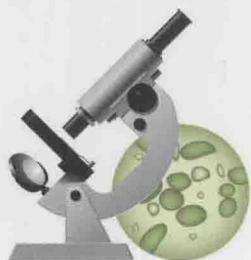


高等学校配套实验教材

供临床、护理、预防、检验、影像、口腔、精神医学等专业使用

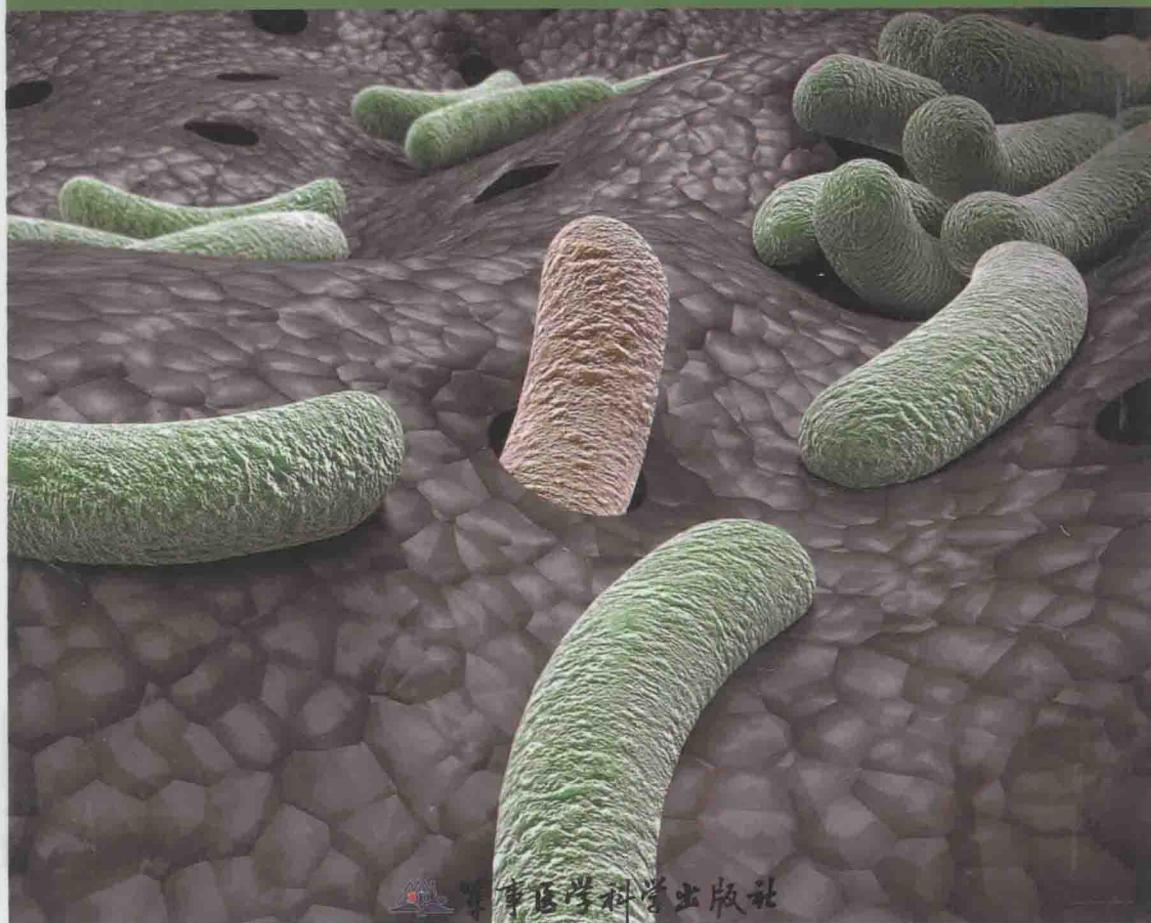
医学微生物学



实验与学习指导

YIXUE WEISHENGWUXUE SHIYAN YU XUEXIZHIDAO

主编 吕厚东 李秀真



军事医学科学出版社

医学微生物学实验与学习指导

(供临床、护理、预防、检验、影像、口腔、精神医学等专业使用)

主编 吕厚东 李秀真

副主编 陈廷 薛庆节 杨媛媛 章洪华 胡文洁

编委(按姓氏笔画排列)

马萌 王晖 王凤刚 吕厚东 全芯 刘永春

杨媛媛 李士根 李秀真 陈廷 胡文洁 高红刚

曹卉 盛忠秋 章洪华 郭永和 谭文彬 薛庆节

军事医学科学出版社

·北京·

图书在版编目(CIP)数据

医学微生物学实验与学习指导 / 吕厚东, 李秀真主编. —北京:
军事医学科学出版社, 2013.10
ISBN 978-7-5163-0368-9

I. ①医… II. ①吕… ②李… III. ①医学微生物学 - 实验 - 医学院校 -
教学参考资料 IV. ①R37-33

中国版本图书馆CIP数据核字 (2013) 第 256020 号

策划编辑: 刘浩生 责任编辑: 蔡美娇

出版人: 孙宇

出版: 军事医学科学出版社

地址: 北京市海淀区太平路 27 号

邮编: 100850

联系电话: 发行部: (010) 66931049

编辑部: (010) 66931039, 66931038, 66931053

传真: (010) 63801284

网址: <http://www.mmsp.cn>

印装: 中煤涿州制图印刷厂北京分厂

发行: 新华书店

开本: 787mm × 1092mm 1/16

印张: 21.5 (彩 1)

字数: 462 千字

版次: 2014 年 2 月第 1 版

印次: 2014 年 2 月第 1 次

定价: 52.00 元

本社图书凡缺、损、倒、脱页者, 本社发行部负责调换

前言

Preface

医学微生物学是高等医学院校开设的一门必修基础课程，实验教学是体现“三基”（基础理论、基本知识、基本技能）中基本技能的重要手段，是加深、验证基础理论和基本知识的唯一途径，也是提高教学质量的重要环节。根据卫生部“十二五”规划教材《医学微生物学》第8版的教学需要与培养目标，通过总结多年的实验教学活动，并汲取兄弟院校的成熟经验，我们编写了《医学微生物学实验与学习指导》。

《医学微生物学实验与学习指导》涵盖了本科医学微生物学教材中所要求的全部实验内容，并有所创新。本书分为两篇，第一篇为医学微生物学实验指导，包括6章，共54个实验项目。该书以基础性、实用性、科学性、先进性为原则，不但能满足本、专科各层次、各专业学生的实验要求，还增加了有关分子生物学实验内容。每项实验分别介绍了“实验目的”、“实验材料”、“实验原理”、“实验方法”及“实验结果”等。对于操作复杂、难度较高的实验项目，根据多年教学经验，对学生在实验中常出现的问题增设了“注意事项”，并在实验后增加了问题思考，有助于提高学生分析问题、解决问题的能力。第二篇为医学微生物学学习指导，它将大纲中要求学生应掌握、熟悉和了解的基础理论、基本知识与基本技能，去粗取精、浓缩加工为“各型试题”，并对其中的选择题、填空题附有“参考答案”，将有助于学生对第8版《医学微生物学》的理解与复习。

本书中各实验内容相对独立，各学校在教学过程中可根据不同的专业及层次分配实验学时、选择相应的实验内容。本书亦可作为从事相关专业的教师、科技工作者和临床检验人员的参考用书。

由于时间仓促，各校实验条件不同，专业有别、层次不一，特别是我们的编写能力有限，在内容与安排方面难免有不足之处，恳请同道及读者提出宝贵意见。

吕厚东

2013年8月

● 第一篇

医学微生物学实验指导	1
------------------	---

第一章 实验的目的要求及实验室规则	3
-------------------------	---

第二章 医学微生物学基础	4
--------------------	---

实验一 显微镜油镜的使用	4
--------------------	---

实验二 细菌的基本形态观察	7
---------------------	---

实验三 细菌的特殊结构观察	8
---------------------	---

实验四 细菌动力的观察	9
-------------------	---

实验五 细菌涂片标本的制备	10
---------------------	----

实验六 常用的细菌染色法	12
--------------------	----

实验七 显微测微尺与血细胞计数板的使用	21
---------------------------	----

实验八 常用培养基的制备	24
--------------------	----

实验九 细菌的分离培养及生长现象观察	37
--------------------------	----

实验十 细菌的代谢产物检查	46
---------------------	----

实验十一 自然界与人体的细菌检查	51
------------------------	----

实验十二 消毒灭菌法	54
------------------	----

实验十三 细菌的药物敏感性试验	62
-----------------------	----

实验十四 噬菌体试验	67
------------------	----

实验十五 细菌的变异性试验	69
---------------------	----

实验十六 细菌的致病性试验	76
---------------------	----

实验十七 吞噬细胞吞噬功能检测	81
-----------------------	----

第三章 细菌学各论	84
-----------------	----

病原性球菌

实验一 葡萄球菌属	84
-----------------	----

实验二 链球菌属	87
----------------	----

实验三 奈瑟菌属	94
----------------	----

肠杆菌科

实验四 埃希菌属	98
----------------	----

实验五 沙门菌属	100
----------------	-----

目录

Contents

实验六 志贺菌属	106
实验七 霍乱弧菌	107
实验八 幽门螺杆菌	110
实验九 弯曲菌属	111

厌氧性细菌

实验十 厌氧芽孢梭菌	113
------------------	-----

呼吸道感染细菌

实验十一 结核分枝杆菌的分离与鉴定	116
实验十二 白喉棒状杆菌的分离与鉴定	119

动物源性细菌

实验十三 炭疽芽孢杆菌	122
实验十四 布鲁菌属	125

支原体、立克次体、衣原体和螺旋体

实验十五 支原体	126
实验十六 衣原体	128
实验十七 立克次体	130
实验十八 螺旋体	132

第四章 微生物自动分析

实验一 微生物鉴定自动化系统	135
实验二 大肠埃希菌自动分析仪分析	137

第五章 病毒

病毒的形态检查

实验一 病毒的形态观察	140
-------------------	-----

病毒培养法

实验二 鸡胚培养法	141
实验三 组织培养法	144
实验四 动物接种法	147

实验五 蚀斑试验	152
实验六 TCID ₅₀ 测定	153

病毒的检测技术

实验七 间接免疫荧光试验	154
实验八 间接酶联免疫吸附试验	155
实验九 病毒血凝及血凝抑制试验	157
实验十 乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 反向间接血凝检查法	159
实验十一 乙肝五项指标检测 (乳胶法)	160
实验十二 反向被动血凝抑制试验	163
实验十三 Southern 印迹试验	164
实验十四 免疫印迹法	167
实验十五 PCR 技术	170

第六章 病原性真菌.....172

实验一 真菌的培养方法	174
实验二 浅部真菌感染临床标本的检查	176
附录一 染色液的配制	177
附录二 常用试剂的配制	179
附录三 常用培养基的制备	183
附录四 微生物的菌种保藏方法	199

◎ 第二篇

医学微生物学学习指导 205

第一章 绪论 207

第二章 细菌学 208

一、细菌的形态与结构	208
二、细菌的生理	212
三、噬菌体	218
四、细菌的遗传与变异	220
五、细菌的耐药性	223

目 录

Contents

六、细菌的感染与免疫	226
七、细菌感染的检查方法与防治原则	232
八、球菌	236
九、肠杆菌科	241
十、弧菌属和螺杆菌属	246
十一、厌氧性细菌	250
十二、分枝杆菌属和嗜血杆菌属	256
十三、动物源性细菌	260
十四、其他细菌	264
十五、放线菌属与诺卡菌属	268
十六、支原体	271
十七、立克次体	273
十八、衣原体	276
十九、螺旋体	279
第三章 病毒学	282
一、病毒的基本性状	282
二、病毒的感染与免疫	287
三、病毒感染的检查方法与防治原则	292
四、呼吸道病毒	296
五、肠道病毒和急性胃肠炎病毒	301
六、肝炎病毒	306
七、虫媒病毒和出血热病毒	313
八、疱疹病毒	318
九、反转录病毒	321
十、其他病毒	326
十一、朊粒	330
第四章 真菌学	331
一、真菌学总论	331
二、主要病原性真菌	333

第一篇

医学微生物学实验指导

第一章 实验的目的要求及实验室规则

一、实验的目的要求

医学微生物学是实践性较强的基础学科之一。实验课既是本学科教学过程的重要环节,又是相对独立、自成体系的一门课程。实验的目的在于加强对学生能力的培养,通过实验课进行本专业基本技能训练,培养学生发现问题、分析问题和解决问题的能力;同时,通过实验可加深和巩固学生对理论知识的理解。在掌握系统理论知识和基本操作技术的基础上,培养学生严谨的科学作风和独立思考、独立工作的能力,建立牢固的“无菌观念”,掌握过硬的“无菌操作技术”,为今后的临床实践与科研工作打下坚实的基础。

实验形式分为示教和学生操作两种。前者主要是验证理论,后者是从不同角度进行基本技术训练和反复练习,以掌握相关的基本技能。

为了提高实验课效果,保证实验课质量,要求学生做到下列几点:

1. 实验前必须进行预习,了解实验的内容、目的、理论依据、操作方法及注意事项,以避免或减少发生错误。
2. 实验过程中坚持严肃性、严格性与严密性,对所操作的实验在全面理解的基础上,按要求依次进行操作,并积极地思考;对示教内容要仔细观察并与有关理论密切联系。
3. 如实记录、分析结果,并得出结论。若结果与理论不符,应分析、探讨其产生的原因,注重培养、训练自己的思维能力,最后写出实验报告。
4. 严格遵守实验室规则,防止发生各种事故。

二、实验室规则

医学微生物学实验的对象主要是病原微生物,操作过程中如果不注意可能会发生感染,甚至传播,为防止实验室感染,并提高实验课的效果,必须严格遵循下述规则:

1. 进实验室必须穿工作衣(白大衣),并按指定的位置入座。
2. 实验室内严禁吸烟和饮食,与实验无关物品勿带入室内。
3. 严格按照实验指导和教师的讲授进行实验操作,以期获得正确的实验结果。
4. 在实验过程中,如果不慎发生培养物或传染性材料污染桌、凳、地面和衣物等,应立即报告教师,可用 2% 来苏处理 30 min,然后洗净;若手上沾有活菌,应尽快浸泡于 2% 来苏中维持 5~10 min,再用肥皂及水洗涮。
5. 用过的带菌材料、器材(吸管、试管、玻片等)应放入指定的消毒缸内。
6. 自觉保持实验室内肃静、整洁。爱护公物,注意节约水电及实验材料。如有损坏,应立即报告指导教师,主动在破损物品登记本上登记,某些物品需根据其价格按规定酌情赔偿。

7. 每次实验完毕,值日生负责整理实验室(包括桌面、地面、实验设备等)卫生,关好水、电、门、窗,洗手后离开实验室。
 8. 未经许可,不得将实验室内任何物品(特别是菌种)带出室外。

第二章 医学微生物学基础

实验一 显微镜油镜的使用

实验目的

1. 熟悉光学显微镜的结构。
 2. 掌握油镜的使用原理及正确的使用方法。

实验材料

1. 器材 普通光学显微镜、香柏油、乙醚酒精、擦镜纸。
2. 标本 细菌革兰染色玻片标本、大肠埃希菌 24 h 培养液。

实验原理

细菌个体微小,一般不超过几微米(μm)。人肉眼分辨力约为 $250\text{ }\mu\text{m}$,所以,必须借助于显微镜(microscope)将其放大1000倍左右才能看清细菌。光学显微镜(图2-1)是利用透镜的放大原理,其放大倍数与透镜的大小有关。油镜的透镜小,镜孔也小,观察时聚光器聚集的光源要通过载玻片和空气后才能进入物镜,由于玻璃与空气的折光率不同,故易产生折射,使进入物镜的光线减少,致使所观察视野暗淡,物象不清。如在油镜与玻片中间加入和玻璃折光率($n=1.52$)相仿的香柏油($n=1.51$),则可减分辨率(图2-2)。

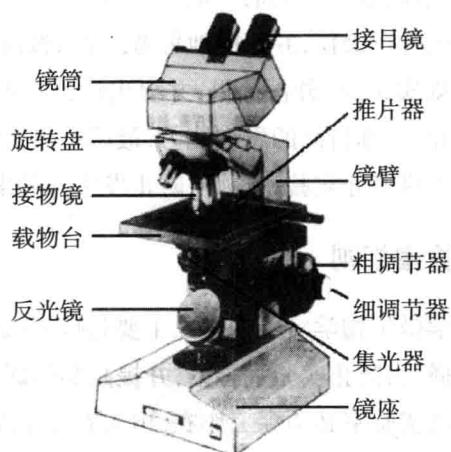


图 2-1 普通光学显微镜的构造

表 2-1 实验室中几种常用物质的折光指数

品名	玻璃	檀香油	香柏油	加拿大树胶	二甲苯	液状石蜡	松节油	甘油	水
折光指数	1.52	1.52	1.51	1.52	1.49	1.48	1.47	1.47	1.33

实验方法

1. 油镜辨认 普通光学显微镜的物镜有低倍镜、高倍镜及油镜三种，检查微生物时常用油镜，油镜头常见的标志是：

- (1) 透镜直径最小。
- (2) 油镜头长度大于低倍镜和高倍镜，油镜头的下缘有一圈黑线或两圈红线。
- (3) 有“oil”等字样。
- (4) 有放大倍数 $100\times$ 的标记。若镜筒的长度不变，显微镜的放大倍数 = 目镜倍数 \times 物镜倍数。例如目镜倍数为 $10\times$ ，物镜倍数为 $100\times$ ，则放大倍数为 1000 倍。

2. 具体应用 一手握住镜臂、一手托住底座，将显微镜轻轻放于实验台上，镜座距实验台边缘约 5 cm。显微镜应直立于桌上，不要将镜臂和载物台倾斜，以避免油滴外溢，影响观察。

(1) 对光

①先用低倍镜对光，显微镜不能直接采用阳光作光源，因其光线过强，反而不易看清，且反射热可损坏光学装置，所以，应采取间接日光为光源，使用平面反光镜；如采用灯光为光源时，宜用凹面反光镜。转动反光镜，使光线集中于集光器。

②根据所观察的标本，升降集光器和缩放光圈，以获得最佳亮度。一般染色标本用油镜检查时，亮度宜强，可将光圈开足，集光器上升至与载物台相平。检查未染色标本时常用低倍镜或高倍镜观察，此时应适当缩小光圈，下降集光器，使亮度减弱。

(2) 观察

①将标本置于载物台上，用弹簧夹固定住标本，移动待检部位于物镜下。
②先用低倍镜找出标本的范围，然后提高镜筒，在标本的待检部位加一滴镜油，量勿过多，更勿将油涂开。用油镜对准油滴，眼睛从侧面看着油镜，将粗调节器缓缓移动，使镜筒逐渐下降，直至油镜的末端浸没在油内，但切勿碰到玻片，然后眼睛转移至目镜，一边观察一边微转动粗调节器，使镜筒逐渐上升，待看到模糊物像时，再改用细调节器转动到物像清晰为止。若油镜末端已离开油面，应按上述过程重复操作。

注意

直筒显微镜按上法找视野，向上微转动粗调节器是使镜筒徐徐上升，而使用 Olympus CH₂ 型显微镜找视野时，向上微转动粗调节器则使载物台徐徐上升。两者方向正好相反，一定要小心，以免压碎标本片和损坏油镜头。

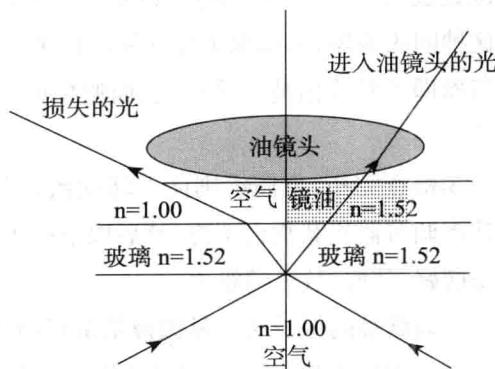


图 2-2 油镜加香柏油的原理

在一般情况下,当物像在一种物镜中已清晰聚焦后,转动物镜转换器将其他物镜转到工作位置进行观察时,物像将保持基本准焦的状态,这种现象称为物镜的同焦(parfocal)。利用这种同焦现象,可以保证在使用高倍镜或油镜等放大倍数高、工作距离短的物镜时仅用细调节器即可对物像清晰聚焦,从而避免由于使用粗调节器时可能的误操作而损坏镜头或载玻片。

③检查完毕,直筒镜则向上转动粗调节器将镜筒提起,双筒Olympus型显微镜则向下转动粗调节器将载物台下降,然后取下标本片,用擦镜纸将油镜头上的油擦净。按要求将显微镜摆好、装好,放入镜箱中。

3. 显微镜的保护法 显微镜是精密的光学仪器,要特别注意爱护。

(1) 取送搬移时要一手握住镜臂,一手托住镜座,轻拿轻放,避免碰撞。

(2) 细调节器是显微镜最精细而脆弱的部分,只能轻微地来回旋转,不要向一个方向转动数周以上。目镜、物镜、反光镜等光学部分必须保持清洁,避免日光直接照射。各部分结构切勿自行拆卸,以免损坏。强酸、强碱、氯仿、乙醚和酒精等均能去漆或损坏机件,应避免与显微镜接触。

(3) 油镜每次使用完毕,立即用擦镜纸(不能用布类或其他纸)拭去镜油,如油已干或透镜模糊不清,可用擦镜纸蘸乙醚酒精少许擦净,但必须随即用另一干擦镜纸拭去残留的乙醚酒精,以免掺入油镜内溶解用以粘固透镜的胶质,造成透镜移位或脱落,因此,应尽量少用乙醚酒精。

(4) 保存: 显微镜不用时,必须将物镜转成“品”字形,并下降集光器和镜筒,用软绸拭净各部件后覆盖于目镜上,放入镜箱或镜罩内,避免直射日光,置于干燥处,以防受潮。

注意事项

1. 显微镜是贵重精密仪器,使用时要精心爱护,不得随意拆装和碰撞。

2. 取送显微镜时应轻拿轻放,双手托持,一手握镜臂,一手托镜座,防止因震动受损。

3. 显微镜的调节器是精密而脆弱的部分,只能进行有限的旋转,当旋转感到有阻力则表明已达极限,绝不能再继续向此方向旋转,必须立即向反方向旋转退回。

4. 油镜用完后一定要擦拭,以防油干而影响其使用寿命。

5. 使用油镜时,一定要等标本干后才能加香柏油,滴镜油时避免形成气泡。

6. 显微镜应放置在背阴干燥处,以防止透镜生霉。

思考题

- 普通光学显微镜的最大放大倍数与分辨率是多少? 使用油浸镜时为什么要加镜油?
- 为什么选用香柏油作为物镜与玻片间的介质? 是否可用液状石蜡代替香柏油?
- 油浸镜有哪些标志? 观察标本时用左眼还是右眼或两眼都睁开?
- 什么是物镜的同焦现象? 在显微镜观察中有什么意义?

实验二 细菌的基本形态观察

细菌属于原核细胞型微生物,细菌具有三种基本形态(球形、杆形和弧形)、四种基本结构(细胞壁、细胞膜、细胞质和核质)。由于细菌微小且无色半透明,故需经适当染色并用显微镜放大后才能清楚地观察。根据细菌的形态、大小、排列方式及染色特性等,可对细菌进行初步鉴别。

实验目的

- 掌握细菌的基本形态。
- 熟悉各种细菌的排列方式及染色特性。

实验材料

- 细菌基本形态(革兰染色)标本片
 - (1)球菌(coccus):葡萄球菌、链球菌、淋病奈瑟菌、脑膜炎奈瑟菌。
 - (2)杆菌(bacilli):大肠埃希菌、炭疽芽孢杆菌、白喉棒状杆菌。
 - (3)弧菌(vibrio):霍乱弧菌。
- 其他物品 光学显微镜、香柏油、乙醚酒精、擦镜纸。

实验方法

用显微镜油镜观察上述细菌革兰染色标本片,认识细菌的三种基本形态。观察时要注意细菌的形态、大小、排列及染色特性。

实验结果

- 球形 脑膜炎奈瑟菌和淋病奈瑟菌:G⁻,镜下菌体呈红色,多数细菌成双排列;葡萄球菌:G⁺,为紫色,呈葡萄状排列;链球菌:G⁺,呈紫色,链状排列。
- 杆形 大肠埃希菌:G⁻短杆菌,菌体呈红色,排列不规则;白喉棒状杆菌:G⁺杆菌,呈紫色,菌体的一端或两端粗大呈棒状,并可见着色较深的颗粒;炭疽芽孢杆菌:G⁺杆菌,菌体粗大,两端平齐,似竹节状排列。
- 弧形 霍乱弧菌:G⁻弧菌,菌体只有一个弯曲,为逗点状,霍乱弧菌涂片染色后可见其排列如“鱼群”状。

思考题

- 观察细菌的基本形态有什么意义?
- 细菌的基本形态有几种?

实验三 细菌的特殊结构观察

细菌具有四种特殊结构(荚膜、鞭毛、芽孢和菌毛),在机体内或营养丰富的培养基上细菌易形成荚膜;在体外、在营养等条件较差的情况下细菌易形成芽孢,芽孢对外界抵抗力极强,进行消毒灭菌时,以是否杀死芽孢作为灭菌彻底与否的指标。由于一个细菌只能形成一个芽孢,所以,芽孢的形成不是细菌的繁殖方式,而是细菌的一种休眠状态;鞭毛是细菌的运动器官;荚膜、鞭毛和菌毛位于菌体表面,与细菌的致病性及诱发免疫应答有关。

细菌的荚膜、鞭毛、芽孢和菌毛等特殊结构必须经过特殊染色后用光学显微镜或电子显微镜(如菌毛)才能看到,细菌的特殊结构有助于细菌的鉴别。

实验目的

熟悉细菌的特殊结构及其在医疗实践中的意义。

实验材料

1. 细菌的特殊结构标本片

- (1) 鞭毛(flagellum): 伤寒沙门菌、霍乱弧菌。
- (2) 荚膜(capsule): 肺炎链球菌、产气荚膜梭菌。
- (3) 芽孢(spore): 破伤风梭菌、炭疽芽孢杆菌。

2. 其他物品 光学显微镜、香柏油、乙醚酒精、擦镜纸。

实验方法

用显微镜油镜观察细菌的荚膜、鞭毛、芽孢等特殊染色标本片。肺炎链球菌与产气荚膜梭菌的荚膜(荚膜染色法),注意观察菌体及荚膜的染色、形态特点。伤寒沙门菌与霍乱弧菌鞭毛(鞭毛染色法),注意观察菌体与鞭毛的染色、形态特点,鞭毛的数目、长短、位置。破伤风梭菌及炭疽杆芽孢(芽孢染色法),注意观察菌体、芽孢的形态、染色及芽孢在菌体中的位置。

实验结果

1. 伤寒沙门菌(周毛菌) 革兰阴性杆菌,经鞭毛染色后可见菌体周围有细长的数根丝状物,即为鞭毛。
2. 霍乱弧菌(单毛菌) 革兰阴性弧菌,经鞭毛染色后可见菌体一端有细长的单根鞭毛。
3. 肺炎链球菌(荚膜) 革兰阳性球菌,成双排列。在菌体外周有一层透明的区域,即为荚膜。
4. 产气荚膜梭菌(荚膜) 革兰阳性粗大杆菌,在菌体外有较厚的荚膜。
5. 破伤风梭菌(芽孢) 革兰阳性杆菌,菌体顶端有一圆形、比菌体宽的结构,即为芽孢。芽孢与菌体相连似鼓槌状,是其独有的形态。

思 考 题

1. 细菌的特殊结构有几种？为什么在油镜下看不到菌毛？
2. 观察细菌的特殊结构有什么意义？细菌的特殊结构为什么要采用特殊染色法？

实验四 细菌动力的观察

有些细菌具有鞭毛，鞭毛是细菌的运动器官，具有鞭毛的细菌在液体中能够运动。无鞭毛的细菌在液体中受到液体分子冲击时可发生原位颤动，称为布朗运动(Brownian movement)。在显微镜下观察细菌有无动力(即有无鞭毛)是鉴别细菌的依据之一。

实验目的

1. 了解镜下观察细菌动力的方法，学会区分真正的细菌运动与布朗运动。
2. 熟悉细菌不染色标本的观察方法。

实验原理

有鞭毛的细菌在液体培养基中能从一处游到另一处，而无鞭毛的细菌无动力，当受到环境中液体分子的冲击时，可发生颤动，以此可观察、了解细菌的运动能力。

实验材料

1. 菌种 变形杆菌及葡萄球菌 8~12 h 肉汤培养物。
2. 器具 盖玻片、载玻片、凹玻片。
3. 试剂 凡士林。

实验方法

1. 悬滴法

(1) 取盖玻片一张，用取菌环取变形杆菌肉汤培养物一滴置于盖玻片中央，盖玻片四角涂少许凡士林。

(2) 使凹玻片反转，使凹窝对准盖玻片中央，粘住盖玻片后反转，使标本成悬滴(图 2-3)。

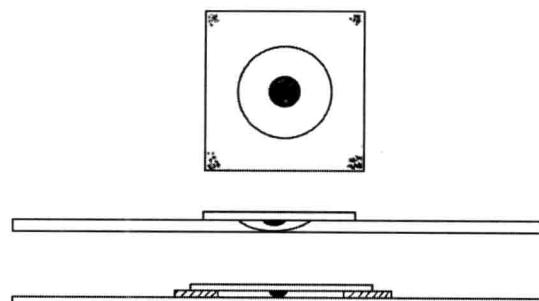


图 2-3 悬滴法