

高等医学院校实验教材

供临床医学、口腔医学、预防医学、法医学、药学、护理学、生物技术等专业使用

Laboratory Manual For Medical Microbiology

医学微生物学 实验指导

主 编 戚中田

副主编 王 健 朱诗应



第二军医大学出版社
Second Military Medical University Press

第 2 版

教育部“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材

医学微生物学 实验指导

主 编 王 颖

副主编 王 颖 李 颖



科学出版社

医学微生物学实验指导

主 编 戚中田

副主编 王 健 朱诗应

编 者 (以姓氏笔画为序)

王 健 朱诗应 任 浩

许礼发 赵 平 赵兰娟

曹 洁 戚中田 潘 卫



第二军医大学出版社

Second Military Medical University Press

内 容 简 介

本书是一本医学微生物学实验教程,分细菌学总论实验、细菌学各论实验、病毒学实验、真菌学实验、微生物学实验设计、附录等6个部分。详细介绍了39项实验的实验目的、原理、材料与步骤。每个实验都设计了活页式实验记录卡,便于学生进行实验总结以及教师检查实验教学效果。

本书编写人员都是长期从事医学微生物学教学与科研工作的教师,具有丰富的实验教学经验,编写的实验内容具有很强的实用性、科学性与先进性。

本书可供高等医学院校临床医学(五年制、八年制)、口腔医学、预防医学、法医学、药学、护理学、生物技术等专业学生使用。

图书在版编目(CIP)数据

医学微生物学实验指导/戚中田主编. —上海:第二军医大学出版社,2011.6

ISBN 978-7-81060-803-9

I. ①医… II. ①戚… III. ①药理学—实验—高等学校—教学参考资料: IV. ①R 37-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2010)第240135号

出版人 陆小新
责任编辑 高标

医学微生物学实验指导

主编 戚中田

第二军医大学出版社出版发行

上海市翔殷路800号 邮政编码:200433

发行科电话/传真:021-65493093

<http://www.smmup.cn>

全国各地新华书店经销

上海第二教育学院印刷厂印刷

开本:787×1092 1/16 印张:19.5 字数:456千字

2011年6月第1版 2011年6月第1次印刷

ISBN 978-7-81060-803-9/R·941

定价:42.00元

前 言

实验课是医学微生物学教学的一个重要环节。一本好的实验教材就成为教好与学好实验课的关键“抓手”。因此,我校微生物学教研室始终保持及时编写与更新实验课教材的优良传统。从1980年代开始至今,叶天星教授、杜平教授、范中善教授先后主编过这本实验课教材,长期在我校临床医学、药学与护理等各专业学生中使用,受到了教师和学生的一致好评,《医学微生物学实验指导》的书名也一直沿用和传承至今。

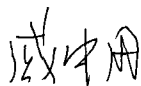
针对新形势下医学微生物学教学改革目标的要求,我们在2007年版的基础上,对《医学微生物学实验指导》进行了重新修订,并与安徽理工大学医学院王健教授密切合作,借鉴国内外最新的医学微生物学实验教材的内容,大力增加综合性实验与自主设计性实验,并设计了新颖的学生实验记录卡。

全书分细菌学总论实验、细菌学各论实验、病毒学实验、真菌学实验、微生物学实验设计和附录等6个部分,具体介绍了39项医学微生物学实验的实验目的、实验原理、实验材料与实验步骤。既保留了大量的微生物学经典实验,又补充了一些新的实验方法,如全自动微生物鉴定操作规程等内容。针对每个实验都设计有统一格式的学生实验记录卡,以活页形式附于书后,便于学生实验总结和教学意见的反馈,以进一步促进教学过程中师生的良性互动。

教材出版过程中得到了第二军医大学出版社的大力支持,在此表示衷心感谢。

限于我们的学术水平和编写能力,教材中难免存在不足之处,敬请广大师生批评指正。

第二军医大学



2011年4月

目 录

微生物学实验目的与要求	(1)
微生物学实验室规则	(2)

一、细菌学总论实验

实验一 油浸显微镜的使用及细菌形态结构的观察	(3)
实验二 细菌涂片标本的制备及简单染色法	(7)
实验三 细菌的革兰染色法	(11)
实验四 细菌培养基的制备与灭菌实验	(13)
实验五 细菌接种技术与分离培养方法	(37)
实验六 细菌培养物的性状观察	(51)
实验七 细菌生化代谢产物的检查	(53)
实验八 细菌动力的检查	(57)
实验九 细菌的动物实验技术	(61)
实验十 细菌毒素的检查	(65)
实验十一 细菌的药物敏感性实验	(69)
实验十二 细菌对抗生素联合敏感实验	(77)
实验十三 细菌耐药性质粒转化实验	(81)
实验十四 噬菌体裂解细菌实验	(83)
实验十五 细菌的形态变异实验	(85)

二、细菌学各论实验

实验十六 病原性球菌实验	(89)
实验十七 肠道病原菌的分离及鉴定实验	(95)
实验十八 沙门菌检验——肥达实验	(99)
实验十九 弧菌属实验	(101)
实验二十 幽门螺杆菌检验	(105)
实验二十一 假单胞菌属实验	(107)
实验二十二 炭疽芽胞杆菌实验	(111)
实验二十三 厌氧芽胞梭菌实验	(115)
实验二十四 白喉棒状杆菌实验	(117)
实验二十五 结核分枝杆菌实验	(119)



实验二十六 沙眼衣原体的检测——实时荧光定量 PCR (123)
实验二十七 支原体实验 (127)
实验二十八 立克次体的检测——外斐反应 (129)
实验二十九 病原性螺旋体的鉴定 (131)
实验三十 放线菌的检测——硫磺样颗粒及菌落形态 (135)

三、病毒学实验

实验三十一 病毒的形态与结构观察 (137)
实验三十二 病毒的增殖培养方法实验 (145)
实验三十三 病毒感染的血清学实验 (153)
实验三十四 病毒的分离与鉴定实验 (163)
实验三十五 病毒感染的快速诊断实验 (167)

四、真菌学实验

实验三十六 表皮丝状真菌检查 (175)
实验三十七 酿酒酵母菌的培养与质粒转化实验 (177)

五、微生物学实验设计

实验三十八 微生物学检查方案的设计 (179)
实验三十九 微生物学新方法、新技术的设计 (183)

六、附录

附录一 国外病例参考答案 (193)
附录二 常见临床标本的微生物学检验程序 (205)
附录三 菌种保存方法 (211)
附录四 常用染色液与试剂 (217)
附录五 VITEK 2 Compact 全自动微生物分析系统 (222)

参考文献 (227)

微生物学实验目的与要求

微生物学是一门实验性极强的学科,实验课是医学微生物学教学的一个重要环节。开设微生物学实验课主要有3个目的:①使学生加深和巩固对理论课内容的理解和记忆;②学会及掌握医学微生物学操作的基本技术和技能,为今后有关疾病的检查、传染病的诊断与相关科研工作打下良好的基础;③培养“有菌观念”和“无菌操作”意识,为学好临床医学、预防医学和军事医学等后续课程打好基础。

本实验指导分细菌学总论、细菌学各论、病毒学、真菌学、实验设计和附录等6个部分,共39项实验。每项实验包括实验目的、实验原理、实验材料、实验步骤、注意事项和实验记录等内容。实验课的形式主要分为学生自己动手操作、教师示教(或展示)和观看教学录像3种。

为了提高实验课的教学质量和学习效果,要求学生在参加实验课时做到以下几点:

1) 实验课前要做好预习,明确本次实验的目的、内容、方法,以及操作中的注意事项及理论依据等。

2) 在实验过程中,要严格按照操作规程,防止微生物的播散和感染。对学生自己操作的实验,应遵照实验指导所列步骤依次进行,边操作边思考;对教师示教的实验要认真听讲,仔细观察,并联系有关理论;对播放的教学录像要认真地看和听,把握其主要内容、操作程序及某些重要细节。

3) 对实验结果,必须认真地记录,然后进行分析,得出结论。遇有与理论知识不符的结果时,应探讨其原因,训练自己的科学思维和解决问题的能力。

4) 课堂讨论时,应认真思考、积极发言。

5) 认真撰写教师指定的实验报告,内容应主要包括形态学描述与实验结果的讨论及小结等。

2011年4月

微生物学实验室规则

医学微生物学实验的对象大多为病原微生物,具有传染性。因此,进入实验室后必须严格遵守以下规则:

- 1) 必须穿着工作服(隔离衣),离开时要脱下,并将其反折、叠好。
- 2) 与实验课无关的物品,不要带入实验室,以免发生污染。
- 3) 实验室内应保持安静、有秩序;不得高声谈话、喧哗,不准打闹和说笑,以免影响他人实验。
- 4) 实验室内严禁饮食、吸烟及用嘴含铅笔或用舌舔标签等;也不要常用手抚摸头、面等部位,以免发生感染。
- 5) 若不慎将菌液吸入嘴内、溅入眼内,或划破手指或将菌液溅撒到桌面、地面、书本及衣物等,应立即报告教师,进行及时消毒处理(立即用抹布浸沾2%~3%来苏或5%石炭酸液,盖在污染部位,经半小时后方可抹去。如手上沾有活菌也用上述消毒液浸泡10 min左右,再以肥皂及自来水反复洗净)。
- 6) 实验材料都应按指定位置妥善放置,沾有传染性材料的吸管、滴管、玻片等物品用后立即投入指定的消毒缸(筒)内,不得乱放或用自来水冲洗。不得将实验室内的物品带出室外。消毒处理后可继续使用的物品,须分别放在指定的地方。
- 7) 要爱护室内仪器设备,按使用规则操作,不得随意拨动电器开关;显微镜用后要擦净,各功能部件应复位,放入显微镜柜内。注意节约使用实验耗材和水、电、煤气等。如有器材损坏须报告教师,并按规定进行登记处理。
- 8) 实验完毕,将各物归放指定地点。需培养的材料要标记组别、姓名等,送入孵箱培育。洗手后才能离开实验室。
- 9) 应轮流值日,负责打扫实验室卫生,关好水、电、煤气、门窗等。

2011年4月

一、细菌学总论实验

实验一 油浸显微镜的使用及细菌形态结构的观察

【实验目的】

细菌个体微小,肉眼不能看到,在细菌的形态学研究过程中,必须借助于显微镜以及适当的染色,才能比较清楚地看到与辨别。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。油浸物镜(oil-immersion objective)在光源显微镜中有最高的放大率和最强的分辨力,同时须在标本与物镜间添加一滴香柏油(cedar wood oil),能将标本中微生物放大1 000倍(使用目镜为 $10\times$ 、使用物镜即油镜为 $100\times$,则物像放大倍数为 10×100),用于查看微生物的形态结构比普通物镜更为清楚,在微生物学检验中最常使用,多用于检查染色标本,故必须熟练掌握其使用技术。

【实验原理】

因香柏油具有与玻璃基本相同的折射率(香柏油为1.515,玻璃为1.52),镜检时,滴加香柏油的作用是使光线进入油滴内与玻璃折射率一致,可使光源尽可能多地进入物镜中(图1-1),避免光线通过折射率低的空气(折射率为1.0)而使光线散失,因而能提高物镜的分辨力,使物像明亮清晰。

【实验材料】

- 1) 显微镜(microscope)、香柏油(cedar wood oil)、二甲苯(xylol)、擦镜纸(lens paper)。
- 2) 各种细菌染色标本片: 球菌、杆菌、螺形菌、真菌、衣原体、支原体、立克次体、螺旋体。
- 3) 细菌特殊结构染色标本片: 荚膜、芽胞、鞭毛、异染颗粒。

【实验步骤】

(一) 油浸显微镜的检查技术(technique of oil-immersion microscopy)

对光→加油→调焦点→看物像→换视野→用毕处理

1. 对光

将显微镜平稳地放在实验台上,依据光源的强弱调整反光镜位置。若是天然光源

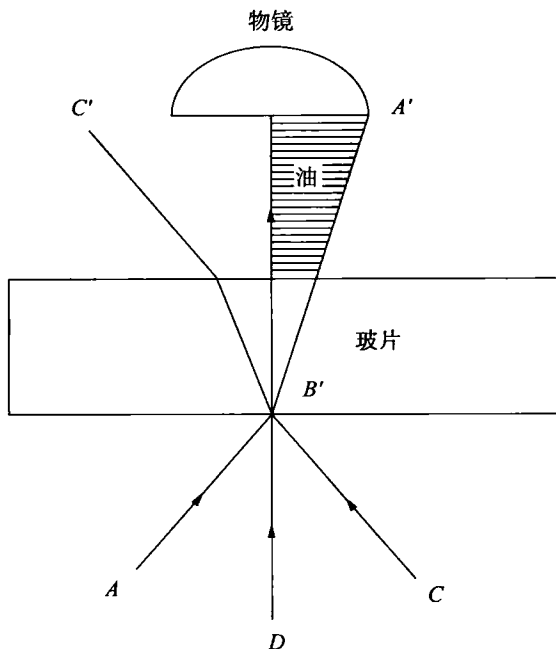


图 1-1 光线通过干燥系物镜(左侧)和油浸系物镜(右侧)的途径

注 1) 光线 A、B'、A' 是通过载物片经香柏油折射的情况, 油镜加香柏油后, 使光线进入物镜中的量较不加香柏油的多。

2) 光线 C、B'、C' 是通过载物片经空气的折光情况, 光线没有进入物镜中。

或较强的光线宜用平面反光镜;若是普通灯光或较弱的光线则用凹面反光镜。把集光器升到最高位置,把光圈完全打开,增大射入光线的强度。

2. 加油

将标本片放在载物台上,染色的部位正对集光器中央,用玻片夹固定。先用低倍镜对好光,用低倍镜调至视野最亮,滴加香柏油一小滴,再换油浸镜检查。首先正确识别油镜头,其上都有标记:如标有 100×;镜头前端有黑、白或红色的圆圈;刻有“HI”或“oil”等,其孔径也较其他物镜小。使用油镜时,不要把镜柱弯曲,以免香柏油流溢。

3. 调焦点

换用油浸镜后,先从侧面注视物镜头(图 1-2),轻轻向下转动粗螺旋调节器,使油镜头下降浸入油滴中,直到接触标本片为止(注意勿用力下降过度,否则有压碎玻片和损坏油浸镜头的危险);然后双眼睁开,用左眼看目镜,用右手轻微转动粗螺旋调节器,使油镜慢慢上升,待看到模糊物像时,就立即改用左手轻轻转动细螺旋调节器以调节焦点,使整个视野中的物像均能清楚识别为止。

4. 看物像

在观察时,只准调节细螺旋调节器,使镜筒微微上升或下降以调节焦点,绝对不可将油镜头下降过度,以免造成破损。如没有看清视野物像,再照上法重检。

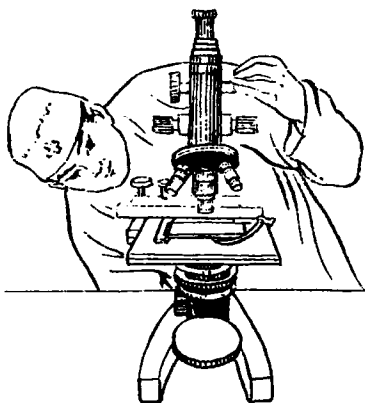


图 1-2 使用油浸物镜、降落镜筒时的姿态

5. 换视野

看清物像后,如想观察其他视野,可调节移动架,使标本片向前后、左右移动。

6. 用毕处理

镜检完毕,将镜筒向上升起,取出玻片,以擦镜纸拭净镜面油滴。如油滴已干在镜头上,可将擦镜纸浸少许二甲苯拭净,再立即用干擦镜纸拭净。最后将物镜转呈“八”字形,并将集光器向下降落,再下降镜筒固定,罩上镜套,用右手握镜臂,以左手掌托镜座将显微镜放入镜箱内,对号归位。

(二) 细菌形态结构的观察(observation of bacterial structures)

细菌个体小,种类繁多,但仍具有一定的形态。在适宜的条件下,其正常的形态主要分成球菌、杆菌和螺形菌三类。细菌细胞的基本结构主要由细胞壁、细胞膜、细胞质和核质组成。有些细菌尚有芽胞、荚膜、鞭毛及菌毛等特殊结构。在细菌形态学检查时,由于细菌微小,且为无色半透明体,故需要用显微镜放大或经合适的染色后,才能较清楚地观察。而各种特殊结构则必须经相应的特殊染色后才可看到。根据细菌的形态、大小、排列方式、特殊结构和染色性,可对其进行鉴别。

1. 按上述方法用油浸镜观察细菌的基本形态特征,并注意其排列形式

- (1) 球菌 双球菌、链球菌和葡萄球菌。
- (2) 杆菌 球杆菌及呈链状排列的杆菌。
- (3) 螺形菌 弧菌与螺菌。

2. 用油浸镜观察下列细菌中的特殊结构

- (1) 荚膜(capsule) 注意菌体形态及荚膜着色特点。
- (2) 芽胞(spore) 注意芽胞在菌体中的位置及形状,芽胞直径与菌体的比例,着色情况以及有无游离芽胞。
- (3) 鞭毛(flagellum) 注意鞭毛的数量及位置。

(4) 异染颗粒(metachromatic granule) 旧称极体(又称迂回体):在菌体的一端或两端,与细菌其他部位染色不同。注意颗粒染色与菌体染色的区别,以及颗粒在菌体中



的位置。

3. 其他微生物形态的观察

- (1) 真菌(fungi) 注意菌丝与孢子的形态及位置。
- (2) 衣原体(chlamydiae) 注意包涵体的形态及位置。
- (3) 支原体(mycoplasma) 注意菌落的形态(像油煎荷包蛋样)。
- (4) 立克次体(rickettsiae) 注意染色和在细胞内的位置。
- (5) 螺旋体(spirochete) 注意螺旋的疏密及两端的形态。

【注意事项】

1) 镜检时,白天使用自然光源,夜间使用人工光源(毛玻璃电灯或日光灯)。用人工光源时要以蓝色玻片滤去黄色光线。

2) 不染色标本镜检时,用凹面反光镜,将光圈缩小或下降集光器,使用高倍镜检查。如用油浸镜检查,需要在标本上加盖玻片,然后加香柏油,要适当调节光圈或上升集光器,使视野中光线合适。镜检染色标本时,用平面反光镜如光源中有窗影时,则用凹面反光镜,上升集光器,打开光圈,滴加香柏油,用油镜检查。

3) 使用显微镜时,物镜最好用高倍(油镜),目镜最好用低倍放大,否则物像欠清晰。

4) 镜检时坐位须端正,胸背挺直,高低不适时,可旋转座凳来适当调节高度。

5) 镜检时应两眼同时睁开,用左眼看目镜,右眼看着纸张绘图,切忌一睁一闭,这样容易使眼疲劳。

6) 油镜头使用后应立即用擦镜纸拭净镜头上的油。擦镜头时,应顺其直径方向擦,不要转圈擦。

7) 显微镜是贵重精密仪器,使用时要精心爱护,不得随意拆散和碰撞,防止与强酸、强碱、乙醚、氯仿、酒精等化学药品接触。

【学生实验记录】

1) 请将显微镜下所见到的几种细菌形态及特殊结构绘于实验记录卡上(用彩色铅笔,按各自大小比例绘出,并注意镜检放大倍数)。

2) 记录油浸镜使用过程中应注意的问题。

(朱诗应)



实验二 细菌涂片标本的制备及简单染色法

【实验目的】

由于细菌微小而透明,在普通光学显微镜下不易识别,故必须进行染色,以增加反差。用显微镜检查细菌或其他微生物的形态结构时,通常是将被检查的材料制成涂抹标本,经过固定、染色后,再用显微镜查看。所以染色是细菌形态学检查法的一项基本技术。本实验是为了学习掌握制备涂片和染色的基本技术,因此必须认真操作,为今后微生物学操作和染色等实验技术打下基础。

(一) 涂抹标本的制备(preparation of smear)

【实验原理】

细菌是胶体性物质,检查时必须将它们固定在玻片上,经过轻烤脱水即易使菌体黏贴在玻片上,虽经随后染色、水洗等步骤也不易脱落。染色前必须将细菌固定,目的是杀死细菌,并使它黏附于玻片上,常用加热法,固定时应尽量使细菌维持原有形态,防止变形。

【实验材料】

载玻片(slide)、牙签(toothpick)、生理盐水(normal saline solution)、接种环(inoculating loop)、煤气灯(或酒精灯)(gas or alcohol lamp)、火柴(match)等。

【实验步骤】

1. 无菌取材法

1) 取材之前先将接种环的末端垂直在火焰中(图2-1A)烧红,随即倾斜接种环不断旋转通过火焰,逐步烧灼灭菌直至接种环的金属棒前半部。

2) 用右手小指和手掌拔去培养管棉花塞,在拔塞时,须将管口靠近火焰,拔塞后,则将管口通过火焰灭菌(图2-1B),随即将火焰灭菌而已冷却了的接种环插入管内挑取少量细菌培养物(图2-1C),然后再将管口通过火焰灭菌,塞好棉塞。

3) 将接种环上剩余菌在火焰中灭菌。灼烧接种环时,先将靠近环处的接种丝置火焰中烧灼,让热传导至接种环,以使圈上细菌被烤干后,再将接种环以垂直方向于火焰中烧红灭菌。当接种环上尚有细菌时,不宜直接先烧接种环,因为突然加热,易使圈上细菌团块爆碎四溅,有散布传染的危险。

2. 涂抹标本的制备

清拭玻片→涂片→干燥→固定

(1) 清拭玻片 取载玻片先在火焰上微微加热,随即用清洁纱布擦拭洁净,务必除去玻片面上的油脂。

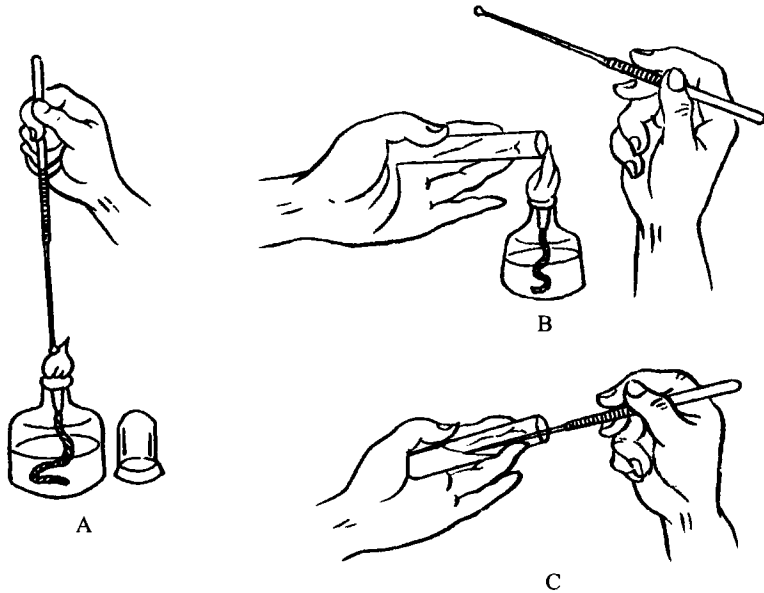


图 2-1 无菌取材的基本步骤

注 A. 接种环经火焰烧灼灭菌; B. 拔出棉塞, 管口通过火焰灭菌; C. 用接种环蘸取细菌培养物, 然后同 B 塞上棉塞。

(2) 取材涂片 用刚灭菌过的接种环, 挑取生理盐水一小滴放在载玻片中央, 再用牙签挑取少许牙垢混于盐水滴中, 均匀抹成薄膜, 薄膜的面积不超过 1 cm^2 , 然后将牙签弃入消毒液中。如用液体培养物涂片, 可直接取培养物涂于玻片上, 不加生理盐水。

(3) 干燥 标本涂抹完毕, 放在室温中待自然干燥。未干的涂片不宜加热烘烤, 以免造成细菌变形。

(4) 固定标本 取已干燥的涂片, 让涂抹面向上将玻片通过火焰来回 3~4 次, 可使细菌菌体脱水和蛋白质凝固, 而被黏贴固定于玻片上, 以免随后染色和水洗时被冲掉。玻片通过火焰时用一般速度即可, 不要停留过久, 以防将涂抹部物体烤焦。

(5) 涂抹标本制成后 可按所需要的方法进行染色, 然后再进行镜检。

(二) 简单染色法(simple staining method)

【实验原理】

细菌是无色透明的均质体, 不经染色, 用普通显微镜不易看出, 都需经染料着染后才能看清。染料有碱性、酸性及中性三类, 细菌染色通常都用碱性染料, 碱性染料离子带有阳电荷, 一般细菌在高于其等电点时皆带有阴电荷, 易与这类染料结合而被着染。此类染料有美蓝(methylene blue)、碱性复红(basic fuchsin)、结晶紫(crystal violet, 未完全甲基化者称为龙胆紫 gentianviolet)、硫堇(thionin)等等。另一类染料是酸性染料, 离子带有阴电荷, 不能使细菌着色, 例如伊红(eosin)、酸性复红(acid fuchsin)及孔雀绿



(malachite green)。第三类染料是中性染料,为带有阴离子及阳离子的混合物,是将酸性染料与碱染料混合而成,例如瑞氏染液(Wright's stain)及吉姆萨染液(Giemsa's stain)。可用于染色血液涂片中的细菌、螺旋体、立克次体及病毒包涵体等,在细菌简单染色中不用此染料。简单染色就是用单纯的一种染料进行染色,多数采用美蓝、结晶紫或稀释的石炭酸复红等碱性染料。此法仅能显示细菌的形态,而不能鉴别细菌。

【实验材料】

吕氏碱性美蓝液(Loeffler's alkaline methylene blue)、显微镜、香柏油等。

【实验步骤】

染色→水洗→干燥→镜检

(1) 染色 取美蓝染液滴在固定好的涂片面上,使染液盖满整个涂抹面为宜,静放3~5 min待其充分着染。

(2) 水冲 将涂片上的染液倒掉,用细缓的流水自玻片的一角轻轻冲去染液,然后用手挥动以甩去玻片上过多的水滴。

(3) 干燥 将载玻片在手中挥动或放在实验台上待其自然干燥。也可用滤纸吸干或放在火焰上高处微微加温以加速干燥。

(4) 镜检 待载玻片干燥后,在涂抹面上滴加香柏油一滴,然后按实验一中的(一)法用油浸镜仔细观察。

【注意事项】

1) 不可将被检材料溅撒至载玻片以外的地方,以防散播污染。

2) 载玻片要洁净无油,否则菌液涂不开,不宜选用厚载玻片。

3) 制备涂抹标本时,涂片要匀而薄。被检物如果是纯菌材料或菌数过多时,只需挑取极微量材料混在一滴生理盐水或蒸馏水中涂匀即可。若取菌量过多,则很多细菌堆积,不利镜下观察辨别。

4) 当涂片制成后,须经固定才可染色,否则细菌会被染液及水冲时冲脱。

5) 用水冲洗染液时水流不可过急,用细缓的流水自玻片的一角轻轻冲去染液,以防止被检材料飞溅。

【学生实验记录】

1) 将上述染色镜检的结果绘于实验记录卡上,绘图时要选择有代表性的细菌,并注明染色方法和放大倍数。

2) 说明涂片中细菌均染成蓝色的原因,并解释简单染色法的局限性。

(朱诗应)

