

Concise Oral Microbiology

简明口腔微生物学

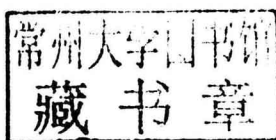
孙卫斌·主编



东南大学出版社
SOUTHEAST UNIVERSITY PRESS

简明口腔微生物学

孙卫斌 主 编



 东南大学出版社
SOUTHEAST UNIVERSITY PRESS

· 南京 ·

图书在版编目(CIP)数据

简明口腔微生物学 / 孙卫斌主编. —南京: 东南大学出版社, 2017.9

ISBN 978-7-5641-7406-4

I . ①简… II . ①孙… III . ①口腔科学 - 微生物学 - 医学院校 - 教材 IV . ①R780.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 203379 号

简明口腔微生物学

出版发行 东南大学出版社

出 版 人 江建中

社 址 南京市四牌楼 2 号(邮编 210096)

印 刷 虎彩印艺股份有限公司

经 销 新华书店

开 本 700 mm × 1000 mm 1/16

印 张 11.5

字 数 210 千字

版 次 2017 年 9 月第 1 版 2017 年 9 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-5641-7406-4

定 价 36.00 元

* 本社图书若有印装质量问题,请直接与营销部联系,电话: 025-83791830。

简明口腔微生物学

编写委员会

主 编 孙卫斌

副主编 泥艳红 吴 娟 杨亚萍

编 写 (按姓氏笔画为序)

朱 锋 华 芳 孙卫斌

杨 洁 杨亚萍 吴 娟

吴萌萌 陈 盛 泥艳红

姜 苏 徐蓉蓉

前言

Preface

口腔微生物学在口腔医学教学课程中的位置似乎没有非常明确。从经典的学科体系上说,微生物学属于基础医学范畴,那么口腔微生物学理应归属于口腔基础医学;但在教学实践中,我们又觉得,口腔微生物学更多的是口腔临床医学各学科的延伸,说它是临床应用微生物学似乎也不为过,因此,把它放在口腔临床医学中去教学并没有感到任何的局促。

事实上,多数情况下,我们是把口腔微生物学放在研究生教学阶段进行的,也就是相当于毕业后教育阶段。在这个阶段进行的教学实践中还会遇到的问题是,学生从大一大二受到微生物学教育到毕业后教育阶段的时间跨度比较大,而承担口腔微生物学教学的大多是临床教师,口腔临床教师精通微生物学基础知识的比较少,即使是有口腔微生物学研究经历的教师,他们熟悉的也不过是本专科疾病的“微生物病因学”,与系统的学科教学还有一定差别。

更进一步说,口腔临床工作对医务人员的口腔微生物学知识的要求在不断提高。随着临床及临床研究工作的开展,感染、医院感染控制、抗生素的合理应用又越来越受临床重视,我们听到的越来越多的是医院对学生病原微生物“基础不扎实”的评价,微生物病因学尽管在口腔临床医学许多本科教材中都有相当的篇幅,但受制于课时数等原因,本科口腔临床医学教学更偏重于诊断与治疗的教学也是客观现实。

有鉴于此,我们组织了这门“口腔微生物学”课程。这一课程的主体是将本科阶段的口腔疾病的微生物学病因学内容稍微进行了一点扩

展,前面请基础医学的老师对病原微生物学总论进行一些铺垫,后面扩展了抗感染治疗和微生物学检测,并安排了几个实验操作课。其目的在于将“口腔微生物学”进行融通与衔接,使其更实用,也为毕业后教育,无论是专业学位研究生或者住院医师规范化培训还是学术学位研究生的工作做一个课程教学的基础。

本书是我们将原有课程教学讲义修订而成的。希望它能够应用于普通高等院校口腔医学专业研究生教学和住院医师规范化培训的教学中。本书作为联系基础、临床、研究的尝试,希望它也能对口腔临床医师有所帮助。至于书的编著水平,真的诚惶诚恐。敬请各位专家、老师、同学、同行不吝指正。

孙卫斌

2017年4月

目 录

Contents

第一章 细菌学概论

第一节 细菌的基本性状	1
第二节 细菌的遗传与变异	7
第三节 细菌的感染与致病性	11

第二章 病毒学概论

第一节 概述	17
第二节 病毒学研究的基本方法	20
第三节 毒粒的性质	21
第四节 病毒的复制	25

第三章 真菌及其他微生物概论

第一节 放线菌	28
第二节 支原体、立克次体和衣原体	30
第三节 真核微生物	32

第四章 免疫学概论

第一节 概述	36
第二节 宿主的非特异免疫	42

第三节 宿主的特异性免疫 46

第四节 感染 48

第五章 龋病及牙髓根尖周病微生物学

第一节 龋病微生物学 52

第二节 牙髓根尖周病微生物学 59

第六章 牙周病微生物学

第一节 概述 68

第二节 牙菌斑生物膜 70

第三节 牙周微生物的致病作用 75

第四节 几种主要的牙周致病菌 83

第五节 常见牙周病的临床和微生物学特征 94

第七章 口腔颌面部感染的微生物学

第一节 口腔颌面部感染的分类及特点 102

第二节 口腔颌面部感染的优势病原菌及其致病性 108

第八章 口腔微生物检测技术

第一节 反应板微量快速生化实验 114

第二节 代谢酸产物分析层析技术 117

第三节 全细胞可溶性蛋白凝胶电泳 121

第四节 细菌细胞壁和细胞膜组分分析 124

第五节 核酸技术 124

第六节 间接免疫荧光技术 131

第九章 抗微生物的化学药物治疗

第一节	抗微生物的化学药物治疗概论	134
第二节	各类抗细菌药物的药理特点	135
第三节	抗微生物药物在口腔医学中的应用	141

第十章 口腔微生物学实验

实验一	龈下细菌的分离培养	154
实验二	龈下细菌刚果红负性染色和革兰染色	155
实验三	PCR 技术检测牙龈卟啉单胞菌的菌毛基因型	157
实验四	牙龈成纤维细胞原代培养技术	160
实验五	软组织标本的包埋和切片	162
实验六	组织切片的 HE 染色法	165
实验七	激光共聚焦显微镜观察细胞骨架	170

第一章



细菌学概论

第一节 细菌的基本性状

细菌(bacterium)是原核生物界的一种单细胞微生物。其特征是形体微小,结构简单,具有细胞壁和原始核质,无核仁和核膜,除核糖体外无其他细胞器。了解细菌的形态和结构对研究细菌的生理活动、致病性和免疫性,以及细菌鉴别、疾病诊断和细菌性感染的防治等均有重要的理论和实际意义。

一、细菌的形态与结构

1. 细菌的大小

细菌是以微米作为测量其大小的单位。观察细菌最常用的仪器是光学显微镜,可以用测微尺在显微镜下进行测量。不同种类的细菌大小不一,同一种细菌也因菌龄和环境因素的影响而有差异。

2. 细菌的形态

细菌按其形态主要有球菌、杆菌和螺形菌三大类。

(1) 球菌 外观呈圆球形或近似球形,多数球菌直径在 $1\mu\text{m}$ 左右。由于繁殖时细菌分裂平面不同以及分裂后菌体之间相互黏附程度不一,可形成不同的排列方式。这对一些球菌的鉴别颇有意义,如双球菌、链球菌、葡萄球菌、四联球菌、八叠球菌等。各类球菌在标本或培养物中除上述的典型排列方式外,还可有分散的

单个菌体存在。

(2) 杆菌 不同杆菌的大小、长短、粗细很不一致。杆菌形态多数呈直杆状,也有的菌体稍弯;多数呈分散存在,也有的呈链状排列称为链杆菌,菌体两端大多呈钝圆形,少数两端平齐或两端尖细。

(3) 螺形菌 细菌菌体呈弧形或螺旋状。根据菌体螺旋数目及形态可分为弧菌、螺菌及螺杆菌。

3. 细菌的结构

细菌的结构对细菌的生存、致病性和免疫性等均有一定作用。细胞壁、细胞膜、细胞质和核质是各种细菌所共有的,称为细菌的基本结构;荚膜、鞭毛、菌毛。芽胞只有某些细菌甚至只在某些特定时期具有,因此被称为细菌的特殊结构(图 1-1)。

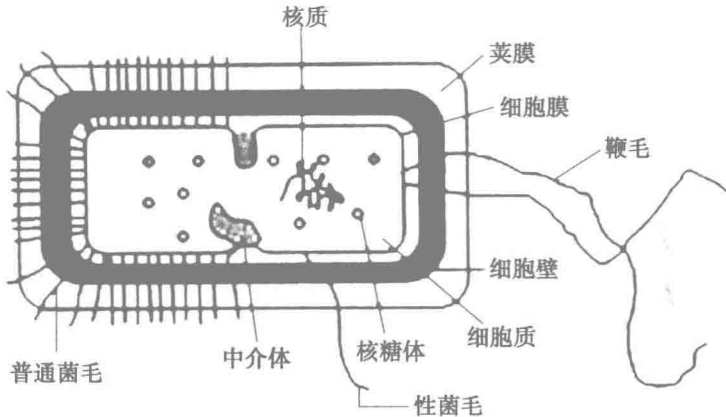


图 1-1 细菌结构模式图

(1) 细菌的基本结构

①细胞壁:在细菌细胞外层的一层无色透明、坚韧并具有一定弹性的膜状结构,可承受细胞内强大的渗透压而不破坏。革兰染色法将种类众多的细菌区分为革兰阳性菌和革兰阴性菌。此两类细菌细胞壁除共有肽聚糖外,各有其特殊组分。

a. 肽聚糖(peptidoglycan):是细胞壁的主要成分,又称黏肽(mucopetide)。细胞壁的机械强度有赖于肽聚糖的存在。合成肽聚糖是原核生物特有的能力。革兰阳性菌的肽聚糖是由聚糖骨架、四肽侧链和五肽交联桥三部分组成,革兰阴性菌的肽聚糖仅由聚糖骨架和四肽侧链两部分组成。革兰阳性细菌细胞壁较厚,直径 20 ~ 80 nm。肽聚糖含量丰富,有 15 ~ 50 层,占细胞壁干重的 50% ~ 80%。而革兰阴性菌的肽聚糖只有 1 ~ 2 层,占细胞壁的 5% ~ 10%。

b. 革兰阳性菌细胞壁特殊组分：革兰阳性菌除肽聚糖外，尚有大量特殊组分磷壁酸 (teichoic acid)。磷壁酸是由核糖醇 (ribitol) 或甘油 (glycerol) 残基经由磷酸二键互相连接而成的多聚物。磷壁酸分壁磷壁酸 (wall teichoic acid) 和膜磷壁酸 (membrane teichoic acid) 两种 (图 1-2)。

c. 革兰阴性菌细胞壁特殊组分：革兰阴性细菌细胞壁较薄，10 ~ 15 nm，除 1 ~ 2 层肽聚糖外，尚有特殊组分外膜层位于细胞壁肽聚糖层的外侧，包括脂多糖、脂质双层和脂蛋白三部分 (图 1-3)。

脂蛋白一端以蛋白质部分共价链连接于肽聚糖的四肽侧链上，另一端脂质部分经以共价链连接于外膜的磷酸上，其功能是稳定外膜并将之固定于肽聚糖层。

脂质双层是革兰阴性菌细胞壁的主要结构，其功能除了转运营养物质外，还有屏障作用，能阻止多种物质透过，可以抵抗许多化学药物的作用，所以革兰阴性菌对溶菌酶、青霉素等比革兰阳性菌具有较大的抵抗力。

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 由脂质双层向细胞外伸出，包括脂质 A、核心多糖和特异多糖三个组成部分，习惯上又将脂多糖称为细菌内毒素。脂质 A 为一种糖磷脂，是由焦磷酸键联结的氨基葡萄糖聚二糖链，其上结合有各种长链脂肪酸，是脂多糖的毒性部分和主要成分，为革兰阴性菌的致病物质，无种属特异性，各种革兰阴性菌内毒素引起的毒性作用都大致相同。核心多糖位于脂质 A 的外层，具有属特异性，同一属细菌的核心多糖相同。特异多糖是脂多糖的最外层，是由数个至数十个低聚糖 (3 ~ 5 个单糖) 重复单位所构成的多糖链。

革兰阳性菌和革兰阴性菌的细胞壁结构显著不同，导致这两类细菌在染色性、抗原性、毒性、对某些药物的敏感性等方面都存在很大差异。

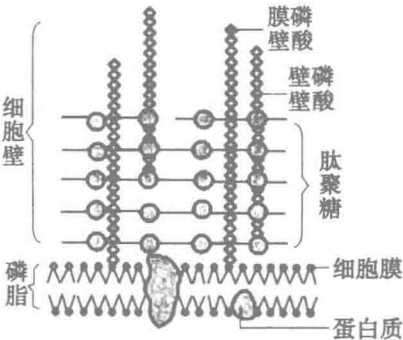


图 1-2 革兰阳性菌细胞壁结构模式图

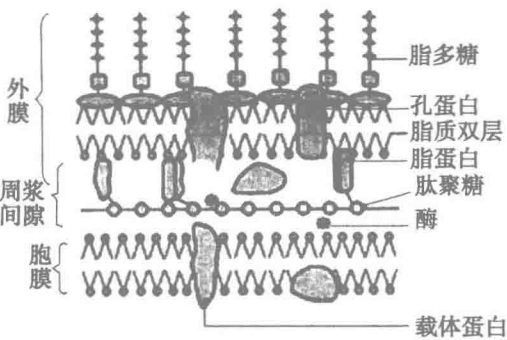


图 1-3 革兰阴性菌细胞壁结构模式图

d. 细胞壁的功能：细菌细胞壁坚韧而富有弹性，保护细菌抵抗低渗环境，可承受高达 5 ~ 25 个大气压的渗透压，并使细菌在低渗的环境下细胞不易破裂。细胞

壁对维持细菌的固有形态起重要作用,可允许水分及直径小于 1 nm 的可溶性小分子自由通过,与物质交换有关。细胞壁上带有多种抗原决定簇,决定了细菌菌体的抗原性。

e. L 型细菌: L 型是指细菌发生细胞壁缺陷的变型,因其首次在 Lister 研究所发现,故以其姓名的第一个字母命名。当细菌细胞壁中的肽聚糖结构受到理化或生物因素的直接破坏或合成被抑制,这种细胞壁受损的细菌一般在普通环境中不能耐受菌体内部的高渗透压而将胀裂死亡,但在高渗环境下,它们仍可存活而成为细菌细胞壁缺陷型。革兰阳性菌 L 型称为原生质体 (protoplast),必须生存于高渗环境中。革兰阴性菌 L 型称为原生质球 (spheroplast),在低渗环境中仍有一定的抵抗力。

②细胞膜:或称胞膜,位于细胞壁内侧,包绕在细菌胞浆外的具有弹性的半渗透性脂质双层生物膜(图 1-4)。主要由磷脂及蛋白质构成,膜不含胆固醇,是与真核细胞膜的区别点。细菌细胞膜是细菌赖以生存的重要结构之一,其功能主要有物质转运、生物合成、分泌和呼吸、信号转导等。

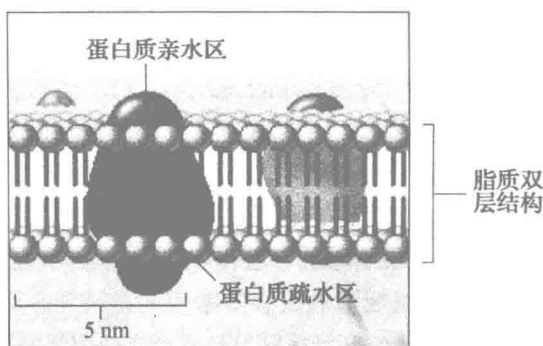


图 1-4 细胞膜脂质双层生物膜结构

a. 中介体:细菌细胞膜可内陷、折叠、卷曲形成囊状物,多见于革兰

阴性菌。囊状物的形成有效扩大细胞膜面积,相应增加了酶的含量和能量的产生,功能类似于真核细胞的线粒体,亦称为拟线粒体。

b. 青霉素结合蛋白:细菌细胞膜上一组参与细胞壁肽聚糖合成的蛋白质,为青霉素作用的靶点蛋白。其与青霉素结合后可使酶功能受抑制,影响细胞壁中肽聚糖的合成。

c. 双组分信号转导系统:是一个组氨酸蛋白激酶和一个反应调节蛋白构成的膜上信号受体,广泛存在于各种原核生物中。是细菌对环境信号做出反应的调控系统。

③细胞质:细胞膜包裹的溶胶状物质为细胞质或称原生质,由水、蛋白质、脂类、核酸及少量糖和无机盐组成,其中含有核糖体、质粒、胞质颗粒等重要结构。

a. 核糖体:细菌合成蛋白质的场所,游离存在于细胞质中。细菌核糖体沉降系数为 70S,由 50S 和 30S 两个亚基组成。细菌核糖体是一些抗生素作用的重要靶点,有些抗生素可以和核糖体的亚基结合,干扰其蛋白质合成,从而杀死

细菌。

b. 质粒: 细菌染色体外的遗传物质, 存在于细胞质中, 多数为闭合环状的双链DNA, 带有遗传信息, 控制细菌某些特定的遗传性状。

c. 胞质颗粒: 细菌细胞质中含有多种颗粒, 大多为储藏的营养物质。不同细菌有不同的胞质颗粒, 同一细菌在不同环境或生长期亦可不同。

④核质: 又称拟核, 是细菌的遗传物质, 决定细菌的遗传特征。与真核细胞的细胞核的区别在于无核膜, 无组蛋白包绕, 不成形。其功能与真核细胞的染色体相似。

(2) 细菌的特殊结构

①荚膜: 某些细菌在其细胞壁外包绕一层黏液性物质, 为疏水性多糖或蛋白质的多聚体。厚度 $\geq 0.2\ \mu\text{m}$, 光学显微镜下可见, 边界明显者称荚膜或大荚膜。厚度 $< 0.2\ \mu\text{m}$ 者称为微荚膜。大多数细菌的荚膜是多糖, 也有少数为多肽。荚膜的形成与环境与营养有关, 一般在机体内和营养丰富的培养基中才能形成。特殊染色可将其染成与菌体不同的颜色。

荚膜的功能: 抗吞噬作用、黏附作用, 以及抗干燥和有害物质的损伤作用。

②鞭毛: 菌体表面附有的细长并呈波浪状弯曲的丝状物。需用电子显微镜观察。不同鞭毛菌其鞭毛的数量和部位有很大差别, 总体分为4类, 分别是单毛菌、双毛菌、丛毛菌和周毛菌(图1-5)。鞭毛由细胞膜长出, 游离于菌细胞外, 由基础小体、钩状体和丝状体三个部分组成。鞭毛是细菌的运动器官, 其运动具有化学趋向性, 常朝有高浓度营养物质的方向移动, 而避开对其有害的环境。鞭毛抗原有很强的抗原性, 少数与致病性有关。

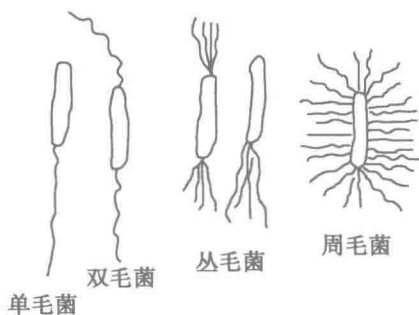


图1-5 鞭毛分类

③菌毛: 许多革兰阴性菌和少数革兰阳性菌菌体表面遍布的比鞭毛更为细、短、直、硬的丝状蛋白附属物称为菌毛, 由结构蛋白亚单位菌毛蛋白组成, 呈螺旋状排列成圆柱体。根据功能不同, 分为普通菌毛和性菌毛。

a. 普通菌毛遍布菌细胞表面, 与细菌的致病性密切相关, 往往构成细菌致病的毒力因子, 能与宿主细胞表面的特异性受体结合, 启动细菌感染的第一步定植。

b. 性菌毛仅见于少数革兰阴性菌, 数量少, 比普通菌毛长且粗, 中空呈管状, 是介导细菌传递遗传物质的一种结构。

④芽胞: 某些细菌在一定的环境条件下, 能在菌体内部形成一个圆形或卵圆形小体, 称为芽胞(图1-6)。芽胞不是细菌的繁殖体, 也并非真正意义上的细菌的特殊结构, 而是适应恶劣环境, 维持细菌生存而处于代谢相对静止的休眠体。产生芽胞的细

菌都是革兰阳性菌。成熟芽胞具有多层膜结构,由内向外依次为核心、内膜、芽胞壁、皮质、外膜、芽胞壳和芽胞外衣。特别是芽胞壳,无通透性,有保护作用,能阻止化学品渗入。芽胞形成时能合成一些特殊的酶,这些酶较之繁殖体中的酶具有更强的耐热性。细菌的芽胞发芽成繁殖体的过程,可分为活化、启动和长出三个连续阶段。芽胞对热力、干燥、辐射、化学消毒剂等理化因素均有强大的抵抗力。细菌芽胞不直接引起疾病,但当发芽成为繁殖体后,能迅速大量繁殖而致病。杀灭芽胞最可靠的方法是高压蒸汽灭菌。当进行消毒灭菌时,应以芽胞是否被杀死作为判断灭菌效果的指标。

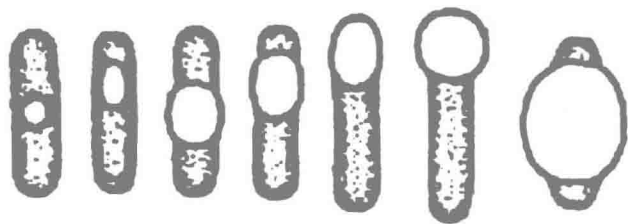


图 1-6 不同类型芽胞

二、细菌的生长繁殖与代谢

1. 细菌生长繁殖的条件

细菌生长繁殖的必备条件包括营养物质、能量和适应的环境等。

(1) 营养 为细菌的新陈代谢及生长繁殖提供必要的原料和充足的能量,包括水、碳源、氮源、无机盐,有些细菌还需要生长因子。

(2) 氢离子浓度 每种细菌都有一个可生长的 pH 范围以及最适生长 pH。

(3) 温度 根据细菌对温度的要求分为嗜冷菌、嗜温菌和嗜热菌。

(4) 渗透压 大多数细菌的生长需要等渗或低渗环境。

(5) 气体 根据细菌代谢时对分子氧的需要与否,可以分为四类:专性需氧菌、微需氧菌、兼性厌氧菌和专性厌氧菌。专性厌氧菌在有氧环境中不能生长,可能是由于缺乏氧化还原电势高的呼吸酶,同时也缺乏分解有毒氧基团的酶。

2. 细菌生长繁殖的规律

(1) 细菌个体的生长繁殖 细菌一般以二分裂方式进行无性繁殖,适宜条件下,多数细菌繁殖速度很快。

(2) 细菌群体的生长繁殖 分为迟缓期、对数期、稳定期和衰亡期。

3. 细菌的人工培养

在医学领域的应用主要有:感染性疾病的病原学诊断、细菌学的研究和生

物制品的制备。

(1) 培养基 由人工方法配置而成,专供细菌生长繁殖使用的混合营养物制品。按培养基的营养组成和用途不同,分为基础培养基、加富培养基、选择培养基、鉴别培养基和厌氧培养基。根据培养基的物理状态不同可分为液体、固体和半固体三大类。

(2) 细菌在培养基中的生长现象

①在液体培养基中:大多数细菌在液体培养基生长后呈现均匀浑浊状态,少数链状细菌呈沉淀生长。

②在固体培养基中:将标本或培养物划线接种在固体培养基的表面,因划线的分散作用,使许多原混杂细菌在固体培养基表面散开,称为分离培养。一般经过18~24小时培养后,单个细菌分裂繁殖成一堆肉眼可见的细菌基团,称为菌落。细菌的菌落一般分为光滑型菌落、粗糙型菌落和黏液型菌落三型。

③在半固体培养基中:有鞭毛的细菌在其中可自由游动,沿穿刺线呈羽毛状或云雾状浑浊生长,无鞭毛细菌只能沿穿刺线呈明显的线状生长。

第二节 细菌的遗传与变异

细菌和其他生物一样具有遗传和变异的生命特征。遗传是指细菌的子代与亲代在生物学性状上的相似性。变异是指细菌子代与亲代之间在某些形状上出现的差异性。遗传使细菌维持种的基本特征,变异使细菌产生变种,根据是否适应环境而死亡或促进细菌进化。

一、细菌变异现象

贮存在细菌遗传物质中的信息,即DNA碱基顺序,是细菌的基因型。细菌特定的基因型所表现的个体性状或特征,称为细菌的表型。当细菌表型特征发生改变时,若基因型发生了改变称为基因型变异;若基因型未发生改变,仅是环境因素影响致表达性状不同,称为饰变。常见细菌表型特征改变现象有以下几类:

1. 形态与结构变异

(1) 菌体形态的变异 细菌形态受外界因素的影响可发生变异。如细菌的L型。

(2) 特殊构造的变异 如荚膜的消失和恢复,鞭毛的从有到无。

2. 菌落变异

菌落从光滑变为粗糙,即 S-R 变异。

3. 毒力变异

包括毒力的增强或减弱。

4. 耐药性变异

细菌对某种抗菌药物由敏感变为耐受甚至依赖称为耐药或赖药性变异。

二、细菌遗传变异的物质基础

1. 细菌的染色体

一般是一条环状双螺旋 DNA,重量约为细菌干重的 2%,总长约 1 mm,染色体决定了细菌的遗传性状。细菌的 DNA 存在于细胞内相对集中的区域,没有核膜包裹,一般称为拟核。拟核中的 DNA 只以裸露的核酸分子存在,虽然与少量蛋白质结合,但不形成染色体结构。细菌染色体大多数基因保持单拷贝形式,结构为连续的基因,一般无内含子,转录后形成的 RNA 不需加工剪切,细菌染色体中亦有多拷贝基因,如 rRNA 基因、tRNA 基因、插入序列等。

2. 质粒

质粒是存在于细菌细胞中,独立于染色体外,能进行自我复制的遗传因子,同时是共价闭合环状双链 DNA。其编码的基因,可赋予宿主细胞某些遗传性状。

质粒具有下列主要特征:

(1) 可不依赖染色体而自我复制,并随细菌的分裂传入子代菌。有的质粒可整合于细菌染色体上,随细菌染色体一起复制。

(2) 可通过接合、转化和转导在细菌间转移。

(3) 质粒在自然条件下可自行丢失,也可经某些理化方法消除。

(4) 质粒赋予细菌某些重要的生物学性状。比较重要的质粒有:

① F 质粒: 编码细菌的性菌毛。

② R 质粒: 带有耐药基因,使细菌产生对某些药物的耐受性。

③ Col 质粒: 使大肠埃希菌产生细菌素。

④ Vi 质粒: 编码肠道杆菌毒力因子。不同质粒在细胞的拷贝数不同,质粒拷贝数常与其大小成反比关系。低拷贝数质粒在每个细胞中只有 1~2 个拷贝,说明其复制受到严格控制,称为严紧性质粒。相对分子质量小的质粒拷贝数高,每个