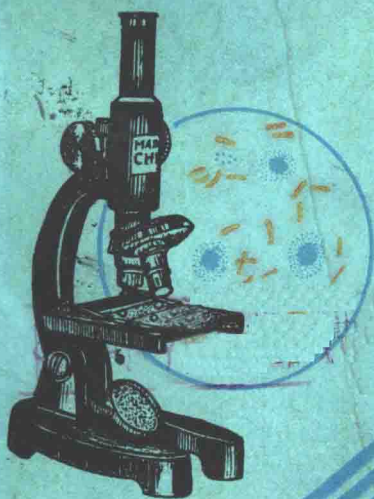


# 分枝杆菌

[英] M·V·查德威克 著  
李国利 庄玉辉 译



人民军医出版社

91

# 分枝杆菌

FENZHI GANJUN

[英] M·V·查德威克 著

李国利 庄玉辉 译

阎逊初 校

人民军医出版社

1985年 北京

## 内 容 提 要

本书系统地介绍了分枝杆菌的分离、鉴定、药敏试验等有关方面的基础知识和技术方法。对结核病的细菌学诊断及防治既有理论意义又有实用价值。可供从事微生物学、防痨以及呼吸内科的科研、教学人员，尤其是检验员和实验员参考。

Maureen V. Chadwick Films

**Mycobacteria**

Bristol London Boston 1982

## 分 枝 杆 菌

〔英〕M. V. 查德威克 著

李国利 庄玉辉 译

责任编辑 罗子铭



人民军医出版社出版

(北京市复兴路22号甲3号)

北京市孙中印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行



开本：787×1092毫米1/32·印张：3·字数：62千字

1985年8月第1版 1985年8月（北京）第1次印刷

印数：1—3500

统一书号：14281·029 定价：0.60元

## 前 言

《分枝杆菌》是一本简明的专著，以介绍结核病实验室常用方法为主。既有各种分枝杆菌的分类鉴定，又有结核病的防治方法；还详细说明了各种抗结核药物和各种菌对这些药物是否敏感的测定方法，这在临床治疗上是关键的步骤。

目前，我国这方面的书籍还较少，这本小册子的出版对于普及关于结核菌和结核病的诊断治疗有参考价值。由于人民生活水平的普遍提高和医疗卫生条件的普遍改善，我国结核病已逐渐减少，但仍为一种危害人民健康和生命的严重疾病。因此，提高结核病的防治水平，仍然具有十分重要的意义。希望通过本书的出版，使其所介绍的方法得到广泛应用，有助于加强结核病的防治，对四化建设有所贡献。

阎逊初

1985年1月

# 目 录

序言.....	(1)
一、结核病——致死的疾病.....	(2)
二、分枝杆菌科.....	(7)
三、安全防护措施.....	(19)
四、培养基.....	(23)
五、标本的处理.....	(39)
六、分枝杆菌的药敏试验.....	(49)
七、分枝杆菌的鉴定方法.....	(55)
八、分枝杆菌分离菌株的鉴定.....	(79)
九、抗结核药物测定.....	(87)

## 序 言

虽然结核病在联合王国曾经是而现在已不再是主要疾病，但仍然存在需要专门做分离、鉴定和治疗的严重问题。在第三世界，结核病至今还是一种主要的疾病。有鉴于此，为鉴定目前大量引起疾病的分枝杆菌而书写本专著。

不是每一个实验室都能做分枝杆菌的各种鉴定的，但本书对于希望了解超出抗酸菌显微镜检查法以外的人是有帮助的，对于检验员和实验员是有用的。我衷心感谢贝克 (Baker) 不仅在本书写作期间甚至在我从事本专业的一生中所给予的帮助和鼓励。

M. V. Chadwick

1982 年千伦敦

## 一、结核病——致死的疾病

目前，在世界的某些地区，每 30 秒钟就有 1 个人死于结核病。对于这样一种其阴影多少世纪以来笼罩着整个人类的致死性疾病，被称为“所有死亡者的首领”是恰当的。在埃及的木乃伊中已发现结核病存在的确实证据。

尽管结核病可以发生许多肺外型，如淋巴腺炎，骨和关节疾病，皮下寒性脓肿和结核性脑膜炎等，但一般是肺部疾病（肺结核）。颈淋巴腺炎曾经是儿童中的一种常见病，其感染的原发病灶在扁桃体。今天在亚洲移民中，颈淋巴腺炎常见为一种继发感染，而不是原发综合症。泌尿生殖器结核是一种不易早期诊断的疾病，因为对尿标本显微镜检查并非总呈阳性。在大多数情况下，女性生殖系统结核感染系继发于体内其它部位的原发病灶。肺部、淋巴结、骨、关节或尿道的腹腔外病灶可通过血流传播至生殖系统，也可由腹腔内的病灶局部直接传播。

虽然目前在生活水平高的国家、结核病已不再是最常见的死亡原因，但就全世界而言，其死亡率仍占首位。尽管结核病化疗取得了很大进展，但在世界范围内，估计每年仍有 1,000 万人患结核病，在联合王国（大不列颠和北爱尔兰）就有 10,000 多病例。

### （一）历史的回顾

1. 病因探讨：在 19 世纪，郭霍（Koch）发现结核杆菌前几年，1 位著名的英国外科医生巴德（Budd）记载，当他与利文斯通（Livingstone）医生谈话时，这位医生告诉他：

在非洲内地，人们几乎不知道结核病。但实际上在非洲内地的中心贸易区结核病正在发生，南海岛的人也有死于结核病患者。此外，巴德在布里斯托尔港治疗的病人中也有在海上英国船上做工时就已患结核病的黑人。1856年，巴德提出了人感染人的假想，指出欧洲人在与波利尼西亚人，印第安人，非洲人和爱斯基摩人接触及交易过程中，把结核病传染给他们。

与巴德同时代的人之一，1位法国外科军医，维尔曼(Villemin)向前迈出了重要的一步，证明结核病能从人或牛传染给白兔、豚鼠，从一只感染动物传染给另一只动物可能无休止地连续进行。做为一个军队的外科医生来说，他的试验，使他认识到长期驻扎在部队营房里的士兵比野外部队更易患结核病，来自农村地区的健康青年，常在他们到达部队营房1~2年内患结核病。

维尔曼指出，拥挤的生活条件是感染结核病的一个主要辅助因素。他的试验毫无疑问证明了结核病不是自然发生的，而是由体内繁殖的一种微生物引起的，并可通过直接接触或空气中感染的飞沫传染给健康人。他还报道消瘦、精神因素、空气污染、遗传因素、不卫生的职业、慢性消耗性疾病可使结核病发病率增高。1865年，他首次向法国医学科学院提出了这些发现，但是他的报告却受到了冷遇，甚至连巴德都未予重视。那时的医学界同行认为结核病是天生易感的，而不接受接触传染的理论，1868年，维尔曼发表了他的报告，慢慢结核病细菌学理论才赢得了普遍承认。

1882年，3位德国工作者，几乎同时各自在感染组织中看到了结核杆菌，但郭霍在1882年5月24日，专门向柏林生



理学会提出了他所做的工作，以至于今天人们把全部荣誉都给了他。他是一位使人类确信结核病是一种传染性疾病的人，这样就使维尔曼所做的工作被忽视了。郭霍在德国成为一个国家英雄，并得到了新的实验室，使他能继续做结核杆菌的研究工作。他受到了全世界的赞扬，使人们感到人类最终是能够战胜结核病——这个人类头号杀人犯的。“所有死亡者的首领”也不再是一个模糊的令人恐惧的幻影了。

2. 治疗的研究：1890年，郭霍向柏林第十届国际医学代表大会宣告：他发现了一种不仅能预防，而且能治疗结核病的物质。它是一种结核杆菌的甘油提取物，即今天通称为“旧结核菌素”。这个消息给全世界人民带来了希望，许多人争先恐后赶到德国接受郭霍的治疗，但是不久就明显地看到，死于结核菌素的病人多于得到帮助的病人，这种治疗几乎到处名声扫地。郭霍发表结核菌素光辉报告1年以后，英国医学杂志发表了一篇严厉的批评文章，谴责郭霍不道德的行为，然而郭霍的工作并不是徒劳的，他发现的结核菌素后来成为结核病诊断的有用工具。

整个19世纪，许多著名人士死于结核病（后来称为肺结核）。肺结核的悲剧导致人们对本病产生一种反常的，虚构的态度。基茨（Keats）和雪莱（Shelly）两位诗人都死于肺结核，在他们缓慢死亡过程中仍然写诗。拜伦（Byron）反常地希望死于肺结核，女士们谈论：“请看可怜的拜伦，他看待死亡是多么有意思。”

在联合王国，在维多利亚女王统治时期，每5个人中有1人死于结核病，而今天每1,000人中只有1人死于结核病。可见较好的社会条件对控制此病起了主要作用。

在此期间，为治疗结核病提出了许多疗法，例如雾化吸入树脂的香脂物质和草药以及使用鸦片制剂止咳等。而大多数疗法疗效很小或不起作用，但由于能使病人感到健康有所改善，而得以长期受欢迎。19世纪鸦片仍被广泛应用于治疗结核病，它只起缓解症状的作用，而不能治愈。

使用鱼肝油治疗肺结核，是布朗普顿 (Brompton) 肺结核病院创建人之一威廉斯 (Williams) 医生介绍的一种新疗法。1850年，威廉斯说明：“用鳕鱼肝制备的新鲜纯鱼肝油治疗肺结核比迄今仍被沿用的其它任何药物以及营养疗法或饮食疗法更有效。”这种疗法在饮食中提供了附加的维生素 A 和 D，确实能使病人体重增加，但对治愈此病无效或基本无效。

结核病的治疗更强调疗养院的益处，包括休息，新鲜空气和富有营养的饮食。19世纪许多肺结核患者，离开了不列颠潮湿寒冷的气候，到温暖的意大利旅行，希望得到治愈。现已知，一旦染病，这些因素对于改善其后果作用是很大的。饮食，体质和健康在避免结核病的发生中是起作用的。例如，1931年的一个调查表明，马萨伊和阿基考亚两个非洲部落，结核的发病率显著不同。马萨伊部落的入食肉，饮食中包括牛奶和生血，而阿基考亚部落的人则食素。肺结核的发病率食素者比食肉者高得多。

除了正在试验中的内科疗法外，结核病的外科治疗也已采用，许多外科医生试图使受感染的肺萎陷。1882年，即发现结核杆菌的当年，福尔拉尼尼 (Forlanini) 提出了通过胸壁建立人工气胸治疗肺结核，这一技术最终被医学界所接受。当认识到多数人用一侧肺仍能继续进行适当活动

的生活之后，外科医生们即开始通过切除患病的肺叶治疗某些类型的肺部疾病。

3. 化疗：由于社会条件和外科技术的提高，使越来越多的人避免了结核病可怕的拖延的死亡，但人类仍继续努力，寻找用各种化疗制剂治疗所有结核病患者。19世纪30年代，磺胺类药物对结核性豚鼠进行试验，取得了一定疗效，但用于人类治疗却无效。1943年，链霉素和对氨基水杨酸钠（PAS）问世，不论是在体内还是试管内均显示出巨大的抗结核效果，从而开始了用化疗药物成功地治疗结核病。然而这两种药使用后不久就发现，并非所有治愈者都是永久性的，有些病人由于结核杆菌对药物产生抗药性而复发。

科学家们不断地研究发现了更多有效的抗结核药物。1952年2月又有一种新的具有特效的药物异烟肼（INH）诞生了。至今，已经证实异烟肼与其它药物联合使用，是最有效的抗结核药物。此后又发现了许多抗结核药物，其中最卓越的可能是利福平，该药能使结核病的疗程从原来的18个月缩短到6个月，有些病例甚至更短。

## （二）展望未来

如今，由于生活水平的提高和一系列抗结核药物的出现，使大多数结核病患者是可治愈的，但1971年，在联合王国有265人死于活动性结核病，其中52人直到死亡后才确诊，其他大多数死亡者中，医疗处置不当被认为是造成死亡的有关因素。尽管今天在联合王国结核病与维多利亚女王统治时期相比，已达到较低的水平，但对结核病的诊断、治疗和预防仍不能放松警惕，这是生命攸关的问题。在联合王国的某些地区结核病的发病率有明显增高，其中实验室工作

人员水平的高低是有关原因之一。是不是由于变得自满而放松了群众性的 X 线照片、卡介苗接种和常规普查工作，这是现在应该考虑的问题。

## 二、分枝杆菌科

分枝杆菌科的最主要鉴别特征是它们的特征性染色。分枝杆菌科的细菌不易着色，但一旦着色即抗酸和酒精脱色。因此，常称这些细菌为抗酸杆菌。尽管增加  $\text{CO}_2$  浓度可促进其生长，但它们是严格需氧菌。在特殊培养基上  $37^\circ\text{C}$  生长缓慢。本科含有范围广泛的营养型，包括在土壤中存在的腐生种。本科的致病菌能引起一些很严重的人类传染病，包括麻疯病和结核病。虽然人和动物间存在着相当大的交叉感染，但是大多数鸟类、哺乳动物和冷血动物对其特异性致病菌是敏感的。

分枝杆菌科含有单独一属——分枝杆菌属。本属细菌无动力，需氧，是略弯曲或直的杆菌，长  $1.0\sim 10\ \mu\text{m}$ ，宽  $0.2\sim 0.6\ \mu\text{m}$ ，类脂复合物组成其独特的细胞壁。

### (一) 人型结核杆菌 (*Mycobacterium Tuberculosis*)

结核病是一种古老的疾病，已在埃及某些木乃伊尸骨中证实。本菌能感染人体的许多器官。

人型结核杆菌引起人的结核病，有时还可传播给牛、猴子和狗。感染可在豚鼠体内建立，在家兔、田鼠和家禽则不行。本菌为细长，直或微弯曲两端浑圆的杆菌，长  $1\sim 4\ \mu\text{m}$ ，宽  $0.2\sim 0.5\ \mu\text{m}$ ，具有抗酸性，无动力，无芽胞，无荚膜。

革兰氏染色不易着色，但通常认为是革兰氏阳性。最好用萋-尼氏染色或金胺石炭酸染色。由于本菌含有多聚磷酸脂，因此菌体内常呈现串珠状和不着色的空泡。

人型结核杆菌即使是在最适宜的生长条件下，生长仍很缓慢。培养基内通常应含有血清或鸡蛋、无机盐和碳源（葡萄糖、甘油或丙酮酸）。该菌一般在14~18天生长，如果病人已接受化疗，可能要延迟至8周才生长。

该菌菌落为浅黄色，小而干燥，常称为“面包屑样”。在最适宜培养条件下，其繁殖一代需18~24小时。把表面活性剂如吐温80加入肉汤培养基中，能提高该菌的生长率，并有助于阻止菌体聚集，使其均匀悬浮生长。

结核杆菌高度耐干燥。保存在37°C的培养物，12年后发现仍有存活力和毒力。细菌所处的环境对其存活是一重要因素。细菌培养物如暴露于直射日光下2小时内即死亡，但痰内的细菌则需照射20~30小时才能死亡。如果未受直接日光照射，在痰内能生存数月。

## **(二) 非洲分枝杆菌 (Mycobacterium Africanum)**

1969年，卡斯特奇 (Castets) 等首先描述了非洲分枝杆菌的特性，它介于人型和牛型结核杆菌之间。该菌对吡嗪酰胺敏感，产生的萘酸比牛型结核杆菌多，丙酮酸钠对其生长影响较小。该菌被称为牛型结核杆菌的非洲-亚洲变种，在移民人群中最常见。

## **(三) 牛型结核杆菌 (Mycobacterium Bovis)**

1896年，史密斯 (Smith) 鉴别出牛型结核杆菌和人型结核杆菌。牛型结核杆菌常比人型结核杆菌短而粗，初次分离培养较困难。该菌是引起牛结核病的病原体，并能感染给

人、猴子、猪和家畜。对动物的致病性比人型结核杆菌强的多。它生长更缓慢，在改良罗氏培养基上生长不良，菌落细小而扁平，然而，如在培养基内加入丙酮酸钠，可促进生长。

50年前，多数牛奶场的牛群，受到牛型结核杆菌的严重感染，这些受感染牛的牛奶是造成人类感染的常见来源。牛的结核菌素试验和牛奶的巴氏消毒法已大大降低了人类牛型结核杆菌病的发病率。

卡介苗(BCG)——卡介苗是1908年由法国工作者卡尔默特(Calmette)和介兰(Guerin)通过在甘油马铃薯胆汁培养基上反复传代培养减毒而分离出的1株牛型结核杆菌变异株。最初分离出的变异株的亚培养物做为牛型结核杆菌卡介苗菌株保存，并做为一种抗结核病的免疫制剂使用。虽然人们认为这是一种非常安全的菌苗，但偶尔可引起局部脓肿或更广泛的感染，包括新生儿接种后的骨髓炎。

#### (四) 田鼠分枝杆菌 (Mycobacterium Microti)

田鼠分枝杆菌是田鼠结核病的致病菌，通常称为田鼠结核杆菌。它比人型和牛型结核杆菌生长更缓慢，菌体更长(10 $\mu$ m)，更细。在含有甘油的培养基上初次分离培养时不生长，亚培养时，甘油也不能促进生长。

该菌在免疫学上与人型、牛型结核杆菌关系紧密。由于这个原因，在卡介苗的效力试验性研究中包括此菌，以比较它与卡介苗对人类抗结核病的免疫力。在7.5~10年后，该菌所提供的免疫水平实际上与卡介苗是一致的。

#### (五) 溃疡分枝杆菌 (Mycobacterium Ulcerans)

溃疡分枝杆菌最初在热带发现形成坏死性的皮肤疾病，

如不及早治疗,即形成中心坏死的慢性溃疡。该菌长 $1.5\sim 3.0\mu\text{m}$ ,宽 $0.5\mu\text{m}$ ,但在组织切片中,一般较大并呈串珠状。该菌在最适宜生长温度 $33^{\circ}\text{C}$ 时,生长仍非常缓慢,可延迟至12周才长出。菌落光滑、细小而隆起,呈淡乳脂色至黄色。

虽然小白鼠的足垫接种该菌可受感染,但大多数实验动物均可抵抗它的感染。

在澳大利亚,非洲和墨西哥紧靠河流和沼泽的地区常常发现溃疡分枝杆菌的感染,但在人体以外从未证实其存在。

#### (六) 麻疯分枝杆菌 ( *mycobacterium Leprae* )

1874年,汉森(Hansen)报道在麻疯病人的病灶内存在着大量的杆菌。虽然首次报告此菌是在100多年前,但至今仍未搞清楚。人工培养尚未成功,感染实验动物也是困难的。大量的实验工作是在小鼠足垫上进行的。九带犰狳是对麻疯杆菌最敏感的动物,目前的研究工作正使用这种动物进行。在犰狳中,麻疯病可感染所有器官,而人类麻疯病则不同。犰狳可用于免疫学研究,并为实验研究工作提供大量的麻疯杆菌。在感染的人体组织内,该菌呈直的或微弯曲的杆状,长 $2.8\mu\text{m}$ ,宽 $0.2\sim 1.4\mu\text{m}$ ,堆集成团,排列成束状,象雪茄烟的小捆一样。

麻疯分枝杆菌是繁殖非常缓慢的细胞内专性寄生菌,人是唯一的自然宿主。该菌抗酸性强,但不抗酒精,有时可见颗粒状染色。

麻疯病的临床表现各异,但根据病人的免疫反应形成了一个免疫谱。谱的一极(结核样型麻疯)反应活跃,而在谱的

另一极（瘤型麻疯）对其病原体无特异性的免疫反应。

在结核样型麻疯中，一般查不出抗酸杆菌。皮肤活体组织检查，真皮层可见成熟肉芽肿，有上皮样细胞、巨细胞和相当广泛的淋巴细胞浸润。该菌侵犯神经，寄居于施旺氏（Schwann）细胞内，神经损害非常广泛。

在瘤型麻疯中，其组织学图象与结核样型麻疯完全不同，无上皮样细胞和巨细胞，淋巴细胞罕见且散在分布。炎症浸润主要是组织细胞，由于细菌类脂的积聚，可呈现特有的空泡。在巨噬细胞内可见大量抗酸杆菌。神经也被侵犯，在施旺氏细胞内可见大量抗酸杆菌，但对神经组织的损害比结核样型麻疯轻。

#### （七）鼠麻疯分枝杆菌（*mycobacterium Lepraemurium*）

鼠麻疯分枝杆菌又称斯特范斯基（Stefansky）杆菌引起鼠麻疯。鼠麻疯病在世界上许多地区的家鼠中自然发生。其病程缓慢，家鼠感染后常可存活6~12个月。感染的鼠类组织内，菌体形态类似麻疯杆菌，只是细胞内的菌体趋向于任意排列，而不是束状排列；在细胞核的周围，而不取代细胞核。尽管鼠麻疯和人麻疯相似，但它们是完全无关的，鼠不是人麻疯的潜伏源。

麻疯分枝杆菌和鼠麻疯分枝杆菌的自然宿主都是单核细胞，但鼠麻疯分枝杆菌与麻疯分枝杆菌不同，它在单核细胞组织培养中可存活数月。实验性感染可在大鼠、小鼠、仓鼠体内建立。

#### （八）副结核分枝杆菌（*mycobacterium Paratuberculosis*）



副结核分枝杆菌是发生在欧洲及北美洲的牛慢性特异性肠炎的病原菌。牛因食入感染的饲料而发病，并引起腹泻，阻碍食物的正常吸收。本病潜伏期长，病程进展缓慢，最终必然导致死亡。感染动物的牛结核菌素皮肤试验阴性，但鸟结核菌素皮肤试验却常呈阳性。

该菌为细小的抗酸杆菌，长 $1\sim 2\ \mu\text{m}$ ，宽 $0.5\ \mu\text{m}$ ，聚集成堆，抗酸性强，分布于肠粘膜和粘膜下层组织的细胞内或细胞外。多年来，只有在培养基内补充灭活的结核杆菌或腐生菌—草分枝杆菌才能生长。该菌所需的生长因子是分枝杆菌素，而它是人工不能合成的。

该菌初次分离培养生长缓慢，但其后再次培养时，即使是在营养不丰富的培养基上，生长也较旺盛。

#### (九) 其它分枝杆菌

过去，人们给这类细菌许多名称，包括无名分枝杆菌（由于所有细菌都已命名，现在已不再称它们为无名分枝杆菌），非结核分枝杆菌和机会分枝杆菌等。命名为非典型分枝杆菌也是不正确的术语，因为它们不是非典型，而具有其本身特殊菌种的特征。

1955年，鲁尼恩（Runyon）提出了一个非常简单，非常有用的分类系统。根据生长速度和色素产生将分枝杆菌分为不同的群。共分四群，每一群中有许多细菌已定位。1962年，柯林斯（Collins）以及马克史（Marks）和理查兹（Richards）又对这些分枝杆菌进行了分类。

柯林斯根据细菌生长需要的温度和 在特殊培养基上生长、色素产生以及对氨硫脲敏感或抗药等，将分枝杆菌分为10群，而马克史和理查兹根据鲁尼恩指征，增加与生长有关