

第二部分 细菌性疾病的微生物学诊断

细菌性疾病的正确诊断及合理治疗(如通过细菌的药敏试验以选择敏感药物),常需进行微生物学检查。微生物学检查包括细菌及其抗原的检测和抗体检测两方面。

检测细菌或其抗原是诊断细菌性疾病的重要依据,尤其是在正常情况下本应无菌的标本中检出病原菌时,则更有诊断意义。细菌种类很多,其生物学性状各异,要鉴定某种细菌常需采用多种方法,这些方法主要有显微镜直接检查、分离培养、生化反应试验、抗原分析及动物实验等。细菌各论的实验,就是要观察和掌握常见细菌的生物学特性及学会从临床标本中分离和鉴定常见细菌。

检测抗体也常可作为诊断细菌性疾病的重要辅助手段。机体感染病原菌后,经一定时间产生抗体,抗体量随病程而增高,因此,用已知抗原测定病人体液中有无相应抗体及抗体量的动态变化可辅助诊断疾病,此对于病程较长,抗原性较强的细菌感染尤为重要,如诊断伤寒和副伤寒的肥达氏试验就是常用的诊断方法。

细菌培养标本的一般要求:

各种临床标本作细菌学分离鉴定时,收集、送验标本都有其特殊要求,但一般都要注意如下几点。

1. 送验标本必须用细菌检查室特备的无菌试管或其他无菌容器,标本采集后应尽快送检(培养厌氧菌常需采用特殊的厌氧收集瓶)。

2. 采集标本时应严格执行无菌操作,防止杂菌污染,送检途中严防容器翻倒或破裂,以致标本溢出,导致污染及传播。

3. 细菌培养标本不得任意加入防腐、抗菌药物或其他药品。血液、脑脊液等标本,应在病人被使用抗菌药物治疗前采集,如已使用,在送检时应注明已使用过的抗菌药物名称,以便在培养时作适当处理。

4. 对特殊细菌的检查应加注明,如厌氧菌、结核杆菌、脑膜炎球菌、真菌等。须做药物敏感试验者,应注明抗菌药物的名称。

实验九 血液、骨髓的细菌学检查

正常人的血流和骨髓内是无菌的。当细菌侵入血流或骨髓生长繁殖,引起寒战、高热等症状时常可检出致病菌。常见的致病菌为金黄色葡萄菌和大肠杆菌,其他尚有绿脓杆菌、变形杆菌、粪产碱杆菌、链球菌、沙门菌等。败血症的病原菌种类与原发病灶及细菌入侵途径有一定关系。如疖、痈挤弄后的败血症主要为金黄色葡萄球菌和溶血性链球菌。如临床表现酷似败血症而血培养多次阴性者,应注意厌氧菌和真菌感染的可能性。

一、标本采取

(一)尽可能于疾病早期、高热期间、抗菌药物治疗前采血。

(二)无菌操作自静脉采血 5ml(骨髓液 1-2 ml)加于含 50ml 肉汤的培养瓶中摇匀,以防血液凝固(培养瓶口需火焰灭菌)。血液和骨髓量相当于培养液的 1/10,因血液过多,血中的抑菌或杀菌物未被充分稀释,会影响病原菌的生长繁殖;血液过少则含菌数也少,两者都会影响阳性结果。

如果取血液前病人已用过四环素、链霉素或磺胺等药物治疗,则血中可能含有相当浓度的药物,此时则需加入 0.3%硫酸镁(拮抗链霉素、四环素组、多粘菌素等的抗菌作用)、对氨基甲酸(5 ug/100ml,拮抗磺胺类药物的抗菌作用)、青霉素酶(破坏青霉素分子)于培养基中以抵消上述药物抑菌作用,提高分离的阳性率。

(三)凡疑有厌氧菌败血症时,应取厌氧血培养专用培养瓶,按分离培养厌氧菌程序进行。

二、检查程序 (图 9-1)

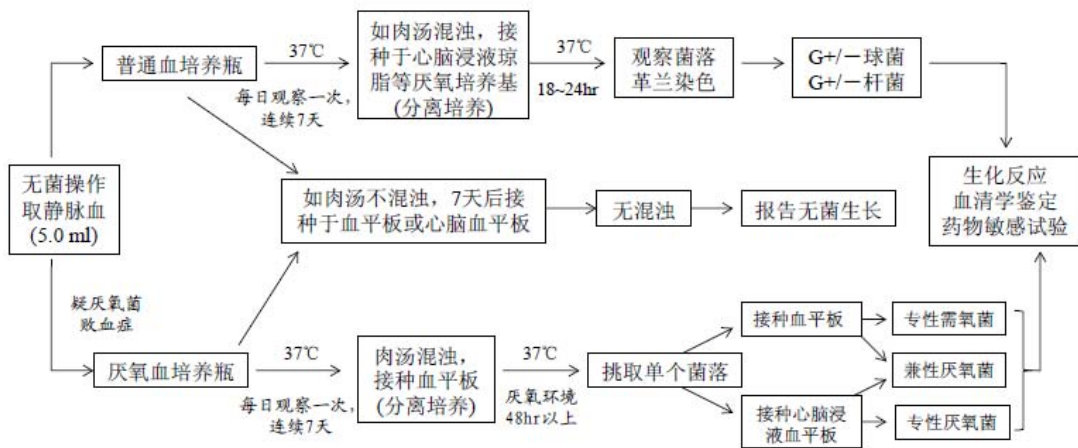


图 9-1 血标本细菌学鉴定流程图

【注意事项】

1. 如疑有脑膜炎球菌败血症,标本应接种于先在 37 °C 预温的液体培养基中,置 10% CO₂ 环境作增菌培养。每日观察,发现混浊后接种于 37 °C 预温的巧克力平板或血平板,置同样环境培养。

2. 对亚急性细菌性心内膜炎患者血培养,宜采血 10 ml 培养,定期移种,3 周后未生长者,可报告“无菌生长”。

3. 由血液培养分离出的任何细菌均应写出报告,如认为细菌生长系污染所致,应报告:“××菌生长,可能系污染”。临床医师对报告应仔细研究,与患者病情核对,以便区别病原菌和污染细菌。

(一)将已接种血液标本的肉汤培养基置 37 °C 培养, 每日观察 1 次(连续 7 天)。如肉汤变混浊, 表示有菌生长, 取一接种环培养物接种于血平板上, 37°C 培养 18~24 h。

(二)观察菌落特征并作革兰染色。

1. 如果菌落中等大小, 光滑, 金黄色, 有溶血圈, 染色为革兰阳性葡萄状球菌, 可疑为金黄色葡萄球菌, 并进行以下鉴定:

(1)接种甘露醇发酵管, 37 °C, 18~24 h 观察结果。

(2)血浆凝固酶试验: 取可疑的菌落加于含 0.3 ml 兔血浆的试管中。先将细菌在试管壁研磨, 然后浸于血浆中, 置 27 °C 水浴 1-4 h, 观察结果, 取出将试管微倾斜, 观察血浆有无凝固。

(3)药物敏感试验:

①取可疑菌落接种于肉汤培养管中, 37°C, 6-8 h。

②用棉签取上述培养物均匀涂布于琼脂平板表面作药物敏感试验, 37 °C 培养 18-24 h, 观察结果。

(4)根据以上试验结果, 判定自被检血液中分离出的细菌及该菌对药物的敏感度。

2. 如果菌落中等大小, 光滑, 灰白色, 染色为革兰氏阴性杆菌, 可疑为肠道杆菌, 并进行以下试验:

(1)用接种针挑取可疑菌落接种于双糖铁基。接种时先将接种针在双糖斜面上自上而下划一条线, 随即穿刺入底层, 然后再自斜面底向上连续划线, 置 37°C 培养 18~24h, 观察结果。

双糖铁基是鉴定肠道杆菌常用的一种培养基, 分为上、下两层, 下层中含有葡萄糖, 为半固体; 上层为斜面, 含有乳糖和硫酸亚铁氨, 培养基中还加酚红作指示剂。利用此培养基可检查细菌对葡萄糖、乳糖发酵情况, H₂S 是否产生以及有无运动力, 可初步鉴定大肠杆菌、伤寒杆菌、副伤寒杆菌和痢疾杆菌。(表 9-2)

表 9-2 常见革兰阴性菌的生物学特性

细菌名称	乳糖	葡萄糖	H ₂ S	运动力
大肠杆菌	+	⊕	-	+
伤寒杆菌	-	+	-/+	+
副伤寒杆菌	-	⊕	+	+
痢疾杆菌	-	+	-	-

(2)取可疑菌落分别接种麦芽糖、甘露醇、蔗糖单糖发酵管和蛋白胨水，37℃培养 18-24 h 观察糖发酵情况和淀粉基质是否产生。

(3)取可疑菌落接种肉汤培养基，37 ℃培养 6~8 h，作药物敏感试验。

(4)根据以上试验结果，判定自被检查血液中分离出的细菌对药物的敏感性。

近来临床上也常用肠杆菌科和其它非苛养 G⁻杆菌鉴定系统（API 10S）进行分离鉴定。

(三)专性厌氧菌的检查程序和鉴定可参阅脓液的细菌学检查部分。

实验十 脓液的细菌学检查

引起化脓性感染的细菌种类很多，如葡萄球菌、链球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌、变形杆菌、无芽胞厌氧菌、气性坏疽病原菌等。对无芽胞厌氧菌感染重要性的认识是近年来医学科学的新进展之一，现已知道，厌氧菌感染遍及临床各领域，尤以腹腔、女性生殖道和口咽部为多见。国外厌氧菌的检查已有开展，我们医学生需了解厌氧菌感染及其检查的新知识。厌氧菌对氧敏感、暴露于空气中容易死亡，同时绝大多数厌氧菌又是人类的正常菌群，因此采集标本时注意不能被正常菌群污染和尽量避免接触空气，收集脓汁(或血液)均需用特制的无氧收集瓶，采集后应尽快送至细菌实验室。

一、标本采集

(一) 需氧菌及兼性厌氧菌检查标本

1. 自溃疡处取标本时，宜先用无菌生理盐水拭净表面，再以无菌棉拭采取溃疡深部的分泌物。

2. 采取脓肿等病灶处的脓液，最好用注射器抽取，脓过厚过少也可用棉拭采取。

(二) 厌氧菌检查标本

1. 需用特制无氧小瓶，该瓶常用青霉素小瓶洗净后内装心脑浸出液 0.5-1 ml，并加少量刃天青为氧化还原指示剂(有氧时粉红色，无氧时无色)。小瓶盖上橡皮塞，加上铝盖，然后将瓶中空气抽净，充以 90%N₂、10%CO₂ 的气体，高压灭菌后备用。如瓶内液体呈红色表示瓶中有氧，应弃去。采标本时，用无菌注射器抽取脓液 0.5-1 ml，然后针头穿过铝盖(抽气时开的小孔)和橡皮塞注入小瓶内。万勿将空气带入瓶内。

2. 在无上述无氧小瓶时，可将注射器针头刺入灭菌橡皮塞内杜绝注射器针头面接触空气，并立即送细菌检验室检验。

二、检查程序(图 10-1)

(一) 需氧菌鉴定可参考血液、粪便等检查程序进行。

(二) 厌氧菌培养法有多种，过去用焦性没食子酸法、生物培养法等，现多采用厌氧缸的抽气换气法、厌氧生物袋法等，后者较方便，现介绍如下，厌氧生物袋(图 10-2)是一种特制不透气的塑料，袋中放有气体发生小管，催化剂小管(内放钯粒)和氧化还原指示剂小管(美蓝)。接种好的平板放入袋中，排出袋中气体，卷叠好袋口，用弹簧夹夹紧，然后折断气体发生小管中安瓿使发生反应产生 CO₂、H₂ 等，在催化剂钯的作用下，H₂+O₂(袋中剩余氧)→H₂O，这更保证了无氧环境，经约半小时再折断指示剂管中美蓝安瓿(美蓝在无氧环境中成无色美白，在有氧环境中又可回复成蓝色的美蓝)，如指示剂不变蓝，表示袋内已成无氧环境，此时即可放 37℃ 孵育培养。

(三) 厌氧菌的确定：厌氧培养 48h 后，打开厌氧袋取出平板，将平板中的每种菌各挑一个菌落分别转种 2 个平板，其中一个是普通血平板，一个是心脑血平板，前者放在有氧环境，后

者放在厌氧环境各培养 48 h。如在有氧环境生长厌氧环境中不生长者为专性需氧菌；在有氧、厌氧环境中均生长者为兼性厌氧菌；在有氧环境不生长厌氧环境生长者可确定为专性厌氧菌。

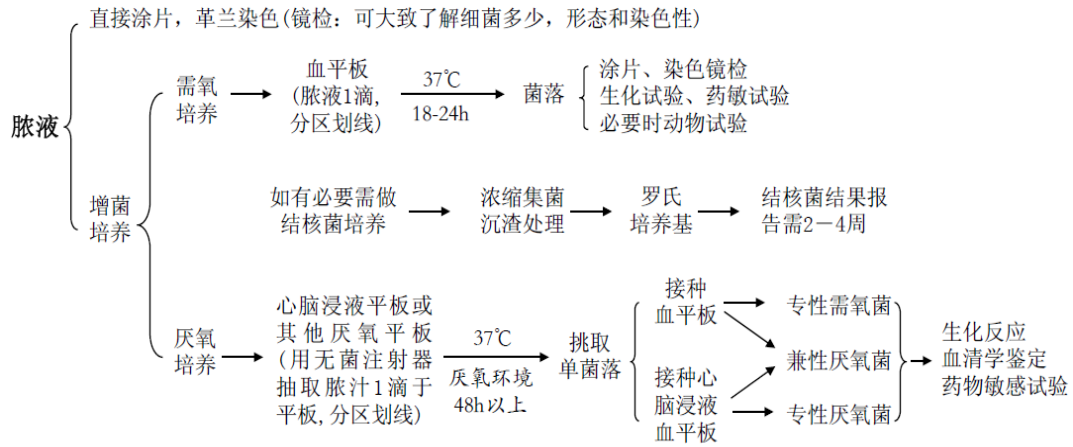


图 10-1 脓液标本细菌学检查流程

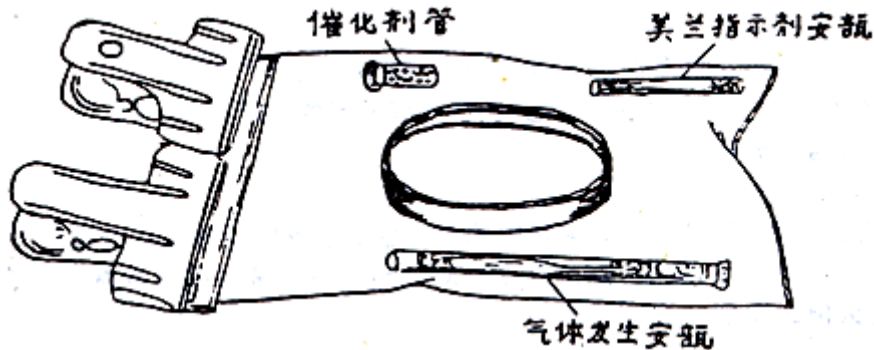


图 10-2 厌氧生物袋图示

(四) 厌氧菌菌种鉴定举例

厌氧菌种繁多, 现选常见的无芽胞厌氧菌——脆弱类杆菌, 和有芽胞的厌氧菌——产气荚膜杆菌为例, 介绍其特征如下:

1. 脆弱类杆菌

(1) 形态: 革兰氏阴性杆菌, 短小, 两端圆, 有时有浓染, 菌体中有空泡。多形性, 有时呈长丝状, 球杆状。染色常较浅, 不均匀。

(2)菌落：灰白色，0.5~2 mm，凸起，半透明，圆形，边缘整齐，一般不溶血。

(3)生化特征：葡萄糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、均发酵产酸，不发酵甘露醇、海藻糖和鼠李糖。能水解七叶灵产生黑色沉淀，不产生吲哚、不液化明胶、不还原硝酸盐。

(4)对抗菌素的敏感性(纸片法)：对万古霉素(5 ug)、多粘菌素(10 ug)、青霉素(2 U)、卡那霉素(1000 ug)不敏感，对利福平(15 ug)、红霉素(60 ug)敏感。

2. 产气荚膜杆菌

(1)形态：革兰氏阳性杆菌、菌体粗大、芽胞一般少见，动物体内可形成荚膜。

(2)菌落：菌落圆形、光滑、灰白色，2-5 mm有双圈溶血环。

(3)庖肉培养基：肉渣变红，不消化，产生大量气体。

(4)石蕊牛乳培养基：该培养基用脱脂牛乳制成，内加石蕊指示剂(碱性蓝色、酸性红色)，产气荚膜杆菌能分解牛乳中的乳糖，产酸，使酪蛋白凝固，同时产生大量气体，冲散凝固的酪蛋白，因此牛乳管中可看到凝固的蛋白和冲至管顶部的凡士林，此称为“暴风雨型”或“汹涌型”发酵，是本菌的重要特征。

(5)卵磷脂酶试验：将产气荚膜杆菌接种于卵磷脂平板(琼脂培养基中加 10%新鲜无菌卵黄)上，接种面积约为直径 2mm，在细菌接种处复盖一无菌盖玻片，轻压，使之与培养基紧密结合，勿留气泡。37℃放置 4~5h 观察结果。如在细菌接种处有混浊沉淀形成即为阳性，这是因为产气荚膜杆菌产生的卵磷脂酶将蛋黄中的卵磷脂分解为甘油和脂肪酸，后者可在细菌接种处形成沉淀。

附：心脑血管琼脂平板

(一)心脑血管浸出液的制备

将去筋膜并搅碎后的牛心和牛脑各 500g，分别置 2 只 2000ml 容量的三角烧瓶内。各加 1000ml 蒸馏水放 4~6℃过夜，次日去浮油，再分别放 45℃水浴中加热 1h，用纱布及脱脂棉过滤后，补充失水至 1000ml，66.75N(15LB)、20min 灭菌后备用。

(二)心脑血管琼脂平板的制备

【成分】

牛心浸出液	250ml
牛脑浸出液	200ml
胰蛋白胨	10g
半胱氨酸	0.5g
磷酸氢二钠	2.5g
氯化钠	5g
琼脂	20g

【制备】

1. 将上述各成分混合，加热溶解，冷却后调正 pH 至 7.4-7.6。分装于三角烧瓶 100 ml/瓶。经 66.75 N 15 min 高压蒸气灭菌后备用。

2. 在制备平板前先加热融化，待冷却到 55 °C 时无菌加以下各物质，如原三角烧瓶中装 100 ml 培养基则加入。

氯化血红素 0.5 mg

维生素 K₁ 1 mg

无菌脱纤维羊血 5-10 ml

3. 倾注平板后应及时使用。

4. 加入维生素 K₁ 有利于产黑素类杆菌的生长，加入氯化血红素有利于类杆菌的生长。

实验十一 粪便的细菌学检查

肠道致病菌主要是志贺菌、沙门菌、霍乱弧菌、结核杆菌、嗜盐菌及变形杆菌等。这些菌是引起人类菌痢、伤寒、副伤寒、肠炎、霍乱、结核及细菌性食物中毒的病原菌。但有的也可出现在无症状的带菌者身上。以下以菌痢、伤寒以及肠道优势菌群的检出为例，叙述粪便的细菌学检查过程。

一、菌痢和伤寒的检出

(一) 标本采取

1. 粪便中细菌极多，为此，粪便的细菌检查常根据检验目的菌的不同而选择不同培养基或用适当方法处理，尽可能地抑制杂菌，以利于病原菌的检出。但不能就认为粪便标本的采集无须注意杂菌污染，若便器或标本盛器不洁而污染了变形杆菌，就可能影响病原菌的分离检出，甚至把污染菌误报造成误诊。

2. 疑似痢疾患者应采取发病初期，用药前，新鲜的脓血或粘液部分的标本，置于消毒容器内送验。液状粪便可挑取絮状物。无法获得粪便时，可采用直肠拭子，即用灭菌棉拭经生理盐水或甘油缓冲盐水湿润后，插入肛门内 4~5 cm 处，轻轻转动一圈拿出。

3. 粪便标本如不能立即送检，可将标本放入甘油盐水保存液中。

(二) 检查程序 (图 11-1)

自粪便中分离培养细菌需连续四日进行系列鉴定。

1. 第 1 日取粪便标本用 S. S 平板作分区划线接种，37℃培养 18~24 h，观察菌落特征。S. S 平板是一种选择性培养基。培养基中除含有营养物质外，还有胆盐、煌绿、硫代硫酸钠和枸橼酸钠等化学剂，这些物质能抑制非致病菌(如大肠杆菌)生长，而胆盐又有促进沙门菌、痢疾菌生长的作用。此外 S. S 平板中还加有乳糖和中性红指示剂(酸性为红色，碱性为蓝色)。

肠道致病菌不分解乳糖，所以在 S. S 平板上生长的菌落为无色透明的小菌落。如能产生 H₂S，则菌落中心呈黑色。大肠杆菌在 S. S 平板上一般不生长，但如粪便标本接种得多，大肠杆菌量多所以仍有生长。大肠杆菌能发酵乳糖产酸，菌落呈红色，或显红色中心，很容易和致病菌区分。

2. 第 2 日：

观察 S. S 平板上菌落，用接种针挑取两个无色透明的可疑为肠道致病菌菌落分别接种于两支双糖铁基中，37℃培养 18-24 h 观察结果。

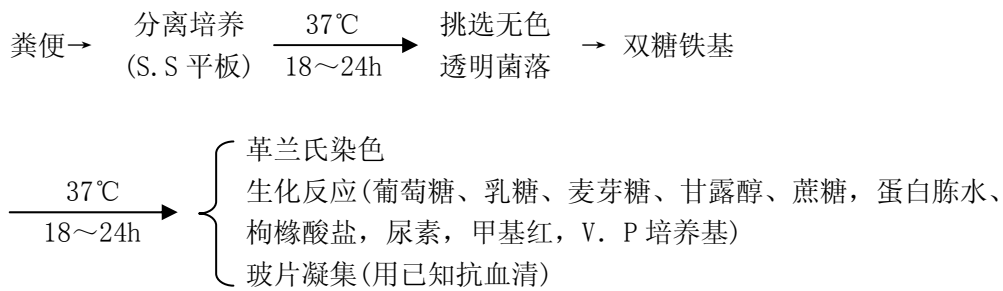


图 11—1 粪便标本细菌学检查流程图

3. 第 3 日:

观察双糖铁基结果。如果双糖铁基中乳糖不发酵, 可能为肠道致病菌。根据葡萄糖发酵结果、运动力的有无可初步判定为那一类细菌。最后鉴定该菌尚需自双糖铁基上取材做以下试验。

(1) 革兰氏染色。

(2) 转种葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇、蔗糖五种单糖发酵管和蛋白胨水(为观察吲哚试验用), 37°C 培养 18~24 h。

(3) 选用已知抗血清用玻片凝集试验。

4. 第 4 日:

(1) 观察单糖发酵及加靛基质后观察吲哚试验结果。

(2) 根据以上各试验结果, 判定被检粪便中分离的肠道致病菌是一种沙门菌或是志贺菌。

【附录】荧光菌球试验

荧光球试验是一种改良的免疫荧光速诊断技术。可用以检测粪便中肠道致病菌。其原理是在细菌培养液(胰蛋白胨水)中加一定量荧光抗体, 然后接种粪便标本, 若粪便中有相应的病原菌出现时, 抗体即与之凝集, 凝集后细菌并不死亡, 继续繁殖而聚集成团生长, 在荧光显微镜下呈现一团绒球样荧光, 故称荧光菌球。以下是志贺菌的检查方法。

【材料】

福氏志贺菌 12 h 液体培养物。

福氏志贺菌荧光血清干粉(安瓿装)。

2% 胰蛋白胨水。

普通琼脂平板。

无菌生理盐水。

无菌 5ml、1ml 吸管, 毛细吸管。

干净载玻片。

垫有湿纱布的搪瓷盘。

【方法】

1. 荧光抗体稀释

(1) 打开安瓿：每安瓿内加 0.2 ml 无菌生理盐水，使之溶解；

(2) 吸取荧光抗体 0.1 ml 加于 4.9 ml 胰蛋白胍水中，使工作浓度为 1:50，装于避光容器内备用。

2. 操作：取 3 片载玻片，编号 1、2、3，在每张玻片上分别加 2 大滴含 1:50 荧光抗体的胰蛋白胍水。用接种环取福氏痢疾杆菌培养物一环于第 1 滴蛋白胍水中，烧去接种环上余菌，冷却后从第一滴蛋白胍水中取一环至第 2 滴；如此，稀释至第 6 滴，然后将载玻片置于垫有湿纱布的搪瓷盘内，37℃ 9~18 h，取出后，加盖玻片，用荧光显微镜看结果。镜下可见绒球样发黄绿色荧光的菌球，因各液滴中接种细菌数量不同，所形成的菌球可有不同大小。一般在一个视野中以含 2~3 个荧光菌球为好。

二、肠道优势菌群的分离与鉴定（图 11-2）

(一) 实验目的：分离和鉴定肠道优势菌群。

(二) 实验方案：

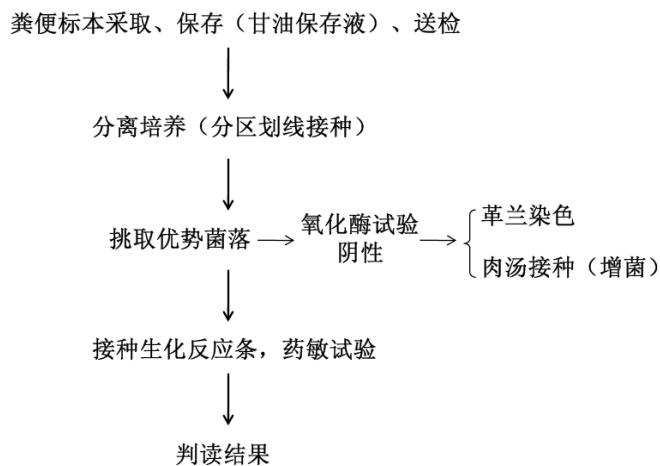


图 11-2 肠道优势菌群分离与鉴定流程图

(三) 实验操作：

1. 标本的采集：采集学生正常粪便，于甘油保存液中保存备用。

2. 分区划线接种：用棉签取标本，采用分区划线法接种于麦康凯平板，37℃ 培养 16-18 h。

【附录】

麦康凯琼脂培养基：（克/升）

蛋白胨	20.0	NaCl	5.0
乳糖	10.0	中性红指示剂	0.025
牛胆盐	5.0	琼脂	15.0-20.0

1. 接种营养肉汤：观察优势菌落颜色、形态、大小、光滑透明度等。挑选任一优势菌落，采用磕碰研磨法接种 3 ml 的营养肉汤，37 °C 培养 16-18 h，为接种肠杆菌科和其它非苛养 G⁻ 杆菌鉴定系统（API 10 S）生化反应条和药敏试验备用。同时挑取相同的菌落进行革兰染色，油镜观察。

2. 细胞色素氧化酶试验：取白色洁净滤纸刮取相同的目标菌落。加 1% 盐酸二甲基对苯二胺溶液一滴，阳性者呈现粉红色，并逐渐加深呈紫色，最后呈黑色，阴性者不变色。

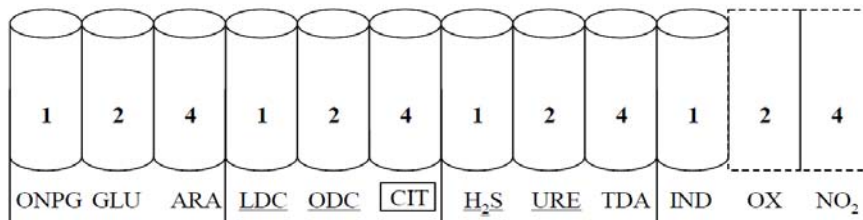
3. 接种生化反应条：（图 11-3）

（1）细菌混悬液制备：从培养好的肉汤中用接种环取两环菌至 3 ml 无菌生理盐水中混匀，（550nm 比色 OD 值为 0.125~0.25 之间）备用；

（2）试验条的准备：试验条接种前需 37°C 孵育 30 分钟；

（3）试验条的接种：

① 取出生化反应条，在反应槽底部加入 3ml 蒸馏水保证培养湿度；



ONPG: 2-磷-硝基苯-β-D-半乳糖苷	H ₂ S: 硫化氢
GLU: D-葡萄糖	URE: 脲素酶
ARA: L-阿拉伯糖	TDA: L-色氨酸脱氨酶
LDC: L-赖氨酸脱羧酶	IND: 吲哚
ODC: L-鸟氨酸脱羧酶	OX: 氧化酶
CIT: 柠檬酸钠	NO ₂ : 亚硝酸盐

图 11-3 生化反应条示意图

表 11-1 生化反应条判读标准

测试	底物	分量 (mg/cup)	反应/酶	结果	
				阴性	阳性
ONPG	2-磷-硝基苯 -β-D-半乳糖苷	0.223	β-半乳糖苷酶	无色	黄色
GLU	D-葡萄糖	1.9	发酵/氧化	兰/兰-绿	黄、黄-灰色
ARA	L-阿拉伯糖	1.9	发酵/氧化	兰/兰-绿	黄色
<u>LDC</u>	L-赖氨酸	1.9	赖氨酸脱羧酶	黄色	橙色
<u>ODC</u>	L-鸟氨酸	1.9	鸟氨酸脱羧酶	黄色	红/橙色
CIT	柠檬酸钠	0.756	柠檬酸利用	浅绿/黄	兰绿/兰色
H ₂ S	硫代硫酸钠	0.075	H ₂ S 产生	无色/带灰	黑色沉淀
<u>URE</u>	脲素 (酚红)	0.76	脲酶	黄色	红色/橙色
TDA	L-色氨酸	0.38	色氨酸脱氨酶	黄色	深褐色(加入 TDA 试剂)
IND	L-色氨酸	0.19	色氨酸酶, 吲哚产生	无色	粉色(加入 JAMES 试剂)
OX		—	细胞色素氧化酶		
NO ₂	(GLU 管)	—	NO ₂ 产生	黄色	红色(加入 NIT1 和 NIT2 试剂 2-3 min 后)

② 在反应条上根据标识进行加样:

用枪头在试验名称未作标识的在试验杯中加一半菌液;

有下划线的加一半菌液后用石蜡液加满封闭;

有方框的加满菌液;

③ 加样后将生化反应槽盖上放入 37 °C 温室培养 16-18 h;

④ 结果判读: (表 11-1)

a. 取出生化反应条, 根据表 11-1 的判读标准进行判读, 阳性结果在相应的小孔上方记“+”, 阴性结果在相应小孔上方记“-”;

b. 对未进行完的反应进行加样:

在 TDA 反应槽中加入一滴 TDA 试剂, 观察并记录结果;

在 IND 反应槽中加入一滴吲哚试剂, 观察并记录结果;

在 GLU 反应槽中分别加入 NIT1 和 NIT2 试剂各一滴 (此为 NO₂ 反应的结果, GLU 反应结果以未加试剂前为准), 2-3 分钟后看结果;

c. 根据生化反应结果进行计数, 每三项为一个数据, 得到一个四位数, 查表进行结果判定, 如图 11-4 所示。

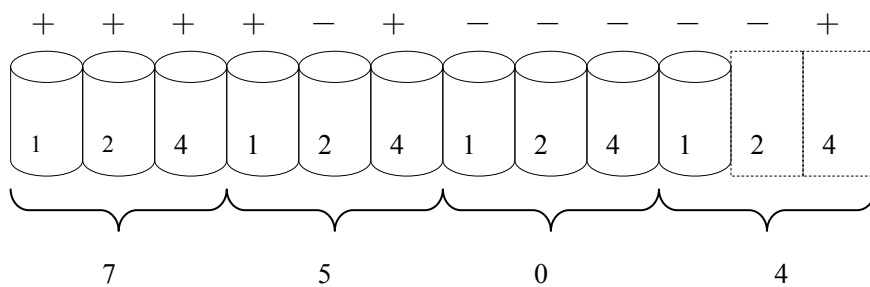


图 11-4 判定结果举例：7504：查表结果为肺炎克雷伯氏菌肺炎亚种

4. 药敏试验：用无菌棉签取肉汤菌液密涂于普通平板上，在将相应的药敏纸片贴在平板上，37 °C 温室培养 16-18 h，测量抑菌圈直径，查表记录结果。

5. 根据生化反应和药敏试验判断肠道优势菌群并测定其耐药性。

实验十二 尿液的细菌学检查

泌尿系统感染是常见疾病，女性尤为常见。致病菌以大肠杆菌最多见，其他有葡萄球菌、链球菌、变形杆菌及绿脓杆菌等。急性早期病例常为单一种菌，慢性期混合感染多见。绿脓杆菌感染常发生于尿道手术或插管后。脓尿病人尿液普通细菌培养阴性者应怀疑可能有结核病或淋病及其它性病。

一、标本采集

1. 一般采集中段尿，先用肥皂水及温开水洗涤外阴部及尿道口，然后用温开水将新洁尔灭配成 1:2000 浸泡局部 15 min，用无菌纱布拭干，让其自行排尿，开始排出之尿弃去。以冲洗尿道前端的细菌，留取中段尿，盛入灭菌容器内送检。必要时以无菌手续，导尿采集标本。

2. 结核杆菌培养，可留取第 1 次全部晨尿盛于消毒瓶内送检。

二、检查程序

(一)涂片检查

取被检尿 10 ml，置于灭菌离心沉淀管内，用 3000 r/min 离心沉淀 20 min，倾去上清液，取沉渣涂片，革兰氏染色(需要时增加抗酸染色)，镜检。

(二)分离培养(图 12-1)

取检尿一接种环，用划线分离法接种于血琼脂平板上(亦可增种一个中国蓝琼脂平板)，37℃ 孵育 18-24 h，生长菌落的鉴定可根据染色性、生化反应等确定(可参阅血、粪的细菌学检查)。

尿的结核菌培养步骤：取清晨全部尿，经 3000 r/min 离心 30 min，取其沉渣 1 ml，然后经类似痰的结核菌培养的处理方法接种于曲氏培养基。

(三)细菌计数

一个有意义的尿细菌计数，取决于正确的采尿技术和迅速接种适宜的培养基。尿液的细菌计数是根据细菌的多少来判断感染或污染。一般认为每毫升含菌量在 1 万个以下，多为污染，无诊断意义；1-10 万个，属可疑，应慎重考虑(取晨尿复查，多可澄清)；10 万个以上者，为真性细菌尿，可肯定为感染。但若病人正在使用抗菌药物等因素，可使菌数小于 10 万，应根据情况予以鉴别。此外培养生长一种以上细菌，即使计数大于 10 万个，亦应怀疑污染。

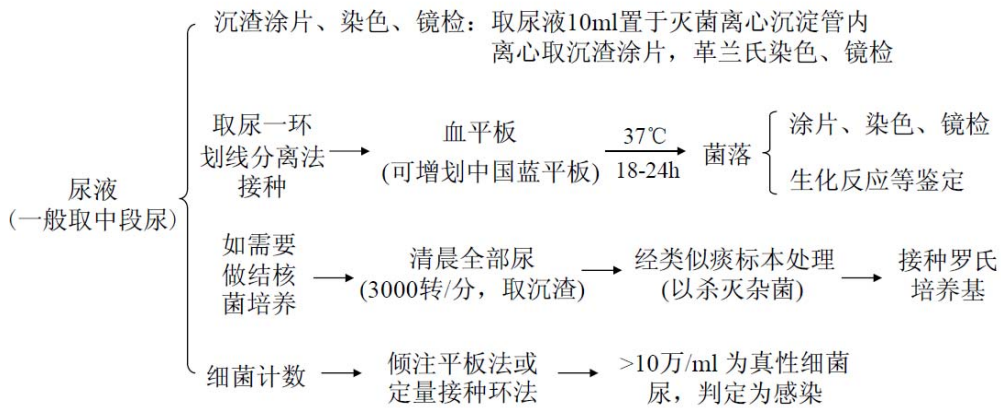


图 12-1 尿液标本细菌学检查流程图

1. 倾注平板法

取新鲜的尿液(通常不超过 2 h), 用灭菌的生理盐水将尿液作 1:1000 稀释, 然后取稀释的尿液 1 毫升, 置于直径约 9 cm 的灭菌平皿内, 再将已融化, 并冷至 45 °C 左右的肉浸液琼脂倾入平皿内(约 15 ml), 混和均匀, 待凝固后, 置 37 °C 孵育 18-24 h. 进行菌落计数。

$$\text{菌落数} \times 1000 = \text{每毫升尿液含菌数}$$

2. 定量接种环法

用定量接种环沾取标本, 然后均匀地用划线法接种于血液琼脂平板上(平均直径 9 cm), 经 37 °C, 18-24 h 的孵育后, 计菌落数, 若定量接种环含量为 0.001 ml 则将整个平板菌落数乘以 1000, 即得每毫升尿液含菌数, 若整个平板菌落数超过 100 个, 则不必计数, 可报告为菌落计数 >10 万 / 每毫升尿液。

实验十三 结核病人痰标本的细菌学检查

痰液中通常含有很多杂菌，培养前必须进行处理。处理的要求是消灭杂菌，尽可能地不影响结核菌，便于集菌。结核菌培养的阳性率及污染率与此密切相关。以前处理的方法很多，一般常用的是氢氧化钠，硫酸，磷酸三钠等，但这些方法对结核杆菌的影响都比较大。现在有人主张使用一种粘液溶解剂 N-乙酰基-L-半胱氨酸与小量氢氧化钠联合使用作为痰的消化剂，效果比较满意。

一、标本采取

1. 痰液标本的采集以清晨为最好，亦可随时采集和送检。采集时应尽量防止唾液及鼻、咽部和口腔内的细菌混入。最好嘱患者先用清水漱口数次，以除去口腔内大部杂菌，然后用自力自气管深部咳出痰液。吐入无菌容器内，立即送检。

2. 作结核菌培养的痰，如不能立即培养，应放入冰箱内，以防止杂菌滋生。

二、检查程序

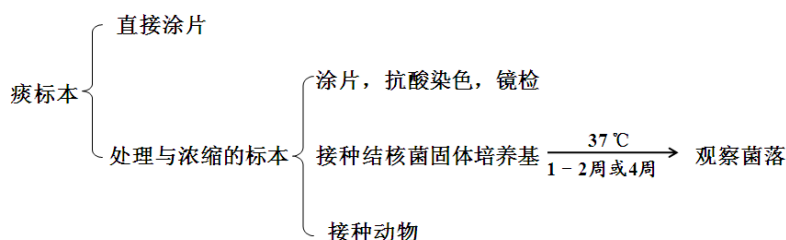


图 13-1 痰标本检查程序

(一)直接涂片：取脓性痰作涂片，抗酸染色油镜观察。结核杆菌呈红色、细长、略弯，单个或呈分枝状，菌体有颗粒状结构，在诊断上有重要意义。非抗酸菌染呈蓝色。

(二)浓缩集菌法：如痰标本中结核杆菌量少。直接涂片不易检出，可将痰标本先浓缩集菌，再涂片染色，可提高阳性率。或是取沉渣作培养或接种动物。以下介绍沉淀集菌法：

1. 取痰 3-5 ml 置试管中，加等量 4% NaOH 和酚红指示剂两滴混合。

2. 置 37℃ 30-45 min(每 10 min 振摇 1 次，然后 3000 r/min，离心 30 min 弃上清，于沉渣中滴加 3% HCl 数滴以中和碱性。

3. 取沉渣作涂片，抗酸染色。

4. 必要时取沉渣作培养或接种动物。

(三)痰标本细菌培养：

取经浓缩集菌的沉渣接种于曲氏固体培养基上。接种后每天观察有无污染，待 2-3 天后，如无污染则改为每周观察一次。一般 2-4 周细菌生长。菌落淡黄色、干燥呈颗粒状。

实验十四 细菌感染后血清中抗体测定

人感染某些细菌，如伤寒杆菌、乙型链球菌后一定时间，血清中可产生特异性抗体，采取病人血清作血清学试验，测定抗体有无，可作疾病的辅助诊断，临床上常用的血清学试验有肥达氏试验和抗“O”溶血素试验等。前者用以辅助诊断伤寒副伤寒，后者辅助诊断乙型链球菌感染。恢复期抗体效价高于早期4倍有诊断价值。

一、标本采取

采患者空腹静脉血3ml左右，分离血清，必要时在疾病的早期和晚期各取血一次送检。

二、肥达氏反应 是一种试管凝集反应

【材料】

被检查血清

伤寒杆菌H、O标准菌液，甲、乙型副伤寒杆菌H标准菌液。

小试管，吸管，生理盐水，试管架。

【方法】

(一)取小试管分四排排列，每排10支，编号。

(二)稀释病人血清(图14-1)，4排各稀释一病人血清。于每排的第1管中加血清0.1ml，然后每管中加入盐水，第1管加0.9ml，其他各管加0.5ml。此时第1管的血清稀释度为1:10(如血清原来未曾稀释)。

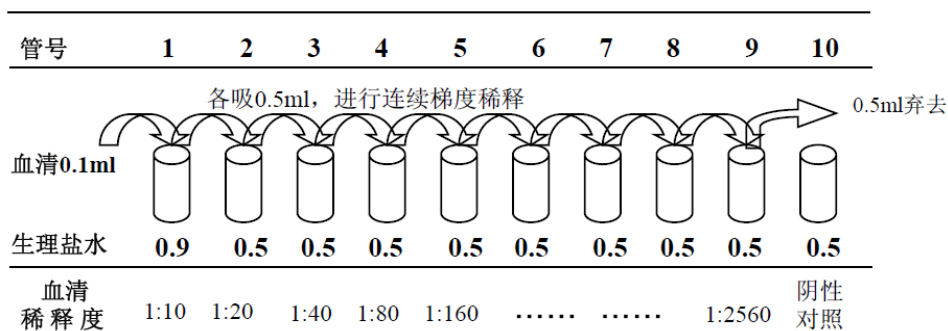


图14-1 血清稀释法

(三)用吸管将第1管中血清与盐水反复吸入与吹出3-5次使之混匀，取混合液0.5ml至第2管，依同法混匀后再吸出0.5ml至第3管，如此稀释直至第9管，混合后弃去0.5ml，第10管不加血清作为对照，这样每管都是0.5ml。

(四)于每1排各管中加入伤寒杆菌O菌液0.5ml，第2排各管中加入H菌液0.5ml，第3排各管中加入甲型副伤寒杆菌O菌液0.5ml，第4排各管中加入乙型副伤寒杆菌O菌液0.5ml。于是各管血清最后稀释度为1/20，1/40，1/80.....1/2560。

(五)振荡试管使菌液与血清充分混合，试管架放 37℃温箱中过夜后观察结果，并判定抗体效价。

结果观察注意点：

(一) 观察结果时，将试管自架中拿出观察底部，注意勿振动或摇摆试管以免凝块摇散。

(二) 先观察不加血清的对照管(第 10 管)。此管中细菌应不发生凝集，但在管底有一整齐的圆团，液体均匀混浊。然后自第 1 管开始依次观察至第 9 管。

(三) “H”和“O”凝集的区别：“H”凝集是鞭毛抗原与相应菌体所形成，凝块疏松，呈絮状沉于管底，轻击管底，似柳絮样絮团浮于液体中；“O”凝集系菌体抗原与抗体作用所形成，凝块致密，贴于管底，轻击管底，呈颗粒状。

结果判定：

(一)液体清，管底有肉眼可见的显著沉淀物(凝块)为 (++)。

(二)管底沉淀物不明显为(+)

(三)管底无沉淀与对照相同为(-)。

抗体效价：能呈现明显(++)凝集的最高血清稀释倍数为血清的凝集效价。