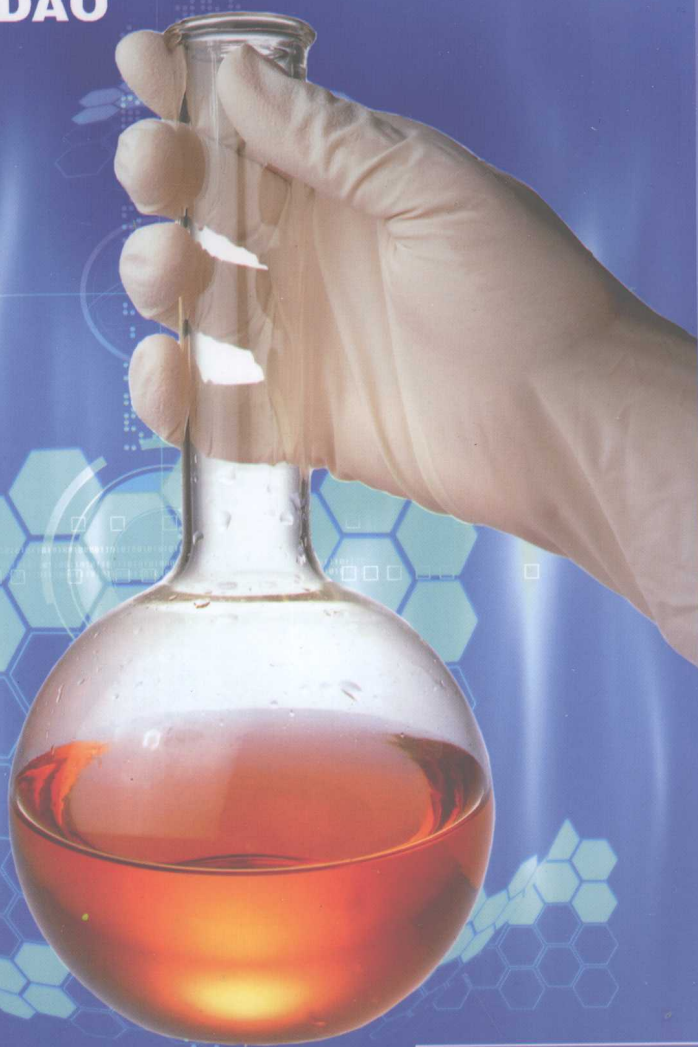


普通高等医学院校配套教材

医学微生物学实验指导 与考试指南

赵丽娟 黄衍强 主编

YIXUE
WEISHENGWUXUE
SHIYAN ZHIDAO
YU KAOSHI
ZHINAN



广西科学技术出版社

普通高等医学院校配套教材

医学微生物学实验指导 与考试指南

赵丽娟 黄衍强 主编

YIXUE WEISHENGWUXUE
SHIYAN ZHIDAO YU KAOSHI ZHINAN

广西科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

医学微生物学实验指导与考试指南/赵丽娟, 黄衍强
主编. —南宁: 广西科学技术出版社, 2008. 2

ISBN 978 - 7 - 80763 - 003 - 6

I. 医… II. ①赵…②黄… III. 医药学: 微生物学—实
验—教学参考资料 IV. R37 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 019173 号

医学微生物学实验指导与考试指南

赵丽娟 黄衍强 主编

广西科学技术出版社出版

(南宁市东葛路 66 号 邮政编码 530022)

广西新华书店发行

广西民族印刷厂印刷

(南宁市明秀西路 53 号 邮政编码 530001)

·*

开本 787mm × 1092mm 1/16 印张 14.25 字数 310 000

2008 年 2 月第 1 版 2008 年 2 月第 1 次印刷

印数: 1 — 3 000 册

ISBN 978 - 7 - 80763 - 003 - 6/R · 1 定价: 29.00 元

本书如有倒装缺页, 请与承印厂调换

《医学微生物学实验指导 与考试指南》编写委员会

主 编	赵丽娟	黄衍强		
副 主 编	秦静英	曾 怡	韦红玉	黄小凤
参编人员	赵丽娟	黄衍强	秦静英	曾 怡
	黄干荣	李晓华	陈源红	韦红玉
	黄小凤	覃艳春	唐华英	

序 言

本教材根据《医学微生物学》(第6版)、《微生物学和微生物学检验》(第2版)和《全国医学微生物学大纲》中实验规划的要求,参考各兄弟院校的编写经验,结合我们工作实践编写而成的。本书适用于临床、检验、护理、影像、口腔等专业。

本教材内容分为基础微生物学实验操作、综合实验操作、独立设计实验、实验考核样题、理论与实验知识练习等内容。编写的目的是要求学生在学习微生物学的过程中,通过实验课的学习而验证理论,从而使学到的知识更为巩固;通过学生亲自动手操作,得到比较全面的微生物学基本操作技术的训练,树立无菌观念,掌握无菌操作技术;通过综合实验掌握常见病原微生物的生物学性状、分离培养和鉴定的方法以及一些临床标本的微生物学检验基本程序;通过独立设计实验,提高学生的学习兴趣,培养学生独立分析问题、解决问题的能力 and 科学研究的能力,比较全面地提高当代大学生的综合水平;通过实验考核与练习,加深学生对理论与实验知识的掌握。

在此特别感谢广西医科大学的樊晓晖教授和广西中医学院的王坤教授给本书提出的宝贵意见,同时也感谢李洁、韦鹏涯、黄宏思等老师的悉心指导和审阅。

由于我们的水平有限,编写的时间仓促,不免出现缺点和错误,恳请各位读者给予批评指正。

编 者
2007年7月

目 录

第一部分 医学微生物学实验前言

前言一	医学微生物学实验目的和要求	(3)
前言二	医学微生物学实验室规则及注意事项	(4)

第二部分 基础实验

实验一	微生物的形态检查	(9)
实验二	细菌的人工培养	(20)
实验三	细菌的分布与外界因素对细菌的影响	(29)
实验四	动物接种实验与病毒培养技术	(36)
实验五	血浆凝固酶实验与肥达氏反应实验	(43)
实验六	抗酸染色与墨汁负染色方法	(46)
实验七	生化反应与血清学实验	(48)

第三部分 综合实验

实验八	肠道杆菌鉴定	(55)
-----	--------------	--------

第四部分 独立设计实验

实验九	独立设计实验	(61)
-----	--------------	--------

第五部分 自学内容

一	三大常规的微生物学检查	(65)
二	临床常见病原菌的培养与鉴定	(74)

第六部分 医学微生物学考试指南

指南一	医学微生物学实验考核试题	(83)
指南二	医学微生物学练习题	(91)
指南三	医学微生物学实验考核试题答案	(192)
指南四	医学微生物学练习题答案	(203)

第一部分

医学微生物学实验前言

前言一 医学微生物学实验目的和要求

医学微生物学实验目的,在于验证有关理论,加深对基本理论知识的理解;通过无菌操作,建立无菌观点,学习和掌握有关的基本操作,使学生养成实事求是的科学态度,培养独立工作、分析问题、解决问题的能力 and 科学研究能力。

实验形式分教师示教和学生操作两种,前者主要验证理论,后者可从不同角度进行基本技能训练和反复练习,掌握这些基本技能,从而掌握一些临床微生物学检查的基本程序和方法。此外,通过学生自己设计实验并操作,有利于培养学生的科研能力和创造能力。

前言二 医学微生物学实验室规则及注意事项

一、实验室规则

在进行微生物学实验时,必须时刻牢记实验的对象是病原微生物,任何疏忽都可能导致严重的后果,不仅自身有可能招致感染,而且有可能将病原微生物传给他人。因此绝不能有丝毫侥幸心理和冒任何不必要的危险。进入实验室时必须遵守下列规则:

1. 进入实验室时必须穿白大褂,离开实验室时脱下白大褂反折,白大褂要经常清洗消毒。
2. 书包、衣物等勿带入实验室,必要的文具、实验指导、笔记等带入后,放在指定的地方。
3. 在实验室内不准吃东西、喝饮料和吸烟,不可把任何东西放入嘴中,也不要用手抚摸头面等部位。
4. 进入实验室后要保持安静,禁止高声谈话,不准打闹嬉笑。
5. 必须按照老师指定的方法,小心地处理传染性材料、培养物和污染的物质,要正确地使用存放污染器材的各种消毒容器。
6. 必须谨慎操作,避免任何有菌材料的溅出,若不慎污染了工作台、手、眼、衣服和地面等处,应立即报告老师,以便及时作适当处理。
7. 培养物和传染性材料必须放在工作台的安全部位,尽可能保持台面的清洁整齐。
8. 爱护公物,合理使用实验材料和器材,如不慎损坏了某些器具,应及时报告老师,听候处理。
9. 每次实验完毕后均用消毒药水擦洗工作台面,并用紫外线灯照射过夜。
10. 实验完毕后清理台面,将需培养的标本及时放入培养箱。关闭水、电、煤气和门窗后方可离开实验室。
11. 离开实验室前,应用消毒液(2% 来苏尔或 0.1% 新洁尔灭)将双手浸泡 5~10 分钟,再用清水洗净。
12. 未经许可,不得将实验室内任何物品特别是菌种带出室外。

二、实验室意外的紧急处理办法

1. 皮肤破损先除去异物,用蒸馏水或生理盐水洗净后,局部以 2% 红汞或 2%~3% 碘酒消毒。
2. 烧伤局部涂凡士林、5% 鞣酸或 2% 苦味酸。
3. 化学药品腐蚀伤若为强酸,先用大量清水冲洗,再以 5% 碳酸氢钠溶液洗涤中和;强碱腐蚀伤时先以大量清水冲洗后,再用 5% 醋酸或 5% 硼酸溶液洗涤中和。若受伤处是眼部,经过上述步骤处理后,再滴入橄榄油或液体石蜡 1~2 滴。
4. 菌液误入口中应立即吐出消毒容器内,并用 1:1000 高锰酸钾溶液或 3% 双氧水漱口;同时根据菌种不同,服用抗菌药物预防感染。
5. 菌液流洒桌面将适量 2%~3% 来苏尔或 0.1% 新洁尔灭倒于污染面,浸泡半小时后抹

去。若手上有活菌,亦应浸泡于上述消毒液 5 分钟后,再用肥皂和水清洗。

6. 发生火警时必须沉着处理,切勿慌张,应立即关闭电闸和煤气阀门。如酒精、乙醚、汽油等有机溶液起火,切忌用水扑救,可用沙土等扑灭火苗。

三、实验操作注意事项

(一) 严格遵循实验指导

1. 在开始做实验以前,必须仔细阅读实验指导,进行独立思考,并根据实际情况,作出实验的具体安排和打算。

2. 合理安排时间和实验材料,避免实验材料浪费;同时尽量避免出错,力求取得理想的结果。

(二) 认真完成实验操作

1. 认真听取指导老师实验前的讲解。

2. 细心操作,若发现问题,在独立思考分析原因的基础上找老师帮助。

3. 在自己的实验材料上作好标记,包括班级、姓名、菌名、日期等。

4. 认真观察自己的实验结果,将其记录在实验报告中(根据需要要用彩色笔绘图记录),并回答实验报告中所有的问题。

5. 实验报告的内容包括:标题、目的、原理、材料、方法、结果(必要时需绘图)、结果分析及意义。

6. 遇到实验结果与理论不符的情况,应仔细分析原因,培养自己独立思考问题、分析问题和解决问题的能力。

(三) 充分利用参考资料

1. 在教科书和参考书中核对有关的数据和资料。

2. 认真观摩示教和影像、多媒体等电化教材。

第二部分

基础实验

实验一 微生物的形态检查

【目的】

1. 掌握显微镜油镜的使用和保护。
2. 掌握细菌的基本形态和特殊结构。
3. 掌握细菌涂片标本的制备及革兰氏染色法的步骤,判断革兰氏染色性及明确其临床意义。
4. 了解特殊结构的染色方法。
5. 了解放线菌和霉菌的形态。
6. 了解放线菌和霉菌的形态观察方法。

【内容】

一、显微镜油镜的使用方法

(一) 普通光学显微镜的接物镜有高倍镜、低倍镜和油镜三种,检查微生物最常用者为油镜,在使用前首先要识别油镜头,在油镜头上常有下列标记

1. 放大倍数是 $90\times$ 或 $100\times$ 。
2. 油镜头前端有一白圈。
3. 物镜的前面透镜最小。
4. 刻有“油”或外文“HI”(Homogeneous Immersions),“Oil Immersion”等字样。

(二) 使用方法

1. 使用显微镜时,必须端坐,坐凳和桌面高度配合适宜,显微镜应直立在桌上。把显微镜的电源线插在适当的电源插座中。

2. 把照明器的开关移到“ON(开)”的位置,滑动光亮控制钮以获得适宜的照明亮度。集光器越靠近载物台平面,则光线越强;光圈放得越大,光线也越强。检查染色标本时,光线应强,光圈应放大,集光器要抬高。检查未染色标本时光线宜较弱,此时应适当缩小光圈,降低集光器。

3. 染色标本上加一小滴香柏油,油勿过多,更勿将油涂开。

4. 置标本于载物台上。弹簧夹固定,将待检部分移至接物镜下。

5. 转动接物镜旋转盘,使油镜头对准标本。眼睛从侧面看着,转动粗调节器,使载物台逐渐上升,直至油镜头浸入油滴内(上升程度是使油镜头几乎与标本接触,但两者切勿相碰!),然后眼睛转到目镜处,一面观察,一面调节粗调节器使载物台缓慢下降,待获得模糊物象时,再换用细调节器调节至物象清晰为止。调节时千万不可使用强力将载物台任意上升,以致压碎标本玻片,甚至将贵重的油镜头损坏。观察标本时,两眼应同时睁开,调节视度圈,使其与瞳距基本一致。

6. 观察完毕,转动粗调节器使载物台下降,取下标本片,用滴加有乙酸乙酯的擦镜纸将油镜头的油擦净,再用干净的擦镜纸将镜头擦净。

7. 显微镜构造如图 1-1 所示。

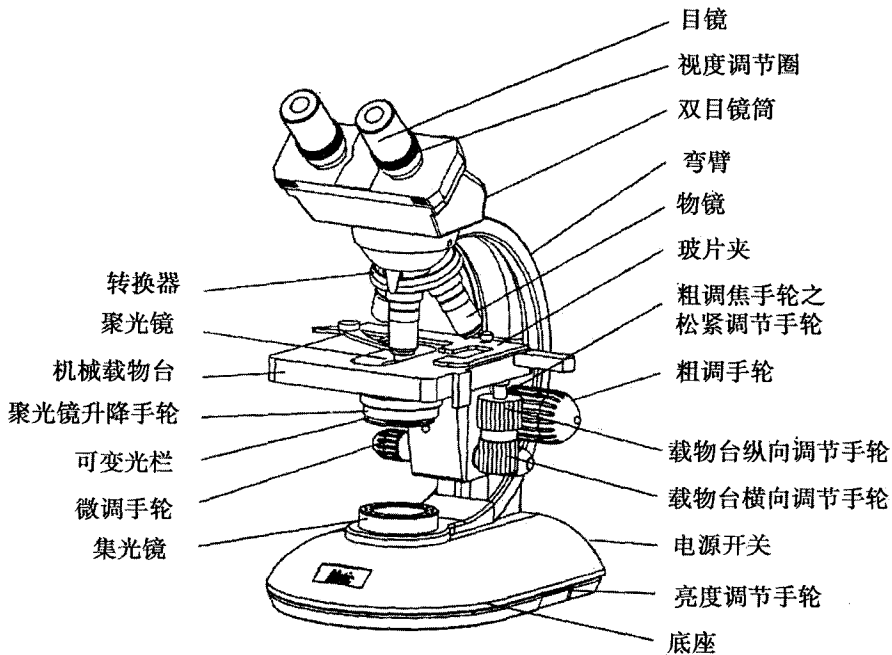


图 1-1 显微镜构造

二、革兰氏染色法

【原理】

革兰氏染色法的原理可能与下列因素有关：

1. 革兰氏阳性菌等电点(PI 2~3)比革兰氏阴性菌的等电点(PI 4~5)低。在同一 PI 条件下,革兰氏阳性菌比革兰氏阴性菌所带负电荷要多,与带正电荷的碱性染料结合力较牢固,不易脱色。
2. 革兰氏阳性菌含有大量的核糖核酸镁盐,可与进入胞浆内的结晶紫和碘结合成大分子复合物,不易被丙酮酒精或 95% 乙醇脱色。而革兰氏阴性菌此种物质量少,吸附染料量也少,形成的复合物分子也较小,故易被丙酮酒精或 95% 乙醇脱色。
3. 革兰氏阳性菌细胞壁结构较致密,肽聚糖层很厚,脂质含量少,乙醇不易透入,而且丙酮酒精或 95% 乙醇可使细胞壁脱水,细胞壁间隙缩小、通透性降低,阻碍结晶紫和碘的复合物渗出。而革兰氏阴性菌的细胞壁结构较疏松,肽聚糖层很薄,脂质含量高,易被丙酮酒精或乙醇溶解,致使细胞壁通透性增高,细胞内的结晶紫和碘的复合物被乙醇溶解逸出而致脱色。

【材料】

1. 葡萄球菌、大肠杆菌和白色念珠菌的 18~24 小时琼脂斜面培养物。
2. 载玻片、生理盐水、接种环、酒精灯等。
3. 革兰氏染色液(结晶紫、碳酸钠、碱性碘液、丙酮酒精、碱性复红)、显微镜、香柏油等。

【方法】

(一) 细菌涂片标本的制备

取生理盐水→涂片→干燥→固定

1. 接种环的使用。接种环是微生物学实验室中用来挑取、接种和分离细菌用的简单器械。使用时,用右手持接种环的柄部,先将金属丝垂直于酒精灯火焰上,烧红后,继而将连接金属丝的金属棒通过火焰灭菌,待冷却后使用,使用前、使用后均用火焰烧灼灭菌。

2. 取生理盐水。取一张洁净载玻片,用接种环取3环生理盐水,分别放在洁净的载玻片中不同位置,注意距离不要太近。

3. 涂片。左手持细菌培养物底部、右手以持笔式拿着接种环柄,将试管口置于火焰附近,以右手小指对掌夹住试管塞,朝一方向旋松塞子后将塞子取出,再将试管口在酒精灯火焰上烧灼灭菌。用冷却后的接种环,分别刮取葡萄球菌、大肠杆菌、白色念珠菌琼脂斜面培养物少许(三种菌在同一张片制备),与生理盐水混合,涂成直径约为1厘米的均匀薄膜涂片,同时灭菌试管口后塞好试管塞,将试管放回试管架。然后立即将接种环烧灼灭菌,放回原处若用液体材料(如液体培养物,痰、浓汁等),可直接取材涂成薄片。

4. 干燥。涂片最好在室温中自然干燥,必要时可将涂片面朝上,小心断续地在弱火高处略烘,以助水分蒸发。但切勿将细菌薄膜烤焦。

5. 固定。目的是杀灭细菌;使菌体与玻片黏附较牢,在染色时不致被染液和水冲洗掉;使细菌蛋白质变性易被着色。

方法:涂片面朝上,于酒精灯火焰上快速来回通过3次,时间2~3秒。

(二) 革兰氏染色法

1. 初染。在细菌涂片上滴加结晶紫染液和碳酸钠各1~2滴,约30秒后水洗,并将玻片上积水轻轻擦净。

2. 媒染。滴加碱性碘液1~2滴,约30秒后水洗,并将玻片积水擦净。

3. 脱色。滴加丙酮酒精2~3滴,轻轻晃动和斜持玻片,使丙酮酒精流出,如果脱色未完全可再滴加丙酮酒精1~2滴,直至流下丙酮酒精为无色或稍呈淡紫色为止,全程5~10秒,立即水洗,并将玻片上的积水轻轻擦净。

4. 复染。滴加碱性复红1~2滴复染,5秒钟后水洗。

5. 镜检。待标本自然干燥,或用吸水纸吸干,加1滴香柏油于标本上,用油镜观察,注意细菌的形态大小、染色性、排列方式、有无其他特殊结构等。

6. 染色结果。葡萄球菌染成紫色,为革兰氏阳性菌,呈葡萄串状排列的球菌观察不到其他特殊结构;大肠杆菌染成红色,为革兰氏阴性菌,单个散在分布的杆菌观察不到其他特殊结构;白色念珠菌染成紫色,为革兰氏阳性菌,呈不规则排列的球菌菌体大小不一,染色不均,有假菌丝。

7. 绘图记录。

(三) 革兰氏染色法影响因素

影响因素:一是操作因素。涂片太厚或太薄,菌体分散不均匀,可影响染色结果。固定时应避免菌体过分受热。二是染液因素。所有染液应防止水分蒸发而影响浓度,特别是碱性碘液久存或受光作用后易失去媒染作用。脱色用丙酮酒精或95%乙醇为宜,若瓶密封不良或涂片上积水过多,可使丙酮酒精或乙醇浓度降低而增强脱色能力。三是细菌因素。不同时间的细菌培养物,染色结果有差异,如葡萄球菌幼龄菌染成紫色,而老龄菌染成红色。细菌染色一般用18~24 h的细菌培养物。总之,涂片与脱色是影响结果的关键步骤,掌握不好很容易造成