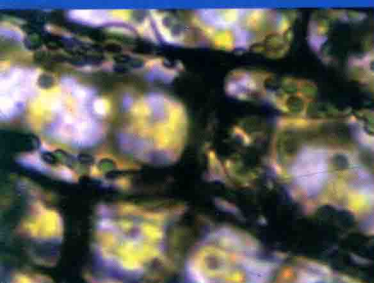


高等院校“十三五”规划/创新实验教材系列：医药类

医学微生物学 实验指导



Laboratory Manual for Medical Microbiology

主 编 徐 霖

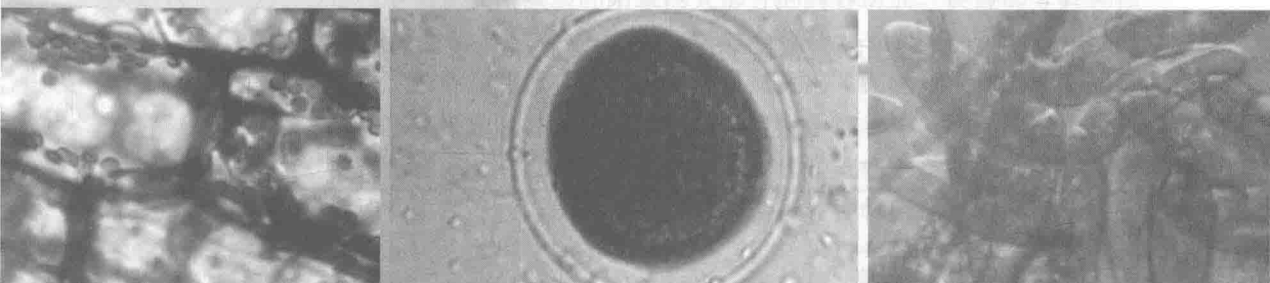
主 审 江丽芳



中山大學出版社
SUN YAT-SEN UNIVERSITY PRESS

高等院校“十三五”规划/创新实验教材系列：医药类

医学微生物学 实验指导



Laboratory Manual for Medical Microbiology

主 编 徐 霖

主 审 江丽芳

编 委 (按姓氏笔画排序)

刘 超 朱 勋 周俊梅

晏辉钧 赖小敏 蔡俊超



中山大学出版社
SUN YAT-SEN UNIVERSITY PRESS

· 广州 ·

版权所有 翻印必究

图书在版编目 (CIP) 数据

医学微生物学实验指导/徐霖主编;江丽芳主审. —广州:中山大学出版社, 2017. 2

(高等院校“十三五”规划/创新实验教材系列:医药类)

ISBN 978 - 7 - 306 - 05958 - 1

I. ①医… II. ①徐… ②江… III. ①医学微生物学—实验—高等学校—教学参考资料 IV. ①R37 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 003961 号

出 版 人: 徐 劲

策划编辑: 周建华 刘爱萍

责任编辑: 谢贞静

封面设计: 林绵华

责任校对: 邓子华

责任技编: 何雅涛

出版发行: 中山大学出版社

电 话: 编辑部 020 - 84110771, 84113349, 84111997, 84110779

发行部 020 - 84111998, 84111981, 84111160

地 址: 广州市新港西路 135 号

邮 编: 510275 传 真: 020 - 84036565

网 址: <http://www.zsup.com.cn> E-mail: zdcbs@mail.sysu.edu.cn

印 刷 者: 佛山市浩文彩色印刷有限公司

规 格: 787mm × 1092mm 1/16 9.5 印张 219 千字

版次印次: 2017 年 2 月第 1 版 2017 年 2 月第 1 次印刷

定 价: 22.00 元

如发现本书因印装质量影响阅读, 请与出版社发行部联系调换

► 前 言

医学微生物学是一门重要的基础医学课程，同时也是一门与临床关系密切且实践性很强的课程，为使医学微生物学实验课更好地体现其科学性、先进性和实用性，更好地与临床实际相结合，我们紧扣本学科的教学大纲，在原有的《医学微生物学实验指导》的基础上进行了整理、修订并出版。

本书主要由实验和附录两大部分的内容组成。实验部分共包括30项微生物学实验内容，每个实验包括实验目的、原理、材料、方法、结果及注意事项等模块，重点突出了医学微生物学的基础理论、基本操作和基本技能的训练，着重于培养学生的无菌观念和生物安全意识，帮助学生逐渐熟悉和掌握常见病原微生物的生物学性状和实验室诊断方法。附录部分包括了各种临床标本的细菌学检查方法和医学微生物学英文词汇等，供学生自学与参考。在实验课的教学中，我们引入了临床病例的讨论，学生通过病例讨论得出对该病的初步诊断，再结合本教材中的基本实验方法，模拟临床标本的微生物学检查，通过实验操作，获得对该病例的微生物学诊断结果。我们希望通过这种以病例为引导的综合性实验教学方式，更好地培养学生的动手能力、科学思维能力、分析问题和解决问题的能力。

本书既可供医学及相关专业、专科的微生物学实验教学使用，亦可供相关专业的研究生、教师及其他科研工作者参考。

限于编者水平，书中难免会有疏漏或不妥之处，恳请广大师生在使用过程中批评指正。

编 者

2016年10月

目 录

绪论.....	1
实验一 细菌的形态与结构的观察.....	3
实验二 细菌接种技术和培养法.....	6
实验三 革兰氏染色法	12
实验四 细菌的代谢产物	14
实验五 细菌在自然界及人体的分布	20
实验六 理化因素对细菌的影响	22
实验七 生物因素对细菌的影响	26
实验八 细菌的耐药性变异	35
实验九 细菌耐药性基因的 PCR 检测	36
实验十 溶菌酶试验	38
实验十一 吞噬作用	39
实验十二 内毒素测定——鲎试验	40
实验十三 外毒素的毒性作用及其抗毒素的中和作用	42
实验十四 病原性球菌	44

实验十五 肠杆菌科细菌	48
实验十六 厌氧性细菌	60
实验十七 分枝杆菌	65
实验十八 白喉棒状杆菌	68
实验十九 支原体和衣原体	71
实验二十 立克次体	78
实验二十一 病原性螺旋体	79
实验二十二 病原性真菌	83
实验二十三 病毒包涵体的观察	87
实验二十四 病毒的分离培养与鉴定	88
实验二十五 病毒的血凝试验与血凝抑制试验	98
实验二十六 轮状病毒感染的快速诊断	102
实验二十七 病毒蛋白多肽成分的检测	103
实验二十八 核酸分子杂交技术	106
实验二十九 间接免疫荧光法检测登革病毒抗原	109
实验三十 抗 HIV-1 抗体的检测	110
附录一 各种临床标本的细菌学检查	114
附录二 医学微生物学英文词汇表	134



绪 论

一、医学微生物学实验室规则

医学微生物学实验室应严格执行国务院颁发的《病原微生物实验室生物安全管理条例》、国家标准《实验室生物安全通用要求》(GB19489—2008)和国家卫生部颁发的《人间传染的病原微生物名录》等相关法律、法规 and 规定,在符合要求的教学实验室进行相关实验。师生在进入和使用教学实验室的过程中,必须严格遵守以下规则:

- (1) 进入实验室必须穿工作衣(白大衣),非必需的物品勿携带入内。
- (2) 实验室内应保持安静和良好秩序,进行实验时要严肃认真。
- (3) 实验室内严禁吸烟和饮食。
- (4) 如有传染性材料污染桌、凳、地面、书或衣物等,应报告老师,并用0.5%次氯酸钠消毒液处理半小时,然后洗净。
- (5) 如有传染性材料污染手,应将手浸泡在新洁尔灭消毒液中5~10 min,然后用自来水冲洗。
- (6) 使用过的沾有传染性材料的吸管、毛细吸管、玻片等要放入消毒缸内。
- (7) 实验过程中,严格遵守无菌操作原则,必须爱护仪器及节约实验材料。如有破损应报告老师,并在登记本上登记。
- (8) 实验完毕后,将需孵育的培养物放入指定的温箱,有潜在传染性的废物则集中放入指定的生物危害垃圾桶,由专人统一消毒处理。
- (9) 离开实验室前,做好桌面清洁与整理,并用肥皂水洗手,脱去工作衣反折好。
- (10) 建立值日生制度,负责实验室卫生、水电及门窗的安全。

二、医学微生物学实验目的和要求

医学微生物学实验是医学微生物学课程的重要组成部分,其目的在于通过实验,使学生巩固和加深所学的理论知识,掌握必要的微生物学基本技术,培养独立观察、思考和分析问题、解决问题的能力,为今后的医学实践打下一定的基础。

医学微生物学实验的形式可分为教师示教(包括电视教学录像)和学生操作两种。为提高实验课的效果,特提出以下几点要求:

- (1) 严格遵守医学微生物学实验室规则,树立无菌观念,正确掌握无菌操作技术。



(2) 每次实验课前应作好预习,明确实验目的和要求,了解实验内容及原理,做好实验前的必要准备工作,避免在实验中发生差错及事故。

(3) 在实验过程中应严肃认真,对示教性实验,应注意仔细观察,及时记录结果。对自己操作的实验,要按实验要求与步骤进行。对一些较复杂的实验,应与其他同学分工协作,注意合理分配和使用时间。

(4) 对每次实验结果,应客观详细地记录或绘图说明。若实验结果与理论不相符,应认真分析,找出原因,必要时应重复实验。

(5) 注意安全,严防各类事故发生。实验完毕,应整理好实验桌面,搞好实验室清洁卫生。若不慎发生各类事故,则应严格按照《医学微生物学实验室规则》所规定的相应要求进行处理。

实验一

细菌的形态与结构的观察

(Observation of Bacterial Morphology and Structure)

目的要求

1. 了解普通光学显微镜的构造 (图 1-1), 熟悉油镜的使用原理 (图 1-2) 以及正确的使用方法。
2. 熟悉细菌的基本形态与特殊结构。

实验内容

【实验材料】

1. 显微镜 (带油镜头)、香柏油、二甲苯、擦镜纸、细菌基本形态和特殊结构标本片各 1 套。

2. 细菌基本形态标本片:

球菌: 葡萄球菌、链球菌、淋病奈瑟菌、脑膜炎奈瑟菌。

杆菌: 伤寒沙门菌。

弧菌: 水弧菌。

3. 特殊结构标本片:

芽胞: 破伤风梭菌。

荚膜: 肺炎链球菌。

鞭毛: 伤寒沙门菌。

【实验方法】

见油镜使用方法。

【实验结果】

葡萄球菌呈葡萄状排列, 链球菌呈链状排列, 淋病奈瑟菌和脑膜炎奈瑟菌呈双球状排列, 伤寒沙门菌呈杆状, 水弧菌菌体弯曲如弧状。

破伤风梭菌经革兰氏染色后, 可见其菌体末端有一个圆形未着色的芽胞, 使整个细菌呈鼓槌状。

具有荚膜的肺炎链球菌, 经荚膜染色法染色后, 可见菌体染成蓝色, 而荚膜染成浅蓝色, 并围以一浅红色边界。

伤寒沙门菌具有鞭毛, 经鞭毛染色后, 可见菌体周围有纤细的鞭毛 (菌体和鞭毛均染成红色)。

将观察结果绘图说明。

【注意事项】

见油镜使用方法。

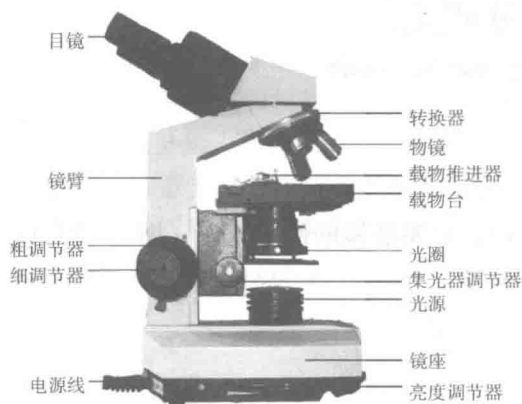


图 1-1 显微镜构造示意

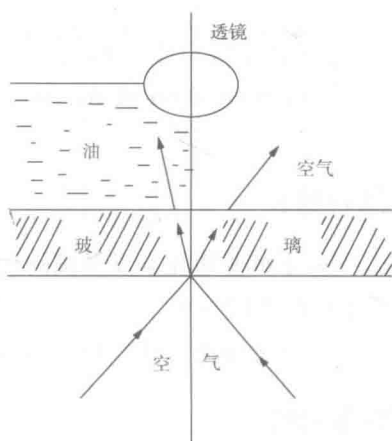


图 1-2 油镜的原理示意

附

显微镜油镜的使用

【实验原理】

细菌个体微小，肉眼无法看到，必须借助普通显微镜的油镜，将其放大 1 000 倍左右，才能看清。因此，必须熟练掌握显微镜的使用和保护，尤其是油镜的使用和保护。

基本原理是光线从标本玻片经空气进入镜头时，由于介质密度不同而发生折射现象，因此进入物镜中的光线很少，导致视野很暗，物像不清晰。如在玻片上加上折光率和玻片（ $n=1.52$ ）相近的香柏油（ $n=1.515$ ），就可避免光线的分散，加强视野的亮度，获得清晰的物像（图 1-2）。

【实验方法】

1. 油镜的识别：油镜头上都有标记；标有 $100\times$ ；镜头前端有黑、白或红色的圆圈；或刻有“III”或“Oil”等；镜头较长，入光孔径也较其他物镜小。

2. 油镜的使用（观察细菌的形态）。

（1）将显微镜平稳地安放在实验台适宜处。

（2）接通电源，调节亮度调节器至视野亮度适宜。使用老式显微镜，若以天然光线为光源时，使用平面反光镜；以灯光为光源时，使用凹面反光镜，并把集光器升到最高位置，把光圈完全打开。

（3）将标本固定在载物台上，先用低倍镜对好焦，并找到标本视野的适当位置，然后转动转换器转换为油镜，光线调至视野最亮。

(4) 先在玻片上滴香柏油 1 滴, 眼睛从侧方观察到转换的物镜头已浸于油内, 然后从目镜视察, 看到模糊物像时, 调动细调节器, 使物像清晰。如未能看到物像, 则缓慢转动粗调节器, 使油镜头几乎与玻片接触为止, 但勿使两者相碰, 防止损伤镜头或玻片。然后从目镜视察, 缓慢转动粗调节器使玻片下降, 看到模糊物像时, 再调动细调节器, 使物像清晰。未能看到物像时, 可重复上述操作。

【注意事项】

1. 油镜头使用后应立即用擦镜纸擦净镜头上的油。如油已干, 可在擦镜纸上滴少许二甲苯擦拭, 并随即用干的擦镜纸擦去二甲苯, 以防止腐蚀镜片。注意在擦镜纸擦拭时, 要求顺一个方向旋转着擦, 不能两个方向来回擦。
2. 显微镜使用时要精心保护, 不得随意拆散和碰撞。
3. 取送显微镜时, 应右手持镜臂, 左手托镜座, 平端于胸前。
4. 不使用时, 将接物镜转开呈“八”字, 以避免镜头正对集光器, 集光器下降, 罩上镜套。登记使用前后的情况, 签名。对号归位。

实验二

细菌接种技术和培养法

(The Inoculation and Cultivation of Bacteria)

目的要求

1. 掌握平板划线法、斜面、液体和半固体培养基等各种接种方法。
2. 熟悉接种细菌工具、细菌培养的环境和条件要求，掌握技术要领。

实验内容

【实验原理】

为了对特定的细菌进行研究或鉴定，常需要从混有多种细菌的标本或者培养物中分离出单个的菌落或单一的菌株。要成功地分离细菌，必须根据标本来源和培养目的不同而选择合适的培养基，并采用合适的接种方法。对于成功分离的菌种，有时也需要采取传代培养的方式，将待保存的菌种接种到合适的培养基上进行短期保存（见菌种的保存方法）。

细菌接种是用接种环（针）沾取细菌或标本，通过划线、涂抹等方法，将细菌接种到合适的培养基上，并在一定的条件下使细菌得以生长繁殖。接种的基本程序有：接种环（针）灭菌→俟冷→沾取细菌或标本→进行接种→接种环灭菌等5个程序。

【实验材料】

1. 菌种：葡萄球菌和大肠埃希菌混合液，葡萄球菌、大肠埃希菌斜面培养物。
2. 培养基：普通液体（肉汤）、半固体和固体培养基（琼脂平板和斜面）。
3. 其他：接种环、接种针、酒精灯。

【实验方法】

1. 接种工具。

接种针和接种环：由环（针）、金属柄和绝缘柄三部分组成（图2-1）。针（环）部分以白金丝制成者为佳，因其硬度适宜，易传热散热，火焰灭菌后冷却快，不易生锈经久耐用，但因其昂贵，通常用300～500 W电热（镍）丝代替。环直径为2～4 mm，长5～8 cm。

标准接种环是取斜面上大肠埃希菌菌苔，充满环的空间，在分析天平上称重。使环内湿重菌量恰为2 mg。标准接种环可用于制备一定浓度的菌悬液或定量接种。

接种针（环）通常用酒精灯或煤气灯烧灼灭菌。接种针用于穿刺接种细菌，接种环用于固体、液体培养基等的细菌接种。



图 2-1 接种环和接种针的结构示意

2. 接种环境。

为避免接种过程中标本中的细菌污染环境，以及空气中的细菌污染培养物，细菌（特别是传染性强的病原微生物）接种应在特定环境内接种。常用设备有接种罩、超净工作台、生物安全柜或无菌室等。

3. 接种方法。

根据待检标本性质、培养目的和所用培养基的性质采用不同的接种方法。

（1）平板划线分离培养法：本法可使标本中混杂的多种细菌分散成单个细菌，在培养基表面各自生长繁殖形成单个细菌集团即菌落，以获得纯培养，为进一步鉴定细菌提供条件。

1) 连续划线分离法：将接种环置于火焰中烧灼灭菌，待冷后取标本或大肠埃希菌少许；左手持起平板，五指固定平皿盖边缘，向外反转手掌，装有培养基的平板于手掌内用拇指、食指和中指固定，向内反转手掌，并将平板边缘稍微提高呈 $30^{\circ}\sim 45^{\circ}$ 角，置酒精灯前上方 $5\sim 6$ cm；③右手持已取材的接种环，先在平板远端涂布，然后快速大幅度左右来回以密而不重的曲线形式作连续划线接种，将整个平板布满曲线（图2-2）；划线完毕，将平板扣入皿盖并做好标记，置 37°C 孵育 $18\sim 24$ h 观察结果。



图 2-2 连续划线分离法（左）及培养后菌落分布（右）示意

2) 分区划线分离法：一般分为3~5区。用接种环取标本涂布于平板1区内作数次划线，再在2、3、4、5区依次划线，每划完一个区域是否需要烧灼灭菌视标本中含菌量多少而定。每一区的划线与上区交叉接触，每区线间保持一定距离，密而不重，如此后一区菌量少于一区，逐渐减少以至划线上的细菌呈单个菌分布，生长繁殖成单个菌落（图2-3）。其操作要领同连续划线分离法。

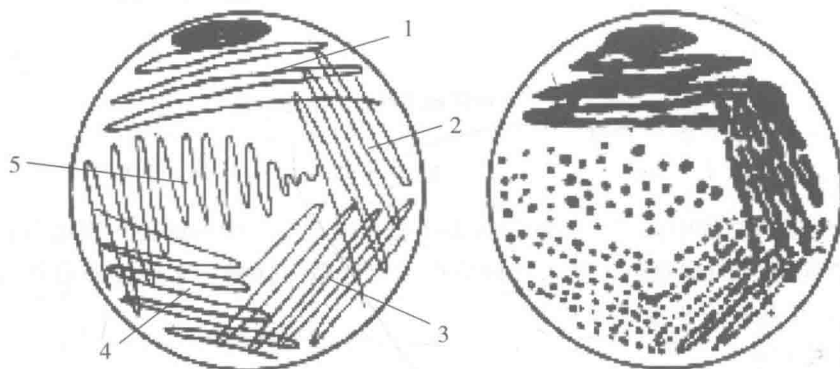


图2-3 分区划线分离法（左）及孵育后菌落（右）示意

(2) 斜面接种法：主要用于纯菌移种，以进一步鉴定或保存菌种。方法是以灭菌接种环挑取细菌后伸入斜面培养基，从斜面底部向上先划一条直线，然后再由底向上作曲线划线，直至斜面顶部（图2-4）。管口灭菌后标记，经37℃孵育18~24h，斜面培养物呈均匀一致的菌苔，如表面不均匀，表示培养物不纯。

(3) 液体接种法：用于肉汤、蛋白胨水、糖发酵管等液体培养基的接种。用接种环从平板上挑取葡萄球菌、枯草芽胞杆菌、炭疽芽胞杆菌无毒株菌苔或菌落，先在接近液面的试管壁上研磨，并沾取少许液体培养基与之调和，使细菌均匀分布于培养基中（图2-5）。管口灭菌后加塞、标记，经37℃孵育18~24h，观察并记录细菌在液体培养基中的生长现象。由于菌种不同，可出现均匀混浊、沉淀生长或表面生长（形成菌膜）等不同的生长现象。

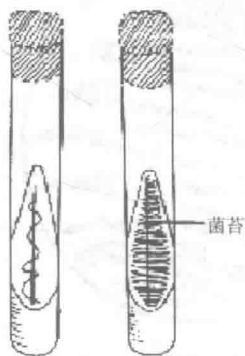


图2-4 琼脂斜面接种法示意

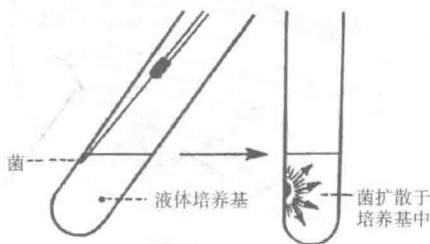


图2-5 液体培养基接种法示意

(4) 半固体穿刺接种法：用于半固体培养基的接种，以保存菌种或观察细菌的动力。方法是用接种针分别挑取大肠埃希菌或痢疾志贺菌培养物，于半固体培养基的中心处向下垂直穿刺接种，直至试管底部上方 5 mm 左右（不能穿至试管底），接种后的接种针沿原穿刺线退出（图 2-6）。管口灭菌后加塞、标记，经 37℃ 孵育 18~24 h，观察结果。有鞭毛的细菌（如大肠埃希菌）能够沿穿刺线向四周扩散生长，为动力试验阳性；而无鞭毛的细菌（如痢疾志贺菌）只能够沿穿刺线生长，不能扩散，为动力试验阴性。

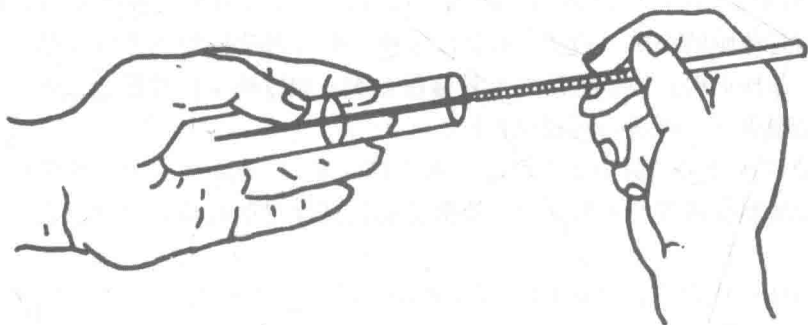


图 2-6 半固体培养基穿刺接种法示意

(5) 涂布接种法：用于标本中菌数测定和药敏试验的细菌接种。

1) 菌数测定：取一定稀释度的菌液 0.1 mL 滴于平板上，用无菌 L 型玻璃棒涂布均匀，盖上平皿盖，经 37℃ 孵育 18~24 h 后计数菌落，再乘以 10 倍的稀释倍数，即为每毫升含菌数。

2) 直接涂布法：多用于纸片法和管碟法药敏试验。用无菌棉拭沾取已校正浓度的菌液，在管壁上挤去多余的液体，在培养基平板上按 3 个方向涂布 3 次，最后沿平板边缘环涂 1 周。加盖后置室温 5 min，使平板表面稍干。再以无菌镊子将药敏纸片贴于涂菌平板表面，或向竖在培养基表面的牛津小杯内加入不同浓度药物。经 37℃ 孵育 18~24 h 后观察结果，测定抑菌圈直径，并按照判断标准判读结果。

附

菌种的保存方法

【实验原理】

由于细菌在使用和传代过程中容易发生污染、变异甚至死亡，造成菌种的丢失，因此，需要对获得的菌种进行保藏。保存菌种时，要根据微生物的培养和生长特性，创造条件使微生物的代谢处于最不活跃或相对静止的状态，以在一定时间内使菌种不发生变异的同时保持活力。通常采用的措施是通过降低培养基的营养成分、低温、干

燥、缺氧、避光和添加保护剂等方法,以达到防止突变、保持纯种的目的。

【实验方法】

1. 传代培养保存法。

将待保存的菌种接种到合适的培养基上,细菌在培养基上生长良好后,放置在避光处室温或4℃冰箱保存,使细菌在该环境下仅维持缓慢的生长。因培养基中的营养成分会被缓慢利用,因此需要定期移种。移种的间隔时间因微生物种类的不同而异。

(1) 半固体穿刺法:适用于大多数对营养要求不高的细菌。保存期限约2个月。

(2) 斜面保存法:广泛适用于细菌、放线菌、酵母菌和真菌的短期保存。放线菌、真菌和有芽胞的细菌一般2~4个月移种1次,无芽胞的细菌每月移种1次,酵母菌2个月移种1次,假单胞菌每半月移种1次。如以胶塞代替棉塞,则可防止水分挥发并能隔绝氧气,可适当延长保存期。

(3) 液体保存法:适用于厌氧菌(庖肉培养基)、链球菌、白喉棒状杆菌、肺炎链球菌、钩端螺旋体等的短期保存。厌氧芽胞梭菌保存期限约2个月,无芽胞的细菌约3周。

(4) 液体石蜡保存法:适用于保存真菌、酵母菌和放线菌,对保存细菌的效果较差。方法是在培养成熟的菌种斜面上,在无菌条件下倒入灭菌并已将水分蒸发掉的液体石蜡,石蜡层高过斜面末端1cm,使培养物与空气隔绝,封口后以直立状态在室温或4℃冰箱保存。由于液体石蜡阻隔了空气,又防止了水分的挥发,因而保存期可达数年。要注意的是,用石蜡封藏的菌种,当恢复使用时,由于菌体外仍粘有石蜡油,故生长较慢,且有黏性,一般要再移种2~3次才能得到生长良好的菌种。

2. 低温保存法。

利用低温来抑制微生物的生命活动。将细菌接种于固体培养基上增菌,待生长良好后,用接种环取细菌数环(量宜多)于加有5%肌醇的小牛血清或脱纤维羊血中,速冻后置-30℃以下低温冰箱保存。此法保存期限约1年,有些菌种可长达10年。复苏菌种时,从低温冰箱取出,放入35~40℃温水浴中快速解冻后,用接种环取细菌置增菌培养基中,即可获得新鲜菌种。

3. 液氮超低温保存法。

是适用范围最广的微生物保存方法,也是目前最有效的菌种长期保存方法,可保存细菌、病毒、噬菌体、立克次体、放线菌、真菌、螺旋体等。动物细胞亦可用此法保存。该法的原理是让生物细胞在液氮超低温的状态下冻结,从而达到长期保存的目的。为了减少超低温冻结时所造成的损伤,要先将生物细胞悬浮在合适的保护剂中,常用的保护剂有羊(兔)全血,10%(20%)甘油,10%二甲基亚砷等。分装后,就可以进行冻结保存。冻结时,因为每种生物所适应的冷却速度有所不同,要根据具体的菌种,选择快速或慢速的冻结方式。保存菌种时,可放在-156℃的气相或-196℃的液相中保存。需复苏使用菌种时,因缓慢解冻会使细胞内再生冰晶或冰晶的形态发生变化从而损伤细胞,所以应采取快速解冻的方式以提高存活率。从液氮中取出后,立即放置在38~40℃的恒温水浴中摇动3~5min使其快速融化,将解冻后



的菌种接种到合适的培养基上适温培养。

4. 冷冻真空干燥法。

除了只产生菌丝不产孢子的丝状真菌不宜用此法外，其他大多数微生物包括病毒、细菌、放线菌、真菌等均可采用此法。此方法因同时具备低温、干燥、缺氧的菌种保存条件，且无需经常传代，因此具有保存时间长，存活率高，变异率低的优点，是目前最有效的菌种保存方法之一。但由于此法操作比较繁琐，技术要求较高，而且需要较昂贵的设备，多为菌种保藏中心采用，一般实验室较少使用。

【菌种的保管】

病原微生物的菌（毒）种由于它本身所具有的特殊性，在保存管理和使用过程中必须强调生物安全，必须符合国家传染病防治、医学微生物菌（毒）种管理有关法规的规定。无论是管理人员还是工作人员，在日常工作中都要有较强的防护意识和守法观念。

1. 菌种经鉴定后，应根据其特性选用适当方法及时保存。最好冻干低温保存。不能冻干保存的菌种，应保存两份，一份供保种用，另一份供日常使用，并定期进行鉴定。

2. 菌种管上应有牢固的标签，标明菌种的编号、代次、批号、日期。

3. 不同属或同属菌、毒种的强毒及弱毒株不得同时在一无菌室内操作。一、二类菌（毒）种及芽孢菌、真菌必须在严格隔离的专用实验室内操作，并加强操作人员的防护。三、四类菌（毒）种的操作应按各项制品规程的规定在专用或合适的实验室内进行。

4. 菌（毒）种保存范围、转移、销毁，须严格遵守卫生部的规定。

5. 保存的菌（毒）种均要填写专用记录，并由专人负责管理，建立必要的保管制度。