

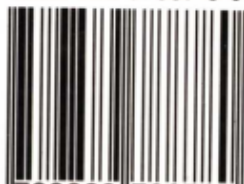
病原微生物实验室

生物安全管理条例

实施手册

封面设计：王 雨

ISBN 988-97887-8-0



9 789889 788780 >

ISBN 988-97887-8-0

定价：998.00 元(手册四卷+1CD)

63.16023

01

12

病原微生物实验室生物安全管理条例实施手册

主编：覃先峰

[第二卷]

中国科技文化出版社

表 3-82 主要立克次体与变形杆菌菌株抗原交叉现象

| 立克次体 | 变形杆菌菌株 | | |
|----------|-------------------|-----------------|-----------------|
| | OX ₁₄₉ | OX ₂ | OX _K |
| 普氏立克次体 | +++ | + | - |
| 斑疹伤寒立克次体 | +++ | + | - |
| 恙虫病立克次体 | - | - | +++ |
| Q 热柯克斯体 | - | - | - |
| 五日热巴通体 | - | - | - |

2. 致病性与免疫性

感染途径 人类感染立克次体主要通过节肢动物如人虱、鼠蚤、蜱或螨的叮咬而传播。人虱、鼠蚤在叮咬处排出含有立克次体的粪便而污染伤口侵入人体；以蜱、螨为媒介的传播途径是在叮咬处立克次体直接进入人体；Q 热立克次体的传播可经接触、呼吸道或消化道途径感染人类。

致病机制 立克次体的致病物质主要有内毒素和磷脂酶 A 两类。立克次体内毒素的主要成分为脂多糖，具有肠道杆菌内毒素相似的多种生物学活性，如致热原性，损伤内皮细胞，致微循环障碍和中毒性休克等。磷脂酶 A 能溶解宿主细胞膜或细胞内吞噬体膜，以利于立克次体穿入宿主细胞并在其中生长繁殖。此外立克次体表面粘液层结构有利于粘附到宿主细胞表面和抗吞噬作用，增强其对易感细胞的侵袭力。

立克次体侵入皮肤后与宿主细胞膜上的特异受体结合，然后被吞入宿主细胞内。不同立克次体在细胞内有不同的增殖过程。普氏立克次体在吞噬体内，依靠磷脂酶 A 溶解吞噬体膜的甘油磷脂而进入胞质，并进行分裂繁殖，大量积累后导致细胞破裂。立氏立克次体通过丝状伪足 (filopodia) 离开细胞；恙虫病立克次体通过出芽方式释放；柯克斯体则主要在吞噬溶酶体性质的膜性液泡中生长，然后使细胞破裂和释放柯克斯体；五日热巴通体在细胞表面生长释放。

立克次体先在局部淋巴组织或小血管内皮细胞中增殖，产生初次立克次体血症。再经血流扩散至全身器官的小血管内皮细胞中繁殖后，大量立克次体释放入血导致第二次立克次体血症。由立克次体产生的内毒素等毒性物质也随血流波及全身，引起毒血症。

立克次体损伤血管内皮细胞，引起细胞肿胀、组织坏死和血管通透性增高，导致血浆渗出，血容量降低以及凝血机制障碍、DIC 等。在体内细胞因子 (如 IFN- γ 等) 和 CTL 的作用下，立克次体感染的宿主细胞被溶解。不同种类立克次体的致病特

点有所不同,但其基本病理改变部位在血管,主要病变是血管内皮细胞大量增生,血栓形成以及血管壁有节段性或圆形坏死等。此外还伴有全身实质性脏器的血管周围广泛性病变,常见于皮肤、心脏、肺和脑。

感染立克次体后,体内可形成抗原抗体免疫复合物,进而加重病理变化及临床症状。严重者可因心、肾衰竭而死亡。

所致疾病 由立克次体引起的疾病统称为立克次体病。不同的立克次体所引起的疾病各不相同,主要包括斑疹伤寒、恙虫病、Q热、埃立克体病、巴通体病以及猫抓病等(表3-82)。

免疫性 立克次体是严格细胞内寄生的病原体,故体内抗感染免疫以细胞免疫为主,体液免疫为辅。机体感染后产生的群和种特异性抗体,有促进巨噬细胞的吞噬及中和毒性物质的作用。由细胞免疫产生的细胞因子,有激活、增强巨噬细胞杀灭细胞内立克次体的作用。病后可获得较强的免疫力。

3. 诊断与防治

微生物学检查法 因立克次体特别容易引起实验室感染,必须严格遵守实验室操作规程,注意防止感染事故的发生。

(1)标本的采集 主要采集病人的血液以供病原体分离或作免疫学试验。流行病学调查时,尚需采集野生小动物和家畜的器官,以及节肢动物等。

一般在发病初期或急性期和应用抗生素前采血,否则很难获得阳性分离结果。血清学试验需采集急性期与恢复期双份血清,以观察抗体滴度是否增长。

(2)分离培养 由于检材中立克次体含量较低,直接镜检意义不大。可将检材(血液、血块或其他组织悬液)接种至易感动物腹腔。除恙虫病立克次体和小株立克次体接种小鼠外,其他均用雄性豚鼠分离。若接种后豚鼠体温 $>40^{\circ}\text{C}$,同时有阴囊红肿,表示有立克次体感染,应进一步将分离出的毒株适应于鸡胚或细胞培养,用免疫荧光试验加以鉴定。

感染组织和皮肤病变活检标本可用免疫荧光法、免疫蛋白印迹法、蛋白质指纹图谱分析法等鉴定。

(3)血清学试验 非特异性外斐反应是用普通变形杆菌的菌株抗原代替立克次体抗原检测患者血清中有无立克次体抗体的凝集试验。如滴度 $\geq 1:160$ 或随病程延长而血清滴度增长 ≥ 4 倍,为阳性反应。流行性和地方性斑疹伤寒、恙虫病患者可出现阳性反应。由于该试验为非特异性,必须同时结合流行病学和临床症状才能作出正确诊断。

此外,还可以采用ELISA法或免疫荧光法检测血清中特异抗体。

防治原则 预防立克次体病的重点是控制和消灭其中间宿主以及储存宿主,如灭鼠、杀灭媒介节肢动物,加强个人自身防护,能有效的防止斑疹伤寒、恙虫热、斑点

热的流行。

特异性预防方面,目前多采用经 γ 射线辐射的全细胞灭活疫苗,如预防斑疹伤寒的鼠肺疫苗、鸡胚疫苗等。立克次体重组的变异性外膜蛋白(variable outer-membraneprotein, VOMP)是候选的亚单位疫苗,正在预试阶段。

氯霉素、四环素类抗生素(包括强力霉素)对各种立克次体均有效,可使病程缩短,病死率明显下降。但病原体彻底清除或病人的健康恢复主要依赖于人体的免疫功能,特别是细胞免疫功能状况。应注意磺胺类药物不能抑制立克次体生长,反而会促进其繁殖作用。

(二)主要致病性立克次体

普氏立克次体 普氏立克次体是流行性斑疹伤寒(又称虱传斑疹伤寒)的病原体。病人是惟一传染源,体虱是主要传播媒介,传播方式为虱-人-虱(图3-72)。虱叮咬病人后,立克次体进入虱肠管上皮细胞内繁殖。当受染虱再去叮咬健康人时,立克次体随粪便排泄于皮肤上,进而可从搔抓的皮肤破损处侵入体内。此外,立克次体在干虱粪中能保持感染性达二个月左右,可经呼吸道或眼结膜使人感染。该病的流行多与生活条件的拥挤、不卫生有关,因此多发生于战争、饥荒及自然灾害时期。

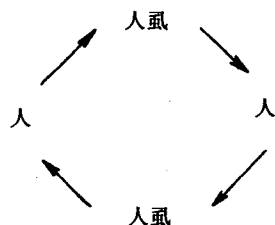


图3-72 流行性斑疹伤寒传播方式

人感染立克次体后,经两周左右的潜伏期骤然发病,主要症状为高热、头痛、皮疹,有的伴有神经系统、心血管系统或其他脏器损害。病后免疫力持久,与斑疹伤寒立克次体感染有交叉免疫。

斑疹伤寒立克次体 斑疹伤寒立克次体是地方性斑疹伤寒(又称鼠型斑疹伤寒)的病原体。鼠是主要储存宿主,传播媒介主要是鼠蚤或鼠虱,感染的自然周期是鼠-蚤-鼠(图3-73)。鼠蚤叮吮人血时,可将立克次体传染给人。带有立克次体的干燥蚤粪有可能经口、鼻、眼结膜进入人体而致病。该病的临床症状与流行性斑疹伤寒相似,但发病缓慢、病情较轻,很少累及中枢神经系统、心肌等。

恙虫病立克次体 恙虫病立克次体是恙虫病的病原体。主要流行于东南亚、西南太平洋岛屿,因此又称东方立克次体(*R. orientalis*)。国内主要见于东南和西南地区。

恙虫病是一种自然疫源性疾病,主要流行于啮齿动物。野鼠和家鼠感染后多无

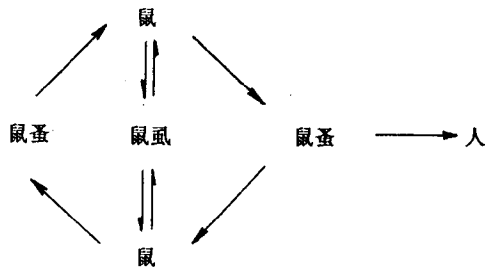


图 3-73 地方性斑疹伤寒传播方式

症状,但体内长期保留病原体,故为主要传染源。此外,兔类、鸟类等也能感染或携带恙螨而成为传染源。

恙螨是传播媒介,又是储存宿主(图 3-74)。恙虫病立克次体寄居在恙螨体内,可经卵传代。

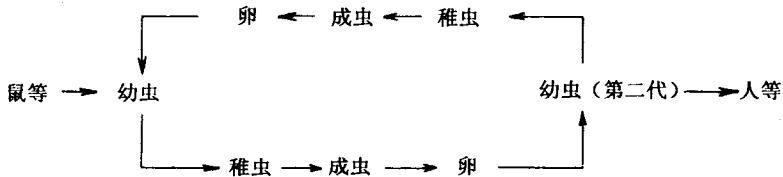


图 3-74 恙虫病传播方式

立克次体借助恙螨的叮咬而在鼠间传播。恙螨幼虫叮咬人时,立克次体侵入人体,叮咬处先出现红色丘疹,成水疱后破裂,溃疡处形成黑色焦痂,是恙虫病特征之一。病原体在局部繁殖后经淋巴系统入血循环,产生立克次体血症。病原体释出的毒素,可引起发热、皮疹,全身淋巴结肿大及各内脏器官的病变。

病后有较持久的免疫力。

贝纳柯克斯体贝纳柯克斯体又称 Q 热柯克斯体,是引起 Q 热的病原体(query fever, 疑问热,指最初不明病因的发热)。其基因组分子量为 1.04×10^9 ,含 1.6×10^6 bp,约为大肠埃希菌的 1/3。近年来已分离其基因达 13 个之多,分别与编码立克次体代谢酶有关(如 pyrB、gltA、sdhCDAB 基因),或与编码表面抗原有关(tpA、tpB、comI 基因),或与编码毒力因子有关(sod、mucz、ebbE、dnaJ、qrsA 基因)。此外,还发现贝纳柯克斯体带有 4 种不同的质粒,分别为 36kb QpHI、39kb QpRS、33.5kbQpDV 和 51kb QpDG,其功能尚未阐明。

贝纳柯克斯体存在着抗原相的变异现象,此因适应不同宿主而表现出两相抗原性,其中主要是 LPS 变异。从人、动物或蜱体内新分离的立克次体为 I 相,含完整的抗原组份,具光滑 Lps(LPSI),毒力强。若经人工传代后成为含粗糙 Lps(LPSII)的 II 相弱毒株。

Q 热的传染源主要是受染的牛、羊等家畜,在动物间的传播是以蜱为传播媒介并

可经卵传代。动物感染后多无症状,但乳汁、尿、粪中可长期带有病原体。人类经接触或呼吸道等途径受染。

Q热的临床症状主要有发热、头痛、腰痛等,部分重症病例可并发心内膜炎。

抵抗力大于一般无芽胞细菌。耐热,牛乳需煮沸 10min 以上才能杀死。耐干燥,在蝉干粪中可存活一年以上。1%甲醛需 48h 才能将其灭活。

病后有一定免疫力,以细胞免疫为主。

预防应着重防止家畜的感染,对乳制品严格消毒。对易感人群可接种用 I 相菌株制成的灭活疫苗或减毒活疫苗。对牛、羊也可采用疫苗接种。

汉赛巴通体 汉赛巴通体是猫抓病(cat scratch disease, CSD)的主要病原体。革兰阴性小杆菌,大小为 $1 \times 0.5\mu\text{m}$ 左右。由临床新鲜标本中分离的汉赛巴通体有菌毛,而经实验室传代后可失去菌毛。其生化反应不活泼,不发酵各种糖类。传染源主要为猫,尤其是幼猫。90%以上的患者与猫或狗有接触史,75%的病例有被猫或狗抓伤、咬伤的历史,猫口腔、咽部的病原体经伤口或通过其污染的毛皮、脚爪侵入而传播,多发于学龄前儿童及青少年。

由于近年来国内外养宠物者增多,因此猫抓病病例增加。病原体从抓伤处进入体内,局部皮肤出现丘疹或脓疱,继而发展为以局部引流淋巴结肿大为特征的临床综合征,出现发热、厌食、肌痛、脾肿大等。常见的临床并发症是结膜炎伴耳前淋巴结肿大(Parinaud 眼淋巴结综合征),系猫抓病的重要特征之一。

汉赛巴通体和五日热巴通体还可引起杆菌性血管瘤—杆菌性紫癜(bacillary angiomatosis - bacillary peliosis, BAP)。BAP 多发生于免疫功能受到严重损害者,如 HIV 感染者、肿瘤或器官移植的病人,其主要表现为皮肤损害和内脏器官小血管增生。杆菌性血管瘤可发生在体内任何实质性器官,而杆菌性紫癜则多见于肝脏、脾脏。

实验室检查可取病灶组织(淋巴结、皮肤、肉芽肿等)作超薄切片,进行组织病理学检查。此外,还可用羊血琼脂或巧克力(色)琼脂等培养基,或采用原代细胞或传代细胞,对新鲜组织标本培养和鉴定。

预防方面尚无特异性措施。与猫、狗接触时避免被抓伤或咬伤,若被抓、咬伤后,可用碘酊局部涂抹。对感染猫进行杀灭。

可采用环丙沙星、红霉素、利福平等治疗感染猫或病人。

十二、衣原体

衣原体(chlamydia)是一类严格在真核细胞内寄生,有独特发育周期,能通过细菌滤器的原核细胞型微生物。过去曾被认为是病毒,现归属于广义细菌中的一类微生物。

衣原体的共同特征是:①革兰阴性,圆形或椭圆形体;②具有细胞壁,其组成与革兰阴性菌相似;③有独特的发育周期,行二分裂方式繁殖;④含有 DNA 和 RAN 两类

核酸;⑤有核糖体和较复杂的酶类,能进行多种代谢。但缺乏供代谢所需的能量来源,必须利用宿主细胞的三磷酸盐和中间代谢产物作为能量来源;⑥对多种抗生素敏感。

衣原体广泛寄生于人类、哺乳动物及禽类,仅少数能致病,能引起人类疾病的衣原体主要有沙眼衣原体和肺炎衣原体。目前在发达国家中,由衣原体感染所致的性传播疾病增加很快,生殖道感染的发病率已超过淋病奈瑟菌感染,成为最常见的性传播疾病。

根据衣原体的抗原结构和 DNA 同源性的特点,将衣原体属(*Chlamydiae*)分为四个种,包括沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)、肺炎衣原体(*Chlamydia Pneumoniae*)、鹦鹉热衣原体(*Chlamydia psittaci*)和兽类衣原体(*Chlamydia pecorum*),彼此间的基本性状有差异(表 3-83)。

表 3-83 四种衣原体的性状比较

| 性状 | 沙眼衣原体 | 肺炎衣原体 | 鹦鹉热衣原体 | 兽类衣原体 |
|---------|---------|-----------|----------|-----------|
| 自然宿主 | 人、小鼠 | 人 | 鸟类、低等哺乳类 | 牛、羊 |
| 主要人类疾病 | 沙眼 | 肺炎 | 肺炎 | 呼吸道感染 |
| | 性传播疾病 | 呼吸道感染 | 呼吸道感染 | |
| | 幼儿肺炎 | | | |
| 原体形态 | 圆、椭圆 | 梨形 | 圆、椭圆 | 圆 |
| 包涵体糖原 | + | - | - | - |
| 血清型 | 18 | 1(TWAR 株) | 不明 | 3 |
| DNA 同源性 | 与相同衣原体种 | > 90% | > 90% | 14% ~ 95% |
| | 与不同衣原体种 | < 10% | < 10% | < 10% |
| 对磺胺的敏感性 | 敏感 | 不敏感 | 不敏感 | 不敏感 |

注: TWAR: Taiwan, acute respiratory

(一) 概述

1. 生物学性状

发育周期与形态染色 衣原体在宿主细胞内生长繁殖,具有特殊的发育周期。可观察到两种不同的颗粒结构:一种是小而致密,称为原体(elementary body, EB);另一种是大而疏松,称为始体(initial body),也称为网状体(reticulate body, RB)。

原体呈球形、椭圆形或梨形,直径 0.2 ~ 0.4 μ m。普通光学显微镜下勉强可见;电镜下中央有致密的类核结构,有胞壁,是发育成熟的衣原体。Giemsa 染色呈紫色,Macchiavello 染色呈红色。原体具有高度感染性,在宿主细胞外较为稳定,无繁殖能力。当进入宿主易感细胞后,细胞膜围于原体外形成空泡。原体在空泡中逐渐发育、

增大成为始体。

始体呈圆形或椭圆形,体大,直径 $0.5 \sim 1\mu\text{m}$,电子致密度较低,无胞壁,代谢活泼,以二分裂方式繁殖,在空泡内发育成许多子代原体。最后,成熟的子代原体从破坏的感染细胞中释出;再感染新的易感细胞,开始新的发育周期。每个发育周期约为 $48 \sim 72\text{h}$ (图 3-75)。始体是衣原体发育周期中的繁殖型,不具感染性。Macchiavello 染色呈蓝色(表 3-84)。

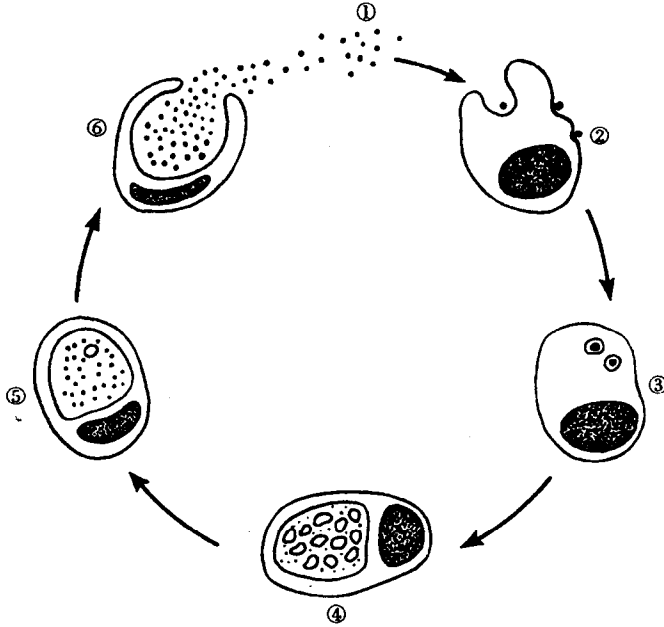


图 3-75 衣原体的发育周期

- ①EB ②0h, 吸附的 EB 被吞入细胞质
- ③8h, EB 发育成 RB ④24h, RB 增殖
- ⑤30h, RB 分化成 EB, 包涵体形成
- ⑥48h, 细胞破裂, 释放 EB

表 3-84 原体和始体的性状比较

| 性 状 | 原 体 | 始 体 |
|------------------------|---------|-------|
| 大小(直径, μm) | 0.2~0.4 | 0.5~1 |
| 细胞壁 | + | - |
| 代谢活性 | - | ++ |
| 胞外稳定性 | + | - |
| 感染性 | + | - |
| 繁殖能力 | - | + |
| 毒性 | + | - |

包涵体系指在易感细胞内含繁殖的始体和子代原体的空泡。由于发育时期不同,包涵体的形态和大小都有差别。成熟的包涵体含大量的原体。

培养特性 衣原体营专性细胞内寄生。绝大多数能在 6~8d 龄鸡胚或鸭胚卵黄囊中生长繁殖,并可在卵黄囊膜内找到包涵体、原体和始体颗粒。某些衣原体可使小鼠感染,如鸚鵡热衣原体接种小鼠腹腔;性病淋巴肉芽肿衣原体接种小鼠脑内。

衣原体可在某些原代或传代细胞株中生长,如 HeLa - 299、BHK - 21、McCoy 或 HL 细胞株,比鸡胚培养更敏感。为提高分离培养阳性率,可将接种标本的细胞离心,促进衣原体进入细胞;或先用 X 线照射细胞使处于非分裂状态,以提高其对衣原体的易感性。

抗原结构 根据细胞壁的不同成分,可分为属、种、型特异抗原。

(1)属特异抗原 位于胞壁,为脂多糖,类似革兰阴性菌的脂蛋白-脂多糖复合物。用补体结合试验检测。

(2)种特异抗原 大多数衣原体的种特异抗原位于主要外膜蛋白(major outer membrane protein, MOMP)上,用补体结合试验和中和试验检测,藉此可鉴别不同种衣原体。

(3)型特异抗原 根据主要外膜蛋白抗原可将每种衣原体分为不同血清型或生物型(biovar)。型特异性差的分子基础是由氨基酸可变区的顺序变化决定的。常用检测的方法是单克隆抗体微量免疫荧光试验。

抵抗力 衣原体对热和常用消毒剂敏感,在 60℃ 仅能存活 5~10min,在 -70℃ 可保存数年,冷冻干燥可保存 30 年以上仍有活性。用 75% 乙醇半分钟或 2% 来苏液 5min 均可杀死衣原体。红霉素、强力霉素和四环素等有抑制衣原体繁殖的作用。

2. 致病性与免疫性

致病机制 衣原体通过创面侵入机体后,原体吸附于易感的柱状或杯状粘膜上皮细胞并在其中繁殖,也能进入单核吞噬细胞繁殖。细胞质围绕原体内陷形成空泡,称吞噬体。原体在空泡内发育成网状体,完成其繁殖过程。细胞内溶酶体如能与吞噬体融合,溶酶体内的水解酶则可将衣原体杀灭。衣原体能产生类似革兰阴性细菌的内毒素毒性物质,抑制宿主细胞代谢,直接破坏宿主细胞。此外,衣原体主要外膜蛋白(MOMP)能阻止吞噬体和溶酶体的融合,从而有利于衣原体在吞噬体内繁殖并破坏宿主细胞。MOMP 的表位还能突变,在体内可以逃避特异性抗体的中和作用而继续感染细胞。在体内抗衣原体的免疫应答过程中,一方面疾病得以缓解,另一方面由 T 细胞与感染细胞的相互作用也会导致免疫病理损伤,产生第 IV 型超敏反应。已有的试验证明经小鼠静脉注入衣原体后,小鼠可出现肺、肠出血和肝坏死,受感染的机体有炎症反应和迟发型超敏反应。沙眼衣原体或 MOMP 成分,可促进单核细胞产生 IL-1 等细胞因子,而 IL-1 是炎症和瘢痕形成的重要因素,沙眼衣原体感染易生成

瘢痕可能与此有关。

不同的衣原体因 MOMP 等不同,其致病性不同,有些只引起人类疾患,例如沙眼衣原体中的沙眼亚种、性病淋巴肉芽肿亚种以及肺炎衣原体。有些是人兽共患病原体,例如鹦鹉热衣原体中部分菌株。有些只引起动物疾病,例如沙眼衣原体中的鼠亚种、鹦鹉热衣原体中的大多数菌株和兽类衣原体。人类感染衣原体后出现的衣原体病主要有沙眼、包涵体结膜炎、泌尿生殖道感染(非淋菌性尿道炎、宫颈炎等)、性病淋巴肉芽肿以及肺炎等。

免疫性 机体感染衣原体后,体内能产生型特异性的细胞免疫和体液免疫。由 MOMP 活化的 T 细胞可分泌细胞因子,抑制衣原体包涵体的发展;特异性中和抗体可以抑制衣原体吸附到宿主细胞,参与抗衣原体感染的中和作用。但这种免疫力不强,因此易造成持续感染和反复感染。此外,机体也可能出现由 IV 型超敏反应造成的免疫病理损伤现象,如性病淋巴肉芽肿等。

(二)主要致病性衣原体

1. 沙眼衣原体

沙眼衣原体除少数菌株来自小鼠外,人类是其主要自然宿主。根据致病力和某些生物学特性的差别,沙眼衣原体可分为三个亚种,即沙眼生物亚种(*Biovar trachoma*)、性病淋巴肉芽肿亚种(*Biovar lymphogranuloma venereum*, LGV)和鼠亚种(*Biovar mouse*)(表 3-85)。

表 3-85 沙眼衣原体三个亚种的比较

| 性 状 | 沙眼亚种 | LGV 种 | 鼠亚种 |
|----------------|-----------|-------|-----------|
| 自然宿主: | | | |
| 人 | + | + | + |
| 小鼠 | - | - | + |
| 易感部位: | | | |
| 鳞状上皮细胞 | + | - | - |
| 淋巴组织 | - | + | - |
| 单核吞噬细胞 | - | + | - |
| 细胞培养: | | | |
| McCoy 细胞培养的阳性率 | 70% ~ 80% | < 50% | 不明 |
| 血清型别数目(个) | 15 | 3 | 不明 |
| 实验动物: | | | |
| 小鼠:脑内接种致死 | - | + | - |
| 灵长类:滤泡性结膜炎 | + | - | - |
| 与沙眼亚种 DNA 同源性 | 100% | 100% | 30% ~ 60% |

(1)沙眼亚种

生物学特性 圆形或椭圆形,不同发育阶段,大小和染色反应不一。原体直径约 $0.3\mu\text{m}$,中央有致密核质,Giemsa染色呈紫红色。网状体直径 $0.5\sim 1\mu\text{m}$,核质分散,Giemsa染色为深蓝或暗紫色。原体能合成糖原,掺入沙眼包涵体的基质组成,故被碘溶液染成棕褐色。

我国学者汤飞凡(1897~1958)在1955年采用鸡胚卵黄囊接种法在世界上首次分离培养出沙眼衣原体,他是世界上发现重要病原体的第一个中国人,开创了沙眼衣原体的实验研究工作。现可采用多种传代细胞对沙眼衣原体进行培养。

采用微量免疫荧光法(MIF)可将沙眼衣原体至少分为18个血清型,其中沙眼生物变种包括A、B、Ba、C、D、Da、E、F、G、H、I、Ia、J和K共14个血清型。LGV生物变种包括 L_1 、 L_2 、 L_{2a} 和 L_3 4个血清型。此外,目前还采用编码MOMP的结构基因寡核苷酸测序、限切酶片段长度多态性(RFLP)等方法分型。

致病性与免疫性 沙眼亚种主要寄生在人类,无动物储存宿主。主要引起以下疾病:

①沙眼 由沙眼亚种A、B、Ba和C血清型引起。主要通过眼—眼或眼—手—眼的途径进行直接或间接接触传播。沙眼衣原体感染眼结膜上皮细胞后,在其中增殖并在细胞质内形成包涵体,引起局部炎症。沙眼的早期症状是流泪、有粘液脓性分泌物、结膜充血及滤泡增生。后期出现结膜瘢痕、眼睑内翻、倒睫以及角膜血管翳引起的角膜损害,影响视力或致盲,是目前世界上致盲的第一位病因。

②包涵体结膜炎 由沙眼亚种B、Ba、D、Da、E、F、G、H、I、Ia、J、及K血清型引起。包括婴儿及成人两类。前者系婴儿通过产道时感染,引起滤泡性结膜炎,其分泌物内含大量衣原体。病变类似沙眼,但不出现角膜血管翳,不形成结膜瘢痕,一般经数周或数月痊愈。

③泌尿生殖道感染 经性接触传播引起的非淋菌性泌尿生殖道感染,其中有50%~60%系沙眼衣原体所致,涉及的血清型与包涵体结膜炎的相同。衣原体感染是男性尿道炎最常见的病因,未经治疗者多数转变成慢性,周期性加重,或可合并附睾炎、前列腺炎等。在女性可引起尿道炎、宫颈炎、输卵管炎、盆腔炎等。衣原体常与淋病奈瑟菌混合感染,淋病奈瑟菌对衣原体繁殖起着激活和促进作用。因此在合并淋病奈瑟菌感染者,沙眼衣原体分离阳性率增高。

机体感染沙眼衣原体后,血清中有特异性抗体,但抗体持续时间短暂。沙眼病愈合后机体免疫力不强,易再受感染。

微生物学检查法 衣原体标本的正确采集和运送方法十分重要。对急性期沙眼或包涵体结膜炎患者,以临床诊断为主。实验室检查,可取眼结膜刮片或眼穹窿部及眼结膜分泌物作涂片。对泌尿生殖道感染者,由于临床症状不一定典型,因而实验室检查很重要,可采用泌尿生殖道拭子或宫颈刮片,少数取精液或其他病灶部分活检标

本,也可以用初段尿离心后涂片。若要作衣原体培养,应注意标本的保存并及时接种到培养细胞中。采集的标本或菌株可加入蔗糖-磷酸盐-谷氨酸盐(SPG)培养基,放-70℃冰箱或液氮保存。衣原体标本的运送常用含抗生素的蔗糖磷酸盐运送培养基。若标本在2h内接种,检出阳性率最高;若在24h内接种,标本可暂时保存在4℃备用。

①直接涂片镜检 采用 Giemsa、碘液或荧光抗体染色镜检,检查上皮细胞内有无包涵体(图3-76)。



图3-76 沙眼衣原体包涵体

结膜涂片 ×650

②分离培养 采用感染组织的刮取物或分泌物,接种鸡胚卵黄囊或传代细胞。衣原体培养较常用的是经放线菌酮处理的单层 McCoy 细胞,或 HeLa-229 细胞及 BHK21 细胞,35℃培养 48~72h。用直接免疫荧光法或酶联免疫法可以检测标本中的衣原体。

③核酸检测 采用多聚酶链反应(PCR)、连接酶链反应(LCR)等核酸扩增技术检测沙眼衣原体,已得到较广泛应用。其中 LCR 采用 4 种寡核苷酸探针(即两对引物),可得到高度的敏感性和特异性诊断。

(2)性病淋巴肉芽肿亚种

生物学特性 LGV 亚种的大小、染色和培养特性均类似沙眼亚种。

引起本病的四个血清型(L₁、L₂、L_{2a}及 L₃)与沙眼亚种 E 型和 C 型有交叉抗原存在。

致病性与免疫性 人是性病淋巴肉芽肿衣原体的自然宿主,无动物储存宿主。主要通过两性接触在人类传播。主要侵犯淋巴组织,在男性侵犯腹股沟淋巴结,引起化脓性淋巴结炎和慢性淋巴肉芽肿,常形成瘰管。在女性侵犯会阴、肛门和直肠,可形成肠皮肤瘰管;也可引起会阴-肛门-直肠狭窄和梗阻。LGV 也能引起伴有耳前、

颌下及颈部淋巴结肿大的结膜炎。

将 LGV 衣原体接种小鼠或猴脑内,可引起脑膜脑炎,但对鸟类不能引起感染。

微生物学检查法 采集淋巴结脓肿、脓液、生殖器溃疡或直肠组织标本待检。LGV 标本的保存、运送以及检测方法,与沙眼亚种相同。LGV 衣原体容易在传代细胞培养,一般不需要特殊的技术处理。检测血清中抗衣原体抗体的血清学诊断试验,在常规临床诊断中价值不大,此因性传播的高危人群多有慢性感染,不易获得衣原体感染急性期和恢复期双份血清进行抗体水平的比较。

防治原则 沙眼的预防重在注意个人卫生,不使用公共毛巾、浴巾和脸盆,避免直接或间接的接触传染,目前尚无特异的预防方法。泌尿生殖道衣原体感染的预防应广泛开展性病知识宣传,提倡健康的性行为,积极治愈病人和带菌者。治疗药物可选用磺胺、红霉素、诺氟沙星等。

2. 肺炎衣原体

肺炎衣原体是衣原体属中的一个新种。只有一个血清型,即 TWAR 组衣原体。这是根据最初分离的两株病原体,即 1965 年自一名台湾小学生眼结膜分离的一株衣原体(Taiwan - 183, TW - 183),和 1983 年自美国大学生急性呼吸道感染者咽部分离的另一株衣原体(acute respiratory - 39, AR - 39),因两株衣原体的抗原性相同,以这两株的字头合并后,称作 TWAR。

生物学特性其原体结构、DNA 序列、培养特性、血清学分析以及致病性与其他衣原体均有不同:

①TWAR 的原体平均直径为 $0.38\mu\text{m}$,在电镜下呈梨形,并有清晰的周浆间隙,原体中无质粒 DNA。

②TWAR 株与鹦鹉热衣原体、沙眼衣原体的 DNA 同源性 $< 10\%$,而不同来源的 TWAR 株都具有 94% 以上的 DNA 同源性,其限制性内切酶的图谱相同。

③TWAR 只有一个血清型,外膜蛋白顺序分析完全相同,98kDa 蛋白为特异性抗原。其单克隆抗体与沙眼衣原体及鹦鹉热衣原体无交叉反应。

④TWAR 株用 HEp - 2 和 HL 细胞系较易分离和传代,但在第一代细胞内很少能形成包涵体。

致病性与免疫性 肺炎衣原体寄生于人类,无动物储存宿主。TWAR 感染系人与人之间经飞沫或呼吸道分泌物传播,亦可在家庭或医院等集体场所相互传染。其扩散较为缓慢,潜伏期平均 30d 左右。TWAR 感染具散发和流行交替出现的特点。在感染人群中流行可持续 6 个月左右。

TWAR 是呼吸道疾病重要的病原体,主要引起青少年急性呼吸道感染,可引起肺炎、支气管炎、咽炎和鼻窦炎等。起病缓慢,临床常表现有咽痛、声音嘶哑等症状,还可引起心包炎、心肌炎和心内膜炎。近年来还发现 TWAR 与冠状动脉硬化和心脏病

的发生有关。采用免疫组化、分子生物学和电镜形态的研究结果,证实在冠状动脉粥样硬化病灶中存在肺炎支原体。不仅有肺炎支原体类似的梨形结构,而且其病理切片用抗肺炎支原体特异性单克隆抗体处理后呈阳性。有资料表明慢性肺炎支原体感染及其形成的免疫复合物,可能是冠心病发病的一个重要因素,但还需要进一步研究。

微生物学检查法

①病原学检查 用 HL 和 HEp-2 细胞培养肺炎支原体较易生长,用 McCoy 细胞及其他传代细胞分离培养肺炎支原体较困难,痰标本对细胞有毒性作用,通常取咽拭标本或支气管肺泡灌洗液较好。标本最好用膜式滤菌器除去杂菌,不加抗生素。痰液和咽拭均先涂片,再以免疫酶标法或直接免疫荧光法检测肺炎支原体的存在。

②抗体测定 目前诊断 TWAR 感染较敏感的方法,是用微量免疫荧光试验检测血清中的抗体。分别检测 TWAR 的特异性 IgM 和 IgG 抗体,有助于区别近期感染和既往感染,也有利于区别原发感染和再感染;凡双份血清抗体滴度增高 4 倍或以上;或单份血清 IgM 抗体滴度 $\geq 1:16$,或 IgG 抗体滴度 $\geq 1:512$,可确定为急性感染。

③特异性核酸检测 采用限制酶 Pst I 对 TWAR DNA 酶切后,可以获得一 474bp 的核酸片段,这是其他两种支原体没有的 DNA 片段。采用扩增 DNA 的 PCR 技术,可以进行 TWAR 特异性核酸片段的检测。

十三、螺旋体

螺旋体(spirochete)是一类细长、柔软、螺旋状、运动活泼的原核细胞型微生物。其基本结构与细菌相似,例如有细胞壁、原始核质,以二分裂方式繁殖和对抗生素等药物敏感等。因此,分类学上划归广义的细菌范畴。

螺旋体在自然界和动物体内广泛存在,种类很多。根据螺旋体的大小,螺旋数目、规则程度及螺旋间距等,螺旋体目可分为两个科。螺旋体科(Spirochaetaceae)又分 5 个属,而钩端螺旋体科(Leptospiraceae)分 2 个属。7 个菌属中,密螺旋体、疏螺旋体和钩端螺旋体 3 个菌属能引起人类的有关疾病(表 3-86)。

表 3-86 螺旋体的科和属

| 螺旋体 | 引起人类疾病 | 病原体 |
|------------------------------|--------|------------|
| 螺旋体科 | | |
| 脊膜螺旋体属(<i>Cristispira</i>) | 不 | - |
| 蛇形螺旋体属(<i>Serpulina</i>) | 不 | - |
| 螺旋体属(<i>Spirochaeta</i>) | 不 | - |
| 密螺旋体属(<i>Treponema</i>) | 梅毒 | 苍白密螺旋体苍白亚种 |
| | 地方性梅毒 | 苍白密螺旋体地方亚种 |

| 螺旋体 | 引起人类疾病 | 病原体 |
|------------------------------|--------|------------------------|
| 疏螺旋体属 (<i>Borrelia</i>) | 雅司 | 苍白密螺旋体极细亚种 |
| | 品他病 | 品他密螺旋体 |
| | 流行性回归热 | 回归热疏螺旋体 |
| | 地方性回归热 | 许多种 |
| | 莱姆病 | 伯氏疏螺旋体, 伽氏疏螺旋体, 埃氏疏螺旋体 |
| 钩端螺旋体科 | | |
| 细丝体属 (<i>Leptonema</i>) | 不 | - |
| 钩端螺旋体属 (<i>Leptospira</i>) | 钩端螺旋体病 | 问号状钩端螺旋体 |

(一) 密螺旋体属

密螺旋体的螺旋细密、规则、两端尖, 数目较多; 包括致病性和非致病性两大类。对人致病的密螺旋体有苍白密螺旋体 (*T. pallidum*) 和品他密螺旋体 (*T. caFateum*) 两个种。苍白密螺旋体又分 3 个亚种: 苍白亚种 (subsp. *pallidum*)、地方亚种 (subsp. *endemicum*) 和极细亚种 (subsp. *pertenuis*), 它们分别引起人类梅毒、地方性梅毒和雅司。品他密螺旋体引起人类品他病。梅毒是性病, 其他 3 种不是性病。

1. 苍白密螺旋体苍白亚种

俗称梅毒螺旋体。人体是惟一宿主。

生物学性状

①形态与染色 直径 0.10~0.15 μm , 波幅 0.3 μm , 波长 0.6 μm , 全长 7~8 μm 。有 8~14 个致密而规则的小螺旋, 两端尖直 (图 3-77)。运动活泼。

电镜下观察, 有细胞壁和细胞膜。细胞壁外尚有包膜, 细胞膜内为含细胞质和核质的螺旋形原生质圆柱体。圆柱体上紧绕着 3~4 根周浆鞭毛 (periplasmic flagella), 也称轴丝或内鞭毛 (endoflagella), 与运动有关。运动方式多样, 有移行、曲伸、滚动等。

革兰染色呈阴性, 但不易着染。Fontana 镀银染色法可将螺旋体染成棕褐色, 在光镜下易于查见。新鲜标本不用染色, 在暗视野显微镜下, 可观察其形态和运动方式。

②培养 苍白密螺旋体苍白亚种不能在无活细胞的人工培养基中生长繁殖。在家兔上皮细胞培养中能有限生长, 繁殖慢, 约 30h 才分裂一次, 并只能维持数代。原认为该螺旋体严格厌氧, 后发现在含 3%~4% 氧时生长最宜。

③抵抗力 苍白密螺旋体苍白亚种的抵抗力极弱。对温度和干燥特别敏感。加热 41.5 $^{\circ}\text{C}$ 经 1h 死亡, 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 时 5min 死亡; 血液中的苍白亚种螺旋体, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 置 3d 后