

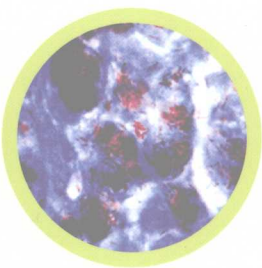
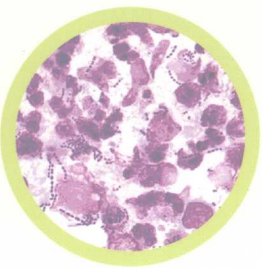
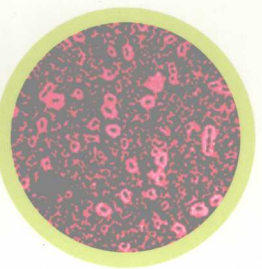
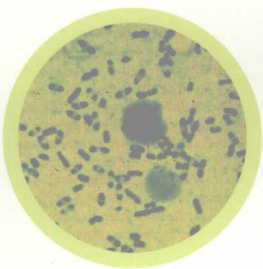
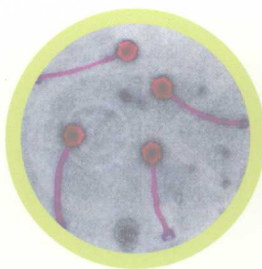
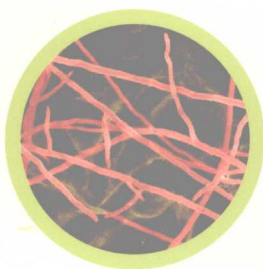
BINGYUANWEISHENGWUJING
JIANSHOUCE

病原微生物

镜检手册

► 主编 何建民 梅 玫

► 主审 姚 智



BINGYUANWEISHENGWUJINGJIANSHOUCE

病原微生物镜检手册

主 编 何建民 梅 玫

主 审 姚 智



天津科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

病原微生物镜检手册/何建民,梅玫主编. —天津:天津科学技术出版社,2008.5

ISBN 978-7-5308-4454-0

I.病… II.①何…②梅… III.病原微生物-显微术-手册
IV.R37-62

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 201533 号

策 划:袁向远

责任编辑:张 跃

责任印刷:王 莹

天津科学技术出版社出版

出版人:胡振泰

天津市西康路 35 号 邮编 300051

电话(022)23332393(发行部) 23332392(市场部) 27217980(邮购部)

网址:www.tjkjcs.com.cn

新华书店经销

廊坊市蓝菱印刷有限公司

开本 787×1092 1/16 印张 10 字数 207 000

2008 年 5 月第 1 版第 1 次印刷

定价 68.00 元

编者名单

主 编	何建民	梅 玫	
副主编	李晓眠	何莉娟	李 梅
	祁艳斌	陈 樱	
主 审	姚 智		

主编简介



何建民 天津医科大学微生物教研室高级实验师,理学学士,硕士研究生在学,其研究方向为分子病毒学。多年来一直从事医学微生物学科的实验教学及科研工作,独立主持校局级课题并参与国家自然科学基金等重大课题多项,并在国家级核心期刊发表论文近二十余篇,荣获天津市科学技术进步二等奖,并获得国家专利一项。

梅 玫 副研究员,医学硕士,天津大学博士在读,现任天津医科大学基础医学研究中心副主任,一直从事细胞分子生物学、形态学及肿瘤学的教学、科研工作。主持及参加多项国家自然科学基金课题、省部级重点科研项目等的研究,并获得多项省部级科技进步奖,获得国家专利两项,国家核心期刊发表数篇论文。



序 言

进入 20 世纪以来,科学技术得到了前所未有的发展,人类不断掌握了新的医学知识和新的防治手段,从而有效地预防、控制和消灭危害人类健康的传染病。至今,全球已成功地消灭了天花,脊髓灰质炎也即将被消灭,伤寒、痢疾、百日咳、白喉、破伤风和麻疹得到了有效控制。

随着经济社会的不断发展、东西方文化的交融,以及人类生活水平的改善和行为方式的改变,加之环境和气候的变化,人类感染性疾病的"病原谱"也发生了重大的变迁,一些原已被控制的传染病,如结核病等,又死灰复燃,重新对人类构成威胁;一些新现的传染病,如艾滋病、疯牛病(朊病毒感染)、埃波拉病毒、严重急性呼吸道综合征(SARS)和禽流感病毒感染等相继出现或被发现,给人类带来巨大的灾难和恐慌。病原生物学的主要研究内容包括各种病原生物的特性、与宿主及环境的相互关系、致病因素和致病机理、实验室诊断、疾病的传播和流行以及预防免疫和控制原则等。

推动这一学科的发展,并为基础医学、临床医疗和预防医学的科研、教学及疾病防治工作提供一个学术交流的园地,这既是学科发展的需要,也是疾病预防控制、国内外学术交流的需要,希望本书能在该领域对广大的读者起到积极、有益的帮助与借鉴作用。



2007.9

前 言

近年来,三十余种新现和再现的病原体如 SARS 病毒、禽流感病毒、疯牛病病毒、Nipah 病毒、猪链球菌等病原微生物的出现,严重威胁人类的生命安全及影响经济建设,而其多样性又主要表现在形态、结构基因组的组成及生物化学反应、致病特点等方面,其中相对稳定的是形态结构,因此形态结构可以作为鉴别病原体的辅助依据之一。特别在当今新的病原体不断出现,给人类健康带来严重的威胁,为有效控制其疾病的流行,快速确定某一病原体已成为诊断学家研究的重要内容。因此,学习和掌握相关微生物的特征,特别是形态结构的识别显得更为迫切和重要了。

本书是编者总结多年教学实践,借鉴了大量国内外微生物学文献,收集整理了与致病性相关的各类病原微生物的镜检结构图像并汇编成册,同时附有精准的概括性的文字说明,供同行和初学者参考,希望能起到“看图识字”的引路作用。本书体现了“全面、新颖、实用”的特点。

出版这本书的目的是期望为广大从事预防医学、传染病和动物防疫工作的同志提供一些相关的信息资料,协助识别某些致病因子,为及时准确地做出鉴定提供可靠的帮助。

在此衷心感谢姚智教授在百忙之中审阅稿件,天津泰达图书馆档案馆的何莉娟老师在生物信息资源方面提供无私帮助与支持。

由于编者水平和资料所限,书中难免有不妥之处,敬祈广大同行和读者指正。

何建民 梅 玫

于天津医科大学 2007.7



CONTENTS

第一章 显微镜应用技术	1
第一节 显微镜的种类与工作原理	1
一、普通光学显微镜	1
二、荧光显微镜	1
三、激光共聚焦扫描显微镜	2
四、暗视野显微镜	2
五、相差显微镜	2
六、倒置显微镜	3
七、电子显微镜	4
(一)透射电子显微镜(TEM)	4
(二)扫描电子显微镜(SEM)	4
(三)扫描隧道显微镜(STM)	5
第二节 普通光学显微镜的构造及使用保养	6
一、普通光学显微镜的结构	7
二、普通光学显微镜的使用方法	7
三、普通光学显微镜的保养	8
第三节 电子显微镜的使用与细胞超微结构观察	8
一、透射电镜样品超薄切片常规制作规程	8
二、扫描电镜样品常规制备规程	9
第二章 微生物的染色技术	10
第一节 细菌染色常用染料种类及选择	10
一、常用染料的性质	10
(一)酸性染料	11
(二)碱性染料	11
(三)中性(复合)染料	12
(四)单纯染料	12
第二节 细菌染色的原理	12

第三节 细菌染色的基本程序	13
第四节 常用染液及染色方法	15
(一)常用染液的酒精饱和液(原液)制备	15
(二)吕氏(Löffler)碱性美蓝染色法	15
(三)稀释复红染色法	15
(四)革兰(Gram)染色法	15
(五)萼一尼(Ziehl-Neelsen)抗酸染色法	16
(六)金永(Kinyoun)染色法	17
(七)金胺“O”染色	17
(八)奈瑟(Neisser)异染颗粒染色法	18
(九)细菌鞭毛染色法	18
(十)黑斯(Hiss)荚膜染色法	18
(十一)密尔(Miss)荚膜染色法	18
(十二)芽胞染色法	18
(十三)布氏菌科兹洛夫斯基染色	19
(十四)螺旋体甲苯胺蓝染色法	19
(十五)负染色法	19
 第三章 致病性细菌镜检	21
第一节 化脓性细菌	21
一、葡萄球菌属	21
二、A组链球菌	22
三、肺炎链球菌	24
四、脑膜炎奈瑟菌	24
五、淋病奈瑟菌	25
六、卡塔布兰汉菌	26
七、阴道加特耐菌	27
第二节 呼吸道感染细菌	28
一、结核分支杆菌	28
二、白喉棒状杆菌	30
三、麻风分枝杆菌	30
四、嗜肺军团菌	31
五、百日咳鲍特菌	32
六、流感嗜血杆菌	33
第三节 胃肠道感染细菌	34
一、大肠埃希菌属	34
二、志贺菌属	36
三、沙门菌属	37

四、变形杆菌属	39
五、空肠弯曲菌	40
六、幽门螺杆菌	40
七、霍乱弧菌	41
八、副溶血性弧菌	43
第四节 厌氧性细菌	43
一、破伤风梭菌	43
二、肉毒梭菌	45
三、产气荚膜梭菌	45
四、艰难梭菌	46
第五节 动物源性细菌	47
一、布鲁斯菌	47
二、鼠疫耶菌	48
三、炭疽芽胞杆菌	49
四、小肠结肠炎耶菌	50
第六节 其他细菌	51
一、气单胞菌	51
二、蜡样芽胞杆菌	52
三、李斯特菌	52
四、铜绿假单胞菌	53
第四章 放线菌	55
一、放线菌属	55
二、诺卡菌属	56
第五章 立克次体	57
一、贝纳柯斯体	57
二、斑疹伤寒立克次体	58
三、普氏立克次体	58
四、恙虫病立克次体	59
第六章 螺旋体	61
一、伯氏疏螺旋体	61
二、钩端螺旋体	62
三、回归热疏螺旋体	62
四、梅毒螺旋体	63
第七章 衣原体	65

一、肺炎衣原体	65
二、沙眼衣原体	66
三、鹦鹉热衣原体	67
第八章 支原体	68
一、肺炎支原体	68
二、溶脲脲原体	69
第九章 致病性真菌镜检	71
第一节 皮肤感染真菌	71
第二节 皮下组织感染真菌	74
第三节 深部感染真菌	76
第四节 条件致病性真菌	77
一、白假丝酵母菌	77
二、曲霉	79
三、毛霉	80
第十章 病毒镜检	82
第一节 呼吸道感染病毒	82
一、流感病毒	82
二、SARS冠状病毒	84
三、H ₅ N ₁ 型禽流感病毒	85
四、副流感病毒	86
五、腮腺炎病毒	87
六、麻疹病毒	88
七、呼吸道合胞病毒	89
八、腺病毒	90
九、风疹病毒	91
十、鼻病毒	91
十一、呼肠孤病毒	92
第二节 肠道感染病毒	93
一、柯萨奇病毒	93
二、新型肠道病毒	94
三、肠道腺病毒	94
四、埃可病毒	95
五、杯状病毒	96
六、星状病毒	96
七、脊髓灰质炎病毒	97

八、轮状病毒	99
第三节 肝炎病毒	100
一、甲型肝炎病毒	101
二、乙型肝炎病毒	102
三、丙型肝炎病毒	104
四、丁型肝炎病毒	105
五、戊型肝炎病毒	106
六、庚型肝炎病毒	107
第四节 虫媒病毒和出血热病毒	107
一、流行性乙型脑炎病毒	108
二、登革病毒	109
三、森林脑炎病毒	109
四、埃波拉病毒	110
五、汉坦病毒	111
六、新疆出血热病毒	112
第五节 人类疱疹病毒	113
一、单纯疱疹病毒	113
二、水痘—带状疱疹病毒	115
三、人巨细胞病毒	116
四、EB病毒	118
五、人疱疹病毒6型	119
六、人疱疹病毒7型	120
七、人疱疹病毒8型	121
八、人疱疹B病毒	122
第六节 逆转录病毒	122
一、人类免疫缺陷病毒	122
二、人类嗜T细胞病毒	124
第七节 其他病毒	125
一、狂犬病病毒	125
二、人乳头瘤病毒	126
三、水疱性口炎病毒	128
四、人类细小病毒B19	128
五、痘病毒	129
第八节 阮病毒	130
附录:病原微生物实验室生物安全管理条例	132
参考文献	143

第一章 显微镜应用技术

第一节 显微镜的种类与工作原理

显微镜是观察细胞的主要工具。根据光源不同,可分为光学显微镜和电子显微镜两大类。前者以可见光(紫外线显微镜为紫外光)为光源,后者则以电子束为光源。

一、普通光学显微镜

普通光学显微镜由3部分构成,即:①照明系统,包括光源和聚光器;②光学放大系统,由物镜和目镜组成,是显微镜的主体,为了消除球差和色差,目镜和物镜都由复杂的透镜构成;③机械装置,用于固定材料和观察方便。显微镜物像是否清楚不仅决定于放大倍数,还与显微镜的分辨力(resolution)有关,分辨力是指显微镜(或人的眼睛距目标25cm处)能分辨物体最小间隔的能力,分辨力的大小决定于光的波长和镜口率以及介质的折射率,用公式表示为: $R=0.61\lambda/N$ 。制作光学镜头所用的玻璃折射率为1.65~1.78,所用介质的折射率越接近玻璃的越好。对于干燥物镜来说,介质为空气,镜口率一般为0.05~0.95;油镜头用香柏油为介质,镜口率可接近1.5。普通光线的波长为400~700nm,因此显微镜分辨力数值不会小于 $0.2\mu\text{m}$,人眼的分辨力是0.2mm,所以一般显微镜设计的最大放大倍数通常为1 000X(图1-1)。

二、荧光显微镜

荧光显微镜是免疫荧光细胞化学的基本



图1-1 普通生物显微镜

工具。它是由光源、滤板系统和光学系统等主要部件组成。是利用一定波长的光激发标本发射荧光,通过物镜和目镜系统放大以观察标本的荧光图像。现在多采用200W的超高压汞灯作光源,它是用石英玻璃制作的,中间呈球形,内充一定数量的汞,工作时由两个电极间放电,引起水银蒸发,球内气压迅速升高,

当水银完全蒸发时,可达50~70atm (5056~7093kPa),这一过程一般需5~15min。超高压汞灯的发光是电极间放电使水银分子不断解离和还原过程中发射光量子的结果。它发射很强的紫外和蓝紫光,足以激发各类荧光物质,因此,为荧光显微镜普遍采用(图1-2)。



图1-2 荧光显微镜

三、激光共聚焦扫描显微境

激光共聚焦扫描显微镜是用激光作扫描光源,逐点、逐行、逐面快速扫描成像,扫描的激光与荧光收集共用一个物镜,物镜的焦点即扫描激光的聚焦点,也是瞬时成像的物点。由于激光束的波长较短,光束很细,所以共焦激光扫描显微镜有较高的分辨率,大约是普通光学显微镜的3倍。系统经一次调焦,扫描限制在样品的一个平面内。调焦深度不一样

时,就可以获得样品不同深度层次的图像,这些图像信息都储于计算机内,通过计算机分析和模拟,就能显示细胞样品的立体结构。激光共聚焦扫描显微镜既可以用于观察细胞形态,也可以用于细胞内生化成分的定量分析。它的主要特点是:①以激光作为光源。②采用共焦成像系统。③扫描、显示及记录系统。激光具有发散角小、方向性好的优点,光束通过聚焦后落在样品(如细胞等)的不同深度;在不同方向、不同深度的平面上进行聚焦扫描,从而得到一系列不同层次的清晰图像。平面间隔最小约600~800nm;利用微机图像合成系统可重建细胞的三维图像,可以更精确地检测、识别组织或细胞内的微细结构及其变化(图1-3)。

四、暗视野显微镜

暗视野显微镜的聚光镜中央有挡光片,使照明光线不直接进入物镜,只允许被标本反射和衍射的光线进入物镜,因而视野的背景是黑的,物体的边缘是亮的。利用这种显微镜能见到小至4~200nm的微粒子,分辨率比普通显微镜高50倍。其特点是该显微镜具有暗视野聚光器,使光线不直接进入物镜,故呈暗视野。该显微镜适用于观察细胞内微小颗粒,例如线粒体、细菌运动等(图1-4)。

五、相差显微镜

相差显微镜是一种将光线通过透明标本细节时所产生的光程差(即相位差)转化为光强差的特种显微镜。这种显微镜最大的特点是可以观察未经染色的标本和活细胞。其基本原理是,把透过标本的可见光的光程差变成振幅差,从而提高了各种结构间的对比度,使各种结构变得清晰可见。光线透过标本后发生折射,偏离了原来的光路,同时被延迟了 $1/4\lambda$ (波长),如果再增加或减少 $1/4\lambda$,则光程差变为 $1/2\lambda$,两束光合轴后干涉加强,振幅增

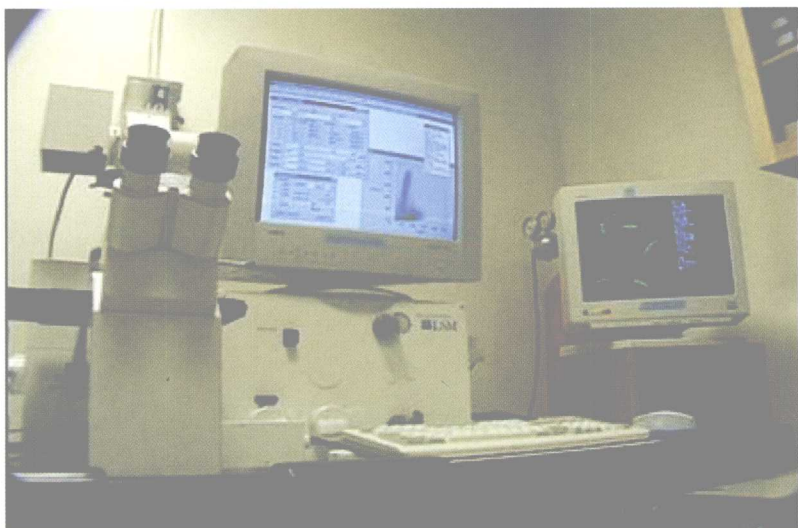


图1-3 激光共聚焦扫描显微镜

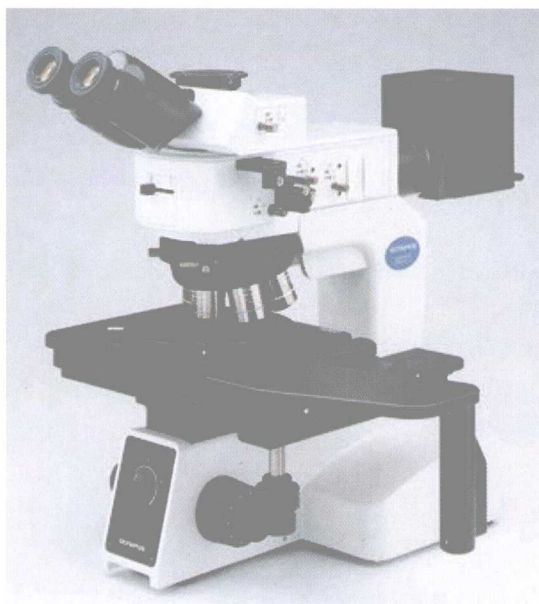


图1-4 暗视野显微镜

大或减小,提高反差。光线通过比较透明的标本时,光的波长(颜色)和振幅(亮度)都没有明显的变化。因此,用普通光学显微镜观察未经染色的标本(如活的细胞)时,其形态和内部结构往往难以分辨。然而,由于细胞各部分的折射率和厚度的不同,光线通过这种标本

时,直射光和衍射光的光程就会有差别。随着光程的增加或减少,加快或落后的光波的相位会发生改变(产生相位差)。光的相位差人的肉眼感觉不到,但相差显微镜能通过其特殊装置——环状光阑和相板,利用光的干涉现象,将光的相位差转变为人眼可以察觉的振幅差(明暗差),从而使原来透明的物体表现出明显的明暗差异,对比度增强,使我们能比较清楚地观察到普通光学显微镜和暗视野显微镜下都看不到或看不清的活细胞及细胞内的某些细微结构(图1-5)。

六、倒置显微镜

其组成和普通显微镜一样,只不过物镜与照明系统颠倒,前者在载物台之下,后者在载物台之上,用于观察培养的活细胞,具有相差物镜。进入20世纪80年代以来,光学显微镜的设计和制作又有了很大的发展,其发展趋势主要表现在,注重实用性和多功能方面的改进。在装配设计上趋于采用组合方式,集普通光镜加相差、荧光、暗视野、DIC、摄影装置于一体,从而操作灵活,使用方便(图1-6)。



图1-5 相差显微镜



图1-6 倒置显微镜

七、电子显微镜

(一)透射电子显微镜(TEM) 在光学显微镜下无法看清小于 $0.2\mu\text{m}$ 的细微结构,这些结构称为亚显微结构或超微结构。要想看清这些结构,就必须选择波长更短的光源,以提高显微镜的分辨率。1932年Ruska发明了以电子束为光源的透射电子显微镜,电子束的波长要比可见光和紫外光短得多,并且电子束的波长与发射电子束的电压平方根成反比,也就是说电压越高波长越短。目前TEM的分辨率可达 0.2nm 。电子显微镜(图1-7)与光学显微镜的成像原理基本一样,所不同的是前者用电子束作光源,用电磁场作透镜。另外,由于电子束的穿透力很弱,因此用于电镜的标本需制成厚度约 50nm 左右的超薄切片。电子显微镜由电子照明系统、电磁透镜成像

系统、真空系统、记录系统、电源系统5部分构成(图1-8)。

(二)扫描电子显微镜(SEM) 扫描电子显微镜工作原理是用一束极细的电子束扫描样品,在样品表面激发出次级电子,次级电子的多少与电子束入射角有关,也就是说与样品的表面结构有关,次级电子由探测体收集,并在那里被闪烁器转变为光信号,再经光电倍增管和放大器转变为电信号来控制荧光屏上电子束的强度,显示出与电子束同步的扫描图像。图像为立体形象,反映了标本的表面结构。为了使标本表面发射出次级电子,标本在固定、脱水后,要喷涂上一层重金属微粒,重金属在电子束的轰击下发出次级电子信号。目前扫描电镜的分辨率为 $6\sim 10\text{nm}$,人眼能够区别荧光屏上两个相距 0.2mm 的光点,则扫描电镜的最大有效放大倍率为

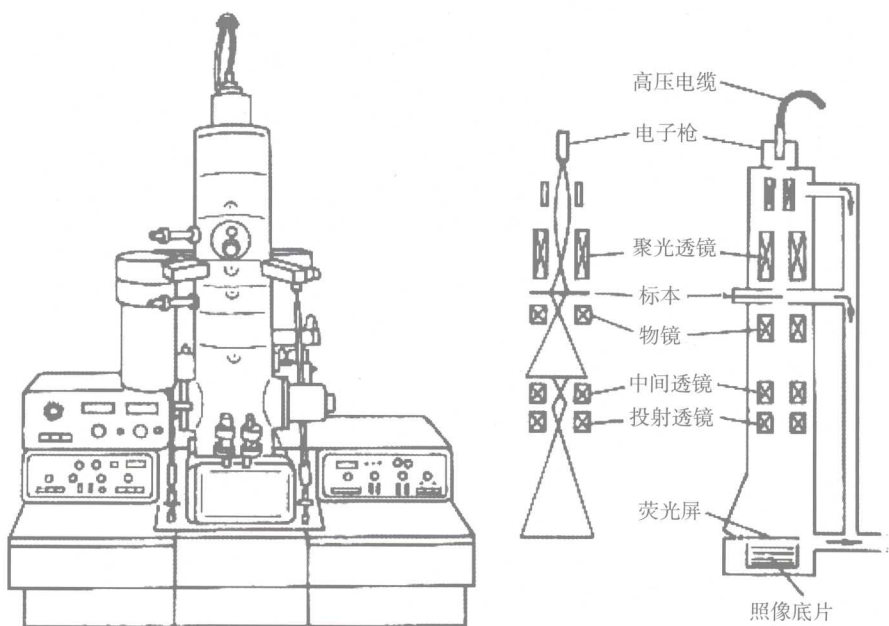


图1-7 电子显微镜结构图



图1-8 透射电子显微镜

$0.2\text{mm}/10\text{nm}=20\,000\times$ (图1-9)。

(三)扫描隧道显微镜(STM) 是根据量子力学原理中的隧道效应而设计。当原子尺度的针尖在不到一个纳米的高度上扫描样品时,此处电子云重叠,外加一电压($2\text{mV}\sim 2\text{V}$),针尖与样品之间产生隧道效应而有电子逸出,形成隧道电流。电流强度和针尖与样品间的距离有函数关系,当探针沿物质表面按给定高度扫描时,因样品表面原子凹凸不平,使探针与物质表面间的距离不断发生改变,从而引起电流不断发生改变。将电流的这种改变图像化即可显示出原子水平的凹凸形态。扫描隧道显微镜的分辨率很高,横向为 $0.1\sim 0.2\text{nm}$,纵向可达 0.001nm 。它的优点是三态(固态、液态和气态)物质均可进行观察,而普通电镜只能观察制作好的固体标本。利用扫描隧道显微镜直接观察生物大分子,如DNA、RNA和蛋白质等分子的原子布阵,和某些生物结构,如生物膜、细胞壁等的原子排列(图1-10)。