

结 JIEHEBING XIJUNXUE

核 JIEHEBING XIJUNXUE

病 JIEHEBING XIJUNXUE

细 JIEHEBING XIJUNXUE

菌 JIEHEBING XIJUNXUE

学 JIEHEBING XIJUNXUE

郭 钧 主 编
孟昭赫 审 校
辽宁科学技术出版社

结 核 病 细 菌 学

郭 钧 主 编

孟昭赫 审校

辽宁科学技术出版社出版 (沈阳市南京街6段1里2号)

辽宁省新华书店发行 沈阳新华印刷厂印刷

开本: 787×1092 1/32 印张: 7 1/2 插页: 3 字数: 150,000

1983年9月第1版

1983年9月第1次印刷

责任编辑: 刘 刊

插 图: 姚承章

封面设计: 李秀中

责任校对: 周 全

印数: 1—5,600

统一书号: 14283·7

定价: 1.15元

内 容 提 要

本书共分十三节，包括结核菌的生物学性状、致病性、抵抗力、变异、非典型抗酸菌、抗酸菌分类、菌型鉴别和细菌学检查方法；还叙述了抗结核药物、耐药性及其测定方法、体液内药物浓度的测定等，尽可能地反映了国内外现代的研究成果和实践经验。本书可供结核病和呼吸系疾病专业医师、研究生和实验室工作者参考。

前 言

结核病是危害人类健康的一种慢性传染病。自从1882年罗伯特·科赫氏发现结核菌以来，这个病的防治工作引起了人们的极大重视。在国外，关于结核病细菌学的研究工作有很大的进展，给结核病的防治工作提供了许多有力的措施。在国内，我们在结核病的防治工作方面还有很多事情要做，尤其是有必要加强结核病细菌学的研究工作。编者有鉴于此，特编写了这本专册。

本书承蒙中华结核病科学委员会主任委员裘祖源教授在百忙之中细心审阅，并写了序言；又蒙中国医学科学院卫生研究所孟昭赫副研究员认真审校，在此一并表示深切的谢意。

在本书编写过程中，尽可能收集国内外现代的研究成果和实践经验，做到理论与实践相结合。但是，由于我们水平有限，难免有缺点、错误，希望同道们批评指正。

编 著 者

一九八一年五月于
北京市结核病研究所

序

结核病危害于人类已有几千年的历史。特别是自十八世纪产业革命以后，随着资本主义机器大工业的发展，对工人的剥削和压迫日益惨重，广大劳动人民经济贫困，文化落后，居住拥挤，卫生条件差，造成结核病的流行和千万人的死亡。结核病成为一种对人类危害很大的传染病。各个时代人们对结核病的认识虽然都有一定的进步，但都未能找到有效的防治途径。1882年，罗伯特·科赫氏发现了结核病的致病菌，这是结核病学划时代的发现，是一个转折点，从此世界各地结核病的防治工作蓬勃地开展起来。多年的防治和科研工作，积累了许多有关结核菌及结核病的知识，为人类控制结核病的流行提供了坚实的理论根据及丰富的实践经验。

到目前为止，有关结核菌的综合性的专著在我国仍然很少，与防治结核病工作的实际需要很不适应。本书的主编和校阅者对结核菌的研究工作都有三十余年的经验，现汇集了国内的工作成果及国外的进展写成《结核病细菌学》，与他们在1951年所编著的《结核病细菌学诊断法》一书相

比较，内容是更加充实和丰富了。本书可贵之处还在于理论与实际操作密切结合，不单传授中外新的研究成果，而且注意了防治工作的实际需要。相信本书的出版定能对我国结核病的防治工作做出一定的贡献。

裘 祖 源

一九八一年六月于北京

目 录

第一节 结核菌的形态	1
一、结核菌的正常形态	1
二、结核菌的多形态性	2
三、微细构造	3
四、结核菌的染色性	4
附：几种显微镜的应用	8
第二节 结核菌的营养要求和培养基	11
一、结核菌培养基的营养成分	11
二、影响生长的各种因素	23
三、培养基的种类和应用	28
第三节 菌体成分和生物活性	53
一、类脂	53
二、蛋白质和肽	55
三、多糖类	56
四、细胞壁和蜡质 D	56
五、核糖核酸	58
第四节 致病性和动物实验	64
一、致病性	64
二、动物实验	65
第五节 结核菌的抵抗力	75
一、物理因素对结核菌的影响	76

二、化学因素对结核菌的影响·····	80
第六节 变异·····	86
第七节 非典型抗酸菌 ·····	89
一、形态·····	89
二、培养特点·····	89
三、生化学性状·····	90
四、非典型抗酸菌对抗结核药物的敏感性·····	91
五、对动物的毒力·····	91
第八节 抗酸菌的分类及菌型鉴别 ·····	95
一、迟缓生长抗酸菌·····	95
二、迅速生长抗酸菌(Runyon IV 群抗酸菌) ·····	100
三、菌型鉴别方法·····	101
第九节 细菌学检查 ·····	116
一、检查材料的种类及收集方法·····	116
二、直接涂片镜检法·····	118
三、集菌·····	120
四、分离培养·····	121
五、动物接种·····	125
六、细菌学诊断的评价·····	126
第十节 抗结核药物 ·····	132
一、异烟肼·····	134
二、对氨基水杨酸钠·····	138
三、氨硫脲·····	140
四、乙胺丁醇·····	142
五、乙硫异烟胺和丙硫异烟胺·····	144
六、吡嗪酰胺·····	146
七、链霉素·····	148

八、卡那霉素·····	151
九、利福平·····	153
十、环丝氨酸·····	155
十一、青紫霉素·····	157
十二、紫霉素、缠霉素和结核放线菌素·····	159
第十一节 耐药性及其测定方法·····	170
一、耐药性发生的机理·····	170
二、交叉耐药性·····	172
三、耐药性的稳定性及敏感性的复归·····	173
四、测定方法·····	175
第十二节 抗结核药物的筛选方法·····	182
一、化学合成药和抗生素抗结核菌作用的实验·····	182
二、中草药抗结核菌作用的实验·····	186
第十三节 体液内抗菌药物浓度的测定·····	194
一、链霉素体液内浓度的测定·····	195
二、异烟肼体液内浓度的测定·····	201
三、利福平体液内浓度的测定·····	206
四、卷曲霉素体液内浓度的测定·····	213
五、乙胺丁醇体液内浓度的测定·····	219
六、乙硫异烟胺体液内浓度的测定·····	226
七、卡那霉素体液内浓度的测定·····	231

第一节

结核菌的形态

结核菌属于裂殖菌纲，放线菌目，分枝杆菌科，分枝杆菌属，是一种细长稍弯的杆菌，多呈分枝状生长，须经加温或延长染色时间才能着色。一旦着色后，可抵抗盐酸酒精的脱色作用，故又称为抗酸菌。

抗酸菌分为结核菌，如人型结核菌和牛型结核菌；非典型抗酸菌，如堪萨斯分枝杆菌和胞内分枝杆菌等。

一、结核菌的正常形态

结核菌为细长稍弯曲两端圆形的杆菌，长约1~4微米，宽约0.3~0.5微米，无芽胞，无鞭毛，无荚膜。生长发育期间可以形成分枝，痰标本中的结核菌常呈现为V、T、Y字型等不规则的形态。革兰氏染色阳性，耐酸染色染成红色。

在菌落形态上 Petroff(1927) 首先把结核菌分成粗糙(R)型与平滑(S)型，并认为粗糙型多为致病性抗酸菌，

平滑型多为非致病性抗酸菌。但亦有例外情况，例如某些非典型抗酸菌虽然有致病力，但菌落为平滑型。Steenken (1935) 曾提出一种定名方法：将R与S的名称仍旧保留，在其下面另加小字，如R_v = 有致病力粗糙型，R_a = 无致病力粗糙型，R_{in} = 中等致病力粗糙型，Sch = 有色平滑型，Scha = 有色致病力平滑型等。此种分类方法一直应用。

二、结核菌的多形态性

除已谈的正常形态外，结核菌本身还具有多种形态，它在生长过程中（初期与衰老期）均可有形态上的改变。此外，结核菌在某些不良条件的影响下，例如生长条件的影响及药物的影响等，也可出现多种形态上的变化，如放线状、丝状、棒状、球状、双球状等。

1. **Much氏颗粒：**它是 Much (1908) 于无热脓肿及其他分泌物中分离出来的颗粒，染色呈革兰氏阳性，在显微镜下常呈不规则的小丛。当时被认为是非抗酸性结核菌，或者是结核菌生活史中的一个阶段，但争论较多，因此，对 Much 氏颗粒的认识至今仍未得到肯定的结论。

2. **非抗酸性形态：**结核菌在生长初期及衰老期，亦可能呈现耐酸性减弱或失去耐酸性。此种情况的产生多由营养条件的改变，抗结核药物的影响或菌体受到某种因素的破坏所致。利用人工的方法亦可产生非耐酸性结核菌，

失掉耐酸染色的特性。

3. 滤过性型：在电子显微镜下，可见到球形颗粒。此种细小的滤过型菌的代谢机能很低。在陈旧的培养基中，也可见到此种球型菌的菌落，当供给新鲜的培养基或新的营养时，这些细小的菌体即逐步地变为杆菌。

4. L 型细菌：近些年来对 L 型细菌研究较多。它是一种极小的菌落，其菌体呈高度多形态性，是一变异株，这类细菌缺乏细胞壁。

三、微细构造

应用电子显微镜，在超薄切片标本上可以观察到结核菌的微细构造。菌体的细胞膜有内外两层薄膜，其外层为较厚的细胞壁，内层为细胞质膜，最外层有时可见到界限不明显的被包物质。细胞浆的中心部位为空泡状态，其中为螺旋状含有核染质的构造，相当于高等生物的核部分。细胞浆中有不能透过电子线的大小颗粒，大颗粒常存在于菌体的两端，小颗粒象病毒大小散在于各处。颗粒的大小、多少由于菌体或培养条件的不同而有很大差异，可能是由细胞浆的某些营养物凝缩而成的。

细胞浆中还有间体(mesosome)，它是一种膜样构造，由细胞质膜内折叠而成。经超微细胞化学检查，可检出琥珀酸脱氢酶、细胞色素氧化酶、三磷酸腺苷酶、酸性磷酸酶的活性。琥珀酸脱氢酶、细胞色素氧化酶的活性主要局

限于间体，但是在部分细胞质膜部位也可以检出比间体较弱的这些酶的活性，间体的三磷酸腺苷酶和酸性磷酸酶活性明显，但在细胞质膜和细胞浆内亦有散在，而较这些酶的活性弱，所以不能说是间体特有的。例如应用卡那霉素等抗结核药物作用于结核菌时，间体的形态发生明显的变化，可见到膜的断裂甚至缺损。关于间体的作用，据推测和呼吸、细胞壁合成、核质分裂及物质的输送等功能有关（图1）。

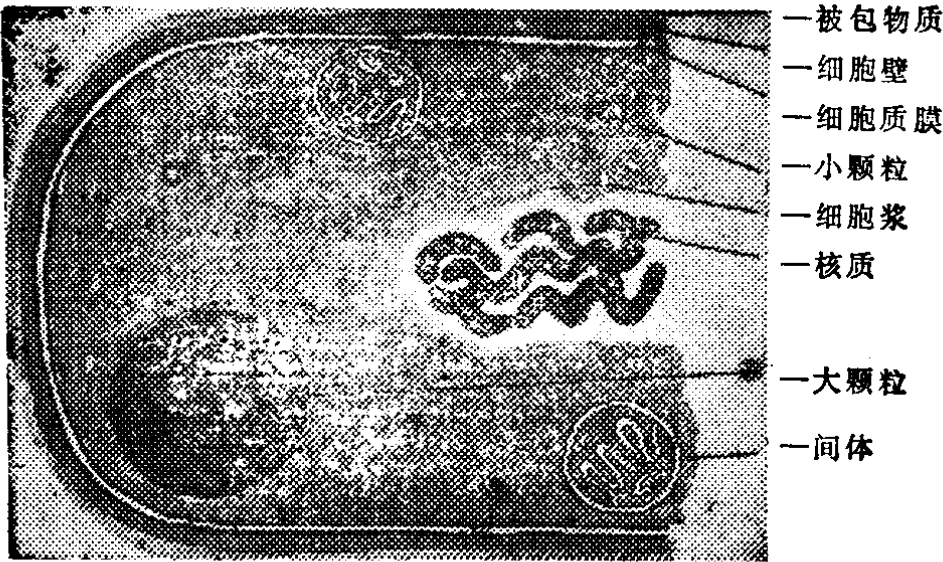


图1 结核菌微细构造模型图（工藤）

四、结核菌的染色性

抗酸染色是鉴别分枝杆菌，尤其是结核菌和其他细菌的重要方法之一。除抗酸菌外，一部分放线菌、棒状杆

菌、细菌芽胞及酵母的棒状孢子等，也具有不同程度的抗酸性，其他一般细菌则无抗酸性。因而，抗酸染色在细菌学上鉴别分枝杆菌与其他细菌时，有重要的实用价值。

抗酸染色原理：细菌染色是一复杂的过程，至今解释不一。有三种学说：

1. 结核菌的菌体中含有分枝菌酸(mycolic acid)。前人最早主张抗酸性是由于细胞周围有一层蜡样膜所致，结核菌及各种抗酸菌的细胞壁是由分枝菌酸、多糖类(阿拉伯半乳聚糖)及粘肽构成。Anderson(1932)曾用化学分析方法，由菌体提出许多成分，并发现其他提取物质无抗酸性，仅分枝菌酸有抗酸性。分枝菌酸是结核菌特有的菌体成分之一，为高级脂肪酸。在菌体内一部分游离散在，大部分存在于细胞壁或蜡质D中的肽基糖脂(peptidoglycolipid)等中，以酯型存在。室桥氏等认为分枝菌酸是结核菌染色时显示出抗酸性的物质基础。也有人认为结核菌的细胞壁比其他细胞的细胞壁具有一个最大的特点，是含有约30%的分枝菌酸，所以可以认为结核菌的抗酸性与分枝菌酸有重要关系。但也有人如Yegian(1947)认为，分枝菌酸的存在并不是产生抗酸性的必要条件。如细菌孢子、人的毛发等并没有分枝菌酸，但有抗酸性，因而仅用分枝菌酸的存在难以说明结核菌的抗酸性。

2. 细菌细胞的完整性与结核菌的抗酸性的关系。用脂肪溶剂将结核菌的类脂体提出时，并不能破坏其抗酸性。但用简单的方法将菌细胞的结构破坏，却能导致抗酸性的

消失。因此可以认为抗酸性与菌细胞结构的完整性有密切关系。细菌自体溶解后分枝菌酸不受破坏而抗酸性则消失，所以认为结核菌的抗酸性与细菌细胞的完整性有重要关系。

3. pooman 氏现象与结核菌抗酸性之间的关系。
pooman(1936) 在麻风菌染色时发现，仅用石炭酸复红染色时细菌菌体不着色，而菌体之周围染成红色，但经硫酸、盐酸或酒精脱色后，菌体才被染成红色，而细胞周围的着色却消失。pooman 氏认为菌体内的各种酸类夺去了复红的氧，致失去红色。再以酸类或酒精处理，得氧平衡，出现红色。所以他认为结核菌是嗜酸性和嗜醇性，而不是抗酸性或抗酒精性。为了证明结核菌是嗜酸还是抗酸，曾进行许多研究。如郑子颖、保田等根据实验结果表示同意 pooman 氏的看法；而户田、石田、徐承荫等反对嗜酸学说。大多数学者认为，使用复红染色时不加石炭酸则无 pooman 氏现象，用酸先处理后再进行染色，pooman 氏现象也不出现。徐承荫曾以亚硫酸钠代替酸或酒精作脱色剂，结果结核菌仍为红色，其他细菌则呈蓝色，而亚硫酸钠并非氧化剂故不能用氧平衡来解释。因此多数学者认为，结核菌仍属抗酸性菌而非嗜酸性菌。我们在实验中发现，染色后只用水冲洗（不用盐酸或酒精处理），则 pooman 氏现象也随着消失，进一步证明了结核菌不是嗜酸性菌，即不用酸性物质脱色菌体也可染成红色。

总之，在染色问题上，结核菌抗酸性的原理至今还未

彻底了解，但是可以认为，结核菌的抗酸染色及抗酸性质的存在，是与分枝菌酸及细菌细胞的完整性有一定关系。

染色方法：染色的方法很多，如萁一纳（Ziehl-Neelsen）氏改良染色法、Heidenhain 氏染色法、Giemsa 氏染色法、Bender 氏染色法、Schädel 氏染色法、户田氏染色法、三友氏染色法等。近年来国内外又有许多新的和改良的染色方法，例如松冈染色法、活菌死菌鉴别法、孔雀绿染色法、复红代替石炭酸复红染色法等，都收到一定的效果。但到目前为止，仍广泛应用萁一纳氏改良染色法，其优点为视野清楚，适合于一般检查用。染色方法的改进，不外乎在用药、染色时间、染色温度以及脱色等方面的改良。

松冈（1956）等利用染色的特性，观察结核菌发育阶段的染色性，发现老的结核菌与分枝体染成红色，新生的第二及第三分枝体抗酸性较弱，染成紫色或淡蓝色。由于结核菌分枝体的抗酸性不同，在形态上的着色也有所不同。因此，在一般的抗酸染色时，利用此法可以提高检出率。我们应用厚涂片法检出结核菌，也得到较满意的结果。

用染色方法鉴别活菌死菌，引起许多学者的兴趣。大高（1956）以普通细菌进行研究，利用伊红染色法得出较满意的结果。室桥（1957）利用细胞染色鉴别活或死的抗酸菌，并认为主要是菌体内的脱氧核糖核酸酶被消化或被盐酸水解，使其丧失对孔雀绿或亚甲蓝的可染性，即可染

上复红。分枝杆菌对孔雀绿或亚甲蓝的可染性，似乎要决定于菌体内的脱氧核糖核酸的聚合程度，而一部分染成绿色的细菌，其脱氧核糖核酸为高度的聚合化，这种细菌至少是活的，并可能增殖。染成粉红色的细菌，其脱氧核糖核酸在一定程度上失去聚合化，则是死菌。松冈（1959）认为这是一种较好的方法。Дыхно（1961）重复他的方法并获得类似的结果。我们根据他们的方法也进行了同样的试验。这种染色方法对于鉴别死菌及活菌有一定意义，但还需要进一步研究和证实。

附：几种显微镜的应用

1. 显微镜：在普通光学显微镜下观察的物体，其大小超过肉眼所能感受光波的一半，即 200nm 时才能看到。一般细菌包括结核菌、真菌、放线菌均可用光学显微镜观察。

2. 荧光显微镜：早在1911年Stübel就应用荧光观察细菌，随后 Kaiserling（1917）用于观察结核菌。Weille（1939）、裴茂（1954）、Байлпева（1957）等均认为用这种方法结核菌的检出率高于普通的抗酸染色，国内的文献也证实这一点。但在实验中发现，除结核菌外，还有许多物质易被金胺（auramine）液所染色，在鉴别上有时有一定困难。近年来国外有的学者认为，荧光显微镜的结核菌检出率比萋—纳法约高4.2~24.5%，国内报道约高5.3~20%，虽然有时出现假阳性，但是由于其检出率高，有逐渐应用在常规检查上的趋势。荧光显微镜结构并不十分复杂，若以紫外灯作光源，可用普通