

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2018. 08. 012

某国产双向血培养瓶细菌培养分离效果的评价

向时庆, 杨 媚

(中国人民解放军陆军军医大学第一附属医院检验科, 重庆 400038)

摘要:目的 对某国产双向血培养瓶的灵敏度和抗菌药物吸附能力分析, 并评价其细菌分离效果。方法 (1)灵敏度检测: 用无菌生理盐水将标准菌株配制成 0.5 麦氏单位, 倍比稀释形成浓度梯度后分别接种于该双向血培养瓶, 常规培养。(2)抗菌药物吸附能力: 用 MH 肉汤稀释头孢噻肟和庆大霉素, 形成浓度梯度系列, 分析铜绿假单胞菌对未经树脂吸附处理过和经过树脂吸附处理过的药物溶液 MIC 的变化。(3)150 例临床标本同时用 Bect/Alert 血培养瓶和该双向血培养瓶培养, 并对其检出率、检出时间和检出种类进行统计。结果 (1)灵敏度: 大肠埃希菌、葡萄球菌均为 10^2 CFU/mL, 20 h 检测出阳性; 肺炎链球菌 10^2 CFU/mL, 48 h 检测出阳性, 10 CFU/mL, 72 h 检测出阳性, 流感嗜血杆菌 10^2 CFU/mL 20 h 检测出阳性; 白假丝酵母菌 10 CFU/mL, 48 h 检测出阳性;(2)抗菌药物吸附: 每毫升树脂吸附头孢噻肟、庆大霉素分别为 800.00、33.33 μ g;(3)Bect/Alert 血培养瓶和该双向血培养瓶阳性检出率均为 20.67%, 都检出 19 种病原菌。结论 该双向血培养瓶灵敏度较高, 抗菌药物吸附能力强, 操作简单易行, 价格便宜, 适合基层医院。

关键词: 灵敏度; 抗菌药物吸附能力; 双相血培养瓶

中图法分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)08-1092-04

Evaluate cultural effect of a domestic biphasic blood culture bottle

XIANG Shiqing, YANG Mei

(Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To analysis the sensitivity and adsorbability to antibiotic and to evaluate the effect of bacterial isolation of a domestic biphasic blood (Pangtong) culture system. **Methods** Sensitivity: dilute 0.5 McF typical strains of ATCC with SPSS to form concentration gradient and then separately inoculate into the blood culture bottles, routine cultivate. Adsorbability: dilution cefotaxime and gentamicin with MH broth to form concentration gradient. Analysis the change of MIC of pseudomonas aeruginosa to two antibiotics with and without treated. Cultivate 150 clinic specimen with Bect/Alert and PangTong culture bottles, and compare the detection rate, time and category. **Results** The sensitivity to Escherichia coli and Staphylococcus is 10^2 CFU/mL within 20 h, to Streptococcus pneumoniae is 10^2 CFU/mL and 10 CFU/mL within 48 h and 72 h, respectively, to Haemophilus influenzae is 10^2 CFU/mL within 20 h, to candida albicans is 10^2 CFU/mL within 48 h. Adsorbability is 800.00 μ g and 33.33 μ g to cefotaxime and gentamicin per ml resin. The positive ratio of Bect/Alert and PangTong biphasic blood culture bottles both is 20.67% without difference, and 19 pathogens were detected. **Conclusion** The sensitivity of PangTong biphasic blood culture bottle is high and adsorbability to antibiotic is powerful. There was no difference to Bect/Alert and PangTong biphasic blood culture bottles to investigate clinic specimen, but PangTong biphasic blood culture bottle need no special equipment. With simple manipulation and cheap, PangTong biphasic blood culture bottle fits to primary hospital.

Key words: sensitivity; adsorbability; bacteria analysis; biphasic blood culture bottle

现代检验医学体系中,微生物检验的重要性在临床诊断、治疗中日益凸显^[1]。近年来血培养的方法发展很快,各种自动化的血培养仪器系统大量出现,我国也大量引进了国外血培养系统,这对推动我国检验医学的快速发展和进步起到了很大的作用^[2]。但

我国应该在国外先进经验基础上形成符合我国实际情况的现代检验医学体系。目前,血液培养已成为最常见和最重要的临床实验^[3],但国内血培养在数量上与国外还存在一定差距,主要在于临床医生对该项工作的认识有一定差距^[4],还有一个重要原因是国外血

培养系统价格昂贵,在不少医院很难开展,为此性价比较高相应国产试剂也成为国内厂家追求和发展的趋势。某国产双向血培养瓶在这种情况下应运而生,并获得国家专利,为评价该产品性能,本研究通过以下 3 个方面进行检测,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 收集 2016 年 4—6 月本院大肠埃希菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC25923、肺炎链球菌 ATCC49619、流感嗜血杆菌 ATCC49207、白假丝酵母菌 ATCC18804、铜绿假单胞菌 ATCC27853,以及临床血液、胸腔积液、腹腔积液、脑脊液等无菌体液标本 150 例。

1.1.2 血培养瓶 某国产双向血培养瓶(重庆庞通医疗器械有限公司),BacT/ALERT 需氧瓶(法国生物梅里埃),均为有效期产品。

1.1.3 抗菌药物 头孢噻肟(华北制药凯瑞特制药有限公司,国药准字 H10980277),庆大霉素(佳木斯第二制药厂,国药准字 H23021304)。

1.2 方法

1.2.1 血培养瓶灵敏度检测 实验方法参照文献建立^[1-2,5-6]:用无菌生理盐水,配制含 0.5 麦氏细菌悬液[细菌相当于(1~2)×10⁸ CFU/mL,其中酵母菌为(1~2)×10⁶ CFU/mL],倍比稀释,即取 0.2 mL 菌液加入 1.8 mL 生理盐水中配成 10⁷ CFU/mL 细菌悬液,以此类推,将大肠埃希菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC25923、肺炎链球菌 ATCC49619、流感嗜血杆菌 ATCC49207 配制为 10⁸、10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10 共 8 个含菌梯度,各取 5 个梯度即 10⁶、10⁴、10³、10²、10 菌液 1 mL,分别接种于血培养瓶中;将白假丝酵母菌 ATCC18804 配制为 10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10 共 6 个含菌梯度,取 4 个梯度即 10⁴、10³、10²、10 菌液 1 mL,分别接种于血培养瓶中;同时将剩余菌液定量接种于平板上,观察是否有细菌生长。置于 CO₂ 孵箱中 35~37 ℃ 恒温培养,常规培养 5 d,工作时间每隔 2 h 轻轻地旋转、摇动培养瓶,并注意观察固相指示系统及瓶中培养液颜色的变化。

1.2.2 抗菌药物吸附实验 以头孢噻肟和庆大霉素为代表进行了实验分析。

1.2.2.1 抗菌药物稀释液的制备 头孢噻肟钠稀释液:取 0.5 g 头孢噻肟溶解在 5 mL 生理盐水中,再稀释成 5 120 μg/mL 的储存液;然后再用 MH 肉汤稀释储存液,终浓度为 256 μg/mL 作为倍比稀释的第 1 稀释度。

庆大霉素稀释液:取 20 mg/mL 注射液 1 mL,再加生理盐水 2.9 mL 配制成 5 120 μg/mL 的储存液;用 MH 肉汤稀释储存液形成终浓度为 16 μg/mL,作

为倍比稀释的第 1 稀释度。

1.2.2.2 制备经过吸附处理抗菌药物稀释液作为测试组 取上述头孢噻肟储存液(5 120 μg/mL)、庆大霉素贮存液(5 120 μg/mL)2 mL,加入 78 mL 的 MH 肉汤中,溶液中混合有 12 mL 无菌大孔树脂,室温下使其吸附处理 4 h。

1.2.2.3 铜绿假单胞菌在上述 2 种稀释液中 MIC 的测定 测定铜绿假单胞菌 ATCC27853 对处理与未处理头孢噻肟与庆大霉素的 MIC 值,未处理与处理抗菌药物 MIC 值的差异为吸附剂吸附抗菌药物值。根据美国临床和实验室标准协会(CLSI) M07-A8 标准文件采用微量肉汤稀释法,每试管中的肉汤应为 1 mL,将试验分为 2 组,未经树脂吸附处理过的药物溶液为对照组,而经过树脂吸附处理过的药物溶液为测试组,每组均设列 3 小组。抗菌药物用 MH 肉汤稀释,形成浓度梯度系列。设计头孢噻肟浓度范围为 4~256 μg/mL,庆大霉素浓度范围 0.5~8.0 μg/mL。孵育:35 ℃,空气,20~24 h。MIC 是肉眼观察试管中的细菌生长完全被抑制时的最低抗微生物药物浓度。

1.2.3 临床标本对比实验 将临床血液标本、胸腔积液、腹腔积液、脑脊液等无菌标本同时注入梅里埃和庞通血培养瓶,常规培养,记录生长情况、生长时间,对比分离细菌种类。采用法国生物梅里埃公司的 API 系统进行鉴定。

2 结 果

2.1 灵敏度及检出时间 标准菌株系列稀释后接种到某国产双向血培养瓶中,对普通细菌检测灵敏度:大肠埃希菌、葡萄球菌均为 10² CFU/mL(20 h);对苛养菌检测灵敏度:肺炎链球菌为 10⁴ CFU/mL(20 h)、10³ CFU/mL(36 h)、10 CFU/mL(72 h),流感嗜血杆菌 10² CFU/mL(20 h);对真菌检测灵敏度:白假丝酵母菌 10 CFU/mL(48 h)。见表 1。

表 1 某国产双向血培养瓶对标准菌株检测的灵敏度					
菌群	10 ⁶ (CFU/mL)	10 ⁴ (CFU/mL)	10 ³ (CFU/mL)	10 ² (CFU/mL)	10 (CFU/mL)
大肠埃希菌	+(20 h)	+(20 h)	+(20 h)	+(20 h)	—
金黄色葡萄球菌	+(20 h)	+(20 h)	+(20 h)	+(20 h)	—
肺炎链球菌	+(20 h)	+(20 h)	+(36 h)	+(48 h)	+(72 h)
流感嗜血杆菌	+(20 h)	+(20 h)	+(20 h)	+(20 h)	—
白假丝酵母菌	+(48 h)	+(48 h)	+(48 h)	+(48 h)	

注: + 表示生长, — 表示未生长, (n) 表示生长的时间

2.2 抗菌药物吸附能力 头孢噻肟对照组的 MIC 为 8 μg/mL,测试组 MIC 为 128 μg/mL,其差值为 120 μg/mL,亦即每毫升溶液中头孢噻肟被吸附去 120 μg。每毫升 A 号树脂吸附头孢噻肟 120 μg×80 mL÷12 mL=800 μg。庆大霉素对照组的 MIC 为 1 μg/mL,测试组 MIC 为 6 μg/mL,其差值为 5 μg/

mL,亦即每毫升溶液中庆大霉素被吸附去 5 μg。每毫升 B 号树脂吸附头孢噻肟为 5 μg×80 mL÷12 mL=33.33 μg。

2.3 两种培养瓶阳性检出率比较 Bect/Alert 血培养瓶和国产双向血培养瓶 37 例均检出病原菌,阳性率为 20.67%,其中 30 例为单一菌株感染,7 例为复合感染。

2.4 某国产双向血培养系统检出病原菌的时间统计
某国产双向血培养瓶 20 h 内阳性检出率为 86.49% (32/37),48、72 h 阳性检出率分为 94.60% (35/37)、100% (37/37)。

2.5 细菌检出种类 150 份血标本中共检出病原菌 49 株、19 种,见表 2。

表 2 某国产双向血培养瓶分离菌种及株数(n)				
菌名	24 h	48 h	72 h	总计
表皮葡萄球菌	4	2	1	7
金黄色葡萄球菌	2			2
大肠埃希菌	12			12
鲍曼不动杆菌	1		1	2
无乳链球菌	3			3
嗜麦芽假单胞菌	2			2
无名念珠菌	1			1
白色念珠菌	1			1
阴沟肠杆菌	5			5
铜绿假单胞菌	1			1
肺炎链球菌		1		1
奇异变形杆菌	1			1
乳球菌	1			1
产气肠杆菌	2			2
屎肠球菌	3			3
粪肠球菌	1			1
流感嗜血杆菌	1			1
反硝化产碱菌	1			1

3 讨 论

目前,临床常见的血培养检测系统是 BacT/Alert 系统和 Fabactec Plus 系统,有助于血液感染的实验室诊断快速而准确,有助于临床正确和合理使用抗菌药物^[4]。但是这些产品都来源于国外,需要高昂的投入,血培养瓶为一次性使用品,其价格也较为昂贵,其在国内的使用也受到一定程度的限制,尤其是在一些基层医院表现得尤为突出。

某国产双向血培养系统采用带有琼脂斜面的固液双向血培养瓶形式,将传统二步法合二为一,不仅可缩短检菌时间、简化操作和减少人为污染,而且较人工培养瓶提高了检测灵敏度。通过实验分析发现:大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌浓度为 10² CFU/mL 时,20 h 便可以被检测出;肺炎链球菌浓度为 10²

CFU/mL 时,48 h 可以被检测出;当 10 CFU/mL 时,72 h 也可以被检测出;流感嗜血杆菌浓度为 10² CFU/mL 时,20 h 便可以检测出;白色念珠菌浓度为 10 CFU/mL 时,48 h 便可以检测出。该国产血培养系统是利用微生物在生长过程中产生气体,当产生的气体到达一定压力时就将含有细菌的培养液压到固相系统,细菌就在固体培养基上生长^[2]。与 BacT/Alert 血培养系统相比,该国产血培养系统虽然没有灵敏的检测系统,故阳性报警时间长于 BacT/Alert 血培养系统,但是只要有微生物生长,20~48 h 可以在固体培养基上得到菌体,有利于进一步做鉴定与药敏,相应大大地缩短了时间。

当血液中抗菌药物的含量到达一定浓度可以抑制细菌的生长,尤其是大量使用高级抗菌药物的患者,其血培养可能由此而出现假阴性,中和血液标本中抗菌药物有利于阳性率的提高^[7-11]。庞通血培养瓶中含有能吸附抗菌药物的树脂。通过本实验分析也发现每毫升树脂吸附头孢噻肟、庆大霉素分别为 800.00、33.33 μg,这也有利于血标本阳性率的提高。

众所周知,血培养出现阳性时间及阳性率与抽血量、血中所含菌量、细菌种类及培养基营养成分有关^[12-13]。某国产血培养瓶大容量,80 mL 培养液。按照 40 mL 培养液允许抽血量 8~10 mL,那么 80 mL 可以抽血 16~20 mL,有利于阳性率的提高。庞通双向血培养瓶富含多种生长因子,完整的氨基酸系列和各种维生素,不仅能促进血液中的一般细菌快速繁殖,更能支持各种营养要求较高的细菌的生长。庞通血培养系统对 150 份临床标本进行检测,其阳性率为 20.67%,与 BacT/Alert 血培养系统一致,无显著性差异,而且培养出真菌、流感嗜血杆菌、肺炎链球菌等苛养菌。150 份标本培养出 49 株、19 种细菌(含真菌),其中 30 份标本培养出单一菌株,7 份标本培养出复合菌。37 份阳性标本,24 h 内为阳性者 32 份,占阳性标本的 86.49%,48 h 达到 94.60%。

由于全自动培养仪和进口血培养瓶价格昂贵,基层医院收费较低,无条件使用,而手工自配血培养瓶营养成分不足,无法及时、准确地为临床服务。庞通双向血培养系统价格适中、操作简便、检出率高、检测时间短,广泛适用于多种细菌的生长,为医院感染的诊断、监控、治疗和其他方面的临床应用提供了良好的条件,为暂无仪器配备的医院提高细菌阳性检出率提供了一种简便、可行的解决途径,尤其适合基层医院使用。

参考文献

[1] 王春玉,陈中举,朱旭慧,等. 3 种不同全自动血培养仪的临床应用及评价[J]. 检验医学与临床,2016,13(7):913-916. (下转第 1097 页)

B 型,但差异无统计学意义($P>0.05$),这表明自身抗体的出现与基因型可能没有关联,C 型更容易产生自身抗体有待于证实。

在过去的报道中,HBV DNA 可自然地发生耐药位点的突变,在使用抗病毒药物之后,通过免疫、药物和自然突变多种因素的影响产生耐药的 HBV,这给治疗难度带来巨大的挑战。在治疗过程中对耐药位点突变进行检测,有助于评估药物疗效,从而更好地选择治疗方案和预防处理耐药问题^[10]。本研究选取 LAM 耐药相关位点(M204I、M204V、L180M)和 ADV 耐药相关位点(N236T、A181T、A181V),基因位点在 B 型和 C 型中的分布差异无统计学意义($P>0.05$),与孙丽娜等^[11]研究中 M204V、N236T、A181T、A181V 4 个位点在 B 型和 C 型中的分布存在差异,这可能是由于此次标本量较少所导致的,应增加患者例数再做分析。

综上所述,自身抗体与慢性乙型肝炎患者的病程发展有一定联系,不同基因型产生自身抗体和耐药位点突变在基因型中的分布须进一步进行研究。

参考文献

- [1] 王贵强,王福生,成军,等.慢性乙型肝炎防治指南(2015 年版)[J/CD].中国肝病杂志(电子版),2015,19(3):1-18.
- [2] ZOULIM F,LOCARNINI S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues[J]. Gastroenterology, 2009, 137(5):1593-1608.
- (上接第 1094 页)
- [2] 王庆玲,梁冰. Versa TREK 血培养系统的临床应用及评价[J]. 实用医药杂志,2017,34(2):116-118.
- [3] 林广城,聂署萍,谭燕清,等. 汇征吉礼需氧血培养瓶与 BD Bactec 需氧瓶的对比分析[J]. 中国热带医学,2015, 15(7):878-880.
- [4] 胡珊,康海全,马萍,等. 重点科室宣讲推进血培养规范送检效果分析[J]. 临床与病理杂志,2016,36(12):1991-1995.
- [5] 黄春红,王云英. BacT/Alert 3D 型全自动血培养仪性能评价[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(19):2421-2422.
- [6] LYNN L H, BEBJAMIN J G, CLINTON K M, et al. Direct comparison of the BACTEC9240 and BacT/ALERT 3D automated blood culture medium[J]. J Clin Microbiol, 1998(36):3731-3733.
- [7] 黄梅,王颖,王卫萍,等. 两种吸附抗生素血培养瓶对血流感染检测能力的比较[J]. 东南国防医药,2014,16(2): 117-120.
- [8] FLAYHART D, BOREK A, WAKEFIELD T, et al. Abil-

- [3] AGMON-LEVIN N, RAM M, BARZILAI O, et al. Prevalence of hepatitis C serum antibody in autoimmune diseases[J]. J Autoimmun, 2009, 32(3/4):261-266.
- [4] 谢巧灵,丛庆伟,吴凌虹,等. 耐核苷(酸)类药物慢性乙型肝炎和肝硬化患者血清 HBV 基因型和 P 区耐药突变点分析[J]. 实用肝脏病杂志,2016,19(1):60-63.
- [5] 林芳,冯霞,张国元,等. 慢性乙型肝炎细胞免疫研究动态[J]. 北京医学,2011,33(6):494-496.
- [6] 刘宁,徐杰,刘金花,等. 慢性乙型肝炎、乙型肝炎肝硬化、乙型肝炎患者 Th1/Th2 型细胞因子水平变化研究[J]. 胃肠病学和肝病杂志,2014,23(2):158-161.
- [7] SHELDON J, RODÈS B, ZOULIM F, et al. Mutations affecting the replication capacity of the hepatitis B virus[J]. J Viral Hepat, 2006, 13(7):427.
- [8] 郑卫波,许文芳,李烨佳. HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者 HBV 基因型分布及其与抗病毒治疗疗效的关系[J]. 检验医学,2015,30(4):349-352.
- [9] 叶扬,张芳,马玲. 慢性乙型肝炎患者血清 HBsAg 定量和 HBV-DNA 检测在 HBV 基因型与耐药变异中的临床研究[J/CD]. 世界最新医学信息文摘(连续型电子期刊), 2015,15(3):7-8.
- [10] 谢巧灵,丛庆伟,吴凌虹,等. 耐核苷(酸)类药物慢性乙型肝炎和肝硬化患者血清 HBV 基因型和 P 区耐药突变点分析[J]. 实用肝脏病杂志,2016,19(1):60-63.
- [11] 孙丽娜,孙剑,刘学恩,等. 乙型肝炎病毒耐药相关位点变异模式与基因型的相关性[J]. 中国病毒病杂志,2012,2 (2):102-106.

(收稿日期:2017-09-17 修回日期:2017-11-27)

- ity of BD BACTEC Plus blood culture bottles versus BacT/Alert FAN blood culture bottles to detect bacterial pathogens samples containing vancomycin[J]. The 105th General Meeting of the American Society for Microbiology, 2005(23):123-131.
- [9] 曹珂,万霞. 两种不同血培养系统对模拟菌血症抗生素吸附能力的研究[J]. 航空航天医学杂志,2014,25(1):5-7.
- [10] 栗方,曹彬. 两种血培养系统对细菌与真菌检测能力比较[J]. 中华医院感染学杂志,2013,23(2):473-474.
- [11] 费志伟. 不同血培养系统对模拟菌血症抗生素吸附能力的研究[J]. 中国医药指南,2015,13(30):67.
- [12] MERMEL L A, MAKI D G. Detection of bacteremia in adults consequences of culturing an inadequate volume of blood[J]. Ann Intern Med, 1993, 119(4):270-272.
- [13] 马楠,李国智,马俊. 全自动血液培养系统在血流感染诊断中的价值及影响因素[J]. 检验医学与临床,2014,11 (11):1253-1255.

(收稿日期:2017-09-14 修回日期:2017-11-24)