

标准与规范

临床微生物学血培养操作规范

中华医学会检验医学分会

【编者按】根据卫生部指示,中华医学会检验医学分会成立了《临床检验操作规范》编写组。《临床微生物学检验操作规范》是该规范的一部分。该规范在撰写过程中始终坚持先进性、科学性、实用性和可行性的指导原则,在查阅文献和总结经验的基础上,完成了编写任务。其间曾举行多次审稿会,对讨论稿进行了充分地研讨和修改。为了使检验界临床微生物学同行尽快参照执行《临床微生物学检验操作规范》,本刊将陆续刊登该规范 1~10 专题,每期 1 个专题,以飨读者。希望广大检验医学人员在学习、执行该规范的同时提出意见,以便再版时修改。

当微生物侵入血液迅速繁殖超出免疫系统清除这些微生物的能力时形成菌血症或真菌菌血症。一过性菌血症常发生于对感染灶的外科处理、黏膜的创伤操作和易污染的外科手术,亦可发生于全身或局部感染的早期;间歇性菌血症常发生于腹腔等部位未能及时引流的脓肿;持续性菌血症常见于感染性心内膜炎等血管内膜感染,亦常发生于伤寒和波浪热的最初几周。

血培养常见菌:革兰阴性菌主要包括大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、肠杆菌,伤寒沙门菌、绿脓假单胞菌、不动杆菌属等;革兰阳性菌主要包括金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌、念珠菌属等。菌血症是临床医学急症,应尽快采集血液进行培养。

一、血标本采集和运送

1. 采血指征:一般患者出现以下一种体征时可作为采血的重要指征:发热($\geq 38^\circ\text{C}$)或低温($\leq 36^\circ\text{C}$),寒战,白细胞增多(计数大于 $10.0 \times 10^9/\text{L}$,特别有“核左移”时),皮肤黏膜出血、昏迷、多器官衰竭,血压降低,C 反应蛋白升高及呼吸加快,血液病患者出现粒细胞减少,血小板减少等,或同时具备上述几种体征时而临床可疑菌血症应采集血液培养。新生儿可疑菌血症,应该同时做尿液和脑脊液培养。对入院危重感染患者应在未进行抗菌药物治疗之前,及时做血培养。

2. 皮肤消毒程序:严格执行以下三步法:(1)70%酒精擦拭静脉穿刺部位待 30s 以上。(2)1%~2%碘酊作用 30s 或 10%碘伏 60s,从穿刺点向外画圈消毒,至消毒区域直径达 3cm 以上。(3)70%酒精脱碘:对碘过敏的患者,用 70%酒精消毒 60s,待酒精挥发干燥后采血。

3. 培养瓶消毒程序:(1)70%酒精擦拭血培养瓶橡皮塞,作用 60s。(2)用无菌纱布或无菌棉签清除橡皮塞子表面残余酒精。

4. 静脉穿刺和培养瓶接种程序:(1)在穿刺前或穿刺期间,为防止静脉滑动,可戴乳胶手套固定静脉,不可接触穿刺点。(2)用注射器无菌穿刺取血后,勿换针头(如果行第二次穿刺,应换针头)直接注入血培养瓶,或严格按厂商推荐的方法采血。(3)血标本接种到培养瓶后,轻轻颠倒混匀以防血液凝固。立即送检,切勿冷藏。

5. 采血量:成人采血量是 8~10 ml,儿童 1~5 ml。血液和肉汤之比为 15~110。

6. 血培养次数和采血时间:采血培养应该尽量在使用抗菌药之前进行,在 24 h 内采集 2~3 次做血培养(一次静脉采血注入到多个培养瓶中应视为单份血培养)。入院前两周内接受抗菌药物治疗的患者,连续 3d,每天采集 2 份。可选用能中和或吸附抗菌药物的培养基。对间歇性寒战或发热应在寒战或体温高峰到来之前 0.5~1h 采集血液,或于寒战或发烧后 1h 进行。特殊的全身性和局部感染患者采血培养的建议:(1)可疑急性原发性菌血症、真菌菌血症、脑膜炎、骨髓炎、关节炎或肺炎,应在不同部位采集 2~3 份血标本。(2)不明原因发热,如隐性脓肿,伤寒热和波浪热,先采集 2~3 份血标本,24~36 h 后估计体温升高之前(通常在下午)再采集 2 份以上。(3)可疑菌血症或真菌菌血症,但血培养持续阴性,应改变血培养方法,以获得罕见的或苛养的微生物。(4)可疑细菌性心内膜炎,在 1~2 h 内采集 3 份血标本,如果 24 h 后阴性,再采集 3 份以上的血标本。

7. 标本运送:采血后应该立即送检,如不能立即送检,需室温保存或置 35~37℃ 孵箱中,切勿冷藏。自动化连续监测系统虽有允许延迟上机监测微生物生长的原理,还是应该尽量减少延迟上机时间。

二、标本验收

1. 血培养瓶验收:(1)检查培养瓶是否有渗漏、破裂或明显污染。(2)检查瓶子上的标签与申请单是否相符。(3)检查血液标本是否适量,并在申请单上注明采血量。(4)对于延迟送检的血培养瓶注意肉眼观察微生物生长可视信号:

通讯作者:董明庆, 210029 南京医科大学第一附属医院临床检验中心

培养瓶内是否有絮状物、混浊、溶血、凝块、薄膜、产气、白色颗粒等。如发现可视信号提示有微生物生长,应该立即直接涂片镜检和划线转种。

2. 不合格血培养标本的处理:(1)拒收培养瓶:血培养瓶标识与化验申请单不符,培养瓶破裂或明显污染。处理方法:立即与临床医师联系,报告拒收的具体理由。(2)补做培养瓶:血标本采集后放置 12h 以上(手工法除外),用不适当类型的培养瓶收集标本,用过期的培养瓶收集标本,采血量不足等。处理方法:立即与临床医师联系,报告标本不合格的具体理由,建议补做血培养。

三、实验室检查

1. 血培养操作过程中应注意生物安全防护。

2. 血培养瓶处理:传统手工法血培养每天至少检查一次,注意微生物生长可视信号,对 48~72 h 未生长的培养瓶应转种,行需氧培养。

发现细菌生长信号,应无菌抽取培养物,涂片行革兰染色,发现细菌,尽快报告染色结果;根据染色特征,选择合适的培养基转种,见表 1。

表 1 根据革兰染色特征选择转种培养基类型的建议

染色特点	5%~10%CO ₂ 孵育 ^a			厌氧气体孵育 ^a	
	血琼脂	巧克力琼脂	中国蓝或麦康凯或 EMB	血琼脂	PEA 或 CAN
革兰阳性					
球菌	X			X	X
杆菌	X			X	X
革兰阴性					
球菌	X	X		X	X
杆菌	X	X	X	X	X
真菌 ^b	X	X			

注:a:所有培养至少孵育 48h;EMB:伊红美蓝琼脂;PEA:苯乙醇琼脂;CAN:多黏菌素-萘啶酸琼脂;b:增加真菌培养基(如:沙保弱葡萄糖琼脂)和 30℃ 孵育;X:选择的培养基

革兰染色未找到细菌的血培养瓶,补充吡啶橙染色检查弯曲菌和布鲁菌,发现阳性者进行分离鉴定,未发现阳性则应转种厌氧和需氧血平板,然后继续培养监测至最终报告的时间,注意其他不常见细菌见附录。

革兰染色为形态均一的细菌,根据革兰染色结果选择抗菌药物进行直接抗菌药物敏感试验,同时转种培养,发现菌落,立即做细菌鉴定和标准抗菌药物敏感试验。使用双相培养基进行血培养时,如有菌落生长可直接进行细菌鉴定和标准抗菌药物敏感试验。

四、结果报告

1. 阳性结果报告:(1)初级报告:阳性血培养结果非常重要,应该立即口头报告给医生,包括革兰染色特性和形态,血培养阳性的瓶数和其他的鉴定信息(如革兰阳性球菌疑似为葡萄球菌等)。报告之前,应该回顾一下患者近期标本中微生物培养情况,这些结果有助于解释感染微生物的来源。同时记录报告的日期、时间、内容以及接受报告人的姓名。(2)

中级报告:报告直接抗菌药物敏感试验结果和细菌种属的初步鉴定结果。(3)最终报告:报告细菌种属名和标准抗菌药物敏感试验结果。

2. 阴性报告:普通血培养 5 d 无细菌生长可报告为:“5 d 培养未见细菌生长”,但培养瓶要继续培养至 7 d,如果发现菌生长,可发补充报告。某些特殊致病菌培养时间需延长。

附录

血培养特殊致病菌的处理

1. 分枝杆菌:从血液中分离培养分枝杆菌需特殊培养基。裂解-离心、BACTEC 12B 或 13A, Bact/Alert MP 培养基均可用于分离培养分枝杆菌。将裂解-离心管中的沉淀物接种至 7H11 培养基中,如果记录了采集的血标本量,裂解-离心法可进行菌落计数定量分析。BACTEC 12B 培养基会抑制某些鸟分枝杆菌复合体的生长,BACTEC 13A 培养基专门用于分离血液中的分枝杆菌,接种的血量为 5 ml,它避免了处理裂解-离心血培养物时所遇到的潜在危险性。

2. 细菌 L 型:血液中很少分离出细胞壁缺陷的细菌。含 10%蔗糖或甘露醇渗透压恒定的培养基,适合培养细胞壁缺陷的细菌。该培养基也适合某些细胞壁完整的细菌生长,因此在这类培养基中分离出某种细菌,并不意味着血液中一定有细菌 L 型。

3. 布鲁菌属:通常将血液接种至含有双相培养基的卡斯塔涅达培养瓶(Castaneda bottles)中进行培养。固相培养基采用胰酶消化大豆琼脂,胰蛋白胍琼脂或布鲁菌琼脂,琼脂的终浓度为 2.5%。液相培养基采用不含琼脂的相同培养基基础,当培养瓶内琼脂凝固后,再以无菌手续将液相培养基基础倾入瓶内即可。卡斯塔涅达培养瓶内 CO₂ 浓度应为 5%~10%,35~37℃ 孵育,每 48h 观察有无细菌生长。无菌生长,将培养瓶倾斜,使肉汤流过琼脂表面。阴性血培养瓶应延长培养至 30 d 后丢弃。

4. 营养变异链球菌:该种细菌的生长需要补充硫醇复合物和维生素 B₆。人血培养基中含有足够的营养成分使营养变异链球菌生长。然而传代培养时,培养基中需要补充盐酸-磷酸吡哆醛(0.001%)或 L-半胱氨酸(0.05%至 0.1%)或二者皆有,否则营养变异链球菌不能生长。也可将血培养物转种至血琼脂平板上,然后交叉划线接种金黄色葡萄球菌,在金黄色葡萄球菌菌落周围有营养变异链球菌卫星样菌落。

5. 真菌:多种方法可提高血液中真菌的检出率,包括使用需氧血培养瓶、双相培养基、裂解-离心技术和特殊营养的肉汤培养基(如脑心浸液肉汤等)。裂解-离心技术是一种分离真菌的有效方法,特别是对于营养要求苛刻的双相真菌。实际上,大多数需氧血培养瓶,孵育 5~7 d,可提供充足的营养使白念珠菌生长良好。然而对于非白念珠菌、光滑球拟酵母菌、新型隐球菌、荚膜组织胞浆菌和其他双相真菌,使用裂解-离心技术可获得最高的检出率,通常采用霉菌抑制琼脂(Inhibitory mold agar),脑心浸液琼脂和巧克力琼脂与 Isolator 管结合使用。阴性的真菌血培养应于 22~30℃ 孵育 4 周后

发终报告。

(未完待续)

6. 心内膜炎特殊致病菌:如果常规血培养 48 h 阴性而临床症状仍提示感染性心内膜炎,临床医生和微生物学家应考虑使用特殊的培养技术。对于分离一些生长缓慢,营养要求苛刻的革兰阴性杆菌(如嗜沫嗜血杆菌、人心杆菌、伴放线杆菌、啮蚀艾肯菌、金氏金氏菌、军团菌属、Quintana 巴尔通体和布鲁菌属等),应延长培养 2~4 周,然后传种特殊的培养基。如果怀疑真菌性心内膜炎,应进行裂解-离心血培养。伯氏柯克斯体或衣原体引起的心内膜炎通常进行血清学诊断。

《临床微生物学检验操作规范》编写组成员

顾问:王金良 主任:董明庆 副主任:倪安平 刘建栋

委员(按姓氏笔画为序):

马筱玲 王树琴 徐英春 倪语星 孙自镛 李桂琴

任健康 邹伟民 谷海瀛 张远春 桂炳东

(徐英春 执笔)

(收稿日期:2003-12-08)

(本文编辑:毛家都)

经验与技术交流

2-巯基丙酸协同试验检测细菌金属 β 内酰胺酶

钱小毛 毛中萍 赵仲农 宋金娥 何磊 张靓 金伟颖

我们采用 2-巯基丙酸(2-mercaptopropionic acid, 2-MPA)和头孢他啶(CAZ)双纸片琼脂扩散协同试验检测细菌金属 β 内酰胺酶,并与 EDTA 协同试验进行比较。

一、材料与方法

1. 菌株来源:185 株菌株均为临床分离的革兰阴性菌,质控菌包括大肠埃希菌 ATCC25922,产 IMP-1 绿脓假单胞菌,产超广谱 β 内酰胺酶肺炎克雷伯菌及高产 AmpC 酶阴沟肠杆菌。

2. 主要试剂:2-MPA 购自 Sigma 公司,培养基及 CAZ 纸片(30 μ g/片)系梅里埃公司产品,EDTA 纸片含 20 mmol/L 的 EDTA 溶液 20 μ l,2-MPA 纸片含 2-MPA 3 μ l。

3. 金属 β 内酰胺酶检测:将待测菌涂布于 M-H 平皿上,稍干后分别贴上 2-MPA 纸片和 CAZ 纸片,EDTA 纸片和 CAZ 纸片(纸片中心距离为 30mm 左右),36 $^{\circ}$ C 孵育过夜后观察结果。CAZ 纸片抑菌环直径扩大者即为金属酶阳性。

4. IMP 型金属酶检测:引物为 5'-CTACCGCAGCA-GAGTCTTTG-3' 和 3'-AACCAGTTTGG-CTTACCA-5',由上海生工公司合成,碱裂解法提取 DNA 模板。反应体系为 94 $^{\circ}$ C 2min 预变性,然后 94 $^{\circ}$ C 1 min,55 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1.5 min。经过 30 个循环后,最后 72 $^{\circ}$ C 10 min 延伸。扩增长度为 500 bp。

二、结果

1. 两种纸片金属 β 内酰胺酶检测结果:185 株待测菌,纸片扩散法药敏试验证实 114 株对亚胺培南和 CAZ 表现耐药。

2-MPA 和 EDTA 两种抑制剂协同试验共检出产金属酶细菌 74 株,总检出率为 64.9%。单用 2-MPA 纸片检出 72 株,检出率为 63.2%,单用 EDTA 纸片检出 69 株,检出率 60.5%,其中 2-MPA 法阳性/EDTA 法阴性有 5 株,2-MPA 法阴性/EDTA 法阳性有 2 株。两种纸片的检出率类似,但 2-MPA 和 CAZ 纸片协同效果佳,协同环大而清晰,边缘整齐,结果容易判断。

2. IMP 型金属酶 PCR 检测结果:共检测 57 株亚胺培南和 CAZ 耐药菌株,共有 32 株阳性,总检出率为 56.1%,包括绿脓假单胞菌 23 株,嗜麦芽窄食单胞菌 7 株,脑膜脓毒黄杆菌 2 株。

三、讨论

金属 β 内酰胺酶对包括碳青霉烯类抗生素在内的几乎所有 β 内酰胺抗生素均有较强的水解能力,产金属 β 内酰胺酶菌株的感染近年逐渐增加,给临床治疗带来了困难。及时检测出产金属 β 内酰胺酶菌株是控制流行的关键。因此寻找一种简便、易行、结果可靠的金属 β 内酰胺酶检测方法尤为重要,2-MPA 和 CAZ 纸片协同法具有协同效果好,结果清晰,重复性好的特点,值得临床实验室推广。

(收稿日期:2003-05-16)

(本文编辑:毛家都)