

现代医学 检验与卫生检验技术

(下)

尚立成等◎主编

第二十二章 临床细菌学检验

第一节 厌氧球菌

厌氧球菌 (Anaerobic cocci) 是临床厌氧感染的重要病原菌, 约占临床厌氧菌分离株的 25%, 其中主要包括革兰阳性的消化球菌属、消化链球菌属以及革兰阴性的韦荣球菌属。

一、消化球菌属

黑色消化球菌 (*Peptococcus niger*) 是消化球菌属中唯一的菌种。

(一) 临床意义

黑色消化球菌通常寄居在女性阴道处, 偶见于临床其他标本。该菌常与需氧菌混合引起腹腔感染、肝脓肿、外阴、阴道及盆腔感染等。

(二) 微生物学检验

革兰阳性球菌。直径 $0.3 \sim 1.3 \mu\text{m}$, 单个、成双、短链或成堆排列。无芽孢, 无荚膜。专性厌氧菌, 生长缓慢, 厌氧培养 2~4 天形成黑色不溶血的小菌落。不发酵糖, 触酶阳性, 靛基质试验、尿素酶试验、硝酸盐还原试验均阴性。对青霉素、红霉素、氯霉素、洁霉素、四环素及甲硝唑敏感。

标本黑色有臭味是该细菌感染的重要特点。接种血琼脂平板, 同时接种含血清疏乙醇酸盐培养基或庖肉培养基, 经厌氧培养 2~4 天后, 观察菌落形态, 革兰染色观察菌体形态和排列做出初步报告。根据生化反应、抗菌药物敏感试验以及气液相色谱分析代谢做出最后报告。

二、消化链球菌属

消化链球菌属 (*Peptostreptococcus*) 由厌氧消化链球菌、不解糖消化链球菌等 9 个菌种组成, 代表菌为厌氧消化链球菌 (*Panaerobius*)。

(一) 临床意义

在临床标本中以厌氧消化链球菌最常见。可引起人体各部组织和器官的感染; 常与金黄色葡萄球菌或溶血性链球菌协同引起严重的创伤感染, 称厌氧链球菌肌炎。该菌亦可通过原发病灶如口腔、牙周等引起细菌性心内膜炎。在临床标本分离株中, 消化链球菌占 20%~35%, 仅次于脆弱类杆菌。

(二) 微生物学检验

革兰阳性球形或卵圆形, 大小不等, 菌体直径 $0.3 \sim 1 \mu\text{m}$, 常呈双或呈短链状排列。无鞭毛, 无芽孢, 无荚膜。专性厌氧, 在 $35 \sim 37^\circ\text{C}$ 、 $\text{pH } 7 \sim 7.5$ 时生长最佳。营养要求较高,

需羊血和血清培养基才能生长。在厌氧血平板上,菌落直径 0.5~1mm、灰白色、凸起、不透明、边缘整齐,一般不溶血,偶有甲型或乙型溶血。生化反应不活泼,在硫乙醇酸钠液体培养基中,呈颗粒状沉淀生长。在其平板上生化反应较为明显,吐温-80 可促进其生长。触酶阴性,发酵葡萄糖,不发酵乳糖,不水解胆汁七叶苷,吲哚、尿素酶、硝酸盐还原试验均为阴性,对多聚茴香磺酸钠 (SPS) 特别敏感。

本属细菌的培养物常有恶臭气味。通过形态、染色、培养特性、生化反应等可与黑色消化球菌鉴别。

三、韦荣球菌属

韦荣球菌属 (*Veillonella*) 为革兰阴性厌氧球菌。韦荣球菌属有 9 个种,其中小韦荣球菌 (*V. parvula*) 和产碱韦荣球菌 (*Valaclescens*) 最常见。

(一) 临床意义

韦荣球菌是口腔、咽部、胃肠道和女性生殖道的正常菌群,为条件致病菌。临床标本可采自软组织脓肿和血液。临床分离率小于 1%。小韦荣球菌可引起上呼吸道感染,而产碱韦荣球菌多见于肠道感染。

(二) 微生物学检验

韦荣球菌属形态相似,为革兰阴性球菌。直径 0.3~0.5 μm ,多排列成对、近似奈瑟球菌。无鞭毛、无芽孢、专性厌氧。血琼脂平板上生长良好,培养 48 小时后,形成直径 1~2mm 圆形、凸起、灰白色或黄色混浊菌落,不溶血;在硫乙醇酸盐肉汤中混浊生长,产生小气泡。新鲜培养物立即置紫外线下照射,菌落可显红色荧光,接触空气后荧光消失。生化反应不活泼,不分解糖类,还原硝酸盐。

取临床标本作直接涂片,如发现革兰阴性小球菌、成对或短链或不规则排列,疑为韦荣球菌。分离培养时可用血琼脂平板,厌氧血琼脂平板或韦荣球菌培养基,分别在需氧和厌氧环境中培养 2~3 天观察结果。同时可接种硫乙醇酸盐肉汤或庖肉培养基,观察生长情况与形态,并作生化反应进行鉴定。

(崔 杨)

第二节 革兰阴性无芽孢厌氧杆菌

革兰阴性无芽孢厌氧杆菌是一大群不形成芽孢的厌氧杆菌,是人体正常菌群的重要组成部分,部分菌株可作为条件致病菌引起感染。

一、类杆菌属

类杆菌属 (*Bacteroides*) 是临床上最重要的革兰阴性无芽孢厌氧杆菌,有 26 个种,其中耐 20% 胆汁的有 15 种,不产色素和不分解糖的有 11 种。临床标本中以脆弱类杆菌 (*B. fragilis*) 最常见,是本属的代表菌种。

(一) 临床意义

类杆菌寄生于人的口腔、肠道和女性生殖道,常引起内源性感染。其中脆弱类杆菌占类

杆菌分离率的 50%。每克粪便中约有 $10^{10} \sim 10^{12}$ 个，为大肠埃希菌的 100 ~ 1 000 倍。有文献报道产肠毒素的脆弱类杆菌已从幼龄动物肠道、细菌性腹泻患儿以及健康儿童及成人的粪便标本中分离出。脆弱类杆菌也可引起胸腔、颅内及女性生殖系统感染。

(二) 微生物学检验

脆弱类杆菌为革兰阴性，大小为 $(0.8 \sim 1.3) \mu\text{m} \times (1.6 \sim 8) \mu\text{m}$ ，着色不均，两端钝圆而浓染，中间不着色染色较浅似空泡。在陈旧培养物或含糖的液体培养基中呈明显多形性，无鞭毛、无芽孢，多数有荚膜。

专性厌氧，在厌氧血平板上经 24 ~ 48 小时培养后，菌落直径 1 ~ 3mm，圆形微凸，表面光滑，边缘整齐，半透明，灰白色，少数菌株可有微溶血。在胆汁七叶苷 (BBE) 培养基中生长旺盛，能分解胆汁七叶苷，使培养基呈黑色，菌落较大，周围有黑晕。触酶试验阳性，发酵葡萄糖、麦芽糖和蔗糖，不发酵阿拉伯糖、鼠李糖、山梨醇和海藻糖。本菌群在发酵过程中，主要代谢产物是乙酸、丙酸和琥珀酸。大部分菌株对青霉素 G、卡那霉素和新霉素耐药；对氯霉素、利福平、氨苄西林、哌拉西林、亚胺培南、甲硝唑等敏感。

二、普雷沃菌属

普雷沃菌属 (*Prevotella*) 是从类杆菌属分出的一个新菌属，包括 20 个种，产黑色素的有 8 个种，不产色素的有 12 个种。代表菌种是产黑色素普雷沃菌 (*P. melaninogenica*)。

(一) 临床意义

产黑色素普雷沃菌主要寄居在正常人体的口腔、女性生殖道等部位，可引起这些部位的内源性感染。临床上本属细菌引起女性生殖道及口腔感染较多见，其致病物质可能是胶原酶。

(二) 微生物学检验

本属细菌为革兰阴性球杆状，大小约 $(0.8 \sim 1.5) \mu\text{m} \times (1.0 \sim 3.5) \mu\text{m}$ ，排列成双或短链，两端钝圆，有浓染和空泡。在液体培养基中，尤其是在含糖培养基中，可长短不等，长者达 $10 \mu\text{m}$ 以上，呈多形性，无鞭毛、无芽孢和荚膜。为专性厌氧菌，在厌氧平板上 2 ~ 3 天培养后，菌落直径为 0.5 ~ 3mm，圆形、凸起、不透明，许多菌株呈 B 溶血。菌落在紫外光 (波长 366nm) 照射下有砖红色荧光，逐渐转为褐黑色和棕色菌落，5 ~ 7 天转为黑色菌落，色素出现后荧光即消失。黑色素只有在含有血液 (以免和人血为好) 的培养基上才能产生。本菌群在培养基中加入氯化血红素 ($1 \mu\text{g/ml}$) 和维生素 K_1 ($0.1 \mu\text{g/ml}$)，可促进生长。

本群细菌在 20% 胆汁培养基中绝大多数不生长，触酶阴性，产黑色素普雷沃菌可发酵葡萄糖、乳糖和蔗糖，除中间普雷沃菌、变黑普雷沃菌和部分洛氏普雷沃菌外脂酶、脲酶均为阴性。多数对氨苄西林、头孢菌素、卡那霉素和万古霉素耐药，而对甲硝唑、氯霉素、青霉素、利福平和新霉素敏感。牛磺胆酸盐和多种染料可抑制本菌群生长。

三、卟啉单胞菌属

卟啉单胞菌属 (*Porphyromonas*) 又称紫单胞菌属。有 12 个种。与人类有关的主要是不解糖卟啉单胞菌 (*P. asaccharolytica*)、牙髓卟啉单胞菌 (*P. endodontalis*) 和牙龈卟啉单胞菌 (*P. gingivalis*) 3 种细菌。代表菌种是不解糖卟啉单胞菌。

(一) 临床意义

卟啉单胞菌主要分布于人类口腔、泌尿生殖道和肠道。引起牙周炎、牙髓炎、根尖周炎、胸膜炎、阑尾炎和细菌性阴道炎，尚可引起头、颈和下呼吸道感染。

(二) 微生物学检验

卟啉单胞菌为革兰阴性杆菌或球杆菌，大小约 $(1.5 \sim 3.5) \mu\text{m} \times (0.8 \sim 1.5) \mu\text{m}$ ，两端钝圆，着色不均匀。35~37℃ 厌氧培养 3~5 天可形成 1~2mm 圆形、凸起、表面光滑、边缘整齐、棕色或黑色菌落。维生素 K_1 和氯化血红素可促进本菌生长及黑色素的产生。本属细菌不分解糖或弱分解糖。触酶试验、胆汁七叶苷和脂酶试验均阴性，吲哚大多阳性。能液化明胶。对卡那霉素、多黏菌素 E 耐药，对万古霉素、头孢菌素、氯霉素、克林霉素、青霉素 G、阿莫西林等均敏感。

本属 3 个菌种均不发酵葡萄糖、乳糖和蔗糖。种内之间的鉴别，不解糖卟啉单胞菌触酶试验阴性， α -岩藻糖苷酶试验阳性；牙髓卟啉单胞菌和牙龈卟啉单胞菌 α -岩藻糖苷酶试验均为阴性。

四、梭杆菌属

梭杆菌属 (*Fusobacterium*) 是临床常见的革兰阴性无芽孢厌氧杆菌，形态细长，两端尖细如梭而得名。目前发现 16 种梭杆菌，人类来源的有 12 种。常见的有具核梭杆菌 (*F. nucleatum*)、坏死梭杆菌 (*F. necrophorum*)、死亡梭杆菌 (*F. mortiferum*) 和溃疡梭杆菌 (*F. ulcerans*)。代表菌种为具核梭杆菌。

(一) 临床意义

临床感染中以具核梭杆菌多见，常在口腔、生殖器、胃肠道和上呼吸道中被发现，坏死梭杆菌是毒力很强的梭杆菌，常引起急性扁桃体炎，有时并发单核细胞增多症，是儿童和青年人扁桃体周围脓肿中最常分离到的厌氧菌。局部症状还包括颈间隙感染和颈静脉脓毒性血栓静脉炎，尚可引起胸膜渗出性脓胸（积脓）、增生性转移脓肿（最常见于胸部、肺部、肝脏和大关节）和菌血症。

(二) 微生物学检验

梭形杆菌为革兰阴性，菌体呈梭状，两端尖细，大小约 $(5.0 \sim 10) \mu\text{m} \times 1.0 \mu\text{m}$ ，常见到游离者为椭圆形，有时菌体中有革兰阳性颗粒存在。无鞭毛，不能运动。本菌为严格厌氧菌，在血平板上生长良好。经 48 小时培养后，菌落直径 1~2mm，不规则圆形，略凸起，灰色、发光、透明、不溶血；用透明光观察，菌落常显示珍珠光斑点；陈旧菌落粗糙、边缘似面包屑样。生化反应不活泼，多数菌株不发酵任何糖类，少数菌株对葡萄糖、果糖可出现弱发酵反应。吲哚和 DNA 酶试验阳性，触酶阴性。不还原硝酸盐，在 20% 胆汁中不生长，脂酶试验阴性。梭杆菌对青霉素、利福平、多黏菌素 E、卡那霉素与新霉素敏感，对万古霉素耐药，但可被胆汁或牛磺胆酸钠所抑制。不发酵葡萄糖，甘露醇，不分解胆汁七叶苷，吲哚和 DNA 酶试验阳性。

(王晓芳)

第三节 革兰阳性无芽孢厌氧杆菌

革兰阳性无芽孢厌氧杆菌 (anaerobic nonsporeforming Gram - positive bacilli) 有 6 个属, 几十个菌种, 在临床厌氧菌的分离中约占 15%。常见的有丙酸杆菌、优杆菌、乳酸杆菌、双歧杆菌、蛛网菌和放线菌。它们的菌落、生化反应、菌体形态等都很相似, 鉴定较难。应用气-液相色谱法 (GLC), 根据其代谢产物不同, 可对菌属做出初步判定。

一、丙酸杆菌属

丙酸杆菌属 (*Propionibacterium*) 是丙酸杆菌科中的第一个属。因发酵葡萄糖产生丙酸而命名。本菌属共有 8 个种, 与临床有关的有 3 种细菌, 即痤疮丙酸杆菌 (*P. acnes*)、贪婪丙酸杆菌 (*P. avidum*) 与颗粒丙酸杆菌 (*P. granulorum*)。

(一) 临床意义

丙酸杆菌属主要寄生在人体的皮肤与乳制品及青贮饲料中。痤疮丙酸杆菌是皮肤上的优势菌群, 存在于正常皮肤的毛囊与汗腺中, 与痤疮和酒渣鼻有关。亦可成为血液、腰椎穿刺液及骨髓穿刺液培养时常见的污染菌。贪婪丙酸杆菌能从血、脓、伤口、脑脓肿、上颌窦脓汁、其他软组织及粪便中分离出。颗粒丙酸杆菌曾从脓汁及肠道中分离出, 其致病性尚未明了。

(二) 微生物学检验

革兰阳性杆菌, 无芽孢、无鞭毛、无荚膜, 棒状或略弯曲, 染色不均, 呈 X、Y 和 V 形排列, 似类白喉杆菌, 在陈旧培养物中常呈长丝状, 有高度多形性。该菌初次分离为厌氧, 经过数次转种以后可变为兼性厌氧。吐温-80 能刺激其生长。在血平板上培养 48 小时后, 形成直径 0.2~0.5mm 的菌落, 圆形、凸起、白或灰白色、不透明、表面光滑, 多数菌株不溶血。在葡萄糖肉汤中生长呈混浊并有颗粒沉淀。在 30~37℃, pH 7.0 环境中可迅速生长。丙酸杆菌属的形态和培养特性都很相似, 鉴定主要靠生化反应。本菌对卡那霉素和万古霉素等敏感, 对多黏菌素等耐药。

二、优杆菌属

优杆菌属 (*Eubacterium*) 又称真杆菌属, 包括 45 种细菌。从人体分离出的有十几个种, 临床上最常见的是不解糖优杆菌 (*E. alactolyticum*)、迟钝优杆菌 (*E. lentum*) 和黏液优杆菌 (*E. limosum*)。代表菌种为黏液优杆菌。

(一) 临床意义

优杆菌是人和动物口腔与肠道正常菌群的成员, 对机体有营养、生物拮抗和维持肠道微生态学平衡等功能。少数菌种可与其他兼性厌氧菌造成混合感染, 引起人心内膜炎等疾病。

(二) 微生物学检验

革兰阳性多形态性, 杆状或球杆状, 单个或成双排列, 偶见短链状, 有或无鞭毛。在厌氧血琼脂平板上, 37℃ 培养 48 小时形成直径 0.5~1.5mm, 圆形、半透明、不溶血的小菌落。20% 胆汁可促进其生长, 黏液优杆菌能发酵葡萄糖和阿拉伯糖, 凝固牛乳, 水解七叶

苷；如迟钝优杆菌除硝酸盐还原阳性外，不发酵任何糖类，不凝固牛乳，不液化明胶，不水解七叶苷，也不产生吲哚。

三、双歧杆菌属

本属细菌已达 30 多种。常见的双歧杆菌主要有青春双歧杆菌 (*B. adolescentis*)、短双歧杆菌 (*B. breve*)、长双歧杆菌 (*B. longum*)、两歧双歧杆菌 (*B. bifidum*) 等。代表菌株为两歧双歧杆菌。

(一) 临床意义

双歧杆菌 (*Bifidobacterium*) 是人和动物肠道内的重要生理菌群。小肠下部数量可达 $10^3 \sim 10^5/\text{g}$ 内容物，大肠中可达 $10^8 \sim 10^{12}/\text{g}$ 粪便。双歧杆菌在体内起到调节和维持人体生态平衡的重要作用，能合成人体所必需的多种维生素等营养物质，拮抗多种肠道病原微生物，有抗感染、增强机体免疫力、抗肿瘤、调节肠道菌群关系等作用，起到营养保健、抗衰老、控制内毒素血症、提高人体对放射线的耐受力等主要的生理功能。

(二) 微生物学检验

本菌为革兰阳性杆菌，菌体形态可因培养基的不同而发生改变，有高度多形性，有直、弯，有分叉，可形成 Y、V 形及一端或两端膨大呈棒状，有时菌体稍弯，染色不均匀。陈旧培养菌着色常不规则，呈颗粒状，无鞭毛、无荚膜、无芽孢。初代分离要求专性厌氧，不同的菌株对氧的敏感性不同。在 BL 或 BS 血琼脂平板上，48 小时培养后，菌落圆形、微凸、灰白色或褐色，边缘齐、不透明、表面光滑、不溶血。发酵葡萄糖产生乙酸和乳酸以及少量甲酸及琥珀酸，不产生丁酸和丙酸。大多数细菌触酶阴性，不产生吲哚，不还原硝酸盐。对杆菌肽、青霉素 G、红霉素、克林霉素和氨苄西林等高度敏感，对头孢菌素、氯霉素、四环素、呋喃妥因中度敏感，对氨基糖苷类抗生素、多黏菌素、萘啶酸和甲硝唑等耐药。

四、乳杆菌属

乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 有 44 个种，7 个亚种。本属细菌因能发酵糖类产生大量乳酸而得名。常见的菌种是嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus*)、德氏乳杆菌 (*L. debrueckii*)、发酵乳杆菌 (*L. fermentum*) 等。代表菌种是德氏乳杆菌 (*L. debrueckii*)。

(一) 临床意义

乳杆菌是脊椎动物消化道、阴道的正常共生菌，因可分解糖类生成乳酸，增加其酸度从而抑制病原菌的繁殖。也广泛存在于乳制品（如乳酪、酸奶）中。某些乳杆菌如嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌，常用于饮料等发酵工业。乳杆菌与龋齿的形成有密切的关系，其原理是口腔中的某些链球菌能使蔗糖变成胶状葡聚糖，附于牙面形成齿斑，乳杆菌能在齿斑上进一步发酵食物中的糖产生乳酸以溶解牙釉及牙质中的磷酸钙，使之脱钙，致其他细菌经牙质小管侵入牙髓，造成牙根端脓肿。

(二) 微生物学检验

革兰阳性无芽孢的细长杆菌，无荚膜及鞭毛，排列成双、单、短链或栅状。某些菌种呈多形性，两端染色较深。乳杆菌为兼性厌氧或微需氧，在厌氧环境中生长更好。最适温度 $30 \sim 40^\circ\text{C}$ ，最适 pH $5.5 \sim 6.2$ ，嗜酸，pH 3.5 还能生长，菌落直径 $0.5 \sim 2\text{mm}$ ，表面粗糙，

边缘不整齐。本属细菌营养要求复杂。常用的分离培养基为 MRS 营养琼脂或葡萄糖血清琼脂。能发酵多种糖类，主要产生乳酸，不分解蛋白质，故触酶试验、液化明胶、硝酸盐还原及吲哚试验均呈阴性。

(王晓芳)

第四节 梭状芽孢杆菌

梭状芽孢杆菌属 (*Clostridium*) 是厌氧芽孢杆菌 (anaerobic sporeforming bacilli) 的唯一菌属，有 130 个种。包括一大群厌氧或微需氧的粗大芽孢杆菌。革兰染色阳性，芽孢呈圆形或卵圆形，直径大于菌体，位于菌体中央，极端或次极端，使菌体膨大呈梭状。本菌属细菌在自然界分布广泛，多数为腐物寄生菌，少数为致病菌。临床有致病性的主要有破伤风梭状芽孢杆菌、产气荚膜梭状芽孢杆菌、肉毒梭状芽孢杆菌与艰难梭状芽孢杆菌等，分别引起破伤风、气性坏疽、食物中毒和假膜性结肠炎等疾病。

一、破伤风梭状芽孢杆菌

破伤风梭状芽孢杆菌 (*C. tetani*) 是梭状芽孢杆菌属中常见的一种芽孢杆菌，能引起破伤风得名。

(一) 临床意义

破伤风梭菌广泛存在于土壤、人和动物的肠道中。当机体受创伤时或新生儿接生时使用不洁用具断脐带，破伤风梭菌可侵入伤口生长繁殖，产生外毒素，引起机体强直性痉挛、抽搐，称为破伤风。新生儿破伤风又称为脐带风。

破伤风梭菌的致病物质主要是外毒素，又称痉挛毒素。对小鼠的最小致死量为 10 - 7mg，对人的致死量小于 1 μ g。它是一种蛋白质，不耐热，可被蛋白消化酶或胰蛋白酶破坏，经 0.3% 甲醛处理可使毒性消失而保留其抗原性成为类毒素。

本菌感染的主要方式是通过创伤，与其他化脓性球菌混合感染，造成局部组织中的氧化还原电势降低。细菌所产生的痉挛毒素进入血流引起严重的毒血症；该毒素对中枢神经系统尤其是对脑干神经和脊髓前角运动神经细胞有高度的亲和力。该毒素能与神经细胞表面的神经节苷脂结合，封闭脊髓抑制性触突，阻止抑制性突触末端释放抑制性冲动的传递介质，破坏了正常的抑制性调节功能，导致肌肉痉挛性收缩。患者初期有轻度发热、头痛、肌肉酸痛等前驱症状，随后出现局部肌群抽搐，咀嚼肌和表情肌痉挛，张口困难，牙关紧闭呈苦笑面容。继后颈部、躯干及四肢肌肉发生强直性痉挛，患者呈角弓反张，全身肌肉呈强直性收缩、颤抖，颜面发绀，呼吸困难，最后可因窒息而死亡。

(二) 微生物学检验

1. 基本特征 本菌为细长杆菌，有周鞭毛，能运动，无荚膜。芽孢正圆形大于菌体，位于菌体顶端呈鼓槌状为本菌特征。初期培养物为革兰阳性，培养 48 小时后，尤其在芽孢形成后，细菌易转为革兰阴性。

专性厌氧，在梭状芽孢杆菌专用培养基上 37℃ 培养 48 小时，菌落直径 2 ~ 4mm，扁平、灰白色、边缘疏松呈羽毛状，伴 β 溶血。在庖肉培养基中，肉渣部分消化，微变黑，有少

量气体。生成甲基硫醇及 H_2S ，导致培养物有腐败性恶臭。一般不发酵糖类，能液化明胶。形成吡啶，不还原硝酸盐，对蛋白质有微弱的消化作用。气液相色谱可检出的代谢产物有乙酸、丙酸和丁酸、乙醇和丁醇。

该菌有菌体 (O) 抗原和鞭毛 (H) 抗原。根据鞭毛抗原的不同，可分为 10 个血清型。各型细菌产生毒素的生物活性与免疫活性均相同，可被任何型抗毒素中和。

2. 实验检查 根据破伤风患者典型的临床表现即可做出诊断，一般不作细菌学检查。若临床必须要求作细菌学检查，可按下列方法进行。

(1) 直接涂片：从病灶处取脓汁或坏死组织，直接涂片革兰染色，镜检观察菌体见一端有圆形芽孢呈鼓槌状的革兰阳性杆菌，可初步报告结果。

(2) 厌氧培养：将可疑标本接种庖肉培养基，在 $75 \sim 85^\circ C$ 水浴加热 30 分钟，杀灭其他杂菌，保留芽孢， $35 \sim 37^\circ C$ 培养 2~4 天。如标本为组织，应先将其剪碎或研磨再接种。在庖肉培养基中生长后可转种适宜的培养基，如新鲜的 CD 培养基或预热的血平板，尽快厌氧培养，18~24 小时后，如有此菌，则呈薄膜状迁徙生长。

(3) 动物试验：同时作毒力试验和保护力试验。毒力试验即在小白鼠尾根部皮下或肌肉内注射 0.1~0.25ml 培养滤液，阳性者，于注射后 12~24 小时，出现尾部僵直竖起、后腿强直或全身肌肉痉挛等症状，甚至死亡；保护力试验是将 0.5ml 培养滤液混以 1:10 稀释的等量破伤风抗毒素，给另一小白鼠注射，如不发病，表示保护力试验阳性，证明培养滤液中有破伤风毒素存在。

二、产气荚膜梭状芽孢杆菌

产气荚膜梭状芽孢杆菌 (*C. perfringens*) 是临床上引起气性坏疽病原菌中最多见的一种梭状芽孢杆菌，本菌在体内因能形成荚膜而得名。能分解肌肉和结缔组织中的糖，产生大量气体，导致组织严重气肿而影响血液供应，患者以局部剧痛、水肿、胀气、肌肉组织迅速坏死，分泌物恶臭并伴有全身毒血症为特征的急性感染。

(一) 临床意义

产气荚膜梭状芽孢杆菌是气性坏疽的主要病原菌。可产生多种外毒素及侵袭性酶。外毒素有 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 η 、 θ 、 τ 、 κ 、 λ 、 μ 和 ν 12 种。最重要的是 α 毒素 (卵磷脂酶)，能分解人和动物细胞膜上磷脂和蛋白质的复合物，破坏细胞膜，引起溶血、组织坏死和血管内皮损伤，使血管通透性增高； α 毒素还能促使血小板凝聚，导致血栓形成，局部组织缺血。 β 毒素可引起人类坏死性肠炎。 ϵ 毒素有坏死和致死作用。 θ 毒素有溶血和破坏白细胞的作用，对心肌有毒性。 κ 毒素 (胶原酶) 能分解肌肉和皮下的胶原组织，使组织溶解。 μ 毒素 (透明质酸酶) 能分解细胞间质中的透明质酸。 γ 毒素 (DNA 酶) 能使细胞核 DNA 解聚，降低坏死组织的黏稠度。造成组织溶解、坏死、产气、水肿以及病变的迅速扩散蔓延等全身中毒症状。

气性坏疽常继发于开放性骨折，大块肌肉撕裂以及组织的严重坏死等。主要是大面积创伤、局部供血不足，组织缺氧坏死，氧化还原电势下降，芽孢发芽繁殖，产生毒素和侵袭性酶，引起感染导致气性坏疽。某些型别也可引起食物中毒和坏死性肠炎，常与兼性厌氧菌混合感染，引起深部脓肿、菌血症、心内膜炎及胆道、泌尿道、女性生殖道、腹腔、盆腔、胸腔的感染等。

除产气荚膜梭状芽孢杆菌外，还有诺维梭状芽孢杆菌（*C. Novyi*）、败毒梭状芽孢杆菌（*C. septicum*）和溶组织梭状芽孢杆菌（*C. histotum*）等也是气性坏疽的病原菌。

（二）微生物学检验

1. 基本特征 产气荚膜梭状芽孢杆菌为革兰阳性粗大杆菌，两端钝圆，大小约 $(1.0 \sim 1.5) \mu\text{m} \times (3.0 \sim 5.0) \mu\text{m}$ 。有明显荚膜。在无糖培养基中易形成芽孢，芽孢椭圆形，位于菌体中央或次极端，直径不大于菌体，无鞭毛，不能运动。

产气荚膜梭状芽孢杆菌为非严格厌氧菌，在少量氧的环境中生长迅速，液体培养基中孵育 2 小时深层即有明显生长，4~6 小时后出现表面生长。在血平板上 24 小时培养，菌落直径 2~4mm，圆形、凸起、光滑、半透明、边缘整齐，多数菌株有双层溶血环，内环由 θ 毒素引起的狭窄透明溶血环；外环由 α 毒素引起的较宽的不完全溶血环。在庖肉培养基中产生气体，肉渣呈粉红色不被消化。在牛乳培养基中能分解乳糖产酸，使酪蛋白凝固，同时产生大量气体（ H_2 与 CO_2 ），将凝固的酪蛋白冲散成蜂窝状，气势凶猛，称为“汹涌发酵”（stormyfermentation），是此菌的特征。所有型菌株均能发酵葡萄糖、麦芽糖、乳糖和蔗糖，产酸产气，卵磷脂酶阳性，不发酵甘露醇或水杨苷；液化明胶，产生 H_2S ，不能消化已凝固的蛋白质和血清，吲哚阴性。主要代谢产物为乙酸和丁酸，有时也形成丁醇。

根据细菌产生外毒素种类的不同，可将产气荚膜梭状芽孢杆菌分成 A、B、C、D、E 5 个毒素型。5 型中对人致病的主要是 A 型和 C 型，A 型最常见，引起气性坏疽和胃肠炎型食物中毒；C 型能引起坏死性肠炎。

2. 实验检查

（1）标本采集：多采取创伤深部的分泌物、穿刺物、坏死组织块；菌血症时采取血液；食物中毒时取可疑食物。坏死组织应研磨制成悬液。

（2）标本直接镜检：可见到革兰阳性粗大杆菌，多伴有其他杂菌（如葡萄球菌和革兰阴性杆菌等），镜下白细胞较少形态不规则，是气性坏疽临床标本直接涂片的特点，对早期诊断有一定意义。在创伤标本的涂片中不常见到产气荚膜梭状芽孢杆菌的荚膜，一般在流产后感染的宫颈涂片上荚膜较易查见。

（3）分离培养：本菌对低浓度氧有耐受且生长迅速，容易分离。标本可接种于庖肉培养基 8~10 小时后，转种于血平板，培养基加硫酸新霉素（100mg/L）可抑制需氧菌生长，在厌氧环境培养 18 小时，即可挑取菌落进行检查。本菌在组织中一般不形成芽孢，故病理材料不需加热处理。

（4）鉴定

1）形态：根据形态和缺少芽孢、有荚膜等特征。

2）培养特性：菌落特征和乳糖发酵反应，特别是“汹涌发酵”现象。

3）Nagler 试验：卵磷脂酶具有抗原性，它的活性可被相应抗血清所中和。测定时在乳糖卵黄牛乳琼脂平板上划线接种待测菌，尔后贴敷一浸有 A 型产气荚膜梭菌与 A 型诺维梭菌混合的抗毒素滤纸条，厌氧培养 18 小时后观察，在远离纸条处生长的菌落周围出现混浊的白环，而在靠近纸条边缘生长的菌落无此现象，称为 Nagler 试验阳性。借以确定该菌能否产生卵磷脂酶。

4）动物试验：取 24 小时庖肉培养基培养物 1ml，接种于豚鼠的右后腿肌肉中，数小时后局部有明显肿胀，由于气体产生可出现捻发音。水肿可扩散至腹部，有时达到腋下区。动

物在接种后 24~48 小时死亡。尸体解剖可见血性水肿，组织中有气味。取内脏或心血涂片镜检可发现有革兰阳性大杆菌有明显荚膜。

5) 挥发性代谢产物：测定产气荚膜梭菌的重要代谢产物乙酸和丁酸。

三、肉毒梭状芽孢杆菌

肉毒梭状芽孢杆菌 (*C. botulinum*) 是一种腐物寄生菌，能产生毒性极强的外毒素，引起特殊的神经中毒症状，病死率很高。多以摄入被肉毒毒素污染的肉类和罐头等食品而中毒，死亡率大约为 25%~50%。该菌因能引起人和动物严重的中毒性疾病 - 肉毒症，故名肉毒梭菌。

(一) 临床意义

肉毒梭状芽孢杆菌可产生极其强烈的外毒素 - 肉毒毒素。该毒素有嗜神经性，可作用于脑神经核与外周神经 - 肌肉接头处和植物神经末梢，阻止胆碱能神经末梢释放乙酰胆碱，导致肌肉麻痹。人食入毒素后，潜伏期 18~72 小时，首先表现脑神经麻痹（如头晕、头痛），继之出现眼部症状（复视、眼睑下垂、斜视、眼内外肌瘫痪、瞳孔放大），相继发展至咽部肌肉麻痹、吞咽困难、语言障碍、声音嘶哑，进而膈肌麻痹、呼吸困难。一般无胃肠道症状，重者可死于呼吸困难与心力衰竭。

本菌尚可使婴幼儿患婴儿肉毒症。病儿（多为半岁以内）常先有便秘，1~2 周后迅速出现全身软弱，不能抬头，无力吸乳，哭声低弱，脑神经麻痹现象，严重者可出现呼吸衰弱。常可在患儿粪便中查到肉毒梭状芽孢杆菌和肉毒毒素。

(二) 微生物学检验

1. 基本特征 肉毒梭状芽孢杆菌为革兰阳性粗大杆菌，大小约 $(0.9 \sim 1.3) \times (4.0 \sim 6.0) \mu\text{m}$ ，单独或成双排列，有时可见短链状。有周身鞭毛，无荚膜。20~25℃ 时在菌体次极端形成椭圆形芽孢，芽孢大于菌体，使细菌呈汤匙状或网球拍状。

本菌严格厌氧，35℃ 培养 48 小时后，血平板上可形成直径 3~5mm，灰白色、边缘不齐、表面粗糙如毛玻璃样菌落，有 β 溶血，4 天后菌落直径可达到 5~10mm。庖肉培养基中 A 型、B 型、F 型菌可消化肉渣变黑并有腐败恶臭味。不发酵乳糖，生化特性随毒素型不同而有所差异。A、B、E 和 F 型发酵葡萄糖、麦芽糖和蔗糖；C 和 D 型发酵葡萄糖和麦芽糖，但不发酵蔗糖；G 型不发酵糖类。各型均液化明胶，产生 H_2S ，但不产生吲哚。除 G 型外均产生脂肪酶，都能溶血，一般不产生卵磷脂酶。气液相色谱分析，各型均可产生乙酸和丁酸，其他有机酸则随型别而不同。

肉毒毒素是目前已知毒物中毒性最强者，其毒性比氰化钾强 1 万倍，比响尾蛇毒素 (crotoxin) 约高 10 万倍，比土的宁约高 100 万倍。肉毒毒素对人的致死量为 0.1~1.0 μg 。该毒素具有一定的耐热性，80~90℃ 加热 5~10 分钟或煮沸 1 分钟可破坏。根据所产生毒素的抗原性不同，肉毒梭菌目前分为 A、B、C1、C2、D、E、F、G 8 个型，引起人类疾病的有 A、B、E、F 型，以 A、B 型为常见，国内报告的大多是 A 型。各型毒素抗原性不同，只能被同型的抗毒素中和，各型毒素的药理作用都是相同的。

2. 实验检查 从患者血清中检出毒素是最直接的有效方法，因为肉毒梭状芽孢杆菌本身并不致病。其次，应采集患者粪便，从中可检出毒素，分离肉毒梭菌，有助于临床诊断。

从食物中毒样本中检出毒素，对于判断食品与中毒的关系和证实临床诊断的可靠性很有意义。外伤感染性患者的伤口坏死组织或渗出液也可供做检验标本。

(1) 标本直接镜检：革兰阳性粗大杆菌，单独或成双排列，有时可见短链状。

(2) 分离培养与鉴定

1) 分离培养：本菌对氧极为敏感，要获得纯培养比较困难。常用增菌方法，将标本接种庖肉培养基，以促进肉毒梭菌的生长和毒素的产生，再经动物接种和保护性试验，以证明毒素的性质。如混合培养物中有毒素存在，可接种血琼脂和卵黄琼脂平板进行次代培养，厌氧培养 36~48 小时后，取可疑菌落做最后鉴定。培养基加硫酸新霉素 (50mg/L) 有助于抑制污染菌生长，但硫酸新霉素对 E 型肉毒梭菌的某些菌株有抑制作用。在卵黄琼脂平板上除 G 型外，其余都产生局限性不透明区和珠光层，因此有助于选取菌落。在乳糖卵黄牛乳培养基上，可鉴定分解和不分解蛋白的菌株，不分解蛋白、不发酵乳糖和分解脂肪的菌落，可推测为 C、D 或 E 型，或为 B、F 型的不解蛋白株。

2) 毒素检测：可疑食物、呕吐物或胃肠冲洗液、粪便浸液、血清及庖肉培养液等。凡有悬浮固体物的待检物均应低温离心沉淀，取其上清液。肉毒毒素的检验可分为毒素的定性检验和毒素的型别鉴定。

3) 鉴定：①涂片镜检为革兰阳性次极端芽孢，呈汤匙状。②厌氧生长，消化肉渣且变黑，产生恶臭味。③菌落边缘有皱褶。④肉毒毒素检测试验阳性。⑤与其他梭状芽孢杆菌鉴别。

四、艰难梭状芽孢杆菌

艰难梭状芽孢杆菌 (*C. difficile*) 是梭状芽孢杆菌属中的一种专性厌氧菌，对氧十分敏感，难分离培养故得名。该菌是人和动物肠道寄生菌，在幼儿的粪便中最常见，为肠道正常菌群的成员。近年来发现本菌与假膜性肠炎有很大关系，目前已成为医院内感染的病原菌之一，日益被人们重视。

(一) 临床意义

正常情况下，肠道中的乳酸杆菌、双歧杆菌、大肠埃希菌等正常菌群对艰难梭状芽孢杆菌有拮抗作用。长期或大量使用抗菌药物后易引起菌群失调，使艰难梭状芽孢杆菌被药物选择出后大量繁殖而导致抗生素相关性腹泻 (antibiotic-associated diarrhea)。此菌产生 A、B 两种毒素。A 毒素为肠毒素，能使肠壁出血坏死，液体积蓄；B 毒素为细胞毒素，能直接损伤肠壁细胞，造成伪膜性结肠炎 (pseudomembranous colitis)。临床表现为腹泻、腹痛、伴有全身中毒症状，严重时能致死。除假膜性结肠炎外，艰难梭菌尚可引起肾盂肾炎、脑膜炎、腹腔及阴道感染、菌血症和气性坏疽等。

(二) 微生物学检验

1. 基本特征 革兰阳性粗长杆菌，大小约 $(1.3 \sim 1.6) \mu\text{m} \times (3.6 \sim 6.4) \mu\text{m}$ ，有的菌株有周鞭毛，芽孢为卵圆形，位于菌体次极端，无荚膜。本菌为严格厌氧菌，用常规的厌氧培养法不易生长。最适生长温度为 $30 \sim 37^\circ\text{C}$ 。在血琼脂、牛心脑浸液琼脂平板上，经 48 小时培养后，菌落直径 $3 \sim 5\text{mm}$ ，圆形，略凸起，白色或淡黄色、不透明、边缘不整齐、表面粗糙，在血平板上不溶血，在卵黄琼脂平板上不形成乳浊环；在其专用选择培养基 (cycloserine-cefoxitin-fructose-agar CCFA) 上生长的菌落，在紫外线照射下可见特殊黄绿

色荧光；经肉汤培养2天以上，菌体有溶融现象。

该菌发酵葡萄糖、果糖、甘露醇，产酸。水解七叶苷，液化明胶。不分解乳糖、麦芽糖与蔗糖，不分解蛋白质，不凝固牛奶，不产生吡啶和 H_2S ，硝酸盐还原阴性、不产生卵磷脂酶及脂肪酶。挥发性代谢产物有少量的乙酸、异丁酸、异戊酸、戊酸、丁酸和异己酸。

2. 实验检查 除直接涂片和分离培养外，同时要测定毒素。

(1) 直接涂片：革兰染色镜检，依据形态特点及优势菌，进一步进行检查。

(2) 分离培养：粪便标本可接种艰难梭状芽孢杆菌选择培养基，根据典型菌落，转种于庖肉培养基中进行纯培养，用于作鉴定试验和毒素测定。

(3) 鉴定：本菌为革兰阳性粗大杆菌，芽孢卵圆形，位于菌体次极端；在 CCFA 平板上形成芽孢，菌落黄色、粗糙型、脂酶和卵磷脂酶阴性；不凝固和不消化牛乳；发酵果糖、液化明胶、不发酵乳糖、不产生吡啶；挥发性代谢产物；细胞毒素试验阳性。

(4) 毒性检测：用于毒性检测的腹泻粪便标本，3 000r/min 离心 30 分钟后，取上清液过滤除菌或庖肉培养基 37℃4 天的培养液，离心沉淀后取上清液过滤除菌，进行细胞毒性试验、家兔肠袢试验及动物致死试验。除上述方法外，尚可用免疫技术直接测定毒素，如应用对流免疫电泳，间接 ELISA 等。

(王晓芳)

第五节 葡萄球菌属

葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 广泛分布在自然界，存在于环境、空气、牛奶、食品及人体和动物体。在动物体内葡萄球菌主要存在于哺乳动物和鸟类的皮肤、皮肤腺体和黏膜上，也可在宿主的口腔、血液、乳腺、肠道、泌尿生殖道和上呼吸道发现。葡萄球菌可能与宿主有互利或共生的关系。葡萄球菌是医院感染的重要微生物，可通过皮肤伤口、针刺或医疗器械直接植入而进入宿主组织，导致感染发生。另外，葡萄球菌也是化脓性感染的最常见病原菌。

一、分类学特征

伯杰鉴定细菌学手册将葡萄球菌归属于微球菌科，葡萄球菌属。以往根据生化反应和产生色素不同，将其分为金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*)、表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*) 和腐生葡萄球菌 (*S. saprophyticus*) 三个种。Kloos 和 Schleifer 1975 年根据对糖类的分解、牛红细胞溶解、凝固酶、硝酸盐还原等试验将葡萄球菌分为 10 个种，增加了模仿葡萄球菌、孔氏葡萄球菌、木糖葡萄球菌、溶血葡萄球菌、华纳氏葡萄球菌、人葡萄球菌和头状葡萄球菌。伯杰系统手册 (1986) 已增加至 20 种，到 1989 年又增加了一些新的种别。伯杰鉴定细菌学手册报告葡萄球菌属包括致病与非致病的葡萄球菌 32 个种，15 个亚种。数十年来，研究者根据形态、色素、产生的酶和毒素、生化反应和 DNA G + C 含量、核酸杂交等对葡萄球菌的分类和鉴定作了不懈努力，迄今已有 35 个种，17 个亚种。

在葡萄球菌中，除中间葡萄球菌可产生血浆凝固酶，猪葡萄球菌产血浆凝固酶不定外，只有金黄色葡萄球菌能产生血浆凝固酶，称为血浆凝固酶阳性的葡萄球菌，其余统称为凝固酶阴性葡萄球菌 (coagulase negative staphylococcus, CONS)。60% ~ 70% 的金黄色葡萄球菌

可被相应噬菌体裂解，表皮葡萄球菌不敏感。用噬菌体可将金黄色葡萄球菌分为 4~5 组 26 型。肠毒素型食物中毒由 III 和 IV 群金黄色葡萄球菌引起，II 群对抗生素产生耐药性的速度比 I 和 IV 群缓慢很多。造成医院感染严重流行的是工群中的 52、52A、80 和 81 型菌株。引起疱疹性和剥脱性皮炎的菌株通常是 II 群 71 型。另外还可利用质粒大小、抗原结构血清学和抗生素等方法对葡萄球菌进行分型。

二、生物学特性

(一) 形态特性

典型的葡萄球菌呈球形或稍呈椭圆形，直径 $0.5 \sim 1.5 \mu\text{m}$ ，平均 $0.8 \mu\text{m}$ 。致病性葡萄球菌一般较非致病者小，可单个、成双、四联或呈短链状排列，亦可呈不规则葡萄串样排列。固体培养基上由于在多个平面不规则分裂形成葡萄串状，在液体培养基上菌体可在一个平面分裂，常排列成对或成短链。葡萄球菌无鞭毛，不能运动，不形成芽孢，除极幼龄的培养物可见荚膜外，一般不形成荚膜。易被常用的碱性染料着色，革兰染色阳性。衰老、死亡或被白细胞吞噬后的葡萄球菌，以及耐药的某些菌株可呈革兰染色阴性。

(二) 培养特性

为需氧或兼性厌氧菌，除腐生葡萄球菌和金黄色葡萄球菌厌氧亚种为专性厌氧外，其余菌种在有氧条件较厌氧条件生长迅速。葡萄球菌对营养要求不高，在普通培养基上生长良好，在含有血液和葡萄糖的培养基中生长更佳。20%~30% 的 CO_2 环境中有利于毒素产生。10~45℃ 均能生长，但 28~38℃ 生长较好，最适温度为 35~37℃。PH 为 4.5~9.8，最适为 7.4~7.6。葡萄球菌耐盐性强，在 10%~15% 的氯化钠培养基中能够生长。在肉汤培养基中 24 小时后呈均匀混浊生长。在琼脂平板上经 35℃ 24~48 小时培养形成圆形、凸起、边缘整齐、表面光滑、湿润、有光泽、不透明的菌落，直径约为 1~5mm。不同种的菌株产生不同的色素，如金黄色、白色、柠檬色。在 20℃ 或在含有糖类、牛乳及血清培养基中色素形成较好，在液体培养基中则不产生色素。葡萄球菌在血琼脂平板上形成的菌落较大，有的菌株菌落周围形成明显的透明溶血环（ β 溶血），也有不发生溶血者。凡溶血性菌株大多具有致病性。在倾注培养时，深层及表层的菌落均有溶血者多为金黄色葡萄球菌。

(三) 生化反应

多数葡萄球菌能分解葡萄糖、麦芽糖和蔗糖，一部分能分解乳糖及甘露醇，产酸不产气。曾用分解甘露醇和明胶液化试验来判断葡萄球菌致病力，但已发现有些非致病菌也能分解甘露醇和液化明胶，故不能以上述两种方法作为判断致病力的唯一标准。有致病力的葡萄球菌凝固酶多阳性，但一些凝固酶阴性的葡萄球菌也引起人类感染。葡萄球菌不产生吡啶，甲基红试验一般阳性，VP 反应多为阳性。可以将亚甲蓝、石蕊还原为无色，分解尿素产氨， H_2S 产生不定，触酶试验多为阳性，仅解糖葡萄球菌及金葡菌厌氧亚种触酶阴性。

(四) 抗原结构

葡萄球菌抗原构造复杂，已发现的有 30 种以上，目前仅对少数几种葡萄球菌抗原的化学组成及生物学活性有所了解。

1. 葡萄球菌 A 蛋白 (staphylococcal protein A, SPA) 存在于细菌细胞壁的一种表面蛋白，与细胞壁的粘肽相结合。它可与人及多种哺乳动物血清中的 IgG 的 Fc 段结合，因而可

用含 SPA 的葡萄球菌作为载体, 结合特异性抗体, 进行协同凝集试验。A 蛋白有抗吞噬作用, 还有激活补体替代途径等活性。SPA 是一种单链多肽, 与细胞壁肽聚糖呈共价结合, 是完全抗原, 有种属特异性。所有来自人类的菌株均有此抗原, 动物源株则少见。此外, SPA 与 IgG 结合后所形成的复合物还具有多种生物学活性, 如激活补体、抗吞噬、促细胞分裂、引起超敏反应、损伤血小板等。

2. 多糖抗原 具有群特异性, 存在于细胞壁, 借此可以分群。A 群多糖抗原磷壁酸的化学组成为 N-乙酰葡萄糖胺核糖醇残基。B 群多糖抗原磷壁酸的化学组成是 N-乙酰葡萄糖胺甘油残基。

3. 荚膜抗原 几乎所有金黄色葡萄球菌菌株的表面有荚膜多糖抗原的存在。表皮葡萄球菌仅个别菌株有此抗原。

三、微生物学检验

(一) 标本采集

该菌属细菌是无芽孢细菌中抵抗力最强的细菌, 易从感染部位获得标本。可根据病种及检查目的不同, 采集不同标本。常见的标本有脓液、渗出液及咽拭子。如疑为菌血症, 可采取血标本。脑膜炎可采集脑脊液, 疑食物中毒应采集剩余食物、呕吐物及粪便标本。采集皮肤、黏膜标本时应避免病灶周围正常菌群污染。调查院内感染或环境污染, 可从各种物品和仪器上采集。

(二) 检验方法

1. 直接涂片镜检 取标本涂片, 革兰染色后镜检, 根据细菌形态、排列和染色性可做出初步判断。无菌标本如脑脊液、关节穿刺液直接涂片镜检, 检见细菌有重要临床意义。其他体液标本如同时检见炎性细胞则镜检结果有重要参考意义, 可报告为“检见葡萄球菌样革兰阳性球菌”。进而根据镜检结果选择合适方法进行分离鉴定。

2. 分离培养 根据不同的标本类型, 选择合适的培养基接种(如血琼脂平板, 甘露醇和高盐培养基等)进行分离培养。每一临床标本均应接种血琼脂板; 血液、脑脊液等标本可先行肉汤增菌, 随后在血平板上分离; 对混有杂菌的标本, 如粪便等可另外接种于高盐甘露醇培养基进行选择培养, 孵育过夜后挑选可疑菌落进行涂片、染色、镜检, 选择性培养可延长到 48~72 小时以便形成可区别的菌落。

在琼脂平板上经 35℃24 小时孵育, 大部分葡萄球菌的菌落约 1~3mm 大小, 但是多数凝固酶阴性葡萄球菌经过夜培养其菌落仍不能相互区别, 平板应继续室温放置 2~3 天。金黄色葡萄球菌厌氧亚种、解糖葡萄球菌、耳葡萄球菌、马胃葡萄球菌、小牛葡萄球菌、缓慢葡萄球菌等生长缓慢的细菌, 通常需要 24~36 小时才可形成可见的菌落。

由于可产生脂溶性色素, 金黄色葡萄球菌的典型菌落呈奶油黄色或柠檬色等, 圆形、光滑、稍凸起、边缘整齐, 在血平板上大多数金黄色葡萄球菌可产生透明溶血环。典型的凝固酶阴性葡萄球菌的菌落则为无色、光滑、圆形、凸起、不透明。

3. 微生物学鉴定 常见的葡萄球菌可通过其生理生化试验鉴定。另外, 葡萄球菌可应用其分子表型特征如细胞脂肪酸的组成或应用其基因型特征如染色体限制性酶切片段等进行种的鉴定。

在血琼脂板上,葡萄球菌典型菌落呈圆形、稍凸起、边缘整齐、表面光滑、湿润、有光泽、产色素、溶血的菌落。菌落较大,直径为1~5mm的菌落。凝固酶阴性的葡萄球菌菌落无色、表面光滑、凸起、不透明。表皮葡萄球菌对高盐有一定耐受力,可在高盐培养基上生长(微球菌的某些菌株也能生长)。自选择培养基上挑取可疑菌落作鉴定,平板应继续室温放置2~3天,通过观察菌落性状有助于菌种鉴定。3天时金黄色葡萄球菌菌落较大,6~8mm,光滑、凸起,产金黄色或橙色色素。表皮葡萄球菌菌落相对较小,约3~6mm,无色素。

经镜检明确为革兰染色阳性球菌后,选可疑菌落作触酶试验。取待测菌落置于洁净玻片上,加3%过氧化氢一滴,产生气泡为触酶试验阳性。在革兰阳性球菌中,葡萄球菌及微球菌触酶均呈阳性。触酶试验需注意:①从血琼脂板上挑取菌落时不能将培养基一同挑起,因为红细胞含有触酶,可产生假阳性结果。②试验步骤不能颠倒,即不可先加触酶试剂,再取菌落,因为接种环若为白金将产生假阳性结果,镍质接种环则不会产生气泡。③试验菌应用培养18~24小时的细菌,不能用陈旧培养物进行试验,否则可致假阴性结果。④触酶试剂应避免光保存于4℃冰箱。

血浆凝固酶试验是鉴定与急性感染有关的致病性葡萄球菌的主要试验之一。葡萄球菌中金黄色葡萄球菌、中间葡萄球菌和猪葡萄球菌凝固酶均阳性。另外,路邓葡萄球菌和施氏葡萄球菌凝固酶亦呈阳性。凝固酶试验有玻片法和试管法两种。试管法检测游离凝固酶,玻片法检测结合凝固酶。试管法具有确定意义,玻片法则广泛用于快速筛选。约有10%~15%的金黄色葡萄球菌凝固酶试验呈阴性结果。实验使用的血浆为EDTA抗凝血浆,常用EDTA抗凝兔血浆。如用人类血浆必须确定无感染性病原体存在,并具有凝固能力。凝固酶试管法试验:取0.1ml心脑浸液肉汤过夜培养物置于试管中(最好用玻璃试管),加0.5ml血浆,混匀后置37℃水浴4小时,倾斜试管成90°观察凝块形成。有些菌种如个别金黄色葡萄球菌株、中间葡萄球菌、猪葡萄球菌等需孵育超过4小时,后两者甚至可能需要12~24小时才能形成凝块。当孵育时间超过4小时,必须注意以下几点:①某些菌株产生葡激酶,可以使凝块溶解产生假阴性。②使用的不是无菌血浆可产生假阳性或假阴性。③所取菌落不纯,由污染的微生物导致错误结果。凝固酶玻片法试验是一种快速、经济的方法。试验时挑取少量培养物加一滴蒸馏水,制成均匀的高浓度细菌悬液,然后加入一滴血浆,于10秒内观察结果。由于可能出现自凝和假阳性结果,该试验不能自高盐琼脂平板挑取可疑菌落进行实验。当疑为金黄色葡萄球菌,玻片法试验阴性时,应行试管法进行确证。

耐热核酸酶试验:热稳定性是金黄色葡萄球菌核酸酶所特有的,而且也是金黄色葡萄球菌菌株的特性。其试验方法是将在24小时肉汤培养物沸水浴处理15分钟,用接种针穿刺接种于甲苯胺蓝DNA琼脂平板,35℃培养1小时,在刺种线周围蓝色琼脂变为淡粉色者为阳性。大多数金黄色葡萄球菌、施氏葡萄球菌、中间葡萄球菌和猪葡萄球菌试验阳性,表皮葡萄球菌、模仿葡萄球菌、肉葡萄球菌等呈弱阳性。

碱性磷酸酶试验:将待测菌种点种在硝基酚磷酸盐MH琼脂上(pH5.6~6.8),孵育18~24小时。细菌产生的碱性磷酸酶使无色的硝基酚磷酸盐水解,生成黄色硝基酚,点种的细菌菌苔周围呈现黄色为阳性。金黄色葡萄球菌、施氏葡萄球菌、中间葡萄球菌、猪葡萄球菌和大多数表皮葡萄球菌碱性磷酸酶试验阳性。

吡咯烷酮芳基酰胺酶(PYR)试验:酶活性可通过水解吡咯烷酮-β-萘胺进行检测,

其水解产物与相应的显色剂作用产生红色反应。溶血葡萄球菌、路邓葡萄球菌、施氏葡萄球菌和中间葡萄球菌常呈阳性反应。

其他鉴定试验：鸟氨酸脱羧酶试验、脲酶试验、β 半乳糖苷酶试验、VP 试验、新生霉素敏感试验、多黏菌素 B 耐药试验等常用于葡萄球菌种间鉴别。目前商品化鉴定系统多应用糖发酵、传统鉴定试验及酶的产色底物试验，常见的有 API staph 鉴定板条、VITEK GPI 鉴定板卡、Uiten 革兰阳性鉴定卡、Microscan 系统、Miniten 系统等。

肠毒素测定：对于食物中毒患者的呕吐物、粪便或剩余食物在作细菌分离鉴定的同时，接种于肉汤培养基中，孵育后加热煮沸 30 分钟以破坏其他毒素，取滤液注射于 6~8 周龄的幼猫腹腔。一般，猫在注射后 4 小时内出现呕吐、腹泻、体温升高或死亡提示有肠毒素存在的可能。动物常在 1~2 天内中毒死亡。近年来，采用免疫学方法检测葡萄球菌肠毒素方法繁多，如反向间接血凝、ELISA、放射免疫等方法较快速敏感。

4. 三种常见的葡萄球菌的鉴定 见（表 22-1）。

表 22-1 三种葡萄球菌的主要生理生化特征

性状	金黄色葡萄球菌	表皮葡萄球菌	腐生葡萄球菌
菌落色素	金黄色	白色	白色或柠檬色
血浆凝固酶	+	-	-
甘露醇	+	-	-
溶血素	+	-	-
SPA	+	-	-
耐热核酸酶	+	-	-
磷壁酸核糖型	+	-	+
磷壁酸甘油型	-	+	+
致病性	强	弱或无	无

四、耐药性

耐甲氧西林葡萄球菌（methicillin resistant staphylococcus, MRS）的耐药机制是由于其染色体上携带 mecA 基因，该基因编码一种称之为 PBP_{2a}。的青霉素结合蛋白（penicillin binding protein PBP）。青霉素结合蛋白是一种参与细菌细胞壁合成的酶，也是 β 内酰胺类药物的作用靶位。PBP_{2a}与 β 内酰胺类抗生素的亲合力极低，在高浓度抗生素存在时，PBP_{2a}仍可正常工作，参与细胞壁肽聚糖的合成，从而使细菌表现出对甲氧西林以及其他 β 内酰胺类药物的耐药性。

MRS 具有异质性，即在耐药群体中虽然都携带有耐药基因信息，但仅有少部分（10⁻⁸~10⁻⁴）细菌细胞在体外检测时表达耐药表型。对于异质性耐药株的检测在很大程度上依赖于合适的体外培养条件以促进其耐药表型的表达，这些条件包括中性 pH、较低的温度（30~35℃）、高盐（2%~4% NaCl）以及较长的孵育培养时间。

MRS 呈多重耐药，除对包括所有头孢菌素、碳青霉烯类、青霉素 + 青霉素酶抑制剂等抗生素均耐药外，还可对包括大环内酯类、氨基糖苷类、喹诺酮类等抗生素耐药。有重要临床意义的多重耐药葡萄球菌包括甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌（MRSA）、甲氧西林耐药表