

临床病原微生物诊断技术

# 临床病原微生物诊断技术

LINCHUANG BINGYUANWEISHENGWU  
ZHENDUANJISHU

编著 齐子荣 丁林茂 杨素娟  
审校 张卿西



RA46.5/O7B  
社

军事医学科学出版社

# 临床病原微生物诊断技术

编著 齐子荣 丁林茂 杨素娟

审校 张卿西

军事医学科学出版社

## 前 言

在临床治疗中,由病原微生物引起的传染病或感染发炎是医生普遍关注的问题。病原微生物的快速检验和鉴定是协助医生迅速做出正确诊断的重要依据,在指导治疗以及有效地控制感染上起重要作用。

本书是在多年研究的基础上并借鉴近年国内外病原微生物诊断进展的大量材料编著的,力求结合临床实际而不是单纯地介绍技术方法。涉及的内容既有常规技术又有现代免疫学方法并扼要介绍电子计算机数控新技术等。本书可为临床医生、检验科工作人员和从事微生物研究的科技工作者提供有益的信息和参考。

本书承蒙军事医学科学院张卿西教授热情指导和严谨审阅,在此谨表谢意。

由于编者业务知识水平有限,错误或不当之处在所难免,请予以指正。

编 者

1996年1月15日

\* \* \* \* \*

21122/15

### 图书在版编目(CIP)数据

临床病原微生物诊断技术 / 齐子荣编著. - 北京:军事医学科学出版社, 1995.8

ISBN 7-80121-010-7

I. 临... II. 齐... III. 临床医学-病原微生物-医学检验-诊断学 IV. R446.5

中国版本图书馆 CIP 数据核字(95)号 08883 号

### 临床病原微生物诊断技术

编 著 齐子荣

责任编辑 李卫雨

军事医学科学出版社

(北京市太平路 27 号 邮政编码: 100850)

新华书店总店科技发行所发行

北京四环科技印刷厂印刷

开本: 787×1092mm 1/16 印张: 9.4 字数: 246 千字

1996年3月第1版 1996年3月第1次印刷

印数 1—1500 定价 12.00 元

ISBN 7-80121-010-7/R·003

## 目 录

英文名词缩略语.....	1
总论.....	3
第一章 呼吸道感染的微生物.....	5
第二章 胃肠道感染的微生物.....	16
第三章 血液中感染的微生物.....	23
第四章 泌尿道感染的微生物.....	31
第五章 生殖道感染的微生物.....	37
第六章 脑脊液中感染的微生物.....	47
第七章 眼、耳、乳突、副鼻窦、牙、骨和渗出物中感染的微生物...	55
第八章 病人血清中的抗原-抗体测定 .....	60
第九章 微生物的血清学鉴定.....	70
第十章 微生物的药敏测定和抗生素的敏感性测定.....	78
第十一章 荧光抗体技术在病原微生物诊断中的应用.....	93
第十二章 微生物实验室的自动化和快速诊断方法.....	96
第十三章 微生物检验中的质量控制和安全措施 .....	101
第十四章 培养基的配方及制备 .....	109
主要参考文献 .....	143

## 英文名词缩略语

<b>AFB</b>	<b>Acid-fast bacilli</b>
<b>AIK or K</b>	<b>Alkaline</b>
<b>ART</b>	<b>Automated reagin test for syphilis</b>
<b>ATCC</b>	<b>American Type Culture Collection</b>
<b>B cells</b>	<b>Lymphocytes involved in antibody production</b>
<b>BAP</b>	<b>Blood agar plate</b>
<b>BCG</b>	<b>Bacillus Calmette-Guerin(for tuberculosis immunization)</b>
<b>BFP</b>	<b>Biological false-positive</b>
<b>CAP</b>	<b>Chocolate agar plate</b>
<b>C &amp; S</b>	<b>Culture and sensitivity</b>
<b>CDC</b>	<b>Centers for Disease Control and Prevention</b>
<b>CF</b>	<b>Complement fixation</b>
<b>CFU</b>	<b>Colony-forming unit(i.e.Colony count)</b>
<b>CIE</b>	<b>Counterimmunoelectrophoresis</b>
<b>CNS</b>	<b>Central nervous system</b>
<b>CPC</b>	<b>Clinical pathologic conference</b>
<b>CPE</b>	<b>Cytopathogenic effect</b>
<b>CRP</b>	<b>C-reactive protein</b>
<b>CSF</b>	<b>Cerebrospinal fluid</b>
<b>CYE</b>	<b>Charcoal yeast extract(agar plate)</b>
<b>DFA</b>	<b>Direct fluorescent antibody test</b>
<b>DNA</b>	<b>Deoxyribonucleic acid</b>
<b>DNase</b>	<b>Deoxyribonuclease</b>
<b>ELISA</b>	<b>Enzyme-linked immunosorbent assay</b>
<b>EMB</b>	<b>Eosin-methylene blue (agar plate)</b>
<b>FTA</b>	<b>Fluorescent treponemal antibody</b>
<b>FUO</b>	<b>Fever of unknown origin</b>
<b>GC</b>	<b>Gonococcus</b>
<b>GN</b>	<b>Gram-negative(broth)</b>
<b>HAA</b>	<b>Hepatitis-associated antigen</b>
<b>HAI</b>	<b>Hemagglutination inhibition</b>
<b>ID</b>	<b>infectious disease; identification</b>
<b>IFA</b>	<b>indirect fluorescent antibody; immunofluorescent antibody</b>
<b>Ig,IgG,etc</b>	<b>Immunoglobulin, immunoglobulin G, etc</b>
<b>KIA</b>	<b>Kligler's iron agar (tube)</b>
<b>MAC</b>	<b>MacConkey's agar plate</b>

<b>MIC</b>	<b>Minimum inhibitory concentration</b>
<b>MBC</b>	<b>Minimum bacteriocidal concentration</b>
<b>NFB</b>	<b>Glucose non-fermenting gram-negative bacteria</b>
<b>NGU</b>	<b>Nongonococcal urethritis</b>
<b>O-F</b>	<b>Oxidation-fermentation medium</b>
<b>O &amp; P</b>	<b>Ova and parasites</b>
<b>ONPG</b>	<b>O-nitrophenol-galactopyranoside(-galactosidase test)</b>
<b>PEG</b>	<b>polyethyleneglycol</b>
<b>PID</b>	<b>Pelvic inflammatory disease</b>
<b>PPD</b>	<b>Purified protein derivative(skin test antigen tuberculosis)</b>
<b>PPNG</b>	<b>Penicillinase-producing(i.e. penicillin-resistant gonococcus)</b>
<b>PRAS</b>	<b>Prereduced, anaerobically sterilized</b>
<b>QC</b>	<b>Quality control</b>
<b>QNS</b>	<b>Quantity nonsufficient</b>
<b>RNA</b>	<b>Ribonucleic acid</b>
<b>SBE</b>	<b>Subacute bacterial endocarditis</b>
<b>SBA</b>	<b>Suprapubic bladder aspiration</b>
<b>STD</b>	<b>Sexually transmitted disease</b>
<b>STAT</b>	<b>Statim(Latin),immediately</b>
<b>T cells</b>	<b>Lymphocyte involved in cellular immunity</b>
<b>TTA</b>	<b>Transtracheal aspiration</b>
<b>TB</b>	<b>Tuberculosis</b>
<b>T-M</b>	<b>Thayer-Martin (agar plate)</b>
<b>TSI</b>	<b>Triple sugar iron (agar plate)</b>
<b>TSS</b>	<b>Toxic shock syndrome</b>
<b>URI</b>	<b>Upper respiratory infection</b>
<b>UTI</b>	<b>Urinary tract infection</b>
<b>VD</b>	<b>Venereal disease</b>
<b>V-P</b>	<b>Voges-Proskauer</b>

# 总 论

病原微生物检验是临床诊断技术之一，它对检验常见的临床感染有重要实用价值。本书在此认识基础上，为临床医生提供病原微生物诊断的基础知识和基本技术手段。

本书共有十四章，其中包括呼吸道、胃肠道、泌尿道、生殖道、脑脊液及血液和五官等的微生物感染及其临床常用的现代血清学和免疫学以及自动化诊断技术。本书按照全身系统分别论述病原微生物感染的诊断，并紧密地与临床感染特征相结合，着重突出病原微生物在各系统感染的特点及其诊断方法，使临床医生对病原微生物感染的发生和发展、病原微生物的生物学特性、感染方式及其毒力、采样方式及其检验程序等获得系统的认识，并列各系统感染的病原菌种属，增强临床医生对各系统病原微生物感染的认识。

在临床病原微生物诊断技术上，本书用较大篇幅详细论述实验室常用的诊断技术及操作程序，使实验者便于掌握操作程序和规范，同时使实验者只要遵循并按其步骤操作，均可得出正确的检验结果和达到预期目的。

首先，在呼吸道感染的微生物中，本书论述了上呼吸道鼻咽腔和下呼吸道肺、支气管的感染特点及检验病原菌的技术方法。据知，感染病原菌约有 20 余种，其中上呼吸道的感染菌群对临床诊断有重要意义的有百日咳杆菌、白喉棒状杆菌、奋森梭菌螺旋体、脑膜炎双球菌和嗜血杆菌以及念珠菌等，而在下呼吸道感染的病原菌主要有肺炎双球菌以及嗜肺性军团菌，并着重论述了呼吸道感染的临床特征以及采样、培养分离及菌群鉴定的操作程序和注意事项。

胃肠道感染的微生物主要由肠杆菌科的菌群组成。它包括大肠杆菌类、变形杆菌以及沙门菌、志贺菌、耶尔森菌、弯曲杆菌及弧菌等，偶尔也见有致病性葡萄球菌及强毒的梭状芽胞杆菌和肉毒杆菌以及少见的结核分支杆菌和某些病毒。其中在临床感染中占重要地位的是沙门菌和志贺菌。霍乱和副霍乱以及肉毒杆菌在胃肠感染中也不可忽视，应引起高度警惕，一旦发现应紧急处理，防止传染源播散。

血液是病原菌极易生长和增殖的场所。血液受到病原菌侵袭后，在控制不当的情况下往往易发生菌血症或败血症，危及病人生命。因而研究血液中的病原菌感染及其监控是相当重要的。从临床检验所见，侵入血液的病原菌种属是相当复杂的，其中主要的菌群有球菌类的葡萄球菌和链球菌，肠道菌群类的大肠杆菌及沙门菌及其它致病性菌属，约有 20 余种。对血液病原菌的检验主要是血培养，它是最直接的检验方法，但在血样检验中，从采样、培养到分离和鉴定都应严格无菌操作，以防止污染。特别对静脉导管滞留的病人尤其应防止污染外源性菌群，否则易造成假阳性而影响检验结果。

泌尿道感染可在不同性别和各年龄发生，并常引起全身性疾病，其中最常见的是急性、慢性肾盂肾炎。从尿液培养和分离病原菌是直接诊断泌尿道感染的可靠手段。大家知道，尿液是一般病原菌的良好培养基，但正常排出尿的菌群与被污染尿的菌群是不同的，易鉴别。泌尿道中易受感染的部位为尿道和阴道，而膀胱在一般情况下是无菌的。感染的菌群主要是葡萄球菌、大肠杆菌、变形杆菌、乳酸杆菌及其它酵母类菌等。感染形式多为混合感染。检验泌尿道感染的检验技术主要是尿培养和直接镜检。

正常人生殖道的菌群主要由球菌类及革兰阴性杆菌组成。其中子宫颈的菌群相当多，

其菌群类属与阴道上段的菌群相似。而外阴的菌群多为该皮肤区存在的病原菌的混合菌群。危害人类健康的病原菌是淋病双球菌和梅毒螺旋体。对引起性病的淋病双球菌可用样品培养技术，从其培养中直接分离出该病原菌，而对梅毒螺旋体主要用血清学诊断方法。因它尚不能在体外直接培养出来。有时支原体和衣原体也能引起子宫颈感染，偶尔人型疱疹病毒也可引起尿道炎。

检验脑脊液中的病原菌是诊断脑膜炎的重要手段。据知，引起脑膜炎的病原菌主要有脑膜炎奈瑟菌及流感杆菌等。在极少情况下，也可检验出沙门菌属及结核分支杆菌等。由于在临床上医生可能很难或者不可能从临床症状上鉴别出脑膜炎，因此，采用快速的准确的检验技术是重要的诊断手段。对于被疑为脑膜炎的病人，其样品不论是清亮的还是混浊的，都应做微生物学检验。

眼、耳、乳突、副鼻窦、牙及骨等感染的微生物有其特性。如眼睛受眼泪的经常冲洗，而眼泪中含抗菌成分，因此一般从眼睛感染的培养物分离出的病原菌数量是较低的，除非有显著脓性。为保证检出病原菌必采用较大量接种和接种各种培养基。对其它部位的病原菌检验，基本与检验眼睛感染的病原菌方法相似。

在病原微生物临床诊断技术上，本书除介绍一般常用的诊断技术外，还介绍了一些现代的方法。其中包括荧光技术、免疫学技术以及某些自动化技术等。同时考虑到微生物检验技术的特殊性，还着重论述了微生物检验的质控和安全措施，并特别强调了对某些强毒菌的防护措施，使从事微生物检验的工作者能安全地完成各项工作。

本书对培养基的制配及其处方和配制技术均作了具体的介绍，使从事培养基配制工作的人员照方配制即可获得合格培养基。



# 第一章 呼吸道感染的微生物

呼吸道感染是临床常见的症状，在呼吸道感染中，人体的上和下呼吸道是病原菌的栖息和繁衍的部位<sup>[1,2]</sup>，其中常见的病原微生物包括：

A 和 B 群  $\beta$ -溶血性链球菌( $\beta$ -hemolytic streptococcus)

白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)

流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)

脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*)

结核分支杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)和其他分支杆菌

霉菌，包括念珠菌属(*Candida sp.*)

荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)、粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)和其他菌肺炎杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)和其他大肠杆菌类(*Coliform bacilli*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和其他假单胞菌(*Pseudomonas*)

黑色素拟杆菌(*Bacteroides melaninogenicus*)、颗粒梭形杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)、脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)和其他革兰阴性厌氧杆菌(*Gram-negative anaerobes*)

厌氧的微需氧球菌

百日咳杆菌(*Bordetella pertussis*)

军团菌属(*Legionella sp.*)

诺卡菌属(*Nocardia*)

支原体属(*Mycoplasma sp.*)和衣原体属(*Chlamydia*)

病毒(viruses)

肺囊虫(*Pneumocystis*)

## 一、咽喉和鼻咽腔培养物检验

咽喉和鼻咽腔培养物对下列感染的诊断有重要帮助：链球菌性咽喉炎、白喉、或口腔念珠菌感染(鹅口疮)；也有助于对某些疾病例如猩红热、风湿热和急性肾小球性肾炎感染灶的确诊；还有助于对某些细菌例如 A 群  $\beta$ -溶血链球菌、脑膜炎双球菌、金黄色葡萄球菌和白喉杆菌带菌状态的检验。

为得到最好的结果，重要的是在抗感染治疗之前就做咽喉培养物培养，而且采样方法要正确。满意的方法如下：

(1) 使用无菌咽喉培养设备，例如，市售的一次性用品，其中装有带聚酯尖的涂抹棒和 1 安瓿改良的 Stuart 运输培养基。

(2) 将病人舌体压下，安全暴露咽喉并充分照明，将拭子紧紧地压在咽喉后壁、两侧扁桃体或扁桃体窝、以及有炎症、渗出液或溃疡的任一部位擦拭。小心避免拭子碰到舌、颊部或嘴唇。

(3) 将拭子放到内试管中，打开安瓿，将拭子放到瓶内的维持培养基内，立刻送到实验室，尽快接种，如有必要，将培养物放置 1h 以上，应放置冰箱直至能够对平面划线接种时为止。

如怀疑是白喉，应取两个拭子，一个即刻接种到 Loeffler 培养基上；另一个按上述第 3 步处理。

如果拭子用于分离病毒，而且需要将样品邮寄至指派的实验室，则应将其放在密封的塑料袋内摆放到装冰的盒中，再用另一个塑料袋套上并封闭起来，这种包装适宜于运输病因因子。作病毒培养用的样品无论何时都不应当冻成冰。如果想分离脑膜炎双球菌，推荐作鼻咽培养物培养，因为这些病原菌在鼻咽腔、鼻子或咽喉中更常见。为了从带菌者怀疑对象中查出脑膜炎双球菌或从疑为百日咳病人中查出百日咳杆菌，鼻咽拭子也是必不可少的。对这种培养最好使用镍铬合金或不锈钢丝的棉签装在含有几滴肉汤的无菌试管内。将病人的头抱稳后，将鼻镜插入；轻轻地将金属丝棉拭子经鼻孔插到后鼻咽部（勿用力）。在该处轻轻地转动，让它停留 20~30s，然后灵巧地退出来。金属丝棉拭子也可以在棉球尖附近弯曲成直角（压在无菌试管容器的内壁把它弄弯）。然后通过口腔并在悬雍垂和软腭之后进入鼻咽腔。必须小心避免口腔和咽喉污染棉拭子。无论是哪一种情况，已接种的拭子都要放回含肉汤的内层试管或者放到咽拭培养采样器 Culturette 的运输培养基内，然后立即送到实验室。在诊断百日咳时也可以用一根软橡皮导管插入鼻咽腔代替拭子。

有时，特别是在研究葡萄球菌或链球菌鼻部带菌者时，还需要作前鼻孔培养，采样方法是将肉汤浸湿的棉拭子插入鼻孔 1 英寸（2.54cm）深处，贴在两侧鼻腔粘膜上轻轻地转动，并将它放回肉汤管内。

检测溶血性链球菌的常规操作步骤（包括分离方法）如下。

直接用咽喉或鼻咽拭子接种到血琼脂平面上。可以用几种方法，因为常规咽喉培养物主要用来检测 A 群  $\beta$ -溶血链球菌，所以在下列操作步骤中将强调后者的意义：

(1) 如果使用聚酯做的拭子（在适合用这种拭子时）推荐直接用湿润的绵羊血琼脂平板培养基进行接种（勿加葡萄糖，因它能抑制特有的溶血作用）。将拭子紧贴在小部分琼脂表面上滚动，用一无菌金属环作划线接种。将接种物涂布到平板的其余部分以便获得完全分离的菌落。涂布接种物的技术有许多种。这里不详述。用接种环刺入琼脂数处以便观察在氧张力下降时由产生  $\beta$  型溶血的菌所造成的表面下溶血现象。这个步骤既可以用于新鲜制备的培养物，也可以用于在原先容器中放置数天的聚酯拭子（必须放在冰箱内）。

(2) 如果用的是浸泡在肉汤中的拭子，将它贴在肉汤管的侧壁上使劲捻转，以便尽可能地把拭子上的样品接到悬液中。据证实，肉汤混悬液接种比直接用拭子在血液琼脂平板上划线接种能更好地检验出这种咽喉拭子上的菌丛。用一无菌环将一铂环量混悬液接种到血琼脂平板培养基上，按以前所述划线接种。

(3) 如果愿作倾注平板，则将棉签放在 2ml 胰蛋白酶解酪蛋白黄豆肉汤内，按前述方法制备悬液。①取一铂环量的这种悬液移到 20×150mm 内含 15mm 左右已溶解并冷却（45~50℃）的胰蛋白酶解酪蛋白黄豆琼脂的带螺丝盖的试管内。②吸出 0.8ml 无菌脱纤维绵羊血放到琼脂中，翻转试管使全部内容物混合，绵羊血可以按常规办法每一个无菌小试管装入 1ml 并放在冰箱内，这样可以保存 7~10 天不会变质。③用火焰烧管口并将琼脂倾注至无菌平板内，放置使其冷却变硬。

在检验生长在血琼脂平板表面疑为非溶血性的 A 群链球菌的菌株时，倾注平板是很有用的。这些菌株只产生链球菌溶血素 O，并可被空气中的氧灭活，因此，生长在平板表面时不产生溶血现象。但是 A 群链球菌的大多数菌株围绕表面菌落出现  $\beta$ -溶血现象，因为它们产生链球菌溶血素 S，它对氧是稳定的。

全部咽喉培养物都在 35℃ 需氧条件下孵育，而鼻咽培养平板（检查脑膜炎双球菌时）则放在点着蜡烛的缸内、瓶或 10% CO<sub>2</sub> 孵箱内孵育 18~24h，有些作者建议最好用厌氧培养。

根据 Gunn 等报道，在绵羊血琼脂内掺入磺胺甲基异噁唑（sulfamethoxazole, SMZ）和甲氧苄氨嘧啶（trimethoprim, TMP）可以更有效地从咽喉培养物中检验出 A 群和 B 群链球菌。因为这种培养基可抑制许多其它类型的链球菌。而且杆菌肽纸片用于纯培养物 A 群  $\beta$ -溶血性链球菌鉴定时其准确性可达 95%。Kurzynski<sup>[5]</sup> 等对接种在含有增效磺胺（SMZ+TMP）的血琼脂平板上做了咽喉培养物杆菌肽纸片敏感试验。结果在 24h 内，在这种类型的初次接种的平板上，85% A 群链球菌被辨认出来，而在常规羊血琼脂平板上检出率仅为 26%。Baron 等采取了另一有意思的途径。他们将含有 25 $\mu$ g 增效磺胺的纸片和含有 0.04U/ml 杆菌肽的纸片一个挨一个地贴在已大量接种咽喉培养物的胰蛋白酶解酪蛋白黄豆绵羊血琼脂平板上。由于增效磺胺纸片抑制了正常菌丛，从而可以看到 A 群链球菌以及杆菌肽对它的抑制。这种技术在证实检验结果方面，特别是对那些没有荧光显微镜的实验室大有用处。

在血琼脂上所获咽喉分泌物培养的结果在一定程度上取决于制备平板使用的血液类型。

推荐进行这些培养时可使用绵羊血琼脂平板（也可用马血）；只有当绵羊血或马血都买不到时才用人血（新鲜血或血库血）。

快速诊断链球菌咽炎的另一途径是咽分泌物涂片的革兰染色，然而有决定意义的是看到多形核白细胞和单个或成双的球形革兰阳性球菌形影不离。但是，鉴于在正常上呼吸道菌丛中可以见到许多其他种类球菌的事实，人们也怀疑这种形态学是否真的对酿脓链球菌特异。大约在 1/4 病人中，出现假阳性结果也是这种技术的一个值得注意的问题。

#### (4) 平板的培养结果观察

接种咽喉培养物的血琼脂平板有时会把缺乏经验的细菌学家搞糊涂。因而介绍正常菌丛以及可能具有重要意义的病原菌和这两组病原菌的菌落特征的知识将有助于解决这个问题。在正常咽喉中常遇见的病原微生物按主次排列如下：

$\alpha$ -溶血性链球菌 ( $\alpha$ -hemolytic streptococcus)

正常喉内各种奈瑟菌，包括产色素型

凝固酶阴性葡萄球菌，偶而还有金黄色葡萄球菌

溶血性嗜血杆菌（可能会和  $\beta$ -溶血性链球菌相混淆）和流感杆菌

肺炎球菌

非溶血性 ( $\gamma$ ) 链球菌

类白喉杆菌

大肠杆菌类细菌（特别是在抗感染治疗后）

酵母，包括白色念珠菌 (*Candida albicans*)

此外在感染的咽喉中还能见到如下微生物：A 群  $\beta$ -溶血性链球菌，偶而也有 B、C 和 G 群；白喉棒状杆菌；脑膜炎球菌。

大多数咽喉培养是为了检查 A 群链球菌。因此无论划线血琼脂或倾注平板都要在过夜孵育后小心地检查  $\beta$ -溶血性链球菌菌落的存在。任何怀疑为  $\beta$ -溶血性链球菌的菌落都应当进行再培养：用一根直针刺入该菌落，并在绵羊红细胞琼脂平板的一个扇面区内划线接种，或者接种到血肉汤管内。它通常产生纯培养物；如果不纯，应当重复这种操作。若进一步鉴定这些菌落可采用杆菌肽纸片敏感试验，而且最好用荧光抗体法或协同凝集反应来证实。Phadebact（一种产品的商品名）可以用来直接对初次分离平板上的细菌进行  $\beta$ -溶血性链球菌的血清学分型。如果初次分离的菌落不够做直接分型试验，可以采用 4h 或 24h 操作法。

### 1. 百日咳的细菌学诊断

近年来百日咳病例数目有回升的趋势。在成人和儿童中都有病例发生。

百日咳诊断靠从呼吸道分泌物中分离出百日咳杆菌来证实。培养取材系用鼻咽拭子，细菌培养则用专门培养基（Bordet-Gengou）琼脂平板，其中含 15%~20% 绵羊血。

按如下方式采取鼻咽拭子。固定小儿的头，将特殊的金属丝棉签小心地通过鼻孔沿着鼻腔底部前进直至触到后咽壁。保持该位置，同时嘱病人做数次咳嗽。然后抽出棉签，立即在 Bordet-Gengou 培养基上划线接种。并用无菌金属环或涂抹器将平板上的接种物铺开。在制备时可向培养基内掺入青霉素（0.5U/ml），抑制正常存在于鼻咽内对青霉素敏感的细菌生长，但一般不影响百日咳杆菌生长。将平板放在 35℃ 有氧状态下孵育 4 或 5d，用放大镜检查典型菌落，该菌落像一小滴水银，周围有一圈溶血。百日咳杆菌靠染色反应、荧光抗体技术以及和特异抗血清的凝集现象来辨认。

从临床病人分离的阳性产率波动于 20%~98% 之间。这种变化和使用操作步骤、病程阶段以及事先是否服用抗生素有关。Whitaker<sup>[1]</sup>等使用荧光抗体技术在发病的第 1 周可以诊断证实 94% 的百日咳病人。Holwerda Elderling<sup>[4]</sup>使用荧光抗体技术直接给取自 Bordet-Gengou 平板的早期生长物染色，可以提前 1 天鉴定出百日咳杆菌。荧光抗体技术对诊断是有帮助的，但是应当经常与常规培养一起做。

当实验室没有百日咳杆菌培养设备时，可以用荧光抗体法检查鼻咽涂片。当这些涂片用 4 或 8U/ml 抗蛋白酶肽（caprotinin）处理时，它们的荧光抗体染色质量至少可保持 3 周。

### 2. 白喉的细菌学诊断

白喉的诊断是个临床问题，主要应当由医生负责，医生依赖细菌学家并希望根据病变部位直接检查涂片且在 15min 内得出明确诊断是有困难的。尽管在患处和粘膜的染色涂片出现白喉杆菌是很有代表性的发现，但这些细菌不能只靠形态学来鉴定，因为其他非致病性类白喉杆菌与白喉棒状杆菌无法区别，因此只根据显微镜检查来做诊断，误诊和漏诊的机会都很大，对这种观察结果只能作为感染的推测依据。这些细菌在分类学上的位置及其类型只有在病人身上分离出有毒性的白喉棒状杆菌后才能确定。测定这些细菌需要历时数日的小心培养和在显微镜下观察，接着用合适的动物或在体外进行毒力试验。

在初次分离时，白喉棒状杆菌最好用 Loeffler 培养基（3 份动物血清加 1 份葡萄糖肉汤，凝固成斜面）或改良的 Pai 培养基等的合适培养基培养。在这些培养基上经 35℃ 孵

育 18~24h 后就会出现细菌生长。使用鉴别性和选择性培养基，例如胱氨酸或巧克力亚硝酸盐琼脂时，检出率较高，初次接种时也应当采用这些培养基。但是，从巧克力亚硝酸盐琼脂中检出的白喉杆菌，其显微镜下的形态不如用 Loeffler 或 Pai 培养基者那样有特色。

实验室用于进行白喉杆菌培养样品通常是咽和鼻咽部拭子。将它们迅速地接种到 Loeffler 或 Pai 斜面上，以及同时划线接种胱氨酸亚硝酸盐琼脂平板或改良的 Tinsdale 培养基上。因  $\beta$ -溶血性链球菌引起的严重咽喉感染可产生类似白喉的感染，故建议和 Loeffler 斜面以及亚硝酸盐平板一起培养，再接种在绵羊血琼脂平板上，以检查 A 群链球菌。在接种培养基之后，可以将拭子放在玻片上滚动，制成涂片，固定后用美蓝染色。最好另外用一拭子作涂片，这样，另一拭子在接种后可以留在 Loeffler 培养基斜面上。应当检查玻片是否存在染色不规则的革兰阳性多形态的细菌，这种细菌便是白喉杆菌。

接种过的培养基放在 35℃ 中孵育，在短期 (2~8h) 孵育的 Loeffler 斜面上可以观察到白喉棒状杆菌经常比其他细菌生长得快，当用美蓝染色时呈现出特有的形态学特点，杆菌呈深染，显示出隔膜，末端呈楔状并逐渐变尖。这样的几个细菌经常互成一角度，像一个 V 和 Y 字母或中国字，但不像某些类白喉杆菌那样排成栅状。

如果从 Loeffler 斜面做的涂片上发现酷似白喉杆菌的细菌而亚硝酸盐平板的涂片上没有，则将斜面上分离的生长物混悬在 1~2ml 无菌肉汤内，并取出一铂环新鲜的亚硝酸盐平板上划线接种，并进行分离。全部平板都应当保存，直到检查 48h 仍为阴性者方可丢弃。

对已知或疑为白喉的临床病例，检测白喉杆菌可用荧光抗体技术作为快速的推测性诊断技术。因为荧光抗体结合物常会与化脓白喉杆菌发生交叉反应而不能区别白喉棒状杆菌的毒性株和非毒性株。有人建议将这种操作步骤与常规培养步骤结合起来以取得最高敏感性和特异性。

### 3. 奋森梭菌螺旋体感染的诊断

过去曾认为奋森梭菌螺旋体所致的齿炎或牙龈炎、口腔或咽的假膜性或溃疡性感染是由革兰阴性螺旋体、奋森、包柔螺旋体和直或微弯和两头尖的厌氧革兰阴性杆菌以及颗粒梭形杆菌所引起的。这种异常大的螺旋体也许和许多其他厌氧菌一起，似乎与这个问题有特殊的关系。这些厌氧菌包括黑色素拟杆菌、其他革兰阴性厌氧杆菌和厌氧球菌。局部组织抵抗力降低通常是感染的前驱。

患奋森梭菌螺旋体咽喉炎时，扁桃体病灶上的假膜易被误认为白喉的假膜，对它们进行鉴别非常重要。用结晶紫染涂片 1 min，并寻找同无数脓细胞共同存在的大量典型细菌可以很容易显示梭菌螺旋体。由于这些细菌经常存在于正常口腔和牙龈中，它们在涂片上的存在必须与临床所见相联系才有意义。奋森咽炎的关键致病菌是坏死梭形杆菌 (*Fusobacterium necrophorum*)，因为奋森咽炎并发脓毒症和转移性感染时，几乎总能从血培养和远处病灶中检验出坏死梭形杆菌，培养没有诊断价值。

### 4. 脑膜炎双球菌和嗜血杆菌的鼻咽分泌物培养

鼻咽分泌物培养在怀疑为脑膜炎双球菌血症和脑膜炎双球菌性脑膜炎的病例中，证明脑膜炎双球菌的存在以及测定脑膜炎双球菌带菌者时有重要意义，标本可以用金属丝棉拭子经口腔在悬雍垂之下并超过悬雍垂到达鼻咽的后壁或经鼻孔沿着鼻腔底部到达后壁来收

集。在这两种情况下，都要求在对准鼻咽壁的位置上轻轻地转动棉拭子以沾取少量粘液。应当注意，从健康人上也可以分离到脑膜炎奈瑟菌；在遭受脑膜炎暴发的人群中，带菌率可高达 80%。在这种情况下，阳性培养的结果是值得怀疑的。在脑膜炎双球菌性脑膜炎康复后并和较敏感的年轻人相接触的病人中查出一个阴性培养结果也许更有意义，脑膜炎奈瑟菌对冷、脱水、不适宜的 pH 或其他菌丛的抑制对其活性格外敏感，因此应尽可能早地接种于培养基。

脑膜炎双球菌可以从常规咽喉和鼻咽分泌物培养中并用潮湿血琼脂或改良的 Thayer-Martin 培养基上分离出来（后一种培养基较好）。在此培养基上，它们在点着蜡烛的瓶子内孵育 18~24h 后生长出小的、灰色的、粘液状的非溶血性革兰阴性双球菌落。

与淋病双球菌相似，脑膜炎双球菌亦为氧化酶阳性，这种现象为在混合培养中检测这些菌落的存在提供了有用的试验。但是，必须注意，口咽部的非致病性奈瑟菌的氧化酶试验也是阳性。因此为了鉴定脑膜炎奈瑟菌就必须用多价抗血清做玻片凝集试验，应用荧光抗体技术，或进行荚膜膨胀（quelling）试验。它与某些碳水化合物酶发生发酵反应对鉴定也是非常重要的。

大量证据表明，流感嗜血杆菌作为媒介在脑膜炎的传播上可能有重要作用。因此，在某些情况下，最好在鼻咽或咽喉分泌物培养中寻找流感嗜血杆菌。但必须记住，正常情况下在少数人的这种部位也能检测到。在取样前应当将棉拭子沾上肉汤使其潮湿，并应放在室温的输送培养基内送到实验室，该样品应当接种巧克力琼脂或胃蛋白酶消化的琼脂平板。

#### 5. 念珠菌属的咽喉分泌物培养

类酵母菌的白色念珠菌可以在小儿或新生儿、糖尿病人和接受抗生素或激素治疗的病人引起口腔内感染，称为鹅口疮。使用前述的咽喉分泌物培养技术从附着在颊内侧、腭或口腔粘膜其它部位上的白色疏松膜取样供革兰染色和培养用。实验室收到后，将拭子接种到萨布罗葡萄糖琼脂斜面上，可以加也可以不加抗生素，放在室温和 35℃ 两种条件下孵育，在 2~3 天念珠菌出现初次生长，为类酵母菌落，并有带特征性的发酵味。白色念珠菌的特征是在特殊培养基上出现发芽管或典型的厚膜孢子。

#### 6. 会厌炎和气管炎的细菌学诊断

会厌炎是一种不常见但严重威胁生命的会厌感染。由于感染而引起的会厌肿胀可能阻塞气管，若出现急症需要马上做气管切开或气管内插管。它主要见于婴儿或少儿，偶而也见于成人。迄今为止，最常见的病原菌是流感嗜血杆菌，A 群链球菌、肺炎球菌和葡萄球菌偶而也起作用。也有由副流感嗜血杆菌（*H. parainfluenzae*）和产青霉素酶（ $\beta$ -lactamase）亦称  $\beta$ -内酰胺酶、耐氨苄西林（ampicillin）的菌株以及副嗜沫嗜血杆菌（*H. paraphrophilus*）引起的个别病例。

会厌炎病人的血培养经常为阳性，而从会厌分泌物培养中可培养出引起感染的病原菌。在未做气管切开或气管内重建气道时，不应当做会厌拭子检测或分泌物培养，因为这种做拭子的动作可引起反射性喉痉挛而造成呼吸道阻塞。

据报道，婴儿和儿童会发生一种与众不同的疾病，它具有哮喘和会厌炎 2 种病的共同特征，其病变包括声门下明显的粘膜水肿。气管抽吸可以从该处抽出大量粘液和脓性物

质。培养出的细菌主要是金黄色葡萄球菌，但在其他病人也有 A 群链球菌和流感嗜血杆菌。像会厌炎病人一样，大多数这类病人需要插管或气管切开。

Bartlett<sup>[2]</sup>等曾对长期气管切开病人的气管分泌物进行了细菌学和细胞学定量研究。已经充分证实在气管切开后，气管中迅速生长了各种细菌的菌落。Bartlett 等的研究指出，这种气管切开以后培养出的菌丛绝大部分是需氧菌，但并非绝对，它是可以改变的，它和同一病人的上呼吸道菌丛没有多大关系。据他们的资料提示，对于这些病人来说，无论是定量培养或是样品中宿主细胞内容物的分析均对识别需要治疗的真正感染的菌种无帮助。

## 二、肺支气管的痰培养检验

细菌性肺炎、肺结核和慢性支气管炎是人类疾病中最重要的一组疾病。因为特异的治疗经常取决于细菌学诊断，因此借助涂片、培养和抗生素敏感试验对按照正确方法收集的痰样品作出的迅速而准确的检查是绝对必要的。特别是在肺炎杆菌、其他肠菌科细菌、假单胞菌属、军团菌属以及金黄色葡萄球菌所引起的肺炎中更应当这样，那些由肺炎链球菌所引起的肺炎病人可能死亡更快。

许多其他类型的病原菌〔例如流感嗜血杆菌、脑膜炎奈瑟杆菌、诺卡菌、耶尔森菌 (*Yersinia*)、支原体、霉菌、各种分支杆菌、各种厌氧菌和病毒〕都可引起肺炎、脓胸、肺脓肿或其他肺部感染。

从痰或其他标本中发现这些病原菌不仅取决于所用的实验室方法，而且也取决于能否保证采样时十分小心，对不适当的材料进行过多的培养可能给临床医生造成错误的信息，因为真正的传染因子已经完全丢失，或者所鉴定出来的是偶然碰到的致病菌。

收集痰液做培养也需要病人合作，并且应当指导他从深咳嗽得到样品（支气管痰），将痰直接咳到无菌平板或其他适宜的容器内，样品量不必大；1~3ml 脓性或粘液脓性样品就足够做大多数实验。除非要做分支杆菌培养，实验室收到样品后应立即检查，尤其是怀疑为组织胞浆菌病时更不得延误。但是，如果不能立即培养，应将样品放冰箱中保存 1~3h，仍可满意地培养出大多数病原菌。

与下呼吸道急性感染有关的最常见病原微生物是：肺炎球菌，肺炎杆菌，流感杆菌，金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)，大肠杆菌类、假单胞菌属和变形杆菌属 (*proteus sp*)，肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)，军团菌属。

除分支结核杆菌和军团菌属外，一般都有可能从外表看来是健康人的上呼吸道中检验出重要的肺部致病菌，因此培养出这些细菌并不能都做为它在特定感染中起病因学作用的充分证据。但是，在急性细菌性肺炎中，一般病原菌都大量地存在于适当的样本中。痰培养对厌氧性肺部感染的诊断是不能令人满意的。痰液不得做厌氧培养。

### 1. 革兰染色涂片的检查

痰液检验的第一步是测定样品是否可靠。小心地选出痰中的脓液部分，将它移至清洁的平板内，并制出革兰染色涂片，或将湿样品封固直接用 Nomaski 相差显微镜进行检查。玻片应放大 100 倍从头到尾检查一遍，注意观察有多少鳞状上皮细胞和多形核白细胞。据 Murray 和 Washington<sup>[6]</sup>发现，每个 100 倍视野有 10 个以上的上皮细胞就会与

明显的口腔污染有关（以培养结果与经气管抽出的气体培养相对比为依据）；他们认为，这种样品应当扔掉。Van Scoy<sup>[10]</sup>复查了这些资料并且判定，产生绿色链球菌、表皮葡萄球菌、奈瑟菌、嗜血杆菌属、酵母菌和棒状杆菌（不大可能是成人肺炎的病因）都可以忽略，而判定有效样品的较可靠标准是在每个低倍镜视野内有25个以上的白细胞。嗜血杆菌和奈瑟菌不是成人肺炎的常见致病菌。其他大多数细菌往往甚少引起肺炎，而绿色链球菌在吸入性肺炎却是常见的致病菌（通常是做为包括厌氧菌在内的混合菌丛的一部分）。许多研究证实了以下想法：在接受培养结果之前应先普查痰液中的上皮细胞和多形核白细胞。在这些研究中最满意的也许是Geckler<sup>[3]</sup>等所做的实验：他们普查了96份肺炎病人的痰样品，并将这些样品的培养结果和从支气管抽出的气体培养相比较，发现痰液样品在每个低倍镜视野中有25个以上的白细胞，且少于10个鳞状上皮细胞，那么根据这些样品生长出来的潜在病原菌，就可预测出支气管抽气培养中94%有细菌生长。痰样品中的鳞状上皮细胞若低于25个，它与支气管抽出气体培养物之间的吻合率为79%。据认为，在做普查的痰液样品的涂片上仔细检查细菌时，几乎可以在75%的可接受样品中，通过对培养结果的预测为临床医生提供有意义的信息。最可靠的样品是在低倍镜每个视野中有上皮细胞不到10个，白细胞多于25个。而每个低倍镜视野中上皮细胞少于25个，白细胞多于25个的痰样品也是可以接受的。

但必须指出，严重的白细胞减少症（外周的细胞数为500个/mm<sup>3</sup>或更少）时不可能集中足够量的多形核白细胞来满足上述对痰样品的标准要求，这些病人应做为例外来处理。通常，除唾液之外，应保留样品为宜。较为可取的作法是对有问题的样品应与负责为病人治疗的临床医生认真讨论。

对细菌性肺炎的早期预测性诊断往往是通过革兰染色充分的痰液直接涂片检查。在典型的病例中，若出现许多有荚膜的、柳叶刀形的、单个的、成双的或呈短链排列而存在的球菌，加上脓细胞，可以提示是肺炎双球菌感染。Rein<sup>[8]</sup>等认为，如果每一油镜视野能看到革兰阳性柳叶刀形双球菌占优势的菌丛（或10个以上），那么，革兰染色阳性者就是肺炎球菌。这种类型的阳性涂片有力地暗示肺炎球菌的存在，但大约1/3含肺炎球菌的样品被漏诊。在使用全血清做荚膜膨胀反应时，这种荚膜膨胀在相当程度上提高了直接观察法准确鉴别肺炎球菌的可能性。染色样品内有成堆革兰阳性球菌的存在提示是葡萄球菌肺炎。而检出许多短而肥大的有荚膜的革兰阴性杆菌为克雷白杆菌感染。观察到“革兰中性”杆菌可能是分支杆菌存在的线索。

但是，应该强调这些发现仅仅是推测性的，只有从血液、胸腔液体以及或许在痰液的培养中分离出肺炎球菌、葡萄球菌、假单胞菌或克雷白杆菌才能得到确证。

## 2. 肺炎球菌的培养

因肺炎链球菌也是细菌性肺炎的主要病原菌，故检查新鲜的痰样品是诊断的重要步骤。

从大叶性肺炎病人采集的带血色的（铁锈色）粘液脓性痰可按下列方式处理：

(1) 选出带脓液或带血的碎片按以下方法直接作涂片。取一环量移至清洁的玻璃片上，压上另一玻片，使劲把两玻片挤压在一起，再将它们拉开，当它们干燥时立即把两张玻片放在火焰上烧一下。一张玻片作革兰染色，另一张作耐酸染色。

(2) 挑选样品的一部分（非唾液部分）用小接种环在绵羊血琼脂平板上作划线接种，



将血平板放在点着蜡烛的玻璃缸内，35℃下孵育 18~24h。

(3) 如果痰块异常坚硬，将粘液脓块移到含无菌盐水的平板内，来回涮洗以去除过多的唾液。移到清洁的平板内，加少量盐水，用无菌注射器反复抽吸样品使之乳化。小心操作以避免出现过多小气泡，取一环量此悬液接种于前面所叙的培养基上。

(4) 如果在孵育后的血平板上看到一些小而有光泽的、绿色透明的、扁平而中央凹陷边缘高起来的菌落，它们很可能是肺炎球菌菌落。接着可以做培养并进一步测定它们在胆盐中的溶解度或它们对奥普托欣 (Optochin) 的敏感性以进行鉴定。

(5) 虽然在早期大叶肺炎病人的痰培养中往往肺炎球菌占优势，但在血平板上也可生长出大量通常为咽喉菌丛的菌落，它是由  $\alpha$ -溶血性链球菌、非致病性奈瑟菌等组成。在将这种只生长正常咽喉菌丛的平板丢弃之前，建议用手持放大镜 (3~8 倍) 再寻找肺炎双球菌落，如果存在这些菌落，就应该再接种到新鲜的血琼脂平板上，并取得纯培养物。

有人报告每毫升含 5 $\mu$ g 庆大霉素的羊血琼脂明显地优于不含庆大霉素的结果，但未能证实。有人也发现含庆大霉素的绵羊血琼脂没有好处，但他们发现，对绵羊血琼脂平板作厌氧孵育，可以在相当程度上提高肺炎双球菌的检出率。作者认为其原因是肺炎球菌又大又粘的菌落比较容易辨认，而且能抑制呼吸道分泌物中存在的其他细菌的生长。

有人发现，痰中肺炎球菌在室温下可长时间活存，在 4℃ 则活存时间还要更长。将样品放在室温，咽部菌过量生长而掩盖肺炎球菌的现象比样品保存在 4℃ 中者更为常见。

### 3. 定量痰培养

很多人曾建议用粘液溶解剂将样品液化，使之匀一化，按 1:10 连续配制几个稀释度，接种到适当的固体培养基上，对痰进行定量培养。皂甙是一种稳定的速效溶解剂，但是这种技术太麻烦太费时间，需要大量平板，和常规方法相比，好处不多。N-乙酰半胱氨酸不应当做为液化剂使用，因为它有抗菌活性。唯有初步冲洗技术是较可靠的方法，特别在不可能做气管抽吸的急性病人值得考虑应用。

### 4. 经气管抽吸和避开上呼吸道菌丛的其他方法

因为革兰阴性肠道杆菌、金黄色葡萄球菌和其他病原菌能引起严重的而有时是致命性的坏死性肺炎越来越多，以及同样这些病原菌在住院和住护理室的病人口腔内经常多见 (革兰阴性杆菌在酒精中毒病人中也常见)，因此常规的痰培养 (由口腔菌丛所污染) 的可靠性是值得怀疑的。早在 1959 年，Pecora<sup>[7]</sup> 提出了经气管抽吸术的另一种方法，即取一根小型号导管通过插在环甲软骨膜上的针头通到气管而不受口咽部微生物污染从下呼吸道采样的技术方法。这种采样技术经证明是安全的。其结果在细菌学上也是可靠的，被推荐在不能咳痰而得不到满意痰样品的肺炎病人以及疑有厌氧性感染的病人 (肺脓肿，吸入性肺炎，支气管扩张或军团病) 中使用。经气管抽出物的革兰染色涂片，结果与相应培养之间的吻合率比相同病人咳出痰的涂片结果要好得多。不过，在低倍镜中能看到痰样品涂片上的许多多形核白细胞和少数鳞状上皮细胞是理想的。此技术不适用有出血趋势或明显换气不良，或者不能静卧的病人。

为评价在经气管抽吸时口咽污染的可能性，通常的作法是观察鳞状上皮细胞。据报道，在患慢性支气管炎或慢性阻塞性肺炎病的病人中通常可在下呼吸道中看到鳞状上皮细胞。而且，除非应用电子显微镜，很难将这些支气管鳞状上皮细胞与颊部鳞状上皮细胞相区别，将 1% 美蓝用喷雾器喷到口咽部能起到可靠标志的作用。用分光光度测定法也可断