A.厚膜涂片是取 0.1 ml 标本, 制成 20mm×15mm 的菌膜

B.漂浮集菌涂片干燥固定后, 需用乙醚脱脂

C.初染用染色液是稀释复红

D.涂片需自然干燥

E.吸干染色后标本的滤纸不能重复使用

8. 关于抗酸染色结果观察正确的是

A.连续观察至少 100 个视野, 未发现抗酸杆菌, 报告为: -

B.兰色细长或略弯曲的杆菌为抗酸阳性菌

C.背景及杂菌被染成红色

D.每个视野内发现 3 条抗酸菌, 报告为: 3+

E.全部涂膜镜检一遍, 发现 2 条抗酸菌报告为: +

9. 生长速度最慢的细菌是

A.肺炎链球菌

B.脑膜炎链球菌

C.新型隐球菌

D.结核分枝杆菌

E.铜绿假单胞

10. 不属于分枝杆菌属特点的是

A.有分枝生长趋势

B.含大量脂质

C.一般不易着色

D.革兰染色呈阴性

E.能抵抗盐酸乙醇脱色

11. 通常用于培养结核分枝杆菌的培养基是

A.血平板

B.TCBS

C.EMB

D.巧克力色血平板

E.罗氏培养基

12. 疑为结核患者的标本分离培养后, 在可弃去之前应观察的时间是

A.2 天

B.5 天

C.15 天

D.4 周

E.8 周

13. 用于结核分枝杆菌分离培养的痰液, 前处理常用的消化液是

A.1%KOH

B.2%KOH

C.2~4%NaOH

D.1%NaOH

E.0.5%NaOH

14. 关于结核分枝杆菌培养特性, 错误的是

A.专性需氧

B.35~40℃均可生长

C.培养需要一定湿度

D.形成光滑型菌落

E.有毒菌株在液体培养基中呈索状生长



15. 分枝杆菌属最大的特点是

- A.细胞壁含大量脂质                      B.无特殊结构                      C.呈分枝生长趋势  
D.一般不易着色                      E.抗盐酸乙醇脱色

16. 为了使结核分枝杆菌培养呈均匀分散生长，培养基中需加入

- A. 聚山梨醇酯-80                      B.鸡蛋                      C.血清                      D.马铃薯                      E.氨基酸

17. 某男，20岁，一个月前感到疲劳，食欲减少，发烧咳嗽，咳痰带血丝。取咳痰行抗酸染色，镜下见到红色细长弯曲分枝杆菌，该菌是

- A.白喉棒状杆菌                      B.肺炎克雷伯菌                      C.炭疽杆菌  
D.结核分枝杆菌                      E.流感嗜血杆菌

18. 对肺结核病人的痰液，最简便有效的处理方法是

- A.煮沸                      B.深埋                      C.焚烧                      D.乙醇浸泡                      E.洗涤剂浸泡

19. 结核菌素试验观察结果的时间是

- A.72小时后                      B.48~72小时                      C.24~48小时                      D.12~24小时                      E.12小时

20. 结核菌素试验阳性表示

- A.感染过结核分枝杆菌                      B.接种过卡介苗                      C.有严重结核病  
D.未感染过结核分枝杆菌                      E.感染过结核分枝杆菌或接种过卡介苗

21. 卡介苗接种的对象是

- A.免疫功能低下者                      B.结核菌素试验阳性者                      C.对结核分枝杆菌有免疫的人  
D.感染过结核分枝杆菌的人                      E.新生儿和结核菌素试验阴性的健康儿童

22. 关于结核分枝杆菌抵抗力的叙述，错误的是

- A.对湿热敏感，用巴氏消毒法可杀死                      B.耐干燥，在干燥痰内可存活6~8天  
C.对紫外线敏感，直接日光照射数小时可被杀死  
D.对酸碱有抵抗力                      E.对抗结核药物易产生耐药性

23. 结核分枝杆菌的致病物质不包括

- A.外毒素                      B.索状因子                      C.蜡质 D                      D.硫酸脑苷脂                      E.磷脂

(24~26题共用题干)

刘某，女，18岁。咳嗽、低热、食欲不振3个月，入院前一天咳血。初步诊断肺结核，医嘱进行病原学检查。

24. 病原学检查应采集的标本是

- A.血液                      B.剩余的食物                      C.粪便                      D.痰                      E.尿液

25. 标本涂片后应选择的染色方法是

- A. 抗酸染色法  
B. 吉姆萨染色法  
C. 镀银染色法  
D. 革兰染色法  
E. 墨汁染色法

26. 结核分枝杆菌的形态特征是

- A. 红色细长略弯曲杆菌  
B. 紫色细长杆菌  
C. 鼓槌状杆菌  
D. 弧状单毛菌  
E. 有肥厚荚膜杆菌

#### B 型题

(27~29 题共用备选答案)

- A. 满 8w, 斜面无菌落生长  
B. 菌落生长占斜面面积的 1/4  
C. 菌落生长占斜面面积的 1/2  
D. 菌落生长占斜面面积的 3/4  
E. 菌落生长布满整个斜面

27. 结核分枝杆菌培养阴性

28. 分枝杆菌培养阳性 (4+)

29. 分枝杆菌培养阳性 (1+)

参考答案

- 1.C 2.A 3.E 4.D 5.B 6.C 7.C 8.D 9.D 10.D 11.E 12.E 13.C 14.D 15.A  
16.A 17.D 18.C 19.B 20.E 21.E 22.B 23.A 24.D 25.A 26.A 27.A 28.E 29.B

## 任务六 病原性真菌的常规检验

### 【项目 1】 皮肤癣菌的鉴定

(一) 材料准备

1. 标本 红色毛癣菌阳性的皮屑、石膏样小孢子菌阳性的头屑或毛发和絮状表皮癣菌阳性的皮屑。
2. 培养基 沙氏培养基。
3. 试剂 10%KOH 或 20%的 KOH。
4. 其他 酒精灯、盖玻片、载玻片、拭镜纸等。

(二) 内容及方法

1. 直接镜检 待检标本放置玻片上, 滴加 10%~20%的 KOH (如皮屑可用 10%、毛发可用 20%), 覆盖玻片, 待 10 min 左右或火焰上微加热, 直接镜检。在弱光下先在低倍镜观察, 再在高倍镜观察, 可找到菌丝或孢子。

2. 培养检查 将待检标本分别接种于沙氏琼脂斜面，每管接种 3~4 点，3~4 天开始观察菌落特征。

### 3. 毛发穿孔试验

(1) 方法：取剪成约 1cm 长的头发数根装入试管中，高压蒸气灭菌（68.95kPa/cm<sup>2</sup>）10min。然后将若干根灭菌头发放入装有毛发穿孔试验液体培养基试管中，接种受试菌后放 28℃ 温箱中培养，每周取出毛发置显微镜下观察至第四周。

(2) 结果：石膏样小孢子菌使毛发有裂口或凹陷，穿孔试验阳性；红色毛癣菌不能使毛发穿孔，试验阴性。

### 4. 鉴定要点

红色毛癣菌菌丝有隔，可见典型的葡萄簇状小分生孢子，也可见梨形或棒状侧生小分生孢子。红色毛癣菌培养后 3~4 天开始生长，菌落初始为白色，表面有短绒毛，背面呈微黄色，培养久之，背面可见深红色。

石膏样小孢子菌见大量壁薄、梭形大分生孢子，菌丝较少，可见有球拍状及螺旋状菌丝及厚膜孢子。石膏样小孢子菌生长较快，3~5d 即可见菌落，中心稍隆起有一小环，周围平坦，表面呈绒毛样；初呈白色，逐渐变为淡黄至橘黄色菌落，表面变粉末样，背面呈棕褐色。

絮状表皮癣菌可见洋梨状、壁薄、光滑、2~4 个分隔的大分生孢子，常 2~3 个为一组；无小分生孢子，可见厚膜孢子。絮状表皮癣菌菌落初始平坦，然后稍隆起，有不规则沟回，表面呈粉末状，草绿色，边缘整齐。

### (三) 注意事项

1. 直接镜检时应注意 ①阴性结果不能排除真菌感染，可疑结果应作复查或用其它检验方法鉴定；②可能存在假阳性结果，如脂肪微滴与出芽酵母菌容易混淆；③注意与其它混合物加以区别，真菌的孢子、菌丝均有一定的形态结构，而混合物形态多样；④皮肤上的致病菌与腐生菌的区别，腐生菌的菌丝、孢子为棕褐色，菌丝特别粗；⑤还应注意与显微镜镜头、载玻片、盖玻片上的霉菌加以区别。

2. 红色毛癣菌、石膏样小孢子菌可取临床标本（皮屑、毛发），直接显微镜检查。

3. 絮状表皮癣菌不侵犯毛发，只侵犯表皮和甲板，可取标本直接检查。

## 【项目 2】白假丝酵母菌的鉴定

### (一) 材料准备

1. 菌种 白假丝酵母菌、热带假丝酵母菌。

2. 培养基 沙氏培养基、玉米粉 Tween-80 琼脂、糖发酵和同化试验培养管、血琼脂培

培养基。

3. 试剂 革兰染色液、乳酸酚棉蓝染液、小牛血清、氯化三苯基四氮唑（TTC）。
4. 其他 盖玻片、载玻片、小试管、温箱等。

## （二）内容及方法

1. 培养检查 将白假丝酵母菌和热带假丝酵母菌分别接种于沙氏培养基和血琼脂平板上，室温（25℃左右）培养 2~3 天后观察其菌落特征。白假丝酵母菌典型菌落是酵母样菌落，灰白或奶油色，有酵母味，培养稍久，菌落增大呈蜂窝状。

2. 显微镜检查 取白假丝酵母菌和热带假丝酵母菌培养物制片。经革兰染色（或乳酸酚棉蓝染色），镜下观察其芽生孢子及是否有假菌丝。白假丝酵母菌呈圆形或卵圆形，较大，革兰染色呈紫色，棉蓝染色呈蓝色，可见芽生孢子和假菌丝。

## 3. 鉴定试验

（1）芽管形成试验：取无菌小试管一支，加入 0.2ml 动物或人血清，接种少许被检真菌，充分震荡混匀数分钟后，置 37℃ 孵育，每隔 1h 用接种环取出含菌血清置于载玻片上，加上盖玻片后镜检，共检查三次。白假丝酵母菌阳性。

（2）厚膜孢子形成试验：将白假丝酵母菌和热带假丝酵母菌划线接种到 Tween-80 玉米粉琼脂平板上，置 25℃ 孵育，每天观察菌体形态的改变（是否有厚膜孢子形成），连续观察 3d 以上。白假丝酵母菌可形成厚膜孢子。

（3）TTC 反应：将上述两种菌接种于含有 TTC（0.05g/L）的 Tween-80 沙氏平板上，25℃ 培养 24~48h，观察菌落颜色。白假丝酵母菌不使培养基变色，热带假丝酵母菌使培养基变红色。

4. 生化反应 将上述两种菌分别接种在葡萄糖、麦芽糖、蔗糖发酵管和同化管，25℃ 或 37℃ 培养 24h，观察结果（表 6-1）。

表 6-1 白假丝酵母菌和热带假丝酵母菌生化反应特性

菌种	糖同化试验				糖发酵试验			
	葡萄糖	麦芽糖	蔗糖	乳糖	葡萄糖	麦芽糖	蔗糖	乳糖
白假丝酵母菌	+	+	+	-	+	+	-	-
热带假丝酵母菌	+	+	+	-	+	+	+	-

## （三）注意事项

1. 白假丝酵母菌培养的温度以室温或 37℃ 均可。

2. 白假丝酵母菌和热带假丝酵母菌的标本可用 10% KOH 或生理盐水制片后直接检查。

### 【项目 3】新型隐球菌的鉴定

#### （一）材料准备

1. 菌种 新型隐球菌。
2. 培养基 沙氏培养基、各种糖发酵试验培养基和同化试验培养基。
3. 试剂 革兰染液、乳酸酚棉蓝染液、10% KOH 溶液、优质墨汁。
4. 其他 盖玻片、载玻片、滴管等。

#### （二）内容及方法

##### 1. 显微镜检查

（1）墨汁负染：先将优质墨汁（如印度墨汁，无颗粒或杂质）滴于载玻片上，再加入待检标本于其中，将二者混合，加盖玻片镜检。在黑色背景下可镜检到透亮菌体和宽厚荚膜。

（2）染色检查：取新型隐球菌培养物制片，经革兰染色或乳酸酚棉蓝染色，镜下观察其芽生孢子特征。

2. 培养检查 将新型隐球菌接种于沙氏培养基（接种两个平板），分别置室温和 37℃ 培养 3~5 天，观察其菌落特征。

##### 3. 生化鉴定试验

（1）糖发酵试验：将新型隐球菌接种在葡萄糖、麦芽糖、蔗糖发酵管，25℃ 或 37℃ 培养 24h，观察现象。

（2）同化试验：将新型隐球菌接种在葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖和蜜二糖同化管，25℃ 或 37℃ 培养 24h，观察现象。

（3）脲酶分解试验：接种该菌于尿素琼脂，25℃ 或 37℃ 培养 24h，观察现象。新型隐球菌脲酶试验阳性。

#### （三）注意事项

1. 新型隐球菌 37℃ 培养生长良好，非致病性隐球菌 37℃ 一般不生长。
2. 少数新型隐球菌在沙氏平板上 2~3 周方可生长，故 3 周不生长方可报阴性。
3. 隐球菌墨汁负染时，镜下见任何圆形物体边缘模糊，内部无反光颗粒，外部有较窄、内外界限不清的透亮环，加 KOH 后即消失者，均不是隐球菌。
4. 隐球菌属脲酶均阳性，而假丝酵母菌只有解脂假丝酵母菌和克柔假丝酵母菌中的部分菌株为阳性。

## 职考测试题

### A 型题

- 关于皮肤癣真菌特性，错误的是
  - 主要侵犯表皮、毛发和指（趾）甲
  - 在沙氏培养基上形成丝状菌落
  - 通过直接或间接接触感染
  - 一种皮肤癣菌只能引起一种癣病
  - 可根据菌丝、孢子及菌落形态作出初步诊断
- 皮肤癣菌不染色标本直接镜检时，为使标本透明，需加
  - 10%~20%的 KOH
  - 1%~2%的 KOH
  - 10%~20%的 NaOH
  - 1%~2%的 NaOH
  - 5%~10%的 KOH
- 培养真菌常用的培养基是
  - 巧克力培养基
  - 疱肉培养基
  - 伊红美兰培养基
  - 沙保弱培养基
  - 亚蹄酸钾培养基
- 表皮癣菌不能引起的癣病是
  - 毛发癣
  - 体癣
  - 甲癣
  - 足癣
  - 手癣
- 不用于真菌染色的方法是
  - 革兰染色法
  - 棉兰染色法
  - 瑞氏染色法
  - 抗酸染色法
  - 墨汁染色法
- 芽管形成及厚膜孢子形成试验阳性的是
  - 热带假丝酵母菌
  - 白假丝酵母菌
  - 光滑假丝酵母菌
  - 近平滑假丝酵母菌
  - 啤酒酵母菌
- 白假丝酵母菌在克玛嘉显色培养基上菌落颜色是
  - 红色
  - 绿色
  - 粉色
  - 蓝色
  - 白色
- CSF 中需要用墨汁染色检验的病原体是
  - 奈瑟菌
  - 新型隐球菌
  - 葡萄球菌
  - 肺炎链球菌
  - 假丝酵母菌
- 关于新型隐球菌特性错误的是
  - 单细胞真菌，有厚荚膜
  - 标本可直接用墨汁负染色后镜检
  - 在沙氏培养基上形成酵母型菌落
  - 在营养丰富的培养基上形成菌丝
  - 常引起脑膜炎
- 不属于白假丝酵母菌特性的是
  - 在玉米粉培养基上生长可形成厚膜孢子

B.在沙氏培养基上形成酵母样菌落

C.在营养丰富的培养基上长出菌丝

D.属于单细胞条件致病真菌

E.是鹅口疮的病原体

参考答案

1.D 2.A 3.D 4.A 5.D 6.B 7.B 8.B 9.D 10.C

## 附录 1 常用培养基的配制及用途

### 1. 肉膏汤

成分：蛋白胨 1g、牛肉膏 0.3~0.5g、氯化钠 0.5g、蒸馏水 100ml。

制法：将上述成分混合，溶化后调 pH 至 7.4，分装后，高压灭菌（103.4kPa）15min。

用途：用作一般细菌培养，或作为其他培养基的基础液。

### 2. 肝浸液及肝浸液琼脂

成分：猪肝或牛肝 50g、蛋白胨 1g、氯化钠 0.5g、蒸馏水 100ml。

制法：将猪肝或牛肝洗净绞碎，加水 50ml，经流通蒸气加热 30min，取出调匀，再蒸 90min，过滤。滤液中加入蛋白胨、氯化钠并加水至 100ml，加热溶解，调 pH 至 7.0，再蒸 30min，取上清液过滤、分装。高压（103.4kPa/cm<sup>2</sup>）灭菌 15min 后备用。

用途：用于布鲁菌等营养要求较高的细菌的培养。

说明：于每 100ml 肝浸液中加入 2%~3%的琼脂，即成为肝浸液琼脂。

### 3. 营养琼脂（普通琼脂）

成分：蛋白胨 1g，牛肉膏 0.3~0.5g，氯化钠 0.5g，琼脂 2~2.5g，蒸馏水 100ml。

制法：将除琼脂外的各成分加于蒸馏水中，加热溶解后，校正 pH 至 7.4，加入琼脂，高压灭菌（103.4kPa）15min 备用。

用途：此培养基可供一般细菌培养之用，可倾注平板或制成斜面。如用于菌落计数，琼脂量为 1.5%；如制成平板或斜面，则应为 2%。此培养基因含糖极少，可作鉴别培养基（中国蓝、SS 等）的基础成分。

### 4. 半固体琼脂

成分：牛肉膏 0.5g，蛋白胨 1g，琼脂 0.2~0.5g，氯化钠 0.5g，蒸馏水 100ml。

制法：将除琼脂外的各成分加于蒸馏水中，加热溶化后调 pH 至 7.4，分装于试管中，每管 1~1.5ml，包装后，高压灭菌（103.4kPa）15min，取出直立待凝固。

用途：此培养基用于观察细菌的动力、厌氧菌的分离、菌种鉴定及保存菌种等，该培养基含糖量极少，故也可作糖发酵培养基的基础成分。

### 5. 血液琼脂

成分：营养琼脂 100ml，无菌脱纤维羊血（或兔血）8~10ml。



制法：将已灭菌的营养琼脂加热溶化，冷至 50℃左右，以无菌操作加入无菌脱纤维羊血或兔血（用前置 35℃水浴箱预温）8~10 ml，摇匀，倾注平板。或分装于无菌试管，制成斜面。

用途：此培养基用途广泛，可用于分离和保存一般不易在普通培养基上生长的细菌。

#### **6. 巧克力色血琼脂**

成分：肉汤琼脂 100ml，无菌脱纤维羊血（或兔血）8~10ml。

制法：将灭菌琼脂培养基加热溶化，待冷至 80~90℃时，加入无菌血液（用前置 35℃水浴箱预温）8~10ml，使之呈巧克力色。冷却至 50℃左右，倾注平皿或制成试管斜面。

用途：用于分离流感嗜血杆菌、奈瑟菌等。

#### **7. 吕氏血清斜面**

成分：1%葡萄糖肉汤(pH7.6) 1 份，无菌血清（牛或兔血清）3 份。

制法：①以无菌操作将 3 份无菌血清加入 1 份无菌葡萄糖肉汤中；②混匀后分装于无菌试管，每管 3~5ml；③将试管斜置于血清凝固器内，加热 80℃~85℃30 分钟，置室温或 35℃温箱 18~20h。如此反复 3 次，进行间歇灭菌后备用。

用途：常用于白喉棒状杆菌分离培养及鉴定，还可用于观察细菌产生的色素，也可用于观察细菌液化及凝固蛋白质的能力。

#### **8. LB 营养琼脂**

成分：胰化蛋白胨 1g、酵母提取物 0.5g、NaCl 1g、琼脂 2g，蒸馏水 100ml。

制法：分别称取所需量的胰化蛋白胨、酵母提取物和 NaCl，置于烧杯中。加入所需水量 2/3 的蒸馏水于烧杯中，用玻棒搅拌，使药品全部溶化。加水至所需体积，调 pH 至 7.0。加入琼脂，加热溶化，高压蒸汽（68.95kPa）灭菌 20min，倾注平板，凝固后备用。

用途：用于细菌培养。

#### **9. 糖、醇类发酵培养基**

成分：蛋白胨 2g 或胰蛋白胨 1g，氯化钠 0.5g，糖 0.5~1 g，1%溴麝香草酚蓝乙醇溶液 0.1~0.2ml，琼脂 0.2~0.5g，蒸馏水 100ml。

制法：将除琼脂、指示剂外的各成分加于蒸馏水中，加热溶化后，调 pH 至 7.4，加入琼脂，溶化后，加入指示剂，充分摇匀，分装于小试管中，每管 1~1.5ml，包装后高压灭菌（68.95kPa）20min，取出直立待凝固。

用途：用于糖发酵试验。

#### **10. 蛋白胨水**

成分：蛋白胨 2g 或胰蛋白胨 1g，氯化钠 0.5g，蒸馏水 100ml。

制法：将上述成分混合于蒸馏水中，加热溶解，调 pH 至 7.4，分装小试管，每管 1~1.5ml，包装后高压灭菌（103.4kPa）15min 后备用。

用途：用于靛基质试验。

#### 11. 葡萄糖蛋白胨水

成分：蛋白胨 0.5g、葡萄糖 0.5g、磷酸氢二钾 0.5g、蒸馏水 100ml。

制法：将上述成分混合于蒸馏水中，加热溶解，调 pH 至 7.2。分装试管，高压灭菌（68.95kPa）20min 后备用。

用途：用于甲基红试验和 V-P 试验。

#### 12. 枸橼酸盐琼脂

成分：NaCl 0.5g，硫酸镁 0.02g，磷酸二氢铵 0.1g，磷酸氢二钾（ $K_2HPO_4$ ）0.1g，枸橼酸钠 0.5g，琼脂 2g，蒸馏水 100ml，1%溴麝香草酚蓝乙醇溶液 1ml。

制法：将上述成分（琼脂、溴麝香草酚蓝乙醇溶液除外）混合后加热溶解，调 pH 至 6.8，加入琼脂，溶化后，加 1%溴麝香草酚蓝乙醇溶液混匀，分装小试管，每管 1~1.5ml，包装后高压灭菌（103.4kPa）15min 后，制成斜面备用。

用途：用于枸橼酸盐利用试验。

#### 13. 硝酸盐培养基

成分：硝酸钾 0.05g，水解酪蛋白 1g，酵母膏 0.3g、蒸馏水 100ml。

制法：将上述成分溶于蒸馏水中，加热溶化，校正 pH 至 7.4，分装试管，高压灭菌（103.4kPa）15min。

用途：硝酸盐还原试验用。

#### 14. 尿素培养基

成分：蛋白胨 0.1g，葡萄糖 0.1g，NaCl 0.5g， $KH_2PO_4$  0.2g，0.4%酚红 1ml，琼脂 2g，尿素 1g，蒸馏水 100 ml。

制法：将上述成分（除尿素、琼脂、酚红以外）混于蒸馏水中，加热溶解，校正 pH 至 7.2。加入琼脂，溶化后加入尿素和酚红，混匀，分装试管，高压灭菌（68.95kPa）20min，制成斜面备用。

用途：用于尿酶试验。

#### 15. 葡萄糖氧化发酵培养基（O/F）

成分：蛋白胨 0.2g，氯化钠 0.5g，1%溴麝香草酚蓝水溶液 0.03ml，琼脂 0.2g， $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.02g，葡萄糖 1g，蒸馏水 100ml。

制法：将上述各成分（除溴麝香草酚蓝外）溶解于水中，调节 pH 值为 7.0，加入指示剂，混匀，分装试管，高压灭菌（68.95kPa）20min 备用。

用途：用于肠杆菌科和非发酵菌的鉴定。

#### 16. 动力-靛基质-脲酶（MIU）培养基

成分：胰蛋白胨 10g， $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.2g、NaCl 0.5g、琼脂 0.3g、葡萄糖 0.1g、0.4%酚红溶液 0.2ml、20%尿素溶液 10ml、蒸馏水 100ml。

制法：除指示剂、尿素外，将上述成分混于水中，加热溶解，矫正 pH 至 7.0，再加入酚红指示剂，高压灭菌（68.95kPa）15min，冷至 50℃左右，以无菌操作加入 20%无菌尿素溶液 10ml，混匀，分装于无菌试管中，每管约 3ml。

用途：用于检验细菌动力、色氨酸酶、尿素酶，鉴别肠道杆菌。

#### 17. 克氏双糖铁（KIA）琼脂

成分：乳糖 1g、葡萄糖 0.1g、蛋白胨 1g、牛肉膏 0.3g、氯化钠 0.3g、硫代硫酸钠 0.02g、硫酸亚铁 0.02g、琼脂 1.6g、0.4%酚红 0.6ml 蒸馏水 100ml。

制法：除琼脂、酚红、乳糖及葡萄糖外，其他成分混合于水中加热溶解。矫正 pH 至 7.4，加入琼脂，溶化后再加入糖类与酚红混匀，分装于小试管中，每管约 3ml，高压灭菌（68.95kPa）20min，制成斜面（斜面与底层各占一半为宜）备用。

用途：用于鉴别肠杆菌科细菌。

#### 18. 半固体双糖铁培养基（分层双糖铁培养基）

成分：

A 液（底层）：蛋白胨水（pH7.6）100ml，琼脂 0.35~0.4g，2%无菌酸性复红水溶液 0.5ml，10%无菌葡萄糖液 2ml。

B 液（上层）：蛋白胨水（pH 7.6）100ml，琼脂 1.5g，2%无菌酸性复红水溶液 0.5ml，20%灭菌乳糖液 5ml，硫代硫酸钠 0.03g，硫酸亚铁 0.02g。

制法：①先于蛋白胨水 100ml 中，加入酸性复红和葡萄糖液，摇匀试调 pH 至 7.6（培养基偏红为宜）后加入琼脂 0.4g，置于甲瓶中作为甲液。②另取蛋白胨水 100ml，加入酸性复红和乳糖液，硫代硫酸钠 0.03g 和硫酸亚铁 0.02g，调 pH 至 7.6 后加琼脂 1.5g，置于乙瓶中作为乙液。③将甲、乙二瓶置于高压灭菌器内，经高压灭菌（68.95kPa）20min。④待冷至 60℃左右，无菌操作将底层培养基分装无菌试管，每管约 4~5ml，

直立于冷水中使其凝固。此步也可在完成制备底层培养基后尽快分装完成，随后高压灭菌（68.95kPa）备用。⑤将乙瓶中培养基溶化，冷至 50℃左右，摇匀后于上述各管中加入乙液约 2ml，使其凝固成斜面。凝固后，置 37℃温箱中培养 24h，若无细菌污染，即可应用。

用途：本培养基以酸性复红为指示剂，在酸性时呈红色，碱性时无色。下层为含葡萄糖的半固体培养基，可以观察细菌的动力和对葡萄糖发酵能力，如细菌发酵葡萄糖产酸、产气，下层则变红，且有气泡或断层产生，同时有动力，上层为含乳糖和硫酸亚铁的固体，主要是观察细菌对乳糖的发酵情况和产生 H<sub>2</sub>S 的能力。细菌如能发酵乳糖，上层斜面呈黄色；致病性肠道杆菌不发酵乳糖，故斜面不变色（红色）；如细菌产生 H<sub>2</sub>S，则斜面有黑色沉淀。

### 19. 三糖铁（TSI）琼脂

成分：蛋白胨 2g，牛肉膏 0.5g，乳糖 1g，蔗糖 1g，葡萄糖 0.1g，氯化钠 0.5g，硫酸亚铁铵〔Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O〕0.02g，硫代硫酸钠 0.02g，琼脂 1.2g，0.2%酚红 1.25ml，蒸馏水 100ml。

制法：将除琼脂和酚红以外的各成分溶解于蒸馏水中，校正 pH 至 7.4。加入琼脂，加热煮沸以溶化琼脂。加入 0.2%酚红水溶液 1.25ml，混匀。分装试管，高压灭菌（68.95kPa）15min。制成高层斜面备用。

用途：用于鉴别肠杆菌科细菌。

### 20. 七叶苷培养基

成分：胰蛋白胨 1.5g、胆汁 2.5ml、枸橼酸铁 0.2g、七叶苷 0.1g、琼脂 2g、蒸馏水 100ml。

制法：将上述成分混合后，加热溶解，调 pH 至 7.0，过滤后分装试管，每管约 1ml。高压灭菌（103.4kPa）20min，趁热制成斜面，待凝固后贮存备用。

用途：用于鉴别肠球菌。

### 21. 脱氧核糖核酸酶(DNase)试验琼脂

成分：DNA 0.2g、氯化钠 0.5g、胰酶消化酪素 1.5g、琼脂 1.5g、胃蛋白酶消化大豆汤 0.5g、蒸馏水 100ml。

制法：将上述成分（除 DNA 外）溶解，矫正 pH 至 7.4，高压灭菌(103.43kPa/cm<sup>2</sup>)15min，冷至 50℃加入 DNA，混匀后倾注平板备用。

用途：用于 DNA 酶试验。

### 22. ONPG 培养基

成分：邻硝基酚 $\beta$ -D-半乳糖苷（ONPG） 60mg、0.01mol/L 磷酸钠缓冲液(pH7.5) 10ml、1%蛋白胨水(pH7.5) 30ml

制法：将 ONPG 溶于缓冲液内，加入蛋白胨水，过滤法除菌，分装于 10mm×75mm 试管，每管 0.5ml。

用途： $\beta$ -半乳糖苷酶试验培养基，用于迟缓发酵乳糖细菌的快速鉴定。

### 23. 氨基酸脱羧酶培养基

成分：氨基酸 0.1g、蛋白胨 0.05g、牛肉膏 0.05g、葡萄糖 0.005g、吡多醛 0.005g、0.2% 溴甲酚紫 0.5ml、0.2% 甲酚红 0.25ml、蒸馏水 100ml。

制法：将蛋白胨、牛肉膏、葡萄糖、吡多醛加水溶解，矫正 pH 至 6.0。加入氨基酸、溴甲酚紫及甲酚红，混匀。分装于含有一薄层无菌液体石蜡的小试管中，高压灭菌（68.95kPa/cm<sup>2</sup>）15min 后备用。

用途：氨基酸脱羧酶试验用。

### 24. 苯丙氨酸脱氨酶培养基

成分：DL-苯丙氨酸 0.2g 或 L-苯丙氨酸 0.1g、酵母浸膏 0.3g、磷酸氢二钠 0.1g、氯化钠 0.5g、琼脂 1.2g、蒸馏水 100ml。

制法：上述成分混合加热溶解后调 pH 至 7.4，分装试管，高压灭菌(68.95kPa)15min，制成斜面备用。

用途：用于苯丙氨酸脱氨酶试验。

### 25. 紫牛乳培养基

成分：新鲜牛乳、1.6%溴甲酚紫乙醇液。

制法：将牛乳置于三角烧瓶中，用流通蒸汽加热 30min。冷却后置 4℃ 冰箱内 2h，吸出牛乳注入另一烧瓶中，弃去上层乳脂，即得脱脂牛乳。每 100ml 牛乳中加入 1.6% 溴甲酚紫 0.1ml，混匀，分装试管，高压灭菌（55.16kPa）10min 后备用。

用途：观察细菌对牛乳中乳糖分解情况。

### 26. 卵黄琼脂

成分：肉浸液 100ml、蛋白胨 1.5g、氯化钠 0.5g、琼脂 2.5~3.0g、50% 无菌葡萄糖水溶液、50% 无菌卵黄盐水溶液。

制法：将蛋白胨、氯化钠、琼脂加入肉浸液中，高压灭菌(103.43kPa)15min，冷却至 55℃，无菌操作法加 50% 葡萄糖水溶液 2ml 和 50% 卵黄盐水悬液 15ml，混匀后倾注平板。

用途：用于厌氧芽胞梭菌的分离培养和卵磷脂酶试验。

### **27. 高盐卵黄琼脂**

成分：10%氯化钠肉浸液琼脂（pH7.4）300ml、卵黄悬液 75ml（一个卵黄混悬于 150ml 无菌盐水中）。

制法：将已灭菌的 10%氯化钠肉浸液琼脂加热溶化，待冷至 55℃左右加入卵黄悬液，混匀后倾注平板，凝固后备用。

用途：分离金黄色葡萄球菌用。

### **28. 卵黄双抗琼脂（EPV）**

成分：50%卵黄生理盐水悬液 10ml、多粘菌素 B 0.42mg 或 2.5 万、万古霉素 0.33mg、蛋白胨 1g、氯化钠 0.5g、牛肉膏 0.3g、玉米淀粉 0.167g、琼脂 2g、蒸馏水 1 00ml。

制法：将蛋白胨、氯化钠、牛肉膏溶解后，调 pH 至 7.6，加入玉米粉及琼脂，混合后高压灭菌(103.43kPa)20min。待培养基冷至 50℃左右，加入卵黄悬液和多粘菌素 B 及万古霉素，轻轻摇匀后倾注平板备用。

用途：用于鼻咽分泌物标本分离脑膜炎奈瑟菌。

### **29. 中国蓝琼脂**

成分：无菌肉膏汤琼脂(pH7.4) 1 00ml、乳糖 0.1g、1%无菌中国蓝水溶液 0.1 ml、1%玫瑰红酸乙醇溶液 0.1 ml。

制法：将 0.1g 乳糖置于无菌的肉膏汤琼脂瓶内，加热溶化琼脂并混匀。待冷至 50℃左右，加入中国蓝、玫瑰红酸溶液，混匀后立即倾注平板，凝固后备用。

用途：分离肠道致病菌用。

### **30. 麦康凯琼脂**

成分：蛋白胨 1.7g、胨 0.3g、猪胆盐(或牛、羊胆盐) 0.5g、氯化钠 0.5g、琼脂 1.7g、蒸馏水 100ml、乳糖 1g、0.01%结晶紫水溶液 1ml、0.5%中性红水溶液 0.5ml。

制法：将各成分(除琼脂、结晶紫、中性红外)混合，加热溶解后校正 pH 至 7.2，加入琼脂、结晶紫和中性红。高压灭菌(103.43kPa)15min，冷至 60℃，倾注平板备用。

用途：供分离肠道杆菌。

### **31. 伊红美兰琼脂培养基**

成分：蛋白胨 1g、乳糖 1g、磷酸氢二钾 0.2g、琼脂 1.5g、2%无菌伊红-Y 水溶液 2ml、0.5%无菌美兰水溶液 1ml、蒸馏水 1 00ml。

制法：将蛋白胨、磷酸氢二钾、乳糖溶解于蒸馏水中，校正 pH 至 7.2，加入琼脂，高压灭菌(68.95kPa)15min，冷至 60℃，加入已灭菌的伊红及美蓝溶液，摇匀后，倾注平板备用。

用途：用于分离肠道菌。

### 32. SS 琼脂

成分：SS 琼脂配方较多，但其效果基本一致，以下列举 4 种常用配方（附录 1-表-1）。

制法：将牛肉膏、豚胨溶于水中，加热溶解，加入其余成分（除中性红、煌绿及琼脂外），加热使其全部溶解。调 pH 至 7.2，加入琼脂后再煮沸 10min，加入煌绿及中性红，混匀后倾注平板，凝固后备用。

用途：用于粪便标本分离培养沙门菌属和志贺菌属。

附录 1-表-1 SS 琼脂常用配方

成分	配方一	配方二	配方三	配方四
牛肉膏 (g)		5	5	
牛心浸液 (ml)				1 000
肉膏液 (ml)	850			
豚胨 (g)		5	5	7.5
乳糖 (g)	10	10	10	15
胆盐 (g)	150(ml)	10	8.5	10
硫代硫酸钠 (g)	11	12	8.5	5
枸橼酸钠 (g)	11	12	8.5	15
枸橼酸铁 (g)		0.5	1	
枸橼酸铁铵 (g)	4			1
磷酸氢二钠 (g)				5
琼脂 (g)	20	25	13.5	18
煌绿 (mg)	1.0	0.33	0.33	0.33
中性红 (mg)	70	22.5	25	37
蒸馏水 (ml)		1 000	1 000	

### 33. 亚硝酸钾血琼脂培养基

成分：肉浸液琼脂（pH7.4）100ml、1%亚硝酸钾水溶液 2ml、0.5 %胱氨酸水溶液 2ml、脱纤维羊血或兔血 5~10ml。

制法：加热溶化已灭菌肉浸液琼脂，待冷至 50℃左右，加入已灭菌的亚硝酸钾溶液、胱氨酸溶液及无菌脱纤维羊血，混匀，倾注平板，凝固后备用。

用途：用于分离白喉棒状杆菌。

### 34. 碱性蛋白胨水

成分：蛋白胨 1g、氯化钠 0.5g、蒸馏水 1 00ml。

制法：将蛋白胨与氯化钠溶于蒸馏水中，煮沸，待冷。调 pH 至 8.4，过滤，分装试管，高压灭菌(103.43kPa)15min 后备用。

用途：用于粪便、肛拭增菌及培养霍乱弧菌。

### 35. 碱性琼脂平板

成分：蛋白胨 1g、氯化钠 0.5g、牛肉膏 0.3g、琼脂 2.5g、蒸馏水 100ml。

制法：将上述成分混合后加热溶解，调 pH 至 8.6，高压灭菌(103.43kPa)15min，待冷至 50℃左右倾注平板，凝固后冷藏备用。

用途：用于分离霍乱弧菌。

### 36. 碱性胆盐琼脂平板(TCBS)

成分：牛胆盐 0.8g、蛋白胨 1g、枸橼酸铁 1g、酵母膏粉 0.5g、溴麝香草酚蓝 0.004g、硫代硫酸钠 1g、麝香草酚蓝 0.04g、枸橼酸钠 1g、琼脂 1.4g、蔗糖 2g、蒸馏水 100ml。

制法：将上述各成分（除指示剂及琼脂外）加热溶解于水中，矫正 pH 至 8.6，加入指示剂及琼脂，煮沸使之完全溶解，不需要灭菌，待冷至 50℃左右倾注平板，凝固后冷藏备用。

用途：用于分离培养霍乱弧菌及副溶血性弧菌。

### 37. M-H 琼脂

成分：蛋白胨 0.6g、牛肉膏 0.25g、氯化钠 0.3g、可溶性淀粉 0.15g、酪蛋白水解物 1.75g、琼脂 1.75g、蒸馏水 100ml。

制法：除琼脂外，将上述各成分加入蒸馏水中加热溶化，调 pH 至 7.2，加入琼脂，高压灭菌(103.43kPa)15min，冷却至 50℃，倾注平板，琼脂厚度为 4mm，凝固后备用。

用途：用于抗菌药物敏感试验。

### 38. L 型细菌培养基

成分：牛肉浸液 80ml、蛋白胨 2g、氯化钠 5g、血浆（灭活人血浆）20ml、琼脂 0.8g。

制法：将上述各成分（除血浆外）加热溶解于牛肉浸液中，调 pH 至 7.4，高压灭菌(103.43kPa)20min，冷至 56℃时加入血浆 20ml，迅速混匀，倾注平板备用。

用途：用于 L 型细菌的分离培养。

### 39. 庖肉培养基

成分：牛肉渣 0.5g、肉汤(或肉膏汤，pH7.4)5ml



制法：取去筋膜、去脂肪的新鲜牛肉 500g，剁碎，置 1 000 ml 蒸馏水中，以弱火煮 1h，用纱布过滤；取牛肉汤 5ml 置于试管中，将牛肉渣 0.5g 加入肉汤中，在每管液面上加入已溶化的凡士林，厚约 5mm，高压灭菌(103.43kPa)15min 备用。

用途：分离培养厌氧菌。

#### 40. GAM 培养基

成分：大豆胨 3g、豚胨 10、消化血清粉 13.5g、酵母浸出粉 5g、牛肉膏 2.2g、牛干膏 1.2g、半胱氨酸 0.3g、葡萄糖 3g、氯化钠 3g、磷酸二氢钾 2.5g、硫乙醇酸钠 0.3g、可溶性淀粉 5g、5mg/ml 氯化血红素 1ml、1%维生素 K<sub>1</sub>0.1ml、蒸馏水 1000ml。

制法：将上述成分加热溶解调整 pH 至 7.3，高压灭菌(103.43kPa)，15min 备用。可加琼脂 2g 或 15g 即为半固体或固体培养基。

用途：厌氧基础培养基

#### 41. 布氏肉汤

成分：胰蛋白酶 1g、动物组织蛋白酶消化物 1g、酵母浸出物 0.2g、葡萄糖 0.1g、氯化钠 0.5g、亚硫酸钠 0.01g、5mg/ml 氯化血红素 0.1ml、1%维生素 K<sub>1</sub>0.01ml、蒸馏水 100ml。

制法：将上述成分混合，加热溶解，调整 pH 至 7.0，分装后高压灭菌备用。如加入 1.5%~2%的琼脂，1%维生素 K<sub>1</sub>调整为 10ug/ml 即为布氏琼脂，再加入 5%~10%脱纤维羊血，即为布氏血琼脂。

用途：培养难分离或生长缓慢的厌氧菌，也可用于厌氧菌药敏试验。

#### 42. 葡萄糖肉汤

成分：葡萄糖 0.3g、酵母浸膏 0.3g、枸橼酸钠 0.3g、磷酸氢二钾 0.2g、0.5%对氨基苯甲酸 0.5ml、24.7%硫酸镁 2ml、牛肉汤 1 00ml。

制法：将上述成分混合（葡萄糖及硫酸镁外），加热溶解，矫正 pH 至 7.6，再煮沸 5min，用滤纸过滤，分装于 100 ml 三角烧瓶内，每瓶 50 ml，包扎瓶口，高压灭菌 20min。将葡萄糖配成 10%水溶液，硫酸镁配成 24.7%水溶液，分别高压灭菌（55.16 kPa）15min。于每 50ml 无菌肉汤中加入无菌葡萄糖 1.5 ml，硫酸镁水溶液 1 ml 混匀，35℃培养 2d 无细菌生长后，存于冰箱内备用。

用途：血液标本增菌用培养基。

#### 43. 四硫磺酸钠煌绿(TTB)增菌液

成分：多胨或胨 0.1g、CaCO<sub>3</sub> 1g、Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 3g、0.1%的煌绿溶液、碘溶液（碘化钾 5g、碘 6g，溶于 20 ml 水中，棕色瓶中储存）、蒸馏水 100ml。

制法：将各成分加入蒸馏水中，加热溶解，不必校正 pH，分装试管，每管 10 ml。分装时应充分振摇，使碳酸钙均匀分装到各试管中。高压灭菌(68.95kPa)10min。临用时，每管加入碘液 0.2ml，0.1%煌绿 0.1ml。

用途：用于沙门菌增菌培养。

#### **44. 革兰氏阴性杆菌（GN）增菌液**

成分：胰蛋白胨 2g、葡萄糖 0.1g、甘露醇 0.2g、柠檬酸钠 0.5g、去氧胆酸钠 0.05g、磷酸氢二钾 0.4g、磷酸二氢钾 0.15g、氯化钠 0.5g、蒸馏水 100ml。

制法：将上述成分溶于蒸馏水中，加热使溶解，校正 pH 至 7.0。过滤，分装于试管中，高压灭菌(68.95kPa)15min。

用途：用于志贺氏增菌用。

#### **45. Elek 琼脂**

成分：胨 2g、麦芽糖 0.3g、乳糖 0.07g、氯化钠 0.5g、琼脂 1.5g、40%氢氧化钠溶液 0.15ml、蒸馏水 100ml。

制法：用 50ml 蒸馏水溶解上述各成分（琼脂除外），煮沸并用滤纸过滤。校正 pH 至 7.8。用另外 50ml 蒸馏水加热溶解琼脂。将两液混合，高压灭菌(103.43kPa)15min。冷却至 50℃，倾注平板，凝固后备用。

用途：用于白喉外毒素的检测。

#### **46. 包-金(Bordet-Gengou)琼脂**

成分：马铃薯 250mg、氯化钠 9g、琼脂 50g、胨 2g、甘油 20ml、脱纤维的羊或兔血（每 100ml 培养基加入 25ml）、青霉素溶液（每 100ml 培养基加入 25U）、蒸馏水 2000ml。

制法：将去皮切碎的马铃薯、氯化钠加蒸馏水 500ml 混合，煮沸至马铃薯熟烂为止，补足失去水分，过滤即得马铃薯浸出液；将琼脂加入 1500ml 蒸馏水中，加热溶化，加入马铃薯浸出液、甘油和胨，溶解后，调 pH 至 7.0，分装（每瓶 100ml）。高压灭菌(103.43kPa)20min，待冷至 50℃左右，以无菌操作加入无菌脱纤维血液和青霉素溶液，混匀，倾注平板，凝固后，冷藏备用。

用途：用于分离百日咳鲍特菌。

#### **47. cBAP-thio 培养基(改良 Campy-BAP 弯曲菌选择培养基)**

成分：胰蛋白胨 1g、琼脂粉 1.5g、蛋白胨 1.0g、葡萄糖 0.1g、酵母浸出汁 0.5g、氯化钠 0.5g、重亚硫酸钠 0.01g、硫乙醇酸钠 0.15g、万古霉素 1.0mg、先锋霉素 11.5mg、多粘菌素 B 250U、两性霉素 B 0.2mg、脱纤维羊血 5ml、蒸馏水 100ml。

制法：将上述各成分（除外抗生素及脱纤维羊血）混合溶解后，调 pH 至 7.4，灭菌 (68.95kPa)20min，冷却至 50℃左右，加入 4 种抗生素及脱纤维羊血，倾注平板或制成斜面。

用途：用于分离培养空肠 / 结肠弯曲菌。

#### 48. 罗氏培养基

成分：磷酸二氢钾 2.4g、枸橼酸镁 0.6g、硫酸镁 (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) 0.24g、天门冬素 3.6g、甘油 12ml、蒸馏水 600ml、马铃薯粉 30g、新鲜鸡蛋液 1 000ml（约 30 个）、2%孔雀绿水溶液 20ml。

制法：①加热溶解磷酸二氢钾、枸橼酸镁、硫酸镁、天门冬素及甘油于蒸馏水中；②将马铃薯加于上述溶液中，边加边搅，使成均匀糊状，在沸水浴中加热半小时；③将鸡蛋用清水洗净壳，用 75%酒精浸泡 30min，取出后用无菌纱布擦干，无菌操作划破卵壳，将卵液一并收集，摇散混匀后，置于上述已冷至 65℃的溶液中；④再加入 2%无菌孔雀绿水溶液 20ml，充分摇匀后用双层无菌纱布过滤，然后分装于无菌试管中，斜置血清凝固器内，间歇灭菌后备用。

用途：用于培养结核分枝杆菌。

#### 49. Hayflick 培养基

成分：牛心消化液（或浸出液）1 000ml、蛋白胨 10g、氯化钠 5g、琼脂 14g、无菌小牛血清 20ml、青霉素 G（20 万 U / ml）0.5ml、25%酵母浸出液 10ml、20%灭菌葡萄糖溶液 5ml、1%醋酸铊 2.5ml。

制法：将牛心消化液、蛋白胨、氯化钠、琼脂混合溶解，调 pH 至 7.8，分装于烧瓶内，每瓶 70ml，高压灭菌(103.43kPa)15min。冷却至 80℃加入无菌小牛血清 20ml、青霉素 G（20 万 U / ml）0.5ml、25%酵母浸出液 10ml、20%灭菌葡萄糖溶液 5ml、1%醋酸铊 2.5ml，混匀后倾注平板。若培养基内不加琼脂，葡萄糖为 1%，并加 0.1%酚红水溶液 2ml，即为液体培养基。

用途：用于分离培养支原体。

#### 50. 柯索夫（Korthof）培养基

成分：蛋白胨 0.4g、氯化钠 0.7g、氯化钾 0.02g、氯化钙 0.02g、碳酸氢钠 0.01g、磷酸氢二钠 0.48g、磷酸二氢钾 0.09g、蒸馏水 500ml。

制法：将上述各成分混合成溶液，100℃加热 20min，冷却后，用滤纸过滤，调 pH 至 7.2。定量分装于三角烧瓶中，高压灭菌(103.43kPa)15min。待冷却后，加入 8%新鲜无菌兔血清溶液，混匀，分装于无菌试管中，在 56℃水浴 1h。

用途：用于培养钩端螺旋体。

#### **51. 沙氏 (Sabouraud) 琼脂**

成分：蛋白胨 1g、葡萄糖 4g、琼脂 1.5g、氯霉素 0.01g、蒸馏水 100ml。

制法：将上述各成分加入蒸馏水中，搅拌并加热煮沸至完全溶解，调 pH 至 6.0，高压灭菌(68.95kPa)15min，冷却至 50℃，倾注平板，凝固后备用。

用途：用于真菌的分离培养。

#### **52. 改良沙氏琼脂**

成分：蛋白胨 1g、葡萄糖 4g、琼脂 2g、蒸馏水 100ml。

制法：将上述蛋白胨、葡萄糖、琼脂放于烧瓶内，加蒸馏水 100ml，煮沸，琼脂溶解后调 pH 至 6.0，高压灭菌(68.95kPa)15min，倾注平板，凝固后备用。如不加琼脂即为沙保液体培养基。

用途：用于真菌的分离培养。

#### **53. 玉米粉吐温-80 琼脂**

成分：玉米粉 4g、吐温-80 1ml、琼脂 2g、蒸馏水 100ml

制法：将玉米粉加入蒸馏水中，65℃加热 1h，过滤，补足水量，加入吐温-80 和琼脂，灭菌(103.43kPa)15min，分装于无菌试管或无菌平板中备用。

用途：用于观察白假丝酵母菌的假菌丝及厚膜孢子。

#### **54. 皮肤癣菌鉴别琼脂 (DTM)**

成分：葡萄糖 1g、蛋白胨 1g、金霉素 0.01g、琼脂 2g、0.8mol/L HCl 0.6ml、放线菌酮 0.05g (溶于 0.2ml 丙酮中)、0.02% 酚红水溶液 0.6ml、硫酸庆大霉素 0.01g (溶于 0.2ml 水中)、蒸馏水 100 ml。

制法：将上述各成分 (除抗生素外) 混合，高压灭菌(68.95kPa)10min，再加抗生素后分装备用。

用途：用于分离皮肤癣菌。

## 附录 2 常见细菌的生化反应试验

细菌在新陈代谢过程中进行着各种生物化学反应。因细菌种类的不同，催化这些反应的酶类及其活性也都有所差异，代谢过程所产生的分解和合成产物亦各不相同。细菌检验中常利用生物化学的方法来检测细菌的代谢产物以鉴别细菌，称为细菌的生化反应试验。

### 【糖醇类代谢试验】

#### (一) 糖发酵试验

【原理】 绝大多数细菌都能发酵糖类，所产生的代谢产物有酸（甲酸、乙酸、丙酸、乳酸等）、气体（如  $H_2O$ 、 $CO_2$  等）及醛、醇、酮等。因各种细菌所含酶类的差异，使他们对糖类的分解能力各不相同，其产物也不一样。有的细菌能分解某些糖而产酸产气，有的只能产酸而不产气，有的则不能分解。

【培养基】 液体发酵管、半固体发酵管、微量发酵管。

【试剂】 常用的指示剂有酚红，溴麝香草酚蓝（BTB），溴甲酚紫，酸性复红等。前两者颜色反应较敏感，但稳定性较差。后二者比较稳定，特别是对发酵迟缓的细菌。如培养时间较长，以后二者为优。

【方法】 将待检菌分离分纯培养后，将其接种于含指示剂的糖（醇）发酵培养基内。置  $35^{\circ}C$  培养数小时至两周，观察结果。若使用微量发酵管或要求培养时间较长时，应保持一定湿度，以免培养基干燥而影响细菌生长。

【结果】 被检细菌分解糖类产酸者为阳性，这时培养基中所含的指示剂呈酸性反应。若产气，则在液体培养基的倒置小管中或半固体培养基中出现气泡。若被检细菌不分解培养基中的糖类，则培养基不发生变化。

【应用】 是细菌鉴定最常用的方法，尤其是肠杆菌科细菌的鉴定。

#### (二) 糖氧化发酵(O-F) 试验

该试验是由 Hugh 和 Leifson 创立，故又称 Hugh-Leifson(HL) 试验。

【原理】 细菌对糖的代谢分为氧化和发酵 2 种类型。细菌在分解葡萄糖的过程中，必须有分子氧参加的，称为氧化型。氧化型细菌在无氧环境中不能分解葡萄糖。细菌在分解葡萄糖的过程中，可以进行无氧降解的，称为发酵型。发酵型细菌无论在有氧或无氧的环境中都能分解葡萄糖。不分解葡萄糖的细菌，称为产碱型。利用此试验可区别细菌的代谢类型。

【培养基】 Hugh-Leifson(HL) 培养基。

【方法】 取 2 支 HL 培养基，煮沸 10min 以驱逐培养基中的氧气。冷却后将被检细菌

接种到 2 支培养基中，其中一支加灭菌的液体石蜡或凡士林厚约 1cm，35℃培养 3~4 天，观察结果。

**【结果】** 2 管均不产酸(不变色)为产碱型；2 管均产酸(变黄)为发酵型；加液体石蜡管不产酸，不加液体石蜡管产酸为氧化型。

**【应用】** 主要用于肠杆菌科和非发酵菌的鉴别，也可用于葡萄球菌和微球菌的鉴别。

### (三) 甲基红试验 (MR 试验)

**【原理】** 细菌发酵葡萄糖形成丙酮酸，丙酮酸进一步的代谢途径因菌异，有的细菌可产生大量的酸，使 pH 维持在 4.4 以下，从而使培养基中的甲基红指示剂呈现红色反应，为 MR 试验阳性。若细菌产酸较少或因产酸后又不断转化为其它物质（如醇，醛，酮，气体和水），使 pH 在 5.4 以上，则甲基红指示剂呈黄色，为 MR 试验阴性。

**【培养基】** 葡萄糖蛋白胨水培养基

**【试剂】** 取甲基红 0.06g，溶于 180ml 95%乙醇中，加入蒸馏水 120ml。

**【方法】** 将待检菌接种于葡萄糖蛋白胨水中，经 35℃培养 2~4 天，取部分培养液（或整个培养物），滴加甲基红试剂，通常每毫升培养液滴加试剂 1 滴，观察结果。阴性结果时培养不得少于 5 天。

**【结果】** 培养液呈现红色为阳性，橘黄色为阴性，橘红色为弱阳性。

**【应用】** 本试验主要用于肠杆菌科中大肠埃希菌与产气肠杆菌的鉴别，前者阳性，后者阴性。其他阳性反应菌如沙门菌属，志贺菌属。

### (四) V-P 试验

**【原理】** 有些细菌在发酵葡萄糖产生丙酮酸后，可使丙酮酸脱羧，形成中性的乙酰甲基甲醇，后者在碱性环境中被空气氧化为二乙酰。二乙酰与蛋白胨中精氨酸所含的胍基反应，生成红色化合物。

若在培养基中加入少量含胍基的化合物，如肌酸或肌酐，可加速反应。一般方法是，加碱前先加入肌酸和  $\alpha$ -萘酚，以增加试验的敏感性。

**【培养基】** 葡萄糖蛋白胨水培养基

**【试剂】**

甲液：50g/L  $\alpha$ -萘酚无水乙醇溶液

乙液：400g/L 氢氧化钾溶液（含 3g/L 肌酸或肌酐）

**【方法】** 将待检菌接种于葡萄糖蛋白胨水，经 35℃培养 48h，取部分培养液（或整个培养物），每 1ml 培养液加入甲液 0.6ml、乙液 0.2ml。充分振摇试管，观察结果。

**【结果】** 呈红色或橙红色反应为阳性。

**【应用】** 主要用于肠杆菌科中产气肠杆菌与大肠埃希菌的鉴别，前者阳性，后者阴性。

#### (五) $\beta$ -半乳糖苷酶(ONPG)试验

**【原理】** 有些细菌可产生 $\beta$ -半乳糖苷酶，可分解邻硝基酚 $\beta$ -D半乳糖苷(ONPG)。ONPG无色，经 $\beta$ -半乳糖酶水解后，可生成黄色的邻位硝基苯酚，为阳性反应。

##### **【试剂】**

1. 缓冲液 取磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 6.9g溶于40ml水中，以5mol/L氢氧化钠矫正pH为7.0，再加水到50ml，放于4℃冰箱内备用。此缓冲液在冰箱中可能析出结晶，在使用前可稍加温使其溶解。

2. ONPG液 称取ONPG80mg，溶于15ml水中，再加上上述缓冲液5ml，放于4℃冰箱中保存。此溶液不稳定，若出现黄色则不能应用。

**【培养基】** 1%乳糖肉汤琼脂。

**【方法】** 将被检细菌接种到1%乳糖肉汤琼脂培养基上，35℃培养过夜。用接种环取菌苔1环置于0.25ml生理盐水中做成菌悬液，然后加ONPG液0.25ml，混匀置于35℃温箱或水浴箱中，分别在20min和3h后观察结果。

**【结果】** 出现黄色者为阳性，一般在20~30min即显黄色；不出现黄色者为阴性。

**【应用】** 常用于迟缓发酵乳糖的细菌的快速鉴定。

#### (六) 七叶苷水解试验

**【原理】** 某些细菌具有七叶苷酶，能分解七叶苷产生七叶素，七叶素与培养基中的铁离子结合后，形成黑色的酚铁络合物，使培养基变黑。

**【培养基】** 七叶苷培养基。

**【方法】** 将被检细菌接种到七叶苷琼脂斜面培养基上，35℃培养18~24h，观察结果。

**【结果】** 培养基变黑色者为阳性；培养基不变色者为阴性。

**【应用】** 主要用于D群链球菌与其他链球菌的鉴别，前者为阳性，后者为阴性。亦可用于肠杆菌科细菌、其他革兰氏阴性杆菌及厌氧菌的鉴别。

#### **【蛋白质和氨基酸的代谢试验】**

##### (一) 靛基质生成试验：

**【原理】** 某些细菌能产生色氨酸酶，可分解蛋白胨中的色氨酸产生靛基质（吲哚），后者与对二甲氨基苯甲醛作用，形成红色的玫瑰靛基质（玫瑰吲哚）。

**【培养基】** 胰蛋白胨水培养基

**【试剂】** 有 Kovac 和 Ehrlich—Bohme 两种，两种试剂的效果基本相同，但 Ehrlich—Bohme 试剂较敏感而受到优选。

**【方法】** 将待检菌接种于蛋白胨水培养基中，经 35℃ 培养 24~48h，取出后加上试剂数滴，观察两层液面的颜色。

**【结果】** 出现红色液面为阳性，黄色液面为阴性。

**【应用】** 肠杆菌科细菌的鉴定，如大肠埃希菌为阳性，产气肠杆菌为阴性。

## (二) 硫化氢生成试验

**【原理】** 有些细菌能分解培养基中含硫氨基酸（胱氨酸、半胱氨酸等），产生硫化氢（H<sub>2</sub>S）。当培养基中含有铅盐或铁盐时，硫化氢可与其反应生成黑色的硫化铅或硫化亚铁。

**【培养基】** 含硫酸亚铁或醋酸铅的培养基

**【试剂】** 硫酸亚铁或醋酸铅直接加在培养基中，其中醋酸铅的敏感性较高。培养基中还常加入少量硫代硫酸钠，以保持还原环境，使硫化氢不被氧化。

**【方法】** 将待检菌接种到醋酸铅或双糖铁培养基中，35℃ 培养 24~48h，观察结果。

**【结果】** 培养基变黑为阳性，不变色为阴性，

**【应用】** 常用于肠杆菌科细菌的属间鉴别。沙门菌属、爱德华菌属、枸橼酸杆菌属和变形杆菌属的多数菌株为阳性，其他菌属多为阴性。

## (三) 苯丙氨酸脱氨酶试验

**【原理】** 某些具有苯丙氨酸脱氨酶的细菌，可使苯丙氨酸脱氨形成苯丙酮酸，后者与三氯化铁作用，形成绿色化合物。

**【培养基】** 苯丙氨酸琼脂

**【试剂】** 100g/L 三氯化铁水溶液

**【方法】** 有琼脂斜面法和快速纸片法。

(1) 琼脂斜面法 将待检菌的斜面培养物，大量移种到苯丙氨酸琼脂斜面上，35℃ 培养 18~24h，再从斜面上滴加 100g/L 三氯化铁水溶液 4~5 滴，使其自琼脂斜面上缓缓流下，或转动斜面，使试剂充分与细菌接触。

(2) 快速纸片法 用 1cm<sup>2</sup> 大小的滤纸片浸泡于 10% 苯丙氨酸磷酸盐缓冲液（pH7.2~7.4）中，晾干备用。将待检菌的菌落涂布在纸片上，35℃ 孵育 15min，取出后滴加 100g/L 氯化铁溶液，立即观察结果。

**【结果】** 呈现绿色反应者为阳性，注意这种绿色 1~2min 后可消失，阴性者无色。

**【应用】** 多用于肠杆菌科细菌的属间鉴别。变形杆菌属，摩根菌属和普罗威登斯菌属



均为阳性，其它菌属多为阴性。

#### (四) 尿素酶试验

【原理】 产生尿素酶的细菌，能水解尿素生成氨和  $\text{CO}_2$ ，氨及其化合物使培养基呈碱性。

【培养基】 尿素培养基（尿素肉汤或尿素琼脂）。

【试剂】 酚红指示剂，在 pH6.8 以下呈黄色，pH8.4 以上呈红色。

【方法】 将待检菌接种于尿素培养基中，35℃培养 2~4h 或过液，取出观察。如阴性者继续培养 4 天再观察。

【结果】 培养基呈红色反应为阳性；不变色或呈黄色为阴性。

【应用】 肠杆菌科属间鉴定。如奇异变形杆菌，普通变形杆菌，雷极普罗威登斯菌和摩根菌为阳性；克雷伯菌能迟缓分解尿素；肠杆菌科其它细菌多为阴性（变形杆菌通常于 2~4h 呈现阳性反应）。

#### (五) 氨基酸脱羧酶试验

【原理】 某些细菌具有某种氨基酸的脱羧酶，可利用氨基酸脱去羧基产生胺和二氧化碳，胺使培养基为碱性反应。此时指示剂显碱性反应。

【培养基】 氨基酸脱羧酶培养基。

【方法】 将被检细菌接种到 2 支脱羧酶培养基中（其中一支不加氨基酸作对照，另一支加赖氨酸、精氨酸或鸟氨酸），再在培养基上覆盖一层灭菌的液体石蜡，35℃培养 18~24h。

【结果】 在培养初期 2 管均变成黄色，这是由于培养基中少量葡萄糖发酵产酸，指示剂溴甲酚紫变黄色，若氨基酸被脱羧，形成碱性胺类，则培养基又转变为原来的紫色。所以阳性者为紫色；阴性者为黄色，对照管为黄色。

【应用】 主要用于肠杆菌科细菌的鉴定（附录 2-表-1）。

附录 2-表-1 氨基酸脱羧酶试验的阳性和阴性对照

氨基酸	阳性对照	阴性对照
赖氨酸	产气肠杆菌	阴沟肠杆菌
鸟氨酸	阴沟肠杆菌	克雷伯菌
精氨酸	阴沟肠杆菌	产气肠杆菌

#### (六) 精氨酸双水解酶试验

【原理】 某些细菌分解精氨酸产碱，不只是由于精氨酸脱羧酶的作用。精氨酸双水解酶可使精氨酸经过 2 次水解产生鸟氨酸、2 分子氨和 1 分子  $\text{CO}_2$ 。

经气相色谱分析表明，沙门菌分解精氨酸是由于精氨酸双水解酶；而大肠埃希菌则系由

精氨酸脱羧酶。

**【培养基】** 含精氨酸的氨基酸脱羧酶试验培养基或 Thormleg 精氨酸培养基。

**【方法】** 将待检细菌接种到上述培养基中。若做肠杆菌科鉴定时，其上可覆盖以灭菌的液体石蜡；做假单胞菌属的鉴定时，则不能覆盖液体石蜡，置 35℃ 培养。

**【结果】** 指示剂颜色转为碱性时为阳性。即溴甲酚紫转为紫色，酚红指示剂转为红色。Thormleg 培养基通常可观察至 7 天。

**【说明】** 由于培养基 pH 的改变不能证明是由精氨酸脱羧酶或由精氨酸双水解酶所致，欲鉴别应进行气相色谱分析。

### **【有机酸盐及铵盐利用试验】**

#### **（一）枸橼酸盐利用试验**

**【原理】** 某些细菌能利用培养基中的枸橼酸盐作为唯一的碳源，也能利用其中的铵盐（如磷酸二氢铵）作为唯一氮源。细菌生长过程中分解枸橼酸盐产生的碳酸盐和分解铵盐生成的氨（ $\text{NH}_3$ ），均能使培养基变碱，使指示剂呈碱性反应。

**【培养基】** 枸橼酸盐培养基

**【试剂】** 溴麝香草酚蓝指示剂，在 pH6.0 以下呈黄色，pH7.6 以上呈蓝色。

**【方法】** 取待检菌，接种于枸橼酸盐琼脂培养基上，35℃ 培养 24~48h，观察结果。如为阴性，应继续培养至第 4 天观察。

**【结果】** 培养基呈深蓝色反应者为阳性，阴性者培养基中无菌生长，仍为绿色。

**【应用】** 多用于肠杆菌科细菌的属间鉴别。如沙门菌属、产气肠杆菌、克雷伯菌属、枸橼酸杆菌、沙雷菌属等通常为阳性，埃希菌属、志贺菌属等多为阴性。

细菌的生化反应试验是鉴别细菌的必要手段。尤其对形态、革兰染色反应和培养特性相同或相似的细菌之鉴别更为重要。靛基质（I）、甲基红（M）、VP（V）、枸橼酸盐利用（C）四种试验常同时用于鉴定肠道杆菌，合称为 IMViC 试验。

#### **（二）丙二酸钠利用试验**

**【原理】** 某些细菌能利用丙二酸钠作为碳源，将其分解产碱，使指示剂显碱性反应。

**【培养基】** 丙二酸钠培养基。

**【方法】** 将被检细菌接种到丙二酸钠培养基上，35℃ 培养 24~48h，观察结果。

**【结果】** 阳性者培养基由绿色变为深蓝色；阴性者培养基颜色不变。

**【应用】** 多用于肠杆菌科细菌的属间鉴别。克雷伯菌属为阳性，枸橼酸杆菌、肠杆菌属、哈夫尼亚菌属中有些细菌也可呈阳性，其他菌属为阴性。

## 【呼吸酶类试验】

### (一)氧化酶试验

【原理】 某些细菌(如奈瑟菌和铜绿假单胞菌等)具有氧化酶,能将二甲基对苯二胺或四甲基对苯二胺试剂氧化成红色的醌类化合物。

【试剂】 盐酸二甲基对苯二胺(或四甲基对苯二胺) 0.5g、蒸馏水 50ml。此试剂配好后,装在有色密闭玻璃瓶内,可保存一周。

#### 【方法】

1. 取白色滤纸 1 条,沾取被检细菌少许,再加试剂 1 滴,阳性者立即出现红色,并且以后颜色逐渐加深。
2. 将试剂滴加到被检细菌的菌落上,阳性者菌落立即呈红色,继而变为深红色至深紫色。此试验避免接触含铁物质,因遇到铁,会出现假阳性。

【应用】 主要用于肠杆菌科细菌和假单胞菌的鉴别。肠杆菌为阴性,假单胞菌为阳性。奈瑟菌属和莫拉菌属也呈阳性。

### (二)触酶试验

【原理】 具有触酶的细菌能催化过氧化氢放出初生态氧,继而形成氧分子出现气泡。

【试剂】 3%过氧化氢和 30%过氧化氢溶液。

【方法】 用接种环取被检细菌的菌落少许,置于洁净的玻璃片上,滴加试剂 1~2 滴,观察结果。应用时作阳性和阴性对照。

【结果】 1 分钟内产生大量气泡者为阳性,不产生者为阴性。

#### 【注意】

1. 不宜用血琼脂平板上的菌落(易出现假阳性)。
2. 30%过氧化氢仅用在奈瑟菌属中淋病奈瑟菌与其他奈瑟菌的鉴别,前者阳性,后者均为阴性。

【应用】 主要用于革兰氏阳性球菌的初步分类。葡萄球菌属和微球菌属为阳性,链球菌属为阴性。

### (三)氰化钾试验

【原理】 呼吸系统中的细胞色素、细胞色素氧化酶、过氧化氢酶和过氧化物酶均以铁卟啉为辅基,氰化钾与铁卟啉结合,使这些酶失去活性,导致细菌生长受到抑制。

【培养基】 氰化钾培养基。

【方法】 将被检细菌接种到氰化钾培养基中,35℃培养 48h,观察结果。

**【结果】** 若细菌生长(不被抑制)为阳性；不生长(抑制)为阴性。

**【说明】** 此试验与细菌接种量和培养基中的营养成分有关。因此必须控制细菌接种量和营养成分，特别是蛋白胨的相对稳定(包括质量和数量)。

#### (四)硝酸盐还原试验

**【原理】** 某些细菌能还原培养基中的硝酸盐为亚硝酸盐，亚硝酸盐与醋酸作用，生成亚硝酸，亚硝酸与试剂中的对氨基苯磺酸作用生成重氮苯磺酸，再与 $\alpha$ -萘胺结合，生成N- $\alpha$ -萘胺偶氮苯磺酸(红色化合物)。

##### **【试剂】**

甲液 对氨基苯磺酸 0.8g、5mol / L 醋酸 100ml。

乙液  $\alpha$ -萘胺 0.5g、5mol / L、醋酸 100ml。

**【培养基】** 硝酸盐培养基。

**【方法】** 将被检细菌接种于硝酸盐培养基中，35℃培养 1~4 天，每天吸取培养物 2ml，加甲液和乙液等量混合液(用时混合)0.1ml，观察结果。

**【结果】** 立即或于 10min 内出现红色者为阳性。加入试剂不出现红色，加入少许锌粉仍无色，硝酸盐反应为阳性

##### **【说明】**

1. 试验时，同时以未接种细菌的培养基作对照。

2. 如加入试剂不出现红色，需检查硝酸盐是否被还原，可于原试管内再加入少许锌粉，如仍无色，说明亚硝酸盐进一步分解，硝酸盐反应为阳性。若加锌粉后出现红色，说明锌使硝酸盐还原为亚硝酸盐，而待检细菌无还原硝酸盐的能力，为阴性。

**【应用】** 主要用于鉴别肠杆菌科细菌、假单胞菌及厌氧菌。

#### (五)氯化三苯四氮唑(TTC)试验

**【原理】** 尿路细菌感染时，尿液中的部分细菌，能还原无色可溶性的氯化二(三)苯四氮唑(TTC)，形成红色不溶性三苯甲腈。

##### **【试剂】**

1. 贮存液 以无菌蒸馏水配制  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  饱和溶液。再取 TTC 775mg，溶于 100ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  饱和液中，混匀后，放置暗处，可保存 2~3 个月。

2. 应用液 取贮存液 4ml，加  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  饱和液至 100ml，混匀后，放置暗处。可使用 2~4 周。

**【方法】** 以无菌吸管吸取清洁中段尿 2ml 置于无菌试管中，加 TTC 应用液 0.5ml，混

匀后，35℃8h 后观察结果。

**【结果】** 出现红色者为阳性；出现淡红色者为弱阳性；不变颜色者为阴性。

**【说明】** 若试验尿液为血尿时，少量血尿不影响结果。大量血尿时，可先将尿液离心沉淀(1 000r / min)，取上清液进行试验。

**【应用】** 主要用于尿路感染的判定。此试验阳性，尿液细菌培养亦阳性，95%左右属于尿路感染。此试验阴性，尿液细菌培养为阳性，则可能是尿路感染，亦可能是污染，必须结合临床和其他检查进行鉴别。此试验阴性，尿液培养亦阴性，则多为非尿路感染。

## **【毒性酶类试验】**

### **(一)溶血试验**

**【原理】** 某些细菌在代谢过程中，可产生溶血素，能使人或动物的红细胞发生溶解，借此来鉴别细菌。

#### **【方法】**

1. **平板法** 将被检细菌接种到血琼脂平板上，35℃培养 24h 后，观察结果。

2. **试管法** 取被检细菌 16~18h 肉汤培养物若干，加入等量的经生理盐水洗涤 3 次的 2%的羊红细胞悬液，35℃水浴中 30min 后，观察结果。

#### **【结果】**

1. **平板法** 菌落周围出现透明的溶血环(完全溶血)或出现草绿色的溶血环(不完全溶血)为阳性。

2. **试管法** 出现溶血者为阳性。

### **(二)凝固酶试验**

**【原理】** 金黄色葡萄球菌能产生凝固酶，可使血浆中的纤维蛋白原变为纤维蛋白，附着于细菌表面，在玻片上形成凝块，也可使试管中的血浆发生凝固。凝固酶试验是鉴定金黄色葡萄球菌致病性的重要试验，分为玻片法和试管法。玻片法检测结合型血浆凝固酶(凝聚因子)；试管法检测游离型血浆凝固酶。

#### **【方法】**

1. **玻片法** 取未稀释的兔血浆和生理盐水各一滴分别滴于载玻片上，挑取金黄色葡萄球菌菌落少许分别与之混合，立即观察结果。此法用于测定结合型凝固酶。

2. **试管法** 取 3 支试管，各加 0.5ml 1:4 稀释的新鲜兔血浆(或人血浆)，在其中一支试管中加 0.5ml 待检菌的肉汤培养物，另二支试管中分别加 0.5ml 凝固酶阳性和阴性菌株肉汤培养物作对照，35℃水浴，3~4h 后观察结果。若阴性可继续观察到 24h。此法用于测定

游离型凝固酶。

#### 【结果】

1. **玻片法** 细菌在血浆中聚集成团块，为凝固酶试验阳性；反之，细菌在血浆中呈均匀混浊则为阴性。

2. **试管法** 细菌使试管内血浆凝固呈胶冻状，为凝固酶试验阳性，试管内血浆不凝固，则为阴性。

【应用】 主要用于葡萄球菌的鉴定。

### (三) DNA 酶试验

【原理】 某些细菌产生 DNA 酶，能分解培养基中的 DNA，使长链 DNA 水解成寡链核苷酸链。由于长链 DNA 可被酸沉淀，寡链核苷酸链则溶于酸，在琼脂平板上加入酸后，菌落周围形成透明环。

【培养基】 0.2%DNA 琼脂平板。

【方法】 将被检细菌接种到 DNA 琼脂平板上，35℃培养 18~24 小时，在平板表面滴加一层 1mol / L 盐酸，厚度使菌落浸没。

【结果】 菌落周围出现透明者为阳性；菌落周围出现沉淀者为阴性。

【应用】 主要用于葡萄球菌、沙雷菌、变形杆菌的鉴定，三者均为阳性。

### (四) 卵磷脂酶试验

【原理】 某些细菌产生卵磷脂酶，在有钙离子存在时，迅速分解卵黄或血清中的卵磷脂，形成混浊沉淀状的甘油酯和水溶性的磷酸胆碱。

【培养基】 10%卵黄琼脂平板。

【方法】 取被检细菌接种或点种在卵黄琼脂平板上，置 35℃培养 3~6 小时，观察结果。

【结果】 经 3 小时后，在菌落周围形成乳白色混浊环，即为卵磷脂酶阳性菌株，6h 后该混浊环可扩大到直径 5~6mm。

【应用】 主要用于葡萄球菌的鉴定。

#### 【其他试验】

### (一) 胆汁溶菌试验

【原理】 肺炎链球菌具有自体溶解酶，而胆汁或胆盐可促使自溶酶产生自溶现象。

【方法】

1. **试管法** 取肺炎链球菌和甲型溶血性链球菌血清肉汤培养物 0.9ml (或 0.8ml) 于 2 个试

管中，分别加入 10%去氧胆酸钠溶液 0.1ml (或纯牛胆汁 0.2ml)，摇匀后，置 35℃水浴 10~15min 观察结果。

**2. 平板法** 取 10%去氧胆酸钠溶液各 1 接种环，直接加在血琼脂平板上肺炎链球菌和甲型溶血性链球菌的菌落上，置 35℃温箱培养 30min 后观察结果。

**【结果】**

1. **试管法** 如细菌悬液由混浊变为透明状，为胆汁溶菌试验阳性；仍混浊为阴性。

2. **平板法** 若菌落消失为阳性；菌落不消失为阴性。

**【应用】** 主要用于肺炎链球菌和甲型溶血性链球菌的鉴别。前者为阳性，后者为阴性。

**(二) 嗜盐性试验**

**【原理】** 某些细菌(如肠道杆菌)，在高于 3%氯化钠培养基上不生长，但能在无盐培养基上生长，称为非嗜盐菌。某些细菌(如副溶血性弧菌等)在含 3%~6%氯化钠培养基上生长，但在无盐培养基上不生长，称为嗜盐菌。有些细菌(如葡萄球菌，铜绿假单胞菌等)，在无盐和高盐培养基上，均能生长，称为耐盐菌。

**【方法】** 取被检细菌，分别接种到一支无盐葡萄糖蛋白胨水和一支 5%~6%氯化钠葡萄糖蛋白胨水中，35℃培养 6~12h，观察生长情况。

**【结果】** 如附录 2-表-2。

附录 2-表-2 嗜盐性试验结果判断

生 长 情 况		结果判断
无盐葡萄糖蛋白胨水	5%~6%氯化钠葡萄糖蛋白胨水	
—	+++	嗜盐菌
+++	—	非嗜盐菌
++	++	耐盐菌

**(三) Optochin 敏感试验**

**【原理】** 肺炎链球菌对 Optochin(乙基氢化羟基奎宁)敏感，可抑制其生长，作用机制可能是干扰其叶酸的生物合成。而其他链球菌则耐药。

**【方法】** 挑取被检菌落，涂在血琼脂平板上，将 Optochin 纸片贴于接种处，35℃孵育 18h，观察结果。

**【结果】** 抑菌环直径 $\geq 14\text{mm}$  为敏感，推断为肺炎链球菌。抑菌环 $< 14\text{mm}$  时，参照胆汁溶菌试验，或为其他草绿色链球菌。

**【应用】** 主要用于肺炎链球菌的鉴定。

**(四) 杆菌肽敏感试验**

**【原理】** A 群链球菌对杆菌肽敏感，而其他群链球菌则耐药。

**【方法】** 挑取被检菌密集涂布在血琼脂平板上，将杆菌肽纸片（0.04U/片）贴于接种处，35℃孵育 18~24h，观察结果。

**【结果】** 抑菌环>10mm 为敏感，可推断为 A 群链球菌；抑菌环<10mm 时为耐药。

**【应用】** 主要用于 A 群链球菌的鉴定。

#### **(五) CAMP 试验**

**【原理】** B 群链球菌能产生 CAMP 因子，可促进金黄色葡萄球菌 β 溶血素活性。因此，在血平板上，在两菌（B 群链球菌和金黄色葡萄球菌）交界处出现箭头状溶血区。

**【方法】** 在血平板上，先用产生 β-溶血素的金黄色葡萄球菌划种一条直线，再将被检菌距金黄色葡萄球菌 3mm 处垂直接种一短线。用同样方法接种阴性和阳性对照。35℃孵育 18~24 小时。

**【结果】** 在被检菌接种线与金黄色葡萄球菌接种线之间有一个箭头状（半月形）透明溶血区，此即 CAMP 试验阳性。无加强溶血区者为阴性。

**【应用】** 主要用于 B 群链球菌的鉴定。

#### **(六) O/129 抑菌试验**

**【原理】** O/129 即二氨基二异丙基蝶啶，对弧菌属的菌株有抑菌作用。

**【药敏纸片制备】** 取 O/129 80mg 溶于 10 ml 无水酒精中。吸取此液 1ml，加入 200 片直径 6 ml 的无菌滤片中，充分浸匀后，35℃烘干备用。每个纸片含 40 μg 的 O/129。

**【方法】** 将被检细菌的蛋白胨水培养物，均匀涂布于碱性琼脂平板上，贴上 O/129 纸片于接种区的中央，35℃培养 18~24h，观察结果。

**【结果】** 出现抑菌环为敏感，无抑菌环者为阴性。

**【应用】** 主要用于弧菌属的鉴定。

#### **(七) 氢氧化钾拉丝试验**

**【原理】** 革兰阴性菌的细胞壁在稀碱溶液中易于破裂，释放出来断裂的 DNA 螺旋，使 KOH 菌悬液呈粘性，可用接种环搅拌后拉出粘丝，而革兰阳性菌在稀碱溶液中没有上述变化。

**【方法】** 取 1 滴新鲜配制的 4%KOH 水溶液于洁净的玻璃片上，取新鲜菌落少许，与 KOH 水溶液搅拌均匀，并每隔几秒钟上提接种环，观察能否拉出粘丝。

**【结果】** 用接种环拉出粘丝者为阳性，仍为混悬液者为阴性。大多数革兰阴性菌于 5~10 秒内出现阳性反应，有的则需 30~45 秒；革兰阳性菌于 60 秒以后仍为阴性。



### 附录3 “一口清、一手精”项目标准

#### 革兰染色

操作步骤		一口清词
制片	实验准备	1.取洁净载玻片一张，置于实验台上 2.点燃酒精灯
	接种环灭菌	3.右手执笔式持接种环，先将接种环金属丝部分竖直于酒精灯火焰烧灼灭菌，斜持接种环，将金属柄下 1/3 旋转通过火焰三次
	取生理盐水	4.左手斜持生理盐水试管，右手小指与小鱼际夹持试管塞旋转拔出，试管口旋转通过火焰灭菌三次
		5.用接种环取生理盐水一环于载玻片中央
		6.试管口灭菌，盖塞，放回原处 7.接种环灭菌
	取细菌培养物	8.左手持琼脂平板，略开盖置酒精灯火焰侧方约 5~6cm 处
		9.用接种环轻轻刮取细菌少许，将琼脂平板倒置于实验台上
		10.将细菌在盐水中涂成直径约 1cm 的菌膜
	灭菌接种环	11.接种环反向灭菌，放回原处
	干燥	12.将载玻片置于火焰上方不烤手处干燥
固定	13.连续通过火焰三次固定，放回实验台上，熄灭酒精灯	
染色	初染	14.加结晶紫染液 1 滴，染色 1min，水洗
	媒染	15.加卢戈碘液 1 滴，媒染 1min，水洗
	脱色	16.将载玻片置于 95%乙醇溶液中脱色，至紫色不再褪去为止，水洗
	复染	17.加稀释复红染液 1 滴，复染 30 秒，水洗、吸干
镜检	镜检	18.在标本上滴加香柏油一滴，然后将标本置于载物台上，用玻片夹固定
		19.将油浸镜调至几何光轴中心
		20.用推进器将菌膜调至油镜下
		21.从侧面观察，双手缓慢转动粗螺旋，使镜头浸于镜油中至几乎与玻片接触 22.从目镜观察，缓慢调节粗螺旋，待看到模糊物象时，换用细螺旋调节至物象清晰为止。用推进器寻找最佳视野进行观察
结果报告	结果报告	23.染成紫色的为革兰阳性菌；染成红色的为革兰阴性菌
整理显微镜	整理显微镜	24.观察完毕，用拭镜纸擦去镜头上的香柏油，然后将物镜头旋转成“八”字型，关闭电源开关，罩上镜罩，放回原位
处理玻片	处理玻片	25.将载玻片放入消毒缸内，消毒清洁后备用

## 细菌的接种技术

项目	一 口 清 词	
平板分区划线法	实验准备	1. 取琼脂平板一块，置于操作台上
	接种环灭菌	2. 点燃酒精灯，接种环烧灼灭菌
	取细菌	3. 取标本接种于平板一端
	划线	4. 将接种环与平板保持 30~40°角，运用腕力以“Z”字形在培养基表面连续划线，划线要直、密、不重叠，划至平板 1/2 处，接种环反向烧灼灭菌
		5. 将平板旋转 90°，开始划线时与上一区的 2~3 根线相交数次后连续划线，划至平板剩余 1/2，接种环反向烧灼灭菌
		6. 再将平板旋转 90°，与上一区的 2~3 根线相交数次后连续划线，划满空白区
		7. 接种环反向烧灼灭菌，放回原处
标记	8. 将平板倒置于操作台上，底部标记	
斜面培养基接种法	1. 接种环烧灼灭菌	
	2. 取细菌培养物少许	
	3. 接种环至斜面培养基底部，自下而上划一直线，再从斜面底部蜿蜒划线至上部	
	4. 接种环反向烧灼灭菌，放回原处，试管标记	
液体培养基接种法	1. 接种环烧灼灭菌	
	2. 取细菌培养物少许	
	3. 倾斜液体培养基，将接种环上的细菌于液面与管壁交接处研磨，研磨部位直立后处于液面下	
	4. 接种反向环烧灼灭菌，放回原处，试管标记	
半固体穿刺接种法	1. 接种针烧灼灭菌	
	2. 取细菌培养物少许	
	3. 将接种针从培养基表面正中，垂直刺入培养基中，底部要留有 0.4cm 距离	
	4. 将接种针按原线路退出	
	5. 接种针反向烧灼灭菌，放回原处，试管标记	

## 常见细菌的生化反应试验

试验项目	一 口 清 词	
糖 发 酵 试 验	原理	不同的细菌含有发酵不同糖类的酶，因而分解糖类的能力各不相同，其产物也不一样。有的细菌能分解某些糖产酸产气，有的只产酸不产气，有的则不能分解糖类。
	方法及 结果判 定	将待检菌接种于含指示剂的糖发酵培养基内，35℃培养 18~24h，若被检菌分解糖类产酸，培养基中所含的指示剂呈酸性反应；若产气，则培养基中含有气泡或出现裂隙；若被检菌不分解培养基中的糖类，则培养基无颜色变化。
甲 基 红 试 验	原理	细菌发酵葡萄糖形成丙酮酸，丙酮酸进一步分解成甲酸、乙酸等混合酸，使 pH 降至 4.4 以下，则甲基红指示剂呈红色反应，为 MR 试验阳性。若细菌产酸较少或因产酸后又不断转化为其它物质，使 pH 在 5.4 以上，则甲基红指示剂呈黄色，为 MR 试验阴性。
	方法及 结果判 定	将待检菌接种于葡萄糖蛋白胨水中，35℃培养 18~24h，滴加甲基红试剂，培养液呈现红色为阳性，橘黄色为阴性。
V-P 试 验	原理	有些细菌在发酵葡萄糖产生丙酮酸后，使丙酮酸脱羧，形成中性的乙酰甲基甲醇，后者在碱性环境中被空气中的氧氧化为二乙酰。二乙酰与蛋白胨中精氨酸所含的胍基反应，生成红色化合物。
	方法及 结果判 定	将待检菌接种于葡萄糖蛋白胨水中，35℃培养 18~24h，加入 V-P 试剂，呈红色或橙红色反应为阳性。
靛 基 质 试 验	原理	某些细菌能产生色氨酸酶，可分解色氨酸产生靛基质（吲哚），后者与对二甲氨基苯甲醛作用，形成红色的玫瑰靛基质（玫瑰吲哚），为阳性。
	方法及 结果判 定	将待检菌接种于蛋白胨水培养基中，35℃培养 18~24h，沿管壁缓慢加入对二甲氨基苯甲醛，试剂与培养基两液面接触处呈现红色为阳性，无色为阴性。
硫 化 氢 生 成 试 验	原理	有些细菌能分解含硫氨基酸，产生硫化氢。当培养基含有铅盐或铁盐时，硫化氢可与其反应生成黑色的硫化铅或硫化亚铁。
	方法及 结果判 定	将待检菌穿刺接种到含铅或亚铁离子培养基中，35℃培养 18~24h，出现黑色沉淀为阳性，无变化为阴性。
尿 素 酶 试 验	原理	产生尿素酶的细菌，可分解尿素生成氨和 CO <sub>2</sub> ，氨在水溶液中形成碳酸铵，使培养基呈碱性，酚红指示剂呈红色。
	方法及 结果判 定	将待检菌接种于含有酚红的尿素培养基中，35℃培养 18~24h，培养基呈红色反应为阳性；不变色或呈黄色为阴性。
枸 橼 酸 盐 利 用 试 验	原理	某些细菌能利用培养基中的枸橼酸盐为唯一的碳源，也能利用其中的铵盐为唯一氮源。细菌生长过程中分解枸橼酸盐产生的碳酸盐和分解铵盐生成的氨，均能使培养基变碱性，使指示剂呈碱性反应。
	方 法 及 结 果 判 定	将待检菌接种于枸橼酸盐琼脂培养基上，35℃培养 18~24h，培养基变为深蓝色或有细菌生长者为阳性，培养基中无细菌生长，仍为绿色者为阴性。

## K-B 法药敏试验

操作步骤		一 口 清 词
原理		药敏试验 K-B 法是将含有定量抗菌药物的纸片贴在已接种待检菌的 MH 琼脂平板上，纸片中所含的药物吸取琼脂中的水分溶解后不断向纸片周围扩散形成递减的浓度梯度，在纸片周围抑菌浓度范围内被检菌的生长受抑制，形成无菌生长的透明抑菌圈。抑菌圈直径的大小与细菌对药物的敏感程度呈正相关。
材 料 准 备	药敏纸片	从冰箱中取出标准药敏纸片，置室温平衡 10min 以上。
	MH 琼脂平板	从冰箱中取出制备好的直径为 90mm，厚度为 4mm 的 MH 琼脂平板培养基，置 35℃温箱 30min，使其表面干燥。
操 作 方 法	配制菌液	用无菌棉拭取待检菌菌落，悬浮于生理盐水中，振荡混匀，调整浊度与 0.5 麦氏管相同。
	接种细菌	用无菌棉拭蘸取制备好的菌液，在管内壁挤去多余的菌液，均匀涂布接种于 MH 琼脂表面，涂布 3 次，每次平板旋转 60 度，再沿平板内沿涂抹一周，置室温干燥 3~5min。
	贴药敏纸片	用无菌镊子取药敏纸片，以“纸片中心距离不小于 24mm，纸片距平皿内缘大于 15mm”的标准贴于含菌琼脂表面，用镊尖儿轻压纸片使其平整与琼脂贴紧，纸片贴后不可再移动。共贴 6 种药敏纸片。
	标记	在平皿底部标记。
	培养	15min 内将平皿单层平放于 35℃温箱中培养 16~18h。
结 果 判 定		从温箱中取出培养物，在黑色无反光背景上观察结果，用游标卡尺测量抑菌环直径，测量范围以抑菌环边缘肉眼见不到细菌明显生长为限。参照药敏试验解释标准，报告结果。

## 附录 4 常用指示剂的变色范围及配制

酸碱指示剂不但常用于比色法测定培养基的 pH 值，还广泛应用于细菌生化反应时观察比较细菌培养基的 pH 值变化情况。由于不同指示剂的颜色改变均有一定的 pH 值范围（附录 4-表-1），故在测定和比较培养基 pH 值时，应根据实际需要，选择合适的酸碱指示剂。

附录 4-表-1 常用指示剂的变色范围

指示剂	20℃变色范围 (pH)	颜色变化 酸→碱
溴酚蓝	3.0~4.6	黄色→蓝紫
甲基红	4.4~6.2	红色→黄色
溴甲酚紫	5.2~6.8	黄色→紫色
溴麝香草酚蓝	6.0~7.6	黄色→蓝色
中性红	6.8~8.0	红色→黄色
酚红	6.8~8.4	黄色→紫红色
麝香草酚蓝	8.0~9.6	黄色→蓝
酚酞	8.2~10	无色→紫红色

常用指示剂的配制方法见附录 4-表-2.

附录 4-表-2 常用指示剂的配制

指示剂	0.1g 指示剂应加 0.01mol/L NaOH	应用浓度 (g/L)
溴酚蓝	14.9	0.4
甲基红	*	0.2
溴甲酚紫	18.5	0.4
溴麝香草酚蓝	16.0	0.4
中性红	*	1.0
酚红	28.2	0.2
麝香草酚蓝	21.5	0.4
酚酞	*	0.4

注：\* 表示不加入 NaOH，用 90%的乙醇作溶剂，配制所需浓度

配制常用指示剂时应精确称取指示剂粉末 0.1g，置研钵中，按附录 4-表-2 所示量加入 0.01mol/LNaOH 溶液，研磨溶解，再加水稀释至所需浓度，如加水稀释至 205ml，即成 0.4g/L 浓度。