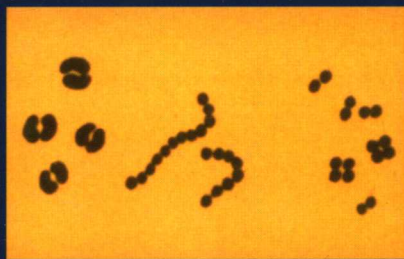
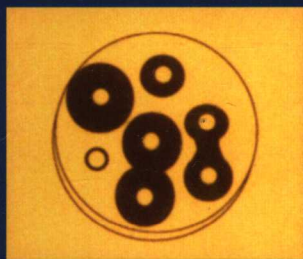


临床细菌学 实验室操作指南

B A S I C
L A B O R A T O R Y
P R O C E D U R E S



I N C L I N I C A L
B A C T E R I O L O G Y

第2版

主 译 于岩岩 赵 鸿



世界卫生组织



人民卫生出版社

临床细菌学 实验室操作指南

BASIC LABORATORY PROCEDURES IN CLINICAL BACTERIOLOGY

第2版

原 著 J. Vandepitte, J. Verhaegen, K. Engbaek,
P. Rohner, P. Piot, C.C. Heuck

主 译 于岩岩 赵 鸿

译 者 (按章节先后排序)

徐京杭 赵连荣 赵 鸿 于岩岩 李 璐
李 俊 张 政 何 豫 张恒辉 王 艳
李兴丰 王 军 孙新婷

 世界卫生组织

 人民卫生出版社

临床细菌学实验室操作指南

Basic Laboratory Procedures In Clinical Bacteriology, 2e

© 世界卫生组织 2003

版权所有。世界卫生组织出版物可从 Marketing and Dissemination, World Health Organization, 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland(电话: +41 22 791 2476; 传真: +41 22 791 4857; 电子邮件: bookorders@who.int) 获取。要获得复制或翻译世界卫生组织出版物的权利, 无论是为了出售或非商业性分发, 应向世界卫生组织出版办公室提出申请, 地址同上(传真: +41 22 791 4806; 电子邮件: permissions@who.int)。

本刊物采用的名称和陈述的材料并不代表世界卫生组织对任何国家、领地、城市或地区或其当局的合法地位, 或关于边界或分界线的规定有任何意见。地图上的虚线表示可能尚未完全达成一致的大致边界线。

凡提及某些公司或某些制造商的产品时, 并不意味着它们已为世界卫生组织所认可或推荐, 或比其他未提及的同类公司或产品更好。除差错和疏漏外, 凡专利产品名称第一个字母均用大写字母, 以示区别。

世界卫生组织采取各种措施来核实本版所包含的信息。然而, 世界卫生组织并不能保证本书所包含的信息是完整和正确的, 因此对于由此使用而带来的一切后果由读者自负。世界卫生组织对因使用本书而带来的损伤不负任何责任。

图书在版编目(CIP)数据

临床细菌学实验室操作指南/世界卫生组织编著; 于岩岩等主译. —北京: 人民卫生出版社, 2006. 6

ISBN 7-117-07538-4

I. 临… II. ①世…②于… III. 病原细菌-实验室诊断-指南 IV. R446.5-62

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 031044 号

临床细菌学实验室操作指南

主 译: 于岩岩 赵 鸿

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 67616688)

地 址: (100078) 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

网 址: <http://www.pmph.com>

E-mail: pmph@pmph.com

邮购电话: 010-67605754

印 刷: 潮河印业有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 889×1194 1/16 印张: 7.75

字 数: 230 千字

版 次: 2006 年 6 月第 1 版 2006 年 6 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 7-117-07538-4/R·7539

定 价: 20.00 元

著作权所有, 请勿擅自用本书制作各类出版物, 违者必究

(凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换)

译者序

传染性疾病预防卫生经费，在发展中国家一直占比例很高。2000 年世界卫生报告数据显示，急性腹泻每年导致 220 万人死亡。急性呼吸道感染（主要是肺炎）是另一种重要的致死原因，每年导致约 400 万人死亡。对肺吸出物的数据分析显示，在发展中国家，相对于病毒而言，细菌（如流感嗜血杆菌和肺炎链球菌）是儿童肺炎的主要原因。产 β -内酰胺酶对青霉素 G 敏感性下降的流感嗜血杆菌和肺炎链球菌已经出现在世界各地，这些情况提示，对这些病原体的检测越来越重要。

性传播疾病越来越多。仍然存在着病毒或细菌性疾病流行和大流行的威胁，而且这种可能由于流行病学监测不充分及预防措施缺乏而变得更容易发生。为了预防和控制主要的细菌性疾病，有必要发展一些用于流行病学调查和疾病监测的简单方法及简易而可靠的诊断技术。

应对这种挑战，有赖于建立在实验室的网络上的实验室服务，这个网络应该能够为卫生中心开展微生物检测，为临床医生提供有价值的诊断依据，为流行病学家提供病因信息。在不同的实验室能够开展的工作内容可有所不同，中心实验室能够开展更复杂的工作，中等水平实验室能解决部分基层实验室不能解决的问题，只有这样才能足够快地搜集到足够相关信息来提高对疾病的监测水平，早期发现少见感染的流行，能够建立、实施及评价特异性干预措施。

徐京杭 于岩岩

前 言

在发展中国家，传染性疾病是最常见的死亡原因。这些疾病的诊断和治疗对于当地卫生机构是巨大的挑战。世界卫生组织长期以来致力于开发和改进这些疾病的实验室检查的标准技术。首先，在1960年规范了细菌性疾病病原检测的方法。1976年，世界卫生组织生物标准化专家委员会提出了纸片法测定抗菌药物敏感性的要求²。

同时，世界卫生组织在实验室工作中引进了质量控制。1981年，世界卫生组织建立了针对微生物学的国际外部质量评估体系。在卫生保健系统各个层次上贯彻执行国家质量评估规划的过程中，承担这一国际质量评估工作的实验室可以起引导作用。

本书汇集并修订了世界卫生组织多年来在以下各方面的指南：实验室检测标本的取样、细菌鉴定及抗菌药物耐药性测定。这些信息有助于微生物学研究和敏感性测定方法的统一，有助于提高检测中心和中等水平实验室的检测质量。它着重阐明需要遵守的规程，而不是基本的显微镜和染色技术。后者在其他世界卫生组织出版物里有详细描写。

目 录

细菌学质量保证.....	1
引言.....	1
定义.....	1
内在质量控制.....	4
外在质量评估	13

第一部分 细菌学检查方法

第一章 血液	15
引言	15
菌血症可发生在何时何地	15
采集血液标本	15
血培养基	16
血培养的过程	17
第二章 脑脊液	19
引言	19
标本的采集和转运	19
肉眼检查	19
显微镜检查	19
初步鉴定	21
药物敏感试验	21
第三章 尿	23
引言	23
标本采集	23
培养及结果解释	24
定量尿培养结果的解释	26
鉴定	26
药敏试验	27
第四章 粪	28
引言	28

病原学和临床特点	28
合理使用实验室资源	29
粪便标本的采集和运送	30
粪便标本的性状和常规检查	30
粪便标本的增菌与接种	31
肠道病原体的培养基	31
初次分离	32
分离物的初步鉴定	33
微生物的最终鉴定	38
血清学鉴定	42
 第五章 上呼吸道感染	 47
引言	47
咽喉部的正常菌群	47
咽喉炎的致病菌	47
标本的收集和运送	48
直接显微镜检查	48
培养和鉴定	49
药物敏感性试验	50
 第六章 下呼吸道感染	 51
引言	51
最常见的感染	51
痰液标本的收集	52
痰液标本的实验室处理程序(非结核感染)	52
结核分枝杆菌的培养	55
结核杆菌培养结果的解释	56
实验室安全性要求	56
 第七章 性传播疾病	 58
引言	58
男性尿道炎	58
女性生殖道标本	60
生殖器溃疡标本	62
 第八章 脓性渗出物、创伤和脓肿	 65
引言	65
常见的临床情况和最常见的病原菌	65
标本的收集和运送	67
肉眼检查	67

显微镜检查	68
培养	69
鉴定	70
药敏试验	72
第九章 厌氧菌细菌学	74
引言	74
根据对氧气的需要量进行的细菌分类	74
细菌学	74
第十章 抗菌药物敏感试验	78
引言	78
抗菌药物敏感试验的基本原则	78
临床“耐药”和“敏感”的定义——三级分类法	78
常规药敏试验的适用场合	80
可供临床实验室常规药敏试验选择的药物	81
改良 Kirby-Bauer 法	83
直接和间接药敏试验的比较	89
影响纸片扩散法抑菌区大小的技术因素	89
质量控制	90
第十一章 血清学试验	92
引言	92
质量控制方法	92
血清学反应	93
梅毒血清学试验	94
热凝集试验	100
抗链球菌溶血素“O”试验(ASO)	101
细菌抗原试验	103

第二部分 培养基与试剂

引言	105
病原菌, 培养基和诊断试剂	105
血液	106
脑脊液	107
尿液	107
粪	108
上呼吸道	110

目 录

下呼吸道.....	111
排除性传播疾病的泌尿生殖器标本.....	111
脓和渗出物.....	112
中级微生物实验室培养基和诊断试剂的推荐表.....	113
推荐阅读材料	116

细菌学质量保证

引言

质量保证体系是保持诊断实验室工作标准及在必要的方面升级其标准的有效途径。在微生物学中，质量不仅指技术上的完美，还包括试验的速度、花费和临床相关性。总体说实验室检查比较昂贵，而且随着医学研究进展，实验室在卫生预算中所占比例持续增加。

定义

一项好的诊断必须具备临床相关性，也就是说，必须有助于疾病的预防和治疗。其他质量方面的问题还包括：

- 可靠性：结果正确吗？
- 重复性：重复实验能获得相同结果吗？
- 速度：实验速度是否够快让医生用于确定治疗方案？
- 成本-效益比：实验的花费与其能带给患者和社会的益处比较合理吗？

影响实验结果可靠性和重复性的因素

实验的错误可能来源于：

- 人员：实验室工作人员和技术员的工作表现与其所接受的教育和培训、个人经验及工作经历直接相关。
- 环境：工作空间不够宽敞、光照或通风不充分、寒冷或炎热、噪音过大或者工作条件不安全都可能影响结果。
- 标本：取样本的方法和时间以及标本的来源通常不能由实验室控制，但直接关系到实验室能否获得可靠的结果。其他实验室可控制的质量影响因素包括：标本运输、鉴定、保存和准备。因此实验室在培训负责取样本和运输标本的工作人员时有专门的规程。应该制定书面说明，让医生和护理人员定期阅读。
- 实验室材料：反应试剂、化学药品、玻璃器具、染色、培养基和实验动物的质量都会影响实验结果的可靠性。
- 实验方法：一些方法会比其他方法可靠。
- 设备：设备缺乏或维护不良会导致结果不可靠。
- 检查和阅读：匆忙阅读结果或未能检查足够的显微镜视野也会导致错误。
- 报告：抄写错误或报告不完整也会引起问题。

实验室结果判读的质量

判读在微生物学中尤其重要。考虑到速度和可靠性，为了给下一阶段选择最佳实验方法，在检查标本的每个阶段，都应该判读实验结果。

微生物实验室质量保证

质量保证包括了实验室为确保实验结果质量而做的所有工作。它必须有以下特征：

- 全面：从收集标本到给医生发送最终报告这个循环中的每一步（图1）都应涉及。
- 合理：专注于循环中最严格的步骤。
- 规律：实验进程中进行持续监测。
- 及时：一旦错误发生，及时发现及纠正。

高质量的实验室服务意味着高水平的医学

质量保证有助于确保昂贵的实验尽可能经济地使用；同时它能决定新的实验是否有效，能提高临床和公共卫生实验室水平，可能有助于在不同实验室获得可比较的结果。

质量保证的形式

有两种质量保证形式：内在的和外在的。

- 内在的质量保证 称为质量控制。每个实验室都有检查其实验质量的程序。

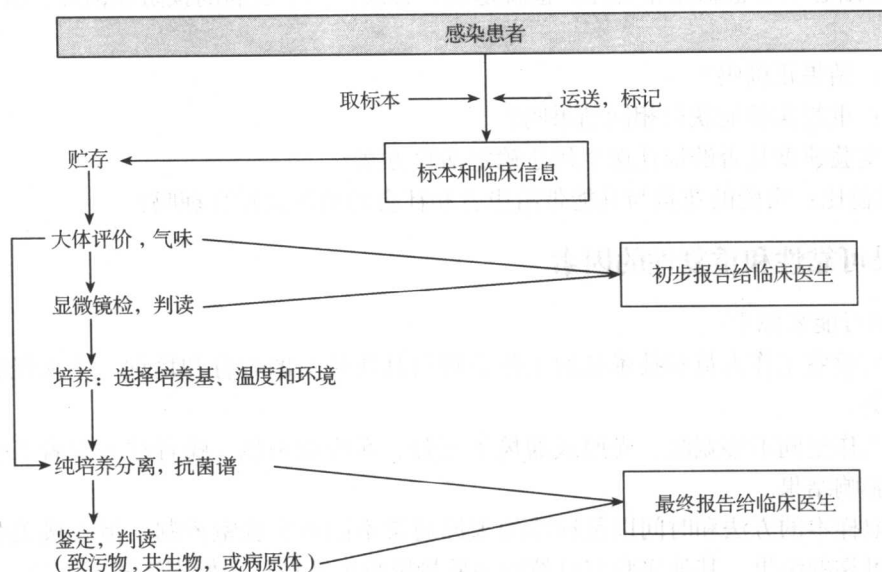


图1 实验室检测步骤

理想的内在质量控制包括：

- 实验质量的持续检测；
 - 从搜集标本到发送最终报告的所有步骤进行全面检查。
- 实验室有伦理的责任提供给病人准确而有意义的结果。

为了获得好的操作进程进行内在质量控制是绝对必要的

- 外在的质量保证 称为质量评估。实验室工作由外在的机构控制。在一些国家这些机构需要取得强制资格（由政府调节）。

外在质量评估包括：

- 实验室质量的周期性检测；

—鉴定实验和分离技术的抽查。

微生物学质量标准

临床相关性

对于一项微生物学实验来说，一项重要的质量标准是它对预防和治疗感染性疾病有多大益处；这称为临床相关性，或临床实用性。只有在临床和实验室沟通很好时才能确定临床相关性。

以下是一些证实临床相关性的例子：

1. 如果从某位住院患者的痰或者咽拭子中分离出一些革兰氏染色阴性杆菌菌落，进一步的鉴定和药敏试验就不会有临床相关性，因为任何一种措施都不会影响患者的治疗。

2. 如果分离到化脓性链球菌，药敏试验也没有太大的临床相关性，因为青霉素 G 是首选，体外敏感。

3. 如果从爆发性非出血性腹泻患者中分离到大肠埃希菌，则测定其血清型没有临床相关性，因为其血清型不与致病性直接相关。

4. 如果革兰氏染色显示“混合性厌氧菌”，则直接鉴定厌氧菌没有临床相关性。因为这费时费力，而且不影响患者的治疗。

5. 如果从呼吸道标本中分离到酵母菌，应当鉴定是否为隐球菌。而进一步的鉴定就没有临床相关性了，因为这不会影响对患者的处置。

总之，高质量的实验应当既准确又有利于感染的预防和治疗。不必分离和鉴定标本中所有不同的微生物。

可靠性

对于能给出定量结果的试验，可靠性是通过衡量实验观察结果和真值的接近程度来确定的。以下是一些例子：

—血清抗菌药物测定；

—体外抗菌药物最小抑菌浓度测定；

—血清抗体滴度。

对于能给出定性结果的试验，可靠性的测定通过观察实验结果是否正确而进行。以下是一些例子：

—病原体鉴定；

—琼脂平板纸片扩散法测定细菌的抗菌药物敏感性。

可靠性还要求使用微生物标准术语，应该应用国际公认的命名。例如，金黄色葡萄球菌不能称为“致病性葡萄球菌”；化脓性链球菌不能称为“溶血性链球菌”。

使用单一公认的方法也很必要。例如，琼脂平板纸片扩散法测定敏感性应该采用国际公认的技术，如改良 Kirby-Bauer 法。

重复性

微生物实验的重复性或精度会因为以下两个因素而下降：

1. 缺乏同质性 一位患者的一份标本中可能会含有不止一种微生物，因此重复培养可能分离出不同微生物。

2. 缺乏稳定性 标本中的微生物会随着时间的不同以不同的速度繁殖或死亡，因此重复培养可能分离出不同微生物。为了提高精度，应该在收集标本后尽快测定。

真实性（效度）

微生物实验的有效性指的是对病原体或病理情况作出正确诊断的能力。包括以下两条：

1. 诊断敏感性（灵敏度）

$$\text{敏感性} = \frac{\text{阳性结果总数}}{\text{感染患者总数}}$$

实验敏感性越高，假阴性结果越少。

例如，麦康凯琼脂培养基分离粪便中伤寒沙门菌的敏感性低。这种重要的肠道致病原常常因为非致病性肠道细菌过度生长而不能被发现。

2. 诊断特异性（特异度）

$$\text{特异性} = \frac{\text{阴性结果总数}}{\text{非感染患者总数}}$$

实验特异性越高，假阳性结果越少。

例如：

- 痰的 Ziehl-Neelsen 染色对诊断结核高度特异，因为其假阳性结果少。
- 尿的 Ziehl-Neelsen 染色特异性低得多，因为其假阳性结果多（由于非典型分枝杆菌的缘故）。
- 肥达试验诊断伤寒的特异性很低，因为相关血清型沙门菌的既往感染产生的抗体发生交叉凝集，这导致了假阳性结果。

内在质量控制

要求

内在质量控制程序要求具备可操作性、实用性和经济性。

内在质量控制不应该尝试每天评价每项进程、反应试剂及培养基。它应该按照实际计划，考虑到每个项目对实验整体的重要性，在此基础上评价每项进程、反应试剂及培养基。

步骤

内在质量控制源于正确的实验操作。

实验操作手册

每个实验室应该有一本包括以下条目的手册：

- 工作间清洁
- 个人卫生
- 安全预警
- 实验室外指定的进餐和吸烟区
- 感染性材料的处置
- 工作人员正确接种疫苗，如乙肝疫苗
- 设备维护
- 标本收集
- 标本登记

—不合适标本的清除

—标本加工

—结果记录

—结果报告

操作手册应该严格遵守，并定期修订和更新。

设备维护

细心维护实验室设备特别重要。如果设备质量差或维护不好就不可能做出高质量的实验。

表 1 所示为重要设备的直接维护内容。设备工作温度可记录在如图 2 所示的表格中。

表 1 设备质量控制

设备	常规维护	监视	技术维护和监察
厌氧广口瓶	每周清洗瓶子内壁 每次使用后再活化催化剂 (160℃, 2h) 每 3 月更换催化剂	每次使用时应用亚甲蓝指示 试纸 每周记录试纸掉色时间	每周检查封在盖子上的密 封垫
高压灭菌器	每月清洗、换水	每次使用前检查和调整水位 每次使用时记录时间和温度 或压力	每 6 月一次
离心机	每周用防腐液擦洗内壁，或 在玻璃试管破碎或液体溅出 时擦洗		定期更换刷子
玻璃器具灭菌用热 气炉	每月清洗内壁	每次使用时记录时间和温度	每 6 月一次
孵化器	每月清洗内壁和架子	每个工作日开始时记录温度 (允许温度为 $35 \pm 1^\circ\text{C}$)	每 6 月一次
显微镜	每天用完后用棉纸或镜头纸 擦拭镜头 每周清洁并润滑机械部件 不用时盖上防尘罩	每月检查电容校准装置 在防尘罩下放一碟蓝色无水 硅胶防止潮湿环境下真菌 生长	定期
冰箱	每 2 月清洁和除霜一次，或 在停电时进行	每天早晨记录温度（允许 温度为 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ ）	每 6 月一次
水浴	每月清洁内壁和换水	每天检查水位 每周第一天记录温度（允 许温度为 $55 \sim 57^\circ\text{C}$ ）	每 6 月一次

培养基

培养基可以从其基本成分开始制备或者购买脱水粉末或者购买即用品。建议购买脱水粉末，因为它们便于运输和保存，而且质量高于实验室自己制备的培养基。为了获得最好的结果，应该仔细注意以下几点：

选择培养基

高效率的实验室会尽量采购与其所做实验匹配的稳定的培养基。例如，一种好的琼脂培养基可以

细菌学质量保证

仪器 _____ 温度 _____
 房间号 _____
 每日记录，如果测出的温度在许可范围，仍要确认。如果有异常，请在相应空白处记录温度。

日期	一月	二月	三月	四月	五月	六月	七月	八月	九月	十月	十一月	十二月	日期
1													1
2													2
3													3
4													4
5													5
6													6
7													7
8													8
9													9
10													10
11													11
12													12
13													13
14													14
15													15
16													16
17													17
18													18
19													19
20													20
21													21
22													22
23													23
24													24
25													25
26													26
27													27
28													28
29													29
30													30
31													31

图2 设备温度纪录

用于血琼脂、巧克力琼脂和多选择培养基。

为了从粪便中分离致病性肠道细菌需要一种高选择培养基（伤寒—志贺菌琼脂或脱氧胆酸-柠檬酸盐琼脂）和一种低选择性培养基（麦康凯琼脂）。

空肠弯曲菌的培养应该选用特殊的培养基。

订购和储存脱水培养基

1. 订购总量应在6个月内用完，或者最多1年内用完。
2. 每个容器中的数量应该在1~2个月之内用完。
3. 一旦收到货物，应该拧紧所有容器的盖子。脱水培养基会从空气中吸收水分。在潮湿的环境中，用石蜡密封容器顶部（在瓶盖和容器间填满熔化的蜡并使其坚硬）。
4. 在每个容器上写上收货时间。
5. 保存在阴凉通风的地方。
6. 周转进货以便最先应用最早的原料。
7. 打开容器时应该标记上打开时间。
8. 舍弃所有成块的或变黑的脱水培养基。
9. 保存培养基的进货书面记录。

制备培养基

1. 严格遵守制备手册说明。
2. 制备数量应该在过期前用完。

保存制备好的培养基

1. 避光。
2. 防热，含有血及其他有机添加剂或抗菌药物的培养基应该保存在冰箱中。
3. 保存于阴凉处的培养基，有效保存期依赖于容器的类型。如：
 - 棉花-羊毛塞子试管，3周；
 - 松盖试管，2周；
 - 螺旋盖容器，3月；
 - 塑料袋密封的平皿，4周。

已制备培养基的质量控制

1. pH测定 如果培养基直接由脱水粉末制备，则不必常规检测其pH值。如果是由基本成分制备的，应该待其冷却后再测pH值。固体培养基应该用表面电极检测或在用蒸馏水泡软后检测。如果pH值偏离标准超过0.2，应该用酸或碱调整或重新制备。

2. 无菌性测定 在高压灭菌后已添加血或其他成分的培养基可直接测定无菌性。每批取3%~5%，35℃孵化2天，把其余部分放回冰箱。如果每个碟子上有多于2个菌落，则应该舍弃整批培养基。

3. 性能测定 实验室应该有1套储备菌株监测培养基的性能。表2列出了可参考的储备菌株。这些菌株可以通过常规工作或商业或官方途径获得。关于储备菌株维护和使用见后面章节内容（备用培养菌落的维护和使用——选择和来源）。

常用培养基的性能测试见表3。

进行新一批培养基的性能测试时应该遵循以下程序：

表2 为质量控制建议常备的菌株^a

革兰氏阳性球菌 粪肠球菌 (ATCC29212 或 33186) 金黄色葡萄球菌 (ATCC25923) 表皮葡萄球菌 无乳链球菌 轻型链球菌 肺炎链球菌 化脓性链球菌 革兰氏阴性需要复杂营养的微生物 卡他莫拉菌 b 型流感嗜血杆菌 β-内酰胺酶阴性 β-内酰胺酶阳性 副流感嗜血杆菌 淋病奈瑟菌 脑膜炎奈瑟菌 厌氧菌 脆弱拟杆菌 产气荚膜梭菌	肠细菌 弗氏枸橼酸菌 阴沟肠杆菌 大肠埃希菌 (ATCC25922) 肺炎克雷白杆菌 奇异变形杆菌 鼠伤寒沙门菌 粘质沙雷菌 福氏志贺菌 小肠结肠炎耶尔森菌 其他革兰氏阴性菌 鲁氏不动杆菌 铜绿假单胞菌 (ATCC27853) 霍乱弧菌 (非 O ₁ 群) 真菌 白色念珠菌
---	--

^a应该选择与实验室最相关的菌株

表3 常用培养基的性能测试

培养基	孵化时间	所培养的微生物	预期结果
胆汁-七叶树素琼脂	24h	粪肠球菌	生长, 变黑
		α-溶血性链球菌	不生长, 溶血
血琼脂	24h, CO ₂	化脓性链球菌	生长, β 溶血
		肺炎链球菌	生长, α-溶血
巧克力琼脂	24h, CO ₂	流感嗜血杆菌	生长
脱羧酶 (以灭菌油覆盖)			
—赖氨酸	48h	鼠伤寒沙门菌	阳性
		福氏志贺氏菌	阴性
—鸟氨酸	48h	鼠伤寒沙门菌	阳性
		肺炎克雷白杆菌	阴性
双水解酶	48h	鼠伤寒沙门菌	阳性
—精氨酸			阴性
白明胶酶 (快速试验)	24h	大肠埃希菌	阴性
		粘质沙雷菌	阳性
Kigle 铁琼脂 (见三糖铁琼脂)			
结晶麦康凯琼脂	24h	大肠埃希菌	红色菌落
		奇异变形杆菌	无色菌落 (不成群)
		粪肠球菌	不生长