

临 床 微 生 物 学 教 育 丛 书

CLINICAL MICROBIOLOGY EDUCATIONAL SERIES

主编

徐英春 倪语星

王金良

主审

司徒永康

审阅

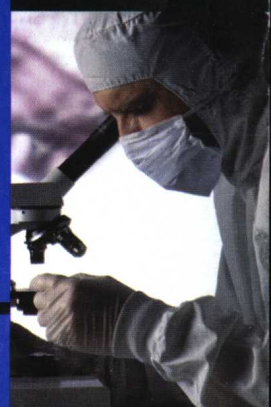
梁皓钧 任永昌

BLOOD CULTURE

血培养

GOOD LABORATORY
PRACTICES

操作规范



上海科学技术出版社

1

临 床 微 生 物 学 教 育 丛 书
CLINICAL MICROBIOLOGY EDUCATIONAL SERIES

主编 •
徐英春 倪语星
王金良
主审
司徒永康
审阅
梁皓钧 任永昌

BLOOD CULTURE

血培养

GOOD LABORATORY
PRACTICES

操作规范

上海科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

血培养操作规范/徐英春,倪语星,王金良主编.
上海:上海科学技术出版社,2002.10
(临床微生物学教育丛书)
ISBN 7-5323-6621-9

I. 血... II. ①徐...②倪...③王... III. 血液—
微生物培养 IV. R446.5

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 058807 号

上海科学技术出版社出版、发行

(上海瑞金二路 450 号 邮政编码 200020)

新华书店上海发行所经销

苏州市望电印刷厂印刷

开本 787×1092 1/16 印张 2.5 字数 31 000

2002 年 10 月第 1 版 2002 年 10 月第 1 次印刷

印数:1-4 000 定价:8.00 元

本书如有缺页、错装或坏损等严重质量问题,
请向本社出版科联系调换

内容提要

本书借鉴国际上最新的观念、方法,并结合我国的实际情况,介绍了血培养常用方法、血样采集和培养瓶接种、血培养处理标准、血培养安全处理、血培养阳性结果的处理与报告程序、质量控制与质量保证、血培养常见与不常见细菌及真菌的特殊处理、有关血培养的争议等内容,其目的在于建立一整套适合我国情况、具有可操作性的标准化操作规范。

本书可为广大临床微生物学工作者及感染性疾病专业的临床医生参考使用,为血培养规范化提供了参考工具。

主编

徐英春 倪语星 王金良

作者

赵 锐 张小江 王 辉 谢秀丽

主审

司徒永康

审阅

梁皓钧 任永昌

前言

临床微生物学诊断在感染性疾患及相关疾患的诊断、治疗、预防以及研究工作中起着越来越重要的作用。它既是实验诊断的重要组成部分,又是医学领域相对独立的学科。

在我国,临床微生物学诊断这一学科的发展相对滞后,与实验诊断的其他学科相比,尚未受到应有的、足够的重视。

医学发展的现状,尤其是感染性疾患发展的形势,要求我们必须充分重视并努力加强临床微生物学诊断这一学科的发展。

其理由:

第一,新的病原体及其所致的新的感染性疾患不断出现。WHO 已发布近 30 年来明确肯定的 30 余种新病原体,其数目现仍在不断增加。尤其是以疯牛病为代表的新病原体 prion(国内部分专家提议译为朊粒)的确定,改变了我们对传统病原体的认识,无疑对病原体的实验诊断提出新的挑战。

第二,许多传统的老病原体出现了临床新问题,对实验诊断提出了新的要求,如霍乱弧菌 O139,多种多样的致腹泻大肠埃希菌,引起中毒性休克综合征的葡萄球菌和链球菌,迅速增加的性传播性疾病病原体,基因变异的乙型、丙型肝炎病毒等,迫使实验诊断手段必须不断改进才能与之相适应。

第三,新、老病原体的耐药性明显增强,不仅带来治疗上的困难,也向实验诊断提出挑战。许多耐药细菌,如耐苯唑西林葡萄球菌(MRSA 和 MRCONS)、耐万古霉素肠球菌(VRE)、耐青霉素肺炎链球菌(PRSP)、低耐万古霉素金黄色葡萄球菌(VISA)、产超广谱 β 内酰胺酶(ESBL)、金属酶及多重

耐药的肠杆菌、非发酵菌、耐多药的结核分枝杆菌等已成为临床治疗中的棘手问题。病毒的耐药性也日趋严重。这不仅要求用正确、迅速的手段检出,而且要给临床解释性判读提供可能存在的耐药机制。

第四,临床微生物学诊断技术日新月异,明显地提高了诊断的敏感性、特异性和及时性,其突出表现是分子生物学技术的进步,微生物的基因检测手段和检验的自动化或半自动化正在改变着微生物检验的面貌。

这一切要求临床微生物学检验工作者重新学习、更新知识、改进技术、提高水平,于是“临床微生物学教育丛书”就应运而生了。

本丛书编写的指导思想及其特点是:

一、突出规范化操作这一中心。就微生物学诊断的主要领域各成一分册,如血培养操作规范、抗微生物药物敏感性试验规范、细菌性腹泻实验诊断规范等将陆续出版。

二、重在规范常规检验技术,介绍国内外认可的、最为适用的、可靠的技术方法,同时力求反映微生物实验诊断的最新成果与信息。

三、吸取美国微生物学会(ASM)的 CUMITECH 先进经验,又努力结合我国的实际情况,力求兼具先进性与实用性。

四、每分册均由国内富有经验的专家编写并集体讨论,由香港专家指导审阅,由香港中文大学微生物科主任司徒永康教授主审。

为方便读者用活页夹存放本套丛书,所以在版面设计时做了适当安排。

全体编审者热切希望本丛书能为规范我国的微生物学检验技术做出努力,但规范也要随着技术发展而改变,正如 CUMITECH 仍在不断更新一样。我们希望本丛书在国内同仁们的实践中不断完善。我们真诚期待大家的评论与指正。

主编

目 录

3	一、血培养常用方法的评价
	(一) 手工血培养系统.....3
	(二) 自动化血培养系统.....5
9	二、血样采集和培养瓶接种
	(一) 采血指征.....9
	(二) 皮肤消毒程序.....10
	(三) 培养瓶消毒程序.....10
	(四) 穿刺静脉和培养瓶的接种程序.....11
	(五) 采血量.....12
	(六) 血液和肉汤比(稀释因子).....12
	(七) 血培养的数量和采血时间.....12
14	三、血培养运输、接收及不规范的处理标准
	(一) 血培养的运输标准.....14
	(二) 血培养的接收标准.....14
	(三) 血培养不规范处理方法.....15
16	四、血培养安全处理
	(一) 正确采集血培养标本预防感染的安全 程序.....16
	(二) 微生物实验室处理血培养标本预防感 染的安全程序.....17
18	五、血培养阳性结果的处理与报告程序
	(一) 血培养阳性结果的处理.....18
	(二) 血培养阳性结果的报告程序.....20
22	六、质量控制与质量保证
	(一) 质量控制.....22

	(二) 质量保证.....	23
26	七、血培养常见、不常见细菌及真菌的特殊处理	
	(一) 血培养常见菌.....	26
	(二) 分枝杆菌.....	26
	(三) 细胞壁缺陷的细菌(L 型细菌).....	26
	(四) 布鲁菌属.....	27
	(五) 营养变异链球菌.....	27
	(六) 真菌.....	27
29	八、有关血培养的争议	
	(一) 中和抗生素试剂的争议.....	29
	(二) 厌氧血培养的争议.....	30
	(三) 实验室对内置血管导管相关败血症评价的争议.....	30

血培养是把静脉穿刺获得的血液接种到一个或多个培养瓶或培养管中,用来发现、识别细菌或其他可培养分离的微生物(如大肠杆菌、念珠菌属、霉菌属等),这些微生物存在于血液中形成菌血症或真菌菌血症。在病人的血液中检测出微生物对感染性疾病的诊断、治疗和预后具有重要的临床意义。当细菌或真菌在血液中迅速繁殖超出单核吞噬细胞系统清除这些微生物的能力时,即产生持续的菌血症,并且可感染血管外组织。病原微生物从血管外经淋巴管直接进入血流,病人可发生血管内感染(如感染性心内膜炎、真菌性动脉瘤、化脓性静脉炎、感染性动脉瘤和动静脉管炎)。

除多处感染或动脉内有感染灶外,大量涌入血流的细菌能在几分钟至数小时内被全部清除,肝和脾脏中的巨噬细胞对清除血流内的细菌起着重要作用,特异性抗体有促清除作用,多形核白细胞在控制血管外局部感染中起重要作用,血管内的中性粒细胞也有一定清除微生物的作用。但细菌的荚膜和毒力因子却阻碍了清除作用的进行。

了解引起菌血症的不同途径有助于诊断和解释血培养结果。菌血症通常来源于以下部位的感染,其中泌尿生殖道为25%,呼吸道为20%,脓肿为10%,外科伤口为5%,胆道感染为5%,其他已知部位的感染为10%,未知部位的感染为25%。

菌血症的临床类型:

1. 一过性菌血症(transient bacteremia) 常发生在病人接受抗生素系统治疗且感染的微生物敏感,由条件致病菌引起,可能造成严重的后果。一过性菌血症发生

于治疗初期是由于抗生素的血药浓度不当,发生于治疗晚期是感染部位引流不当或宿主防御功能破坏。常发生于对感染组织(如脓肿、疖、蜂窝组织炎)的处理、污染黏膜表面的创伤性操作(牙齿修复、膀胱镜检、尿道扩张术及各种插管、引产和乙状结肠镜检查)和污染区的外科手术(经尿道的前列腺切除、阴道子宫切除术和烧伤感染的清创术)。一过性菌血症亦可发生在全身或局部感染的早期。据文献报道,脑膜炎、肺炎、化脓性关节炎、骨髓炎、腹膜炎、胆囊炎、小肠结肠炎、外伤或手术感染均可能引发一过性菌血症。

2. 持续性菌血症(continuous bacteremia) 是感染性心内膜炎、感染性动脉瘤、血栓性静脉炎和其他血管内膜感染的主要特征,亦常发生在伤寒热和波浪热的最初几周。

3. 间歇性菌血症(intermittent bacteremia) 常发生于腹腔、骨盆、肾周、肝脏、前列腺及其他部位未能及时引流的脓肿,这些脓肿是不明发热的常见原因。

一、血培养常用方法的评价

目前血培养常用的方法包括手工血培养系统和自动化血培养系统。手工血培养系统主要包括传统肉汤培养法、压力计法和双相法。自动化血培养系统包括半自动系统和全自动连续监测系统。

(一) 手工血培养系统

1. 传统肉汤培养法 传统或直观的手工肉汤培养监测法是一种技术最简单、劳动强度较大的血培养方法。含有补充物的需氧和厌氧肉汤培养基含各种微生物生长所需的营养物质,需氧和厌氧培养基肉汤量应与抽血的量相吻合,以保证血液和肉汤比为1:5~10。聚茴香脑磺酸钠(SPS)是常用的抗凝剂,肉汤中加入一些补充物可保证细菌选择性生长。商用手工血培养瓶富含二

氧化碳(CO_2)气体,孵育后可形成需氧环境。

手工培养瓶要求每天或更频繁地检查细菌生长的可视信号,通常培养7d。孵育6~18h后常规将血培养肉汤转种和(或)涂片革兰染色或吡啶橙(aeridine orange)染色,有利于早期发现微生物生长,而对肉眼血培养阴性的血培养瓶进行盲传或终点转种及涂片镜检毫无价值。传统肉汤法能较好地培养厌氧菌。

2. 压力计法 该法是Oxoid Signal血培养系统,它由一个传统肉汤培养瓶和一个感应器构成。感应器是由外接一个长针的塑料透明贮液器构成。血液加入到培养瓶后,感应器的针头通过瓶塞插入到肉汤中。微生物生长产生的气体增加了内部的气压,此气压迫使肉汤培养液通过针头进入到贮液器中,在

贮液器中有培养液出现指示肉汤中有微生物生长。

1986年首先报道了Oxoid Signal血培养系统,并与其他各种血培养方法进行了对照评估。Oxoid Signal血培养系统的缺陷是假阳性率高,对不动杆菌属、假单胞菌属、念珠菌属、流感嗜血杆菌和奈瑟菌属的检出率低。降低假阳性率可通过孵育培养瓶至35℃后再插入感应器针头,或在孵育的48 h内摇动培养瓶而改善其性能。

3. 双相法 1947年, Casteneda首先描述了用于检测布鲁菌属的方法,这种方法使用的培养基已在过去的20年中发展成商品。Septi-Chek、Opticult系统(Becton-Diskinson的微生物系统)及Hemoline双相瓶(BioMerieux的产品)是双相法的代表产品。双相瓶内含肉汤和琼脂,注入血液后,颠倒培养瓶使肉汤血液流向琼脂表面,孵育培养瓶,每天检查肉汤内和琼脂表面上的微生物生长情况。

与传统肉汤培养法相比,双相瓶能使临床上重要的需氧菌、兼性厌氧菌和真菌较好地生长,缩短了检测微生物生长的时间。

要点:

任何一家临床微生物实验室都应建立完善的血培养方法,对临床感染急症病原微生物的检测至关重要。经济条件差的实验室,应该建立传统肉汤培养法,制备营养丰富的肉汤基础,可自制血培养瓶:先向瓶内注入营养丰富的肉汤,然后将瓶盖松开,盖上铝盖,121℃、20 min 灭菌;趁肉汤还热的时候,立即牢牢旋紧瓶盖,不要去掉铝盖,否则瓶盖就不是无菌环境,用封盖钳子夹紧铝盖;当肉汤冷却后,瓶内形成一个真空区,便于注入血标本。有条件的可购买商品双相瓶。手工血培养的要点:①在抽血培养前严格进行皮肤消毒。②每个病人从不同部位至少抽2瓶血培养。③采集推荐的血液量。如果血液不足,只能接种一个需氧瓶。④送到实验室前不能放入冰箱内。⑤从采血到孵育培养瓶不能超过12 h。⑥每天肉眼检查培养瓶,可疑阳性一定要进行革兰染色。⑦培养1、3、5 d或肉汤明显混浊,需进行转种。⑧转种的培养基种类取决于革兰染色的结果。⑨

阳性标本做直接抗生素敏感试验。^⑩快速报告革兰染色、培养和药敏结果。^⑪在培养 48h 后,阴性结果也应向临床报告,对临床非常有益。^⑫分离的菌株至少保留几周。

手工血培养系统操作流程图见图 1。

(二) 自动化血培养系统

1. 半自动 BACTEC 放射性系统 BACTEC 放射性系统 (由 Becton

Dickinson 生产)是第一代半自动化血培养系统,虽然它不再广泛用于常规血培养,但它仍然普遍用于分枝杆菌的培养和监测。

2. 自动化连续监测系统 自动化连续监测血培养系统检测微生物生长,并产生一电信号,仪器自动报警,指示血培养阳性。目前商用自动化连续监测系统主要包括: BACTEC 9000 系统、BacT/Alert 系统和 Vital 系统。

(1) BACTEC 9000 系统

BACTEC 9000 系统 (Becton Dickinson 公司的微生物系统)含有一台微型信息处理机和一个探测器/传感

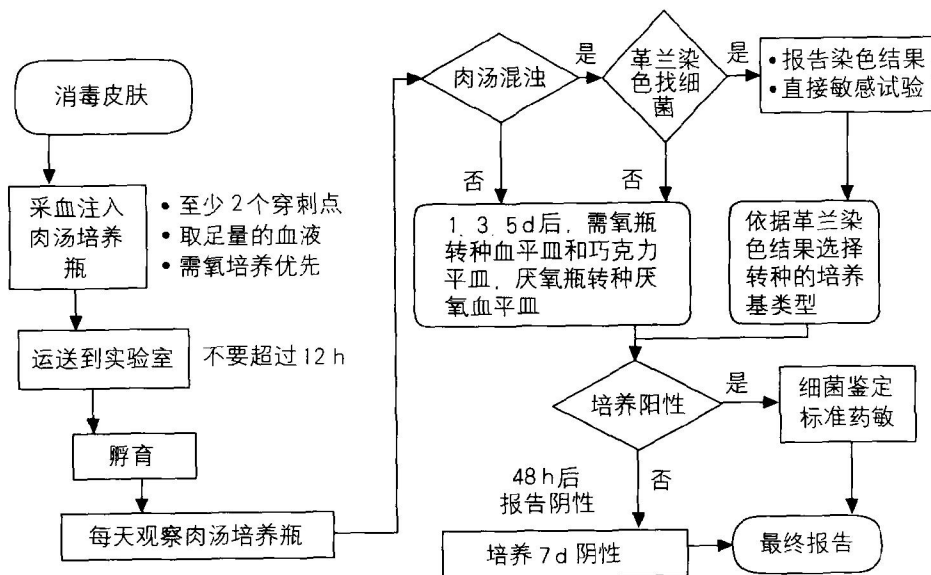


图 1 手工血培养系统操作流程图

器。探测器由一个发光二极管和一个吸收光二极管组成,位于培养箱内每个瓶孔的底部。 CO_2 传感器位于每个培养瓶的底部,指示剂是荧光。探测器对每个培养瓶每10 min扫描1次,仪器报警指示阳性。培养瓶以30 r/min摇动。目前,BACTEC 9000系统有三种类型:9120型容纳120瓶;9240型容纳240瓶;9050型容纳50瓶。一台微型信息处理器能同时连接5台探测器孵箱,最多容纳1200瓶。

BACTEC 9000系统的培养基包括标准需氧/厌氧瓶、树脂需氧/厌氧瓶和树脂儿童需氧瓶。所有培养瓶除儿童瓶外均能容纳10 ml血液,最终血液与肉汤比为1:2.5。儿童瓶能容纳0.5~3 ml血液,血液与肉汤比为1:13.3~80。需氧瓶在孵育之前不需送气。

(2) BacT/Alert系统 BacT/Alert系统(Organon Teknika公司生产,现被BioMerieux公司收购)采用光电比色法来监测血培养瓶中微生物生长代谢产生的 CO_2 。BacT/Alert监测系统由一个传感器和一个比色探测器构成。传感器对 CO_2 敏感并附着在血培养瓶的底部。比色探测器位于培养箱内每个瓶孔底部,由一个发光二

极管和一个吸收光二极管组成。传感器通过 CO_2 渗透膜把肉汤隔开,细菌产生的 CO_2 通过薄膜扩散并与传感器中的指示剂反应,产生颜色变化,由蓝绿色变成黄色,光电二极管探测器产生一个电压信号并与传感器中的颜色变化成比例。此探测器对每个培养瓶10 min扫描1次,仪器报警指示阳性。BacT/Alert系统的经典型包括:240型容纳240瓶,120型容纳120瓶,一台微型处理器最多能连接6台探测器培养箱,最多容纳1440瓶,培养瓶以70 r/min摇动;3D型每个探测器培养箱能容纳240瓶,一台微型处理器最多能连接6台探测器培养箱,最多容纳1440瓶。

BacT/Alert系统的培养基包括标准需氧/厌氧瓶、吸附炭需氧/厌氧瓶和吸附炭儿童瓶。所有培养瓶除儿童瓶外均能容纳10 ml血液,最终血液与肉汤比为1:4。儿童瓶能容纳4 ml血液,血液与肉汤比为1:5。新型需氧瓶不需送气。

(3) Vital系统 Vital系统(BioMerieux公司产品)由一台培养箱/探测器和一台微型信息处理机组成。培养箱能容纳400瓶。一台信息处理机能连接3台培养箱,最大容量为1200

瓶。血培养瓶以 150 r/min 水平式摇动。

Vital 系统的肉汤培养基含有荧光指示剂,用于监测微生物的生长。肉汤培养基中的氧化还原作用、pH 或 CO₂ 含量的变化抑制了指示剂的荧光,仪器报警指示阳性。发光二极管/光子探测器每 15 min 对每个培养瓶监测 1 次。Vital 系统也使用了一个最小荧光阈值

用于立即监测延迟孵育的培养瓶中微生物的生长。

Vital 系统有 40 ml 肉汤培养基的需氧瓶和厌氧瓶。培养前瓶子不需要送气。

自动化连续监测血培养系统的特点及自动化连续监测血培养系统用培养基与采血量见表 1、2。

表 1 自动化连续监测血培养系统的特点

系统	生长指示剂	检测原理	每培养箱的容量(瓶)	每系统培养箱数(箱)	每系统最大容量(瓶)	检测频率(min)	搅动类型及速度
BACTEC 9000	CO ₂ 产物	荧光法	50、120、240	5	1 200	10	摇动, 30 r/min
BacT/Alert	CO ₂ 产物	比色法	120、240	6	1 440	10	摇动, 70 r/min
Vital	CO ₂ 产物、pH 变化或氧化还原变化	荧光法	200、300 或 400	3	1 200	15	水平, 150 r/min

表 2 自动化连续监测血培养系统用培养基与采血量

系统类型	培养瓶类型	肉汤量(ml)	肉汤基础	接种血量(ml)	血液与肉汤比	抗凝剂浓度(%)
BACTEC 9000	标准需氧/厌氧瓶	25	SCD	10	1:2.5	0.050/SPS
	树脂需氧/厌氧瓶	25	SCD	10	1:2.5	0.050/SPS
	树脂儿童需氧瓶	40	SCD	0.5~3	1:13.3~80	0.025/SPS
BacT/Alert	标准需氧/厌氧瓶	40	SCD	10	1:4	0.035/SPS
	吸附炭儿童瓶	20	BHI	4	1:5	0.020/SPS
	吸附炭需氧瓶	40	TSB+BHI	10	1:4	0.050/SPS
	吸附炭厌氧瓶	40	TSB+BHI	10	1:4	0.050/SPS
Vital	需氧瓶/厌氧瓶	40	SCP	10	1:4	0.025/SPS

注: SCD 大豆酪蛋白消化汤; BHI, 脑心浸液; SCP, 大豆酪蛋白胨汤; SPS, 聚茴香脑磺酸钠; TSB, 胰酶消化大豆汤。

要点:

自动化连续监测血培养系统,减低了劳动强度,电脑探测器提高了检测的敏感性,但增加了血培养成本,目前不可能普及到所有的临床微生物实验室。按操作手册推荐的程序操作自动化培养仪器。血培养瓶如不能及时送检,一定要尽量缩短延迟上瓶时间,采血后室温保存培养瓶。每天操作系统之前,通过仪器维护,确保机械功能正常。仪器

报警阳性后,立即革兰染色,结果阴性,补做吡啶橙染色。转种阳性培养瓶,可根据染色结果选择适当的培养基,做初级药敏试验(或称直接药敏试验)和初级鉴定。所有阳性瓶,革兰染色结果阴性和阳性都应该转种培养,重新上瓶继续监测,按试验程序完成孵育期限。

自动化血培养连续监测系统操作流程见图2。

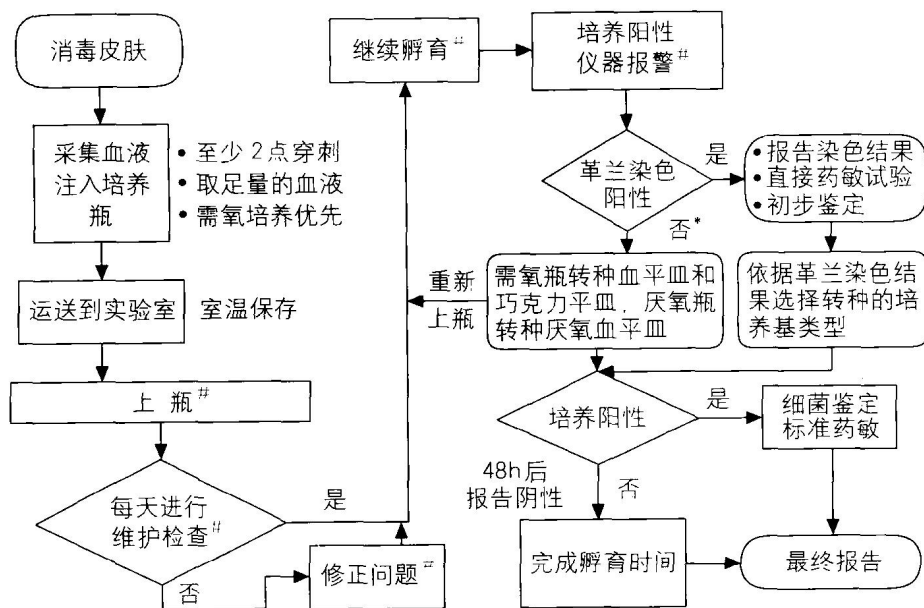


图2 自动化血培养连续监测系统操作流程

#, 遵循操作手册; *, 用吡啶橙染色复查