

血培养瓶法在无菌体液病原菌培养中的应用

殷琳, 喻华, 黄湘宁, 乔宁, 张凯, 刘鑫 (四川省医学科学院/四川省人民医院检验科, 成都 610072)

【摘要】目的 探讨血培养瓶法在无菌体液病原菌培养中的应用。**方法** 收集 2013 年 3~9 月四川省人民医院共 321 份无菌体液标本, 通过双瓶血培养瓶法和直接接种法培养分离病原菌, 通过与传统的直接接种法比较对其进行评价。**结果** 321 份标本中, 通过血培养瓶法 108 份标本培养出细菌, 阳性率为 33.6%; 直接接种法 55 份标本培养出细菌, 阳性率为 17.1%, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。血培养增菌后 80% 细菌在 24~48 h 内检出, 而直接接种法 90% 细菌在 24 h 检出, 检出时间直接接种法更具优势。两种方法检出细菌前 3 位均为屎肠球菌、大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌, 而凝固酶阴性葡萄球菌、草绿色链球菌等在血培养法中检出率明显高于直接法。血培养瓶法的敏感性为 89.7%, 阴性符合率为 95.3%, 直接接种法分别为 43.2% 和 76.3%, 而阳性符合率直接法略高于血培养瓶法。导致培养结果假阴性的细菌主要为凝固酶阴性葡萄球菌、棒状杆菌和微球菌。**结论** 血培养法的敏感性明显高于直接接种法, 可提高病原菌检出率, 与直接接种法同时培养可缩短检出时间并防止漏检, 特别是对链球菌群、厌氧菌和真菌的检出具有显著优势, 但需注意严格无菌操作, 减少污染环节。

【关键词】 无菌体液; 血培养瓶法; 直接接种法

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.19.021 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)19-2696-02

Application of blood culture bottle method for pathogenic bacteria culture with aseptic humoral YIN Lin, YU Hua, HUANG Xiang-ning, QIAO Ning, ZHANG Kai, LIU Xin (Department of Clinical Laboratory, Sichuan Academy of Medical Sciences/Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610072, China)

【Abstract】Objective To assess the application of blood culture bottle method for pathogenic bacteria culture with aseptic humoral. **Methods** A total of 321 aseptic humoral specimens were collected in hospital from March to September in 2013. All specimens were detected by double blood culture bottles method and direct inoculation method. The comparison between the two methods was analyzed. **Results** The positive rate of the blood culture bottle method was 33.6% (108/321), while 17.1% (55/321) as the direct inoculation method, and the difference between the two methods was statistically significant ($P < 0.01$). For the blood culture bottle method, 80% bacteria were checked out within 24 to 48 hours; for the direct inoculation method, 90% bacteria were checked out within 24 h. The top three detected bacteria were Enterococcus faecium, Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae for both methods. However, for the Coagulase negative staphylococcus, Streptococcus viridans, Rod bacillus, Micrococcus, Anaerobic bacteria and fungi, the positive rates of the blood culture bottle method were significant higher than that of the direct inoculation method. The sensitivity and negative coincidence rate of blood culture bottle method were 89.7% and 95.3% respectively, while 43.2% and 76.3% as the direct inoculation method. The positive coincidence rate of the direct inoculation method was slightly higher than that of the blood culture bottle method. Coagulase negative staphylococcus, corynebacterium and micrococcus were the mainly false negative bacteria. **Conclusion** The sensitivity of the blood culture bottle enrichment method was higher than that of the direct inoculation method for pathogenic bacteria culture with aseptic humoral, it could increase the positive rate of pathogen detection, especially for the streptococcus group, anaerobic bacteria and fungi.

【Key words】 aseptic humoral; blood culture bottle enrichment method; direct inoculation method

全自动血培养仪广泛应用于临床, 为血液感染提供了方便快速的检测方法^[1], 需氧厌氧配对血培养瓶的使用更是提高了血液感染的阳性率。而无菌体液包括胸腹水、脑脊液、穿刺液等标本通常采用传统培养方法, 如血平板、麦康凯或巧克力平板培养, 病原菌检出率较低。为了提高无菌体液病原菌检出率, 为临床诊断提供更有效的信息, 对近半年本院临床住院患者 321 例无菌体液标本采用双瓶血培养瓶增菌和直接接种两种培养方法, 现将结果报道如下。

1 材料与与方法

1.1 材料来源 321 份标本为本院住院患者无菌体液标本。

其中胸腔积液 138 份, 腹水 105 份, 脑脊液 48 份, 其他部位穿刺液 30 份。

1.2 仪器与试剂 血培养采用 Bact/ALERT 3D 培养仪, 细菌鉴定使用 VITEK2 全自动细菌鉴定仪, 细菌鉴定卡, 需氧厌氧血培养瓶系法国生物梅里埃公司产品。血平板、麦康凯平板、巧克力平板系郑州安图公司提供。

1.3 方法

1.3.1 血培养瓶增菌法 临床医生按照血培养采集标准操作规程, 采集无菌体液标本 5~10 mL 分别注入需氧厌氧血培养瓶内, 充分混匀, 立即送检实验室, 置 Bact/ALERT 3D 血培养

箱培养。当血培养瓶报阳时将培养瓶取出,直接涂片并立刻转种血平板、巧克力平板置 35 ℃ CO₂ 孵箱中培养,于 18~24 h 后对菌落进行涂片染色、鉴定及药敏试验,如 5 d 未报阳视为阴性,报告无细菌生长。

1.3.2 直接接种法 无菌体液标本同时送检实验室,混匀后用接种环直接接种血平板、麦康凯和巧克力平板,置 35 ℃ CO₂ 孵箱中培养。接种后 18~24 h 如有细菌生长,对菌落进行涂片染色、鉴定及药敏试验,如 48 h 无菌生长视为阴性,报告无细菌生长。

1.4 观察指标 参照《全国临床检验操作规程》^[2] 及相关文献报道^[3-5],通过常规及生化等检验数据以及患者临床诊断综合分析,将符合细菌感染诊断结果且培养出细菌的患者判定为真阳性(TP),不符合细菌感染而培养出细菌的标本为假阳性(FP),符合细菌感染而未培养出细菌的标本为假阴性(FN),不符合细菌感染而未培养出细菌的标本为真阴性(TN),统计两种方法的 TP、FP、FN、TN,并计算两种方法的敏感性、准确性及阴性、阳性符合率结果。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件对数据进行统计学分析,计数资料采用百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两种方法分离细菌阳性率比较 321 份标本通过双瓶血培养法有 108 份培养出细菌,阳性率为 33.6%,通过直接接种法 55 份标本培养出细菌,阳性率为 17.1%,差异有统计学意义($P<0.05$),详见表 1。

表 1 两种方法分离细菌阳性率比较[n(%)]

标本来源	n	血培养瓶增菌法阳性	直接接种法阳性
胸腔积液	138	39 (28.3)	18(13.0)
腹水	105	48 (45.7)	27(25.7)
脑脊液	48	12 (25.0)	6(12.5)
其他穿刺液	30	9 (33.3)	6(20.0)
总计	321	108 (33.6)	55(17.1)

2.2 两种方法细菌检出时间比较 血培养增菌后 80%细菌在 24~48 h 内检出,而直接接种法 90%细菌在 24 h 检出,检出时间直接接种法更具优势。见表 2。

表 2 两种方法检出时间比较[n(%)]

检出时间	血培养瓶增菌法阳性	直接接种法阳性
24 h 内	15(13.9)	52(94.5)
24~48 h	90(83.3)	3(5.5)
48 h 以上	3(2.8)	0(0.0)
总计	108(33.6)	55(17.1)

2.3 不同方法敏感性符合率比较 血培养瓶法的敏感性为 89.7%,阴性符合率为 95.3%,直接接种法分别为 43.2%和 76.3%,而阳性符合率直接法略高于血培养瓶法,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

表 3 不同方法敏感性符合率比较

方法	TP (n)	FP (n)	FN (n)	TN (n)	敏感性 (%)	阳性符合率 (%)	阴性符合率 (%)
血培养瓶法	87	21	10	203	89.7	80.6	95.3
直接接种法	48	7	63	203	43.2	87.3	76.3

2.4 培养瓶法和直接接种法细菌分布情况 321 份标本中,大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌和尿肠球菌在两种方法的检出率最高而阳性符合率较为一致。草绿色链球菌、厌氧菌和真菌在血培养瓶法中真阳性例数明显高于直接法,差异有统计学意义($P<0.01$),而凝固酶阴性葡萄球菌、棒状杆菌、微球菌在血培养瓶法中的假阳性例数明显高于直接法,差异有统计学意义($P<0.01$)。详见表 4。

表 4 血培养瓶法和直接接种法细菌分布情况(n)

菌名	血培养瓶法			直接接种法		
	TP+FP+ FN+TN	TP	FP	TP+FP+ FN+TN	TP	FP
大肠埃希菌	18	18	0	14	14	0
肺炎克雷伯菌	12	11	1	10	10	0
尿肠球菌	18	16	2	11	10	1
凝固酶阴性葡萄球菌	29	12	17	7	5	2
粪肠球菌	6	5	1	4	3	1
金黄色葡萄球菌	3	3	0	3	3	0
化脓链球菌	2	2	0	2	2	0
草绿色链球菌	6	5	1	0	0	0
鲍曼不动杆菌	2	1	1	2	1	1
铜绿假单胞菌	2	2	0	1	1	0
棒状杆菌	3	0	3	0	0	0
微球菌	2	0	2	0	0	0
厌氧菌	2	2	0	0	0	0
真菌	3	2	1	1	1	0

3 讨 论

血液培养瓶营养成分丰富,较固体平板培养基更适于病原菌生长^[6],同时因含有树脂、药用炭等吸附抗菌药物成分,能提高病原菌检出率,除常见菌更易生长外,苛氧菌也生长良好。本研究研究显示,双瓶血培养增菌细菌阳性率为 33.6%,而直接接种法细菌阳性率为 17.1%,差异有统计学意义($P<0.05$),与王升和张红升^[7]报道结果一致。血培养瓶对各种无菌体液细菌检出率高,主要原因有以下几点:(1)血培养瓶营养成分丰富,添加吸附抗菌药物的物质可以提高病原菌检出率;(2)直接接种法接种标本量较少,而血培养瓶注入 5~10 mL 体液,使标本量增加;(3)血培养法培养时间为 5 d,且注入需氧厌氧血培养瓶,有利于厌氧菌、苛氧菌、真菌及生长缓慢病原菌的检出。

血培养增菌法 80%病原菌在 24~48 h 内检出,而直接接种法 90%病原菌在 24 h 就能生长,直接接种法在缩短检出时间上更具优势,但却容易出现漏检。尿肠球菌、大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌在两种方法中检出率最高且阳性符合率较一致。经统计分析,凝固酶阴性葡萄球菌、草绿色链球菌、棒杆菌、微球菌、厌氧菌和真菌在两种方法中的差异明显,这可能与链球菌对营养条件要求高,血培养瓶法更利于其生长有关。但延长直接接种法培养时间是否能提高链球菌检出率还有待进一步研究。通过方法学评价,血培养法的敏感性和阴性符合率高于直接接种法,而阳性符合率略低于直接接种法,这与体液标本注入血培养瓶容易二次污染而致假阳性结果有关。而通过临床资料分析发现,造成假阳性的主要菌株为(下转第 2700 页)

异常的灵敏性明显高于 Scr。Tanaga 等^[12]观察到冠心病患者行冠状动脉造影后 48 h 内 Scr、BUN 无变化,而血浆 Cys C 浓度明显升高。本研究结果显示,造影前两组 Cys C、Scr、BUN、TRF 水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$),而造影后 12、24 h CIN 组 Cys C 水平明显升高,48 h 后有所下降,但仍高于造影前及非 CIN 组同一时间点的水平,从而表明 Cys C 较 Scr、TRF 较早出现变化,能较早反映肾功能受损情况。以造影后 12、24 h Cys C 水平较造影前上升 25% 作为诊断 CIN 的标准,其灵敏性分别为 84.5% 和 89.6%,特异性分别为 75.9% 和 82.9%,表明 Cys C 具有较高的灵敏性及特异性,可作为诊断早期 CIN 的预测指标,对 CIN 具有较高的诊断价值。

参考文献

- [1] 余振球,段绍斌,周顺科,等.尿肾脏损伤分子 1、白细胞介素 18 和胱抑素 C 对老年钆造影剂肾病的预测价值[J].中华肾脏病杂志,2013,29(3):173-177.
- [2] 张婷,吴继雄,许邦龙,等.血浆胱抑素 C 与 β 痕迹蛋白在早期预测造影剂肾病中的价值[J].安徽医药,2013,17(7):1154-1157.
- [3] 邹琴,廖湘平,郭胜根.胱抑素 C 在造影剂肾病早期诊断中的价值[J].医学临床研究,2011,28(12):2379-2381.
- [4] 阚振,袁争百,苏振琪,等.冠脉介入治疗中造影剂对血清胱抑素 C 水平的影响[J].安徽医学,2011(10):1719-1720.
- [5] 徐丹,盖延红,刘玲玲.胱抑素 C 检测在冠状动脉造影后造影剂肾病诊断中的价值[J].中国当代医药,2012,19(20):109.

- [6] Yoon HJ, Kim H, Lee JP, et al. The efficacy of the cystatin C based glomerular filtration rate in the estimation of safe contrast media volume[J]. Korean Circ J, 2013, 43(9):622-627.
- [7] 王书彩,孙芳毅,郝青,等.冠脉介入治疗对老年糖尿病患者血清胱抑素 C 和肾功能的影响[J].河北医药,2012,34(3):352-353.
- [8] 王颖,燕树勋,史云菊.血清胱抑素 C 在老年人造影剂肾病中的评估作用[J].中国慢性病预防与控制,2012,20(2):161-163.
- [9] 汤益民,朱建华.血清胱抑素 C 在冠脉介入相关肾功能损害中的应用价值[J].心脑血管病防治,2011,11(3):184-186.
- [10] 庄丛明,刘映峰,江玲,等.血清白介素 6 与胱抑素 C 在早期预测对比剂肾病中的意义[J].中国全科医学,2011,14(16):1801-1803.
- [11] Duan SB, Liu GL, Yu ZQ, et al. Urinary KIM-1, IL-18 and Cys-c as early predictive biomarkers in gadolinium-based contrast-induced nephropathy in the elderly patients[J]. Clin Nephrol, 2013, 80(5):349-354.
- [12] Tanaga K, Tarao K, Nakamura Y, et al. Percutaneous coronary intervention causes increase of serum cystatin C concentration even in the patients with a low risk of contrast-induced nephropathy[J]. Cardiovasc Interv Ther, 2012, 27(3):168-173.

(收稿日期:2014-01-20 修回日期:2014-06-14)

(上接第 2697 页)

凝固酶阴性葡萄球菌、棒杆菌和微球菌,这也是造成血培养瓶增菌法阳性符合率低的原因之一。与血培养相似,体液采集过程中也存在污染问题,因此应严格注意无菌操作,采集后无需离心处理,直接注入培养瓶,减少污染环节^[8-9]。另外,厌氧菌和真菌在血培养瓶中真阳性例数明显高于直接法,差异有统计学意义($P<0.01$),这与临床未对无菌体液进行厌氧培养而导致厌氧菌检出率低有关,而真菌生长缓慢,需要延长培养时间提高其阳性率,血培养法因双瓶培养和延长培养时间为 5 d 可以防止其漏检。在标本量允许的情况下,体液标本应同时选用需氧瓶和厌氧瓶,缩短兼性厌氧菌报阳时间,怀疑真菌感染时,首选需氧瓶。同时需注意的是,虽然脑脊液检出率仍为血培养瓶增菌法高于直接接种法,但有资料说明血培养瓶增菌不合适脑脊液标本,因为其中含有的聚茴香胺硫酸钠对淋病奈瑟菌、脑膜炎奈瑟菌有毒性^[10]。

综上所述,血培养瓶增菌法的敏感性明显高于直接接种法,应用于无菌体液培养可提高病原菌检出率,与直接接种法同时培养可缩短检出时间并防止漏检,特别是对链球菌群、厌氧菌和真菌的检出具有显著优势,但需加强临床沟通,加强无菌体液采集环节的规划化管理,减少污染概率。

参考文献

- [1] 梅凌英.无菌体液培养使用血瓶增菌和直接接种法探讨[J].中国保健营养:下旬刊,2013,23(2):520.
- [2] 叶应妩,王毓川,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3

版.南京:东南大学出版社,2006:314-320.

- [3] 容元,梁兴东,马丽梅,等.超敏 C 反应蛋白和细菌计数在浆膜腔细菌感染诊断中的应用[J].国际检验医学杂志,2013,34(8):947-949.
- [4] 徐丹,高旭红,蒋莉,等.胸腹腔积液 CRP 与生化指标测定的临床意义[J].中国实验诊断学,2009,13(9):1229-1230.
- [5] 吕中全,李爽,李昊森.应用 UF-100 全自动尿沉渣分析仪检测浆膜腔积液的作用和意义[J].实用医学杂志,2010,26(2):308-310.
- [6] 鲁炳怀,时琰丽,朱凤霞.用全自动血培养仪进行体液病原菌培养[J].临床检验杂志,2011,29(5):373-374.
- [7] 王升,张红升.无菌体液细菌培养的新方法探讨[J].实用医技杂志,2007,14(22):3025-3026.
- [8] Daur AV, Klimak F, Cogo LL, et al. Enrichment methodology to increase the positivity of cultures from body fluids[J]. Braz J Infect Dis, 2006, 10(6):372-373.
- [9] Mattei R, Savarino A, Fabbri M, et al. Use of the BacT/a-alert MB mycobacterial blood culture system for detection of mycobacteria in sterile body fluids other than blood[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(3):711-714.
- [10] 张秀珍,朱德妹.临床微生物检验问与答[M].北京:人民卫生出版社,2008:32.

(收稿日期:2014-01-02 修回日期:2014-06-10)