

## 营养肉汤培养法在新型冠状病毒肺炎并发感染患者其他病原菌培养中的应用

王锦萍 王军 梁连辉 陈春明 梁栋 吴玉萍

作者单位: 528400 广东中山, 中山市第二人民医院检验科

通信作者: 王锦萍, Email: apple1981apple@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2021.04.003

**【摘要】** 目的 探讨新型冠状病毒肺炎(新冠肺炎)患者并发感染时,将营养肉汤培养法应用于其他病原菌培养的可行性。方法 收集 2020 年 1—5 月中山市第二人民医院收治的新冠肺炎并发感染患者的 89 份其他病原菌标本,分别使用营养肉汤微生物学培养法(营养肉汤培养组)与传统微生物学培养法(传统培养组)进行培养,比较两种培养方法检出细菌和真菌的阳性率差异以及检出的病原菌分布。结果 标本来源主要为肺泡灌洗液、导管尖端、伤口分泌物等,细菌培养标本 65 份,真菌培养标本 24 份。营养肉汤培养组与传统培养组的细菌检出阳性率比较差异无统计学意义[55.3% (36/65) 比 52.3% (34/65),  $P > 0.05$ ], 一致性优( $K=0.938$ ); 营养肉汤培养组与传统培养组的真菌检出阳性率比较差异亦无统计学意义[58.3% (14/24) 比 50.0% (12/24),  $P > 0.05$ ], 一致性优( $K=0.834$ ); 营养肉汤培养组与传统培养组的细菌和真菌总检出阳性率比较差异无统计学意义[56.2% (50/89) 比 51.7% (46/89),  $P > 0.05$ ], 一致性优( $K=0.910$ )。营养肉汤培养组与传统培养组检出率最高的病原菌为嗜麦芽芽孢单胞菌[分别为 62.0% (31/50)、65.2% (30/46)], 近光滑假丝酵母菌[分别为 18.0% (9/50)、17.4% (8/46)]。结论 营养肉汤培养法可在新冠肺炎初发时期和突发公共卫生事件的病原菌培养中使用,有助于降低检验人员培养其他病原菌时感染新冠肺炎的风险。

**【关键词】** 新型冠状病毒肺炎; 新型冠状病毒; 营养肉汤培养法; 病原菌

**基金项目:** 广东省中山市社会公益与基础研究项目(2020B1023)

### Application of nutrient broth culture method in culture of other pathogens in coronavirus disease 2019 patients complicated with concurrent infection

Wang Jinping, Wang Jun, Liang Lianhui, Chen Chunming, Liang Dong, Wu Yuping. Department of Clinical Laboratory, the Second People's Hospital of Zhongshan City, Zhongshan 528400, Guangdong, China

Corresponding author: Wang Jinping, Email: apple1981apple@163.com

**【Abstract】 Objective** To explore the feasibility of using the nutrient broth culture method for other pathogens in coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients with concurrent infection. **Methods** A total of 89 samples of other pathogenic bacteria in COVID-19 patients complicated with infection were collected from the Second People's Hospital of Zhongshan City from January to May 2020, and cultured with nutritive broth microbiology method (nutritive broth culture group) and traditional microbiology method (traditional culture group). The differences in the detection results of bacteria and fungi and the distribution of pathogens detected by the two culture methods were compared. **Results** The main sources of specimens were alveolar lavage fluid, catheter tip and wound secretion. There were 65 bacterial culture specimens and 24 fungal culture specimens. There was no significant difference in bacterial detectable rates between nutritive broth culture group and traditional culture group [55.3% (36/65) vs. 52.3% (34/65),  $P > 0.05$ ], with excellent consistency ( $K = 0.938$ ). There was no significant difference between the nutritive broth culture group and traditional culture group in fungal detectable rates [58.3% (14/24) vs. 50.0% (12/24),  $P > 0.05$ ], with excellent consistency ( $K = 0.834$ ). There was no significant difference in total detectable rates of bacteria and fungi between nutritive broth culture group and traditional culture group [56.2% (50/89) vs. 51.7% (46/89),  $P > 0.05$ ], with excellent consistency ( $K = 0.910$ ). The pathogens with the highest detectable rate nutritive broth culture and traditional culture groups were *Stenotrophomonas paedophilia* [62.0% (31/50) and 65.2% (30/46)] and *Candida albicans* [18.0% (9/50) and 17.4% (8/46)]. **Conclusion** The nutrient broth culture method could be used for pathogen culture in the early onset of COVID-19 and unexpected public health events, and reduce the inspectors' infection risk of COVID-19.

**【Key words】** Coronavirus disease 2019; 2019 Novel coronavirus; Nutrient broth culture method; Pathogenic bacteria

**Fund Program:** Social Welfare and Basic Research Project of Zhongshan, Guangdong Province (2020B1023)

新型冠状病毒(2019 novel coronavirus, 2019-nCoV)引起的新型冠状病毒肺炎(新冠肺炎)自 2019 年出现后,已在多个国家传播,构成全球范围的流行<sup>[1-2]</sup>。随着患者不断增多,新冠肺炎并发肺部细菌感染病例也逐渐增多,微生物学检验标本不可灭活,且含有高载量的 2019-nCoV,造成微生物培养检验医师感染风险增加。本研究收集新冠肺炎并发感染患者的细菌和真菌培养标本,采用营养肉汤培养法进行微生物学培养,并传统微生物培养法进行比较,旨在减少微生物培养过程中的生物安全风险,现将结果报告如下。

### 1 资料与方法

**1.1 研究对象** 收集 2020 年 1—5 月本院收治的新冠肺炎并发感染患者的 89 份细菌和真菌培养标本,新冠肺炎病例诊断标准符合国家卫生健康委制定发布的新冠肺炎诊疗方案<sup>[3-4]</sup>。

**1.2 仪器与试剂** 采用 BD Phoenix-100 全自动微生物鉴定及药敏分析仪(美国碧迪公司), VITEK<sup>®</sup> RMS 微生物质谱检测仪和 BACT/Alert 3D 全自动血培养仪(法国生物梅里埃公司), Thermo 371 CO<sub>2</sub> 培养箱, Thermo Scientific 1300 系列 A2 生物安全柜(美国赛默飞公司)。质量控制(质控)菌株为大肠埃希菌 ATCC25922,金黄色葡萄球菌 ATCC25923,铜绿假单胞菌 ATCC27853,白色念珠菌 ATCC90028。

### 1.3 研究方法

**1.3.1 不同标本处理方法** ① 胆汁、腹水、胸水:营养肉汤培养组标本存储于梅里埃血培养瓶,传统培养组标本存储于无菌容器;② 导管尖端、伤口分泌物、中段尿:营养肉汤培养组标本存储于 4 mL 营养肉汤螺旋管中,传统培养组标本存储于无菌容器,其中中段尿需要 1 mL;③ 肺泡灌洗液:营养肉汤培养组标本存储于 4 mL 营养肉汤螺旋管,传统培养组标本存储于无菌容器。所有标本均给予 3 层包装,置于贴有生物安全标识的样本箱,立即送检。

**1.3.2 不同标本培养方法** 在生物安全柜中打开包装,对无菌容器进行乙醇消毒。挑取黏稠肺泡灌洗液标本进行涂片检查,紫外线照射 30 min 灭活病毒,置于染片盒里染革兰 1 液,从生物安全柜中拿出进行后续染色。经革兰染色后,若每个低倍视野可见上皮细胞 < 25 个、白细胞 > 10 个,则为合格标本。① 营养肉汤培养组:胆汁、腹水、胸水标本直接置于全自动血培养鉴定仪培养;导管尖端、伤口分泌物、中段尿、肺泡灌洗液标本在营养肉汤螺旋管里经 37 ℃,

18 ~ 24 h 增菌后接种于血平板、麦康凯平板、巧克力平板和沙保罗平板。② 传统培养组:胆汁、腹水、胸水、导管尖端、伤口分泌物标本接种于血平板、麦康凯平板、巧克力平板、营养肉汤和沙保罗平板;中段尿、肺泡灌洗液标本接种于血平板、麦康凯平板、嗜血杆菌巧克力平板和沙保罗平板。

**1.3.3 菌种鉴定及药敏试验** 所有标本经 37 ℃, 18 ~ 24 h 分离培养后,挑选可疑菌落进行菌种鉴定及药敏试验。结果判定按照美国临床与实验室标准协会 2019 年第 29 版抗菌药物敏感性试验执行标准(M100-S29)执行。

**1.3.4 生物安全防护** 检验人员采取三级防护措施,穿着隔离服,佩戴 N95 口罩和双层橡胶手套。配置负压独立实验室及外排式 A2 生物安全柜,标本的接种、涂片、鉴别及药敏试验均尽量在生物安全柜中操作。标本培养需要一层包装,经 75% 乙醇消毒后移生物安全柜,放入培养箱培养,在不影响鉴定结果的前提下,全自动微生物鉴定仪所用鉴定试剂在上机前须经紫外线照射 30 min 或 75% 乙醇消毒。医疗废物须进行高压灭菌处理。

**1.4 伦理学** 本研究符合医学伦理学标准,并经本院伦理审批(审批号:20211101),所有检测及治疗均获得过患者或家属的知情同意。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 16 软件进行统计分析,计数资料以株(%)表示,采用  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。采用 Kappa(K)检验两种方法的一致性, $K > 0.8$  说明一致性优。

## 2 结果

**2.1 本院收集标本来源分布及数量** 共收集 89 份待检标本。见表 1。

表 1 2020 年 1—5 月新冠肺炎并发感染患者标本来源分布及数量

培养类型	标本数(份)	标本来源(份)						
		胆汁	腹水	胸水	导管尖端	中段尿	伤口分泌物	肺泡灌洗液
细菌培养	65	1	1	2	5	3	6	47
真菌培养	24	0	0	2	1	1	2	18
总计	89	1	1	4	6	4	8	65

**2.2 不同培养方法两组标本细菌和真菌培养结果比较** 营养肉汤培养组与传统培养组的细菌培养检测结果比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), K 值为 0.938,表明两种方法一致性优。营养肉汤培养组与传统培养组的真菌培养检测结果比较差异亦无统计学意义( $P > 0.05$ ), K 值为 0.834,表明一致性优。营

养肉汤培养组与传统培养组的培养细菌和真菌总检出阳性率比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ),  $K$  值为 0.910, 表明两种方法一致性优。因此, 营养肉汤培养法与传统培养法的检出结果一致性较高, 可认为营养肉汤培养法可靠。见表 2。

表 2 不同培养方法两组细菌及真菌检测结果比较

培养类型	标本数 (份)	营养肉汤培养组		传统培养组	
		阳性菌株 (株)	阳性率 (%)	阳性菌株 (株)	阳性率 (%)
细菌培养	65	36	55.3	34	52.3
真菌培养	24	14	58.3	12	50.0
总计	89	50	56.2	46	51.7

**2.3 微生物鉴定** 经全自动微生物鉴定及药敏分析仪和微生物质谱检测仪检测, 营养肉汤培养组与传统培养组检出的主要病原菌分布基本相同, 检出率最高的病原菌为嗜麦芽窄食单胞菌 [分别为 62.0% (31/50)、65.2% (30/46)] 和近光滑假丝酵母菌 [分别为 18.0% (9/50)、17.4% (8/46)]。见表 3。

表 3 2020 年 1—5 月新冠肺炎并发感染患者标本检出病原菌种类及构成比

病原菌名称	营养肉汤培养组		传统培养组	
	株数 (株)	构成比 (%)	株数 (株)	构成比 (%)
嗜麦芽窄食单胞菌	31	62.0	30	65.2
表皮葡萄球菌	2	4.0	1	2.2
溶血葡萄球菌	1	2.0	1	2.2
链球菌	2	4.0	2	4.3
白色假丝酵母菌	3	6.0	2	4.3
近光滑假丝酵母菌	9	18.0	8	17.4
马尔尼菲篮状菌	2	4.0	2	4.3
总计	50	100.0	46	100.0

### 3 讨论

2019-nCoV 是一种直径为 60~140 nm 的  $\beta$  属冠状病毒, 病毒颗粒有包膜, 呈圆形、椭圆形或多形型, 以呼吸道飞沫、密切接触和气溶胶为主要传播途径<sup>[5-6]</sup>。有研究报道, 2019-nCoV 可经冷链传播<sup>[7]</sup>, 气溶胶传播途径亦备受关注。新冠肺炎疫情期间, 医院检验科在工作流程、人员配置、后勤保障等方面都需要采取应对措施, 在最大限度保障检验医师安全的前提下高效地完成病原体检测工作<sup>[8]</sup>。微生物实验室通常为密闭空间, 检验人员处理新冠肺炎患者体液标本时除密切接触外, 还会产生高浓度气溶胶。细菌或真菌培养时间为 3~7 d, 培养过程不可灭活标本或病毒, 大大增加了检验人员感染 2019-nCoV 的可能性, 营养肉汤培养法在采样时可减少采集量, 且培养前灭活病毒, 能减少病毒载量,

从而达到降低微生物培养风险的目的。

比较不同微生物培养方法所得病原菌检出结果, 营养肉汤培养组和传统培养组检出率差异无统计学意义, 两种方法一致性优。可见营养肉汤法与传统培养法的病原体检出情况基本一致, 而且对于目标菌株的鉴定结果也几乎一致, 产生的差异主要为 1 份导管尖端标本和 3 份肺泡灌洗液标本的随机样本误差。导管尖端、伤口分泌物、中段尿标本置于营养肉汤中送检, 马上置于 37 °C 培养箱孵育 12~24 h 再转种, 此方法与传统培养法比较, 理论上更容易保存菌种并培养出目标菌种, 但因为本研究样本量较少, 缺乏理论支持, 暂作为一致结论。对肺泡灌洗液标本采用营养肉汤培养法是首次使用, 传统培养法 3 例阴性结果可能由检验人员对阳性目标菌株的判断差异引起, 而肺泡灌洗液的细菌培养和真菌培养标本量比其他类型标本多, 且肺泡灌洗液标本检测对检验人员的微生物学检验技术要求较高, 需要区分污染菌、定植菌、咽部正常菌群和条件致病菌等, 由此产生人为随机误差的可能性较大。使用两种培养方法对胆汁、腹水、胸水标本的检测结果一致, 因此不做讨论。

从生物安全角度来看, 营养肉汤培养法与传统培养法相比能降低病毒载量, 减少检验医师职业暴露的风险。在微生物标本的送检过程中, 可能存在各类无菌容器标本泄漏的问题, 虽然可以重新采集标本, 但无疑会增加采样人员和检验人员的感染风险。无论是对盛放肺泡灌洗液的支纤瓶还是采集难度较高的胆汁、腹水、胸水标本, 传统培养法的流程是临床医生采集后将标本放入无菌容器 3 层包装立即送检, 运送过程中标本有泄露风险, 但通常由检验人员接收标本后, 进入微生物实验室开始检测时才能发现标本泄露问题, 继而通知临床科室标本污染, 需要重取送检。营养肉汤培养法相对传统培养法可以很好地解决部分人为造成的标本泄漏问题, 采用螺旋口营养肉汤管代替传统的支纤瓶, 不需人工封口, 能减少带有开放性接口的支纤瓶泄漏问题; 胆汁、腹水、胸水标本直接由临床医生抽取后置入血培养瓶送检, 由全自动血培养仪 24 h 不间断检测数据, 减少人工操作步骤, 从而减少人为操作不当导致的污染和标本泄漏问题, 同时可在最短时间内发现阳性结果, 在保证检验结果准确的同时降低采样人员和检验人员的感染风险。对于新冠肺炎患者, 特别是重症和危重症患者, 减少重新取样次数还能减

少患者痛苦,因此营养肉汤培养法优势明显。

营养肉汤培养法对标本量无要求,只需少量标本即可进行培养,且培养时只需接种增菌后的营养肉汤即可,因此能降低后续培养及鉴定过程中培养皿及菌种携带的病毒载量。有研究显示,2019-nCoV 在体外可存活 4~6 h,附着于新冠肺炎患者分泌物上则可存活 4~5 d<sup>[9]</sup>。2019-nCoV 颗粒直径约为 0.06~0.20 nm,真菌颗粒直径约为 2.5~60.0 nm,球菌颗粒直径约为 0.4~1.2 nm,杆菌颗粒直径约为 0.3~4.0 nm<sup>[10]</sup>,因此微生物学培养的菌株可以成为携带 2019-nCoV 的微生物气溶胶,减少标本量可以从源头上减少病毒载量。

采用营养肉汤培养法时,实验室接收标本后可以保留最后一层包装,于培养箱中 37℃ 静置培养 12~24 h,操作时能减少气溶胶产生。有研究表明,高浓度 2019-nCoV 在 35~40℃ 条件下可在 1 d 内完全失去活性,当超过 40℃ 时只能存活 6 h<sup>[11-12]</sup>。本研究中营养肉汤培养法的培养时间虽然有时未达到 24 h,但也起到有效降低 2019-nCoV 活性的作用。虽然随着病毒的变异,温度对其影响可能变小,但只要控制好培养时间就能起到减毒的作用。

目前认为 2019-nCoV 疫苗可有效预防新冠肺炎,但“疫苗后时代”还可能产生不可预知的问题。最早于 2020 年 10 月在印度发现的德尔塔(Delta)变异株是 2019-nCoV 的变异毒株之一,其在 2021 年 5 月 21 日后从境外输入至我国广东省,并引发了局部聚集性疫情<sup>[13]</sup>,2019-nCoV Delta 变异株的平均潜伏期约为 4.4 d,较原始毒株缩短了 1~2 d,具有较快的传播速率<sup>[14-15]</sup>。已接种疫苗的健康人群仍然有感染 2019-nCoV Delta 变异株的风险,且无症状感染者比例有所降低<sup>[16-17]</sup>。2021 年 11 月 9 日,南非再次分离出 2019-nCoV 新变异株奥密克戎(Omicron),此变异株是否比 Delta 变异株有更强的传播力和竞争优势,以及是否对现有疫苗产生免疫逃逸,尚有待进一步的研究。

随着新冠肺炎在全球的大范围流行,可预测还会出现更多新变异株,抗 2019-nCoV 特效药的临床应用可能需要更长的时间,感染控制仍是目前疫情防控的重中之重,生物安全防护还是可控制的手段,营养肉汤培养法从生物安全角度来说,适合在新冠肺炎时期和其他突发公共卫生事件中应急使用,既能保证培养效果,同时可降低相关人员的感染风险。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- SMITH J A, JUDD J. COVID-19: vulnerability and the power of privilege in a pandemic [J]. Health Promot J Austr, 2020, 31 (2): 158-160. DOI: 10.1002/hpja.333.
- BEDFORD J, ENRIA D, GIESECKE E, et al. COVID-19: towards controlling of a pandemic [J]. Lancet, 2020, 395 (10229): 1015-1018. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30673-5.
- 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第六版)[EB/OL]. (2020-02-19) [2021-06-03]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202002/8334a8326dd94d329df351d7da8aef2/files/b218cfeb1bc54639af227f922bf6b817.pdf>.
- 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)[EB/OL]. (2020-03-04) [2021-06-03]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202003/46c9294a7dfe4cef80dc7f5912eb1989/files/ce3e6945832a438eaae415350a8ce964.pdf>.
- 费明明,童飞,陶小根,等. 中性粒细胞/淋巴细胞比值对新型冠状病毒肺炎患者疾病分型的诊断价值[J]. 中华危重病急救医学, 2020, 32 (5): 554-558. DOI: 10.3760/ema.j.cn121430-20200413-00506.
- WU A, PENG Y, HUANG B, et al. Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China [J]. Cell Host Microbe, 2020, 27 (3): 325-328. DOI: 10.1016/j.chom.2020.02.001.
- 国家卫生健康委员会.《冷链食品生产经营新冠病毒防控技术指南》和《冷链食品生产经营过程新冠病毒防控消毒技术指南》问答[J]. 饮料工业, 2020, 23 (5): 1-4. DOI: 10.3969/j.issn.1007-7871.2020.05.001.
- 王晟,李霄,杨怡. 新型冠状病毒肺炎疫情期间检验科整体应对措施探讨[J]. 实用检验医师杂志, 2020, 12 (2): 120-122. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2020.02.017.
- 詹菁,刘倩,张雨竹,等. 新型冠状病毒 2019-nCoV 的一些初步认识[J]. 环境化学, 2020, 39 (2): 283-291. DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2020021501.
- 杨振洲. 新型冠状病毒气溶胶医院内潜在感染风险及预防措施[J]. 中国医药, 2020, 15 (6): 812-815. DOI: 10.3760/j.issn.1673-4777.2020.06.003.
- 崔晓娟,牟嘉斌,滕峥,等. 新型冠状病毒温度稳定性研究[J]. 上海预防医学, 2021, 33 (9): 818-823. DOI: 10.19428/j.cnki.sjpm.2021.20498.
- LYU Q, LIU M Y, QI F F, et al. Sensitivity of SARS-CoV-2 to different temperatures [J]. Animal Model Exp Med, 2020, 3 (4): 316-318. DOI: 10.1002/ame2.12141.
- 任胜勇,王兴伟,赵霞飞,等. 德尔塔新冠病毒变异株的特点及防控对策[J]. 中华危重病急救医学, 2021, 33 (9): 1141-1144. DOI: 10.3760/ema.j.cn121430-20210809-01156.
- ZHANG M, XIAO J P, DENG A P, et al. Transmission dynamics of an outbreak of the COVID-19 Delta variant B.1.617.2-Guangdong Province, China, May-June 2021 [J]. China CDC Wkly, 2021, 3 (27): 584-586. DOI: 10.46234/ccdew2021.148.
- ZHOU B, THAO T, HOFFMANN D, et al. SARS-CoV-2 spike D614G change enhances replication and transmission [J]. Nature, 2021, 592 (7852): 122-127. DOI: 10.1038/s41586-021-03361-1.
- HACISULEYMAN E, HALE C, SAITO Y, et al. Vaccine breakthrough infections with SARS-CoV-2 variants [J]. N Engl J Med, 2021, 384 (23): 2212-2218. DOI: 10.1056/NEJMoa2105000.
- SHEIKH A, MCMENAMIN J, TAYLOR B, et al. SARS-CoV-2 Delta VOC in Scotland: demographics, risk of hospital admission, and vaccine effectiveness [J]. Lancet, 2021, 397 (10293): 2461-2462. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)01358-1.

(收稿日期: 2021-09-30)

(本文编辑: 郗文)