

临 床 微 生 物 学 教 育 丛 书

CLINICAL MICROBIOLOGY EDUCATIONAL SERIES

主编

王金良 倪语星
徐英春

主审

司徒永康

审阅

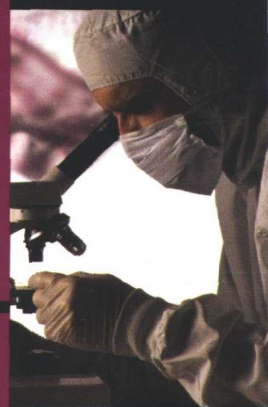
梁皓钧 任永昌

STOOL EXAMINATION
FOR BACTERIAL DIARRHEA

细菌性腹泻

GOOD LABORATORY
PRACTICES

实验诊断规范



上海科学技术出版社

2

临床微生物学教育丛书
CLINICAL MICROBIOLOGY EDUCATIONAL SERIES

主编
王金良 倪语星
徐英春
主审
司徒永康
审阅
梁皓钧 任永昌

STOOL EXAMINATION
FOR BACTERIAL DIARRHEA

细菌性腹泻

GOOD LABORATORY
PRACTICES

实验诊断规范



上海科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

细菌性腹泻实验诊断规范/王金良,倪语星,徐英春
主编. —上海:上海科学技术出版社,2002.10
(临床微生物学教育丛书)
ISBN 7-5323-6622-7

I. 细... II. ①王...②倪...③徐... III. 腹泻,
细菌性—实验室诊断—规范 IV. R442.2-65

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 058740 号

上海科学技术出版社出版、发行

(上海瑞金二路450号 邮政编码200020)

新华书店上海发行所经销

苏州市望电印刷厂印刷

开本 787×1092 1/16 印张 2.75 字数 35 000

2002年10月第1版 2002年10月第1次印刷

印数:1-4 000 定价:8.00 元

本书如有缺页、错装或坏损等严重质量问题,
请向本社出版科联系调换

内容提要

本书借鉴国际上最新的观念、方法,并结合我国的实际情况,介绍了致腹泻病原菌、粪便培养的基本过程、致腹泻病原菌及诊断依据、粪便培养要点等内容,其目的在于建立一整套适合我国情况、具有可操作性的标准化操作规范。

本书可为广大临床微生物学工作者及感染性疾病专业的临床医生参考使用,为细菌性腹泻诊断规范化提供了参考工具。

主编

王金良 倪语星 徐英春

作者

吕 锦 李 新

主审

司徒永康

审阅

梁皓钧 任永昌

前言

临床微生物学诊断在感染性疾患及相关疾患的诊断、治疗、预防以及研究工作中起着越来越重要的作用。它既是实验诊断的重要组成部分,又是医学领域相对独立的学科。

在我国,临床微生物学诊断这一学科的发展相对滞后,与实验诊断的其他学科相比,尚未受到应有的、足够的重视。

医学发展的现状,尤其是感染性疾患发展的形势,要求我们必须充分重视并努力加强临床微生物学诊断这一学科的发展。

其理由:

第一,新的病原体及其所致的新的感染性疾患不断出现。WHO 已发布近 30 年来明确肯定的 30 余种新病原体,其数目现仍在不断增加。尤其是以疯牛病为代表的新病原体 prion(国内部分专家提议译为朊粒)的确定,改变了我们对传统病原体的认识,无疑对病原体的实验诊断提出新的挑战。

第二,许多传统的老病原体出现了临床新问题,对实验诊断提出了新的要求,如霍乱弧菌 O139,多种多样的致腹泻大肠埃希菌,引起中毒性休克综合征的葡萄球菌和链球菌,迅速增加的性传播性疾病病原体,基因变异的乙型、丙型肝炎病毒等,迫使实验诊断手段必须不断改进才能与之相适应。

第三,新、老病原体的耐药性明显增强,不仅带来治疗上的困难,也向实验诊断提出挑战。许多耐药细菌,如耐苯唑西林葡萄球菌(MRSA 和 MRCS)、耐万古霉素肠球菌(VRS)、耐青霉素肺炎链球菌(PRSP)、低耐万古霉素金黄色葡萄球菌(VISA)、产超广谱 β 内酰胺酶(ESBL)、金属酶及多重

耐药的肠杆菌、非发酵菌、耐多药的结核分枝杆菌等已成为临床治疗中的棘手问题。病毒的耐药性也日趋严重。这不仅要求用正确、迅速的手段检出,而且要给临床解释性判读提供可能存在的耐药机制。

第四,临床微生物学诊断技术日新月异,明显地提高了诊断的敏感性、特异性和及时性,其突出表现是分子生物学技术的进步,微生物的基因检测手段和检验的自动化或半自动化正在改变着微生物检验的面貌。

这一切要求临床微生物学检验工作者重新学习、更新知识、改进技术、提高水平,于是“临床微生物学教育丛书”就应运而生了。

本丛书编写的指导思想及其特点是:

一、突出规范化操作这一中心。就微生物学诊断的主要领域各成一分册,如血培养操作规范、抗微生物药物敏感性试验规范、细菌性腹泻实验诊断规范等将陆续出版。

二、重在规范常规检验技术,介绍国内外认可的、最为适用的、可靠的技术方法,同时力求反映微生物实验诊断的最新成果与信息。

三、吸取美国微生物学会(ASM)的 CUMITECH 先进经验,又努力结合我国的实际情况,力求兼具先进性与实用性。

四、每分册均由国内富有经验的专家编写并集体讨论,由香港专家指导审阅,由香港中文大学微生物科主任司徒永康教授主审。

为方便读者用活页夹存放本套丛书,所以在版面设计时做了适当安排。

全体编审者热切希望本丛书能为规范我国的微生物学检验技术做出努力,但规范也要随着技术发展而改变,正如 CUMITECH 仍在不断更新一样。我们希望本丛书在国内同仁们的实践中不断完善。我们真诚期待大家的评论与指正。

主编

目 录

2	一、临床表现和粪便性状所提示的致腹泻病原菌
4	二、粪便培养的基本过程
	(一) 标本采集与运送..... 4
	(二) 初步分离培养基..... 5
	(三) 粪便培养操作流程..... 7
11	三、致腹泻病原菌及诊断依据
	(一) 霍乱弧菌及其他弧菌.....10
	(二) 志贺菌.....12
	(三) 沙门菌.....13
	(四) 弯曲菌属.....14
	(五) 气单胞菌.....17
	(六) 蜡样芽胞杆菌.....19
	(七) 艰难梭状芽胞杆菌.....19
	(八) 产气荚膜梭状芽胞杆菌.....22
	(九) 肠致病性大肠埃希菌.....23
	(十) 产肠毒素大肠埃希菌.....25
	(十一) 肠侵袭性大肠埃希菌.....26
	(十二) 产志贺毒素大肠埃希菌和肠出血性 大肠埃希菌.....26
	(十三) 类志贺邻单胞菌.....29
	(十四) 金黄色葡萄球菌.....30
	(十五) 小肠结肠炎耶尔森菌.....30
32	四、粪便培养要点
	(一) 了解病史.....32
	(二) 腹泻常见致病菌的培养要点.....32
	(三) 特殊细菌的检查.....33
	(四) 性传播性疾病腹泻的检查.....33
	(五) 报告结果.....34

腹泻仍是威胁人类健康的重要疾病。世界上每年有 10 亿 5 岁以下的儿童患腹泻,死亡人数达 500 万,其中以发展中国家患麻疹或营养不良的儿童为甚。据估计,发展中国家的儿童要比发达国家或卫生供水条件好的国家的儿童发病率高 3~5 倍。在美国,5 岁以下儿童每年约出现 2 次腹泻,死亡 500 人。在我国,腹泻属发病率最高的疾病之一。

成人腹泻每年约发生 1~2 次,且可出现胃肠道感染的后果,从而造成严重的医疗费及社会资源的损失。

致腹泻的新病原体不断出现,如隐孢子虫等。

肠道病原菌与正常菌群同时存在。正常成人每克粪便中的菌量达 $10^{11} \sim 10^{12}$ 个,其中 99% 为厌氧菌,主要是类杆菌、真杆菌、双歧杆菌、优杆菌和消化链球菌,兼性厌氧菌量为 $10^8 \sim 10^9$ 个。病原菌感染时,正常菌群会有减少,但由如此多的菌群中检出病原菌并非易事,需正确掌握细菌性腹泻的临床和细菌学特点,遵循规范的操作方法。

本操作规范之目的,一是规范粪便培养技术,二是介绍较新的病原体,三是介绍以较低的成本达到高效的检出,尤其着重介绍各种感染菌引起的临床症状。

一、临床表现和粪便性状所提示的致腹泻病原菌

了解不同病原菌所致腹泻的临床表现可供检验人员明确检出目标,这对非常规培养菌的检出尤为重要。应了解病史、接触史、潜伏期。如近期大量应用抗生素,提示艰难梭菌;近期旅游,提示产毒素大肠埃希菌(ETEC)或霍乱弧菌;去沿海旅游,提示副溶血弧菌等。

虽然腹泻的临床表现多样,但典型临床特征可提示特定病原。如脓便,见于阿米巴、志贺菌、肠侵袭性大肠埃希菌(EIEC);血便,见于沙门菌、弯曲菌、志贺菌、EIEC和产志贺毒素大肠埃希菌(VTEC);“米汤样”便,提示霍乱弧菌;幼儿秋冬季腹泻、呕吐,提示轮状病毒;出血性结肠炎或溶血尿素综合征(HUS),提示VTEC;亚急性或慢性腹泻、腹胀,提示贾第鞭毛虫;阑尾炎症状,提示耶尔森菌;短潜伏期的剧烈呕吐,提示葡萄球菌性食物中毒。

食入含金黄色葡萄球菌肠毒素的食物可直接发病,但大多数腹泻病人只感染极少数菌体,不卫生的条件和带菌者成为传播者。

细菌性腹泻的潜伏期一般为24~48 h, VTEC为3~5 d, 空肠弯曲菌可达3~11 d。在潜伏期内细菌定居于肠黏膜,繁殖足够的数量,产生毒力(包括黏附、产生肠毒素或细胞毒素、侵袭力)而启动疾病过程。病原体需克服机体的防护屏障,如胃酸、肠黏膜防护、肠动力、机体的体液和细胞免疫系统等,当此防护功能减退时则发病严重。已知病原菌的4个毒力因素是肠毒素产生、侵袭力、细胞毒素和黏附。细菌的黏附是致病的开端,这取决于细菌的菌毛、动力、化学趋化因子和定居能力。大多数病原菌的定居机制尚未明确,已知ETEC的定居是通过菌毛和定居因子

等表面结构。

霍乱毒素的作用机制已明确。它通过肠黏膜上皮细胞特异神经节苷脂(GMI)受体而刺激腺苷环化酶,使环腺苷酸(cAMP)增多,引起大量液体分泌和钠、氯、碳酸氢离子的丢失,临床表现为严重水样便。此过程可由应用等渗葡萄糖液而缓解,故口服补液剂有明显疗效。ETEC产生的热敏毒素(LT)和耐热毒素(ST)的作用机制与此相似。蜡样芽胞杆菌和产气荚膜梭菌也产肠毒素。

肠侵袭性细菌如志贺菌、EIEC可侵入肠黏膜上皮细胞并繁殖而致急性

感染,可引起溃疡、黏膜坏死。此种侵袭性由大质粒编码。

引起抗生素相关性肠炎的艰难梭菌可产生毒素A(具肠毒素活性)和毒素B(细胞毒素),其具体作用机制仍不明确。

某些大肠埃希菌也可产细胞毒素[Vero细胞毒素(VT)、志贺毒素(SLT)],已证明与出血性肠炎和HUS有关。某些大肠埃希菌可附着肠黏膜,致微绒毛损伤和附着-擦伤(AE)效应,此为EPEC的致病机制,具体过程及基因基础尚待研究。

二、粪便培养的基本过程

(一) 标本采集与运送

分离致腹泻病原菌的标本需在发病急性期收集(图1)。在疾病活动期和进展期病原体可能大量存在。成形粪便中存在病原体的可能性很小。十二指肠内容物、呕吐物、血液和骨髓可用于某种肠道病原体的培养。肠炎和发

热病人应做血培养。直肠拭子仅限用于活动期的病人、难于获得粪便的婴儿和儿童,或用于流行病学调查。为了采集到理想标本,应将拭子通过肛门括约肌到达直肠。拭子上要见到粪便。最好是用直肠镜检或乙状结肠镜检,由直肠或乙状结肠受损部位用拭子取材,而不要常规使用。

粪便应直接收集在一干净蜡制纸板或有合适盖子的塑料容器中,做好标号,并按要求送到实验室。旋盖玻璃或塑料容器适合于液状粪便。如果标本需运送或预料检验要延迟2h以上,则需用运送培养基。Cary-Blair运送培养基适用于保护大多数细菌性病原体。 0.03 mol/L 甘油磷酸盐缓冲液($\text{pH } 7.0$)也在使用,但对于副溶血弧菌、霍乱弧菌或空肠弯曲菌却不很理想。 $0.5 \sim 2\text{ g}$ 粪便标本足以用于培养,

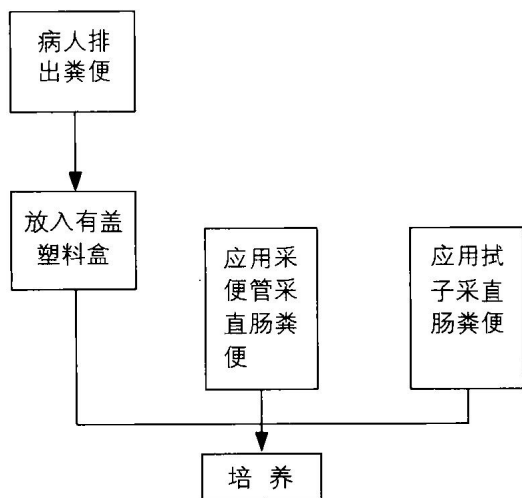


图1 粪便标本采集方法

培养应选取有黏液、血的部分,因为这部分常含有较高数量的肠道病原体。如采便后 2h 内未培养,标本应放在 Cary-Blair 运送培养基中并入冰箱保存。缓冲运送培养基 pH 不随温度下降而改变,志贺菌可以存活。

常见细菌性腹泻的特征和分离培养法见表 1。

仅仅粪便培养阴性但有持续的症状,不能完全排除细菌性感染,有时需连续收集 3 次标本。更重要的是,缺少完整病人信息的标本使实验室无从根据病人资料去查找其他更合适的病原体。

直接镜检粪便中的白细胞对确定炎性肠道疾病有很大作用。将 Loeffler 亚甲蓝(美蓝)染液与等量粪便悬液混合于载玻片上,盖上盖玻片,再以 40 倍物镜的光学显微镜检测粪便中的白细胞。大量白细胞存在可提示炎症过程。杆菌性痢疾和结肠炎病人由于有大量病原菌的侵袭,粪便中多形核白细胞占优势;而伤寒和阿米巴痢疾病人的粪便中单核细胞占优势。毒素引起的腹泻少见大量白细胞。粪便涂片革兰染色对检测特殊肠道病原体无效。而粪便的相差和暗视野显微镜检查有助于肠炎弯曲菌的早期诊断。

(二) 初步分离培养基

用于培养特殊病原体的分离培养基的选择需依据病人的临床特征(图 2)。

门诊病人应接种分离沙门菌、志贺菌和弯曲菌属的选择性培养基。含沙门菌和志贺菌量少的标本可用增菌肉汤。用以检出沙门菌和志贺菌的分离培养基的选择,实验室各有偏好。通常每份粪便都要接种这两种选择鉴别培养基。高选择性者为 Hektoen 肠道琼脂(HE)和木糖-赖氨酸-去氧胆酸盐琼脂(XLD),两者都含有硫化氢(H_2S)指示剂,所以易于识别沙门菌。其他高选择增菌培养基,如 SS、去氧胆酸、亚硫酸铋或煌绿,可抑制这两属中的某些菌株。志贺菌属在这些高选择性培养基上的检出并不十分可靠。还要接种一个低选择性的肠道鉴别培养基,通常为麦康凯(MacConkey)琼脂或伊红亚甲蓝(美蓝)琼脂(EMB)或中国蓝琼脂。仔细检查麦康凯琼脂也可以发现结肠炎耶尔森菌。弯曲菌的分离方法另作介绍。还应接种一非选择性培养基,通常为 5% 羊血琼脂,用于检测肠道中大量生长的微生物如酵母菌、金黄色葡萄球菌或铜绿假单胞菌(绿脓杆菌)。它对分离蜡样

表 1 常见细菌性腹泻的特征和分离培养法

细菌	感染源	感染量 (CFU)	主要致病机制	潜伏期	方法		
					处理	增菌	培养基, 其他
气单胞菌	水	未知	肠毒素?			血琼脂, CIN	
蜡样芽胞杆菌	肉、菜、米饭	毒素	腹泻毒素 呕吐毒素	6~24 h 1~6 h	食品、炊具等应培养	庖肉培养基 35℃, 48 h	肠毒素 血清型 苯乙醇血琼脂
弯曲菌	水、动物、乳 奶粉、肉类	?	侵袭性? 毒素?	3~11 d	培养于微嗜氧环境, 42℃	弯曲菌血琼脂 Skirrow, 巧克力选择培养基	
大肠	抗生素应用	?	肠毒素 (细胞毒素)	4~9 d	培养: 酒精或热处理 肠毒素: 缓冲液混悬, 离心 细胞毒素: PBS 10 倍稀释, 离心	CCFA	乳胶凝集、EIA 敏感细胞、中和试验 EIA、细胞查毒素 血清型
产气荚膜杆菌	肉、肉制品	$10^9 \sim 10^{10}$	肠毒素	8~16 h	粪便、食物厌氧培养	血琼脂 卵黄琼脂	
大肠埃希菌	食品、水	$10^6 \sim 10^8$	LT, ST	4~24 h		肠道菌培养基	查ST, LT, DNA探针 PCR, 侵袭性基因
产毒素性 侵袭性 产VT	食品 肉、乳	$10^6 \sim 10^8$?	侵入 VT	8~24 h 3~5 d	查毒素, 粪便悬液离心培养	Vero 细胞 山梨醇麦康凯琼脂	中和试验确证 $O_{157}:H_7, VT$
类志贺邻单胞菌	水、海产品	?	?	1~2 d		血琼脂	
沙门菌 (非伤寒)	食品、动物	$10^2 \sim 10^6$	侵袭、毒素?	8~72 h		SF 或四硫磺酸盐肉汤 GN	血清型 血琼脂
志贺菌	水、食品	$10 \sim 200$	侵袭、志贺毒素	8h~5 d	食品应检查	肠道菌鉴别培养基 鉴别培养基	血清型 肠毒素 噬菌体分型
金黄色葡萄球菌	肉、乳、食品	毒素	肠毒素	1~6 h		甘露醇-盐琼脂 TCBS	血清型
霍乱弧菌	水、海产品	10^8	霍乱毒素	1~5 d		碱性胨水 碱性胨水	
副溶血弧菌	海产品	$10^6 \sim 10^8$	毒素	15~24 h		PBS 中 4~5℃ 存 3 周	
小肠结肠耶尔森菌	水、食品	?	侵袭	16~48 h		SS, CIN	

注: CIN, Ceftulodin Irgasol Novobiocin 琼脂; CCFA, 环丝氨酸-果糖琼脂; SF, 亚硝酸盐肉汤; FGN, 革兰阴性杆菌增菌液; TCBS, 亚硫酸盐-枸橼酸盐-胆汁-蔗糖琼脂; SS, 志贺-沙门菌琼脂; PBS, 盐酸盐缓冲液盐水。

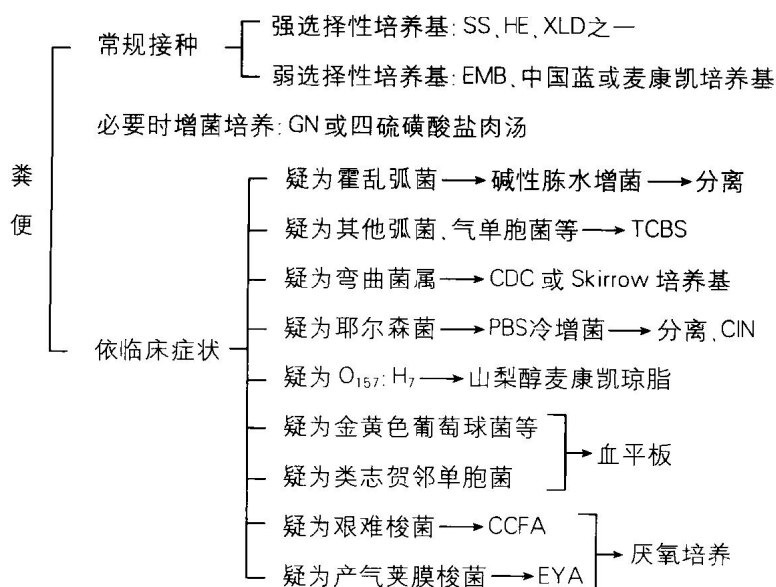


图2 腹泻病人粪便培养选用培养基

CDC, 美国疾病控制中心; EYA, 卵黄琼脂

芽胞杆菌、气单胞菌、类志贺邻单胞菌也很有用。特别是免疫受损病人, 肠内过度细菌繁殖应予治疗。在弧菌、耶尔森菌或 VTEC 菌株高度流行的地区, 选择、鉴别培养基应是常规的培养手段。

增菌肉汤有两个特殊功能。首先可抑制粪便中正常菌群而使特定微生物繁殖。每种增菌肉汤的应用应遵循规范。如用于沙门菌和志贺菌属的 GN 应增菌 6~8 h; 超过 6~8 h, 粪便中的正常菌群如大肠埃希菌就会过度繁殖。实验室应仔细评估沙门菌和志贺菌的检出率来确定增菌肉汤的价值。其第二个用处是, 用不同沙门菌和志贺菌血清型

的抗体致敏的乳胶粒子来直接检出沙门菌和志贺菌。此法的优点是能在 24 h 内筛出阴性标本。乳胶凝集法与传统方法进行比较, 对 3 500 份标本进行检测, 其检测沙门菌的敏感性为 86%, 志贺菌为 85%, 对两个属的特异性都超过了 95%。此技术虽不能代替传统方法, 但对肉汤筛查有较高沙门菌和志贺菌检出率的临床实验室有用。

(三) 粪便培养操作流程

粪便培养检出病原菌的流程见图 3。
粪便培养气体及温度条件见图 4。

世界卫生组织推荐在发展中国家用克氏双糖铁培养基(KIA)和动力-靛

基质-尿素培养基(MIU)来初步鉴定肠道菌,其应用流程见图5。

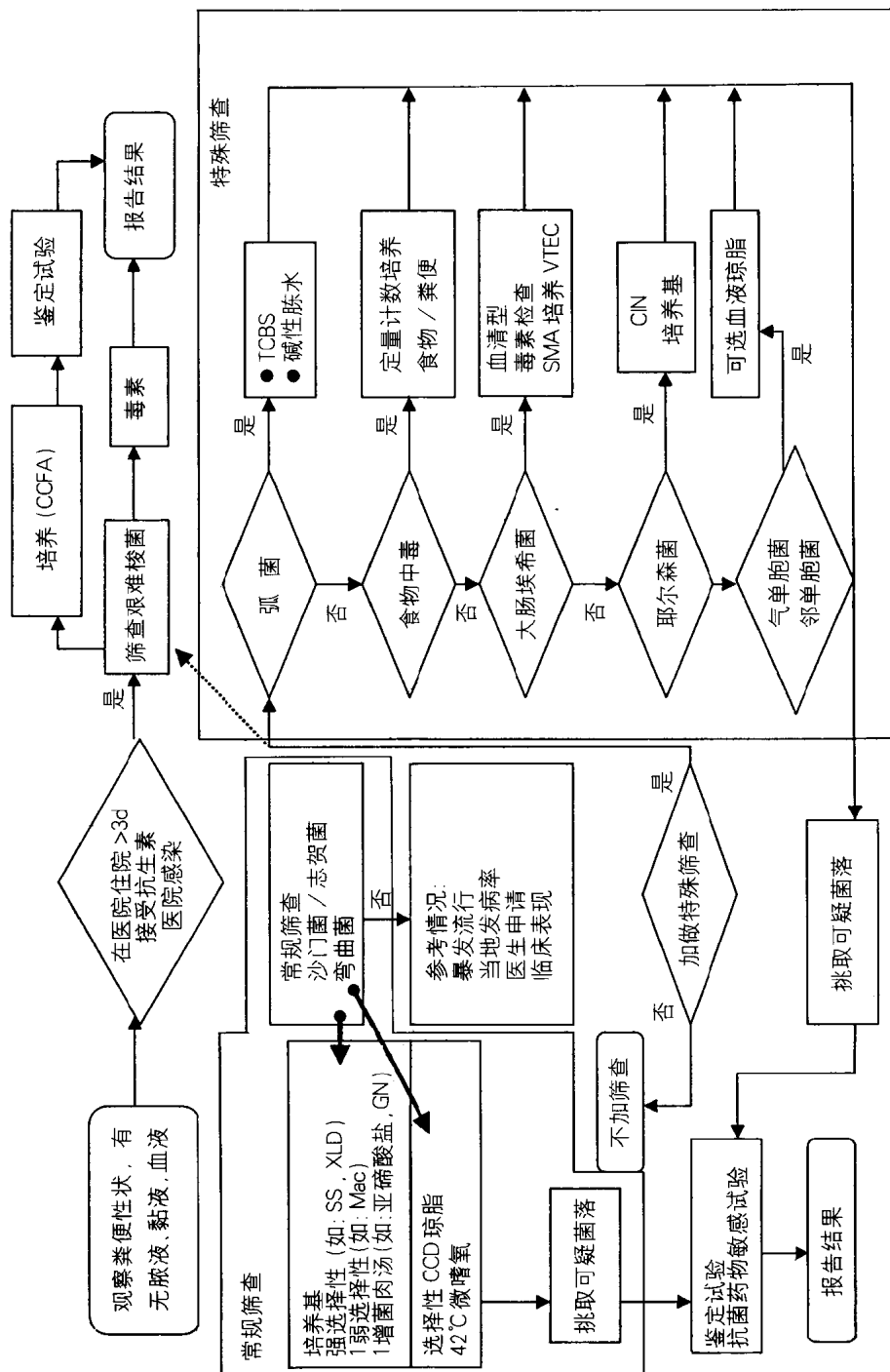


图 3 粪便病原菌检验流程

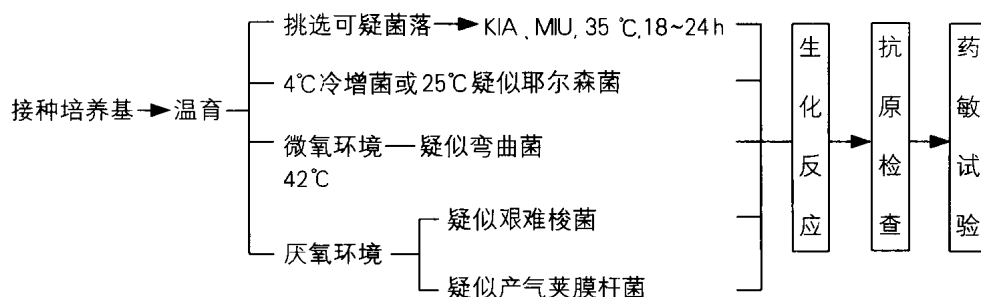


图4 粪便培养条件示意图

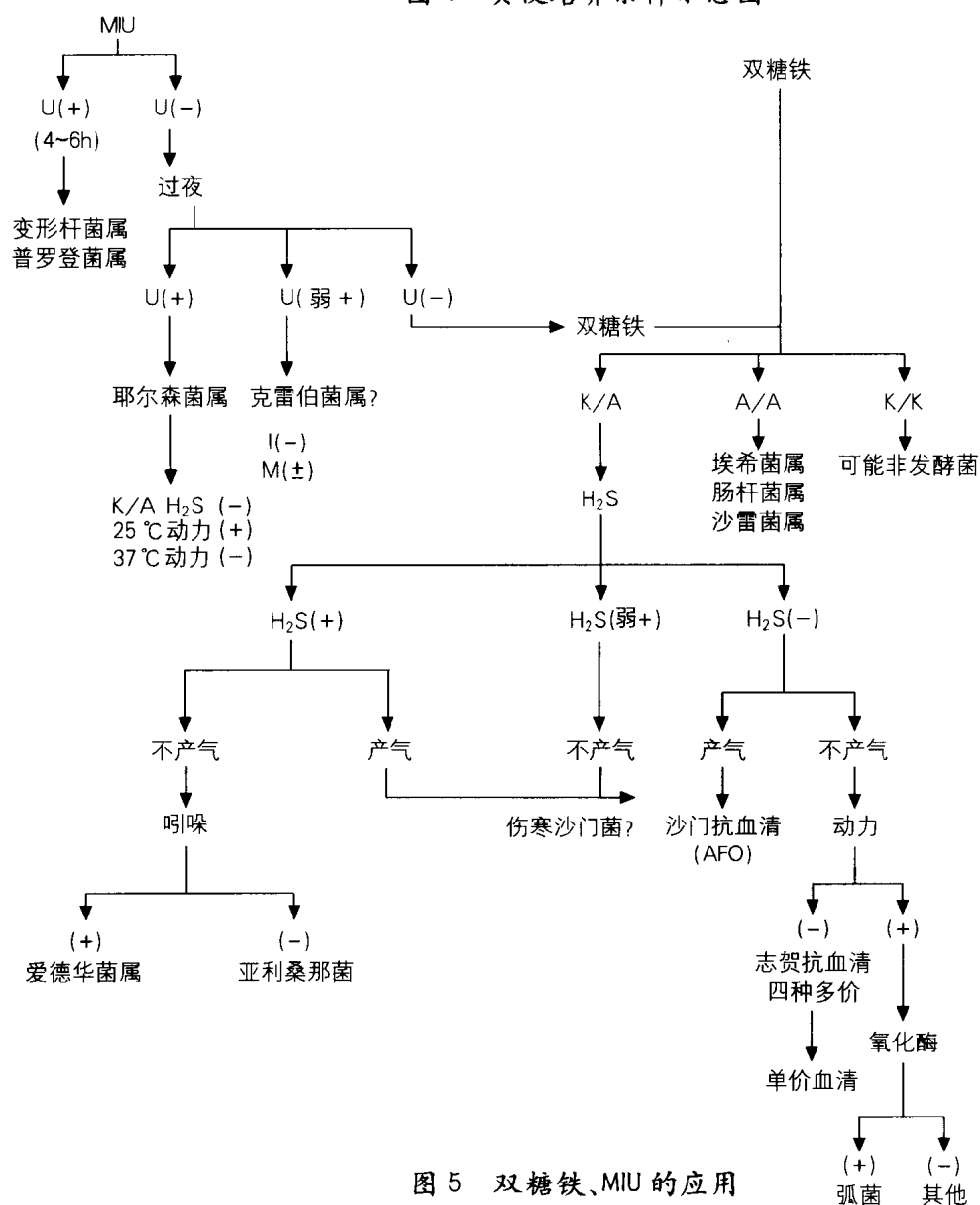


图5 双糖铁、MIU 的应用