

# 第一章 病原生物安全

在世界范围内，传染性、感染性疾病一直是普遍存在、备受关注的公共卫生问题。特别是在新型冠状病毒感染疫情防控背景下，病原生物学作为一门研究病原体与人类疾病关系的学科，备受医学生的关注。病原生物实验是一门实践性、技术性很强的课程，因其研究对象的特殊性，涉及许多可能对人类健康造成威胁的因素。

2003年以来，北京、台湾等地区相继发生实验室人员严重急性呼吸综合征冠状病毒传播事件，2010年东北某大学、2019年兰州某研究所相继发生的布鲁氏菌感染事件，以及2019年新型冠状病毒感染疫情初期一些一线医务人员相继感染，这些事件的陆续发生给人们敲响了生物安全的警钟。关注实验室生物安全，提高病原生物相关从业人员的生物安全防护至关重要。

## 第一节 病原微生物概述

微生物是存在于自然界的一大类微小生物，包括非细胞型微生物（如病毒）、原核细胞型微生物（如细菌）及真核细胞型微生物（如酵母菌）。具有体积微小、结构简单、种类繁多、分布广泛、繁殖迅速、适应力强、易于变异等特点。原核生物被认为是地球上最早的生命形态。已发现世界上最古老的铁细菌（如铁柄杆菌、小纤毛菌、小管纤毛菌及古亚铁氧化铁球菌）距今约24亿年。蓝藻是一类进化历史悠久、革兰氏染色阴性、不含叶绿体（区别于真核生物的藻类）、能进行产氧性光合作用的细菌。已发现的蓝藻化石中，最古老的距今约34亿年。在蓝藻等厌氧古细菌的

光合作用下，地球经历大氧化事件及雪球地球事件后，大气中氧含量约 20%，适于人类的生存。迄今世界上发现的最早陆生真菌距今约有 6.3 亿年。生物登陆是生命演化史上一次重要转折，陆地由一片荒芜变得生机勃勃，而真菌在此过程中扮演着重要角色。

随着地球轨道改变、风带或洋流变化，地球表面气候变暖，在 1.5 万年前人类文明爆发。人类生活从狩猎游牧逐渐变为农业聚居，野生动物不断被人类驯化，使生物赖以生存的环境受到影响，人类与家畜之间共有传染病也随之增多。纵观影响人类历史进程的几次全球瘟疫事件，能够改变人类历史的重要致病菌，绝大多数源自家畜和宠物。天花、肺结核、流行性感、麻疹、疟疾、霍乱、白喉、百日咳、猩红热等传染病最初都是动物病原体。

21 世纪以来，全球陆续出现一些跨越国界流行的新发传染病，已成为国际关注的突发公共卫生事件。2003 年，严重急性呼吸综合征冠状病毒引起全球严重急性呼吸道综合征；2009 年，甲型 H1N1 流行性感席卷全球；2003 年和 2013 年，先后出现人感染 H5N1、H7N9 禽流行性感病毒疫情；2013 年，中东呼吸综合征冠状病毒引起严重的中东呼吸综合征；2014 年，西非暴发大规模埃博拉病毒疫情，2016 年，寨卡病毒来势汹汹威胁亚非多个国家；2017 年，鼠疫在马达加斯加肆虐，成为“50 年来鼠疫暴发最强年”；同年，马尔堡病毒在南部非洲肆虐；2018 年，非洲国家受到脑炎疫情暴发的威胁；2019 年，新型冠状病毒引发感染疫情迅速席卷全球，随着该病毒的持续传播，病毒变异株也在不断出现，导致该疫情持续 3 年之久。这些疫情的发生给病原生物学相关研究带来了严峻的挑战。

## 第二节 病原微生物的分类与分级

我国根据病原微生物的传染性、感染后对个体或者群体的危害程度，将病原微生物分为四类，其中第一类和第二类病原微生物统称为高致病

性病原微生物。

第一类病原微生物是指能够引起人类或者动物非常严重疾病的微生物，以及我国尚未发现或者已经宣布消灭的微生物。该类微生物如天花病毒、新疆出血热病毒、埃博拉病毒、蜱传脑炎病毒、东方马脑炎病毒等均曾引起世界范围内大瘟疫，引起的传染病死亡率可达 30% ~ 90%。

第二类病原微生物是指能够引起人类或者动物严重疾病，比较容易直接或者间接在人与人、动物与人、动物与动物间传播的微生物。该类微生物，如狂犬病毒、结核分枝杆菌、乙型脑炎病毒、人类免疫缺陷病毒、严重急性呼吸综合征病毒、高致病性禽流行性感冒病毒、霍乱弧菌等均曾引起大范围内暴发流行。

第三类病原微生物是指能够引起人类或者动物疾病，但一般情况下对人、动物或者环境不构成严重危害，传播风险有限，实验室感染后很少引起严重疾病，并且具备有效治疗和预防措施的微生物。常见的病原体包括流行性感冒病毒、普通人冠状病毒、乙型肝炎病毒、柯萨奇病毒、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、淋病奈瑟菌、梅毒螺旋体、沙眼衣原体等。

第四类病原微生物是指在通常情况下不会引起人类或者动物疾病的微生物。如食品制作中使用的嗜热链球菌等。

我国根据所操作的生物因子的危害程度和采取的防护措施，依照实验室生物安全防护水平分级，将实验室分为一级（BSL-1）、二级（BSL-2）、三级（BSL-3）、四级（BSL-4）。其中生物安全一级防护水平最低，四级防护水平最高。高致病性病原微生物的实验操作必须在三级及以上实验室进行。

### 第三节 实验常用病原体致病性及防治

#### 一、葡萄球菌

葡萄球菌 (*Staphylococcus*) 广泛分布于自然界，亦存在于人和

动物体表及与外界相通的腔道中，包括对人类致病的金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、对人类机会致病的表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 及非致病的腐生葡萄球菌 (*Staphylococcus saprophyticus*)。金黄色葡萄球菌是葡萄球菌属的模式种。

### (一) 生物学性状

金黄色葡萄球菌直径约  $1\ \mu\text{m}$ ，球形，革兰氏阳性，呈葡萄串状排列 (图 1-1)。无芽孢、无鞭毛，少数菌株细胞壁外层可见荚膜样黏液物质。需氧或兼性厌氧。营养要求不高。在普通培养基中， $37^\circ\text{C}$  生长良好。在普通营养琼脂上培养 24 h 后，可形成直径约 2 mm，圆形、隆起、表面光滑、湿润、边缘整齐、不透明的金黄色菌落 (图 1-2)。在血琼脂培养基上菌落周围可见完全透明的溶血环。可分解甘露醇产酸。触酶 (过氧化氢酶) 阳性，可与链球菌相区分。

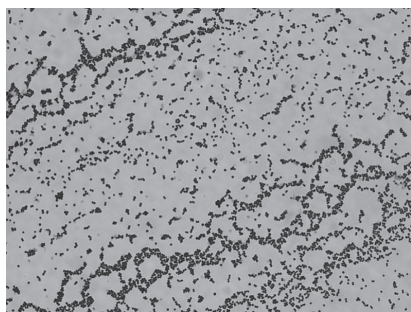


图 1-1 金黄色葡萄球菌显微镜下形态 ( $\times 1000$ )  
(彩色插图见书前插页)

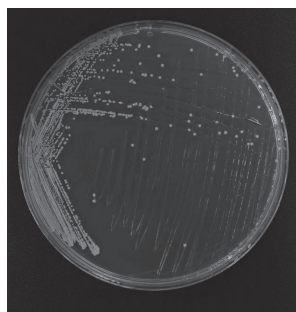


图 1-2 金黄色葡萄球菌菌落形态  
(彩色插图见书前插页)

葡萄球菌抗原种类较多，最主要的是葡萄球菌 A 蛋白、荚膜多糖。90% 以上金黄色葡萄球菌细胞壁表面存在葡萄球菌 A 蛋白。利用葡萄球菌 A 蛋白建立的协同凝集试验被广泛用于多种微生物抗原的检测。宿主体内的大多数金黄色葡萄球菌表面存在荚膜多糖抗原，具有黏附作用。

葡萄球菌对外界理化因素的抵抗力较强。在干燥的脓汁或痰液中可存活 2 ~ 3 个月； $60^\circ\text{C}$  加热 1 h 或  $80^\circ\text{C}$  加热 30 min 才能将其杀灭；耐盐，在含 100 ~ 150 g/L 氯化钠培养基中仍能繁殖。对甲紫等某些染料较敏

感，对青霉素、金霉素、红霉素及庆大霉素高度敏感，对链霉素中度敏感，对磺胺、氯霉素敏感性较差。该菌易产生耐药性，对青霉素 G 的耐药菌株已达 90% 以上，尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA）已经成为医院感染最常见的致病菌之一。

### （二）致病性与免疫性

葡萄球菌中金黄色葡萄球菌毒力最强。致病物质包括表面结构蛋白（如黏附素、荚膜、胞壁肽聚糖及葡萄球菌 A 蛋白等）、侵袭性酶（凝固酶及纤维蛋白溶酶、耐热核酸酶、透明质酸酶、脂酶等）、毒素（细胞溶素、杀白细胞素、表皮剥脱毒素、毒性休克综合征毒素-1、肠毒素等）。多数致病性葡萄球菌均能产生凝固酶，与菌株的毒力关系密切，可作为鉴定致病性葡萄球菌的重要指标。耐热核酸酶由致病性葡萄球菌产生，临床上已将耐热核酸酶作为测定葡萄球菌有无致病性的重要指标之一。约 50% 临床分离的金黄色葡萄球菌可产生肠毒素，刺激呕吐中枢导致以呕吐为主要症状的急性胃肠炎，即食物中毒。

葡萄球菌可引起人类的侵袭性疾病，即化脓性感染。临床表现为脓汁金黄而黏稠、病灶界限清楚、多为局限性。严重者可导致败血症、脓毒血症等。其产生的外毒素还可引起毒素性疾病，包括食物中毒，因摄入被葡萄球菌产生的肠毒素污染的食物后出现急性胃肠炎症状，是夏秋季节常见的胃肠道疾病；烫伤样皮肤综合征，由表皮剥脱毒素引起，多见于婴幼儿和免疫功能低下的成人；毒性休克综合征，由毒性休克综合征毒素-1 引起，可导致突然高热、呕吐、腹泻、弥漫性红疹等症状，严重者可出现心、肾衰竭，甚至休克。

人体对葡萄球菌有一定的天然免疫力。当皮肤黏膜受损，或患有结核、糖尿病、肿瘤等疾病导致机体免疫功能降低时，才会引起感染。患者恢复后，可获得一定的免疫力，但免疫力不强，难以防止再次感染。

### （三）防治原则

预防主要是注意个人卫生，皮肤有化脓性感染者，未治愈前不宜从

事食品制作或饮食服务行业。有皮肤创伤时应及时消毒处理，要注意隔离防止感染传播。正常人鼻咽部的带菌率为 20% ~ 50%，医务人员可高达 70%，要注意避免医源性感染。治疗时应根据药物敏感性试验结果制订治疗策略，防止耐药性产生和扩散。对于反复发作的顽固性疖疮，应采用自身菌苗或类毒素进行人工自动免疫。

## 二、肠道杆菌

肠道杆菌是一大群生物学性状相似的革兰氏阴性杆菌，常寄居于人及动物肠道内，亦存在于土壤、水及腐物中。肠杆菌科细菌种类繁多，根据生化反应、抗原结构、基因组 DNA 序列分析，分为 44 属 170 余种。其中，少数为致病菌，如伤寒沙门菌、志贺菌、鼠疫耶尔森菌等，可引起人类疾病；一部分为机会致病菌，如大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、奇异变形杆菌等，属于正常菌群，但当宿主免疫力降低或细菌异位寄生时，可引起机会性感染。

### （一）埃希菌属

埃希菌属 (*Escherichia*) 最常见、最重要的菌种是大肠埃希菌 (*Escherichia coli*)。大肠埃希菌是肠道中重要的正常菌群，能为宿主提供一些具有营养作用的合成代谢产物；为机会致病菌，可引起肠道外感染；有一些血清型具有致病性，能引起人类胃肠炎；在环境卫生和食品卫生学中，常被用作粪便污染的卫生学检测指标。

#### 1. 生物学性状

大肠埃希菌为革兰氏阴性杆菌，多数菌株有周身鞭毛，有菌毛，无芽胞（图 1-3）。兼性厌氧。对营养要求不高，在普通营养琼脂上 37℃ 培养 24 h 后，形成直径 2 ~ 3 mm 的圆形、凸起、透明的 S 形菌落（图 1-4）。液体培养时呈均匀浑浊生长。能发酵葡萄糖、乳糖等多种糖类，产酸并产气。该菌有 O、H 及 K 三种抗原，可用于血清学分型；能产生大肠菌素，亦可用于分型。



图 1-3 大肠埃希菌显微镜下形态 (×1000)  
(彩色插图见书前插页)

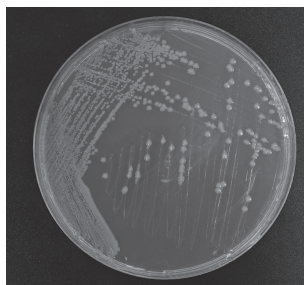


图 1-4 大肠埃希菌菌落形态  
(彩色插图见书前插页)

## 2. 致病性与免疫性

大肠埃希菌的黏附素有利于菌体紧密黏着在宿主细胞上。大肠埃希菌能产生多种类型的外毒素，包括志贺毒素 I 和 II (Stx-1、Stx-2)、耐热肠毒素 a 和 b (Sta、Stb)、不耐热肠毒素 I 和 II (LT- I、LT- II)、溶血素 A 等，在致病过程中起重要作用。

大肠埃希菌一般在肠道内不致病，但如果移行至肠道外的组织或器官则可引起肠外感染。肠道外感染以化脓性感染和泌尿道感染最为常见。化脓性感染如败血症、腹膜炎、阑尾炎、手术创口感染、新生儿脑膜炎；泌尿道感染如尿道炎、膀胱炎、肾盂肾炎常见。大肠埃希菌多来源于患者肠道，可引起内源性感染（新生儿脑膜炎例外）。大肠埃希菌的某些血清型，如肠产毒素型大肠埃希菌、肠侵袭型大肠埃希菌、肠致病型大肠埃希菌、肠出血型大肠埃希菌、肠集聚型大肠埃希菌，可引起人类胃肠炎。

## 3. 防治原则

寄居于肠道中的大肠埃希菌可以不断随粪便排出体外，引起周围环境、水源、饮料及食品的污染。样品中检出的大肠埃希菌越多，表示被粪便污染的程度越严重，也间接表明可能有肠道致病菌污染。因此，卫生细菌学以“大肠菌群数”作为饮水、食品等粪便污染的指标之一。大肠菌群是指在 37℃ 24 h 环境中发酵乳糖产酸产气的肠道杆菌，包括埃希菌属、枸橼酸杆菌属、克雷伯菌属及肠杆菌属等。我国卫生标准 GB 5749—2006 规定，在 100 mL 饮水中不得检出大肠菌群。污染的水和

食品是肠产毒素型大肠埃希菌最重要的传染媒介，肠出血型大肠埃希菌常可污染肉类和未消毒牛奶，充分的烹饪可降低肠产毒素型大肠埃希菌和肠出血型大肠埃希菌感染的危险。

## （二）志贺菌属

志贺菌属 (*Shigella*) 是人类细菌性痢疾的病原菌，俗称痢疾杆菌。细菌性痢疾是一种常见病，主要流行于发展中国家。该属包括痢疾志贺菌、福氏志贺菌、鲍氏志贺菌及宋内志贺菌。

### 1. 生物学性状

志贺菌大小为革兰氏阴性的短小杆菌，有菌毛，无芽孢、鞭毛及荚膜。对营养的要求不高，在普通琼脂平板上培养 24 h，可形成直径约 2 mm、半透明的光滑型菌落。该属中宋内志贺菌常出现扁平的粗糙型菌落。可分解葡萄糖，产酸不产气。除宋内志贺菌个别菌株迟缓发酵乳糖外，均不发酵乳糖。故在 SS 培养基等选择培养基上，呈无色半透明菌落。在克氏双糖管中，斜面不发酵，底层产酸不产气，硫化氢阴性，动力阴性，有别于沙门菌、大肠埃希菌等。该属细菌有 O 和 K 两种抗原。O 抗原包括群特异抗原和型特异抗原，可作为分类的依据，将该属分为 4 群和 40 余血清型（包括亚型）。

志贺菌抵抗力较其他肠道杆菌弱，60℃加热 10 min 可将其杀灭。对酸和一般消毒剂敏感。在粪便中，由于其他肠道菌产酸或噬菌体的作用常使该菌在数小时内死亡，故粪便标本采集后应立即送检。在污染物品、瓜果、蔬菜上，该菌可存活 10 ~ 20 天。在适宜温度下，可在水和食品中繁殖，引起水源或食物型的暴发流行。由于磺胺和抗生素的广泛应用，志贺菌的多重耐药现象日趋严重，即使在边远地区分离的菌株也对常见 4 ~ 8 种药物耐药，极大地影响临床疗效。

### 2. 致病性与免疫性

志贺菌主要侵袭回肠末端和结肠部位的黏膜上皮细胞。该菌先黏附并侵入位于派伊尔淋巴结的 M 细胞，再通过 III 型分泌系统向上皮细胞和巨噬细胞分泌 IpaA、IpaB、IpaC 及 IpaD 四种蛋白，进而诱导细胞膜凹陷，

发生细菌的内吞。志贺菌能溶解吞噬小泡，进入细胞质内生长繁殖，并通过宿主细胞内的肌动纤维重排，推动细菌进入毗邻细胞，实现细菌的传播。细菌逃避了宿主免疫系统的清除作用，从而保护自身，并通过诱导细胞程序性死亡从吞噬中得以存活。在此过程中，引起白细胞介素- $1\beta$ 的释放，招募多形核白细胞抵达感染组织，致使肠壁完整性遭到破坏，细菌进一步侵入较深层的部位，加速了细菌的扩散。坏死的黏膜、死亡的白细胞、细胞碎片、纤维蛋白及血液共同构成了脓血黏液便。

志贺菌均具有强烈的内毒素。内毒素作用于肠黏膜，使其通透性增高，促进对内毒素的吸收，引起发热、意识障碍，甚至中毒性休克等症状；亦可破坏肠黏膜，促进炎症、溃疡、坏死及出血；还可作用于肠壁植物神经系统，使肠功能发生紊乱，肠蠕动失调和痉挛，出现腹痛、里急后重等症状。志贺菌还可产生外毒素，即志贺毒素，与肠出血型大肠埃希菌产生的毒素相同，可损伤上皮细胞。

志贺菌引起的细菌性痢疾传染源是患者和带菌者。急性期患者排菌量大，传染性强；慢性感染患者排菌时间长，可长期储存病原体；恢复期患者带菌可达2~3周，甚至数月。该病主要通过粪-口途径传播，志贺菌可通过饮食进入肠道。痢疾志贺菌感染患者病情较重，易引起小儿急性中毒性菌痢、溶血性尿毒综合征及痢疾的流行；宋内志贺菌多引起轻型感染；福氏志贺菌感染易转变为慢性，病程迁延。我国较为常见的是福氏志贺菌和宋内志贺菌的流行。

志贺菌感染有急性和慢性两种。典型的急性细菌性痢疾经过1~3天的潜伏期后，突然发病，出现发热、腹痛及水样腹泻，约1天，腹泻次数增多至10余次，并由水样腹泻转变为脓血黏液便，伴有里急后重、下腹部疼痛等症状。50%以上的患者在5天内，发热和腹泻可自发消退。若治疗及时，预后良好。但在体弱儿童和老年人，水分和电解质的丧失，可导致失水、酸中毒，部分病例还可引起溶血性尿毒综合征，甚至死亡。痢疾志贺菌引起的细菌性痢疾最为严重，死亡率可达20%。

志贺菌感染恢复后，多数患者血液中可产生循环抗体，但该抗体无

保护作用。抗感染免疫主要是消化道黏膜表面的分泌型免疫球蛋白 A。病后免疫期较短暂，也不巩固。

### 3. 防治原则

细菌性痢疾的预防应注意预防和控制人类的感染和传播，开展水、食物、牛奶等的卫生学监测，处理垃圾及灭蝇；隔离患者、消毒排泄物；检测发现亚临床病例和带菌者，特别是饮食从业人员监测；抗生素治疗感染个体。

### （三）沙门菌属

沙门菌属 (*Salmonella*) 是一群寄生在人类和动物肠道中，生化反应和抗原结构相关的革兰氏阴性杆菌。沙门菌属的血清型已达 2500 多种。根据 DNA 同源性，将该属分两个种，即肠道沙门菌 (*Salmonella enterica*) 和邦戈沙门菌 (*Salmonella bongori*)。该属中少数血清型如伤寒沙门菌、甲型副伤寒沙门菌、肖氏沙门菌及希氏沙门菌为人类的致病菌，可引起肠热症。绝大多数血清型宿主范围广泛，其中部分沙门菌是人兽共患病的病原菌，可引起人类食物中毒或败血症；动物感染大多无症状或为自限性胃肠炎。

#### 1. 生物学性状

沙门菌为革兰氏阴性杆菌，有菌毛，有周身鞭毛，无芽孢，一般无荚膜。为兼性厌氧菌，对营养的要求不高，在普通琼脂平板上可生长，在 SS 选择鉴别培养基上可形成中等大小、无色、半透明的光滑型菌落。不发酵乳糖或蔗糖。对葡萄糖、麦芽糖及甘露糖发酵，除伤寒沙门菌产酸不产气外，其他沙门菌均产酸产气。沙门菌在克氏双糖管中，斜面不发酵、底层产酸产气（但伤寒沙门菌产酸不产气），硫化氢阳性或阴性，动力阳性，可与大肠埃希菌、志贺菌等区别。在此基础上，利用尿素酶试验可与变形杆菌相区别。沙门菌主要有 O 和 H 两种抗原，少数菌株有一种表面抗原，功能上与大肠埃希菌的 K 抗原相似，称为 Vi 抗原。

沙门菌对理化因素的抵抗力较差，65℃加热 15 ~ 30 min 即可将其杀灭。对一般消毒剂敏感，但对某些化学物质如胆盐、煌绿等的耐受性

较其他肠道菌强，故可将其作为沙门菌选择培养基的成分。在水中能存活 2 ~ 3 周，粪便中可存活 1 ~ 2 个月，在冰中可存活更长时间。

## 2. 致病性与免疫性

沙门菌感染必须经口进入足够量的细菌，才能克服肠道正常菌群和胃酸的作用、局部肠道免疫等机体防护屏障，进一步到达并定植于小肠，引起疾病的产生。沙门菌是胞内寄生菌。当沙门菌被摄入并通过胃后，通过其种特异性菌毛与宿主小肠末端位于派伊尔淋巴结的 M 细胞结合，接着 III 型分泌系统沙门菌致病性岛 I 向 M 细胞中输入沙门菌分泌的侵袭蛋白，引发宿主细胞内肌动纤维的重排，诱导细胞膜内陷，导致细菌内吞的发生。沙门菌在吞噬小泡内生长繁殖，使宿主细胞死亡，细菌进一步扩散并进入毗邻细胞淋巴组织。该菌还具有有一种耐酸应答基因，使其在胃和吞噬体的酸性环境中得到保护。氧化酶、超氧化物歧化酶亦可保护细菌不被胞内杀菌物质杀伤。伤寒沙门菌和希氏沙门菌在宿主体内可以形成 Vi 抗原，具有微荚膜功能，能抗御吞噬细胞的吞噬和杀伤，阻止抗体、补体等破坏菌体。

沙门菌有较强的内毒素，可引起宿主体温升高、白细胞下降，剂量大时可导致中毒症状和休克，与内毒素激活补体替代途径产生 C3a、C5a 等及诱发免疫细胞分泌白细胞介素 -1、 $\gamma$  干扰素、肿瘤坏死因子 - $\alpha$  等细胞因子有关。鼠伤寒沙门菌等个别沙门菌可产生肠毒素，性质类似肠产毒素型大肠埃希菌产生的肠毒素。

沙门菌病传染源为患者和带菌者（恢复期带菌者和健康带菌者）。食入被含菌粪便污染的水源或污染水体中的贝壳类生物是造成暴发流行的主要原因。带菌动物在其组织（肉）、排泄物、奶、蛋中均有细菌存在。因此，来自感染动物、被污染或消毒不当的奶和奶制品、肉和肉类制品、冷藏蛋类等均可引起沙门菌病。含有抗生素的动物饲料的增多，使耐药的沙门菌菌株增加，给人类带来了更大的潜在性危害。

人类沙门菌病包括肠热症、胃肠炎及败血症。肠热症包括伤寒沙门菌引起的伤寒，及甲型副伤寒沙门菌、肖氏沙门菌、希氏沙门菌引起的

副伤寒。伤寒和副伤寒的致病机制和临床症状基本相似，副伤寒病情较轻，病程较短。当沙门菌被摄入并通过胃后，细菌经 M 细胞被吞噬细胞吞噬，部分细菌经淋巴液到达肠系膜淋巴结大量繁殖，经胸导管进入血流引起第 1 次菌血症，而后随血流进入肝、脾、肾、胆囊等器官。患者出现发热、不适、全身疼痛等前驱症状。从病原菌经口进入人体到疾病发作的时间与感染剂量有关，短则 3 天，长则 50 天，通常潜伏期为 2 周。病原菌在上述器官繁殖后，再次入血造成第 2 次菌血症。在未经治疗的病例，该时段症状较明显，体温呈阶梯式上升，持续 1 周，随后高热（39 ~ 40℃）持续 7 ~ 10 天，并出现缓脉、肝脾大、全身中毒症状及皮肤玫瑰疹，外周白细胞明显下降。胆囊中的病原菌随胆汁进入肠道，一部分随粪便排出体外，另一部分再次侵入肠壁淋巴组织，使已致敏的组织发生超敏反应，导致局部坏死和溃疡，严重者出现出血或肠穿孔等并发症。肾脏中的病原菌随尿液排出。以上症状在疾病第 2 ~ 3 周出现，若无并发症，第 3 ~ 4 周后病情开始好转。5% ~ 10% 未经治疗的患者可出现复发，病程一般较短，病情较轻。未经治疗的典型伤寒病死率约为 20%。

胃肠炎，即食物中毒，是最常见的沙门菌病，约占 70%。由于摄入大量被鼠伤寒沙门菌、猪霍乱沙门菌、肠炎沙门菌等污染的畜禽肉类、蛋类、奶和奶制品等食品引起。该病潜伏期为 6 ~ 24 h。起病急，主要表现为发热、恶寒、呕吐、腹痛、水样腹泻，偶有黏液或脓腹泻。严重者迅速脱水，导致休克、肾衰竭而死亡，病死率达 2%，多见于老年人、婴儿和体弱者。一般沙门菌胃肠炎多在 2 ~ 3 天自愈。

沙门菌引起的败血症以猪霍乱沙门菌、希氏沙门菌、鼠伤寒沙门菌、肠炎沙门菌等较为常见。患者多为儿童和免疫力低下的成人。经口感染后，病原菌进入血液循环，症状严重，表现有高热、寒战、厌食、贫血等，肠道症状较少见。约 10% 的患者，因细菌的血流播散，出现局部化脓性感染，如脑膜炎、骨髓炎、胆囊炎、心内膜炎、关节炎等。

有 1% ~ 5% 的伤寒或副伤寒患者，在症状消失后 1 年仍可在其粪便中检出相应的沙门菌，转变为无症状（健康）带菌者。无症状带菌者

体内的病原菌存在于胆囊或尿道中，成为重要传染源。

肠热症病后可获得一定程度的免疫性。恢复后 2 ~ 3 周有复发的情况存在，但比首次感染症状轻。沙门菌侵入机体后，主要在细胞内生长繁殖，要彻底杀灭这类胞内寄生菌，特异性细胞免疫起主要防御作用。沙门菌存在于血流或细胞外时，特异性体液抗体也有辅助杀菌作用。胃肠炎的恢复与肠道局部生成分泌型免疫球蛋白 A 有关。

### 3. 防治原则

做好水源和食品卫生管理，防止被含有沙门菌的粪便污染。感染动物的肉类、蛋、奶等制品要彻底烹饪。及时发现、确诊及治疗带菌者。带菌期间不可从事食品行业工作，并严格遵循卫生注意事项。伤寒、副伤寒的免疫预防，过去一直沿用皮下接种死疫苗。伤寒 Vi 荚膜多糖疫苗为新一代疫苗，具有一定的保护力，免疫持久，安全性较高。肠热症的治疗早期使用氯霉素，近年多重耐药菌株逐渐出现，目前使用的有效药物主要是环丙沙星。

## 三、念珠菌

念珠菌属 (*Candida*) 广泛存在于自然环境中，有 81 种，其中 10 余种可引起感染。白念珠菌 (*Candida albicans*) 是临床上最常见的机会致病菌，可引起皮肤、黏膜、内脏的急慢性感染，称为念珠菌病。

### (一) 生物学性状

白念珠菌为单细胞真菌，菌体圆形或卵圆形，革兰氏阳性，以芽生方式繁殖 (图 1-5)。在感染组织内易形成芽生孢子及假菌丝。在血琼脂及沙氏琼脂培养基上生长良好。37℃ 培养 2 ~ 3 天，出现灰白或奶油色、表面光滑湿润、带有浓厚酵母气味的类酵母型菌落 (图 1-6)。血琼脂 37℃ 培养 10 天，可形成中等大小暗灰色菌落。在含 1% 吐温 -80 的玉米琼脂培养基上可形成丰富的藕节状假菌丝，在假菌丝的顶端、中间或侧缘可产生较大、厚壁、圆形或梨形的厚膜孢子，是其鉴别特征之一。

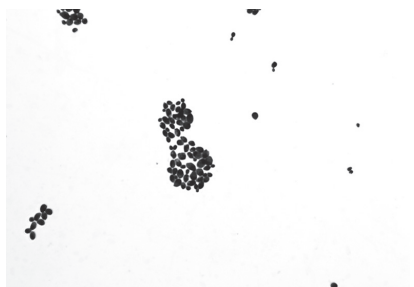


图 1-5 白念珠菌显微镜下形态 (×1000)  
(彩色插图见书前插页)

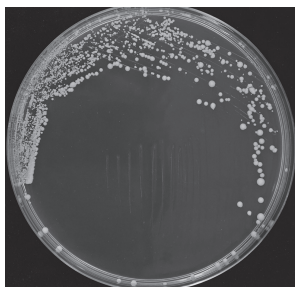


图 1-6 白念珠菌菌落形态  
(彩色插图见书前插页)

## (二) 致病性与免疫性

白念珠菌是人体的正常菌群，通常存在于人的皮肤、口腔、上呼吸道、阴道、泌尿道及肠道黏膜，当机体出现菌群失调或免疫力降低时，可引起机会性感染，多为内源性感染。皮肤感染好发于皮肤潮湿、皱褶部位，可引起湿疹样皮肤念珠菌病、肛周瘙痒症、肛周湿疹、指间糜烂症等，易与湿疹混淆。黏膜感染可引起鹅口疮、口角糜烂、外阴与阴道炎等，以鹅口疮最常见。内脏感染包括肺炎、支气管炎、肠炎、膀胱炎、肾盂肾炎等，偶可引起败血症。中枢神经系统感染包括脑膜炎、脑膜脑炎、脑脓肿等，多由原发病灶转移而来。

## (三) 防治原则

目前对念珠菌病的高危人群尚未建立有效的预防措施。对于易感人群应注意加强自身免疫功能。治疗白念珠菌感染常用氟康唑，对耐药菌株可选择伊曲康唑或棘白菌素类药物治疗。

## 四、流行性感冒病毒

流行性感冒病毒 (influenza virus) 属于正黏病毒，是对人或某些动物细胞表面的黏蛋白有亲和性、有包膜、具有分节段 RNA 基因组的一类病毒，包括人流行性感冒病毒和动物流行性感冒病毒。人流行性感冒病毒是人流行性感冒的病原体，分为甲 (A)、乙 (B)、丙 (C) 3 型；其中甲型流行性感冒病毒抗原性易发生变异，多次引起世界性大流行。

### （一）生物学性状

流行性感冒病毒一般为球形。病毒体结构主要包括病毒核酸和由蛋白质组成的核衣壳和包膜。核衣壳位于病毒体的核心，呈螺旋对称排列，由病毒的单负链分节段 RNA 与 1 个或几个包含 PB1、PB2 和 PA 的 RNA 依赖 RNA 聚合酶复合体结合，被核蛋白覆盖，共同形成核糖核蛋白。包膜由内层基质蛋白和外层脂蛋白组成，具有维持病毒外形和完整性等作用。包膜上镶嵌有两种刺突，即血凝素和神经氨酸酶。两者的抗原结构不稳定，易发生变异，是划分甲型流行性感冒病毒亚型的主要依据。

根据核蛋白和内层基质蛋白的抗原性不同，流行性感冒病毒被分为甲、乙、丙 3 型。根据病毒表面血凝素和神经氨酸酶抗原性的不同，甲型流行性感冒病毒又分为若干亚型。流行性感冒病毒易发生抗原性变异、温度敏感性变异等。抗原性变异是流行性感冒病毒变异的主要形式，包括抗原性转变和抗原性漂移两种形式。

流行性感冒病毒能在鸡胚羊膜腔和尿囊腔中增殖，可用红细胞凝集试验检出病毒。在细胞培养（人羊膜、猴肾、狗肾、鸡胚等细胞）中可以增殖，但不引起明显的致细胞病变。在小鼠中连续传代可提高毒力，引起小鼠肺部广泛性病变或死亡。

流行性感冒病毒抵抗力较弱，不耐热，56℃加热 30 min 即可灭活；室温下病毒的传染性很快丧失，在 0 ~ 4℃可存活数周。对干燥、日光、紫外线及乙醚、甲醛等化学药物敏感。

### （二）致病性与免疫性

流行性感冒病毒是引起流行性感冒的主要病毒。通常引起呼吸道局部感染，不引起病毒血症；多呈季节性广泛流行，北方以冬季为主，南方四季均可发生。传染源主要是患者，其次为隐性感染者，感染动物亦可传染人；主要传染途径是飞沫、气溶胶通过呼吸道在人间传播。人群普遍易感，潜伏期一般为 1 ~ 4 天，取决于侵入的病毒量和机体的免疫状态。

病毒感染呼吸道上皮细胞后，可迅速产生子代病毒，扩散和感染邻近细胞，引起广泛的细胞空泡变性。患者出现畏寒、发热、头痛、浑身

酸痛、咳嗽、鼻塞、流涕等症状。流行性感冒发病率高，病死率低，死亡病例多见于有细菌性感染等并发症的婴幼儿、老年人等。

流行性感冒病毒感染或疫苗接种后，机体可形成特异性免疫应答。呼吸道黏膜局部分泌的分泌型免疫球蛋白 A 抗体可阻止病毒黏附。血清中抗血凝素特异性抗体为中和抗体，有抗病毒感染、减轻病情的作用，可持续存在数月至数年。流行性感冒病毒特异性 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞可辅助 B 淋巴细胞产生特异性抗体，CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞可通过直接作用和溶解病毒感染细胞，参与病毒的清除与疾病的恢复。

### （三）防治原则

日常要加强锻炼，流行期间应避免到人群聚集的公共场所，戴口罩、必要的空气消毒等可在一定程度上预防流行性感冒的发生。流行性感冒的治疗以对症治疗和预防继发性细菌感染为主。金刚烷胺可抑制甲型流行性感冒病毒的穿入与脱壳过程，奥司他韦可以选择性抑制甲型流行性感冒病毒的神经氨酸酶活性。

病原生物学实验室是进行科学研究、疾病诊断与预防的重要场所，其日常运作依赖于一系列精心选择的试剂。这些试剂在样本处理、微生物培养、检测鉴定及结果分析等各个环节中发挥着关键作用。以下简要介绍病原生物学实验室中常用的八大类试剂。

#### 1. 消毒灭菌试剂

（1）乙醇（俗称酒精）：常用浓度为 70% ~ 75%，可有效杀灭多数细菌和病毒，作为实验室常用的表面消毒剂。

（2）次氯酸钠：强氧化剂，被广泛用于环境、设备和器皿的消毒。

（3）过氧化氢：高效消毒剂，常用于生物安全柜内和实验室空间的消毒。

（4）紫外线灯：虽然不是传统意义上的试剂，但作为物理消毒方法，在实验室中常用于空气和物体表面的消毒。

#### 2. 染色剂与脱色剂

（1）革兰氏染液：包括结晶紫、碘液、乙醇和番红等，用于细菌革

兰氏染色法的鉴别。

(2) 吉姆萨染液：用于细胞、血液及微生物的染色，尤其适用于显示细胞质颗粒和寄生虫。

(3) 酸性品红：常用于结核分枝杆菌等微生物的染色。

(4) 脱色剂（如乙醇）：在染色过程中用于去除多余的染料，以突出特定结构或微生物的染色效果。

### 3. 培养基与添加剂

(1) 营养琼脂：基础培养基，适用于多种微生物的生长。

(2) 血琼脂：添加血液的琼脂培养基，用于需氧和兼性厌氧菌的培养。

(3) 选择性培养基（如麦康凯琼脂、伊红美蓝琼脂）：添加特定抑制剂的培养基，用于分离特定类型的微生物。

(4) 培养基添加剂（如抗生素、生长因子）：用于改善培养基的营养成分或抑制非目标微生物的生长。

### 4. 鉴定与分型试剂

(1) 生化鉴定试剂盒：包含一系列生化反应试剂，用于微生物的代谢途径鉴定。

(2) 分型血清：用于病毒、细菌等病原体的血清学分型。

(3) 聚合酶链反应引物与探针：特定设计的核苷酸序列，用于分子生物学检测中的目标基因扩增和检测。

### 5. 分子生物学试剂

(1) 聚合酶链反应试剂套装：包括 DNA 聚合酶、dNTPs、引物、缓冲液等，用于聚合酶链反应扩增反应。

(2) DNA/RNA 提取试剂盒：用于从样本中提取高质量的核酸，为后续分子生物学实验提供基础。

(3) 限制性内切酶与 DNA 连接酶：在基因克隆和重组实验中起关键作用。

#### 6. 血清学与免疫学试剂

(1) 抗体（如单克隆抗体、多克隆抗体）：用于抗原-抗体反应，用于诊断、检测和定位病原体。

(2) 抗原：用于刺激机体产生免疫反应的物质，常用于血清学检测和疫苗制备。

(3) 酶联免疫吸附试验试剂盒：基于酶联免疫吸附反应的试剂盒，用于检测样本中的特定抗体或抗原。

#### 7. 生化检测试剂

(1) 酶类检测试剂（如葡萄糖氧化酶、乳酸脱氢酶等）：用于检测样本中的酶活性，反映微生物代谢状态或疾病标志物。

(2) 底物与显色剂：在生化检测中，用于与酶反应并产生可检测信号的化学物质。

#### 8. 显微镜观察用试剂

(1) 封片剂（如甘油明胶）：用于固定和保护显微镜载玻片上的样本，防止其干燥和脱落。

(2) 染色剂（如荧光染料）：用于活细胞或组织的荧光标记，增强显微镜下的观察效果。

(3) 缓冲液：在制备显微镜样本时，用于调节 pH，维持细胞的正常形态和活性。

(4) 二甲苯：用于擦拭显微镜镜头和载玻片上的油渍。

## 第四节 病原微生物相关实验方法

### 一、细菌培养

#### (一) 准备阶段

##### 1. 配制培养基

细菌培养的第一步是配制含有充足营养物质的培养基。常用的培养

基成分包括牛肉汤、蛋白胨、氯化钠、葡萄糖等，根据培养细菌的种类和需求，可能还需要添加特定的营养物质。对于特定细菌，如光合细菌，还需根据海洋或淡水环境选择合适的培养基配方。

### 2. 灭菌处理

配制好的培养基及所有培养用具需进行高温灭菌处理，以杀灭杂菌，避免对实验结果的干扰。一般使用高压蒸汽灭菌锅进行灭菌，或使用煮沸法消毒小型培养基。

### 3. 无菌器具准备

确保所有用于采集、处理和培养的器具均为无菌状态，如无菌杯、无菌试管、无菌针管等。

## （二）采集样本

### 1. 标本采集

根据实验目的选择合适的标本类型，如血、尿、便、脓液、分泌物等。采集过程中需严格遵守无菌操作原则，避免污染。例如，血液标本采集应在患者接受抗生素治疗前进行，尿液标本则需保证在膀胱内停留时间足够长，以减少正常菌群的污染。

### 2. 标本保存与运输

采集后的标本应尽快送至实验室进行培养，运输过程中需保持适当的温度和湿度，避免样本变质或污染。

### 3. 样本处理

（1）样本预处理：根据样本类型进行预处理，如去除咽部分泌物、清洗尿道口等，以减少正常菌群的干扰。

（2）接种：将处理后的样本接种到培养基上，注意接种量要适中，以免影响培养效果。接种后轻轻摇匀培养基，使样本均匀分布。

### 4. 培养条件设定

（1）温度：根据细菌种类设置合适的培养温度。一般病原菌在37℃下培养，而特殊细菌如嗜冷菌和嗜热菌则需设定不同的温度。

（2）酸碱度：调节培养基的pH至细菌生长的最适范围。多数病原

菌最适 pH 为中性或弱碱性，但个别细菌对 pH 有特殊要求。

(3) 气体环境：根据细菌对氧气的需求设置培养环境。有氧细菌在通气条件下培养，厌氧细菌则需在无氧环境中培养。

#### 5. 无菌操作

整个培养过程必须严格按照无菌操作要求进行，包括穿戴无菌衣帽、手套，使用无菌器具，以及在操作过程中避免污染。

#### 6. 观察记录

(1) 生长情况观察：定期观察培养基上细菌的生长情况，记录颜色变化、菌落形态等。对于特殊细菌，如光合细菌，还需观察其对光照的反应。

(2) 测定和调整：根据需要测定培养基的酸碱度，及时调整以保持在最适范围。同时，注意观察培养基中是否有污染现象。

#### 7. 鉴定与结果分析

(1) 形态鉴定：对培养出的细菌进行形态学鉴定，包括菌落形态、菌体形态等。

(2) 生化及血清学反应：进一步进行生化反应和血清学反应鉴定，以确定细菌种类和性质。

(3) 结果分析：结合临床情况对培养结果进行解释和分析，为疾病诊断和治疗提供依据。

#### 8. 注意事项

(1) 严格遵守无菌操作：无菌操作是细菌培养成功的关键，必须始终贯穿整个培养过程。

(2) 标本采集和处理规范：确保标本采集和处理的规范性和准确性，以提高培养结果的可靠性。

(3) 培养条件控制：准确控制培养条件，包括温度、pH 和气体环境等，以满足细菌生长的需求。

(4) 定期观察和记录：定期观察和记录细菌的生长情况，及时发现问题并采取相应的处理措施。

(5) 注意安全：在操作过程中注意个人安全防护，避免细菌污染和