

44710 2

脑膜炎奈瑟氏菌

微生物学与免疫血清学检验



6.5

江苏省卫生防疫站

1979.10

脑膜炎奈瑟氏菌

微生物学与免疫血清学检验

(内部资料)

江苏省卫生防疫站编印

一九七九年



A 791425

前 言

为了进一步做好防疫检验工作，保护人民身体健康，为实现社会主义现代化服务，我们参考有关文献资料，结合实际工作中的体会，于一九七七年编写了《脑膜炎奈瑟氏菌微生物学与免疫血清学检验》以供参考。

由于我们的实践经验少，业务水平低，不妥之处，请批评指正。

江苏省卫生防疫站

一九七九年二月

目 录

第一章 脑膜炎球菌生物学特性及其检验方法	1
一、生物学特性	1
(一)形态与染色	1
(二)培养特性	2
(三)生化特性	3
(四)抵抗力	4
(五)抗原构造与抗原分类概况	4
(六)群别与型别	6
(七)致病性和毒素	9
(八)变异	10
(九)流行病学	11
(十)群别与流行病学趋势	12
二、实验室检验	12
(一)标本采集	12
(二)涂片直接染色镜检	13
(三)分离培养	13
(四)菌落筛选与纯培养	14
(五)生化反应	15
附 I: 奈瑟氏菌属鉴别表	16
注: 生化反应注意事项	16
(六)细菌凝集试验	17
(七)沉淀试验	18
(八)荚膜肿胀试验	18
(九)脑膜炎球菌判断标准	18
附 II: 检验程序表	19

附Ⅲ：脑膜炎球菌鉴定记录表·····	2 2
注：二氧化碳环境的形成·····	2 4
第二章 脑膜炎球菌培养基的制备方法 ·····	2 7
一、基础培养基的制备·····	2 7
二、选择性培养基的制备·····	2 8
三、生化试验培养基的制备·····	3 4
四、菌种保存培养基的制备·····	3 7
五、几种常用指示剂的配制·····	3 9
第三章 细菌对药物的敏感性试验 ·····	4 1
一、各种药物原液的配制·····	4 1
二、材料与方法·····	4 6
第四章 脑膜炎球菌菌种保存方法 ·····	6 0
一、培养基内保存方法·····	6 0
二、冷冻真空干燥保存法·····	6 1
第五章 脑膜炎双球菌免疫血清学检验 ·····	7 1
一、间接血凝试验方法·····	7 2
二、间接血凝抑制试验方法·····	8 2
三、反向间接血凝试验方法·····	8 5
四、微量凝集试验方法·····	106
五、乳胶凝集试验方法·····	107
六、炭末免疫血清凝集试验方法·····	111
七、杀菌力试验方法(溶菌作用)·····	112
八、对流免疫电泳·····	116
第六章 脑膜炎球菌抗血清的制备 ·····	122
一、免疫原的准备·····	122
二、免疫方法·····	123
三、交叉凝集素吸收试验·····	128

第七章 免疫荧光抗体	133
一、免疫荧光技术基本方法.....	134
二、荧光抗体染色的特点.....	137
三、免疫荧光制剂的准备.....	137
四、免疫荧光染色法.....	153
五、免疫荧光应用于流脑病人的快速诊断.....	155
第八章 缓冲液及有关试剂的配制方法	158
一、磷酸盐缓冲液的配制.....	158
二、硼酸盐缓冲液及醋酸盐缓冲液的配制.....	162
三、有关制剂的配制.....	162

第一章 脑膜炎球菌生物学特性及其检验方法

脑膜炎双球菌统称为脑膜炎球菌 (*Meningococcus*) 是流行性脑脊髓膜炎的病原菌。1884年Marchiafava及 Cellice 氏从脑膜炎患者的脑脊髓液中发现。1887年Weichselbaum氏从六例病人的脑脊髓液中分离得到此培养。脑膜炎球菌能引起脑膜及脑脊髓膜的炎症，通称为脑膜炎。脑膜炎由该菌引起者最为常见，而且容易发生流行，故称流行性脑脊髓膜炎（以下简称流脑）。脑膜炎也可由肺炎双球菌、结核杆菌、流感杆菌、葡萄球菌以及其它肠道病毒所引起，由这些病原微生物引起的多为散发性，不引起流行。

一、生物学特性

(一)形态与染色

脑膜炎球菌，革兰氏染色（固紫染色）阴性，呈卵圆形或圆形，菌体直径为0.6~0.8微米，成对排列，两菌相接面平坦或向内凹，呈肾状或咖啡豆状。

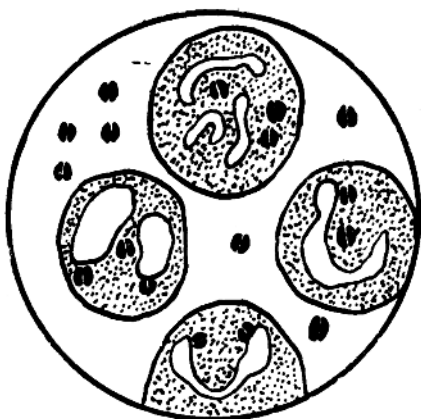
在体内的球菌较规则，在患者的脑脊髓液中一般都位于细胞内，形态典型。而发病早期，常可出现在细胞外。在培养基内排列较不规列，有成双排列或四个相联。菌体大小有时相差甚大。机体反应或因治疗作用或培养时间过久，很易发生自溶，出现衰退型，呈膨大球状，染色不匀。该菌无鞭毛，无动力，不产生芽胞，新分离的A群与C群菌株常具荚膜。用普通苯胺染色容易着色，革兰氏染色液染色，着色后，不易被酒精脱色，如染色不好或片子过厚有呈革兰氏阳性者。用吕氏美兰液染色，常可出现Bales-Ernst，或叫异染颗粒，细胞其它部分

不着色。用奈瑟氏液染色，颗粒呈兰黑色，菌体为棕色。

附图。

(二)培养特性：

脑膜炎球菌对培养基的营养要求较高，特别是从人体初次分离培养。在培养基内必需含有血液或血清、牛奶、鸡蛋、水解蛋白及其它动物体液等营养物质，才能发育。通常用的培养基以牛肉浸汤为基础，加羊、兔血液的琼脂培养基、



巧克力琼脂平板或卵黄琼脂平板。若在培养基中加入玉米粉、山芋粉等不溶性淀粉可吸收和中和培养基中对该菌有毒的物质，如氨基酸、脂肪酸……。在分离平板中，加入一定量的某些抗菌素，可抑制革兰氏阳性与阴性的杂菌，有利于脑膜炎球菌的生长，提高检出率。目前常用的抗菌素有多粘菌素B、多粘菌素E、万古霉素、林肯霉素、杆菌肽、粘杆菌素、瑞斯托霉素、可力霉素等。

脑膜炎球菌系需氧菌，但在含有10%CO₂低氧环境中培养，生长最为旺盛，在绝对无氧环境下培养不生长。培养基的最适PH为7.4—7.6。培养的最适温度为36℃—37℃，低于30℃不能生长。

该菌对寒冷干燥较为敏感，在不良环境中易自溶。因此，在取得被检标本时，应尽快接种于培养基中进行培养。

该菌在双抗巧克力色或卵黄琼脂平板上，经37℃10% CO₂环境培养18—20小时后，菌落光滑、湿润、闪光、扁平或稍凸起，边缘整齐，呈半透明淡灰色，易乳化的集落。在血琼脂平板上，对红血球不溶血，菌落呈兰灰色。在卵黄琼脂平板上菌落呈米灰色或无色。总之，由于培养基的不同，菌落显色略有改变。A、C群有荚膜菌株，菌落透明度较差，可略带粘性。B群菌落略小，在某些培养基上，可呈微黄色。D群菌落最小。在含有血清的肉汤中，经24小时培养，呈轻度或中等度混浊，并呈现微小的颗粒或粘稠沉淀，无表面生长。在普通琼脂37℃培养，一般不生长或生长不好。在血琼脂中培养22℃时亦不生长。

脑膜炎球菌由于能形成一种活动性自溶酶(Autoenzyme)，使其在培养过程中很快发生自溶，导致菌体膨胀，失去染色特性，如在培养中不及时转种，数日内即可死亡。因此在制备菌液作凝集试验或免疫原时，应先将菌液加热(56—60℃)30分钟破坏其自溶酶。

该菌菌株较难保存，若短期保存可用鸡蛋斜面或卵黄盐水以及淀粉等培养基。有人试验用脱脂牛奶作保护剂置-40℃到-75℃冰箱可保存较长时间。如有条件最好以冷冻干燥保存。

(三)生化特性：

脑膜炎球菌对生化反应不甚活泼，能分解葡萄糖、麦芽糖，产酸不产气，大部份生成乳酸(麦芽糖、葡萄糖酶介丙酮酸还原乳酸，不发酵蔗糖、乳糖、果糖。能还原美兰，甲基红阴性或弱阳性。V.P、靛基质、硫化氢均为阴性。但也有一些新分离出来的菌株生化反应往往不规则，如有的仅发酵葡萄

糖，不发酵麦芽糖；有的只发酵麦芽糖，不发酵葡萄糖。据报导，对SD产生耐药性的菌株，可降低或丧失对麦芽糖的发酵能力。一般认为这是由于菌株丧失了对麦芽糖透过酶的活性所造成的，亦有个别菌株丧失对磷酸酶的活性。

不分解蛋白质，不液化凝固血清，能形成靛基酚氧化酶，故氧化酶试验呈阳性，但此并非脑膜炎球菌所特有，奈瑟氏菌属的其它球菌也为阳性。

氧化酶反应：将1%二甲基对苯二胺溶液滴加于已培养好的细菌平板上，立即轻轻摇动，使液体流于可疑菌落上，如系脑膜炎球菌，因其体内含有靛基酚氧化酶，能使二甲基对苯二胺氧化，使试剂分子中的氢脱出与氧结合，生成红色昆类化合物，致使菌落呈现淡红色，逐渐变为紫红色。

(四)抵抗力：

脑膜炎球菌的抵抗力很低，对寒冷、湿热、干燥均很敏感。在室温三小时即死亡，在生理盐水中只能存活数小时，加热60℃，五分钟即可死亡。在1%石炭酸溶液中1—2分钟即死亡。在0.1%的氯化汞溶液中立即死亡。

这种细菌在培养过程中很易死亡，其原因，除自溶外，有些学者认为可能与它代谢过程中产生的碱性物质，如胺类物，使培养基中氢离子浓度降低(PH8.6—9.0所造成。)

对磺胺类药物及青、链、氯、金、土霉素均较敏感，但近年来发现越来越多的脑膜炎菌株对磺胺类药物产生抗药性。

(五)抗原构造与分类概况：

脑膜炎球菌抗原构造可分为三部分：

1.核蛋白抗原：称为“P”物质(Psubstance)，与毒性有关。具有抗原性，但无特异性。其免疫血清，如用沉淀等试验可与奈瑟氏菌属其它细菌及肺炎球菌发生反应。

2. 菌体多糖体抗原：为碳水化合物，称为“C”物质(C substance)。与奈瑟菌属其它细菌及肺炎球菌等共同存有。

3. 特异性多糖类抗原：为多糖体酸的钠盐，有特异性。各菌株之间免疫学性质不完全相同。A、C群主要是荚膜多糖体钠盐，B群主要是多糖——多肽物；A群是N-乙酰-O-乙酰甘露糖胺磷酸盐(N-acetyl-O-acetylmannosaminephosphate)；B群是N-乙酰-神经氨酸(N-acetyl neuraminic acid)；C群是N-乙酰-O-乙酰神经氨酸(N-acetyl-O-acetyl-neuraminic acid)。用间接凝集试验证明，免疫后能产生群特异性的抗体。可利用其群特异性免疫血清用凝集试验及凝集吸收试验等方法进行分群。

在1950年以前，国际上对脑膜炎球菌的抗原分类不统一。早在1909年Dopter用凝集法把脑膜炎球菌分成脑膜炎球菌和付脑膜炎球菌。1914年Dopter和Pauror用凝集吸收试验的方法又分为脑膜炎球菌和付脑膜炎球菌 α 、 β 、 γ 型。1915年Gordon和Murray用同样的方法分为I、II、III、IV型。以后许多学者进行这方面的研究工作。1942年以后，习惯地用Branham的分类法，即：I、II、IV、IIa群，直到1950年国际微生物学会命名委员会根据脑膜炎球菌群特异性荚膜多糖体的不同分为A、B、C、D群。

大肠杆菌K与B群脑膜炎球菌多糖体有交叉反应。1972年Robbins报导13株大肠菌与脑膜炎球菌A、C群及肺炎球菌I、II型多糖抗原有血清学交叉反应，并指出由于大肠杆菌含有脑膜炎球菌相似的抗原可能使大年龄组人群获得自然免疫力。Kasper(1973)报导了大肠杆菌O7：KCC7：NM与B群脑膜炎球菌有相似的神氨酸抗原。从而说明大肠杆菌某些型与脑膜

炎球菌的某些群存在共同抗原。

脑膜炎球菌抗原分类

Dopter Pouren 1914(法)	Gordon Murray 1915(英)	Gniffith Sectt 1916(英)	Vicolle Debains Aganan 1918(法)	1940年 后常用	1950年 国际微生 物学会
脑膜炎球菌	I 型	I 组	A 型	I 组 (型)	A 组 (1,2二型)
付脑膜炎球 菌 α, β, γ	I 型	I 组	B 型	I 组 (型)	B 组 (1,2,3三型)
	IV 型	I 组	B 型	IV 组 (型)	D 组(一型)
			C 型	II ₂ 组 (型)	C 组(一型)
			D 型		

(六)群别与型别:

1956年Jyssum报告了不与A、B、C、D群诊断血清凝集的菌株。1961年Slaterus用微量沉淀琼脂扩散方法在荷兰发现A、B、C、D诊断血清不凝集的菌株,并利用凝集吸收试验证明呈三个新的血清群,定名为X、Y、Z群。以后Hellis也证实了X、Y、Z血清群的存在。1967年Erans又报导了BO、29E、W₁₃₅血清群,并证明BO型与Y群相同。目前国外报导的脑膜炎菌群为A、B、C、D、X、Y、Z、29E、W₁₃₅九个群。B群又分为32个型,C分为11个型。

我国1972年之前,未见到新血清群的报导,但在实际工作中常遇到一些在形态、培养、生化特性等均符合脑膜炎球菌而不与A、B、C、D群血清凝集的菌株,这些菌株由于没有进一步的研究,往往称为不凝集性的菌株或被排除于脑膜炎球菌之外。北京药品生物制品检定所利用凝集、吸收试验等方法发现

了七个新的血清群，这些新的血清群的抗原关系都是彼此独立的，有的菌株之间还有部分共同抗原。这七个新血清群定名为：1889、1890、1892、319、1916、1486、1811。与联合国世界卫生组织提供给我国的X、Y、Z、29E、四群比较，我国的1889与Y群相同；1892群与29E群相同，1916群与X群相同。

近年来，国外用间接血凝抑制试验等方法进行了流脑抗体测定和细菌血清分群的研究，得到了成果。利用杀菌试验、杀菌抑制试验、细菌素或脑膜炎菌素试验、沉淀试验进行了细菌分型工作。1967年Robert首先应用调理素及杀菌反应，在B群中分出两种不同抗原型。1971年Counts应用脑膜炎指示菌所产生的杀菌物质——细菌素(Bacteriocin)或称脑膜炎菌素(Meningocin)将B群分成32个型，C群分成11个型。

长春生物制品研究所用18株A群脑膜炎球菌株进行抗原分析，发现18株菌之间抗原并不一致，这也提示了A群脑膜炎球菌之间有型别存在。

脑膜炎球菌产生的细菌素它能对同种或有关菌起抑制作用，因此可利用这一特点进行群内分型。

细菌素分型使用琼脂平板培养基作交叉划线，测定被检菌株对细菌素的敏感性。其敏感性与血清分类，及抗药性无关。

1972年Frask用一种微量杀菌法进行细菌分型，此法较为敏感。用一定量的活菌加入含有补体的抗血清中(同型与异型)36℃30分钟处理，接种到血琼脂平板上，进行培养后计算菌落数，测出抗血清的杀菌滴度(对同型菌出现杀菌活性)。

细菌素：细菌素(Bacteriocin)是一种具有活性的蛋白质，有人认为细菌素是细菌死亡后所产生的某种物质，它是一种很小的东西，小的用电子显微镜看不到，比较大的可以用电子显微镜看到，它与噬菌体有相似的地方，也有不相同的地方(见表)。

细菌素与噬菌体的比较

	细 菌 素	噬 菌 体
相同点	1. 蛋白质	1. 蛋白质
	2. 有溶源性细菌能带细菌素	2. 有溶源性细菌能带噬菌体
	3. 形态上相似有兄或从形	3. 成兄形状
不同点	1. 不能繁殖	1. 能繁殖
	2. 可被蛋白酶破坏	2. 不能被蛋白酶破坏

细菌素与噬菌体作用基本相似；细菌素能给细菌注入一种物质使细菌不能合成DNA或RNA就不能合成蛋白质而使细菌死亡。

化学物理因素对细菌素的影响

处 理 法	条 件	细菌素滴度
加 热	100℃ 15分钟	500
	120℃ 15分钟	0
胰 蛋 白 酶	0.2% 37℃ 2小时	0
蛋 白 酶	0.2% 37℃ 2小时	0
DNA 酶	10 μg/ml 2 小时	500
RNA 酶	10 μg/ml 2 小时	500
对 照		500

(七)致病性和毒素:

脑膜炎球菌能引起鼻咽炎,败血症和脑脊髓膜炎。

流行性脑脊髓膜炎的临床症状分为三期:

1.上呼吸道感染期:一般是鼻咽部急性充血,偶尔伴有咽部干痛或鼻塞流涕等现象,一般无全身不适。此期,从鼻咽腔采样分离培养可得阳性结果。

2.菌血期:由于细菌进入血流的数量、毒力,机体反应不同,因而病情轻重也不同,轻者仅有一些瘀点,而重者则呕吐,面色青灰,脉搏不清,血压测不到,神志不清。由于细菌栓塞毛细血管和毒素损坏血管壁造成瘀点瘀斑。

3.脑脊髓膜炎期:当细菌由血液或淋巴到达脑膜,即引起化脓性脑脊髓膜炎,出现高热、抽搐、昏迷、颈项强直、角弓反张,克氏希氏征阳性等临床表现,并引起呼吸衰竭严重后果。

毒素:脑膜炎球菌有比较耐热(80℃30分钟)的外毒素,但经煮沸能破坏。主要是内毒素。内毒素为菌体蛋白质部分,称为“P”物质,这种物质可使患者皮肤粘膜发生瘀点、瘀斑。1929年Schwartzman证明脑膜炎球菌有坏死性紫癜因子。

动物试验的致病症状:

1.将脑膜炎球菌菌悬液,注射到豚鼠腹腔,1—3天后死亡。解剖尸体可见腹腔有大量渗出液,在肝脏前叶表面和网膜上有大量纤维蛋白和脓球沉淀。肠系膜、内脏和腹壁出血,肾上腺明显充血,胰脏和周围组织水肿,在胸腔渗出液中可发现少数球菌,而血液及内脏中则不易发现。

2.将菌液于65℃加热一小时杀菌后,注射到豚鼠或小白鼠腹腔,仍可使动物致死。死菌悬液与活菌悬液对动物的致死量和所出现的症状大体相似。

3.将菌液注射到猴子脑脊髓内,可引起脑膜炎,六小时发病,三十小时死亡。

4.脑膜炎球菌肉汤培养物的滤液,注射到动物体内,不发病。

从上述动物试验得出:死菌液可致病,无菌滤液不致病;死于脑膜炎的尸体解剖可见内脏充血、肾上腺明显出血,但血液内不易找到脑膜炎球菌。由此说明脑膜炎球菌致病的因素,很可能是由于菌体在机体内自溶过程中释放出内毒素所致。在动物中小白鼠与豚鼠对脑膜炎球菌比较敏感,目前常用小白鼠腹腔注射方法,以菌株对小白鼠的半数致死量即LD₅₀作为毒力和致病力强弱的指标,但在注射菌液中必须加有粘液素或胃膜素做保护剂,LD₅₀的大小与菌株毒力强弱有关,并与保护剂的质量也有一定的关系。一般从病人脑脊液、血液分离的菌株,毒力都比较强。

人们感染脑膜炎球菌后仅极少数人发病,而绝大多数人仅表现鼻咽炎或带菌状态,这一问题有待进一步研究。

(八)变异:

脑膜炎球菌分为:光滑型(Smooth Type)和粗糙型(Rough Type),简称S型和R型,它们可以互变。从人体初次新分离的菌株,大多为光滑型。一般陈旧菌株容易变为粗糙型,偶尔出现粘液型(即M型, Middle Type)。从光滑型变为粗糙型常伴随部分群特异性抗原的丧失,可与多种血清出现。非特异性凝集。因粗糙型菌株失去特异性抗原,这种菌株一般无毒力,菌落变大、粗糙,甚至出现颗粒或粘状。R型菌株通过动物体(小白鼠)传6—7代后能恢复成“S”型。曾有人用人工方法将光滑型菌株通过培养传代先变成粗糙型,然后最培养在含有光滑型脱氧核糖核酸培养基中,使粗糙型又变为光滑

型。这种变异一般称为返祖。

Miller氏等将对青、链霉素敏感的菌株，经重复移种于含有青、链霉素培养基（抗菌素由低浓度到高浓度），即可获得人工产生抗青、链霉素的菌株。这些抗药菌株在形态毒力等方面，与原来敏感菌株有所不同，例：抗青霉素菌株菌体增大，排列呈四联状，菌落呈黄色，透明度差，对小白鼠毒力降低。

有些变异菌株对链霉素可产生很强的抵抗力，可转变为依赖菌株（在含有链霉素的培养基上才能生长较好）。

Evans氏(1947年)发现在人血琼脂培养基上，经长期培养，A型菌株可变为稳定的粗糙型菌株，并失去发酵麦芽糖的能力。

（九）流行病学：

流行性脑脊髓膜炎见于世界各地，多为散发性，偶成流行性。当冬季气候突变时，有上呼吸道感染者，容易引起发病。十岁以下的儿童，特别是婴、幼儿易感染此病。出生几天的婴儿，偶见发病。成人一般较儿童为少，但一旦感染发病，症状严重，病死率高。

对脑膜炎球菌的感受性与血清抗体中免疫球蛋白的浓度有关（与人体内的IgG、IgA、IgM有关）。从杀菌力试验证明，新生儿和成年人杀菌力都较强，发现新生儿体内IgG特别高，带菌者及健康人体内IgG也较高。对易感人群进行杀菌力测定，发现杀菌力都较低，但发病一周后，杀菌力增高，说明人体的杀菌力高低与IgG有关。近年来文献报导认为脑膜炎球菌有关的特异性免疫球蛋白主要是IgM，而且两种球蛋白能提高儿童机体的非特异性抵抗力。

1973年Reller报告咽部带不凝集性脑膜炎球菌能产生对有毒株（流行菌群）的自然免疫力。