

临床微生物室的检验程序

内容导学

病原微生物直接威胁着实验室人员的生命健康，因此微生物安全的宣教必不可少，患者标本的采集、运送、接种、培养、观察、鉴定、药敏、报告等各个环节都是临床检验医生每天要面对的基本工作。将理论与实践相结合，严格的按照操作程序执行是保证实验数据正确性的关键。下面我们一起来学习临床微生物室的检验程序。

一、染色镜检

1. 能够根据检验申请、标本类型及可疑的病原菌种类选择正确的染色方法（如怀疑隐球菌性脑膜炎，选择墨汁染色）。
2. 对痰标本应进行涂片革兰染色，判断标本质量，观察细菌分布
3. 直接镜检可以快速了解标本中有菌和大致菌量，初步判断是否存在优势致病菌，还可以根据其形态、结构和染色性对病原菌进行初步分类并提供诊断思路：厌氧菌引起的伤口感染、便涂片菌群失调、痰涂片是否为合格标本等。
4. 对于某些致病菌，标本涂片镜检具有重要的早期诊断意义：TB。

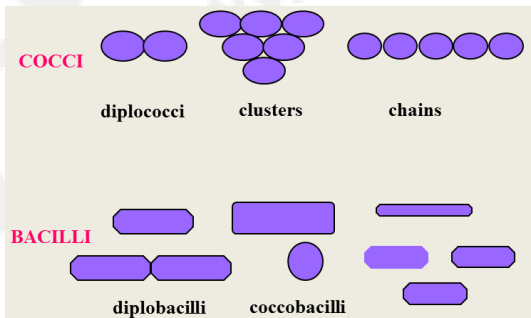


图 1 CHARACTERISTICS OF GROUPING

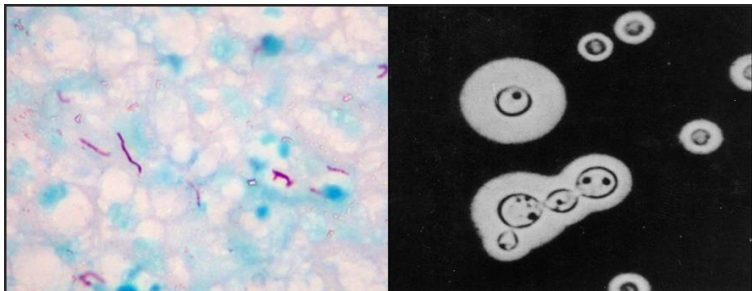


图 2 染色镜检

二、细菌分离培养

1. 初次分离用非选择性培养基的平板直径应不小于 9cm，应只接种一份样品。



图 3 细菌分离培养

2. 能够根据检验申请信息、标本类型及可疑的病原菌选择正确的培养基和培养条件（如培养温度、气体环境和培养时间）。

3. 能正确判别各类标本在培养基上生长的有意义的结果。

4. 需要定量培养的标本（如尿液、肺泡灌洗液）应按要求接种并进行菌落计数。

5. 培养基的选择

根据目的分类：

- (1) 营养培养基：加入了营养成分，如血液等，促进营养要求高的细菌生长（肺炎链球菌）。
- (2) 选择性培养基：某种特殊化学物质，能阻止一类细菌生长但不影响另一类细菌繁殖（EMB 抑制革兰阳性菌生长）。
- (3) 鉴别培养基：加入某种特殊化学物质，使生长的细菌呈现不同颜色（乳糖发酵，阳性大肠埃希菌在 SS 上呈现粉红色菌落，志贺菌无色）。
- (4) 增菌培养基：含有特殊成分适合分离菌生长，不适合其他菌生长，通常用于标本细菌数量少、生长缓慢的细菌（碱性蛋白胨水能让霍乱弧菌繁殖，其他菌生长不良）。

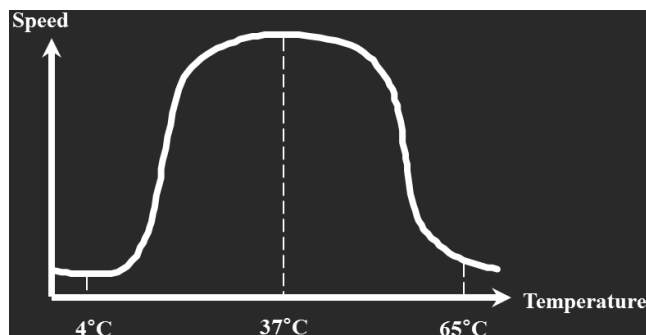


图 4 Multiplication rate depends on temperature

(5) CULTURE

1) aerobes

① Require the presence of oxygen;

② Their energy is obtained by using oxygen in the air: Respiration (oxidative metabolism);

③ eg: *Pseudomonas*, *Mycobacteria*, *Enterobacteriaceae*.

2) anaerobes

Can only develop in the absence of air. Oxygen is toxic for this type of bacteria. All the energy produced comes from fermentation (fermentative metabolism). eg: *Fusobacterium*, *Eubacterium*.

3) Microaerophilic bacteria

Prefer a O_2 reduced atmosphere, eg: *Campylobacter*, *Mycoplasma*.

4) Capnophilic bacteria

Some bacteria prefer a CO_2 -enriched atmosphere, it is essential for others, eg: *Neisseria gonorrhoeae*.

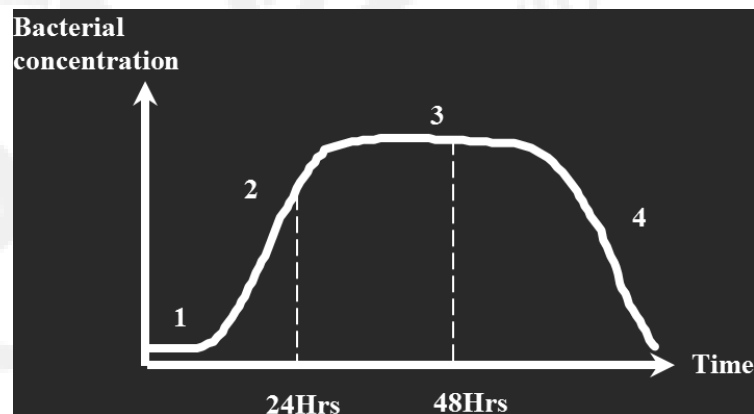


图5 Bacterial growth phases

三、细菌鉴定

1. 能根据细菌菌落形态和涂片染色结果选择适当的鉴定试验项目，并采用适宜的方法将细菌鉴定到种。

2. 对细菌鉴定所需要使用的血浆凝固酶、触酶、氧化酶试验及诊断性抗血清等至少应在每个实验当日做阳性和阴性质控。

3. 对细菌鉴定所需的其他生化反应试剂至少应在每一批次产品使用前做阴性和阳性质控，并在

有效期内使用。

4.Orientation tests results:

- ①Morphology;
- ②Gram;
- ③Catalase, oxidase.

Examples:

- ①Cocci, Gram+, Catalase+→Staphylococci;
- ②Cocci, Gram +, Catalase-→Streptococci;
- ③Bacilli, Gram-, Oxidase-→Enterobacteriaceae.

5. 链球菌属

(1) β 溶血

- ①Lancefield 群特异性抗原鉴定 A、B、C 等;
- ②杆菌肽敏感试验: A 群链球菌 (+);
- ③CAMP 试验: B 群链球菌 (+)。

(2) 非 β 溶血

- ①肺炎链球菌: Optochin 试验——5g, $\geq 14\text{mm}$ 敏感;
- ②草绿色链球菌: API, VITEK, MicroScan。

6. 一些病原学检查要点

(1) 淋病奈瑟菌鉴定方法

- ①革兰染色形态;
- ②氧化酶 (+)、30%触酶 (+);
- ③分解葡萄糖产酸。

(2) 脑膜炎奈瑟菌鉴定方法

- ①革兰染色形态;
- ②触酶 (+)、氧化酶 (+);
- ③分解葡萄糖、麦芽糖产酸不产气;
- ④荚膜多糖抗原凝集试验。

(3) 卡他莫拉菌鉴定方法

- ①在血琼脂平板上挑取淡粉, 易刮取, 易乳化的菌落;
- ②触酶 (+)、氧化酶 (+)、DNA 酶 (+);

③还原硝酸盐和亚硝酸盐。

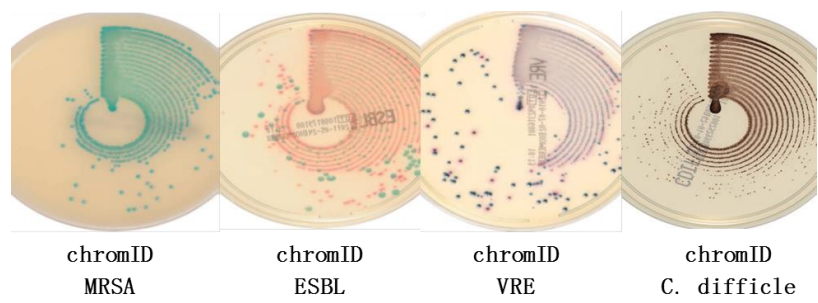


图 6 Identification on chromogenic media

四、药敏试验

- 1. 能根据本单位条件及所检测的病原菌种类选择纸片扩散法、稀释法、浓度梯度扩散法（E 试验）或自动化仪器法进行抗菌药物敏感性试验。
- 2. 试验过程应遵循标准化操作方法或制造商建议进行操作。
- 3. 药物敏感性试验结果解释至少应遵循上一年度 CLSI 药敏试验的判断标准。
- 4. 使用自动化仪器进行药敏试验的实验室应按制造商的要求进行质控。
- 5. 应定期(至少每 1~2 年 1 次)使用最新的 CLSI 文件标准对仪器的药敏试验判断折点进行评估，仅报告符合文件标准的抗菌药物药敏试验结果，对评估不符合要求（如药物稀释度不包括药敏判断折点、折点设置错误、检测结果偏离）的仪器应暂停使用，并与仪器供应商沟通。
- 6. 使用纸片扩散法进行药敏试验的实验室应按要求对每一批号的药敏试验纸片进行质控，如果质控在控，则改为每周质控 1 次(若检测频率小于每周 1 次，则应在每个检测日进行质控)。
- 7. 某些常见耐药机制的表型检测
 - (1)需要关注：耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）、D 试验（红霉素诱导克林霉素耐药）、万古霉素中介金黄色葡萄球菌（Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus, VISA）、万古霉素耐药金黄色葡萄球菌(Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus, VRSA)、耐万古霉素肠球菌(VRE)、青霉素耐药肺炎链球菌（PRSP）、高水平氨基糖苷类耐药（HLAR）、产超广谱 β -内酰胺酶菌（ESBL）碳青霉烯类耐药肠杆菌科（CRE）等。
 - (2)D 试验：适用于葡萄球菌属、肺炎链球菌、 β 溶血链球菌、红霉素耐药而克林霉素敏感时，需要做此试验。如“阳性”则克林霉素修改为耐药。
 - (3)需要检测 β -内酰胺酶的菌种：葡萄球菌属、流感嗜血杆菌、卡他莫拉菌、淋病奈瑟菌、厌氧菌等。 β -内酰胺酶阳性预测对青霉素酶不稳定青霉素类耐药。

8. 伤口样品

(1)应明确伤口样品培养程序，深部伤口感染应至少包括样品采集、需氧菌及厌氧菌的培养及鉴定。

(2)如果不具备厌氧培养条件，则应有程序表明，样品置合格的运送系统迅速送有条件的实验室。

(3)应有适当的方法检测苛氧菌（如放线菌，快速生长的分枝杆菌等）。

9. 厌氧菌培养

(1)培养时间与样品类型、诊断有关，在第一次培养评估之前应有足够的培养时间（至少 48 小时）。

(2)应有合适的液体培养基，有合适的鉴定方法（适用时）。

10. 分枝杆菌

(1)样品应置密闭的防渗漏容器内。

(2)某些样品（如：尿液、脑脊液）抗酸染色应浓缩，所有样品培养前应浓缩。应以密闭试管置密封的离心架内离心。

11. 真菌培养

(1)宜使用含和不含抗菌药物的两类培养基。

(2)如果在室温下培养，应每天监测并记录室温（22℃～26℃）。

(3)经空气传播有高度感染性的真菌样品、含菌丝体的真菌应在生物安全柜内处理。若采用平皿培养，应封盖。

12. 病毒

(1)培养时，应详细记录细胞类型、传代数、细胞来源、培养基及生长状况。

(2)应检测并记录培养基和稀释剂的无菌试验和 pH 值。

(3)应监测细胞病变效应，以优化培养的最佳时间。

(4)应比较未经接种或接种无菌物质的单层细胞与接种临床样品的培养物。

13. 法定传染病病原微生物

对我国法定传染病病原微生物的检验程序应满足如下要求：

(1)检验程序应至少符合中华人民共和国卫生行业标准。

(2)当培养过程中发现人间传染的高致病性病原微生物（依据《人间传染的病原微生物名录》）时，应按相关法规要求进行处理，或送至相应级别的生物安全实验室进行检验。

胡云建 供稿

医博士 编辑整理