

上海普通高校“九五”重点教材

现代病原学检验与临床实践

主编 倪语星 洪秀华 姜昌斌



上海科学技术文献出版社

109951

上海普通高校“九五”重点教材

现代病原学检验与临床实践

主编 倪语星 洪秀华 姜昌斌

上海科学技术文献出版社

责任编辑：蔡 平

封面设计：石亦义

ZW22/13

上海普通高校“九五”重点教材

现代病原学检验与临床实践

主编 倪语星 洪秀华 姜昌斌

*

上海科学技术文献出版社出版发行

(上海市武康路2号 邮政编码 200031)

全国新华书店经销

上海教育学院印刷厂印刷

*

开本 787×1092 1/16 印张 20.25 字数 505 000

1999年8月第1版 1999年8月第1次印刷

印数：1-3 100

ISBN 7-5439-1304-6/R·353

定 价：32.00 元

《科技新书目》481-594

《现代检验医学与临床实践》编委会

主 编

王鸿利 朱明德 赵月林

主 审

陶义训 罗邦尧

编 委 (以姓氏笔画为序)

王鸿利	丛玉隆	许以平	朱明德	巫向前
李定国	陈赛娟	沈 霞	金大鸣	罗邦尧
郑 捷	赵月林	洪秀华	姚 建	姜昌斌
胡晓波	胡翊群	陶义训	倪语星	熊立凡
熊树民	樊绮诗			

第 三 分 册

《现代病原学检验与临床实践》

主 编

倪语星 洪秀华 姜昌斌

编写者 (以姓氏笔画为序)

毛玲娥	王志军	王慕娣	叶元康	刘 伟	汤耀卿
华红一	张欣欣	张伟滨	陆志檬	陈雪华	何礼贤
项明洁	金根娣	陆 萍	胡必杰	洪秀华	徐大刚
袁 明	袁卫如	涂少华	倪语星	蒋 斌	姜昌斌
韩立中	韩永年	雷若庆	蔡 倩	廖镇江	潘 萌

前 言

《现代病原学检验与临床实践》是《现代检验医学与临床实践》系列丛书的第三分册(整套系列丛书共有六个分册)。

随着基础医学和临床医学的飞速发展,检验医学也有了很大的进展。现代病原学检验引进了免疫学、分子生物学和计算机数码信息技术等现代技术,使传统的病原学检验向快速、准确、微量、自动化和电脑化的方向发展。现代病原学检验在感染性疾病的明确诊断上、指导合理的抗菌治疗和医院感染的病原体及其耐药性的监测方面起着非常重要的作用。

本书以病原学检验为主线,赋以全书“现代”概念。在基础理论、检验项目和临床实践中突出了新的概念和观点,并综合了国内外专家对各种检验方法在病原学诊断中所起作用的评价,供读者参考。本书以全面、系统、新颖和实用为特点,是现代检验医学与基础医学同临床医学有机结合成为一个整体的新型教学参考书。

本分册共分七章,在内容上涉及各系统常见的细菌、病毒、螺旋体、支原体、衣原体、立克次体、真菌等病原微生物和寄生虫引起的感染性疾病,详述了每种疾病的病因和检验方法,并将病原学检验与临床实践密切结合。且联系当前这一领域中的热点和难点问题,增加了医院感染、细菌耐药性监测和抗生素合理使用等内容,力求全面、深入地反映现代感染性疾病的病原学特点和最新动态。

作者们希望本书的出版能够为推动我国高等医药院校检验医学和临床医学的发展起一点促进作用。衷心期望使用本书的师生、临床各科医师、检验医师和科研人员对本书的内容、形式等各方面提出宝贵意见,以弥补因时间仓促、考虑不周或文字欠佳等不足之处,从而使本书更加符合现代医学和医学教育发展的需要。

编者
1999年4月

目 录

第一章 细菌感染性疾病检验与临床实践	(1)
第一节 概述	(1)
第二节 细菌的耐药性监测	(3)
第三节 医院感染	(11)
第四节 结核病	(22)
第五节 肺炎和支气管炎	(33)
第六节 肺脓肿和脓胸	(41)
第七节 败血症	(45)
第八节 感染性心内膜炎	(49)
第九节 流行性脑脊髓膜炎	(51)
第十节 感染性腹泻和细菌性食物中毒	(54)
第十一节 肠热症	(59)
第十二节 腹腔内感染	(64)
第十三节 性传播疾病	(70)
第十四节 泌尿道感染	(75)
第十五节 前列腺炎和前列腺脓肿	(79)
第十六节 女性生殖系统感染	(82)
第十七节 灼伤感染	(86)
第十八节 骨和关节感染	(91)
第十九节 创伤和术后感染	(98)
第二十节 移植后感染	(106)
第二章 病毒感染性疾病检验与临床实践	(116)
第一节 概述	(116)
第二节 流行性乙型脑炎	(118)
第三节 中枢神经系统慢病毒感染	(124)
第四节 肠道病毒感染	(131)
一、柯萨奇病毒和埃柯病毒感染	(132)
二、脊髓灰质炎	(138)
第五节 病毒性肝炎	(140)
一、甲型肝炎	(140)
二、乙型肝炎	(143)
三、丙型肝炎	(149)
四、丁型肝炎	(153)
五、戊型肝炎	(154)

六、庚型肝炎	(155)
第六节 肾综合征出血热	(156)
第七节 疱疹病毒感染	(162)
一、单纯疱疹病毒感染	(163)
二、水痘-带状疱疹病毒感染	(166)
三、Epstein - Barr 病毒感染	(169)
四、巨细胞病毒感染	(172)
第三章 真菌感染性疾病检验与临床实践	(177)
第一节 概述	(177)
第二节 浅部真菌感染	(179)
第三节 念珠菌病	(186)
第四节 新型隐球菌病	(191)
第五节 毛霉菌病	(196)
第六节 孢子丝菌病	(197)
第七节 着色真菌病	(201)
第四章 支原体感染性疾病检验与临床实践	(204)
第一节 概述	(204)
第二节 呼吸道支原体病	(206)
第三节 泌尿生殖道支原体病	(210)
第四节 其他人类支原体疾病	(212)
第五章 螺旋体感染性疾病检验与临床实践	(216)
第一节 概述	(216)
第二节 梅毒	(219)
第三节 钩端螺旋体病	(224)
第四节 莱姆病	(229)
第五节 回归热	(232)
第六章 立克次体、衣原体及放线菌感染性疾病检验与临床实践	(236)
第一节 概述	(236)
一、立克次体	(236)
二、衣原体	(238)
三、放线菌	(240)
第二节 立克次体感染	(241)
一、流行性斑疹伤寒	(241)
二、地方性斑疹伤寒	(243)
三、恙虫病	(245)
四、Q 热	(246)
第三节 衣原体感染	(248)
一、沙眼衣原体	(248)
二、肺炎衣原体	(250)

三、鸚鵡热衣原体	(251)
第四节 放线菌感染	(252)
第七章 寄生虫感染性疾病检验与临床实践	(257)
第一节 概述	(257)
第二节 腔道内原虫病	(259)
一、贾第鞭毛虫病	(259)
二、阿米巴病	(262)
三、隐孢子虫病	(267)
四、肺囊虫病	(269)
第三节 组织内原虫病	(272)
一、黑热病	(272)
二、疟疾	(275)
三、弓形虫病	(281)
第四节 蠕虫病	(285)
一、血吸虫病	(285)
二、带绦虫病和囊虫病	(289)
三、棘球绦虫病	(292)
四、丝虫病	(295)
附录 常用英汉缩略语词汇	(300)
索引	(305)

第一章 细菌感染性疾病检验与临床实践

第一节 概 述

病原性细菌在人体内或体表生长繁殖,能产生毒素等致病因子,刺激机体出现体液或细胞免疫反应(炎症反应),导致组织损伤和器官功能障碍并出现明显的临床症状,称为细菌感染性疾病。

(一) 细菌的结构与功能

细菌是一类具有细胞壁的单细胞微生物。具有以下基本特点:① 个体微小,以微米为测量单位,必须在显微镜下放大 900~1 000 倍才能看清;② 结构简单,无成形的细胞核,无核膜及核仁,在分类上属原核生物界;③ 有相对固定的外形,有球菌、杆菌、弧菌和螺菌 4 种形态。

细菌的基本结构包括以肽聚糖为基本骨架的细胞壁、脂质双层结构的细胞膜、胶状的细胞质,内含由双股 DNA 组成的核质(染色体)、染色体外的闭环 DNA(质粒)、核蛋白体和胞质颗粒。

细胞壁维持细菌的固有外形并和染色性有关,与细胞膜一起参与细胞内外的物质交换。革兰阴性菌细胞壁中的脂多糖是内毒素的主要成分,与致病性有关。细胞膜的主要功能有物质转运、分泌、呼吸和生物合成等作用。细胞质是细菌新陈代谢的重要场所,其中的核蛋白体是蛋白质合成的场所;质粒控制着细菌耐药性和毒素形成等特定的遗传性状;而细胞质中的内含颗粒是细菌营养和能量的储存场所。细胞核是细菌的遗传物质,能控制细菌的遗传、变异和分裂增殖等重要的遗传性状。

某些细菌具有一些并非为细菌生命活动必不可少的特殊结构,包括荚膜、鞭毛、菌毛和芽胞。

荚膜能保护细菌,抵抗吞噬细胞的吞噬和消化,增加细菌的侵袭力;鞭毛是细菌的运动器官,某些细菌的鞭毛与细菌的粘附性有关;荚膜和鞭毛的形态及抗原性均有助于细菌的鉴别与分型。菌毛有两种,普通菌毛有助于细菌的粘附和定植,同细菌的侵袭力和致病性有关;性菌毛是细菌以接合方式传递遗传物质(质粒)的通道。芽胞对热、干燥、辐射和化学消毒剂等理化因素具有强大的抵抗力,某些细菌形成芽胞后其传染性可保持多年,临床上可将能否杀死芽胞作为判断灭菌效果的指标,芽胞的形态亦有助于细菌的鉴别。

(二) 细菌的致病性

种类繁多的细菌均能引起人类的感染性疾病。每一种细菌引起疾病的可能性(致病性)取决于它的毒力、数量和侵入门户、机体的免疫状态和宿主对感染反应的程度等多种因素的相互作用。

细菌的毒力因素(致病物质)包括细菌的表面结构(菌毛、荚膜等)及其产生的某些有害代谢产物(毒素、毒性蛋白质和酶),其作用包括接近宿主、粘附和定植于宿主表面、侵入组织、引起炎症、中毒和明显的临床症状,或由于细菌抗原引发机体病理性免疫反应导致组织损伤。

细菌粘附于宿主细胞是其发挥致病作用的第一步。粘附首先需要粘附素(菌毛等)与粘附素的受体结合。细菌粘附于宿主一定部位的上皮细胞后能够生存下来并继续生长繁殖称为定植。只有已经定植的细菌才有可能继续侵入机体致病或传播给他人。细菌定植后,少数能在定植表面致病,而多数侵入组织进一步增殖,产生毒素等致病因子,刺激机体出现体液或细胞免疫反应(炎症反应),导致组织损伤和器官功能障碍并出现明显的临床症状。

细菌的毒性代谢产物包括内、外毒素、细菌释放的毒性蛋白质和酶等。

外毒素多由革兰阳性菌和少数革兰阴性活菌合成和分泌,毒性强,具组织亲和性。根据靶组织的不同分神经毒、细胞毒和肠毒素3种。内毒素为革兰阴性菌的细胞壁成分,当细菌死亡裂解后才释放出来,具有相似的毒性作用,能引起发热、中毒性休克、弥漫性血管内凝血(DIC)和组织损伤等。细菌产生的其他毒性蛋白质和酶包括溶血素,杀白细胞素,透明质酸酶、链激酶及血浆凝固酶等。

(三) 细菌的检验原则

应用微生物学的基本知识和技术,结合临床实际,对可疑患者的标本进行检验以作出病原学诊断的过程称为微生物学检查。其包括标本的直接显微镜检查、病原菌的分离培养鉴定、细菌代谢产物、毒素、抗原、基因的检测和细菌感染后机体免疫应答产物的测定及抗生素敏感性试验等。对细菌感染性疾病作出及时、准确的病原学诊断是临床微生物学实验室最根本的任务,这对临床感染性疾病的诊断与合理使用抗生素具有直接帮助。

1. 形态学检查

对各种体液、渗出液和组织标本直接进行显微镜检查,根据细菌形态、结构和染色性等的观察有助于对病原菌的初步识别和分类,并为进一步鉴定提供依据,称为形态学检查。形态学检查是微生物检验中极为重要的基本方法之一,对某些细菌,如痰中的抗酸杆菌和脑脊液中的脑膜炎奈瑟菌等,通过形态学检查可迅速得到初步诊断,有利于感染的及时控制和抗生素的合理使用。

2. 分离培养鉴定

分离培养鉴定是微生物学检查的关键部分,其目的在于从临床标本中找出活的细菌,并鉴定该菌的属、种(型)并保存菌种,进一步确定其致病性和耐药性,以指导抗菌治疗和预测治疗效果。

在进行微生物学检查的临床标本或培养物中常有多种微生物混杂,既有致病菌,亦有正常菌群(条件致病菌)。不同细菌培养所需的条件及其生长特征亦各有差异。因此,必须根据临床的要求、送检标本的性质和培养目的,选用适合不同细菌生长的培养基,采用不同的分离接种方法以及培养条件,并通过生化反应和血清学试验来确定细菌的生物学性状,以对病原菌的种类和致病性作出正确判断。

3. 免疫学试验

免疫学试验在临床微生物学检查中又称血清学试验。血清学试验是根据抗体与相应的抗原在适宜条件下,能在体外发生特异性结合的原理,用已知抗体检测待测病原体抗原,或用已知病原体抗原检测患者血清及其他体液中的待测抗体,从而对感染性疾病作出诊断的

一种实验诊断方法,具有高度的特异性和敏感性。

免疫学试验的方法有多种,临床上常用的有凝集、沉淀、血凝抑制、补体结合、中和等试验与各种免疫标记测定技术,包括酶免疫测定、荧光免疫测定和放射免疫测定技术等。

在实际应用中,可根据临床要求、标本种类和检验目的的不同,选用合适的免疫学试验方法,既可用于检测抗原,又可检测抗体。

4. 基因诊断

微生物细胞内存在着特定的基因组(染色体或质粒 DNA 所携带的遗传信息),决定并调控微生物的性质、特征和所有的外在表现。用分子生物学技术直接检测病原体基因,有助于对微生物感染性疾病的病因作出诊断。

基因检测技术中目前常用的方法有 DNA 探针技术和聚合酶链反应(PCR)技术等。DNA 探针技术是利用核酸间碱基配对(分子杂交)的特性来识别特定核酸序列的方法。PCR 是一种体外基因扩增技术,是利用 DNA 聚合酶介导一系列循环反应,对来自基因组 DNA/RNA 的信号进行放大,然后将扩增的 DNA 片段进行特异性鉴定,从而检出目的基因。

5. 自动化检测

计算机的广泛应用,大大促进了临床微生物学检查自动化的进程,使微生物实验由原来缓慢、繁琐和手工操作的传统方法,变为快速、简便、电脑化和自动化的系统。其中微生物自动鉴定和药敏系统、全自动免疫诊断系统及全自动血培养仪等是目前广泛应用于临床微生物学检查方面的自动化仪器。

6. 临床标本的采集和送检

临床标本的正确采集和送检,对于准确检出病原微生物,避免正常菌群或污染微生物的影响,及时、准确地诊断和治疗感染性疾病具有重要意义,采集标本时应做到以下几点:① 收集微生物学检查标本的容器必须无菌(煮沸、干热或高压灭菌),但不得用消毒剂处理;② 尽可能在合适的时间收集标本,了解感染性疾病的病程,将有助于决定采集何种标本及采集的时间,如疑为败血症的患者最好在发热期间采血做血培养检查;③ 必须准确地从感染部位采集标本,避免正常菌群的污染而影响致病菌生长。应严格做到无菌采取血液、脑脊液、尿液和穿刺液,采集粪便、肛拭和鼻咽拭等标本时,虽然无须严格无菌操作,但也应置于灭菌容器内送检;④ 培养标本最好在应用抗菌药物前采集,解释培养结果也应考虑到抗菌药物应用史,某些细菌如淋病奈瑟菌、脑膜炎奈瑟菌、化脓性链球菌和流感嗜血杆菌等对抗菌药物非常敏感;⑤ 培养标本采集后应尽快送至实验室,搁置时间过长,可能造成某些需要复杂营养的微生物死亡、污染菌过度生长或使细菌数量发生改变,而影响检验的结果。一般标本应冷藏保存送检,某些标本(如脑膜炎奈瑟菌和淋病奈瑟菌、志贺菌等)送检时应保温(35~37℃)。送作厌氧菌培养的标本必须与空气隔绝。

(倪语星)

第二节 细菌的耐药性监测

近年来细菌耐药性的产生及耐药菌株引起的感染问题日趋严重,现代感染类型的变化

表现在病原体种类的变迁、细菌耐药性的变迁和机体易感性的变化。20 年代感染性疾病病原体以链球菌为主,50~60 年代则以葡萄球菌感染为主,70~80 年代又变成以革兰阴性杆菌为主,从 20 世纪 90 年代以后,凝固酶阴性葡萄球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、肠球菌和念珠菌等耐药性较强的细菌和真菌的感染占主要地位,造成以条件致病菌在免疫低下的机体内引起全身各系统的感染这一现代感染的典型模式。

医院感染目前已成为全球性的突出问题,其主要原因之一是抗菌药物的使用不当促进了耐药菌在机体内和医院环境中的定植繁衍,进而导致交叉感染和内源性感染日益增多。现已相继发现了许多抗生素难以治疗的细菌感染,如多重耐药的结核分枝杆菌(multidrug resistant *M. tuberculosis*,MDRTB)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*,MRSA)、耐青霉素肺炎链球菌(penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae*,PRSP)和产生超广谱 β -内酰胺酶的革兰阴性杆菌(extended spectrum β -lactamase,ESBL)甚至出现了现有抗生素无法控制的耐万古霉素肠球菌(vancomycin resistant *Enterococcus*,VER),使临床医学在感染控制的问题上面临抗生素发明以来最严重的挑战。

因此,合理使用抗菌药物的前提之一是重视感染病原学的实验室诊断和耐药性监测,为临床抗感染治疗的药物选择、疗效的监测和考核以及医院感染的监测提供实验室依据。

【理论基础】

(一) 耐药菌株的流行病学

自 80 年代起多种对革兰阳性杆菌和铜绿假单胞菌具强大抗菌活性的抗菌药物(新的 β -内酰胺类和氟喹诺酮类)先后应用于临床,并取得满意疗效。近年来革兰阳性球菌感染日见增多,主要在医院内和重症监护病房中感染。据美国的统计资料,医院内菌血症的病原菌中约 47%~52%为葡萄球菌(包括金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌)和肠球菌,上述细菌占全部院内感染的 30%。国内报道,革兰阳性菌约占临床分离菌的 20%~25%,在菌血症的病原中约占 33%~53%,其中最多见的是金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌和肠球菌属。尤为重要的是革兰阳性球菌对常用抗菌药物的耐药菌种、菌株的迅速增多,主要表现为:① 葡萄球菌中甲氧西林耐药株的发生率增多;② 耐青霉素肺炎链球菌在许多国家和地区中传播;③ 出现了耐糖肽类(万古霉素、替考拉宁)和对多种抗生素耐药的肠球菌属。

耐甲氧西林葡萄球菌以 MRSA 为代表,耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌的临床流行病学与 MRSA 相同。不同国家 MRSA 的分离率不同,美国从 1975 年到 1991 年的分离率由 2.4%上升到 29%。我国不同地区报道不一,低者为 3.5%,高者在 30%以上。

肠球菌感染在医院感染中所占比例亦有增多趋势,并可引起菌血症,心内膜炎、尿路感染和腹腔感染等多种严重感染。其中粪肠球菌占 80%以上,屎肠球菌约 10%。肠球菌属对青霉素具有固有的低度耐药性,但近年来发现不少肠球菌菌株除对氨苄西林和其他青霉素类耐药,同时也对庆大霉素等氨基糖甙类高度耐药。自 1983 年 Murray 鉴定出第一株 β -内酰胺酶的粪肠球菌,1992 年 Coudron 分离出第一株 β -内酰胺酶屎肠球菌后,近年来的肠球菌万古霉素的耐药率亦在不断增加。1988 年英国首次报道了耐万古霉素的粪肠球菌和屎肠球菌所致医院感染暴发流行。美国报道,耐万古霉素肠球菌(WRE)已从 6.3%(1979 年)上升至 7.9%(1993 年),并占重症监护病房中肠球菌感染的 14%。

1976 年澳大利亚首次报道耐青霉素肺炎链球菌其 MIC 为 0.5mg/L,此后在许多国家

和地区迅速播散,尤以南非、西班牙及东欧国家为多;90年代后,耐青霉素肺炎链球菌(PRSP)的发生率在许多国家迅速上升;目前在美国、日本及一些南美国家中,PRSP已占20%,西班牙占44%,韩国多于60%。1981年南非还报道了耐第三代头孢菌素的菌株。中世界关注的另一焦点是产生超广谱 β -内酰胺酶(ESBL)的革兰阴性杆菌,1982年,美国报道了第一例具有ESBL的催产克雷伯菌;在法国,肺炎克雷伯菌中产ESBL的分离率1985年为0.75%,1987年为8.4%,1988年为11%。肺炎克雷伯菌是产生ESBL的最常见菌,有报道14%~16%的肺炎克雷伯菌产ESBL,肠杆菌科的其他菌如催产克雷伯菌、大肠埃希菌、奇异变形杆菌中也可分离到ESBL。

(二) 耐药机制

1. 细菌耐药性产生的类型

细菌获得性耐药系由细菌脱氧核糖核酸(DNA)改变而产生的。DNA变化方式有两种。

(1) 染色体DNA的改变(突变) 决定耐药性的染色体遗传基因可经某些物理化学因素处理后诱发突变,也可遗传因子(基因)自发突变的结果,细菌获得性耐药多由后一种情况形成。由突变产生的耐药性一般只对一种或两种相类似的药物耐药,且比较稳定,其产生和消失(即回复突变)与药物接触无关,突变产生的耐药性互不相关,但可随染色体分裂传递给下一代。突变造成耐药的细菌在自然界的耐药菌中仅居次要地位,人类在个别情况下突变耐药菌也可引起感染的暴发流行。

(2) 耐药性质粒传递 耐药性质粒为细菌胞质内的带有耐药性基因的环状双股DNA,通过质粒的重新组合或耐药质粒的传递,细菌获得耐药性。通过耐药质粒传递的耐药现象在自然界发生的细菌耐药现象中占有重要地位,也最为多见。耐药质粒在微生物间的相互传递或转移有4种方式:①转化,耐药菌溶解后释出的DNA进入敏感菌细胞内时,耐药菌即可将耐药性转移给敏感菌。此种传递方式基本限于革兰阳性细菌,革兰阴性菌中仅嗜血杆菌属以此种方式传递耐药。由转化产生的耐药性有很大的局限性,故在自然界和临床上并不重要。②转导,耐药菌通过噬菌体将耐药基因转移给敏感菌,耐药性转导的现象可在多种革兰阳性和阴性菌中发生但其发生率通常很低。耐药性转导的现象仅能发生于同种的细菌内,在自然界的发生率不高,临床意义可能不大。③接合,由接合传递的耐药性也称感染性耐药。此种耐药性传递方式系通过耐药菌和敏感菌菌体的直接接触由耐药菌将耐药因子转移给敏感菌。接合转移方式仅出现在革兰阴性细菌,特别是肠道细菌之间,弧菌也可通过这一方式获得耐药。耐药因子不仅可在同种细菌间转移,而且可在同属不同种的菌中转移。④转座子易位,大部分耐药基因存在于转座子上,通过转座子在DNA分子中移动,改变或影响其插入位点附近的基因表达和基因重组发生耐药。

2. 耐药性发生机制

(1) 酶抑制抗生素的作用 细菌通过耐药因子可产生破坏抗生素的酶(钝化酶),从而使药物在作用于菌体前即被破坏而失效。目前分离出的钝化酶可分为三类:① β -内酰胺酶,青霉素酶即属此类。 β -内酰胺酶可分为质粒介导和染色体介导两型,在金黄色葡萄球菌中的 β -内酰胺酶基因为质粒携带,其产生的青霉素酶至少有3种。在革兰阴性菌中所发现的 β -内酰胺酶可分为4组。根据酶水解底物的不同可分为:青霉素酶、头孢菌素酶、广谱酶和超广谱酶4种。②氯霉素乙酰基转移酶(CAT),某些金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、D群链球菌和革兰阴性杆菌可产生乙酰基转移酶使氯霉素转化为无活性的3-乙酰氧和1,3-双

乙酰氧衍生物。此外,还有一种由 R-因子控制的硝基还原酶也可使氯霉素失活,但较少,居次要地位。③氨基糖甙类钝化酶,此组酶多由质粒控制,分为磷酸转移酶、乙酰转移酶和核苷转移酶三类。三者分别使敏感的羟基磷酸化、氨基乙酰化和羟基核苷化,改变或破坏后的抗生素即不能再与细菌核糖体结合。某些抗生素可为一种以上的钝化酶所破坏,一种酶又可破坏一个以上的化学结构相似的氨基糖甙类抗生素。

(2) 抗生素的渗透障碍 由于细菌细胞壁的障碍或细菌细胞膜通透性的改变,抗生素不能到达作用靶位发挥抗菌效能。革兰阴性菌对许多抗生素的固有耐药性是由于细胞中的类脂-多糖-蛋白复合物的非特异性屏障所致。革兰阳性菌对多粘菌素的耐药与多粘菌素难以透过细菌的较厚细胞壁有关。各种青霉素的作用机制相仿,由于对细菌细胞通透性的差异而产生不同的抗菌谱。由质粒控制的细菌细胞膜通透性的改变使很多抗生素,如四环素、氯霉素、磺胺药和某些氨基糖甙类抗生素,难以进入细胞内,导致细菌的耐药性。

(3) 靶位蛋白的改变 抗生素对细菌作用靶位的改变是细菌获得耐药性的又一途径。染色体的突变或耐药质粒的获得均可改变靶位的蛋白,降低靶位蛋白和抗生素的亲合力,某些耐药性可由质粒和染色体同时控制。

(4) 与青霉素结合蛋白(PBPS)结合量的变化 PBPS 是存在于细菌内的一种能与 β -酰胺类抗生素结合蛋白质,当其与青霉素结合力强弱不同及结合的 PBPS 数目不同时,可表现出不同程度的抗菌作用。肺炎链球菌 6 型和 57 型对青霉素 G 耐药性的增加是由于青霉素 G 对 PBP₁、PBP₂、和 PBP₃ 结合量的减低。

(5) 代谢拮抗剂的产生 细菌可通过代谢拮抗剂产量的增加来抑制抗生素或其他抗菌药物的作用,如耐药金黄色葡萄球菌接触磺胺药后,其 PABA 产量增加至敏感菌的 20~100 倍,以利与磺胺药物竞争。

(6) 细菌酶系统的变化 对青霉素类耐药的金黄色葡萄球菌也常对干扰细胞壁合成的头孢菌素类和万古霉素有交叉耐受性,但庆大霉素和利福平对此类细菌的杀菌活性不变。

(7) 通过细菌的代谢状态和外界环境阻止药物的作用 呈休眠状态的细菌或细菌在营养缺少的外界环境中时,一般皆对抗生素耐药,外界环境中的 pH、氧含量、离子及营养成分皆会影响抗生素的作用。

某些细菌可具有一种以上耐药发生的机制,细菌对抗生素渗透性的改变和钝化酶的产生是最常见的组合。这种情况多出现于革兰阴性杆菌,其钝化酶的作用显然可由于其对药物通透性的改变而得到加强。

【检查项目】

(一) 药物敏感试验

实验方法主要包括定性测定的纸片扩散法、定量测定的稀释法和 E 试验法(E test)。

1. 纸片扩散法

经世界卫生组织推荐,目前各国临床微生物学实验室广泛采用的标准纸片扩散法是由 Bauer 和 Kirby 所建立的纸片琼脂扩散法,即 Kirby-Bauer 法(K-B 纸片琼脂扩散法)。下面介绍 K-B 纸片琼脂扩散法。

(1) 原理 将含有定量抗菌药物的纸片贴在接种测试菌的琼脂平板上。纸片中所含的药物吸取琼脂中的水份溶解后便不断地向纸片周围区域扩散形成递减的梯度浓度。在纸片周围抑菌浓度范围内测试菌的生长被抑制,从而形成透明的抑菌圈。抑菌圈的大小反映测试

菌对测定药物的敏感程度,并与该药对测试菌的最低抑菌浓度(MIC)呈负相关关系,即抑菌圈愈大, MIC 愈小。

(2) 抗菌药物纸片 应选择直径 6.35mm 专用药敏纸片,目前各种抗生素纸片已有商品出售,应保存于含硅胶的密封瓶(管)内,贮藏于-20℃冰箱内,日常工作用的少量纸片可放于 4℃冰箱内使用 1 个月。

(3) 培养基 水解酪蛋白(MH)琼脂是对生长较快的需氧和兼性厌氧菌进行药物敏感试验的标准培养基,pH7.2~7.4,琼脂厚度为 4mm,对生长条件要求较高的细菌进行药敏试验时,需加入营养增补剂。

(4) 方法 以无菌棉拭子浸蘸已校正浓度的菌液(0.5 麦氏比浊标准,相当于 10^8 CFU/ml),在管内壁将多余菌液旋转挤去后在琼脂表面按三个方向均匀涂布接种 3 次,最后沿平板内缘涂抹 1 圈,平板在室温下干燥 3~5 分钟后用无菌镊将含药纸片紧贴于琼脂表面,各纸片中心相距应大于 24mm,纸片距平板内缘应大于 15mm,置 35℃孵育 16~18 小时后阅读结果。

(5) 结果解释 用米尺或卡尺(精度达 mm)量取抑菌圈直径。纸片法药敏标准是根据大量试验菌株所测定的抑菌圈直径与最低抑菌浓度进行相关回归分析而确定的。根据常规剂量给药后,测定药物能在体内达到的血药浓度,将抗菌药物敏感性标准分为三级:敏感即表示测试菌能被测定药物常规剂量给药后在体内达到的血药浓度所抑制或杀灭;中度敏感即指测试菌可被测定药物大剂量给药后在体内能达到的浓度所抑制,或在测定药物浓集部位的体液中,如尿液中被抑制;耐药即表示测试菌不能被在体内感染部位可能达到的抗菌药物浓度所抑制。

(6) 影响纸片法药敏结果的因素 培养基的质量、药敏纸片的质量、接种菌量、试验操作质量、孵育条件、温度和时间、抑菌圈测量工具的精度、质控标准菌株本身的药敏特性是否合格有无变异等。

(7) 质量控制 采用标准菌株如金黄色葡萄球菌 ATCC 25923、大肠埃希菌 ATCC 25922、和铜绿假单胞菌 ATCC 27853 等与测试菌在同一条件下作药敏试验。

将从确证的感染部位采集到的一些重要临床标本直接作药敏试验,这样可提早 24 小时得出初步药敏结果,但还需在病原菌分纯后用 K-B 法对其进行验证和补充。

2. 稀释法

是定量测定抗菌药物抑制细菌生长作用的体外方法,分为肉汤稀释法和琼脂稀释法,前者又分试管稀释法和微量稀释法。稀释法所测得的某抗菌药物能抑制检测菌肉眼可见生长最低浓度称为最低(或最小)抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)。

(1) 试管稀释法 又名常量稀释法,是以 MH 液体培养基将抗菌药物作不同浓度的稀释,然后接种待试菌,定量测定抗菌药物的 MIC 或最小杀菌浓度(minimal bactericidal concentration, MBC)。结果测定以无细菌生长者药物最低浓度管为细菌的 MIC。以 0.01ml 定量接种环取肉眼观察无菌生长的各管移种 1 环于血琼脂平板上,经 35℃孵育过夜后观察以能杀死 99.9%原始种入的细菌最低药物浓度为该菌的 MBC。

(2) 微量稀释法 聚苯乙烯微孔板内含有各种稀释度的经冷冻干燥后的抗菌药物作为商品供应,临床微生物实验室只须加试验菌液即完成了药敏试验,盖上盖板,用透明胶布封固后,35℃孵育 16~24 小时后判断结果。细菌生长可表现为弥漫的混浊、丝网状或大圆点沉

于孔底,无菌生长时则透明。以底部清晰或不见沉淀细菌孔的最低药物浓度,为试验菌的最低抑菌浓度。

(3) 琼脂稀释法 将不同剂量的抗菌素药物,加入融化并冷至 50℃左右的定量 MH 琼脂中,制成含递减浓度药物的平板,经接种待试菌并孵育后,其最低药物浓度不出现菌落者,即为待试菌的最低抑菌浓度。

3. E 试验

(1) 原理 E 试验结合了稀释法和扩散法的原理和特点,操作简便同扩散法,但可以同稀释法一样直接定量出测试药物的 MIC,结果准确,重复性好。与纸片 K-B 琼脂扩散法的主要区别在于 E 试验所用的是一条宽 5mm、长 50mm、内含有干化、稳定的、浓度由高至低呈指数梯度分布的一种抗菌药物的商品化塑料试条,试条上标出该抗菌药物的浓度刻度($\mu\text{g/ml}$),浓度梯度范围一般为 15 个自然对数。

(2) 培养基 测定快速生长的需氧和兼性厌氧菌可用 MH 琼脂或瑞典 PDM 抗生素敏感试验培养基。测定对生长条件要求较高的病原菌时,应根据其需要添加有关的营养补充物。

(3) 方法 接种菌准备、平板接种等同 K-B 纸片琼脂扩散法。直径 140mm 的平板内可放置 6 根 E 试验试条,90mm 平板通常只能放 1~2 条,孵育温度和时间同纸片琼脂扩散法。

(4) 结果阅读 孵育后围绕试条可形成一个椭圆形的抑菌圈,抑菌圈和试条的横向相交处的刻度读数即是测定抗菌药物对测试菌的最低抑菌浓度。

以上药敏试验均应用质控标准菌株定期作质量控制。

(二) 耐药菌株监测试验

1. β -内酰胺酶的检测

细菌所产生的抗生素灭活酶主要有 β -内酰胺酶和氨基糖甙类抗生素钝化酶, β -内酰胺酶能裂解青霉素族和头孢菌素族抗生素的基本结构 β -内酰胺环,从而使其丧失抗菌活性。大部分金黄色葡萄球菌以及流感嗜血杆菌、淋病奈瑟菌、革兰阴性厌氧菌和少数肺炎链球菌均能产生 β -内酰胺酶从而导致对青霉素 G 和氨基青霉素等的耐药。应用快速的 β -内酰胺酶检测法可以比常规药敏提前 24~48 小时获得结果以便临床合理用药。常用的检测方法如下。

(1) 微生物活性消失法 选用对青霉素高度敏感的枯草芽胞杆菌为指示菌,如被试菌含有 β -内酰胺酶,则在划线两边有枯草芽胞杆菌生长,并见蝴蝶状抑菌圈,不含 β -内酰胺酶的试验菌仍呈很大的抑菌圈。

(2) 产色头孢菌素法 当产色头孢菌素的 β -内酰胺环被 β -内酰胺酶打开,基质液由黄色变成红色,本法在临床实验室中常用商品化快速纸片法取代塑料微量板法。

(3) 淀粉-碘测定法 若检测菌产生 β -内酰胺酶,则可水解青霉素的 β -内酰胺环,使其变为青霉噻唑酸,后者与碘结合,使蓝色的碘-淀粉复合物转变为无色。

(4) 酸度指示剂法 若检测菌产生 β -内酰胺酶,则可水解青霉素的 β -内酰胺环,使其变为青霉噻唑酸,后者使酚红指示剂由红色转变为黄色。

2. 超广谱 β -内酰胺酶 ESBL 的检测

ESBL 常见于大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌。TEM1、TEM2、SHV-1 发生点突变后,被

水解的底物便扩大到三代头孢菌素及氨基曲南。质粒介导的 ESBL 常和其他耐药基因相联,如氨基糖甙类、复方新诺明等,表现为多重耐药。常规试验不能完全检出 ESBL, MIC 只是轻度升高或抑菌圈稍减小,未达到耐药的分界点。另外,氨基曲南、头孢噻甲羧肟、Cefpodoxime 耐药可作为 ESBL 的指征,ESBL 可被酶抑制剂解除,检测方法如下。

(1) 双纸片法 把一张含基质的抗生素纸片(如头孢噻肟)与另一张含有 β -内酰胺酶抑制剂的纸片(如羟氨苄青霉素+棒酸)置于已密划细菌的琼脂平板上,以两纸片中心相距 30mm 为宜。孵育过夜后,在两药纸片间抑菌圈呈协同作用(含头孢噻肟纸片抑菌圈向 β -内酰胺酶抑制剂纸片扩大称之)表示 ESBL 产生。

(2) E 试验 用头孢噻甲羧肟+克拉维酸和头孢噻甲羧肟作 E 试验,两者 MIC 值相差 4 倍以上者,表示此菌株产 ESBL。

3. 耐甲氧西林葡萄球菌的筛选测定

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌对苯唑青霉素等耐药的机制主要有三个方面:① 由染色体 *mecA* 基因介导产生低亲和力的青霉素结合蛋白(PBP_{2a});② 产生大量的 β -内酰胺酶;③ 青霉素结合蛋白发生改变。其中以 *mecA* 基因介导的耐药性为 MRSA 的主要经典耐药类型。检出方法可用添加有 4%氯化钠和 6 μ g 苯唑青霉素/ml 的 MH 琼脂进行筛选测定。测试菌的准备和接种方法同纸片法药敏试验,用 1 μ l 接种环接种或棉拭点种,接种菌量为 10⁴CFU,35℃孵育 24 小时后有菌落生长者则为 MRSA。金黄色葡萄球菌 ATCC 29213、金黄色葡萄球菌 ATCC 38519 和已知阳性的 MRSA 菌株可作为此试验的质控菌株。

4. 肠球菌的耐药性检测

(1) 耐高水平氨基糖甙类的肠球菌的筛选测定 肠球菌氨基糖甙类高耐药株可用琼脂稀释法或微量稀释法进行筛选测定。琼脂稀释法测定培养基采用含 500 μ g 庆大霉素/ml 的脑心浸液琼脂或 5%羊血 MH 琼脂,每点接种菌量为 10⁴CFU,35℃孵育 24 小时,有菌落生长为阳性;微量肉汤稀释法采用含 500 μ g 庆大霉素/ml 的脑心浸液肉汤,每次接种菌量为 5 $\times$ 10⁵CFU/ml,35℃孵育 24 小时,出现生长者为阳性。本试验采用粪肠菌 ATCC 29212 作为敏感对照标准菌株,粪肠球菌 ATCC 51299 作为耐药对照标准菌株进行质控。此外尚可采用纸片扩散筛选试验,测试菌准备和接种方法同纸片法药敏试验,选择 120 μ g/片的庆大霉素或 300 μ g/片的链霉素,35℃孵育 18~24 小时后,量取抑菌圈,直径大于或等于 10mm 为敏感,6mm 为耐药,7~9mm 需补做 MIC。

(2) 耐青霉素、氨苄青霉素肠球菌的检测 耐 β -内酰胺类的肠球菌对青霉素的 MIC 常大于或等于 2 μ g/ml,其中粪肠球菌 2~4 μ g/ml,屎肠球菌 16~32 μ g/ml。耐药机制为① PBP 改变;② 少部分产生 β -内酰胺酶,纸片法可精确检出前者,后者较差,可用 Nitrocefin 试验。NCCLS 推荐测试青霉素的敏感性可预测对氨苄青霉素、阿莫西林、 β -内酰胺酶抑制剂的敏感性;由 PBP 改变引起的耐青霉素(MIC $\geq$ 16 μ g/ml)应认为对脲基青霉素,泰能均耐药;而由 β -内酰胺酶引起的应认为对氨苄青霉素和脲基青霉素耐药,但对酶抑制剂泰能敏感。

(3) 对万古霉素耐药的肠球菌检测 耐药菌有三种表型:① VanA 型,为高水平耐万古霉素,其 MIC $\geq$ 64 μ g/ml,对壁霉素的 MIC $\geq$ 16 μ g/ml;② VanB 型,为低至高水平耐万古霉素,其 MIC16~512 μ g/ml,不耐壁霉素;③ VanC 型,为天然低水平耐药, MIC 2~32 μ g/ml, NCCLS 的万古霉素耐药判定标准: $\leq$ 4 μ g/ml 为敏感,8~16 μ g/ml 为中介, $\geq$ 32 μ g/ml 为耐药。用纸片琼脂扩散法,Vitek, Microscan 有可能检测不出肠球菌低水平万古霉素耐药