

陈 聪 敏

(上海第一医学院微生物教研组, 上海)

厌氧菌分有芽孢的和无芽孢的两大类, 过去对后一类报道很少。近年来, 由于厌氧培养技术的改进, 发现在人体内正常菌群中, 厌氧菌占首位, 其中绝大多数为无芽孢的厌氧菌。厌氧菌的临床感染率也很高。据报道, 腹腔感染和某些深部脓疡(如脑脓疡、肝脓疡、肺脓疡等)的厌氧菌感染率达 90% 以上。某些临床标本的厌氧菌检出率近 60%。由此可见, 检验厌氧菌有助于对临床感染的诊断。过去认为是“无菌脓肿”的病例, 临床表现细菌感染, 但常规法培养检验为阴性的病例, 某些常用抗生素治疗无效的病例等, 可能其中不少是与厌氧菌感染有关的。本文拟从微生物学角度介绍厌氧菌

的种类, 在人体内的分布和微生物学检查方法。

厌氧菌的种类和体内分布^{〔1〕}

除梭状芽孢杆菌可随泥土感染伤口外, 其它厌氧菌感染均来自体内正常菌群。厌氧菌在正常菌群中数量居首位。肠道中, 每克大便内含 10^{11} 个厌氧菌, 比大肠杆菌多约一千倍; 口腔内每克牙垢有 10^{10-13} 个厌氧菌, 每毫升唾液有 10^8 个, 甚至清洁前段尿中, 每毫升也有 10^{2-5} 个厌氧菌。分布如此广泛、数量如此庞大的厌氧菌群, 不能不对人体健康产生相当大的影响。

表 1 人体正常菌群中厌氧菌的种类和分布*

分 布 部 位	有芽孢 梭状芽孢杆菌	无 芽 孢								球 菌	
		革 兰 氏 阳 性					革兰氏阴性				
		放线菌属	二又杆菌属	真杆菌属	乳酸杆菌属***	丙酸杆菌属	类杆菌属	梭形杆菌属	弧 菌		
皮 肤	0	0	0	±	0	++	0	0	0	+	0
上呼吸道**	0	+	0	±	0	+	+	+	+	+	+
口 腔	±	+	+	+	+	±	++	++	+	++	++
肠 道	++	±	++	++	+	±	++	+	±	++	+
外生殖道	0	0	0	未知	0	未知	+	+	0	+	0
尿 道	±	0	0	未知	±	0	+	+	±	±	未知
阴 道	±	0	+	±	++	+	+	±	+	+	+

* “0”: 无或极少; “±”: 无规律性; “+”: 常见; “++”: 大量, 常见。

** 包括鼻、咽、喉和扁桃腺。

*** 包括厌氧、微需氧和兼性厌氧等三类。

厌氧菌的微生物学检查法

厌氧菌种类繁多, 它们对氧的敏感程度不同。有些在空气中, 或在有 0.5% 氧的条件下暴

露不到十分钟即死亡, 这些菌是极端厌氧菌; 另一些在氧浓度为 2—8% 条件下或空气中暴露 60—90 分钟仍可存活, 称为中度厌氧菌。可检出之临床感染的大多是后者^{〔2〕}。

一、临床检验样品中厌氧菌的检出率

过去厌氧菌的检出率很低。单纯使用硫乙醇酸盐培养基培养,检出率只有3%。后来随着方法的改进,检出率逐步提高。几种方法的检出率见表2。临床最常见的厌氧菌及其检出率,见表3。

表2 临床检验样品中厌氧菌的检出率^[3]

检验方法	样品数	检出率(%)	提出人及年份
单纯用硫乙醇酸盐培养基	6,253	3	Bornstein et al., 1964
厌氧缸	5,294	9	Stokes, 1958
改良厌氧瓶	7,500	15	Davis et al., 1973
气袋缸(gas bag jars)	1,223	26	Zabransky, 1970
用预还原培养基,不断用无氧气体充气	10,191	35	Martin, 1971
用无氧的送样管,预还原培养基及厌氧的手套箱	700	38	Spanlding et al., 1974
增加床边接种手续,用选择培养基	689	58.5	Holland et al., 1977

表3 临床最常见厌氧菌及其检出率^[4]

细菌种类	检出率(%)
革兰氏阴性杆菌	33—45
脆弱类杆菌组	12—23
产黑色素类杆菌组	6—10
具核梭形杆菌	2—3
革兰氏阳性杆菌	20—27
不分解糖的消化球菌	9—10
厌氧消化链球菌	8—9
中间型的链球菌	4—5
无芽孢的革兰氏阳性杆菌	15—25
痤疮丙酸杆菌	5—20
慢真杆菌	3—5
有芽孢的革兰氏阳性杆菌	5—15
产气荚膜杆菌	5—9
革兰氏阴性球菌	1—3
韦荣氏球菌	1—3

二、厌氧菌的分离培养^[3,5-8]

(一) 材料的选取,运送和保存

材料的选取是厌氧菌培养能否成功的关键。在选取过程中要避免接触体内的正常菌

群,否则检查结果不能说明问题。因此,可能有正常菌群的材料,如大便和肛拭、自行排出的尿、吐出的痰、流出的脓及鼻咽拭子、阴道及子宫颈拭子等都不必检查。检验材料应来自原来无菌的部位,如血、脑脊液、胸腹腔、心包、关节液和胆汁等。取样应尽可能用注射器,不用棉拭。深部脓疡应在表面消毒后用无菌注射器或通过外科手术取样;肺分泌物用导管和注射器在环甲膜下经气管抽取,尿由耻骨上直接从膀胱中抽取;盆腔积液由直肠子宫陷窝抽取;副鼻窦或深创口用导管或注射器尽可能深入抽取。同时,取样时要避免样品和空气接触。用注射器取样,应将多余气体排出,针尖插入无菌橡皮塞内以隔绝空气,连注射器一起送检。也可用无氧小瓶收集。我们用装青霉素的小瓶,内装含少量氧化还原指示剂刃天青(有氧时粉红色,无氧时无色)的培养基0.5毫升,抽去空气,充以无氧的二氧化碳,高压灭菌备用。使用时,将样品用注射器针头穿过橡皮塞注入0.5—1.0毫升送检。样品应在30分钟内接种,最迟不要超过2小时,以免非厌氧菌繁殖而抑制了厌氧菌的生长。如果一时来不及接种,可将样品在室温下保存,不要冷藏,因为冷藏对某些厌氧菌有害。

(二) 镜检

样品在接种前应该用无菌注射器抽样涂片作革兰氏染色镜检。这样做有以下几个好处:(1)初步了解细菌数量,形态和染色性,在提供正式检验报告前为临床医师选择治疗方案提供参考;(2)由镜检结果选定合适的选择培养基;(3)通过镜检结果与培养结果的比较,为本实验室提供质量控制的指征。

镜检时,着色浅而不均匀的阴性杆菌常是厌氧菌。两端圆而着色深、有时有空泡的多形性阴性杆菌是脆弱类杆菌;长丝状,两端尖的阴性杆菌可能是梭形杆菌属。革兰氏阳性杆菌中,短粗而无芽孢者是典型的产气荚膜杆菌,此种细菌占临床检出的梭状芽孢杆菌的一半。其它梭状芽孢杆菌常有芽孢。还有一些梭状芽孢杆菌细长、无芽孢,呈革兰氏弱阳性甚至阴性。有些不产生芽孢的阳性菌细长、多形态、成短

链、偶呈分枝状,似为放线菌属。镜检时还应检查有无多核白细胞和上皮细胞及其数量,以供临床诊断参考。

(三) 培养基的选择

常用的培养基有心脑浸出液和布鲁氏菌培养基。在培养基中加入 50—100 微克/毫升的卡那霉素和 7.5 微克/毫升的万古霉素,可抑制兼性厌氧菌而有利于专性厌氧菌的生长。如用补加了维生素 K (10 微克/毫升) 和血红素 (5 微克/毫升) 的含卡那霉素和万古霉素的溶血琼脂作类杆菌的选择培养基,特别有利于产黑色素类杆菌的生长。类杆菌属细菌在临床样品中约占 50%。因此上述培养基对提高检出率有十分重要的作用。该培养基应用前配制,在用前 42 小时放入厌氧缸中,以便在接种细菌时它处于还原状态,有利于厌氧菌的生长。

(四) 厌氧菌分离步骤

目前国内大多采用抽气换气法分离厌氧菌。分离步骤如图 1 所示。取样接种分离平板后放入厌氧缸内,其中有氧化还原指示剂美蓝和冷催化剂钯,密闭后抽气至缸内气压降到 30—40 毫米汞柱,然后用高纯度的氮气反复通入,抽气三次,以减少其中氧气。最后分别充入 80% 氮气、10% 氢气和 10% 二氧化碳。二氧化碳为细菌初代培养所必需;氢气是用于在钯催化下与残留氧气作用生成水以充分除去氧气。此时美蓝变成白色。钯在用后因吸水而可能由微红色变成浅蓝色,在 160℃ 烘烤 2 小时即可再生。

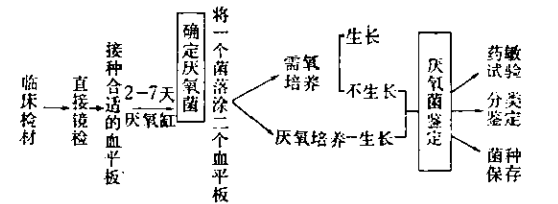


图 1 厌氧菌的分离步骤

厌氧菌生长较慢,一般在 48—72 小时才能形成可见的菌落,此时作初步观察,培养到七天才可作最后观察,如此时仍为阴性,应再培养二周。48 小时后长出的菌落,如能在无氧和有氧环

境下在血平板上都能生长,则为兼性厌氧菌;在有氧时不生长、无氧时才生长的为专性厌氧菌。

(五) 分离培养厌氧菌的注意事项

1. 应先作镜检,以便选用选择培养基。
2. 样品不能在空气中暴露太久。
3. 培养基应新鲜,培养时应尽可能使用选择培养基。
4. 厌氧缸应密封良好;钯须及时再生;必须加入美蓝作指示剂;某些厌氧菌初代培养必须二氧化碳,故必须在厌氧缸内通入。
5. 培养时间必须足够长。有些样品中只含少量极难培养的厌氧菌,有时须培养 2—3 周才能长出菌落。

三、厌氧菌的鉴定

临床常见的厌氧菌主要鉴定特征列于表 4。这些方法较费时间。目前国外已采用气相色谱法和间接荧光抗体法进行快速鉴定。

1976 年 Gorbach 等^[9]用气相色谱法快速鉴定脓液中的厌氧菌,现在国外已普遍应用。用此法在一小时内即可得出结果。

Onderdonk 等^[10]发现,目前公认为临床最常分离到的厌氧菌——脆弱类杆菌有荚膜,而荚膜多糖就是它的毒力因子。因此, Kasper 等^[11]用提纯的荚膜多糖制备出抗血清,用间接荧光抗体法来快速鉴定脆弱类杆菌。Fiddian 与 Kasper 合作^[12],以脆弱类杆菌亚种荚膜多糖的单价血清和五个亚种全菌的混合血清,用间接荧光抗体法直接检查了取自人体各部位的 43 份样品。与常规培养法和气相色谱法比较,发现以单价荚膜多糖用荧光抗体法鉴定最为敏感 (100%) 和特异 (90.3%); 用混合血清敏感性也高 (100%), 但特异性不高 (64.3%), 不过可以鉴定五个亚种。这种方法只需 2 小时,简单、快速而灵敏。

厌氧菌的研究进展为微生物学研究提供了新方法和新知识。厌氧菌在人体正常菌群中占首位,在人体不少部位的感染率也占首位。更重要的是,临床上大量存在常规细菌培养检验阴 (下转第 168 页)

表 4 临床常见厌氧菌的鉴别特征

细 菌 名 称	鉴 别 特 征*	革兰氏染色	形 态	同化特性					胆汁刺激生长情况	Twee 380	明胶液化	硝酸盐还原	对抗生素的敏感性(纸片法)					
				葡萄糖	甘露糖	鼠李糖	海藻糖	七叶灵					吡 啶	万古霉素(5 微克)	粘菌素(10 微克)	青霉素(2 单位)	卡那霉素(1 毫克)	利福平(15 微克)
脆弱亚种 (<i>Bacteroides fragilis</i>)	狄氏亚种 (<i>B. fragilis</i> subsp. <i>distans</i>)	-	具多形性,杆状,两端圆,两端染色极浓,菌体中可有气泡,有时球杆状。 菌落直径 0.5—2 毫米,凸起,圆形,灰白色,半透明,也可以呈粘液状,发亮。	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	
	脆弱亚种 (<i>B. fragilis</i> subsp. <i>fragilis</i>)	-		+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	
	普通亚种 (<i>B. fragilis</i> subsp. <i>vulgatus</i>)	-		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	卵圆亚种 (<i>B. fragilis</i> subsp. <i>ovatus</i>)	-		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	多形亚种 (<i>B. fragilis</i> subsp. <i>rhetataamicron</i>)	-		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
不分解糖亚种 (<i>Bacteroides melaninogenicus</i> subsp. <i>asaccharolyticus</i>)	中间型亚种 (<i>B. melaninogenicus</i> subsp. <i>intermedius</i>)	-	杆状,末端圆,或呈球杆状,大小较一致。 菌落圆形,突起,暗淡无光,长出后颜色由黄—米黄—棕—黑色。	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	
	产黑色素亚种 (<i>B. melaninogenicus</i> subsp. <i>melaninogenicus</i>)	-		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	具核梭形杆菌 (<i>Fusobacterium nucleatum</i>)	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
产气荚膜杆菌 (<i>Clostridium perfringens</i>)**	脆弱丙酸杆菌 (<i>Propionibacterium acnes</i>)	+	杆状,细长,两端尖,有时成对,两端相靠。菌落凸起,中间发亮,如玻璃屑;也可不发亮如面包屑。 杆状,少见芽孢,短粗,有荚膜,菌落平坦,圆形,有双层溶血圈,直径 1—2 毫米。 棒状,作链状排列。菌落直径 0.5—2 毫米,凸起,光滑,圆形,灰白色,不透明。 球形,排列成链或成堆。菌落直径 1—2 毫米,凸起,圆形,灰白色,不透明,不溶血。 球形,排列成链。菌落小,灰白色,圆形,不透明,有时溶血。 球形,微小,成对或成堆。菌落小如针尖。	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	不分解糖消化球菌 (<i>Peptococcus asaccharolyticus</i>)	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	厌氧消化链球菌 (<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>)	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	小韦氏球菌 (<i>Veillonella parvula</i>)	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

* “+”表示阳性反应,刺激生长或对抗生素敏感(抑菌圈直径 ≥ 10 毫米);“-”表示阴性反应,不刺激生长或对抗生素有抗性(抑菌圈直径小于 10 毫米);“±”表示不定。
** 卵圆葡萄球菌试验阴性;产气荚膜杆菌试验阳性;对动物有毒力。