

# 实用临床医学 检验技术

张延芳等◎主编

(下)

 吉林科学技术出版社

# 实用临床医学检验技术

(下)

张延芳等◎主编

# 第四章 微生物检验

## 第一节 概 论

# 第四章 微生物检验

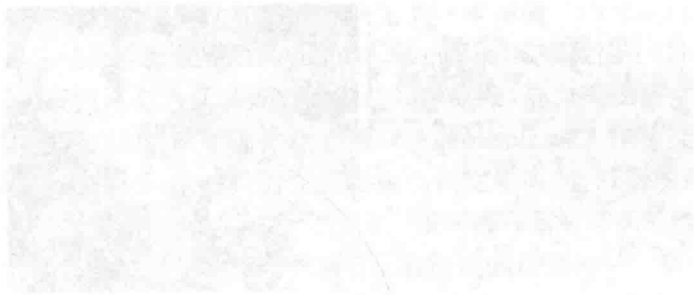


图 4-1 枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis) 的显微镜下形态

# 第四章 微生物检验

## 第一节 球菌

球菌(coccus)是细菌中的一个大大类,其大部分是不致病的腐生菌,对人致病的称病原性球菌(pathogenic cocci)。因其主要引起化脓性炎症,故又称为化脓性球菌(pyogenic coccus),主要为葡萄球菌属、链球菌属及奈瑟菌属的细菌。根据革兰染色结果不同,分为革兰阳性和革兰阴性球菌两大类,前者有葡萄球菌、链球菌、肺炎链球菌和肠球菌等;后者有脑膜炎奈瑟菌、淋病奈瑟菌等。

### 一、葡萄球菌

葡萄球菌属(*Staphylococcus*)为一群革兰阳性球菌,因其常堆积成葡萄串状而得名,是化脓性细菌中最常见者。广泛分布于自然界的水、空气、土壤中及物体表面,在人和动物体表及与外界相通的腔道中也存在葡萄球菌。正常人鼻咽部带菌率可达50%,医务人员高达80%,是医院内感染的重要细菌。本属包括48个种和亚种,其中金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)为人类重要的病原菌,表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)和腐生葡萄球菌(*S. saprophyticus*)是人体正常菌群,可引起机会性感染。

#### (一)生物学性状

1. 形态与染色 葡萄球菌呈球形或椭圆形,直径 $0.5\sim 1.0\mu\text{m}$ ,排列成葡萄串状(图4-1)。金黄色葡萄球菌无芽胞,无鞭毛,除少数菌株外一般不形成荚膜。革兰染色阳性,衰老、死亡或被白细胞吞噬后,以及在抗菌药物的作用下某些菌株可呈阴性。

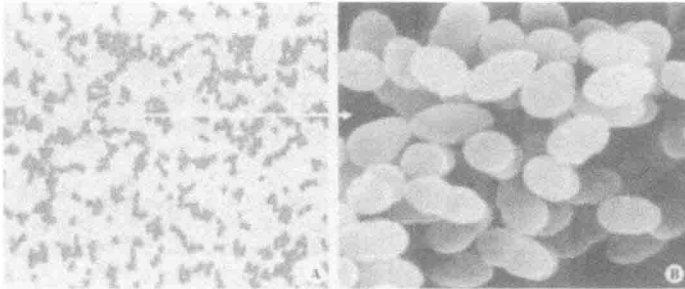


图4-1 葡萄球菌的镜下所见

A. 光镜; B. 电镜

2. 培养特性 营养要求不高,在普通培养基上生长良好,最适pH为7.4,最适温度 $37^{\circ}\text{C}$ 。为需氧或兼性厌氧菌。在普通培养基上形成直径 $1\sim 2\text{mm}$ 、隆起、表面光滑、圆形、有光泽、不透明、湿润、边缘整齐的菌落。能产生脂溶性色素而使菌落呈现金黄色,是金黄色葡萄球菌的重要特性,也可借此区别于产生柠檬色色素的腐生葡萄球菌和白色色素的表皮葡萄球菌。在血琼脂平板上,致病菌株菌落周围形成明显的完全透明溶血环( $\beta$ 溶血)。

3. 生化反应 触酶试验阳性,可用于区分葡萄球菌和链球菌。致病株可分解甘露醇。多数葡萄球菌能分解葡萄糖、麦芽糖和蔗糖,产酸不产气。

4. 抗原结构 抗原构造复杂,已发现 30 种以上,其化学组成有蛋白质抗原、多糖抗原和细胞壁的重要成分抗原,其中以葡萄球菌 A 蛋白较为重要。

(1)葡萄球菌 A 蛋白(Staphylococcal protein A, SPA):是一种表面蛋白,位于菌体表面,存在于 90% 以上的金黄色葡萄球菌细胞壁上,SPA 是一种单链多肽,与肽聚糖共价结合,是完全抗原。能与人及多种哺乳动物血清中的 IgG1、IgG2 和 IgG4 的 Fc 段发生非特异性结合,结合后 IgG 分子的 Fab 段仍可同相应抗原分子发生特异性结合。采用含 SPA 的葡萄球菌作载体,结合特异性抗体,检测标本中相应抗原,称协同凝集试验,现已广泛用于多种微生物抗原的检出。此外,SPA 与 IgG 结合后的复合物具有抗吞噬、激活补体、促细胞分裂、损伤血小板和引起超敏反应等多种生物学活性。

(2)荚膜抗原:宿主体内大多数金黄色葡萄球菌表面有荚膜多糖抗原,有利于细菌黏附到细胞或生物合成材料表面(如导管、人工关节、瓣膜等),与侵袭力有关。

5. 抵抗力 在不形成芽胞的细菌中葡萄球菌抵抗力是很强的。在干燥的脓汁、痰液中存活 2~3 个月;加热 60℃ 1 小时或 80℃ 30 分钟才被杀死;耐盐性强,在含 10%~15% 的 NaCl 的培养基中仍可生长。近年来由于大量抗生素的应用,耐药菌株迅速增多,尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *S. aureus*, MRSA)已经成为医院内感染最常见的致病菌。

## (二)致病性与免疫性

金黄色葡萄球菌可产生多种外毒素与胞外酶,毒力强。

1. 致病物质 其毒力因子包括:①侵袭性酶:有凝固酶、纤维蛋白溶酶、耐热核酸酶、脂酶、透明质酸酶等。②毒素:细胞毒素( $\alpha$  溶素、 $\beta$  溶素、 $\gamma$  溶素、 $\delta$  溶素、杀白细胞素)、毒性休克综合征毒素-1、表皮剥脱毒素、肠毒素等。③表面结构:荚膜、磷壁酸、SPA、胞壁肽聚糖等。

(1)凝固酶(coagulase):是一种能使含有柠檬酸钠或肝素抗凝剂的人或兔血浆发生凝固的酶类物质。耐热,粗制品 100℃ 经 30 分钟或高压灭菌后仍保持部分活性。根据是否产生凝固酶,可将葡萄球菌分为凝固酶阳性和阴性株两大类。凝固酶有两种,一种凝固酶结合于菌体表面并不释放,称为结合性血浆凝固酶(bound coagulase)或凝聚因子(clumping factor),在该菌株的表面使纤维蛋白原变为纤维蛋白而引起细菌凝聚,结合凝固酶常用玻片法测定,另一种是分泌至菌体外的,称为游离性血浆凝固酶(free coagulase)。作用类似凝血酶原,可被人或兔血浆中的协同因子(cofactor)激活变成凝血酶样物质后,使液态的纤维蛋白原变成固态的纤维蛋白,从而使血浆凝固,常用试管法测定。凝固酶和葡萄球菌的致病力关系密切,大多数致病株能产生,故凝固酶是鉴别葡萄球菌有无致病性的重要指标。凝固酶阳性菌株进入机体后,使血液或血浆中的纤维蛋白沉积于菌体表面,阻碍体内吞噬细胞的吞噬。同时,凝固酶集聚在菌体表面,亦能保护病原菌不受血清中杀菌物质的破坏。葡萄球菌引起的感染易于局限化和形成血栓,与凝固酶的生成有关。过去认为凝固酶阳性菌株有致病性,阴性菌株无致病性,因此凝固酶常作为鉴别葡萄球菌有无致病性的重要标志。但近年来发现阴性菌株也可致病。

(2)葡萄球菌溶素(staphylolysin):致病性葡萄球菌产生多种溶素。按抗原性不同,分为  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  溶素五种,对人类有致病作用的主要是  $\alpha$  溶素,为分子质量 21~50kDa 的不均一蛋白质,不耐热,65℃ 30 分钟被破坏。对多种哺乳动物红细胞有溶血作用,对白细胞、肝细胞、成纤维细胞、血小板、血管平滑肌细胞等均有毒性。

(3)杀白细胞素(leukocidin):分快(F)和慢(S)两种组分,当两者单独存在时,并无活性,必须协同才有作用。其可作用于巨噬细胞和中性粒细胞细胞膜表面特异性受体卵磷脂和神经节苷脂,通过改变细胞膜的通透性,而杀伤破坏细胞。杀白细胞素在抵抗宿主吞噬细胞,增强病原菌侵袭力方面有重要意义。

(4)肠毒素(enterotoxin):约1/2临床分离的金黄色葡萄球菌产生肠毒素,按等电点和抗原性的不同,分A、B、C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>、D、E、G和H<sub>9</sub>个血清型,均可引起急性胃肠炎,即食物中毒。与产毒菌株污染了牛奶、肉类、鱼、虾、蛋类等食物有关。肠毒素是一组热稳定的可溶性蛋白质,分子质量为26~30kDa,耐100℃30分钟,也不受胃肠液中蛋白酶的影响,故误食污染肠毒素的食物后,刺激呕吐中枢,引起以呕吐为主要症状的急性胃肠炎,称为食物中毒。其机制可能是毒素在肠道作用于神经受体,传入中枢而导致呕吐。葡萄球菌肠毒素属于超抗原,类似丝裂原,可以不经抗原提呈细胞的处理,能非特异性激活T细胞并释放过量细胞因子致病。

(5)表皮剥脱毒素(exfoliative toxin, exfoliatin):也称表皮溶解毒素(epidermolytic toxin),有两个血清型,A型耐热,B型不耐热,引起表皮剥脱性病变,主要发生于婴幼儿、新生儿和免疫功能低下的成年人,引起烫伤样皮肤综合征(staphylococcal scalded skin syndrome, SSSS),又称剥脱性皮炎。患者皮肤呈弥漫性红斑和水疱,继以表皮上层大片脱落。主要由噬菌体II群金黄色葡萄球菌产生的一种蛋白质,分子质量24~33kDa,具有抗原性,可被甲醛脱毒成类毒素。

(6)毒性休克综合征毒素-1(toxic shock syndrome toxin 1, TSST-1):由噬菌体I群金黄色葡萄球菌产生的一类蛋白质,可引起发热,增加机体对内毒素的敏感性。感染产毒菌株后可引起机体多个器官系统的功能紊乱或毒性休克综合征(toxic shock syndrome, TSS)。

(7)其他酶类:葡萄球菌尚可产生葡激酶(staphylokinase),亦称纤维蛋白溶酶(fibrinolytic),产生透明质酸酶(hyaluronidase)、耐热核酸酶(heat stable nuclease)、脂酶(lipase)等。

## 2. 所致疾病 有侵袭性和毒素性疾病两种类型。

(1)侵袭性疾病:主要引起化脓性炎症。葡萄球菌可通过多种途径侵入机体,引起局部或全身感染,甚至引起败血症。

1)局部感染:主要表现为疖、痈、甲沟炎、睑腺炎、毛囊炎、脓痤疮、蜂窝组织炎、伤口化脓等,感染的特点是病灶界限清楚、脓汁呈黄色而黏稠、具有局限性。此外还可引起气管炎、脓胸、中耳炎、骨髓炎、肺炎、脑膜炎、心包炎等内脏器官感染。

2)全身感染:细菌从局部扩散入血流可引起败血症、脓毒血症等,多由金黄色葡萄球菌引起,新生儿或机体防御功能严重受损时表皮葡萄球菌也可引起败血症。

(2)毒素性疾病:由葡萄球菌产生的有关外毒素引起食物中毒、烫伤样皮肤综合征、毒性休克综合征。

以往认为金黄色葡萄球菌是葡萄球菌属中唯一的致病菌,而凝固酶阴性葡萄球菌(coagulase negative staphylococcus, CNS)是对人类无害的共栖菌。近年来,临床和实验室检测结果均已证实CNS已经成为医源性感染的常见病原菌,且其耐药性日益增多,给临床诊治造成极大困难,应引起医护人员和微生物学者的重视。

3. 免疫性 人类对葡萄球菌有一定的天然免疫力,只有当皮肤黏膜受创伤后,或机体免疫功能低下时,才引起感染。患病后所获免疫力不强,难以防止再感染。

### (三)微生物学检查

1. 标本 根据病情不同可取不同标本,如血液、脑脊液、脓汁、呕吐物及粪便或可疑食物等。

2. 直接涂片镜检 取标本涂片,革兰染色后镜检,一般根据细菌形态,排列和染色性可做出初步诊断。

3. 分离培养与鉴定 将标本接种于血琼脂平板,培养后挑选可疑菌落进行涂片、染色、镜检。血液标本需先经肉汤培养基增菌后,再接种血琼脂平板。致病性葡萄球菌的鉴定主要根据是否产生凝固酶和耐热核酸酶,发酵甘露醇等作为参考指标。凝固酶阴性葡萄球菌感染的诊断可依据凝固酶阴性、不能分解甘露醇及色素检查,在最后判定时应结合临床。

4. 葡萄球菌肠毒素检查 近年来较多采用免疫学方法检测,常用 ELISA 法。亦可用特异的 DNA 基因探针杂交技术检测葡萄球菌是否为产肠毒素的菌株。

### (四)防治原则

加强卫生宣传教育,讲究个人卫生,应及时处理皮肤创伤。治疗时应根据药物敏感试验结果,选择敏感抗菌药物。反复发作的顽固性患者,可试用自身疫苗或类毒素疗法。

## 二、链球菌属

链球菌属(*Streptococcus*)是化脓性球菌中另一大类常见的革兰阳性球菌,广泛存在于自然界、人及动物粪便和健康人的鼻咽部,多为正常菌群,并不致病,少数可引起人类各种化脓性炎症。链球菌属中对人致病的主要是 A 群链球菌和肺炎链球菌。

### (一)A 群链球菌

#### 1. 生物学性状

(1)形态与染色:直径  $0.6\sim 1\mu\text{m}$ ,球形或椭圆形,呈链状,长短不一。革兰染色阳性,无鞭毛、无芽胞(图 4-2)。在液体培养基中形成的链较固体培养基中长。幼龄菌(培养 2~4 小时)可形成透明质酸的荚膜,随培养时间的延长,细菌自身产生的透明质酸酶,使荚膜分解。在脓液标本或被吞噬细胞吞噬后或陈旧培养基常呈革兰阴性。

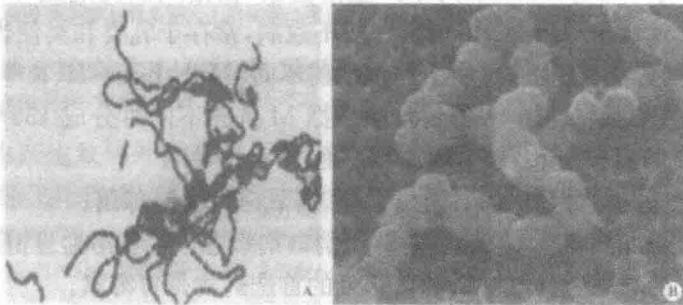


图 4-2 链球菌镜下所见

A. 光镜; B. 电镜

(2)培养特性:需氧或兼性厌氧。营养要求较高,常在普通培养基中加入血清、血液、葡萄糖等营养物质才能生长。在固体培养基上形成细小、灰白色、表面光滑、圆形半透明或不透明的菌落,在液体培养基中常形成絮状沉淀。不同菌株在血平板上生长的菌落周围,可产生程度不同的溶血。

(3)生化反应:分解葡萄糖,产酸不产气。一般不分解菊糖,不被胆汁溶解。不产生触酶。

(4) 抗原构造: 链球菌抗原结构较复杂(图 4-3), 主要有三种抗原, ①表面抗原又称蛋白质抗原, 位于最外层, 具有型特异性, A 群链球菌有 R、S、M、T 四种蛋白质抗原, 其中 M 抗原与致病性关系最为密切。②多糖抗原, 又称 C 抗原, 细胞壁多糖组分, 为群特异性抗原。对人致病的链球菌 90% 属于 A 群, 其次为 B 群, 其他群少见。③核蛋白抗原, 又称 P 抗原, 无特异性, 各种链球菌均相同, 且与葡萄球菌有交叉。

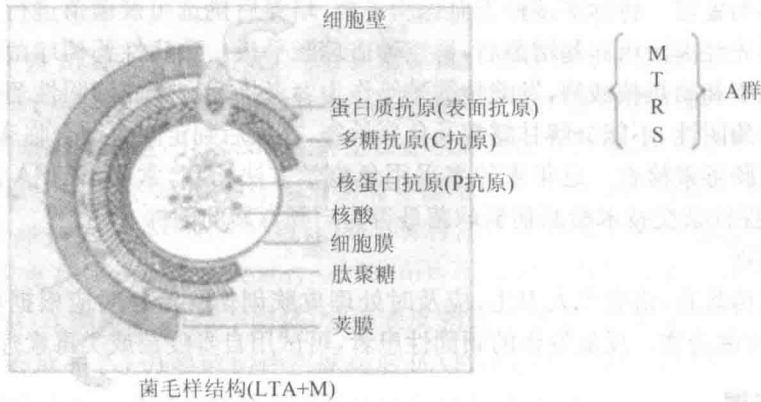


图 4-3 链球菌抗原构造模式图

(5) 分类: 根据溶血现象、抗原结构和对氧需求进行分类。

1) 根据溶血现象分类

A. 甲型溶血性链球菌( $\alpha$ -hemolytic streptococcus): 具  $\alpha$  溶血或甲型溶血, 菌落周围有 1~2mm 宽的草绿色溶血环, 红细胞不完全溶解。这类链球菌亦称草绿色链球菌(viridans Streptococcus), 多为机会致病菌。

B. 乙型溶血性链球菌( $\beta$ -hemolytic streptococcus): 具  $\beta$  溶血或乙型溶血, 菌落周围形成 2~4mm 宽、界限分明、完全透明的无色溶血环,  $\beta$  溶血环中红细胞完全溶解。这类链球菌又称溶血性链球菌(streptococcus hemolytic), 致病力强, 常引起人类和动物多种疾病。

C. 丙型链球菌( $\gamma$ -streptococcus): 不产生溶血素, 菌落周围无溶血环, 故又称不溶血性链球菌(streptococcus non-hemolytic), 一般不致病, 常存于乳类和类便当中。

2) 根据抗原结构分类: 依据胞壁中多糖抗原的不同, 可分成 A~H、K~V 20 个群对人致病的链球菌株 90% 左右属 A 群。A 群链球菌根据 M 抗原不同可分成 150 个型; B 群分 4 个型等对人类致病的 A 群链球菌多数呈现乙型溶血。

3) 根据对氧需求分类: 分为厌氧、兼性厌氧和需氧三大类链球菌。

(6) 抵抗力: 不强, 加热 60°C 即杀死, 对常用消毒剂敏感。乙型溶血性链球菌对青霉素、杆菌肽、红霉素和磺胺药均敏感, 因此, 链球菌感染的首选药物是青霉素。

2. 致病性

(1) 致病物质: 其致病物质除菌体胞壁成分外, 还产生多种外毒素和侵袭性酶

1) 胞壁成分

A. 脂磷壁酸(lipoteichoic acid, LTA): 人类口腔黏膜上皮细胞、血小板、淋巴细胞、红细胞、白细胞等细胞膜上均有 LTA 的结合位点, A 群链球菌通过 LTA 易与宿主细胞黏附。

B. F 蛋白: 是化脓性链球菌重要黏附结构之一。位于化脓性链球菌细胞壁内, 具有纤维粘连蛋白(fibronectin)的受体, 能与上皮细胞表面的纤维粘连蛋白结合, 使得链球菌与上皮细



胞表面黏附,有利于其在宿主体内定植和繁殖。

C. M蛋白:是其表面蛋白质,具有抗吞噬和抗杀菌作用。M蛋白有抗原性,能刺激机体产生抗体。因M蛋白与心肌、肾小球基底膜成分有共同抗原成分,故针对M蛋白产生的抗体,可损害人类心血管、肾等组织,与风湿性心肌炎、肾小球肾炎等超敏反应性疾病有关。

2)侵袭性酶:包括透明质酸酶/扩散因子、链激酶(SK)/链球菌溶纤维蛋白酶、链道酶(SD)/链球菌DNA酶、胶原酶等。

### 3)外毒素

A. 链球菌溶血素(streptolysin):有溶解红细胞,破坏白细胞、血小板的作用根据对O<sub>2</sub>的稳定性,分为链球菌溶素O(streptolysin O, SLO)和链球菌溶素S(streptolysin S, SLS)两种,①SLO,为含-SH基的蛋白质,对氧敏感,遇氧时-SH基可被氧化为-S-S-基,失去溶血性。若加入半胱氨酸或亚硫酸钠等还原剂,溶血作用可被逆转。SLO对中性粒细胞、巨噬细胞、血小板、心肌细胞、神经细胞等有毒性作用。SLO抗原性强,感染后2~3周,85%以上患者产生抗体,病愈后可持续数月甚至数年。活动性风湿热患者血清SLO抗体显著增高,其效价在1:400以上。因此,测定SLO抗体含量,可作为近期链球菌感染或风湿热及其活动性的辅助诊断指标。②SLS,多数A、C、G群及某些其他群链球菌产生SLS。SLS是小分子的糖肽,无抗原性,对氧稳定,对热和酸敏感。血琼脂平板上菌落周围的β溶血环由SLS所致。SLS也能破坏白细胞和多种组织细胞。

B. 致热外毒素(pyrogenic exotoxin):又称红疹毒素或猩红热毒素,是人类猩红热的主要致病物质。

(2)所致疾病:A群链球菌引起的疾病约占人类链球菌感染的90%,其传染源为患者或带菌者,传播途径有空气飞沫传播、经皮肤伤口感染传播等。链球菌可引起多种疾病,可分为三种类型。

#### 1)侵袭性疾病

A. 皮肤和皮下组织急性化脓性炎症:其病灶特点为界限不明显,脓性分泌物稀薄,细菌易扩散,常引起蜂窝组织炎、脓疱疮。沿淋巴管和血流扩散引起淋巴结炎、急性淋巴管炎及败血症。

B. 其他器官系统感染:如扁桃体炎、肾盂肾炎、咽炎、中耳炎、乳突炎、产褥热等。

#### 2)毒素性疾病

A. 猩红热:由产生致热外毒素的A群链球菌引起的呼吸道传染病。多发于儿童,潜伏期为2~3天,细菌经飞沫传播,引起全身中毒症状。临床特征为发热、全身弥漫性鲜红色皮疹及皮疹退后明显的脱屑,常继发严重的咽炎或皮肤软组织感染。猩红热一年四季都可发生,以冬春季为多。

B. 链球菌中毒性休克综合征:以休克为主要症状,常伴有呼吸系统及其他多个器官功能的衰竭,

#### 3)超敏反应性疾病

A. 风湿热:常继发于A族链球菌感染引起的咽炎,潜伏期为1~5周,易感人群为儿童。临床表现以心肌炎、关节炎为主。

B. 急性肾小球肾炎:大多数由A群链球菌引起。多见于儿童和青少年,临床表现为蛋白尿、血尿、水肿和高血压。

## (二)肺炎链球菌

肺炎链球菌(*S. pneumoniae*),俗称肺炎球菌(*pneumococcus*)。广泛存在于自然界,常寄居在正常人鼻咽腔中,仅少数致病,是大叶性肺炎、支气管炎和脑膜炎的主要病原菌。

### 1. 生物学性状

(1)形态与染色:革兰阳性球菌,菌体呈矛头状,直径约 $1\mu\text{m}$ ,常以宽端相对、尖端向外成双排列,无芽胞、无鞭毛。在机体内或含血清的培养基上能形成荚膜,人工培养后荚膜逐渐消失。革兰染色时荚膜不着色,表现为菌体周围透明环(图4-4)。

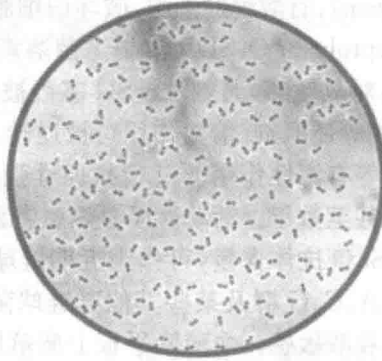


图4-4 肺炎链球菌(革兰染色)

(2)培养特性:营养要求较高,形成细小圆形、灰白色、表面光滑、湿润并有草绿色溶血环的菌落。兼性厌氧。肺炎链球菌产生的大量自溶酶,若孵育时间大于48小时,使菌体溶解,菌落中央下陷呈脐状。

(3)生化反应:肺炎链球菌自溶酶可被胆汁或胆盐激活,使细菌加速溶解,故常用胆汁溶菌试验与甲型链球菌区别,是可靠的鉴定方法。

### (4)抗原构造与分型

1)荚膜多糖抗原:根据荚膜多糖抗原性的不同,可将肺炎链球菌分为90多个血清型。

2)菌体抗原:C多糖存在于细胞壁中,可被血清中一种被称为C反应蛋白(C reactive protein,CRP)的 $\beta$ 球蛋白沉淀。对活动性风湿病等诊断有一定意义。M蛋白为型特异抗原,肺炎链球菌M蛋白与细菌毒力无关,产生的抗体无保护作用。

(5)抵抗力:较弱,有荚膜的肺炎链球菌抗干燥能力强,在干痰中可存活1~2个月。

### 2. 致病性与免疫性

(1)致病物质:主要的致病因子是荚膜,有抗吞噬作用,有利于肺炎链球菌在宿主体内定居并繁殖。此外,肺炎链球菌溶血素O、神经氨酸酶可能与肺炎链球菌在鼻咽部和支气管黏膜上定植、繁殖和扩散有关。

(2)所致疾病:主要引起人类大叶性肺炎,其次是支气管炎。肺炎链球菌也可引起胸膜炎、乳突炎、中耳炎、心内膜炎及化脓性脑膜炎。

(3)免疫性:感染后,机体可建立较牢固的型特异性免疫,故同型病菌的二次感染比较少见。

3. 微生物学检查 根据感染部位不同采取不同标本,如痰液、脓液、血液、脑脊液等。对痰、脓或脑脊液沉淀物标本可涂片进行革兰染色镜检,若发现典型的成对排列、有荚膜的革兰阳性球菌,结合临床症状可做初步诊断。

4. 防治原则 多价肺炎链球菌荚膜多糖疫苗对预防肺炎链球菌感染有较好效果。治疗

常用青霉素、磺胺类抗生素,因人群肺炎链球菌感染的菌型不断变迁,且耐药菌株日益增多,因此需加强肺炎链球菌的菌型监测,在治疗前做常规药敏试验。

### 三、奈瑟菌属

奈瑟菌属(*Neisseria*)是革兰阴性球菌,常成双排列。无芽胞,无鞭毛,有菌毛和荚膜。专性需氧,能产生触酶和氧化酶。奈瑟菌属有 23 个种和亚种,其中对人类有致病性的只有脑膜炎奈瑟菌和淋病奈瑟菌。

#### (一) 脑膜炎奈瑟菌

脑膜炎奈瑟菌(*N. meningitidis*),俗称脑膜炎球菌(*Meningococcus*),是流行性脑脊髓膜炎(流脑)的病原菌。

#### 1. 生物学性状

(1)形态与染色:肾形或蚕豆形革兰阴性球菌,细菌常成对排列,凹面相对,直径为 0.6~0.8 $\mu\text{m}$ ,无鞭毛,无芽胞(图 4-5)。

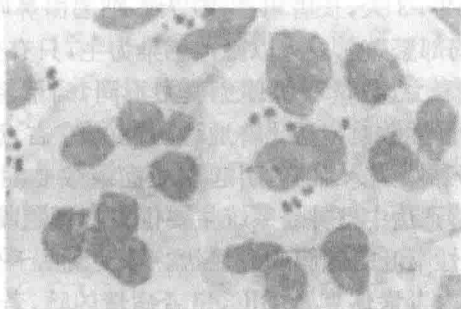


图 4-5 脑膜炎奈瑟菌脑脊液涂片

(2)培养特性:营养要求较高,常用巧克力培养基培养,最适生长温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ ,专性需氧,初次分离时,还需提供 5%的  $\text{CO}_2$ 。一般培养 24~48 小时后,形成直径 1.0~1.5mm 的隆起、光滑、无色、圆形、透明或半透明、似露滴状的菌落。在血琼脂平板上不溶血。因易产生自溶酶,人工培养物如不及时转种常死亡。

(3)生化反应:大多数菌株可分解葡萄糖和麦芽糖,产酸,不产气。

(4)抗原结构与分类:主要抗原有 4 种。

1)荚膜多糖抗原:具有群特异性。根据此抗原性不同,可分为 A、B、C、D、H、I、K、X、Y、Z、29E、W135 和 L 共 13 个血清群。与人类疾病关系密切的主要是 A、B、C、Y 及 W135 群。我国流行的 95% 是 A 群,带菌者以 B 群为主。

2)外膜蛋白抗原:具有型特异性,根据外膜蛋白组分不同,各血清群又可分为若干血清型,但 A 群所有菌株外膜蛋白相同。

3)脂寡糖抗原(lipooligosaccharide antigen, LOS):主要成分是糖脂,具有抗原性,可据此进行免疫学分型。LOS 是脑膜炎奈瑟菌的主要致病物质。

(5)抵抗力:抵抗力很弱,对日光、热力、寒冷、干燥、紫外线及一般消毒剂均敏感。对链霉素、青霉素、氯霉素均敏感,对磺胺普遍耐药。

#### 2. 致病性与免疫性

(1)致病物质:致病物质主要有荚膜、菌毛和 LOS。

1)荚膜:具有抗吞噬作用,保护菌体免受体液中杀菌物质的损伤,有利于细菌在机体内存活和繁殖,增强脑膜炎奈瑟菌的侵袭力。

2)菌毛:脑膜炎奈瑟菌菌毛特异性受体存在于鼻咽部黏膜上皮细胞表面,当菌毛与特异性受体结合后,介导菌体黏附于呼吸道黏膜上皮细胞表面,有利于细菌的黏附、侵入、定居及繁殖,并损伤黏膜上皮细胞。

3)LOS:是脑膜炎奈瑟菌最重要的致病物质。可引起发热和白细胞升高,作用于小血管和毛细血管,引起坏死、出血,表现为皮肤出血性皮疹或瘀斑及微循环障碍。严重败血症时,因大量 LOS 释放引起休克和弥散性血管内凝血(DIC),预后不良。

(2)所致疾病:是流行性脑脊髓膜炎(流脑)的病原菌,人类是唯一易感宿主。传染源是患者和带菌者。约70%正常人鼻咽部带有本菌,是重要的传染源。目前,我国流行的血清群95%以上是A群,近年亦有B群病例,病情重,死亡率高,多为散发。

病原菌主要经飞沫传播,也可通过接触患者呼吸道分泌物污染的物品而感染。6个月内的婴儿可通过母体获得脑膜炎奈瑟菌 IgG 抗体,故很少被感染。6个月~2岁婴儿是脑膜炎奈瑟菌的易感人群。潜伏期2~3天,长者可达10天。细菌由鼻咽部侵入,依靠菌毛黏附于黏膜上皮细胞表面,并在其局部繁殖。成人以隐性感染为主,只有少数人发展成脑膜炎,可获得免疫力。流脑患者随细菌毒力、数量和机体免疫力不同,病情轻重不一。临床上表现为3种类型,即普通型、暴发型和慢性败血症型。普通型占90%左右,患者先有上呼吸道感染,继而大量繁殖的病菌从鼻咽部黏膜进入血流,引起菌血症或败血症。患者出现发热、恶寒、恶心、呕吐和出血性皮疹。细菌到达中枢神经系统主要侵犯脑脊髓膜,引起化脓性炎症,患者出现剧烈头痛、颈项强直、喷射性呕吐等脑膜刺激症状。暴发型见于少数患者,血中细菌大量繁殖,并释放大量内毒素,引起内毒素休克及 DIC,患者病情凶险,若不及时抢救,常危及生命。慢性败血症型不多见,以成人为主,病程可迁延数日;普通型和暴发型以儿童为主。

(3)免疫性:机体对脑膜炎奈瑟菌的免疫力以体液免疫为主。显性、隐性感染或疫苗接种2周后,血清中群特异性 IgG、IgM 和 IgA 抗体水平明显升高。在呼吸道局部 SIgA 可阻止脑膜炎奈瑟菌的侵袭,血中抗体在补体参与下能杀伤脑膜炎奈瑟菌。人类可从正常寄居于鼻咽部的、不致病脑膜炎奈瑟菌间的交叉抗原而获得一定免疫性。

### 3. 微生物学检查

(1)标本:采取患者脑脊液、血液或刺破皮肤出血瘀斑处取渗出物。带菌者检查可用鼻咽拭子。脑膜炎奈瑟菌因对低温和干燥极敏感,故标本采取后应注意保湿、保暖并立即送检。接种的培养基宜预先保温,以免脑膜炎奈瑟菌死亡,影响检出率。最好是床边接种。

(2)直接涂片镜检:脑脊液离心沉淀后,取沉淀物涂片,或消毒患者出血瘀斑处皮肤,用无菌针头挑破瘀斑取其渗出物制成涂片,革兰染色后镜检,如镜下能见到中性粒细胞内、外有革兰染色阴性双球菌,可做出初步诊断。

(3)分离培养与鉴定:脑脊液与血液标本在血清肉汤培养基中增菌后,接种到巧克力血琼脂平板上,放置于含5%~10% CO<sub>2</sub> 的环境中孵育,挑取可疑菌落涂片染色镜检,并做生化反应及型特异性多价血清的凝集试验鉴定。

(4)快速诊断法:流脑患者脑脊液及血清中存在脑膜炎奈瑟菌可溶性抗原,可用已知的抗体检测,用于流脑早期诊断。

1)对流免疫电泳:此法较常规培养法敏感,特异性高。

2) SPA 协同凝集试验:用脑膜炎奈瑟菌 IgG 抗体标记含 SPA 的葡萄球菌菌体,然后加入待测脑脊液或血清,若标本中含有相应抗原,则可见葡萄球菌聚集在一起,形成肉眼可见的凝集。

4. 防治原则 关键是尽快隔离传染源、切断传播途径及提高人群免疫力。特异性预防可对儿童注射荚膜多糖疫苗。常用 A、C 双价或 A、C、Y 和 W135 四价混合疫苗,免疫力维持 3 年以上荚膜多糖抗原是胸腺非依赖性抗原,对 2 岁以下的婴幼儿免疫效果不佳。流脑的治疗首选药物为青霉素 G,剂量要大,对过敏者可选用红霉素。

## (二) 淋病奈瑟菌

淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*),俗称淋球菌(*Gonococcus*),是人类淋病的病原菌,1879 年(Neisser)首次从尿道分泌物中发现。人是淋病奈瑟菌的唯一宿主,主要引起人类泌尿生殖道黏膜的急性或慢性化脓性感染,引起淋病。

### 1. 生物学性状

(1) 形态与染色:革兰阴性,有荚膜和菌毛,无鞭毛,不形成芽胞。菌体呈肾形,成双排列,凹面相对,大小为  $0.6\mu\text{m} \times 0.8\mu\text{m}$ 。在脓性标本中,似一对咖啡豆,常存在于多形核白细胞内。

(2) 培养特性:专性需氧,初次分离培养时补充 5%  $\text{CO}_2$ 。营养要求高,常用巧克力血琼脂培养基。最适合生长温度为  $35\sim 36^\circ\text{C}$ ,培养 24~48 小时后,形成灰白、凸起,圆形或半透明、光滑菌落。根据菌落特征与毒力,淋病奈瑟菌可分为 T1~T5 型。其中,T1、T2 型菌株菌落小,有菌毛,人工培养基转种后可转成 T3、T4 和 T5 型菌株,无菌毛,无致病性。

(3) 生化反应:生化反应不活泼,只分解葡萄糖,产酸不产气,不分解其他糖类,氧化酶阳性。

### (4) 抗原结构与分类

1) 菌毛蛋白抗原:菌毛存在于有毒力的菌株。由不同菌株提取的菌毛,其抗原性不同,可逃逸机体的免疫攻击。

2) 外膜蛋白抗原:可分为 P I、P II 和 P III 三种。P I 为主要外膜蛋白,是淋病奈瑟菌分型的主要依据,有助于流行病学调查。

3) 脂寡糖抗原(LOS):由脂质 A 和核心寡糖组成,脂寡糖具有内毒素活性,易发生变异

(5) 抵抗力:与脑膜炎奈瑟菌相似,抵抗力非常弱,对干燥、冷、热、一般消毒剂敏感。淋病奈瑟菌易产生耐药。

### 2. 致病性和免疫性

(1) 致病物质:主要致病物质是表面结构,如荚膜、菌毛、外膜蛋白,以及内毒素和 IgA1 蛋白酶。

IgA1 蛋白酶能破坏黏膜表面存在的特异性 IgA1 抗体,有利于淋病奈瑟菌黏附至黏膜表面。P I 能直接插入到中性粒细胞的膜上,严重破坏膜结构的完整性,菌毛可黏附至人类尿道黏膜上,不易被尿液冲掉;荚膜具有抗吞噬作用。淋病奈瑟菌主要侵犯黏膜,尤其对单层柱状上皮和移行上皮细胞(如子宫颈颈、后尿道、前尿道、膀胱黏膜)有很强的亲和力。淋病奈瑟菌借助菌毛、外膜蛋白 P II 黏附黏膜细胞的表面进行繁殖,之后进入细胞内大量繁殖,导致细胞损伤裂解。诱导中性粒细胞聚集和吞噬,引起局部急性炎症,形成典型的尿道脓性分泌物。

(2) 所致疾病:人类淋病主要通过性接触,淋病奈瑟菌侵入泌尿生殖道而感染,潜伏期平

均 2~5 天。男性患者主要表现为急慢性尿道炎,如不及时治疗,细菌可上行感染引起前列腺炎和附睾炎;女性患者好发部位为宫颈,其次为尿道旁腺、尿道、输卵管及前庭大腺,主要表现为尿道炎和宫颈炎,出现尿频、尿急、尿痛、尿道或宫颈口流脓等症状,如累及前庭大腺和盆腔,可导致不孕。当母体患有淋菌性阴道炎或子宫颈炎时,婴儿出生时易患上新生儿淋菌性结膜炎。

(3) 免疫性:人类对淋病奈瑟菌感染无天然抵抗力。多数患者可自愈,并出现特异性 IgM、IgG、IgA,但不持久,再感染和慢性患者较普遍存在。

3. 微生物学检查 用无菌棉拭子蘸取泌尿生殖道脓性分泌物或子宫颈口表面分泌物,将脓性分泌物涂片检查,如发现多形核白细胞内有革兰染色阴性的双球菌,结合临床表现即可初步诊断。

4. 防治原则 目前尚无淋病疫苗。婴儿出生时,不论母亲有无淋病,都应以 1% 硝酸银或氯霉素链霉素合剂滴入两眼,以预防新生儿淋菌性结膜炎的发生。淋病奈瑟菌耐药问题十分突出,耐药菌株不断增加,特别是多重耐药菌株的出现给临床治疗带来极大困难。可选择青霉素、新青霉素、博来霉素、大观霉素、头孢曲松、诺氟沙星等药物,必要时做药敏试验指导用药。

(王秀丽)

## 第二节 肠道杆菌

### 一、概述

肠道杆菌属肠杆菌科(Enterobacteriaceae),它是一大群生物学性状近似的革兰染色阴性的杆菌,常寄居在肠道内,亦存在于水和土壤中。大多数为肠道的正常菌群,但当机体免疫力下降或细菌移位至机体其他部位时可成为条件致病菌而引起感染。该科细菌种类繁多,根据其抗原结构、生化反应、核酸杂交和序列分析,至少分 30 个属,120 个种。与医学有关的细菌主要存在于埃希菌属、志贺菌属、沙门菌属、摩根菌属、克雷伯菌属、变形杆菌属、柠檬酸菌属、沙雷菌属、肠杆菌属和耶尔森菌属 10 个属中,包括 25 个菌种。肠杆菌科细菌有共同生物学特性:

1. 形态与结构 为(0.3~1.0)×(1~6)μm 中等大小的革兰染色阴性杆菌,多数有周身鞭毛,无芽胞;少数有包膜或荚膜,大多有菌毛。

2. 培养特性 营养要求不高,兼性厌氧或需氧,能在普通琼脂平皿上生长繁殖,形成灰白色、光滑、湿润的直径 2~3mm 中等大小的菌落。

3. 生化反应 分解多种糖类和蛋白质,形成不同的代谢产物,常用来鉴定肠道杆菌。

4. 抗原结构复杂 有菌体抗原 O、鞭毛抗原 H 和荚膜抗原 K,其他还有包膜抗原及菌毛抗原。

5. 抵抗力 对理化因素抵抗力弱,一般 60℃ 30 分钟即被杀灭。对一般化学消毒剂敏感。

6. 易变异 肠杆菌科细菌易变异,除自发突变外,常通过接合、转导或溶源性转换等发生遗传物质转移,使受体菌获得新的性状;最常见的是耐药性变异。

### 二、埃希菌属

埃希菌属(*Escherichia*)有 5 个代表种,以大肠埃希菌(*E. coli*)最常见,大肠埃希菌在肠道

中是正常菌群的一部分,但有些血清型具有致病性,能导致腹泻。常被用作粪便污染的卫生学检测指标。

### (一)生物学性状

G中等大小杆菌(图4-6)。多数菌株有周鞭毛,无芽胞;有菌毛。能发酵多种糖类,产酸、产气。能发酵乳糖,可与志贺菌、沙门菌等区别。吡啶、甲基红、VP、柠檬酸盐(IMViC)试验结果为“十十一”。

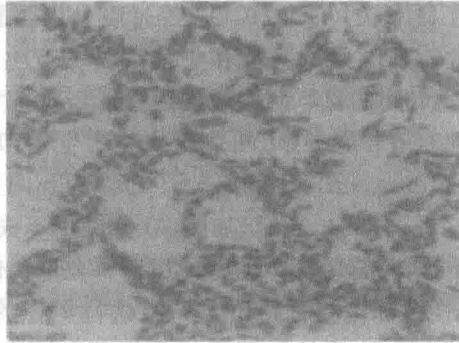


图4-6 大肠埃希菌(革兰染色×1000)

### (二)致病性

多数为条件致病菌,菌群移位时引起肠道外感染;少数血清型引起肠道内感染,具有多种致病物质,如荚膜、内毒素、Ⅲ型分泌系统等。

1. 肠道外感染 多数大肠埃希菌在肠道内不致病,若移位可引起肠外感染。肠道外感染以化脓性感染和泌尿道感染最常见,如膀胱炎、尿道炎、肾盂肾炎,亦可引起阑尾炎、腹膜炎、手术创口感染;对婴儿、老人或免疫力低下者,可引起败血症、新生儿大肠埃希菌性脑膜炎,这些大肠埃希菌常来源于肠道,为内源性感染。

2. 胃肠炎 某些大肠埃希菌血清型可引起人类腹泻,与食入受污染的食品和饮水有关,常为外源性感染。根据其致病机制不同,常将致病性大肠埃希菌分为五种型别(表4-1)。

表4-1 引起胃肠炎的大肠埃希菌

菌株	作用部位	疾病与症状	致病机制	常见O血清型
ETEC	小肠	旅行者腹泻;婴幼儿腹泻;水样便,恶心,呕吐,腹痛,低热	质粒介导LT和(或)ST,大量分泌液体和电解质	6、8、15、25、27、63、78、148、115、153、159
EIEC	大肠	痢疾样腹泻;水样便,继以少量血便,腹痛和发热	质粒介导侵袭和破坏结肠黏膜上皮细胞	28ac、29、112ac、124、136、143、144、152、164、167
EPEC	小肠	婴儿腹泻;水样便,恶心,呕吐,发热	质粒介导黏附和破坏绒毛结构,导致吸收受损和腹泻	26、55、86、111、114、119、125、126
EHEC	大肠	血性腹泻,HUS;水样便,继以大量出血,剧烈腹痛,低热或无,可并发血小板减少性紫癜	溶原性噬菌体编码Stx-I或Stx-II,中断蛋白质合成	157、26、111
EAEC	小肠	婴儿腹泻;持续性水样便,呕吐,脱水,低热	质粒介导聚集性黏附上皮细胞,阻止液体吸收	3、42、44、86

(1)肠产毒素型大肠埃希菌(enterotoxigenic E. coli,ETEC):肠产毒素型大肠埃希菌是5

岁以下婴幼儿和旅游者腹泻的重要病原菌。致病物质主要是肠毒素和定植因子,定植因子使细菌黏附到小肠黏膜上皮细胞,细菌繁殖产生肠毒素,肠毒素引起腹泻,可从轻度至严重的霍乱样腹泻。肠毒素分不耐热和耐热两型,均由其质粒编码。不耐热肠毒素(heat labile enterotoxin,LT)对热不稳定,65℃30分钟可被破坏,由1个A亚单位和5个B亚单位组成,A亚单位是毒素的活性成分,B亚单位可与肠黏膜上皮细胞表面的GM1神经节苷脂结合,介导A亚单位穿入细胞膜,进而活化腺苷环化酶,使细胞内ATP大量转变为cAMP。胞质内cAMP水平升高后,导致肠黏膜细胞内H<sub>2</sub>O、Cl<sup>-</sup>、K<sup>+</sup>、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>等过度分泌至肠道,同时Na<sup>+</sup>的再吸收减少,导致腹泻。毒素还可刺激前列腺素的释放和炎症因子的产生,导致进一步水分的丧失。不耐热肠毒素与霍乱肠毒素两者间的氨基酸组成同源性达75%左右;两者B亚单位的肠黏膜结合受体都是同一个GM1神经节苷脂。LT可刺激机体产生中和抗体,有保护作用。ETEC的耐热肠毒素(heat stable enterotoxin,ST)可分STa和STb两型,STb与人类疾病无关,STa为低分子量多肽(MW1500~4000),100℃加热20分钟仍不失活。免疫原性弱。STa的作用机制是通过激活肠黏膜细胞内的鸟苷环化酶,使GTP大量转化为cGMP,胞内cGMP增多而导致腹泻。多数STa阳性菌株可同时产生LT,致病性更强的。编码STa和LT-I的基因存在于同一个转移性质粒上,该质粒也同时携带编码黏附素(CFA/I,CFA/II,CFA/III)的基因。

(2)肠侵袭型大肠埃希菌(enteroinvasive E. coli,EIEC):主要侵犯较大儿童和成人。所致疾病症状与菌痢类似,临床表现有发热、腹痛、腹泻、脓血黏液便及里急后重等症状。EIEC并不产生肠毒素,其可侵袭结肠黏膜上皮细胞并在其中大量繁殖。细菌能侵袭结肠黏膜上皮细胞,引起细胞内吞,进入细胞质中大量增殖,最后杀死受感染的细胞,再扩散到邻近细胞,导致组织破坏和炎症。EIEC侵袭结肠黏膜上皮细胞的能力与其质粒上携带的侵袭性基因有关。该质粒与志贺菌携带的侵袭性基因质粒高度同源。EIEC无动力,其生化反应和抗原结构与志贺菌相似,易被误诊。

(3)肠致病型大肠埃希菌(enteropathogenic E. coli,EPEC):是最早发现的致泻大肠埃希菌,是婴幼儿腹泻的主要病原菌,有高度传染性,严重者可致死。病菌在十二指肠、空肠和回肠上段大量繁殖,黏附于微绒毛,导致刷状缘被破坏、微绒毛萎缩变平、上皮细胞排列紊乱和功能受损,严重干扰对肠道中液体等的吸收造成水样腹泻,常为自限性,但可转成慢性。

(4)肠出血型大肠埃希菌(enterohemorrhagic E. coli,EHEC):为出血性结肠炎和溶血性尿毒综合征(haemolytic uremic syndrome,HUS)的病原体。引起人类疾病的主要是O157:H7血清型。但不同国家的流行株可以不相同。目前已被许多国家列为法定传染病。污染的食品是重要的传染源。牛可能是O157:H7的主要储存宿主。

(5)肠集聚型大肠埃希菌(enteroaggregative E. coli,EAEC):可引起婴儿持续性腹泻、脱水、偶有血便。EAEC的特点是能在细胞表面自动聚集,形成砖状排列,影响水分及营养物质的吸收。细菌感染可导致微绒毛变短,单核细胞浸润和出血。此外,EAEC还能刺激黏液的分泌。

### (三)微生物学检查

1. 标本 肠外感染根据感染情况采取中段尿、脓液、血液、脑脊液等;胃肠炎取粪便。

2. 分离培养与鉴定

#### (1)肠道外感染

1)涂片染色检查:除血液标本外,均需做涂片染色检查。



2)分离培养:血液接种肉汤增菌,待生长后再移种血琼脂平板。体液标本的离心沉渣和其他标本直接划线分离于血琼脂平板。37℃孵育 18~24 小时后观察形态。

3)鉴定:初步鉴定根据 IMViC(+ + - -) 试验,最后鉴定靠系列生化反应。尿路感染尚需计数菌落量,每毫升尿中细菌数 $\geq 10$  万有诊断价值。

(2)肠道内感染:将粪便标本接种于鉴别培养基,挑选可疑菌落并鉴定为大肠埃希菌后,再分别用核酸杂交、ELISA、PCR 等方法检测不同类型致腹泻大肠埃希菌的毒力因子、肠毒素血清型等。

#### (四)防治原则

保持高卫生标准,减少接触引起胃肠炎大肠埃希菌菌株的危险。治疗选用磺胺药、庆大霉素、诺氟沙星、吡哌酸等,但易产生耐药性,应在药物敏感试验的指导下进行。

### 三、志贺菌属

志贺菌属(*Shigella*)是人类细菌性痢疾的病原菌,通称痢疾杆菌(*dysentery bacterium*),引起的疾病就是细菌性痢疾(*bacillary dysentery*,简称菌痢)。细菌性痢疾是一种常见病,临床上以发热、腹痛、腹泻、里急后重感及黏液脓血便为特征,主要流行于发展中国家,全世界年病例数超过 2 亿,年死亡病例达 65 万。

#### (一)生物学性状

短小杆菌,革兰染色阴性。无鞭毛,无荚膜,无芽胞,有菌毛。营养要求不高,在普通琼脂平板上生长,形成半透明的光滑型菌落。志贺菌属中的宋内志贺菌常为扁平的粗糙型菌落。志贺菌属细菌有 O 和 K 两种抗原,O 抗原是分类的依据(表 4-2)。

表 4-2 志贺菌属的分类

菌种	群	型	亚型	甘露醇	鸟氨酸脱羧酶
痢疾志贺菌	A	1~10	8a,8b,8c	-	-
福氏志贺菌	B	1~6,x,y 变型	1a,1b,2a,2b,3a,3b,3c,4a,4b	+	-
鲍氏志贺菌	C	1~18		+	-
宋内志贺菌	D	1		+	+

#### (二)致病性与免疫性

1.致病物质 致病物质包括侵袭力和内毒素,有些菌株还能产生外毒素。

(1)侵袭力:志贺菌侵袭和生长繁殖的靶细胞是回肠末端和结肠部位的黏膜上皮细胞。志贺菌依靠菌毛黏附于上皮细胞,通过Ⅲ型分泌系统向上皮细胞和巨噬细胞分泌 4 种蛋白(IpaA,IpaB,IpaC,IpaD),这些蛋白诱导细胞膜凹陷,导致细菌的内吞。能溶解吞噬小泡,进入细胞质内生长繁殖。另外,可通过受感染细胞内肌动纤维的重排,推动细菌进入相邻细胞,开始细胞之间的传播。在感染和传播过程中,可引起白细胞介素 1 $\beta$  的释放,从而吸引多形核白细胞(PMN)到受感染组织,致使肠壁的完整性遭受破坏。细菌得以到达并攻击较深层的上皮细胞,使坏死的细胞越来越多。坏死的黏膜上皮细胞、细胞碎片、死亡的白细胞、纤维蛋白和血液构成脓血黏液便。

(2)内毒素:志贺菌所有菌株都可产生强烈的内毒素。内毒素可作用于肠黏膜,使其通透性增高,进一步促进对内毒素的吸收,引起发热、神志障碍,甚至中毒性休克等一系列症状。内毒素能破坏肠黏膜,可促进炎症、溃疡、出血和坏死,呈现典型的脓血黏液便。内毒素还能