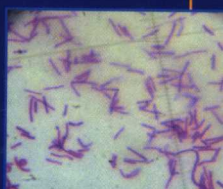
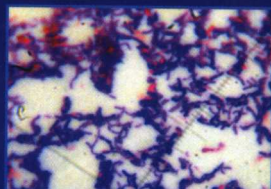
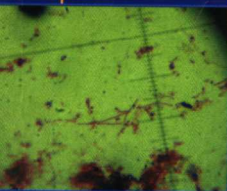


临床厌氧菌 检测及图解



LINCHUANG YANYANGJUN
JIANCE JI TUIJIE

●
罗 予 冯羨菊/编著

中国协和医科大学出版社

临床厌氧菌检测及图解

罗 予 冯美菊 编著

中国协和医科大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

临床厌氧菌检测及图解 / 罗予, 冯羨菊编著. —北京: 中国协和医科大学出版社, 2006. 12

ISBN 7-81072-819-9

I. 临… II. 罗… III. 厌氧杆菌属-实验室诊断-图解
IV. R446.5-64

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 114895 号

临床厌氧菌检测及图解

编 著: 罗 予 冯羨菊
责任编辑: 谢 阳

出版发行: 中国协和医科大学出版社
(北京东单三条九号 邮编 100730 电话 65260378)

网 址: www.pumcp.com
经 销: 新华书店总店北京发行所
印 刷: 北京丽源印刷厂

开 本: 850 × 1168 毫米 1/32 开
印 张: 4
彩 图: 16
字 数: 70 千字
版 次: 2007 年 3 月第一版 2007 年 3 月第一次印刷
印 数: 1-3000
定 价: 25.00 元

ISBN 7-81072-819-9/R·812

(凡购本书, 如有缺页、倒页、脱页及其他质量问题, 由本社发行部调换)

序

厌氧细菌学的崛起，不仅向人们展示了一个前所未知或知之不多的丰富多彩的微生物世界，并且大大地促进了一门新型的医学基础学科——微生态学的迅猛地发展。

过去临床上有许多所谓“无菌性炎症（或脓肿）”、或“原因不明的发热”、或者是感染反复发作或迁延不愈等这些病症，绝大多数都与厌氧菌感染密切相关。我国厌氧菌检验技术和手段比较落后，这类技术推广也有诸多困难，须改进和普及开展。

尤其是微生态学发展，过去鲜为人知的专性厌氧菌差不多都是微生态系统中主要的原籍种群，并经研究证实：在人的肠道中（即肠内容物中）99%的种群为厌氧菌，而需氧的或兼性菌——肠杆菌不过仅占1%，如果不认识厌氧菌，对微生态学认识也就无从谈起。

现今出版的《临床厌氧菌检验及图解》一书，由河南省医学科学研究所罗予主任等编著，此书有三大特点：其一为较全面介绍了临床厌氧菌的一般检测技术和微生态学中肠道菌群分析的检测方法；其二是此书较详细地将厌氧细菌重要的菌属、菌种图

谱展现，令读者一目了然；其三是作者将自己和研究生所做的分子生物学工作言简意赅应用于厌氧菌的分离和检测中，为厌氧菌的分离和鉴定技术的发展起着一定的推动作用。

愿本书为广大读者提供相当的帮助。

中华预防医学会微生态分会主任

熊德鑫

2006年10月于北京

前 言

厌氧菌是一类在无氧环境下生长的细菌，厌氧菌广泛分布于自然界的土壤、沼泽、湖泊、海洋、河流沉渣、污水、食物及人和动物体中。厌氧菌寄生在人和动物的皮肤深层和黏膜表面，厌氧菌群组成了重要的消化道菌群和膜菌群，与机体的生长发育、新陈代谢、营养、免疫、衰老、致病均有极其密切的关系。厌氧菌感染涉及临床各科，如由厌氧菌感染引起的菌血症占到10%~20%，但用医院常规细菌培养方法不能检出，而诊为“原因不明发热”，不能选用针对性药物治疗，是某些感染性疾病迁延不愈和反复发作的重要原因之一。目前国内少数临床细菌室和实验室能作为常规项目开展厌氧菌检测，因此，推广普及该检测对提高抗感染治疗水平有重要意义。

作者及所在研究室在蔡访勤研究员的指导下，建立肠道菌群检测技术、无芽孢厌氧菌培养和鉴定技术；20年来，先后开展了牙髓和牙周炎、深部脓肿、眼内炎、前列腺炎等厌氧菌检测，进行了乳酸杆菌、双歧杆菌调节机体肠道菌群和免疫刺激作用的研究等微生态学研究。长期从事这些工作的经历，深感其繁琐、费时、所需材料和试剂不易得到、不同厌氧菌和菌群辨别困难，不能及时报告检测结果，指导临床诊治作用降低。对此，我们对传统的厌氧菌检测程序、菌群检测技术加以改进，如2~4天可以报告厌氧菌初步鉴定加药敏的结果：近年来，我们开展了分子

生物学技术检测厌氧菌的研究工作。作者结合这些工作经验，收集有关照片，参考近年来国内外厌氧菌检测技术，本着实用直观的原则编写本书，希望能对国内普及厌氧菌检测工作和微生物学研究有所帮助。

本书的编撰受到复旦大学医学院王文风教授的热情支持和帮助，对此我们表示衷心的感谢！值得指出的是大病初愈的蔡访勤研究员对本书进行审阅和修改，我们深感敬佩和感谢；本书在编写过程中得到卞广林和王国钺硕士生对有关资料收集，孟林敏高级实验师和赵国新实验师的帮助，在此，致以衷心感谢。

由于编者水平有限，书中很可能尚有错漏和不妥之处，恳请专家和读者批评指正，以便日后完善。

郑州大学 河南省医学科学研究所

罗 予

2007 年 1 月 12 日

目 录

第一章 概述	(1)
一、基本概念和分类	(1)
二、人体正常菌群中厌氧菌的种类与分布	(2)
第二章 厌氧菌分类和图谱	(5)
一、类杆菌属	(5)
二、普雷沃菌属	(5)
三、卟啉单胞菌属	(6)
四、梭杆菌属	(6)
五、梭状芽胞杆菌属	(6)
六、革兰阳性无芽胞杆菌	(7)
七、韦荣球菌属	(11)
八、革兰阳性厌氧球菌	(11)
第三章 厌氧菌的分离培养、鉴定	(37)
一、厌氧菌临床标本采取技术与器具	(37)
(一) 要求	(37)
(二) 转送标本的容器	(37)
(三) 采样方法	(37)

二、厌氧环境建立方法	(38)
(一) 厌氧罐	(38)
(二) 厌氧手套箱	(41)
(三) 厌氧工作站	(42)
(四) 微生物自动化培养系统	(43)
(五) 生物袋法	(44)
(六) 厌氧培养皿法	(44)
(七) 其他方法	(44)
三、常规培养鉴定方法	(44)
(一) 初代培养	(44)
(二) 次代培养 (分纯传代)	(45)
(三) 生化反应	(45)
四、快速鉴定方法	(59)
(一) 色谱法	(59)
(二) 免疫荧光法	(62)
(三) 分子生物学技术方法	(64)
第四章 菌群测定	(74)
一、常用的选择培养基和受检菌群	(74)
二、菌群培养、鉴别计数方法	(74)
三、大便菌群检测结果	(79)
四、快速菌群测定	(82)
第五章 药敏试验	(84)
一、常用药敏方法	(84)
二、药敏分析系统	(86)

第六章 厌氧菌常用培养基和抗厌氧菌药	(87)
一、要求	(87)
二、基础培养基	(87)
三、选择培养基	(91)
四、生物学特性鉴定培养基	(99)
五、转送培养基	(101)
六、氧化还原指示剂	(102)
七、氯化血红素、维生素 K ₁ 添加液	(103)
八、抗厌氧菌药	(103)
参考文献	(105)
附	(107)

第一章 概 述

一、基本概念和分类

巴斯德 (Pasteur) 在 1863 年最早提出厌氧菌的定义: 形态为杆菌, 在缺少氧气情况下发酵丁酸 (butyric acid)。随着人们对厌氧菌认识的不断深入, 目前专家根据细菌对氧气的需求不同, 分别定义为:

1. 对氧极端敏感的厌氧菌 (extreme oxygen sensitive anaerobes, EOSA): 即极端厌氧菌。它们在 0.5% 氧分压下或空气中暴露不到 10 分钟即死亡。此种菌在临床实验室中极少分离到, 密螺旋体、月形单胞菌和丁酸弧菌等就是这类细菌。

2. 中度厌氧菌 (moderate anaerobes): 能在 2% ~ 8% 氧分压中生长。在空气中暴露 60 ~ 90 分钟, 或在脓汁抽出 72 小时后还能够分离出来。临床上能被分离出来的厌氧菌如脆弱类杆菌, 产气荚膜梭菌及其他各种常见的厌氧菌均属此类。

3. 耐氧厌氧菌 (aerotolerant anaerobes): 这种菌在有氧条件下也能生长, 但较差, 在无氧条件下生长最好。第三梭菌和溶组织梭菌即属此类。

4. 微需氧菌 (microaerophilic bacteria): 这种细菌在大气中及无氧条件下均不能生长。只能在含 5% ~ 10% CO₂ 和 5% O₂ 条件下生长。这类细菌主要有弯曲菌。丙酸杆菌属、乳杆菌属、放线菌属、双歧杆菌属和消化链球菌属也有部分菌种是微需氧菌。

5. 兼性厌氧菌 (facultative anaerobes): 这种细菌在有氧或

无氧条件下都能生长。目前常规细菌培养中,大多数细菌如大肠杆菌和葡萄球菌及铜绿假单胞菌等均属此类。

习惯上将前四者称为厌氧菌,最后者归为需氧菌。

厌氧菌不需要氧作为生长代谢活动的终末电子受体,它们的能量主要来自发酵反应。分子氧抑制厌氧菌生长的机制可能与分子氧能刺激辅酶Ⅱ(NADH)氧化酶活性,使NADH大量消耗,能量新陈代谢受阻和分子氧干扰RNA合成有关;也可能同厌氧菌缺少细胞色素和细胞色素氧化酶、触酶和过氧化物酶、超氧化物歧化酶(SOD)有关。缺少这些酶,可致能量不足和引起细菌核酸及酶的变性,损伤细胞壁导致死亡。厌氧菌的生长需在一个有效低氧化还原电势(Eh)环境中生长。Eh是一种物质能接受电子(被还原)或放出电子(被氧化)的势能。环境中的Eh高低与其含氧浓度成正比。正常组织中Eh约150mV,有氧环境中的培养基表面Eh约为+300mV,人的结肠中Eh为-250mV,含氧量极低。种类繁多的厌氧菌对Eh要求不一。

二、人体正常菌群中厌氧菌的种类与分布

人体正常菌群中厌氧菌的种类与分布见表1-1。在肠道、粪便中,厌氧菌与需氧菌数量比约为100~1000:1。厌氧菌常见属、种见表1-2,表中可见,无芽胞厌氧菌比有芽胞厌氧菌数量多,临床意义大。由于分离培养技术和分类技术的改进,近年来又有了不少新种、新属出现。

在正常情况下,厌氧菌菌群以一种生态平衡存在于人体体表、黏膜表面、肠腔内,对机体并不致病。在长期使用免疫抑制剂、广谱抗生素的情况下,引起黏膜菌群、肠腔内菌群失调及局部皮肤和黏膜损伤等,引起细菌移位,造成机体感染。据报道,厌氧菌感染涉及到临床各科。牙周及根管感染中,厌氧菌感染占50%~60%,败血症中,厌氧菌败血症占10%~20%,

女性生殖道，厌氧菌感染为 60% ~ 70%；在吸入性肺炎中，80% 可检出厌氧菌。其他眼内炎，中耳炎、前列腺炎等均有厌氧菌感染的报道，肠道内菌群紊乱，微生态平衡失调成为腹泻的一个重要病因。

表 1-1 人体正常菌群中厌氧菌的种类与分布**

分布 部位	芽胞 杆菌	无 芽 胞 杆 菌						球菌			
	革兰 阳性	革 兰 阳 性					革 兰 阴 性				
	梭状 芽胞 杆菌属	放线 菌属	双歧 杆 菌属	优杆 菌属	乳杆 菌属	丙酸 杆 菌属	类杆菌 属、普 雷沃菌 属、卞 啉单胞 菌属	梭杆 菌属	弧菌 属	革兰 阳性	革兰 阴性
皮肤	0	0	0	±	0	++	0	0	0	+	0
上呼吸道*	0	+	0	±	0	+	+	+	+	+	+
口 腔	±	+	+	+	+	±	++	+	+	++	++
肠 道	++	±	++	++	+	±	++	+	±	++	+
外生殖道	0	0	0	未知	0	未知	+	+	0	+	0
尿 道	±	0	0	未知	±	0	+	+	±	±	未知
阴 道	±	0	+	±	++	+	+	±	+	+	+

注：“0”极少或无；“±”无规律性；“+”常见；“++”大量，常见。

* 包括鼻、咽、喉和扁桃体；** 包含厌氧，微需氧和兼性厌氧 3 类。

表 1-2 厌氧菌常见属和种

形态	染色性	常见的属和种
杆菌	革兰阳性有芽胞	梭菌属：产气荚膜梭菌
	革兰阳性无芽胞	放线菌属：衣氏放线菌
		双歧杆菌属：婴儿双歧杆菌，青春双歧杆菌
		丙酸杆菌属：痤疮丙酸杆菌
		乳杆菌属：嗜酸乳杆菌
		优杆菌属：迟缓优杆菌
球菌	革兰阴性无芽胞	类杆菌属：脆弱类杆菌，
		普雷沃菌属：产黑素普雷沃菌
		卟啉单胞菌属：不解糖卟啉单胞菌
		梭杆菌属：具核梭杆菌
球菌	革兰阳性无芽胞	消化球菌属：黑色消化球菌
		消化链球菌属：大消化链球菌
	革兰阴性无芽胞	韦荣球菌属：小韦荣球菌

(罗 予)

第二章 厌氧菌分类和图谱

一、类杆菌属

类杆菌属 (*Bacteroides*): 是革兰阴性无芽胞杆菌, 有多形态性, 少数菌有荚膜或鞭毛, 有 26 个种, 其中 15 个菌种能在胆管中发炎。模式菌种为脆弱类杆菌 (*B. fragilis*)。本属在临床厌氧菌感染中很常见, 其中又以脆弱类杆菌所占比例最高。国内孙荫等报告 96 例阑尾炎中, 厌氧菌总阳性率 70.8%, 分离到 72 株厌氧菌, 其中脆弱类杆菌占 72.2%。

判别点: 35~37℃厌氧培养 36~48 小时, 类杆菌选择性培养基 (如 Bd 基) 平板上生长出白或灰白、半透明, 圆形中小菌落, 耐氧试验不生长; 能在 20% 胆盐中生长的为胆汁耐受类杆菌, 如脆弱类杆菌群。涂片为革兰阴性杆菌或球杆菌, 染色不均、两端圆而浓染、中间不染色或染色较浅、似为空泡, 或菌体形态如肠杆菌, 见图 2-1~2-6。菌落形态见图 2-7。形成 L 型细菌的类杆菌呈现增粗增长、菌体模糊或呈长丝状菌体形态, 见图 2-8~2-10。

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, 革兰阴性无芽胞杆菌, 有多形态性, 有 20 个种, 其中产黑色素的有 8 个种, 余 12 个种不产色素。模式菌种为产黑色素普雷沃菌 (*P. melaninogenica*), 常从牙龈炎和牙周炎标本中分离到。

判别点: 35~37℃厌氧培养 36~48 小时, 类杆菌选择性培养

基（如 Bd 基）平板上生长出灰白、圆形中小菌落，耐氧试验不生长；菌落在紫外光（波长 36.5nm）照射下有砖红色荧光且渐转为褐黑色或棕色菌落，色素出现后，荧光消失，为产色素菌种。菌体形态为革兰阴性球杆状，见图 2-11，菌落形态见图 2-12。

三、卟啉单胞菌属

卟啉单胞菌属（*Porphyromonas*）是从类杆菌属分出的一个新菌属，革兰阴性无芽胞杆菌，有 12 个种，与人类有关的主要有 3 个种，即不解糖卟啉单胞菌、牙龈卟啉单胞菌和牙髓卟啉单胞菌。代表菌种是不解糖卟啉单胞菌（*P. asaccharolytica*）。其菌落和菌体形态类似产黑素普雷沃菌，菌落有荧光和色素，球杆状菌体。与产黑素普雷沃菌鉴别点是本属的 3 个主要菌种生化反应中不发酵葡萄糖、乳糖和蔗糖。

四、梭杆菌属

梭杆菌属（*Fusobacterium*）：为革兰阴性无芽胞杆菌，无鞭毛，人来源有 12 个种，其他来源有 4 个种，模式菌种为具核梭杆菌（*F. nucleatum*）。是临床较常见厌氧菌感染分离菌。

判别点：36~37℃厌氧培养 48 小时，梭杆菌培养基（如 FS 基）平板上生长出灰白，边缘不整或面包屑状小菌落，革兰染色为阴性无芽胞杆菌，菌体细长、两头尖，有的呈多形性，菌体膨大有空泡。菌体上有革兰阳性颗粒的多为具核梭杆菌。菌体形态见图 2-13~2-16。

五、梭状芽胞杆菌属

梭状芽胞杆菌属（*Clostridium*）：简称梭菌属，有 130 个种，是革兰阳性芽胞杆菌，但易变成阴性，有动力或无动力。菌体中常有圆形或卵圆形芽胞，使菌体中部膨大呈梭形。有些菌种

能在不同程度上耐氧，也有少数菌种很难形成芽胞。本属的某些菌种能产生外毒素引起腹泻、食物中毒等严重的疾病，甚至致命。肉毒梭菌、破伤风梭菌、产气荚膜梭菌、艰难梭菌，诺锥梭菌和败毒梭菌等，都能产生外毒素。对临床有意义的菌种有双发酵梭菌、肉毒梭菌、破伤风梭菌、产气荚膜梭菌、艰难梭菌、诺锥梭菌、溶血梭菌、溶组织梭菌、腐败梭菌等 30 多种。

判别点：36 ~ 37℃ 厌氧培养 48 小时，梭菌培养基（如 cd 基）平板上生长出黄白或扁平大、中、小菌落，或菌落周围有乳白环。其中的艰难梭菌菌落表面有斑点，不透明，不溶血，生化鉴定要点是能发酵葡萄糖和果糖，水解七叶灵和液化明胶，其余均阴性；产气荚膜梭菌菌落大，扁圆，半透明，在少量氧的环境中仍能生长、溶血，在牛乳培养基中有“汹涌发酵”之称；肉毒梭菌菌落表面有斑点，边缘不整，半透明或灰白色，有乙型溶血，生化鉴定要点是，发酵葡萄糖，不发酵乳糖和甘露醇、不产生吡啶、不还原硝酸盐、能液化明胶。对不易形成芽胞的细菌，可放 30℃ 庖肉培养，易形成芽胞。革兰染色为阳性粗大杆菌或球杆菌或有芽胞杆菌，菌体形态见图 2 - 17 ~ 2 - 19。

六、革兰阳性无芽胞杆菌

革兰阳性无芽胞杆菌：包括有乳杆菌属，双歧杆菌属、丙酸杆菌属、放线菌属，真杆菌属和丙酸蛛网菌属等。它们的菌落、生化反应、菌体相似，鉴别不易。可用气液相色谱法（GLC）检测其脂肪酸代谢产物和检测细菌特征，见表 2 - 1 和表 2 - 2。依此定属，再依据各属的生化反应定种。