

第1章

臨床微生物總論

彭健芳

內容大綱

學習目標

總論

細菌的構造

臨床微生物檢驗用培養基

臨床檢體的收集與處理

免疫血清學診斷與分子生物技術

臨床微生物室的品管

實驗室安全

實驗室生物安全等級原則性規定

生物安全等級第一級

生物安全等級第二級

生物安全等級第三級

參考資料

學習目標 (Learning Objectives)

- 細菌的構造。
- 臨床微生物檢驗用培養基。
- 臨床檢體的收集與處理。
- 血清免疫學診斷與分子生物技術。
- 臨床微生物實驗室的品管。
- 實驗室安全。

1-1 總論

一、細菌的構造 (Bacterial Structure)

細菌的構造是原核細胞，除了細胞壁以外，原核細胞的內部構造都比真核細胞簡單。

1. 細胞外膜 (Cell Envelope)

大部分的細菌都有細胞外膜，它是由細胞壁以及細胞膜所組成。

(1) 細胞壁 (Cell Wall)

菌體之表層有堅韌的細胞壁圍住細胞膜。細胞壁可保護菌體，抵抗外界物理性損害，例如：低滲透壓或低溫等。有些細菌之細胞壁外層有莢膜 (capsule) 或黏液層 (slime)。細胞壁下層的細胞膜和其內容物統稱為原質體 (protoplast)，由此伸出菌體外之特殊構造有鞭毛 (flagella) 和線毛 (pili)。鞭毛與細菌的運動有關，線毛則與細菌之附著以及行接合生殖有關。細胞質內尚有：類核體 (nuclear body)、核糖體 (ribosome) 與包涵體 (inclusion Body) 等。有些細菌在細胞質內有內孢子 (endospores)。細菌之細胞壁位於細胞膜外。正常細菌除了黴漿菌 (*Mycoplasma*) 皆有細胞壁。

細胞壁主要功能是保持菌體形狀與其堅韌性，使菌體免於破裂。細菌由於細胞膜有主動運送 (active transport) 系統，例如：胺基酸糖及無機離子等，可從低濃度之環境透過細胞膜進入高濃度之細胞質。

細胞壁構造的主要成分是 Peptidoglycan (murein, mucopeptide)，由於 Peptidoglycan 的交互錯綜連接，造成細胞壁之堅韌。革蘭氏陽性細菌的細胞壁比革蘭氏陰性細菌細胞壁厚。因此革蘭氏陽性細菌要較革蘭氏陰性細菌

能抵抗較高的內部滲透壓。細菌的 Peptidoglycan 是由 N-Acetylglucosamine 與 N-Acetylmuramic Acid 兩分子交替連接所組成的骨架。兩個鄰近的 Peptidoglycan 再經由 D-alanine 形成多肽鏈而成連接樑 (crosslinking)。

(2) 細胞質膜 (Cytoplasmic Membrane)

細胞質膜位在細胞壁下，作為菌體細胞內部與外部的屏障，由雙層磷脂質 (phospholipid-bilayer) 以及其間的蛋白質所構成。細胞膜是半透膜，能將菌體所需之成分及巨分子物質留在菌體內，同時能自外界吸取營養物，以供體內之需。因此細胞膜具選擇性。同時細菌的主動運送系統 (active transport) 之進行，係在細胞膜之脂層自由流動。

2. 革蘭氏陽性細菌與革蘭氏陰性細菌之差異

(1) 革蘭氏陽性細菌

革蘭氏陽性細菌之細胞壁幾乎全由厚且緊密的 Peptidoglycan 及 Teichoic Acid 所形成的聚合體組成。

(2) 革蘭氏陰性細菌

革蘭氏陰性細菌之細胞壁雖較革蘭氏陽性細菌為薄，但其化學組成則較為複雜。革蘭氏陰性細菌的細胞壁只有兩層的 Peptidoglycan，沒有 Teichoic Acid。革蘭氏陰性細菌另外有外膜 (outer membrane) 位於 Peptidoglycan 層之外，外膜比單層的 Peptidoglycan 厚。外膜有三種成分：脂質層 (lipid bilayer)，蛋白 (protein) 和脂多醣體 (lipopolysaccharide)。

3. 菌體外部構造 (External Structure)

菌體外部構造重要的有莢膜 (capsule)、鞭毛 (flagella) 和線毛 (pili)。

(1) 莢膜 (Capsule)

為一種無固定形狀的黏滑狀的膠狀膜，通

常其化學組成爲多醣（polysaccharide），但在 *Bacillus anthracis* 爲多個 D-Glutamate 形成的多胜肽（polypeptide）。

(2) 鞭毛（Flagella）

鞭毛爲完全由蛋白質構成的細線型構造。構成鞭毛的組成單位是由一鞭毛蛋白（flagellin）蛋白質。鞭毛是細菌的運動小器官。鞭毛的基體埋於細胞膜上與細胞膜或細胞壁連接，環鈎（hook）與鐵絲（filament）（例如：L 環（L-Ring））連接細胞壁的脂多醣體層。

(3) 線毛（Pili, Fimbriae）

革蘭氏陰性的細菌在其表面有很堅韌的附屬物稱爲線毛，由 Pili 蛋白所構成。線毛較鞭毛更爲纖細而短。線毛有兩種，其中一般線毛（ordinary pili），有助細菌附著宿主細胞；另有一種線毛叫性線毛（sex pili），當細胞行接合生殖時，扮演相當重要的角色。

4. 細菌的染色¹

觀察細菌，染色步驟是一個很重要的工具，可以幫助微生物學家對於所分離的菌種進行分類與鑑定。細菌的染色方法有很多種類，最常用的是革蘭氏染色（Gram Stain）。細菌可依據革蘭氏染色反應結果分爲革蘭氏陽性或革蘭氏陰性，這是細菌在鑑定過程中一個重要的特徵。抗酸性染色（Acid-fast staining）步驟則是應用於辨識分枝桿菌（*Mycobacteria*）是否存在痰液、支氣管沖洗液等。有許多特殊染色步驟使用於芽胞、鞭毛、細胞壁與核酸等染色，這些染色技術對於菌種分類上的應用較少，較常用於觀察菌體的特殊構造。

(1) 革蘭氏染色（Gram Stain）

1883 年，革蘭氏（Christian Gram）發展了革蘭氏染色（Gram stain）。一直到今日，真正的生理化學反應在整個染色過程中仍有些不清楚。細胞壁的通透性是主要決定一個菌體細胞的革蘭氏染色反應結果。因爲革蘭氏陽性菌的

菌體細胞壁的生理化學差異性比革蘭氏陰性菌對於結晶紫—碘複合物（crystal violet-iodine complex）的滯留性較強而呈現紫黑色的菌體，不受 95% 酒精的脫色作用。反之，革蘭氏陰性菌體因爲結晶紫—碘複合物沒有滯留性，在 95% 酒精作用下會將結晶紫流失，於對比染色時，因沙黃液（safranin O）的顏色而呈現紅色。同時，菌體細胞壁的化學組成的存在與否，會改變菌體的染色性，例如：Nucleoprotein, Ribonucleic acid, Polysaccharide 從菌體萃取出來時，或者細胞壁受抗生素作用而抑制其合成等。革蘭氏染色除了觀察純培養的菌體外，更能應用於臨床檢體的直接鏡檢。可作爲病原菌快速的初步檢定。例如：體液、不受污染的膿瘍、軟組織的感染物、男性尿道分泌物等。病患尿液的直接鏡檢，可作爲是否是感染症的依據。

臨床檢體的鏡檢包括菌體的型態、數目及細胞的完整性。膿細胞的核會因爲革蘭氏染色呈粉紅色。革蘭氏染色反應常受某些因素的影響而改變。菌體培養的時間在 18~24 小時，其染色反應正常。但若培養的時間過久而使菌體老化，會改變菌體的染色性，尤其是革蘭氏陽性菌，會因而變成革蘭氏陰性的反應。抑制菌體細胞壁合成的抗生素，會造成革蘭氏陽性菌對脫色液的敏感性增加而脫色。

臨床檢體的顯微鏡檢查有下列三個目的：

1. 中性球（neutrophils）的數目和比例可以顯示發炎反應的形式和輕重度。痰液的革蘭氏染色，可以判定痰液的品質。若鱗狀上皮細胞的數目在低倍顯微鏡（100x）下觀察，小於 10 個，而中性球大於 25 個時，表示痰液的品質是細菌性感染，屬於有臨床意義的檢體。
2. 立刻知道檢體的品質，檢體中所出現的細菌，菌絲、酵母菌等，可提供訊息，作爲初步的實驗診斷，給予特殊治療。

3. 直接鏡檢配合需氧菌培養可以觀察是否有厭氧菌的存在。

(2) 抗酸性染色 (Acid-Fast Stain)

菌體的細胞壁含豐富的長鏈脂肪酸，使細菌對於 Carbol-fuchsin 的染色不會被酸性酒精 (3% HCl Alcohol) 脫色。這些細菌 (主要為 *Mycobacteria species*) 被稱為抗酸菌 (acid-fast)。抗酸性染色的直接鏡檢，可以快速偵測結核病的病患，也可以作為藥物療效的評估。

傳統式抗酸性染色法為 Ziehl-Neelsen 法，需要加熱幫助染色劑滲透入菌體的臘質之細胞壁。Kinyoun 氏法又稱為冷染色法 (cold-stain-method)，因染色劑的濃度提高，或加入表面活性清潔劑 (如 Tergitol)，而不必加熱，染色效果同 Ziehl-Neelsen 法。分枝桿菌的螢光染色 (Fluorochrome Stain for *Mycobacteria*)，使用螢光劑 (例如：Auramine 和 Rhodamine) 可顯示抗酸菌的存在。在螢光顯微鏡下觀察，菌體是呈現黃色菌體，背景則是 Potassium Permanganate 的對比染色。螢光染色下，在 25 倍的生物鏡下，可觀察到抗酸菌的存在。

因為抗酸菌有高度感染性，染色過程的操作最好在生物安全櫃內進行，包括抹片的製備是來自臨床檢體，混合菌株的標本和純種培養的菌體。抹片的製備可以直接來自臨床檢體，或者檢體經過消化去污濃縮而來。抹片的製備，在玻片上讓其自然乾燥，在 65°C 的電器上放置 2 小時，可使菌體不活化，固定之。

(3) 美藍染色 (Methylene Blue Stain)

美藍染色適用於觀察 *Haemophilus influenzae* 和 *Neisseria meningitidis* 的存在，因為這兩種菌屬使用革蘭氏染色所呈現革蘭氏陰性的紅色並不明顯。使用美藍染色，則多核白血球細胞染色成藍色，*H. influenzae* 菌體則呈現深藍，背景則為灰色。

(4) 直接鏡檢方法 (Direct Smear Examination)

① Potassium hydroxide 直接鏡檢方法

Potassium hydroxide (KOH) 載置法 (KOH Mounting) 使用 10% KOH 等量與皮膚、指甲、或毛髮混合蓋上玻片，於火焰上稍微加熱，放置室溫 30 分鐘後，鏡檢。用以觀察是否有黴菌菌絲體的存在。

② India Ink 鏡檢 (India Ink Preparation)

使用等量的 India Ink 與 CSF 混合，然後蓋上玻片鏡檢。觀察 *Cryptococcus neoformans* 的存在與否。

二、臨床微生物檢驗用培養基 (Culture Media for Clinical Microbiology) ¹

培養基製備的目的是提供微生物的生長、存活、或繁殖之用。其他的目的包括：選擇性的生長、生化特性的鑑定、色素的產生等。使用於臨床微生物培養與鑑定的培養基常有多種形式的製備，例如：液體、半固體、固體培養基。為了方便運送檢體或菌種、常製備成管狀、錐瓶狀、平板或圓瓶狀。微生物的生長需要複雜的養分、包括氮化物、碳化物、維生素等。臨床微生物的生長大部分屬於異營菌 (heterotrophic) 需要氮源、碳源，不同於自營菌 (autotrophic) 的微生物能利用氮元素或氨、硝酸鹽當作氮源。

1. 培養基的組成分 (Composition of Culture Media)

天然物質如肉類、牛奶、蛋和馬鈴薯直接加入製備成培養基或萃取成分來製備培養基。蛋白胨 (peptone) 是培養基最重要的營養來源。它是蛋白質 (肉類、植物、牛奶) 以酸、鹼或消化酵素經由水解得到水溶性物質。蛋白胨是提供培養基中氮源。但是蛋白胨的來源不同，成分亦不同。來自於明膠 (gelatin) 的蛋白胨不含 Tryptophan 或碳水化合物適合非挑剔性

細菌的生長；來自於牛奶、肉類、酵母菌的蛋白胨則含有不同的碳水化合物。洋菜 (agar) 萃取自紅海藻 (*Rhodophyceae*) 常用於製備固體培養基。微生物的生長對酸鹼度有嚴格的要求，否則其生長可能部分或完全受到抑制。pH 值的測定應以培養基最終使用之形態 (final-use state)，例如：液體、半固體或固體培養基所測定的 pH 值為準。一些培養基中含有不同的呈色的指示劑，例如：Phenol red、Bromthymol blue、Bromcresol purple 和 Neutral red。Methylene blue 和 resazurin 是常用的氧化—還原指示劑，氧化態分別呈藍色和紅色，還原態則均呈白色。培養基中常加入抑制劑使培養基具有選擇性，可以抑制某些微生物的生長，可以較容易發現某些微生物的存在。抑制劑可分為四大類，包括：染料、重金屬、化學藥物和抗生素等。

(1) 染料

例如：Crystal violet 加入培養基可抑制 G (+) 菌，有利於 G (-) 菌的分離，例如：MacConkey agar 培養基。

(2) 化學藥物

有 Sodium Azide、高濃度 NaCl、Potassium tellurite、Sodium selenite、Sodium dodecyl sulfate、Phenylethanol。

(3) 重金屬

有 Bismuth 等。

(4) 抗生素

可有效抑制某些型態的微生物，因此加入培養基可當作選擇性藥物。常用的抗生素包括 Kanamycin、Vancomycin、Chloramphenicol、Gentamicin、Colistin、Nalidixic acid、Sulfadiazine、Cycloheximide。

2. 培養基功能的種類 (Functional Types of Culture Media)

某一特定培養基的組成不同，會決定培養

基的用途。一般性用途的培養基 (general purpose medium) 是提供微生物生長，例如 Nutrient agar 和 Tryptic soy agar。Blood agar plate (BAP) 培養基是一般性培養基，例如：Tryptic Soy Agar 加入 5~10 % 綿羊血製備而成，主要使用於高挑別性微生物的培養 (表 1-1)。

表 1-1 Tryptic Soy Agar

(1) 配方

Trypticase	15 g
Peptone	5 g
Sodium Chloride	5 g
Agar	15 g
蒸餾水	1,000 ml
Final	pH 7.3 ± 0.2

(2) 依商品標示，稱適當克數，溶於適量之蒸餾水中。

(3) 加熱攪拌，沸騰 1 分鐘使成溶液。

(4) 在 121 °C 滅菌 15 分鐘。

(5) 滅菌後，冷至 45~50 °C，加入 5 % 無菌去纖維之綿羊血混合均勻。

(6) 倒平板，製成血液瓊脂平板。

特定細菌增菌用培養基 (enrichment medium)，例如：Selenite Broth、Tetrathionate Broth、GN Broth 主要是 *Salmonella* 和 *Shigella* 的增菌培養基；Chocolate agar 是致病性 *Neisseriae* 增菌培養基。選擇性培養基 (selective medium)，例如：EMB (表 1-2)、MAC、HEK、XLD (表 1-3)、SS、Sodium azide agar、CNA 等，其功能是某特定型態或種屬的微生物分離培養基，抑制某一菌叢中的其他微生物的生長。培養基可以因為選擇性的程度不同而有區別，例如：高度選擇性培養基 (brilliant green-agar) 可抑制其他微生物而只讓所選擇的菌種生

長。例如：Group A selective strep agar（內含 5 % Sheep Blood）是使用於咽喉培養（throat culture）時，Group A *Streptococci* 的分離。

表 1-2 Eosin-Methylene Blue Agar (EMB)

(1) 配方如下：

Peptone	10 g
Lactose	5 g
Sucrose	5 g
Dipotassium Phosphate	2 g
Agar	13.5 g
Eosin Y	0.4 g
Methylene Blue	0.065 g
蒸餾水	1,000 ml

(2) 按商品標示，稱好精確克數，加入適當蒸餾水中，pH 調至 7.2 ± 0.2 。

(3) 加熱經常攪拌至完全溶解。

(4) 在 121°C 滅菌 15 分鐘。

(5) 冷卻至 50°C ，倒平板。

若要抑制 *Proteus* 的擴散，可在 1,000 ml 培養基中加 3.65 g Agar（濃度為 5 %）。

目的：該培養基用於選擇性分離革蘭氏陰性桿菌，並區分 Lactose 發酵及非發酵性菌。

表 1-3 XLD Agar

(1) 配方如下

Xylose	3.5 g
L-Lysine	5.0 g
Lactose	7.5 g
Sucrose	7.5 g
Sodium Chloride	5.0 g
Yeast Extract	3.0 g
Phenol Red	0.08 g
Sodium Desoxycholate	2.5 g
Sodium Thiosulfate	6.8 g
Ferric Ammonium Citrate	0.8 g
Agar	13.5 g
蒸餾水	1,000 ml, pH 值為 7.5 ± 0.2

(2) 稱 XLD Agar 溶於適當量蒸餾水中。

(3) 加熱攪拌至完全溶解（不能於 121°C 滅菌 15 分鐘）。

(4) 冷卻至 50°C 。

(5) 倒平板。

目的：該培養基用於選擇性分離 *Salmonella* 和 *Shigella*。

區別性培養基（differential medium），例如：TSI Agar、SIM、Urea Medium、VP Semi-solid、Citrate Agar 等培養基含有某些成分可以使某一純培養菌種表現出特異的生化反應而被鑑定，或者是在一混合的菌叢中表現特異菌落型態而被鑑定。例如：TSI agar 是一區別性培養基應用於（一）腸內細菌來判定發酵 Lactose、Glucose、Sucrose 的能力，以及硫化物的產生（表 1-4）。

表 1-4 Triple Sugar Iron Agar (TSIA)

(1) 成分如下：

Peptone	20 g
Sodium Chloride	5 g
Lactose	10 g
Sucrose	10 g
Glucose	1 g
Ferrous Ammonium Sulfate	0.2 g
Sodium Thiosulfate	0.2 g
Phenol Red	0.025 g
Agar	13.0 g
蒸餾水	1,000 ml, 調 pH 至 7.3

(2) 依商品標示，稱好 TSIA，加入適當量蒸餾水中。

(3) 分裝 5 ml 於 15×103 mm 試管中，在 121°C 滅菌 15 分鐘。

(4) 排成斜面，使斜面長 3.8 cm，基底 2.5 cm。

(5) TSI Agar 用於鑑定革蘭氏陰性桿菌，可測定

醣類發酵及 H₂S 產生，TSI Agar 之判讀需在 18~24 小時為之。

Mannitol Salt Agar 內含 7.5 %NaCl 可抑制大部分的細菌，而使 *Staphylococcus* 分離。同時，因為 *Staphylococci species* 中對 Mannitol 發酵的能力不同，若能利用 Mannitol 而產酸，可使 Phenol Red 變黃色，當作 *Staphylococcus aureus* 的分離鑑定之用。臨床微生物分離用培養基（isolation media）是以一般性營養培養基搭配選擇性培養基合併使用。

3. 培養基的選擇（Selection of Culture Media）

瓊脂平板固體培養基比較常用。但液體培養基應用在初次的分離培養較容易，例如：體液、活體組織、深部組織抽取液中所含菌量很少，可以放在液體培養基中先行增菌，再次培養於固體平板培養基上。於液體培養中放置 4~5 天來增菌，適合於 *Brucella* 菌屬的血液培養或者是 *Cardiobacterium hominis* 的培養來確定是否為心內膜炎病患。

培養基可分為選擇性或非選擇性培養基。非選擇性培養基不含有抑制劑可提供大部分的

微生物的生長。含 5 % 綿羊血平板培養基是常用的非選擇性培養基適用於臨床檢體培養用。馬血或綿羊血，再添加 Isovitalex 所製備之平板培養基適合於 *H. influenzae* 的分離培養。人類血液平板培養基適用於 *Gardenerella vaginalis* 的培養與鑑定，因該菌於綿羊血平板上不會溶血，但在人血平板上會出現溶血現象，可提供初步判斷。

血液平板培養基中加入抗生素可當作選擇性培養基之用。例如：Kanamycin 和 Vancomycin 加入血液培養基製備成 KV 瓊脂平板，使用於 *Bacteroides* 菌屬的分離。若加入 Bacitracin、Novobiocin、Colistin、Cephalothin、Polymyxin B 製備成 Campy-BAP，使用於 *Campylobacter jejuni* 的分離培養。Colistin 和 Nalidixic acid 或者 Phenylethyl alcohol (PEA) agar。加入血液瓊脂不抑制 Gnegative 細菌，提高 Gram Positive 細菌分離率。Eosin methylene blue (EMB) 培養基因含有 Bile Salts 的抑制劑，Eosin Y 和 Methylene blue 則可抑制 Gram Positive 細菌和做為酸性的沈澱指示劑，所以可以做腸內菌屬的選擇性培養基。Selenite 肉汁培養基是一種增菌性培養基，可抑制 *E. coli* 或其他共生菌的生長，促進數量較少的 *Salmonella* 和 *Shigella* 的生長，而提高分離陽性率（表 1-5）。

表 1-5 常用初步分離培養基的選擇（Selection of Primary Culture Media）

培養基	預期分離物	備註欄
Chocolate Agar	<i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i>	降低 Agar 濃度可增加 Agar 濕度
Colistin-Nalidixic Acid Agar	革蘭氏陽性菌	
EMB	革蘭氏陰性桿菌	
Blood Agar Plate	革蘭氏陽性菌與陰性菌腸內菌	可觀察溶血性
XLD Agar	<i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i>	

三、臨床檢體的收集與處理² (Collection and Processing of Clinical Specimens)

要確定是否為感染症，選擇適當的培養技術或利用免疫血清學方法偵測人體內抗原或抗體的效價高低是必要的實驗診斷。儘管現在已有新型的非培養方法來偵測病原體的存在與否，但最終的證實，培養技術仍然是不可缺少的。因此，醫檢人員應該以熟練的經驗選擇適當的檢體來培養，同時利用常規技術，以便儘早發現病原體的存在。培養時，檢體的收集技術也是重要的一環，會影響培養的結果，導致某一細菌是否確實為感染症的病原菌。若檢體的收集方式錯誤，不僅導致不能發現重要病原菌，錯將人體的正常菌叢或者共生菌當成致病菌，往往會造成不正確的治療。

感染症實驗診斷的結果與臨床標本收集的選擇，時間性和方法等息息相關。許多微生物在人體的感染症中隨病程的變化，體液中的分布，不同器官部位有不同發現率。以及這些微生物會受到不同藥物的影響而成長或死亡。成功地分離出病原菌，有助於感染症的實驗診斷。因此檢體的收集，應該儘可能地採集，最有可能病原體存在的地方或部位。(圖 1-1)

1. 檢體收集注意事項 (Fundamental Consideration of Specimens Collection)

有時候，送達實驗室的檢體不適合作培養檢查，若勉強接種培養，其結果反而會導致不正確的資訊給醫師，造成錯誤的診斷與不適當的治療。所以，實驗室必須嚴格規定臨床檢體受理與拒絕的規則，使檢體的品質能合乎培養的條件。

檢體要確實地採集於感染部位，儘可能避

免污染感染器官鄰近部位的共生菌。例如：利用咽喉拭子 (throat swab) 從扁桃腺窩 (peritonsillar fossae) 採集檢體分離 *Streptococcus* 時，要避免有口咽 (oropharynx) 分泌物的污染；痰 (sputum) 或下呼吸道分泌物的收集要避免有口與咽分泌物 (oropharyngeal secretions) 的污染。創傷部位分泌物要採檢自深層部位，需避免接觸到鄰近部位；泌尿道檢體的採檢，避免不充分的沖洗步驟。女性陰道分泌物要避免污染到子宮內膜物 (endometrial sample)。膿瘍部位檢體要利用適當抽取針頭採檢，抽取自深層部位膿瘍病灶處，避免採取自表淺處傷口分泌物，而使檢驗結果有偏差錯誤。

利用棉棒拭子去採取大部分的檢體是不容易得到良好的培養檢體，抽取式針頭或者導管則是受到鼓勵使用。適當的時機去收集檢體會提高培養的陽性率。同時，要了解各種感染症在人體變化的過程，才能決定收集檢體的適當時機。收集檢體的適當時機如下所示：

1. 採取痰液培養可作為細菌性肺炎的實驗診斷，不必每天培養，連續 1~3 天即可。
2. 要確定病患是否為敗血症，則需在 24 小時，採取 3 套的血液培養即可。
3. 菌血症的確定則至少取兩套血液培養，以便提高病原菌的發現率。
4. 常規性的培養如痰液、尿液或傷口分泌物，僅需在 24 小時做一次培養即可。
5. 肺結核病例的實驗診斷則需連續 3 天，採取清晨第一次，深咳的痰液。
6. 糞便的細菌培養，則需在有確實的臨床症狀，才採取。
7. 避免收集 24 小時的檢體尤其是痰液或者尿液做培養，因為污染或過度生長的危險因子很大。
8. 人體尿液的酸鹼度 pH 值則低於 5.5，或

者滲透壓很高，或者尿素濃度太高，均會抑制細菌的生長。

9. 若細菌能生長在人體的尿液，表示人體的防衛機制有缺陷。足夠量的檢體去進行細菌培養例如血液培養，成人至少需 3~5 ml 血液量，孩童則需 2~3 ml 的血液。

10. 痰液或氣管沖洗液則需 0.5 ml 以上，才能反應出病人的症狀。

檢體請驗的拒收標準如下：

1. 檢驗申請單與檢體上病人姓名不符。
2. 檢驗申請單未註明檢體種類及檢驗項目。
3. 以不適當檢體請求檢驗厭氧培養，例如：痰、中段尿、褥瘡潰瘍、導尿液、咽喉、陰道分泌物、皮膚、糞便、口腔、環境標本、迴腸手術標本、胃洗液、支氣管洗液、膿瘍。
4. 拭子檢體請求檢驗厭氧菌培養，但沒有置於厭氧攜送容器之中。
5. 請驗細菌及黴菌血清學檢查，但將血液置入培養瓶或培養基內。
6. 申請檢查的項目與所選擇的容器種類不符合。
7. 痰液採取不當。
8. 請求抗酸菌培養，但檢體以棉棒或抹片採取。
9. 請驗抗酸菌檢查痰液檢體未使用 50cc 離心管收集。
10. 申請淋病雙球菌、腦膜炎雙球菌或嗜血桿菌檢查，但檢體沒有以巧克力培養基運送。
11. 同一檢體，同時做多種檢查。
12. 乾燥拭子檢體。
13. 容器破裂或管口沒有拴緊以致檢體外溢。
14. 24 小時尿或痰，供結核菌或黴菌培養。

15. 尿液置於室溫超過 2 小時。只收到檢體申請單而未收到檢體。

使用適當的採集器具、檢體容器和培養基可使病原菌的發現率提高。使用消毒的容器收集大部分的檢體。容器的設計必須考慮方便採集，尤其當病患自己採集時。痰液或者尿液的收集容器應為廣口設計。容器蓋子應能緊密避免運送時滲漏。使用拭子採檢時，材質若為棉花可能殘留的脂肪酸會抑制細菌的生長，若材質為 Calcium alginate 則可能釋出毒性物質，亦會抑制挑剔性細菌的生長。拭子頭若選用 Dacron 或 Polyester 材質則比較適當。使用拭子收集檢體，應快速接種培養。咽喉拭子採檢後，應迅速放入運送培養基（transport medium）或者濕潤的容器中，避免細菌的死亡。而且，盡快在 48 小時內接種。

常用的運送培養基包括半固體的 Stuart 氏或 Amies 氏運送培養基。拭子採檢作厭氧培養時，容器中所含的運送培養基必須有 10 公分以上的高度，避免氧氣的傷害。檢體採集後應迅速接種培養基。例如：直腸拭子（rectal swab）應立刻接種於 XLD 平板培養基，或者 EMB 平板培養基上，又或者放入 GN（Gram-negative）增菌培養基中。泌尿道分泌物則直接放入培養巧克力平板培養基作 *Neisseriae gonorrhoeae* 的分離。上呼吸道分泌物要培養分離 *Bordetella pertussis*，則接種在 Bordet-Gengou 培養基上。儘可能，要在病患尚未使用抗生素之前採集檢體。對抗生素相當敏感的菌種（例如：咽喉中的化膿性鏈球菌（ β -hemolytic group A streptococcus）、生殖道的淋病雙球菌（*N. gonorrhoeae*）、腦脊髓液中的 *Haemophilus influenzae* 或（*N. meningitidis*）檢體採集作細菌分離培養時，應該在抗生素使用之前。

採檢的容器，外表應該有正確的標示。每一個培養容器，要標示清楚病患的資料，包括：姓名、病歷號碼、檢體別、主治醫師、採

集日期。任何一個檢體要清楚標示要求培養的類別，例如：需氧菌、厭氧菌、黴菌或者抗酸菌的培養。屬於一般性常規培養，或者某一種病原菌的特殊培養等，方便檢驗室工作人員處理。

2. 臨床檢體的接種技術 (Inoculation Methods of Clinical Specimens)

使用適當的技術來接種臨床檢體在細菌培養基上，對於細菌的分離與鑑定的過程是非常重要的。這些過程包括從固體培養基上得到單一的菌落；避免污染以及移殖菌體於培養基上；在移殖過程避免氣相的產生；使用適當方法使得純菌體生化反應能有正確生長特性。尤其是高度致病力病原菌，例如：*Bacillus anthracis*，*Mycobacterium tuberculosis*，*Histoplasma capsulatum*等更應該注意在生物安全性操作箱內來處理。

(1) 瓊脂平板的平板畫線法接種 (Inoculation of Agar Plates Streak)

平板畫線法主要使用於分離微生物得到純培養，應用於具有多種混合菌種的臨床檢體的處理方式。從平板培養基上分離所得的菌落可應用於細菌的研究包括菌落型態，溶血反應，菌落的顏色等特徵，可以協助菌體的鑑定。所使用的瓊脂平板表面必須光滑，濕潤，但不可含太多水分。放置冰箱的平板培養基，使用前應該回溫到室溫。檢體接種的接種環的材質和構造會影響接種步驟的成功與否。接種環與接種針的材質包括有鎳、白金和鋁等。其特性是無毒性，經過加熱後，冷卻迅速為最重要的選擇。因為畫線接種是一種稀釋技術，逐漸減少微生物的數目。最後，在平板畫線區會出現單一的菌落。平板四區畫線技術，也可以應用於檢體中微生物數目的半定量。

(2) 試管培養基接種 (Inoculation of Tubed-Type Media)

試管培養基有斜面固體培養基，半固體和液體培養基。依培養基的型態，使用不同的接種棒包括接種環或者接種針。一般而言，接種環 (loop) 使用於檢體的接種，而接種針 (needle) 使用於移殖少量純培養菌落到試管的培養基上。菌體生長於斜面培養基或液體，可提供大量的細菌生長。若接種於選擇性或區別鑑定培養基則可以用來鑑定細菌。生長於半固體培養基的各種混合培養，則可移殖於固體培養基以便得到純培養物。若將純培養物接種在半固體培養基可當作菌種來源，測試菌種的生化反應特性。

(3) 純培養物的準備 (Preparation of Pure Culture)

為了鑑定某一臨床菌株，純培養的微生物體是需要的。純培養的來源是從平板培養基上的單一菌落取得。單一菌落被轉移到液體培養基，製備成純培養，進行各種生化試驗或者再度接種於區別鑑定培養基上，來判定某一種未知的微生物。

3. 臨床檢體的培養技術 (Techniques for the Culturing of Specimens)

臨床檢體的培養，是將臨床檢體塗劃在培養基上，必須在實驗室特定區域來操作，稱之為劃域培養區 (Streak-Out Area)。將檢體接種在培養基上時，應在隔離的無菌操作箱 (Laminar Flow) 進行。工作人員要戴手套，口罩等避免受感染。

當臨床檢體收集運送到微生物實驗室，微生物的分離與鑑定的流程如下：

1. 選擇適當的培養基來接種檢體。
2. 選擇適當的溫度和環境來培養，使大部分的微生物能生長。