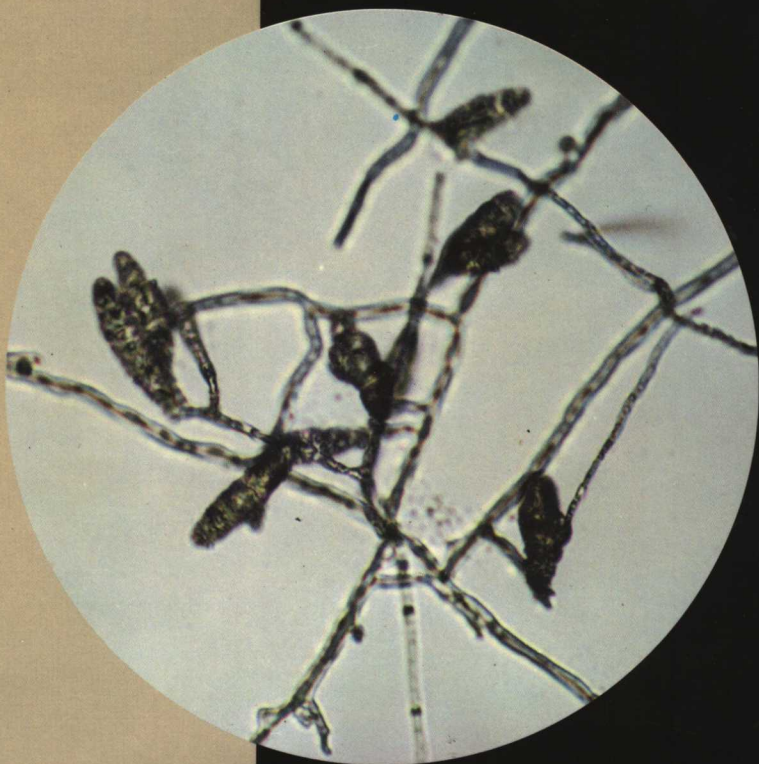


医学 微生物学 实验指导

Laboratory
Manual For
Medical
Microbiology

●王传恩 主编

●中山大学出版社



医学微生物学 实验指导

主编 王传恩

主审 江丽芳 区芝白

编者 (以姓氏笔画为序)

王传恩 陈 元 邵 焰

周俊梅 晏辉钧 陶剑平

黄俊琪 梁 瑜

中山大学出版社

广 州

内 容 简 介

本书是医学院校实验教材,可供医学院校开设医学微生物学实验课选用。全书由实验和附录两大部分组成。内容包括医学微生物学实验的原理和基本方法,细菌、真菌和病毒等的系统检验,各类临床标本的细菌学检查,临床微生物学教学讨论和自学参考病例及医学微生物学英文词汇等。本书适用于医学本科及专科各专业实验教学使用,亦可供研究生教学时参考。

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/王传恩主编. —广州:中山大学出版社,
2002.4

ISBN 7-306-01914-7

I. 医… II. 王… III. 医药学:微生物学-实验-高等学校-教材 IV. R37.33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 010639 号

中山大学出版社出版发行

(地址:广州市新港西路 135 号 邮编:510275)

电话:020-84111998; 84037215)

广东新华发行集团股份有限公司经销

广州市番禺区市桥印刷厂印刷

(地址:番禺区市桥环城西路 201 号 邮编:511400 电话:020-84881937)

787 毫米×1092 毫米 16 开本 9.25 印张 214 千字

2002 年 4 月第 1 版 2002 年 4 月第 1 次印刷

印数:1~3 000 定价:15.00 元

如发现因印装质量问题影响阅读,请与承印厂联系调换

前 言

根据学科发展和教学改革研究,为适应目前医学微生物学教学工作的需要,我们在原有的基础上组织中青年教师重新编写了这本《医学微生物学实验指导》教材。

本书主要由实验和附录两大部分内容组成。实验部分共包括 28 项实验,每个实验包括实验目的、原理、材料、方法、结果及注意事项等条目。重点突出了医学微生物学实验中的基本操作、基本技能和基础理论。所列实验除部分可供选择以外,在大多院校实验室都有条件做到。附录部分由各类临床标本的细菌学检查、临床微生物学教学讨论病例、临床微生物学自学参考病例和医学微生物学英文词汇等四个附录组成。

本书适用于医学本科及专科各专业实验教学使用,亦可供研究生教学时参考。

本书细菌学实验主要由陈元、陶剑平、晏辉钧、黄俊琪老师编写;病原性螺旋体和病原性真菌实验主要由周俊梅老师编写;病毒学实验主要由王传恩老师编写;附录一主要由陈元和邵焰老师编写,附录二和附录四主要由王传恩和晏辉钧老师编写,附录三主要由周俊梅和梁瑜老师编写。

限于编者水平,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

2002 年 1 月

目 录

医学微生物学实验室规则·····	(1)
医学微生物学实验目的和要求·····	(2)
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 革兰染色法 ·····	(10)
实验四 细菌的代谢产物 ·····	(12)
实验五 物理、化学因素对细菌的影响 ·····	(18)
实验六 生物因素对细菌的影响 ·····	(22)
实验七 细菌的耐药性变异 ·····	(30)
实验八 溶菌酶试验 ·····	(32)
实验九 吞噬作用 ·····	(33)
实验十 内毒素测定——鲎试验 ·····	(34)
实验十一 外毒素的毒性作用及其抗毒素的中和作用 ·····	(36)
实验十二 病原性球菌 ·····	(38)
实验十三 肠杆菌科 ·····	(41)
实验十四 厌氧性细菌 ·····	(52)
实验十五 白喉棒状杆菌 ·····	(56)
实验十六 分枝杆菌 ·····	(59)
实验十七 立克次体 ·····	(62)
实验十八 衣原体和支原体 ·····	(63)
实验十九 病原性螺旋体 ·····	(70)
实验二十 病原性真菌 ·····	(73)
实验二十一 病毒包涵体的观察 ·····	(77)
实验二十二 病毒的分离培养与鉴定 ·····	(78)
实验二十三 病毒的血清学试验 ·····	(84)
实验二十四 轮状病毒感染的快速诊断 ·····	(87)
实验二十五 间接免疫荧光法检测病毒抗原 ·····	(88)
实验二十六 抗 HIV-I 抗体的检测 ·····	(89)
实验二十七 病毒蛋白多肽成分的检测——SDS-PAGE 检测 HBV 多肽成分·····	(91)

实验二十八 核酸分子杂交技术——斑点杂交法检测 HBV DNA	(94)
附录一 各种临床标本的细菌学检查	(97)
附录二 临床微生物学教学讨论病例.....	(115)
附录三 临床微生物学自学参考病例.....	(118)
附录四 医学微生物学英文词汇表.....	(136)

医学微生物学

实验室规则

医学微生物学实验的对象是致病微生物，有传染的危险性，因此，进入实验室必须提高警惕性，严格遵守下列规则，以防招致感染或将病原微生物传给他人。

一、进入实验室必须穿工作衣（白大衣），不必需的物品勿携入室内。

二、实验室内应保持安静和良好秩序，实验时要严肃认真。

三、实验室内严禁吸烟和饮食。

四、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 2% 来苏水处理半小时，然后洗净。

五、如有传染性材料污染手上，应将手浸泡在 0.05%~0.1% 新洁尔灭中 5~10 分钟，然后用自来水冲洗。

六、用过的沾有传染性材料的吸管、毛细吸管、玻片等要放入来苏缸内。

七、实验过程，必须爱护仪器及节约材料。如有破损应报告老师，并在登记本上登记。

八、实验完毕，需孵育的培养物放入指定的温箱，待废弃的培养物则集中送至指定地点，统一消毒处理。桌面用来苏水清拭。

九、离开实验室前，用 0.05%~0.1% 新洁尔灭浸手，并用肥皂洗手，脱去工作衣并反摺好。关好水、电、门窗，方可离开实验室。

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、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（包括多媒体、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：

一、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。

二、每次实验课前应做好预习，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，避免在实验中出现差错及事故。

三、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。

四、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。

五、注意安全，严防发生各类事故。实验完毕，应整理好实验桌面，搞好实验室清洁卫生。

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，熟悉油镜的使用原理和正确的使用方法。
2. 熟悉细菌的基本形态与特殊结构。

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一套。

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：

破伤风梭菌、肺炎链球菌、伤寒沙门菌。

方 法

见油镜使用法。

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。

附：显微镜的使用

原 理

细菌个体微小，肉眼不能看到，必须借助普通显微镜之油镜（图 1-1），将其放大 1000 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。

油镜的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，结果视野很暗，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)。

使用方法

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；刻有“III”或 Oil 等，其入光孔径也较其它物镜小。

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) 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。

(3) 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。

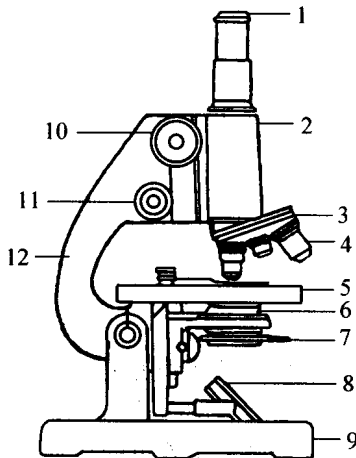


图 1-1 光学显微镜的构造

1. 目镜；2. 镜筒；3. 物镜转换器；4. 物镜；5. 载物台；6. 聚光器；7. 可变光阑；8. 反光镜；9. 镜座；10. 粗调节螺旋；11. 细调节螺旋；12. 镜臂

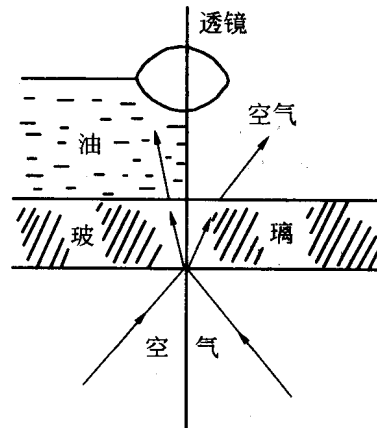


图 1-2 油镜原理示意图

(4) 将标本固定在载物台上，先把低倍镜调至视野最亮，并找到标本视野的适当位置，然后换用油镜。

(5) 先在玻片上滴香柏油 1 滴，用眼从侧方看着物镜，缓慢转动粗调节器，使物镜头浸于镜油内，并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，仔细转动粗调节器，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，可在拭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。注意在用擦镜纸擦拭时，要求顺一个方向旋转擦，不能两个方向来回擦。

2. 使用显微镜时要精心保护，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. 不用时，将物镜转开呈“八”字型，使其不正对集光器，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。

原理

接种细菌，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→候冷→沾取细菌或标本→进行接种→环灭菌等。

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. 其它：接种环、接种针。

步骤和方法

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。

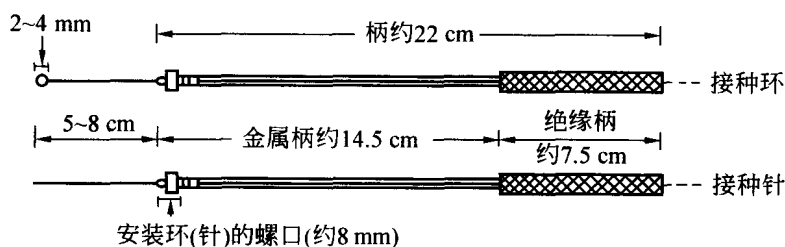


图 2-1 接种环和接种针结构

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、液体培养基的细菌接种。

2. 接种环境

为避免接种过程中标本中的细菌污染环境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

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：将接种环火焰灭菌，待冷却后取标本或大肠埃希菌少许；左手持起平板，五指固定皿盖边缘，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 5~6 cm；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，将平板扣入皿盖并作好标记，置 37°C 孵育 18~24 h 观察结果。

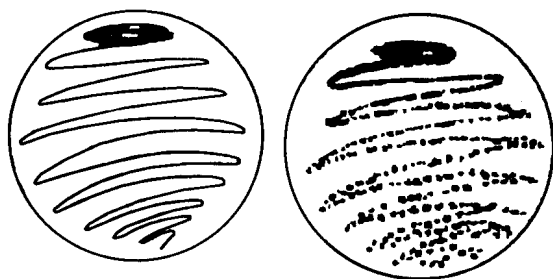


图 2-2 连续划线分离法（左）及培养后菌落分布（右）

2) 分区划线分离法：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 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前一区，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）。其操作要领同曲线划线分离法。

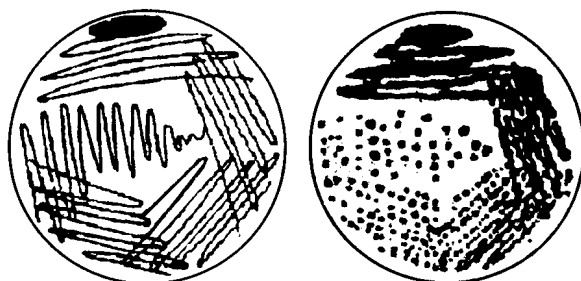


图 2-3 分区划线分离法（左）及孵育后菌落（右）

(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 18~24 h，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 18~24 h，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。

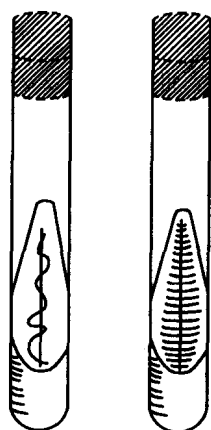


图 2-4 琼脂斜面接种法（左）及培养后菌落分布（右）

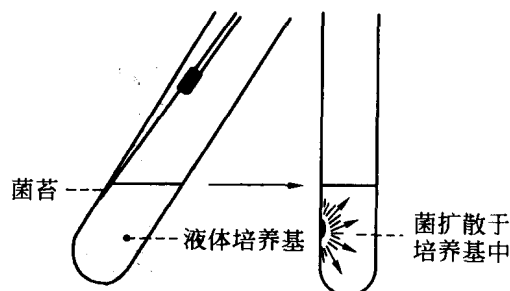


图 2-5 液体培养基接种法

（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和痢疾志贺菌培养物，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。

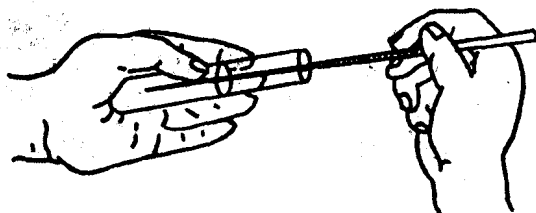


图 2-6 半固体培养基穿刺接种法

(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 ℃ 18~24 h 孵育后计数菌落，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，在培养基平板上按三个方向涂布 3 次，最后沿平板边缘环涂一周。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 ℃ 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。

实验三 革兰染色法

(Gram's Stain)

目的要求

1. 掌握革兰染色法及其意义。
2. 熟悉细菌涂片的制备。

原理

1. 革兰阳性菌细胞壁结构较致密，肽聚糖层厚，脂质含量少，乙醇不易透入；革兰阴性菌细胞壁结构疏松，肽聚糖层薄，含大量脂质，乙醇易渗入。

2. 革兰阳性菌等电点 (pI 2~3) 比革兰阴性菌 (pI 4~5) 低，在相同 pH 条件下，革兰阳性菌所带负电荷比革兰阴性菌多，故与带正电荷的结晶紫染料结合较牢固，不易脱色。

3. 革兰阳性菌菌体含大量核糖核酸镁盐，可与碘、结晶紫牢固结合，使已着色的细菌不被乙醇脱色；革兰阴性菌体含核糖核酸镁盐很少，故易被脱色。

器材和试剂

1. 菌种：葡萄球菌、大肠埃希菌的液体或琼脂斜面培养物。
2. 试剂：革兰染液（结晶紫染液、革兰碘液、95%酒精、稀释复红）、生理盐水。
3. 其它：载玻片。

步骤和方法

1. 涂片制备

(1) 涂片：取一张洁净载玻片，将大肠埃希菌液体培养物直接涂布于载玻片，或先在载玻片上放置一接种环生理盐水，再取固体培养基上少许葡萄球菌与生理盐水磨匀，涂成 1 cm×1 cm 大小的区域，取菌量不可太多，使盐水磨成灰白色为宜。

(2) 干燥：涂片最好在室温下自然干燥，或将标本片接种面向上，置酒精灯火焰高处慢慢烘干，切不可放在火焰上烧干。

(3) 固定：干燥后的标本片迅速通过火焰 3 次，这样既可杀菌，又能将细菌固定在玻片上，以免玻片上的细菌在染色过程中被水冲洗掉。

2. 革兰染色

(1) 初染：滴加结晶紫 2~3 滴于涂布细菌处，染色 1 min 后用细流水冲洗，甩干。

(2) 媒染：滴加碘液数滴，染色 1 min 后用细流水冲洗，甩干。

(3) 脱色：滴加 95% 乙醇数滴，轻轻晃动玻片，使玻片上流下的乙醇液无紫色为止，大约 30 s 左右（灵活掌握时间），用流水冲洗，甩干。

(4) 复染：滴加稀释复红液数滴，染色 1 min，用流水冲洗，甩干。

待标本片自然干燥或用吸水纸吸干后，在涂菌处滴加一滴香柏油，然后用油镜观察。

结 果

葡萄球菌染成紫色，为革兰阳性菌，呈葡萄状排列的球菌；大肠埃希菌染成红色，为革兰阴性菌，单个散在分布的杆菌。

注意事项

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。