

高等医学院校实验教程

病原生物学 实验教程

主编 马淑霞 沈晓玲 刘伯阳



北京大学医学出版社

普通高等教育“十一五”国家级规划教材

病原生物学

实验教程

主编 李树德 副主编 李树德 李树德



人民卫生出版社

高等医学院校基础课实验教材

病原生物学实验教程

主 编 马淑霞 沈晓玲 刘伯阳

副主编 周晓茵 王海河

编 委 (以姓氏拼音排序)

蔡连顺 (佳木斯大学)

李 霞 (牡丹江医学院)

吕丽艳 (齐齐哈尔医学院)

木 兰 (内蒙古医学院)

陈 光 (佳木斯大学)

刘伯阳 (齐齐哈尔医学院)

马淑霞 (佳木斯大学)

沈晓玲 (内蒙古医学院)

北京大学医学出版社

BINGYUAN SHENGWUXUE SHIYAN JIAOCHENG

图书在版编目 (CIP) 数据

病原生物学实验教程/马淑霞, 沈晓玲, 刘伯阳主
编. —北京: 北京大学医学出版社, 2010. 8
ISBN 978-7-81116-959-1

I. ①医… II. ①马…②沈…③刘… III. ①病原微
生物—实验—医学院校—教材 IV. ①R37—33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 130594 号

病原生物学实验教程

主 编: 马淑霞 沈晓玲 刘伯阳

出版发行: 北京大学医学出版社 (电话: 010-82802230)

地 址: (100191) 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内

网 址: <http://www.pumpress.com.cn>

E-mail: booksale@bjmu.edu.cn

印 刷: 北京朝阳新艺印刷有限公司

经 销: 新华书店

责任编辑: 许 立 责任校对: 金彤文 责任印制: 张京生

开 本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 9.75 字数: 241 千字

版 次: 2010 年 8 月第 1 版 2010 年 8 月第 1 次印刷 印数: 1—8000 册

书 号: ISBN 978-7-81116-959-1

定 价: 17.00 元

版权所有, 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

高等医学院校实验教程编审委员会

主任委员 程伯基

副主任委员 (按姓氏拼音排序)

崔光成 关利新 乔远东 魏晓东 毅 和

委 员 (按姓氏拼音排序)

卜晓波	陈志伟	李艳君	梁 军	林雪松
刘 星	刘伯阳	刘东璞	刘文忠	马淑霞
马小茹	欧 芹	沈晓玲	宋印利	孙宏丽
田国忠	新 燕	云长海	张 涛	张晓莉
张振涛	朱金玲			

前 言

医学微生物学与人体寄生虫学是十分重要的医学基础课，实验课是其必要的教学环节，它有助于学生对基本理论、基本知识和基本技能的掌握。

为适应我国高等医学教育改革和发展的需要，全面贯彻落实科学发展观，培养符合时代要求的医学专业人才，由齐齐哈尔医学院、牡丹江医学院、佳木斯大学、哈尔滨医科大学大庆校区和内蒙古医学院五所院校联合编写了《病原生物学实验教程》。我们根据临床医学五年制教学大纲的要求，在保证教学质量的前提下，精选必要的经典实验，摒弃一些陈旧的、低层次重复的实验内容，并适当介绍一些与现代分子医学相关的实验方法和技术，体现出当今医学实验技术的发展水平和方向。

本实验教程分为两篇，第一篇为医学微生物学实验；第二篇为人体寄生虫学实验。

本书可供医学院校本、专科学生使用，亦可供临床医师、医学检验、卫生防疫以及从事医学微生物学与人体寄生虫学专业的教师和研究人员参考。

由于编者水平有限，内容难免存在不足之处，希望得到广大师生的批评指正，以便修改完善。

马淑霞

2010年4月29日

实验室规则

医学微生物学与寄生虫学的实验对象主要是病原微生物、寄生虫，有传染的可能性。为了自身安全，要求同学们进入实验室必须严格遵守以下规则：

1. 进入实验室必须穿白大衣，必要时要戴帽子和口罩，按规定座位坐好。实验课进行后，不得随意进出。
2. 除必要的书籍和文具外，其他个人物品一律不准带入实验室。
3. 保持室内安静，严禁在实验室饮食、吸烟。
4. 严格按实验指导要求进行无菌操作，不得擅自移动示教标本和室内仪器设备。
5. 爱护实验设备，节约使用实验材料。如有损坏，应立即向老师报告。
6. 实验用过的器材，必须放在指定地点或按要求处理，不能随便乱丢乱放。需培养的物品按要求放入培养箱。酒精灯必须用火柴点燃，不可互相对点。
7. 实验中如发生割破手指、菌液吸入口中、实验材料污染桌面或衣服等情况，应立即报告老师及时处理。
8. 实验完毕，整理实验台。值日生搞好室内卫生，保持室内整齐。离开实验室前，关好门、窗、水、电，用消毒液泡手或肥皂水洗手。

目 录

实验室规则

第一篇 医学微生物学实验

第一章 细菌形态学检测法	1
实验一 油镜头的使用	1
实验二 细菌形态结构的观察	3
实验三 细菌的运动观察	4
实验四 细菌分布	5
第二章 细菌的人工培养	7
实验一 常用培养基的制备	7
实验二 细菌的培养和细菌生长状态观察	10
第三章 细菌染色法	13
实验一 常用的细菌染色法	13
第四章 细菌的生化鉴定法	18
实验一 常用的细菌生化反应试验	18
第五章 外界因素对细菌的影响	24
实验一 物理因素对细菌的影响	24
实验二 化学因素对细菌的影响	29
实验三 细菌对药物的敏感性与耐药性试验	31
第六章 细菌毒力的测定	34
实验一 细菌毒素测定	34
第七章 病原性球菌	36
实验一 脓液中化脓性球菌的分离鉴定	36
实验二 抗链球菌溶血素“O”试验	41
第八章 肠道杆菌的分离与鉴定	43
实验一 粪便标本中致病性肠道杆菌的分离鉴定	43
实验二 肥达反应	46
第九章 其他细菌的微生物学检测	49
实验一 厌氧菌的分离培养及微生物学检测	49
实验二 结核分枝杆菌的检查法	54
第十章 其他微生物的检测	59
实验一 螺旋体、支原体、衣原体、立克次体的检测	59
第十一章 病毒学实验	64
实验一 病毒的分离培养	64

实验二	病毒的血凝试验与血凝抑制试验	69
第十二章	真菌的微生物学检查	73
实验一	真菌形态结构观察	73
实验二	真菌培养方法	75
第十三章	分子微生物学实验	78
实验一	PCR 法检测乙型肝炎病毒	78
实验二	免疫印迹法检测 HIV 特异抗体	79

第二篇 人体寄生虫学实验

第一章	蠕虫	82
实验一	华支睾吸虫	84
实验二	布氏姜片吸虫	87
实验三	卫氏并殖吸虫	88
实验四	斯氏狸殖吸虫	90
实验五	日本血吸虫	90
实验六	链状带绦虫	93
实验七	肥胖带绦虫	97
实验八	微小膜壳绦虫	99
实验九	细粒棘球绦虫	100
实验十	曼氏迭宫绦虫	101
实验十一	似蚓蛔线虫	102
实验十二	十二指肠钩口线虫和美洲板口线虫	105
实验十三	蠕形住肠线虫	108
实验十四	毛首鞭形线虫	110
实验十五	马来布鲁线虫、班氏吴策线虫	111
实验十六	旋毛形线虫	113
第二章	原虫	115
实验一	溶组织内阿米巴	116
实验二	结肠内阿米巴	117
实验三	蓝氏贾第鞭毛虫	118
实验四	阴道毛滴虫	119
实验五	杜氏利什曼原虫	120
实验六	隐孢子虫	121
实验七	刚地弓形虫	121
实验八	肺孢子菌	122
实验九	疟原虫	123
实验十	结肠小袋纤毛虫	128
第三章	医学昆虫	129
实验一	蚊	129

实验二 蝇·····	131
实验三 白蛉·····	132
实验四 蚤·····	133
实验五 虱子·····	134
实验六 蜚蠊·····	135
实验七 臭虫·····	136
实验八 蜱·····	137
实验九 螨·····	138
第四章 常见人体寄生虫感染的实验诊断技术·····	140
病原检查·····	140
免疫诊断技术·····	141
肠道寄生虫病检验技术·····	141
主要参考文献·····	143

第一篇 医学微生物学实验

第一章 细菌形态学检测法

细菌属于原核细胞型微生物。细菌的结构简单，具有细胞壁，原始核质，以二分裂方式繁殖，对抗生素等药物敏感。细菌体积微小，且无色透明，肉眼无法直接观察，必须借助于显微镜和适当的染色才能观察到。对细菌形态进行观察是认识细菌的第一步。

实验一 油镜头的使用

利用普通光学显微镜的油镜头可以对细菌的大小、形态、排列、结构、动力和染色性等形态特点进行观察。熟练掌握油镜头的使用，是微生物学实验的一项基本技能。

【实验目的】

1. 掌握油镜头的使用方法；
2. 熟悉油镜头的原理；
3. 了解实验注意事项。

【实验原理】

显微镜使用过程中，当光线从载玻片经过空气进入镜头时，由于玻璃的折射率（1.52）和空气的折射率（1.0）相差较大，造成光线分散，进入物镜中的光线太少，视野发暗，物像不清晰。在载玻片上加香柏油后，由于香柏油折射率（1.515）和玻璃折射率（1.52）数值接近，所以大大减少光线散射，增加视野亮度，从而获得清晰物像（图 1-1）。

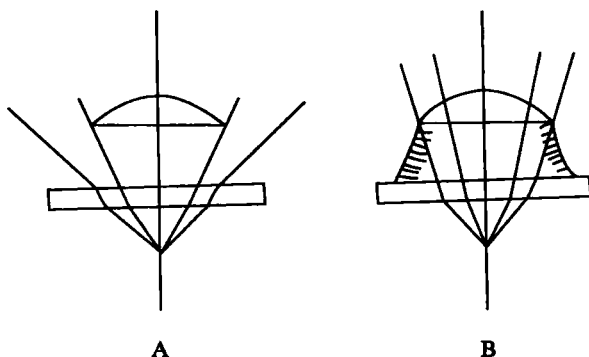


图 1-1 油镜头的原理
A. 介质为空气 B. 介质为香柏油时光线通过图

显微镜的构造分为机械部分和光学部分（图 1-2）。

1. 机械部分

镜臂：呈圆弧形位于镜筒的后方。

载物台：在镜筒下方，用以安放被检物。

调节手轮：分粗细两种，粗调手轮可以使载物台大距离升降，细调节手轮可以精确地调节距离。

载物台调节手轮：分为横向调节和纵向调节两种，可使载物台作相应移动。

聚光镜升降调节手轮：可调节聚光镜上下移动。

2. 光学部分

物镜：由几块透镜组成，在镜头下端接近被检物体，分为低倍镜、高倍镜和油镜。

目镜：装在镜筒上端，为眼睛观察的部位。

聚光镜：位于载物台下方，由几块透镜组成，其高度可以上下自由调节，它的位置影响图像的清晰度和光线的强度。

集光镜：电光源发出光线由此穿出。

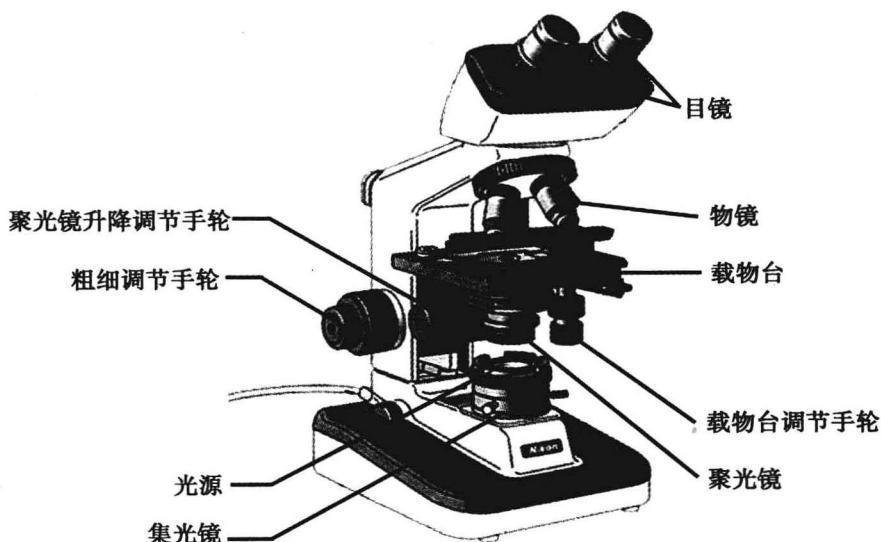


图 1-2 显微镜的构造

【仪器和药品】

标本片、香柏油、二甲苯、擦镜纸。

【实验方法】

1. 油镜头的识别：显微镜往往带有几个不同放大倍数的物镜头，其中油镜头具有以下特点：

- (1) 标有白色线圈；
- (2) 标有“HI”或“oil”等标志；
- (3) 标有 $100\times$ 字样；
- (4) 油镜头孔径比其他物镜要小。

2. 油镜头的使用:

- (1) 将显微镜平放实验台上;
- (2) 插上电源, 打开光源开关;
- (3) 将聚光镜升到最高位置, 光栏调节杆完全打开;
- (4) 将标本片用玻片夹固定在载物台上, 并使标本片染色较深的菌膜位于光线中央;
- (5) 取香柏油 1 滴, 滴在标本片中央, 转动转换器, 将油镜头摆正;
- (6) 用眼睛从侧面看准油镜头, 调节粗调节手轮使载物台缓缓上移, 使油镜头浸入油滴内, 但勿接触玻片, 以免损坏镜头和标本片;
- (7) 然后在目镜下观察, 调节粗调节手轮使载物台缓缓下移, 至看到模糊物像时, 再改用细调节手轮, 使物像变清晰, 注意下调载物台的过程中不可使油镜头与油滴脱离开;
- (8) 假如未能看到物像, 重复上述 (6)、(7) 操作, 注意要将动作放缓;
- (9) 用毕后, 将载物台下移, 用擦镜纸蘸取少许二甲苯沿一个方向擦去镜头上的镜油, 随即用干的擦镜纸擦去二甲苯, 以防腐蚀透镜;
- (10) 取下标本片, 用擦镜纸擦去镜油, 关闭显微镜电源。

3. 显微镜的保护:

- (1) 显微镜使用完毕后, 将物镜转开, 并降下载物台;
- (2) 不用时, 将罩子套好, 避免受潮和日光直射;
- (3) 搬动时避免磕碰, 不得随意拆卸显微镜部件, 同时要防止实验中使用的化学物质(强酸、强碱、乙醚、氯仿等)沾到显微镜上造成腐蚀。

【注意事项】

1. 使用油镜头时, 油镜头必须浸泡在油滴里才能观察到物像。
2. 在用目镜观察时, 切忌上调载物台, 防止压碎标本片, 损毁油镜头。

【思考题】

油镜头使用的要点是什么?

(卢 莎 沈晓玲)

实验二 细菌形态结构的观察

细菌基本形态有球形、杆形、螺形三种类型, 分别称为球菌、杆菌、螺形菌。细菌除了具有细胞壁、细胞膜、细胞质、核质等基本结构外, 某些细菌还具有特殊结构比如芽胞、鞭毛、荚膜, 这些结构只有通过特殊染色才能观察到。细菌的菌毛异常的纤细短小, 在光学显微镜下无法观察, 只能通过电镜观察。

【实验目的】

1. 掌握细菌基本形态;
2. 熟悉细菌特殊结构。

【仪器和药品】

油镜头、香柏油、二甲苯、擦镜纸、标本片。

【实验方法】

1. 用油镜头逐一观察标本片。

2. 细菌基本形态标本片注意观察细菌的形态、大小、排列规律及革兰染色性。

3. 荚膜标本片采用荚膜染色法, 观察时尽量找到染色较浅、菌体较少的视野来观察。

4. 鞭毛标本片采用鞭毛染色法, 染料在菌体及鞭毛上沉着, 使菌体及鞭毛直径增加并着色, 利于观察。注意观察鞭毛的分布, 是单鞭毛、丛鞭毛、还是周鞭毛, 以及鞭毛的形态和长短。尽量选择散在的单个杆菌的视野来观察。

5. 芽胞标本片采用芽胞染色法。芽胞的特点是难以着色, 而一旦着色后又难以脱色, 所有的芽胞染色法都是根据这一特点设计的。染色时, 选用着色力强的染料并且微微加热, 以促进芽胞着色; 水洗脱色, 芽胞染上的颜色难以渗出, 而菌体会脱色。然后用对比度强的染料对菌体复染, 使菌体和芽胞呈现出不同的颜色, 便于观察。选择有单个菌体的视野观察, 注意观察芽胞的形态、大小和位置。此外, 也可采用简单染色法使菌体着色而芽胞不着色(芽胞呈无色透明状)进行观察。

6. 将观察到的结果在报告本上绘图, 并加以说明。

【注意事项】

1. 绘图时要真实体现镜下细菌大小, 标记细菌名称及放大倍数。

2. 细菌基本形态严格按照革兰染色后的颜色来画, 革兰阴性菌为红色, 革兰阳性菌为蓝紫色。

3. 体现细菌的自然分布特点, 不可随意对细菌进行排列。

4. 特殊结构尽量用单个菌体来体现。

【思考题】

1. 细菌的实际大小和镜下大小分别是多少?

2. 细菌的特殊结构与其致病性有何关系?

(卢 莎 沈晓玲)

实验三 细菌的运动观察

少数球菌、半数以上的杆菌、几乎所有的弧菌和螺菌都具有鞭毛。有鞭毛的细菌具有运动性, 没有鞭毛的细菌, 只能呈现位移不大的颤动。因此能否运动是某些细菌的特征之一, 可以帮助鉴别细菌。

检查细菌有无动力的方法有: 暗视野显微镜法、悬滴法、压滴法、半固体培养基法等。

【实验目的】

1. 掌握悬滴法观察细菌运动的基本技术;

2. 学会在显微镜下识别细菌的运动性和非运动性。

【实验原理】

悬滴法就是将菌液滴加在洁净的盖玻片中央, 然后将它倒盖在有凹槽的载玻片中央, 即可放置在普通光学显微镜下观察。

【仪器和药品】

1. 菌种: 枯草杆菌、葡萄球菌 8~12h 肉汤培养物。

2. 其他: 显微镜、香柏油、二甲苯、凡士林、凹玻片、盖玻片、镊子、接种环、擦镜纸。

【实验方法】

1. 取洁净凹玻片一张，在凹槽四周涂少量凡士林。
2. 取一接种环的枯草杆菌或葡萄球菌肉汤培养物放置盖玻片中央，并用记号笔在菌液的边缘做一记号，以便在显微镜观察时，易于寻找菌液的位置。
3. 将凹玻片的凹槽对准盖玻片中央的菌液，并轻轻地盖在盖玻片上，使两者粘在一起，然后翻转凹玻片，使菌液正好悬在凹槽的中央，再用铅笔或火柴棒轻压盖玻片，使玻片四周边缘闭合，以防菌液干涸。
4. 镜检，先用低倍镜找到标记，再稍微移动凹玻片即可找到菌滴的边缘，然后将菌液移到视野中央换高倍镜观察。由于菌体是透明的，镜检时可适当缩小光圈或降低聚光器以增大反差，便于观察。镜检时要仔细辨别是细菌的运动还是分子运动（即布朗运动），前者在视野下可见细菌自一处游动至他处，而后者仅在原处左右摆动。细菌的运动速度依菌种不同而异，应仔细观察。

【实验观察】

有鞭毛的枯草杆菌可看到活跃的运动，可作直线、波浪式或翻滚运动，两个细菌之间出现明显的位移（注意与布朗运动或随水流动相区别），无鞭毛的葡萄球菌不运动。

【注意事项】

1. 有鞭毛的细菌在幼龄时具有较强的运动力，衰老的细胞鞭毛易脱落，故观察时宜选用幼龄菌体。
2. 检查细菌运动的凹玻片和盖玻片都要洁净无油，否则将影响细菌的运动。
3. 若使用油镜头观察时，应在盖玻片上加香柏油一滴。

【思考题】

在悬滴法中，为什么要涂凡士林？为什么加的菌液不能太多？如果发现显微镜视野内大量细菌向一个方向流动，你认为是什么原因造成的？

（卢 莎 沈晓玲）

实验四 细菌分布

细菌分布极广，种类甚多。细菌广泛地分布于土壤、空气、水等自然界环境和人类、动物的体表及其与外界相通的腔道中。自然界中，微生物极少单独存在，各种不同的微生物种群与其周围的环境及寄生的宿主共同构成微生态系统。细菌在自然界物质循环上起重要作用，大多数是对人类有益的，少数对人类致病。了解细菌的分布情况，有助于正确理解细菌与人类的关系，充分利用细菌有益的一面，控制其不利的一面。

【实验目的】

1. 掌握验证空气、皮肤、饮用水有大量细菌存在的方法；
2. 树立严格的消毒灭菌及无菌观念；
3. 了解细菌的分布。

（一）空气中细菌的检查**【仪器和药品】**

普通琼脂平板。

【实验方法】

1. 选择实验室任何地点, 打开普通琼脂平皿盖, 暴露在空气中 5~10min, 任空气中的细菌随尘埃下沉, 落到培养基表面。

2. 盖上平皿盖, 在皿底注明班级, 组别, 放 37℃ 培养箱培养 18~24h, 观察结果。

【实验观察】

经培养后的琼脂平板表面有杂菌生长。

(二) 皮肤细菌的检查

【仪器和药品】

普通营养琼脂培养基、无菌生理盐水、无菌棉拭子。

【实验方法】

1. 每两人合用一个普通琼脂平板, 用记号笔在皿底分为四个区, 每人两个区, 标明 1、2 区, 并做好个人标记。

2. 以示指直接轻轻按压培养基 1 区表面 (切忌不可用力过大将琼脂压破)。

3. 用无菌棉拭子蘸无菌生理盐水, 擦拭额头或鼻尖部皮肤, 然后在培养基 2 区均匀涂抹。

4. 翻转培养皿使其底面朝上, 置培养箱 37℃ 培养 18~24h, 次日观察结果。

【实验观察】

取出培养后的琼脂平板, 观察是否有细菌生长及菌落的形态, 手部与面部细菌数量是否有差异。

(三) 饮用水中细菌检查

【仪器和药品】

普通营养琼脂培养基、无菌平皿、吸管、自来水。

【实验方法】

1. 用无菌吸管吸取 1ml 自来水, 置于空的无菌平皿中。

2. 将已进行高压蒸汽灭菌的普通营养琼脂培养基冷却至 50℃ 左右, 倒入盛有自来水的平皿当中, 将皿底紧贴桌面轻轻摇动, 使琼脂与水样混匀, 静置待凝。

3. 将培养皿翻转倒置, 置 37℃ 培养箱培养 18~24h 后观察结果。

【实验观察】

观察琼脂平板, 对菌落进行计数, 即为每毫升水样的菌落总数。

【思考题】

1. 了解细菌分布的特点对医疗实践工作有何意义?

2. 我国生活饮用水的卫生标准?

(卢 莎 沈晓玲)

第二章 细菌的人工培养

感染性疾病的诊断关键在于病原菌的分离与鉴定，人工培养法就是为细菌提供必要的环境条件，使其在体外生长繁殖。细菌培养时应选择适宜的培养基，以便提供特定细菌生长所需的必要条件。本实验的目的是了解基础培养基的主要成分和制作方法；掌握细菌在各种培养基上的接种方法；掌握细菌在各种培养基上生长情况的观察和描述方法。

实验一 常用培养基的制备

【实验目的】

1. 掌握常用培养基的配制方法；
2. 熟悉细菌生长繁殖所需条件；
3. 了解培养基的概念、种类和用途。

【实验原理】

培养基是用人工方法将多种微生物生长需要的营养物质配制成的营养基质。主要用于微生物的分离、培养、鉴定和菌种保存等方面。培养基的种类很多，按其用途可分为基础培养基、营养培养基、选择培养基、鉴别培养基、厌氧培养基等；按其物理性质可分为固体培养基、半固体培养基和液体培养基。不同种类的培养基一般都应含有微生物生长需要的碳源、氮源、能源、无机盐、生长因子和水等成分。在配置培养基时常加入指示剂以便观察微生物是否利用和分解培养基中的糖和醇类。此外，为了满足微生物生长繁殖的需要，还要控制培养基的 pH 值。其制备步骤大致是：按一定配方称量药品、溶解、修正 pH 值、过滤、分装在一一定的容器内、灭菌、检定和保存。

（一）称量药品

根据培养基配方依次准确称取各种药品，放入适当大小的烧杯中。蛋白胨极易吸潮，故称量时要迅速，先在烧杯中加入少量蒸馏水，再加蛋白胨等成分。

（二）溶解

用量筒取一定量（约占总量的 1/2）蒸馏水倒入烧杯中，加热，并用玻棒搅拌，以防液体溢出。待各种药品完全溶解后，停止加热，补足水分。

（三）修正 pH 值

培养基的 pH 值是细菌生长繁殖的重要条件，不同的培养基所需 pH 值不同，一般培养基 pH 值为 7.2~7.6。培养基经过高压灭菌后，pH 值减低 0.1~0.2，所以修正时应高出所需 pH 值 0.1~0.2。测定 pH 可用 pH 试纸或酸度计等。

（四）过滤、分装

培养基各成分经过溶解、修正 pH 值、加热煮沸后可形成不同程度的沉淀物，可以用滤纸或两层纱布夹一层薄薄的脱脂棉趁热进行过滤。过滤后立即进行分装。分装时注意不要使培养基沾染在管口或瓶口，以免浸湿棉塞，引起污染。培养基分装后用棉塞塞紧，再包上一层防潮纸，用棉绳系好。在包装纸上标明培养基名称，制备组别和姓名、日期等。