

临床微生物学教育丛书
CLINICAL MICROBIOLOGY EDUCATIONAL SERIES

主编

倪语星 王金良
徐英春 胡必杰

主审

司徒永康

审阅

梁皓钧 任永昌

PROPER SPECIMENS COLLECTION

病原学检查标本采集、运送和保存

GOOD LABORATORY
PRACTICES

规范

上海科学技术出版社



6

主编

倪语星 王金良 徐英春 胡必杰

作者

倪语星

主审

司徒永康

审阅

梁皓钧 任永昌

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,主要介绍病原学检查标本的生物安全,标本的采集和选择,病毒、立克次体、衣原体、支原体的转运,标本的运送,标本的接收和拒收原则,标本优先处理的原则,以及各类标本的处理。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临床各专业医生参考使用。

前 言

临床微生物学诊断在感染性疾病及相关疾病的诊断、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,尤其是感染性疾病发展的形势,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病不断出现。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 0139,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,如耐甲氧西林葡萄球菌(MRSA 和 MRNS)、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已出版。

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

2

一、标本的采集

- (一) 生物安全.....2
- (二) 标本的选择和采集.....2
- (三) 病毒、立克次体、衣原体及支原体标本的转运...4
- (四) 标本的运送.....4
- (五) 标本的接收和拒收原则.....5
- (六) 标本优先处理的原则.....7

10

二、标本的采集方法和处理原则

- (一) 血液标本.....10
- (二) 脑脊液标本.....14
- (三) 其他无菌体液标本16
- (四) 呼吸道标本.....18
- (五) 胃肠道标本.....28
- (六) 尿标本.....32
- (七) 生殖道标本.....35
- (八) 伤口标本.....38

要有效地利用实验室,发挥病原学诊断的作用,标本的正确选择、采集和运送十分重要。首先要做好标本的采集和处理工作,否则实验室所做的工作几乎没有什么价值。因此在检验的整个过程和各个环节中,医院各部门的人员都必须了解保证标本质量的重要性和必要性。实验室有责任提供相关信息资料和专业知识,包括详尽的安全标准,标本的选择、收集、运送、接收、填写及粘贴标签的标准,并使之编入各科室的操作手册中。本篇提供病原学检查标本的正确采集、处理规范和指南。

一、标本的采集

(一) 生物安全

生物安全的问题极其重要,必须受到重视。有些工作人员可能并不清楚运往实验室的标本中有潜在的病原体,所以要制定安全规章制度以保护实验室人员和其他可能接触到病原体的人员。多数微生物实验室的手册中包含实验室生物安全的内容,实验室操作手册中还应该包括有关标本管理安全操作的内容,而且每个实验室都应该备有生物安全的专业参考资料。这些参考资料应该包括微生物实验室生物安全的等级和分级管理要求,并制订如何处理和丢弃感染性材料的严格措施。

直接与标本管理有关的安全措施为:

1. 标本收集过程中必须戴手套、穿工作服,必要时戴面罩或护目镜。

2. 标本的容器必须防漏。标本集中

运送时应将盛有液体标本的试管竖立插入试管架,再将试管架放入一个有盖并有标记的专用塑料运送箱中。少量标本单独运送时应将试管放入密封的、防漏的塑料袋中并做好标记。

3. 严禁将针头暴露的注射器送到实验室。应将注射器中的标本注入无菌密封的试管中,或将针头用无菌塞子堵住,放在一个密封的、防漏的塑料袋中。

4. 严禁将渗漏的标本容器送往实验室或者进行处理。应该及时向医生通报容器渗漏,并解释如果继续处理可能会出现的安全问题,要求重新采集标本,将渗漏的容器消毒后丢弃。

(二) 标本的选择和采集

采集标本时必须选择能代表病情发展过程的标本的种类和采集部位,否

则就没有临床意义。一些常见的易被污染的标本和部位包括：①尿液，容易被前尿道或会阴部微生物污染。②血液，常被静脉穿刺部位的共生菌污染。③子宫内膜，可能被无关的阴道杂菌污染。④瘘道，可能存在来自胃肠道的微生物。⑤中耳，在使用耳刷采集标本时可能被外耳道的细菌污染。⑥鼻窦，可能存在鼻咽部的细菌。⑦皮下感染和表浅的伤口，易被皮肤和黏膜上的细菌污染。

普通标本选择与采集的基本原则为：

1. 避免常居菌群随时可能造成的污染，以确保采集的标本能代表感染过程。许多感染部位内的病原菌可能在健康人体内属于正常菌群。这些（来自皮肤、黏膜或呼吸道）正常菌群可能会干扰正确的检验结果，由于正常菌群的过

度生长也会掩盖真实的病因。

2. 选择正确的解剖部位，并以适当的技术、方法和设备采集标本（表1）。

3. 厌氧培养标本必须选择适当的部位（表1），首选组织活检或用注射器吸取穿刺液标本，拭子是不好的厌氧培养标本。不要将标本冷藏，而应该将标本放在室温环境中。

4. 采集足量的标本，样本量不足也可能产生假阴性结果。

5. 每份标本都应贴上标签，要标明病房、病人姓名、住院/门诊号、标本来源、采集部位、采集日期（时间）和采集者姓名等。

6. 将标本放在有利于可疑病原菌存活的特制的容器内，防止渗漏，无安全隐患。

表1 适用于厌氧培养的各种临床材料

可接收标本	不可接收标本
抽吸物（用注射器或采集针）	拭子
前庭大腺标本	宫颈分泌物
胆汁、血、骨髓、窦内吸出物	前列腺液和精液
支气管镜采集的标本（保护性毛刷）	未防污染的支气管灌洗液、气管切开吸取物
输卵管穿刺或后穹窿穿刺标本	子宫颈、阴道或外阴拭子
卵巢、胎盘（经剖宫产术取得）、子宫内膜抽吸物	恶露、污染的子宫颈内拭子
粪便（检测艰难梭菌）	粪便或直肠拭子
气管穿刺吸取物	痰（自行咳出或诱导）、鼻咽拭子
耻骨上方穿刺尿	中段尿、膀胱尿或导管尿

(三) 病毒、立克次体、衣原体 及支原体标本的转运

用于运送细菌的方法和转运培养基并不适合于病毒和衣原体的转运。病毒转运培养基(viral transport media, V T M)要求防止干燥,在转运过程中能保持病毒的活性,同时防止污染杂菌的过度繁殖。

液体运送系统的缓冲液中往往含有牛血清蛋白(bovine serum protein B S A)、凝胶或胎牛血清(fetal bovine serum, F B S),并加入对病毒没有抑制作用的抗生素。用于病毒检验的组织标本也应该置于这种培养基中。含蔗糖的液体运送系统(如 2-SP)可用于运送病毒和衣原体,因为其所用的抗菌剂对衣原体没有抑制作用。

用含有新生儿阴茎包皮成纤维细胞的转运系统(有商品供应)有助于巨细胞病毒和单纯疱疹病毒的检测。这种培养基用于仅能在成纤维细胞中生长的病毒的运送。

不含钠的谷氨酸盐缓冲液可促进立克次体繁殖。含有 B S A 的蔗糖-磷酸盐-谷氨酸盐运送培养基常用来运送立克次体、支原体和衣原体。此外,探针标

记、扩增系统、酶免疫检测(E I A)抗原探测系统的供应商通常会建议或提供适合自己产品的运送培养基和专用拭子,用于收集和运送标本。

(四) 标本的运送

1. 所有的标本都必须立即送往实验室,最好在 2 h 内。如果不能及时运送,应将标本按表 2 中规定的条件存放。

2. 细菌学检验标本的存放一般不能超过 24 h,而病毒检测标本在 4℃ 条件下可存放 2~3 d。

3. 最佳的临床标本送检(包括厌氧菌培养标本)首先取决于所获取标本的量。量少的标本应在采集后 15~30 min 内送检。活检组织如果采用厌氧运送方式,可于 25℃ 存放 20~24 h。

4. 对环境敏感的微生物如志贺菌、淋病奈瑟菌、脑膜炎奈瑟菌和流感嗜血杆菌(对低温敏感)应立即处理,禁止冷藏脊髓液和生殖道、眼部、内耳道标本。

5. 从病房或实验室将临床标本或有传染性的物质运往另一个实验室,不论距离长短,都要求严格注意标本的包装和标签说明。所要运送的标本必须正确标记、包装和保护;运送工具上也应

该标明运送生物材料。送检途中要注意 安全防护。

表2 各种运送系统的保存条件和可疑的病原菌

防腐剂/运送系统	℃保存	4	℃保存	25
无防腐剂	活检组织、气管冲洗物、导尿管、静脉导管、脑脊液、肺活检、心包积液、痰、尿液(各种来源)		脑脊液(检测细菌)、关节滑液	
厌氧运送			腹水、羊水、厌氧培养物、吸取物、胆汁、盲肠、深部病变、子宫内避孕装置(分离放线菌用)、肺内吸取物、胎盘(取自剖腹产术)、窦内吸取物、组织(外科)、气管内吸取物、尿液(经耻骨上穿刺吸取)	
直接接种于培养基			角膜碎片、血培养、培养皿、玻璃体液	
厌氧运送培养基	烧伤伤口组织、弯曲菌、外耳、志贺菌、弧菌、耶尔森菌		骨髓、子宫颈、结膜、棒状杆菌、内耳、生殖道培养、鼻咽部、奈瑟菌、沙门菌、上呼吸道培养	

(五) 标本的接收和拒收原则

应该重视标本的质量,对不规范采集、保存和运送的标本要采取纠正措施。如果检测失控的标本,那么得出的结果会给医生提供错误的信息,导致误诊和治疗不当。因此,实验室必须制订并严格执行严格标本接收和拒收准则。

实验室为保证标本质量而制订的标本拒收制度为:

1. 无标签 不检测,并与送检的医生和护士联系。对于非侵害性方式获取的标本(尿、痰、咽拭子标本),要求重新

采集送检。如果是侵入性采集标本(如穿刺液、体液或组织标本),只有在与采集此标本的医生商量之后方可接收检测,并要在报告上注明此问题,将其记录存档。

2. 送检延误 不接收,提醒送检者,要求重新采集。在报告单上注明“送检延误”。

3. 送检容器不当或渗漏 不接收,告知送检者,要求重新采集,在报告单上注明出现的问题及采取的更正措施。

4. 标本不符合要求(如厌氧培养标本却按需氧培养标本送检) 不接收,联系送检者,阐明试验要求,指出不符

合要求之处,要求重新采集符合试验要求的标本。

5. 同一天内收到同一检测目的的相同标本(血液标本除外) 不检测,将标本正确保存于适当温度。与送检者联系并说明标本重复不予处理,并在报告单上注明。

6. 例外的情况 就是即使得到的标本质量不好也必须做检测,如情况特殊或取材困难等。在一些情况下,由于标本的临床意义值得怀疑而不必进行检测。表3列举了一些不能为临床提供有价值信息的标本,应该取消检测。

无菌体液标本可能来自严重的或

表3 临床意义可疑而不应检测的标本

标本类型	处理意见
烧伤创面及创伤伤口(拭子)	建议重送组织标本或抽吸物
结肠造口分泌物	不予采用
褥疮(拭子)	建议重送组织标本或抽吸物
Foley 导尿管前段	不予采用
坏疽病灶部位拭子	建议重送组织标本或抽吸物
新生儿胃吸取物	不予采用
恶露	不予采用
齿周病灶(拭子)	建议重送组织标本或抽吸物
直肠周围脓肿(拭子)	建议重送组织标本或抽吸物
溃疡(拭子)	建议重送组织标本或抽吸物
呕吐物(除霍乱检验外)	不予采用

危及生命的病人,必须迅速、正确地处理。体液标本是否需要离心,是直接接种琼脂平皿还是需要接种血液培养瓶

增菌,都应写入实验室规程,并根据规程操作。表4列举了一些处理无菌体液的建议。

表4 无菌体液标本的处理

体液	采集容器	浓集	染色	注释评估
羊水	厌氧管	不必	革兰染色	
后穹窿穿刺液	厌氧管	不必	革兰染色	
透析液	分离管或 Bx2	离心或过滤	革兰染色或吡啶橙染色(检出率低)	白细胞<100 个为正常
心包液	血培养瓶和	离心	取浓集液革兰	白细胞<300 个/ml

(续表)

体液	采集容器	浓集	染色	注释评估
腹水	(或)厌氧管	离心	染色	为正常
	Bx2(10 ml)+厌氧管		革兰染色	白细胞<300个/ml 为正常
胸腔积液(渗液、漏出液、胸腔穿刺液、积脓)	厌氧管	离心	革兰染色	做真菌学检验需 >5 ml,少或无白细胞 为正常,积脓可有 大量白细胞
滑液	Bx2+厌氧管	离心	革兰染色	少量白细胞为正常

注: Bx2, 需氧和厌氧血培养瓶。

(六) 标本优先处理的原则

送到实验室的标本应尽可能马上进行处理。为了加速标本处理的过程, 实验室应制订一套区分标本处理优先次序的方法。总的来讲, 标本可归为3类: 紧急、常规和选择性。

1. 紧急标本 需紧急处理的标本常提示疾病可能危及生命, 需要立刻处理(无论病人在医院何处), 以使初步信息能在标本到达 30 min 到 1 h 内及时告知临床医生。需要紧急优先处理的标本如下(表 5)。

其他含苛养菌或类似淋病奈瑟菌

表5 需要紧急优先处理的标本

标本	来源
血液	无论来源何处
脑脊液	无论来源何处
经气管吸取物	无论来源何处
眼部标本(如眼内炎)	无论来源何处
心包积液	无论来源何处
羊水	无论来源何处
下呼吸道标本	来自 ICU
外科标本	来自 ICU
关节液	如果诊断为化脓性关节炎

注: ICU, 重症监护病房。

的标本均应快速检测。

2. 常规标本 常规性标本常来自短期内无生命危险病人,但是这些标

本可能提示有严重的感染,需要确诊或采取治疗、预防性措施。这些标本如下(表6)。

表6 常规标本

标 本	来 源
咽喉标本	无论有否诊断或来源何处
烧伤	无论有否诊断或来源何处
眼部标本	无论有否诊断或来源何处
取自导尿管的尿液	如果诊断为泌尿道感染
各种方式取得的尿液	来自 ICU
女性生殖道标本	产科或妇科或外科,如果诊断为败血症或败血性流产
外科标本	来自手术室
下呼吸道标本	如诊断为肺炎
腹水	如诊断为腹膜炎

3. 选择性标本 除了上述紧急性和常规性标本之外的便是选择性标本。选择性标本同其他标本一样,需经过熟练和正确的处理,只是在处理的时间上有轻重缓急之分。

建立处理、报告紧急标本的制度不仅对危重病人很重要,也是美国临床实验室修正法案(CLIA 98)所明确要求的。微生物实验室必须规定哪些标本是紧急的,需要优先处理。为满足医生迅速了解某一病人的情况,报告单上必须留出空间,以便让医生注明标本结果是

否需要立刻知道(在1h内或更短的时间内)。同样,临床医生也应该知道实验室有责任在短期内告知他们哪些标本的紧急检验结果。

对一份需要紧急处理的标本,必须进行快速和精确的检测,并且应该将初步结果电话告知临床医生,与医生联系的情况也应该在报告单上注明。在电话号码簿或计算机标本记录或其他地方注明结果已被电话通知,包括日期、告知的医生、通知的信息及打电话的实验室人员姓名。

要点：

1. 病原学检查标本的选择和采集原则是：①避免正常菌群的污染。②选择合适的解剖部位，并以正确的方法和设备采集标本。③采集足够数量的标本。④每个标本都要有明确的标记，标明病人的姓名、住院号、来源、采集部位、采集日期(时间)和最初的采集者。⑤标本必须放在合适的无菌容器内，防止渗漏。

2. 标本的运送必须及时，如果不

能及时运送，应该适当保存。用于运送的材料应正确包装和保护，并有明确标记。

3. 临床微生物实验室必须制订一套严格的标本接收和拒收标准，对不符合要求的标本要坚决退回，以免浪费资源和误导临床，或产生安全问题。

4. 临床微生物实验室必须规定哪些标本是紧急的，需要优先处理。对需要紧急处理的标本必须进行快速和精确的检测，并在最短的时间内将初步结果电话告知临床医生。

二、标本的采集方法和处理原则

（一）血液标本

血液是实验室所接收的最重要的标本之一。送检血液标本有助于识别由细菌、真菌引起的菌血症、脓毒症、心内膜炎和人工瓣膜感染、化脓性血栓性静脉炎以及其他感染或导管相关的感染。因为血源性感染与多种微生物有关,所以用于血培养的培养基应该能支持各种细菌的生长。

【采集方法】

（1）采血的部位和次数 对于成年病人,每次发热时应该分别在2个部位采集血标本,以帮助区分是病原菌还是污染菌,特别是对于凝固酶阴性的葡萄球菌、棒状杆菌、绿色链球菌及布鲁菌,要考虑其污染的可能性。一般来说,单一采集的血培养标本更可能被污染,而要检出具有代表性的病原体则往往

要在2个以上部位采集2份以上的血液进行培养。在24 h内采血部位不得多于4个以上,此限制考虑到一天中每次发热时只采集2个部位的血液做2份血培养就可评价2次发热,做再多的血培养没有必要。根据几份研究资料表明,95%以上的菌血症都是在前两三份血培养中检测出来的。

（2）采血的时机和采血量 采集血标本应该在使用抗生素之前,尽管有些培养基含有消除抗生素影响的物质。理论上说,采血时机应恰好在发热高峰之前,但实际上应该是在发热高峰后立即采血。采血的总量也是影响检出病原体的重要因素之一。在一项研究中增加血培养的血量从40 ml到60 ml,可提高检出率10%。对于成人,每次穿刺应采血20~30 ml。对于儿童,采血量就要求少一些,因为其每毫升中的细菌要多

些。血与肉汤的比例以1:(5~10)更有利于检出细菌,这或许是肉汤稀释了抑菌物质的缘故。大多数商业血培养系统为了最佳检出都规定了必要的血标本量,但对于标本量不足的血培养标本不必拒收。

(3) 方法 准备无菌手套、止血带、酒精和聚维酮碘(碘伏)棉球、双针采集系统或一次性注射器,进行严格的皮肤消毒。通常通过肘静脉穿刺取血,从外周静脉导管或中心静脉导管采取血标本很可能被正常菌群污染,因此应在导管采集标本的报告单中注明。静脉穿刺采集标本的培养结果更为可靠。

去除培养瓶上的封条和瓶帽,用酒精棉球消毒橡皮塞,待干。用止血钳夹紧采血皮管,并将一头的一个针头扎进需氧瓶中。

消毒静脉穿刺部位皮肤,选择静脉和穿刺点,用酒精棉球从中心向外消毒皮肤,再用聚维酮碘按同样方法消毒,待干(30 s~1 min),再用酒精棉球擦去碘迹。

以双针采血皮管另一端的一个针头穿刺静脉。松开夹在采血皮管上的止血钳,使血液流入瓶中(50 m l瓶中放入5 m l,100 m l瓶中放入10 m l)。不同的

血培养仪器有不同的采血量要求,应参照其说明。

再次夹紧止血钳,将针头从需氧瓶拔出插进厌氧瓶。松开止血钳,使血液流入厌氧血培养瓶中(采血量同需氧瓶)。

重新夹紧止血钳。用无菌纱布压迫穿刺点,拔出针头,嘱病人用纱布压紧穿刺点2~3 min。将针头从厌氧瓶拔出,丢弃采集设备(不可再次使用)。清除任何溅在血培养瓶上的血液,做好标记(病人信息、采集时间和部位、注明使用抗生素的情况和临床诊断),迅速送往实验室。如在夜间采集,应将标本保持在室温或35℃,禁止冷藏。

婴幼儿采集方法与成人相同,但抽血量只需0.5~2 m l,用儿童专用血培养瓶,只需做需氧培养。

采集血液标本的临床条件和原则见表7。

【处理原则】

(1) 培养条件 所有的血培养温度都应在35℃。手工血培养系统应该培养7 d,阴性需氧培养瓶要在最后一天做盲目传代培养。对于自动化系统,培养5 d就足以检出绝大多数细菌,不必转种做盲目传代培养。当出现阳性瓶需