

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 503—2017

临床微生物实验室血培养操作规范

Operating procedures of blood culture for clinical microbiology laboratory

2017-09-06 发布

2018-03-01 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准起草单位：中国医学科学院北京协和医院、上海交通大学附属瑞金医院、北京医院、广东省临床检验中心、北京电力医院、香港玛丽医院。

本标准主要起草人：徐英春、孙宏莉、杨启文、王瑶、窦红涛、王贺、赵颖、张丽、范欣、倪语星、胡继红、邹伟民、赵锐、梁皓钧。

临床微生物实验室血培养操作规范

1 范围

本标准规定了血培养临床微生物检验的技术要求。

本标准适用于开展血培养的临床微生物实验室。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

一套血培养 one set of blood culture

从同一穿刺点采集的血液标本,通常分别注入需氧和厌氧培养瓶。

2.2

输液港 access ports

完全植入人体内的闭合输液装置,包括尖端位于上腔静脉的导管部分及埋植于皮下的注射座。

2.3

血培养污染率 rate of blood culture contamination

污染的血培养标本数占同期的血培养标本总数的比例。

计算公式:

$$\text{血培养污染率} = \frac{\text{污染的血培养标本数}}{\text{同期血培养标本总数}} \times 100\%$$

3 血样采集和培养瓶接种

3.1 采血指征

可疑感染患者出现以下任一指征时,可考虑采集血培养:

- a) 体温 $>38\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $<36\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- b) 寒战;
- c) 外周血白细胞计数增多(计数 $>10.0 \times 10^9/\text{L}$,特别有“核左移”时)或减少(计数 $<4.0 \times 10^9/\text{L}$);
- d) 呼吸频率 >20 次/min或动脉血二氧化碳分压(PaCO_2) <32 mmHg;
- e) 心率 >90 次/min;
- f) 皮肤黏膜出血;
- g) 昏迷;
- h) 多器官功能障碍;
- i) 血压降低;
- j) 炎症反应参数如C反应蛋白、降钙素原(PCT)、1,3- β -D-葡聚糖(G试验)升高等。

3.2 检验申请

申请单应明确标识患者基本信息、申请医师信息、标本类型、采集部位、申请项目、临床诊断、采血时

间,并尽可能提供其他治疗相关信息,如抗菌药物使用情况。

3.3 采血时间

寒战或发热初起时采集。抗菌药物应用之前采集最佳。

3.4 采集套数

成人每次应采集 2 套~3 套,每套从不同穿刺点进行采集,2 d~5 d 内无需重复采集。如怀疑感染性心内膜炎,应重复采集多套。儿童通常仅采集需氧瓶。有以下高危因素时应考虑厌氧瓶培养:其产褥期患腹膜炎,或慢性口腔炎或鼻窦炎、蜂窝组织炎、有腹腔感染的症状和体征、咬伤、接受类固醇治疗的粒细胞缺乏患儿。考虑肺炎链球菌菌血症时,宜同时做脑脊液培养。

3.5 采血量

成人每瓶采血量 8 mL~10 mL,或按照说明书采集;婴幼儿及儿童采血量不应超过患者总血量的 1%,具体采血量参考说明书。若采血量充足,注射器采集的血液先注入厌氧瓶,后注入需氧瓶,碟形针采集的血液反之。若采血量不足,优先注入需氧瓶。

3.6 采集方法

3.6.1 采集静脉血;仅在评估导管相关性血流感染时采集导管血。血培养宜单独采血,与其他检测项目同时采血,应先接种血培养瓶,以避免污染。

3.6.2 采集前做好手卫生,静脉穿刺点选定后,去除血培养瓶的塑料瓶帽,切勿打开金属封口环和胶塞,使用 75%乙醇或 70%异丙醇消毒,自然干燥 60 s。注意采血前检查血培养瓶是否完好无损、是否过期。

3.6.3 在穿刺前或穿刺期间,为防止静脉滑动,应戴无菌乳胶手套固定静脉。

3.6.4 穿刺点皮肤消毒:

a) 三步法:

第一步:75%乙醇擦拭静脉穿刺部位,待干 30 s 以上;

第二步:1%~2%碘酊作用 30 s 或 1%碘伏作用 60 s,从穿刺点向外画圈消毒,消毒区域直径达 3 cm 以上;

第三步:75%乙醇擦拭碘酊或碘伏消毒过的区域进行脱碘。

对碘过敏的患者,在第一步基础上再用 75%乙醇消毒 60 s,待酒精挥发干燥后采血。

b) 一步法:

0.5%葡萄糖酸洗必泰作用 30 s(不适用于 2 个月以内的新生儿),或 70%异丙醇消毒后自然干燥(适用于 2 个月以内的新生儿)。

注意穿刺点消毒后不可再碰触。

注:其他消毒剂需要进行消毒能力和适用性验证后才可使用。

3.6.5 用注射器无菌穿刺取血后,勿换针头(如行第二次穿刺,换针头),直接注入血培养瓶,不应将抗凝血注入血培养瓶。

3.6.6 血液接种到培养瓶后,轻轻颠倒混匀以防血液凝固。

3.6.7 完成工作后洗手。

3.6.8 污染率评估:实验室应定期对血培养污染率进行评估,污染率应控制在 3%以下。

4 血培养瓶运送

血培养瓶应在 2 h 之内送至实验室孵育或上机;如不能及时送检,应将血培养瓶置于室温下,切勿

冷藏或冷冻。应采用密封的塑料袋和硬质防漏的容器运送标本。若运送到参考实验室,应使用符合生物安全规定的包装。

5 血培养瓶接收

5.1 实验室收到血培养瓶后,应尽快接收并评估和记录标本质量(如采集时间、血标本量、瓶数、转运时间和条件、申请单信息和标识等),评估合格后立即孵育。若培养瓶延迟送检而提示已有细菌生长,则应直接进行涂片镜检。经评估后不合格血培养瓶(如血培养瓶标识错误或无标识,破碎,损坏,渗漏,凝血等情况),应拒收并尽快告知申请医师。

5.2 以下情况可以接收但应告知申请医师:

- a) 采血量不足;
- b) 血培养瓶套数或瓶数不够;
- c) 成人样本仅接种需氧或厌氧瓶。

5.3 特殊情况:实验室应有紧急预案,如在常规血培养系统故障时,如何对血培养瓶处理和孵育等。

6 实验室操作方法及流程

6.1 添加剂

6.1.1 抗凝剂

抗凝剂使用聚茴香脑磺酸钠(SPS),浓度为0.025%~0.05%。肝素、柠檬酸盐和乙二胺四乙酸(EDTA)不能作为抗凝剂加入血培养瓶中,但在检测分枝杆菌时,也可选用肝素或柠檬酸盐抗凝。

6.1.2 抗生素吸附剂

推荐使用树脂。

6.2 手工培养法

6.2.1 培养基

6.2.1.1 传统肉汤培养基

传统肉汤体积应为18 mL~100 mL。需氧培养基:胰酶消化大豆肉汤,脑心浸液肉汤,哥伦比亚肉汤。微需氧或厌氧菌培养需添加硫醇,硫基乙酸盐;苛养菌培养需添加溶血素、维生素 K_1 和L型半胱氨酸。

6.2.1.2 双相培养基

同时含有琼脂和肉汤的血培养瓶,可用于成人或儿童患者的需氧菌、厌氧菌和分枝杆菌培养。血液注入后颠倒培养瓶,使血液和肉汤混合物冲刷琼脂表面,再将培养瓶垂直孵育,观察肉汤和琼脂表面有无微生物生长。

6.2.1.3 溶血肉汤培养基

使微生物从裂解的血液中释放出来后,通过离心将其与血液成分分离,沉淀物转种固体培养基进行孵育。

6.2.1.4 真菌培养基

应用上述三种培养基都可检出酵母菌,但双相真菌和丝状真菌宜用双相培养基和溶血肉汤培养基。糠秕马拉色菌需要在培养基中添加油脂(如橄榄油)。

6.2.1.5 分枝杆菌培养基

分枝杆菌如在传统肉汤培养基中延长孵育时间也能生长。在肉汤中添加脂肪酸(如不饱和脂肪酸)、白蛋白和 CO₂ 更适合分枝杆菌生长。分枝杆菌中某些种(日内瓦分枝杆菌和嗜血分枝杆菌)生长时需要添加剂(分枝杆菌生长素、溶血素、血红蛋白或柠檬酸铁胺)。

6.2.2 培养方法

6.2.2.1 一般情况

推荐 35 °C~37 °C 孵育 7 d,一些缓慢生长的苛养菌(如巴尔通体、李斯特菌属、布鲁菌属和奴卡菌属等)和双相真菌需要更长的孵育时间。手工法应每天或更频繁地观察肉眼可见的微生物生长,特别注意孵育 48 h 内的生长迹象。使用明亮的荧光灯泡或白炽灯,观察浊度、溶血、产气、表面菌落形成和血液颜色的改变,发现有微生物生长迹象进行涂片革兰染色和转种,根据涂片染色结果选择培养基类型。

6.2.2.2 真菌

酵母菌在需氧瓶中易生长,摇动肉汤培养可提高酵母菌的检出率。多数酵母菌孵育 2 d~5 d 可检测出,某些酵母菌如新型隐球菌需延长孵育时间。怀疑双相真菌或丝状真菌感染,孵育时间需延长 2 w~4 w。双相培养瓶在孵育的最初 24 h 内,应轻轻摇动。27 °C~30 °C 和 35 °C~37 °C 同时孵育。

6.2.2.3 分枝杆菌

由于分枝杆菌繁殖缓慢,所有培养瓶应至少孵育 6 w。

6.3 自动化仪器培养法

6.3.1 培养基

商品化培养瓶包括需氧瓶、厌氧瓶、儿童瓶、真菌培养瓶及分枝杆菌培养瓶。

6.3.2 培养方法

6.3.2.1 一般情况

35 °C~37 °C 孵育 5 d,一些缓慢生长的苛养菌(如巴尔通体、李斯特菌属和奴卡菌属等)和双相真菌需要延长孵育时间。自动化血培养系统每间隔一定时间自动通过电子感应器检测微生物生长代谢过程中产生的 CO₂ 浓度或气压变化,阳性报警后需要立即处理。对于已经培养 5 d 的阴性瓶不需要常规盲传或终点转种。

6.3.2.2 真菌

宜采用真菌培养瓶。

6.3.2.3 分枝杆菌

宜采用分枝杆菌培养瓶。

6.4 室内质控

6.4.1 手工培养法

对培养基、革兰染色、鉴定试剂、药敏试验、结果审核和报告解释等每个项目制订相应的质控标准操作程序。

6.4.2 自动化仪器培养法

按厂商推荐的方法进行。

7 导管相关血流感染

7.1 短期外周导管的血培养

采集 2 套外周静脉血培养。无菌操作拔除导管,剪切导管尖端 5 cm,采用 Maki 半定量培养。结果解释如下:

- 如 1 套或以上血培养阳性,并且导管尖端培养阳性(≥ 15 个菌落),血培养与导管尖端培养菌种相同,提示为导管相关性血流感染(CRBSI);
- 如 1 套或以上血培养阳性,并且导管尖端培养阴性,无法判断;但如血培养分离株为金黄色葡萄球菌或念珠菌属,并且没有其他明确的感染源,提示为 CRBSI;
- 如 2 套血培养阴性,但导管培养阳性,提示为导管定植;
- 如 2 套血培养和导管尖端培养均为阴性,不考虑 CRBSI。

7.2 中心静脉导管及静脉输液港(VAP)的血培养

7.2.1 保留导管的患者血培养

至少采集 1 套静脉外周血培养,同时应尽快采集等量的 1 套导管血培养。结果解释如下:

- 如 2 套血培养得到的菌株其鉴定结果和药敏谱均相同,并且没有其他明确感染源,提示为 CRBSI。
- 如 2 套血培养均阳性并且分离的菌种相同,导管血阳性报警时间比外周血阳性报警时间早 ≥ 120 min,又没有其他明确感染源,则提示为 CRBSI(如导管血阳性报警时间比外周血阳性报警时间早 < 120 min,2 套血培养获得鉴定与药敏谱相同的分离株,也可能为 CRBSI)。
- 如仅导管血培养阳性,提示导管有细菌定植或污染。
- 如仅外周血培养阳性,不能确定为 CRBSI。若血培养阳性株为金黄色葡萄球菌或念珠菌属,并且没有其他明确的感染源,则可能为 CRBSI。
- 如 2 套血培养均阴性,不考虑 CRBSI。

7.2.2 拟拔除导管的患者血培养

至少采集 1 套外周血培养。无菌操作拔除导管,剪切导管尖端 5 cm,采用 Maki 半定量培养。结果解释如下:

- 如 1 套以上血培养和导管尖端培养阳性,并且菌种鉴定与药敏谱相同,提示为 CRBSI。
- 如 1 套以上血培养阳性且导管尖端培养阴性,若血培养阳性株为金黄色葡萄球菌或念珠菌属,

则可能为 CRSBI。如需要进行确认,要求进一步采集其他外周血培养,获得阳性且为同一菌种,没有其他明确的感染源,提示为 CRBSI。

- c) 如血培养阴性,导管尖端培养阳性,提示定植。如外周血培养和导管尖端培养均为阴性,不考虑 CRBSI。

8 感染性心内膜炎

8.1 采集血培养时机及数量

8.1.1 急性心内膜炎

应立即采集血培养。宜在经验用药前 30 min 内不同部位采集 2~3 套血培养。

8.1.2 亚急性心内膜炎

宜每隔 0.5 h~1 h 采集 1 套血培养,不同部位共采集 3 套血培养。如 24 h 培养阴性,宜加做 2 套血培养。

8.2 假阳性

假阳性最常见的原因是皮肤寄生菌污染。因此可疑感染性心内膜炎患者采集血培养应对采集点皮肤进行彻底消毒,且不应从留置导管处采血,避免出现假阳性结果。

8.3 假阴性

假阴性最常见原因是在采血时患者已使用抗菌药物,为降低假阴性,宜使用含树脂的血培养瓶。另一个原因是营养变异链球菌(如毗邻颗粒链菌、乏养菌属)感染。

8.4 孵育时间

常见病原体 5 d 内培养阳性。如培养 5 d 仍阴性,而临床怀疑感染性心内膜炎,则应传种至不含抗菌药物的巧克力平皿,5% CO₂ 培养。

9 血培养特殊病原体的处理流程

9.1 乏养菌属和颗粒链菌属

这类菌在大豆胰蛋白胨血琼脂平板上不生长,次代培养时要求血培养基中补充吡哆醛或 L 型半胱氨酸;或同时接种金黄色葡萄球菌,该菌呈“卫星”生长现象;或采用巧克力培养基、厌氧血琼脂等营养丰富的培养基进行培养。

9.2 巴尔通体

血培养阳性率低,推荐血清学和分子生物学方法检测。

9.3 布鲁菌属

大多数布鲁菌需氧瓶培养 3 d 内阳性,很少超过 7 d。

9.4 弯曲菌属

空肠弯曲菌可在血培养中出现,其在传种后 42 °C 生长较快,微需氧孵育 48 h 后可看到微小菌落。

9.5 弗朗西斯菌属

不同菌株生长速度不同,孵育时间不定。由于其菌体微小,形态多样,革兰染色易漏检。土拉热弗朗西斯菌可在标准血培养瓶中生长,初代培养可在标准羊血琼脂生长,次代培养不生长。有些菌株初代仅在巧克力琼脂平板生长。

9.6 HACEK 菌群

包括嗜血杆菌属(H)、放线杆菌属(A)、心杆菌属(C)、艾肯菌属(E)和金氏杆菌属(K)。多数血培养可在7 d内阳性报警。如高度怀疑心内膜炎是由HACEK细菌引起的,而5 d后血培养仍为阴性,应延长培养时间或盲传。

9.7 螺杆菌属

螺杆菌属感染多发生于免疫缺陷患者中。血培养瓶通常孵育5 d以上,并且在培养结束后,盲传至血平板,微需氧孵育。

9.8 军团菌属

肺炎继发菌血症少见,孵育培养5 d后,采用溶解-离心系统传种于活性炭酵母浸膏(BCYE)培养基培养。

9.9 钩端螺旋体

血培养中难分离。

9.10 支原体

人型支原体偶尔可从血培养中分离出来,添加补充明胶或精氨酸,可以提高检出率,生长缓慢并采用专用培养基。可疑肺炎支原体和人型支原体感染血液可以直接接种pH 4.5 SP4葡萄糖培养基。

10 血培养污染

10.1 即便严格遵守无菌操作,仍有3%~5%的血培养瓶中培养出皮肤(如表皮葡萄球菌、痤疮丙酸杆菌、梭菌、类白喉棒状杆菌)或周围环境(如不动杆菌属、芽孢杆菌属)中常见菌。这些菌大部分为污染菌,但出现以下情况考虑可能为致病菌:

- a) 不同部位血培养标本培养出同一种菌;
- b) 多次分离出同一种菌,且药敏结果相同。

10.2 污染菌不需做药敏试验,但应向临床报告,并提示可能污染,如痤疮丙酸杆菌(皮肤寄生菌)。

10.3 血培养中两种或两种以上细菌生长,可能是复数菌血症,如厌氧菌血症时可能有多种病原菌感染;也可能是污染所致。

11 血培养报告程序

11.1 血培养阳性报告程序

11.1.1 一级报告(初步报告)

血培养阳性,应立即进行涂片和革兰染色,尽量在1 h内报告给临床医师,包括:患者姓名、阳性血

培养瓶类型、瓶数、报警时间、涂片革兰染色特性及形态,询问患者目前感染情况和抗菌药物使用情况并记录,可向医师提出治疗建议。此外,还应记录报告时间、接收报告者信息和报告者信息。同时将阳性培养液传种适当培养基。各单位可根据自身医疗需求,决定是否基于涂片结果用培养液进行直接药敏试验。

11.1.2 二级报告(补充报告)

将初步鉴定结果及时报告医师。如进行直接药敏试验,应报告药敏结果。

11.1.3 三级报告(终报告)

包括菌种名称、血培养阳性时间(以小时计算)和标准药敏试验结果。

注:随着微生物快速诊断技术如基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)的应用,菌种鉴定结果有可能在第1天或第2天即可报告。

11.2 血培养阴性报告程序

11.2.1 报告内容:“血培养经××天培养阴性”。自动化仪器细菌培养一般设定周期为5 d,真菌14 d,分枝杆菌42 d;手工法细菌培养一般周期设定为7 d,真菌14 d,分枝杆菌60 d。

11.2.2 可在72 h培养阴性后,发布初步报告,但应说明“培养3 d阴性,标本将延长培养至××天,如为阴性可不重复报告”。如72 h后阳性,应按血培养阳性报告程序处理,与临床沟通并补发阳性报告。

11.2.3 手工法血培养在报告培养阴性前,宜将血培养液盲传至血琼脂平板和巧克力平板,于CO₂培养箱内孵育24 h,培养阴性后再报告。

11.3 报告审核

实验室应对阳性血培养涂片口头报告。应建立初步报告和最终报告的审核制度,并进行定期汇总分析,对实验室信息系统(LIS)需进行传输和性能验证。实验室应对以上项目制订标准操作流程。

12 血培养安全防护

12.1 安全培训

对实验室员工进行安全培训,应涵盖所有实验室活动。实验室质量保证体系的核心内容应包括培训、监测、事故报告、安全相关文件。

12.2 实验室感染

针刺伤感染;暴露的皮肤黏膜,接触气溶胶或微滴是主要感染途径。禁止在污染区用嘴吹吸移液管、咬指甲、抽烟、饮食、摘戴隐形眼镜、手或其他环境表面与眼、鼻、嘴接触等。

12.3 防护措施

12.3.1 洗手

在戴手套前、摘手套后、工作结束后、离开实验室和进入清洁区时均应洗手。如直接接触血液或潜在的感染性物质后应立即清洗暴露部位。

12.3.2 实验室生物安全要求

应在二级生物安全实验室条件下处理标本。疑为高致病性病原体如结核分枝杆菌、布鲁菌属、弗朗

西斯菌属、鼠疫耶尔森菌、类鼻疽博克霍尔德菌等阳性血培养的大量纯培养物应在三级生物安全实验室条件下处理。

12.3.3 防护用具

12.3.3.1 手套

采集血培养、接收和处理标本时应戴手套,采集下一患者时应换手套。血液污染手套、有破损迹象或失去防护作用时应及时更换。

12.3.3.2 面罩

实验室人员暴露于可经空气传播的高危险性物质或可能发生标本喷溅时,应配戴个人防护面罩。

12.3.3.3 隔离服

应穿隔离服,存在任何可见污染时立即脱去,并作为生物危险垃圾丢弃或严格按流程清洗。离开实验室或进入清洁区时应脱去隔离服。

12.4 防护针刺伤

12.4.1 尽可能减少注射器及锐器的使用。

12.4.2 使用注射器时,应避免回套针帽。

12.4.3 若用注射器采集血液,将血液直接注入血培养瓶,无需更换针头。注射器使用完毕后,应将针头放入锐器桶,不可重复使用。

12.4.4 使用后的注射器或其他锐器,应装入锐器桶内。

12.5 溢洒处理

12.5.1 若溢洒的感染性物质可经呼吸道传播,溢洒处的房间应关闭至少 30 min 以使微滴沉降。在清理溢洒时应戴个人防护用具。溢洒物含高危病原体(如结核分枝杆菌)时,应戴 N95 口罩。

12.5.2 根据溢洒物的量、类型、可能含有的传染性物质及其浓度和污染表面的类型,制定实验室具体处理措施。至少应包括以下要素:

- a) 容器及吸收物质;
- b) 用水溶性清洁剂去除残留的溢洒物;
- c) 用快速医用消毒剂如自制的漂白剂稀释液冲洗表面污染,浓度和作用时间取决于污染表面的类型;
- d) 擦去消毒剂并用水擦洗;
- e) 表面干燥防止滑倒;
- f) 去污染用的材料、所有被污染且不能有效去污染的物质均应处理。

13 菌株保存

血培养阳性菌株应保存并符合生物安全要求,以备复核或进一步检测。

参 考 文 献

- [1] 徐英春,倪语星,王金良.血培养操作规范[M].上海:上海科学技术出版社,2002:1-31.
- [2] 周庭银,倪语星,王明贵,林兆奋.血流感染实验室诊断与临床诊治.上海科学技术出版社,2014.
- [3] 习慧明,杨文航,刘文静,等.59例人体血液及静脉导管培养葡萄球菌阳性病例污染率及临床意义[J].中国护理管理,2011,11(2):14-16.
- [4] WS/T 433—2013 静脉治疗护理技术操作规范.
- [5] WS/T 442—2014 临床实验室生物安全指南.
- [6] CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Principles and procedures for blood cultures. approved guideline, 2007, M47-A, vol.27, No17.
- [7] W Michael, Dunne JR, Frederick S Nolte, et al. Blood culture III, cumitech 1B. American Society for Microbiology, 1997, 1:1-21.
- [8] 国家卫生和计划生育委员会:临床检验专业医疗质量控制指标(2015年版).
-