

# 中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 499—2017

---

## 下呼吸道感染细菌培养操作指南

Performance guideline for bacterial culture of lower respiratory tract infections

2017-01-15 发布

2017-07-01 实施

---

## 目 次

前言 .....	III
引言 .....	IV
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 分析前 .....	2
4.1 标本采集 .....	2
4.2 标本运送 .....	2
4.3 筛选并拒收的标本 .....	3
5 分析中 .....	3
5.1 痰及气管吸出物标本处理 .....	3
5.2 气管镜标本处理 .....	4
5.3 连续培养并观察慢生长菌 .....	5
5.4 分离并鉴定下呼吸道重要致病菌(见附录 C) .....	5
5.5 质量控制 .....	7
6 分析后报告结果 .....	9
6.1 革兰染色报告 .....	9
6.2 报告有临床意义的微生物 .....	10
6.3 对非致病菌的报告 .....	11
6.4 平板上无细菌生长 .....	12
6.5 与结果有关的说明 .....	12
附录 A (规范性附录) 下呼吸道感染的主要类型及主要病原体 .....	13
附录 B (规范性附录) 纤维支气管镜采集的标本适合诊断的病原体和检验项目 .....	14
附录 C (规范性附录) 常见可疑菌落形态及常规快速鉴定方法 .....	15
参考文献 .....	17

# 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：国家卫生和计划生育委员会临床检验中心、陕西省人民医院、安徽省立医院、北京医院、北京大学人民医院、中国医学科学院北京协和医院、首都医科大学附属北京友谊医院、解放军总医院、浙江省温州医科大学附属第二医院。

本标准主要起草人：胡继红、任健康、马筱玲、胡云建、王辉、徐英春、苏建荣、罗燕萍、李向阳。

# 引 言

## 0.1 口咽部定植菌群的变化

人类口咽部位定植着大量需氧菌、兼性厌氧菌和厌氧菌等微生物,口腔菌群总数可达  $10^{10}$  CFU/mL $\sim 10^{12}$  CFU/mL。健康人咽部定植细菌最少,咽部需氧的正常菌群主要由革兰阳性菌组成。人体基础条件的变化会改变咽部定植菌群的种类和数量。长期接触某些携带侵袭性定植菌人群,如日托儿童的父母的肺炎链球菌、流感嗜血杆菌定植数量会增加;在免疫抑制、慢性肺病、广谱抗菌药物治疗或住院患者等人群中,革兰阴性杆菌的优势明显增加。

## 0.2 肺部感染的常见机制

肺部感染的最常见机制是肺泡内吸入了口咽部定植菌。健康宿主吸入定植菌后通常无临床症状,细菌可被黏液、柱状纤毛清除;吸入性肺炎患者咽部菌群种类趋向于侵袭性细菌或耐药细菌,如肺炎链球菌或革兰阴性杆菌等。吸入定植菌能否引起肺部感染取决于吸入菌的致病性及数量、患者免疫系统和呼吸道防御功能等因素。

其次,吸入含微生物的气溶胶亦可引发下呼吸道感染,如使用不清洁呼吸机导致的交叉感染。

血液播散是下呼吸道感染第三位的原因,感染通常造成双肺下叶肺炎。

## 0.3 痰涂片对下呼吸道感染病原菌诊断的作用

除引起社区非典型肺炎的病原不能常规培养外,其他常见肺部感染的病原菌均可用常规培养方法分离,但培养方法的敏感性低,且无法判断分离菌的来源。

痰涂片可提高下呼吸道感染病原学诊断的特异性和敏感性。涂片革兰染色可评估痰标本的质量,具有减少口咽部污染菌的影响、提高病原菌诊断特异性的作用。痰涂片还可发现培养不能生长的细菌。

## 0.4 纤维支气管镜标本定量培养的临床意义

经纤维支气管镜获取的支气管肺泡灌洗液和保护毛刷标本适合做细菌定量培养,当可能致病菌的菌落数大于阈值时,其诊断下呼吸道感染的特异性可达 82% $\sim 91\%$ ,诊断价值远高于痰标本。

## 0.5 下呼吸道感染细菌培养的局限性

微生物实验室选择的培养方法不支持病原菌生长、抗菌药物影响、标本送检时间延长、口腔正常菌群污染等可导致假阴性结果出现;而污染菌对标本检测结果的影响以及过度解读细菌学结果等可导致假阳性报告。

# 下呼吸道感染细菌培养操作指南

## 1 范围

本标准规定了下呼吸道感染常规细菌培养的操作指南。

本标准适用于医疗机构微生物实验室。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

WS/T 503 临床微生物实验室血培养操作规范

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

#### 库什曼螺旋纤维 Curschmann's spiral fibers

库什曼螺旋纤维呈螺旋状,系慢性炎症时小支气管分泌的黏液,因呼吸困难、肺内二氧化碳张力增高而凝固,同时由于受到喘息气流的间歇吹动旋转滚动而成。经革兰染色后,在显微镜下可见其呈毛虫状蜷曲,中轴蓝染,边缘呈淡红色。

### 3.2

#### 夏科雷登结晶 Charcot-Leyden Crystal

可见于支气管,为菱形或针状六边形无色透明结晶,其两端尖长,大小不等,折光性强,由嗜酸性粒细胞破裂后嗜酸性颗粒相互融合而成,可用碘染色。可在稍放置的痰中找到嗜酸性粒细胞堆。在对烟曲菌有变态反应的哮喘患者或肺部感染寄生虫患者的痰液中常见。

### 3.3

#### 纤毛柱状上皮细胞 ciliated columnar epithelium cell

主要分布在下呼吸道内表面,在柱状细胞的游离面附有能摆动的纤毛,是能分泌黏液的杯状细胞,分泌的黏液能粘着并清除灰尘和细菌等异物,借助纤毛有节律性的摆动,将含有灰尘、细菌的黏液排除至喉部。

### 3.4

#### 肺巨噬细胞 pulmonary macrophages

由单核细胞分化而来,广泛分布在肺间质内,在呼吸性细支气管以下的管道周围和肺泡隔内较多,游走入肺泡腔内的肺巨噬细胞,称肺泡巨噬细胞。肺巨噬细胞的吞噬、免疫和分泌作用都十分活跃,有重要防御功能。吸入空气中的尘粒、细菌等异物进入肺泡和肺间质,多被巨噬细胞吞噬清除,有的从肺泡腔经呼吸道黏液流动和纤毛运动而被咳出。

## 4 分析前

### 4.1 标本采集

#### 4.1.1 咳痰

适用于肺部感染患者,特别是重病监护室(ICU)及住院的社区获得性肺炎(CAP)、慢性阻塞性肺疾病急性加重(AECOPD)、肺脓肿(咳痰非最适标本)、可疑细菌性病原体引起的肺部感染患者(见附录A)。咳痰前,患者用无菌生理盐水漱口;指导患者咳出深部痰,勿留取唾液和鼻咽腔分泌物。

#### 4.1.2 气管吸出物

仅当气管插管的患者出现肺炎症状时(如发热或浸润),可采集气管吸出物标本。从气管中吸痰,用无菌容器留取送检。

注:气管在插管 24 h 后即有定植菌,若未有肺部感染指征时送检气管吸出物,可导致结果与疾病不符。

#### 4.1.3 血培养

当肺部感染患者伴有发热( $\geq 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ )或低体温( $\leq 36\text{ }^{\circ}\text{C}$ )、白细胞增多或粒细胞减少等血培养送检指征时,送检血培养(具体参考 WS/T 503 中标本采集和送检要求)。

#### 4.1.4 气管镜标本(见附录 B)

##### 4.1.4.1 采集气管镜标本注意事项

采集气管镜标本注意事项如下:

- 气管镜可采集到感染部位高质量的标本,包括支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage, BAL)、支气管灌洗液标本(bronchial washings, BW)、保护毛刷标本(Protected specimen brush, PSB)及支气管穿刺活检标本,均应由呼吸科医师或经培训医师采集;
- 为防止污染,应采用吸入麻醉剂,勿从工作腔中吸取灌洗液标本;
- 标本采集顺序为:BW、BAL、PSB 和活检标本,应避免带血。

##### 4.1.4.2 BAL

利用纤维支气管镜向小支气管和肺泡中注入无菌生理盐水灌洗,在 40 mL~80 mL 回收的灌洗液中包含约 1 mL 支气管末梢和肺泡中的分泌物;弃去前段可能污染的部分,收集其余部分后立即送检。

##### 4.1.4.3 PSB

将纤维支气管镜插入亚段支气管可疑感染部位,经支气管镜刷检孔推出双层套管中的毛刷(远端填充聚乙二醇),刷取脓性分泌物,采样后将毛刷回收入双层套管并退出纤维支气管镜,用无菌剪刀剪断毛刷,置于含 1 mL 生理盐水的无菌容器中(仅供需氧培养),快速送检。

## 4.2 标本运送

用无菌防漏容器收集标本,贴好标本信息(条码)后,应在 2 h 内(室温)送至微生物实验室。若延迟送检,将导致非苛养的口咽部定植菌过度生长,有临床意义的病原菌数量相对减少。为防止口咽部正常菌群的过度生长,可将标本放置  $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$  环境(2 h~24 h),但培养分离到肺炎链球菌等苛养菌的机会和数量会减少。故若标本延迟送检,应在报告中予以说明并指出可能对培养结果造成的影响。

### 4.3 筛选并拒收的标本

通过筛选拒收的标本如下：

- a) 24 h 内重复采集的痰细菌培养标本；
- b) 唾液；
- c) 鼻冲洗液和分泌物、鼻孔拭子；
- d) 咽部标本；
- e) 未经保护套管收集的支气管刷培养标本；
- f) 痰的厌氧菌培养标本；
- g) 诱导痰。

注 1：除支气管穿刺吸出物、PSB 采集的分泌物经双层套管保护行床边接种（做厌氧培养）、活检标本、胸水或其他未经污染的标本以外，其他的标本均不适合做厌氧菌培养。

注 2：诱导痰标本只适用于检测卡氏肺孢子和结核分枝杆菌，对其他病原菌检出效果差。

## 5 分析中

### 5.1 痰及气管吸出物标本处理

#### 5.1.1 标本处理基本要求

标本处理基本要求如下：

- a) 接种标本及涂片操作应在 II 级生物安全柜中进行；
- b) 应尽快处理所有标本，特别是来自门急诊、新入院患者、ICU 患者和有创方法采集的标本（如：BAL 和肺活检标本），以保证致病菌的活性，避免造成重复采集标本；
- c) 使用全自动接种前处理系统的实验室按厂家说明书处理标本。

#### 5.1.2 接种标本

用无菌拭子挑取适量（足够接种平板和涂片）脓性或无血部位痰或气管吸出物，分别接种血平板、巧克力平板、麦康凯或中国蓝平板（或其他目标病原的培养基，如真菌等），分区划线后立即培养。

#### 5.1.3 培养

将接种的血平板、巧克力平板放二氧化碳培养箱（CO<sub>2</sub>：5%~10%），麦康凯或中国蓝平板放置普通培养箱，35℃~37℃条件下培养 24 h~48 h，血平板、巧克力平板培养至 72 h。

#### 5.1.4 标本涂片及革兰染色

接种平板后，用刚接种平板的拭子涂抹玻片，涂片应薄且均匀（透过涂片部位可看清楚下面印刷品的字迹）。自然干燥或恒温干燥器上干燥后，经甲醇固定（化学纯，在棕色玻璃瓶或塑料容器中贮存）或火焰快速固定 3 次，革兰染色，晾干后读片。

革兰染色脱色时间因选用不同的脱色剂而异，具体：

- a) 95%乙醇脱色时间为 30 s；
- b) 丙酮-乙醇（体积比为 3：7，棕色瓶室温保存，有效期 1 年）脱色时间 1 s~5 s（脱色均匀）；
- c) 丙酮（试剂纯）脱色时间更短，至脱色中的试剂无色（标本中含大量宿主细胞时脱色效果好）。

注：使用革兰染色仪染色的实验室按照厂家操作说明书进行，注意条件优化，使涂片染色结果达到满意效果。

### 5.1.5 显微镜观察革兰染色结果

痰涂片在低倍物镜下检测 20 个~40 个视野,气管吸出物涂片分别在低倍镜视野(LPF)和油镜视野(OIF)下观察。计算有细胞视野的细胞平均数量,分别记录鳞状上皮细胞(SECs)、多形核白细胞(WBCs)和细菌的数量,见表 1。

表 1 显微镜观察革兰染色半定量结果

项目	1+(偶见)	2+(少量)	3+(中量)	4+(大量)
细胞计数(低倍镜)	少于 1 个/LPF	1 个~9 个/LPF	10 个~25 个/LPF	大于 25 个/LPF
细菌计数(油镜)	少于 1 个/OIF	1 个~5 个/OIF	6 个~30 个/OIF	大于 30 个/OIF

## 5.2 气管镜标本处理

### 5.2.1 BAL 定量培养

#### 5.2.1.1 混匀标本

涡旋震荡 BAL 标本 30 s~60 s。

#### 5.2.1.2 常规平板计数

平板 1:用经校准的加样器(或经校准的 10  $\mu$ L 接种环)取 10  $\mu$ L BAL 标本,分别点种在恢复至室温的血平板和巧克力平板,再用灭菌 L 型玻棒涂布平板。培养后菌落数等于相同形态菌落数乘以稀释倍数( $10^2$ )。培养物的菌落数小于 100 个,即低于阈值( $10^4$  CFU/mL)。

平板 2:用 1 $\mu$ L 定量接种环(经校准)取 1 环 BAL 标本,分别接种在血平板和巧克力平板,用无菌 L 型玻棒涂布平板。培养后菌落数等于相同形态菌落数乘以稀释倍数( $10^3$ )。培养物的菌落数大于 10 个,即达到阈值( $10^4$  CFU/mL)。

注:若用接种环密涂平板,生长的菌落数量会低于实际数量。推荐用 L 型玻棒涂布平板计数,定量培养结果更准确。

#### 5.2.1.3 稀释平板计数

步骤 1:取 1 只标记“1:100”含 5 mL 磷酸缓冲液(PBS)试管,加入 50  $\mu$ L BAL 原液标本,涡旋震荡;再从中取 100  $\mu$ L 分别接种血平板和巧克力平板,用灭菌 L 型玻棒涂布平板。培养后菌落数等于相同形态菌落数乘以稀释倍数( $10^3$ )。培养物的菌落总数大于 10 个,即达到阈值( $10^4$  CFU/mL)。

步骤 2:取 1 只标记“1:10<sup>4</sup>”含 5 mL PBS 试管,加入 50  $\mu$ L 经步骤 1 中 1:100 稀释的标本,涡旋震荡;从中取 100  $\mu$ L 分别接种血平板和巧克力平板,用灭菌 L 型玻棒涂布平板。培养后菌落数等于相同形态菌落数乘以稀释倍数( $10^5$ )。

注:磷酸缓冲液配制:0.067 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_3$  70 mL 与 0.067 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_3$  30 mL 混合(pH 7.2),高压灭菌后使用。

### 5.2.2 PSB 定量培养

#### 5.2.2.1 混匀标本

将 1 mL 带毛刷的标本管涡旋震荡 30 s~60 s。



### 5.2.2.2 常规平板计数

平皿 1:用加样器取 10  $\mu\text{L}$  标本(或用 10  $\mu\text{L}$  接种环)分别接种血平板和巧克力平板,用无菌 L 型玻棒涂布平板,培养后菌落数等于相同形态菌落数乘以稀释倍数( $10^2$ )。培养物的菌落数大于 10 个,即达到阈值( $10^3$  CFU/mL)。

平皿 2:用 1  $\mu\text{L}$  定量接种环(经校准)取 1  $\mu\text{L}$  标本分别接种血平板和巧克力平板,用无菌 L 棒涂布平板,培养后菌落数等于相同形态菌落数乘以稀释倍数( $10^3$  CFU/mL)。

### 5.2.2.3 稀释平板计数

取 1 只标记“1 : 100”含 5 mL 磷酸缓冲液试管,加入 50  $\mu\text{L}$  PSB 原液标本,涡旋震荡,从中取 100  $\mu\text{L}$  分别接种血平板和巧克力平板,用无菌 L 型玻棒涂布平板。培养后菌落数等于相同形态菌落数乘以稀释倍数( $10^3$ )。

### 5.2.3 接种其他培养基并培养

完成血平板和巧克力平板稀释涂碟后,可取 100  $\mu\text{L}$  BAL 标本或 PSB 标本接种麦康凯或中国蓝培养基做分区划线。培养步骤同 5.1.3;有创方式采集的肺组织标本经加适量肉汤或无菌生理盐水研磨,将研磨液接种血平板和巧克力平板,延长培养至 4 d。

### 5.2.4 革兰染色标本处理

在完成标本定量培养后,取适量 BAL 标本进行细胞离心;保护毛刷标本可直接涂片。经自然干燥、甲醇固定或火焰快速固定 3 次,革兰染色。

### 5.2.5 剩余 BAL 标本可用于其他病原检测

对剩余 BAL 标本离心后,可根据需要进行分枝杆菌、军团菌、真菌及卡氏肺孢子菌和病毒等相关病原的培养、涂片、分子、免疫等检查。

## 5.3 连续培养并观察慢生长菌

观察培养 18 h~24 h 后的平板,为检出可能生长的丝状真菌、慢生长菌、苛养的革兰阴性杆菌如博德特菌属(*Bordetella* spp.),平板在检查后连续培养并观察至 72 h,可能发现慢生长菌。

## 5.4 分离并鉴定下呼吸道重要致病菌(见附录 C)

### 5.4.1 链球菌属

#### 5.4.1.1 $\beta$ -溶血链球菌

$\beta$ -溶血性链球菌是呼吸道重要的致病菌,应重点观察血平板上有  $\beta$ -溶血的菌落,血平板所添加的 5% 绵羊血的质量非常关键,否则难以观察到菌落的透明溶血现象。具体步骤如下:

- 检查  $\beta$ -溶血菌落并鉴定触酶阴性且呈链状或成对排列的球菌;
- 鉴定是否化脓链球菌:密涂后粘贴杆菌肽纸片(0.04 U/片),35  $^{\circ}\text{C}$  过夜培养,若有抑菌环,则报告化脓链球菌,任何数量均应报告。化脓链球菌吡咯烷酮芳胺酶(PYR)试验为阳性;
- 患儿标本检查是否有窄溶血环,并鉴别 B 群链球菌(无乳链球菌),若 CAMP 试验(金黄色葡萄球菌)阳性,则任何数量均应报告;
- 鉴定其他有临床意义数量的优势生长  $\beta$ -溶血链球菌。

小菌落的  $\beta$ -溶血性链球菌或 F 群链球菌均为上呼吸道正常菌群。

### 5.4.1.2 肺炎链球菌

鉴别草绿色链球菌和肺炎链球菌,检查形态与肺炎链球菌相似的 $\alpha$ -溶血菌落,做以下试验:

- 胆汁溶菌试验:在菌落上滴10%去氧胆酸钠溶液1滴,置35℃15 min~30 min后,若菌落溶解,报告“肺炎链球菌”;若菌落不溶解,则用奥普托辛(optochin,OP)敏感试验再确认;
- OP敏感试验:将菌落密涂于血平板,粘贴OP纸片(5 $\mu$ g/片),经35℃、5%(二氧化碳CO<sub>2</sub>)环境过夜培养,若出现抑菌圈(直径大于14 mm判为敏感),报告“肺炎链球菌”;
- 药敏试验:快速挑起相似菌落,做药敏试验;同时粘贴OP纸片确认纯度,以检查药敏结果是否混有其他草绿色链球菌(污染菌)。

注:存在对胆汁耐受或对奥普托辛耐药的肺炎链球菌株,将这两个试验联合检测可减少错误报告。

### 5.4.2 苛养革兰阴性杆菌

#### 5.4.2.1 流感嗜血杆菌

流感嗜血杆菌是生长在巧克力平板上的球杆菌,在血平板上不生长,但在葡萄球菌周围可呈卫星状生长。流感嗜血杆菌鉴定——卫星试验法:血平板卫星阳性(菌落不溶血)且MH平板卫星试验阴性;或X、V因子生长法:在涂布待检菌的MH平板上贴X因子、V因子和(X+V)因子纸片,X、V纸片周围不生长,但(X+V)纸片周围生长;以上两种方法均可判断是流感嗜血杆菌,也可做ALA(aminolevulinic acid)试验确认,并做 $\beta$ -内酰胺酶试验。

#### 5.4.2.2 博德特菌属

有重要临床意义的博德特菌在血平板上生长,触酶和脲酶均为阳性,培养48 h出现肉眼可见菌落。

#### 5.4.2.3 其他苛养革兰阴性杆菌

除非呈优势生长或数量很多,通常无需鉴定其他苛养的革兰阴性杆菌,如艾肯菌属,因这些均为上呼吸道正常菌群,很少引起呼吸系统疾病。

### 5.4.3 革兰阴性双球菌

有临床意义的革兰阴性双球菌,主要是卡他莫拉菌和脑膜炎奈瑟菌,依照以下快速试验筛查:

- 检测有意义数量的、用接种环可推移的菌落,且DNA酶阳性,确认是卡他莫拉菌(90%以上卡他莫拉菌株的 $\beta$ -内酰胺酶试验为阳性,可帮助判断)。
- 检查巧克力平板上任何氧化酶阳性的菌落,并在血平板上不生长或生长不良,葡萄糖(+)、麦芽糖(+)、乳糖(-),确认鉴定脑膜炎奈瑟菌,无需常规做药敏试验。

### 5.4.4 革兰阴性杆菌

在麦康凯或中国蓝平板上生长良好的革兰阴性杆菌,依照以下快速试验筛查:

- 若只生长了一种细菌并达到了有临床意义的数量,而无其他致病菌,通过初步试验筛查,此菌若为肠杆菌科细菌特别是肺炎克雷伯菌,需做鉴定和药敏试验;
- 对于住院患者,不管是否有其他病原菌,检查有意义数量的铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、洋葱伯克霍德菌和嗜麦芽窄食单胞菌,因这些菌多是典型的多重耐药菌,可造成医院内流行;
- 若生长一种以上其他等量的革兰阴性杆菌,做初步试验,并报告(如:吲哚、氧化酶、在麦康凯平板上的气味和形态、菌落色素和克氏双糖试验的结果)。

#### 5.4.5 葡萄球菌属

对培养生长的葡萄球菌属的处理方法如下：

- a) 若革兰染色显示占优势的成堆球菌与白细胞相关,而无其他有意义数量的致病菌,只对有临床意义数量的金黄色葡萄球菌进行鉴定；
- b) 若是住院患者,依照感染控制原则,即使少量菌也应用头孢西丁检测苯唑西林是否耐药；
- c) 仅当凝固酶阴性葡萄球菌在平板上几乎为纯培养时,才需鉴定到种水平和/或做药敏试验,其他葡萄球菌均为呼吸道正常菌群。

#### 5.4.6 肠球菌属

对培养生长的肠球菌属的处理方法如下：

- a) 一般情况下,少量生长的肠球菌无需报告,当生长几乎为纯培养时,用初步生化试验鉴定确认；
- b) 很多革兰阳性球菌是呼吸道正常菌群,PYR 阳性甚至胆汁七叶苷和亮氨酸胺酶(LAP)阳性。

#### 5.4.7 革兰阳性杆菌

只对以下培养生长的革兰阳性杆菌处理,因其他革兰阳性杆菌通常不引起肺炎,具体如下：

- a) 筛查并排除任何数量的来自免疫抑制患者的奴卡菌属和马红球菌(黏液样菌落、脲酶阳性)；
- b) 如有大的革兰阳性芽孢杆菌,需排除炭疽芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌；
- c) 有限地鉴定棒状杆菌。当下述两种情况存在且细菌呈大量优势生长时,使用鉴定革兰阳性杆菌的商品试剂盒进行鉴定,包括：
  - 1) 当菌株快速脲酶试验阳性时(假白喉棒杆菌、假结核棒杆菌脲酶阳性)；
  - 2) 标本来自 ICU 病房的插管患者。

#### 5.4.8 真菌

对生长的丝状真菌或酵母样真菌的处理方法如下：

- a) 对丝状真菌做鉴定(除外实验室或环境污染的霉菌,如青霉菌)；
- b) 从培养超过 48 h 的平皿上分离双相真菌(如荚膜胞浆菌和球孢子菌)或酵母样真菌的菌落；
- c) 检查陈旧培养物以排除新生隐球菌,无需对其他酵母样真菌做进一步鉴定；
- d) 念珠菌属于口腔正常定植菌群,一般情况下,对于免疫力正常人群,即使从下呼吸道标本中分离到念珠菌,除非有组织病理学证据,否则无需进一步鉴定；但对于肿瘤患者(如:白血病)、肺移植患者或新生儿,要进一步鉴定来自下呼吸道标本中的酵母样真菌及念珠菌。

#### 5.4.9 涂片可见但培养不生长的细菌

如涂片时可见细菌,但培养后未见此形态的细菌生长,可能因使用了抗菌药物的缘故；但不能排除可能存在军团菌、百日咳博德特菌和分枝杆菌等。实验室应及时与临床联系,扩大病原检查范围。

### 5.5 质量控制

#### 5.5.1 革兰染色

革兰染色室内质控的频次及结果如下：

- a) 应对新购置或新批号的商品化革兰染色试剂做室内质控,常规质控频率为每周 1 次；
- b) 革兰染色阳性质控菌株:金黄色葡萄球菌 ATCC25923,深紫色球菌为合格；
- c) 革兰染色阴性质控菌株:大肠埃希菌 ATCC25922,红色杆菌为合格。

## 5.5.2 抗酸染色

抗酸染色室内质控的频次及结果如下：

- 应对新购置或新批号商品化抗酸染色试剂做室内质控，常规质控频率为每周 1 次；
- 抗酸染色阳性质控菌株：结核分枝杆菌 ATCC25177(弱毒株)，或用快生长分枝杆菌作为阳性质控菌株，红色分枝状杆菌为合格；
- 抗酸染色阴性质控菌株：大肠埃希菌 ATCC25922，蓝色杆菌为合格。

## 5.5.3 培养基

### 5.5.3.1 血平板

购买或自制的 5% 羊血平板每批次做室内质控的菌株和结果为：

- 化脓链球菌 ATCC19615,  $\beta$ -溶血，生长良好为合格；
- 肺炎链球菌 ATCC49619,  $\alpha$ -溶血(草绿色溶血)，菌落中间凹陷的典型菌落特征为合格。

### 5.5.3.2 巧克力平板

购买或自制的巧克力平板，每批次做室内质控的菌株和结果为：

流感嗜血杆菌 ATCC49247，生长饱满、典型的湿润、半透明菌落为合格。

## 5.5.4 试剂

### 5.5.4.1 每批号、每周需做质控的试剂

每批号、每周需做质控的试剂包括：

- 奥普托欣(OP)纸片(5 mg/片)：质控菌株为肺炎链球菌 ATCC49619，抑菌圈  $>14$  mm 为合格。
- 杆菌肽纸片(0.04 U/片)：质控菌株为化脓链球菌 ATCC19615，形成抑菌圈为合格。
- PYR 试验：质控菌株为化脓链球菌 ATCC19615，桃红色为合格。

### 5.5.4.2 每批号、每次试验需做质控的试剂

每批号、每次试验需做质控的试剂包括：

- 3% 过氧化氢(触酶试验)：阳性对照菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC25923，产剧烈气泡；阴性对照菌株为粪肠球菌 ATCC29212，不产气泡或缓慢产生少量气泡。
- 兔血浆或乳胶凝集试剂(凝集因子试验、玻片法凝固酶试验)：阳性对照菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC25923，呈不规则块状凝集，阴性对照菌株为表皮葡萄球菌 ATCC12228，不凝集。
- 兔血浆或乳胶凝集试剂(凝固酶试验、试管法凝固酶试验)：质控菌株同 b)，经 4 h 孵育，阳性对照菌呈凝胶胨状；阴性对照菌呈液态。(常规做凝固酶试验时应使用 EDTA 抗凝兔血浆，当玻片法试验为阴性结果时，应再做试管法确认，因有 10%~15% 的金黄色葡萄球菌株的玻片法凝固酶试验呈阴性。)
- 1% 盐酸四甲基对苯二胺(氧化酶试验)：阳性对照菌株为铜绿假单胞菌 ATCC27853，10 s 内产蓝紫色；阴性对照菌株为大肠埃希菌 ATCC25922，不变色。
- 头孢硝噻吩(nitrocefina)( $\beta$ -内酰胺酶)试验：阳性对照菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC29213，产粉红色；阴性对照菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC25923，不变色。

## 6 分析后报告结果

### 6.1 革兰染色报告

#### 6.1.1 痰标本报告原则

痰、支气管吸出物标本涂片革兰染色结果解释见表 2。

表 2 痰、气管吸出物标本涂片革兰染色结果解释

指 征	解 释	
痰:大于 10 个 SECs/LPF	标本包含唾液和上呼吸道分泌物,报告“大于 10 个鳞状上皮细胞/低倍视野,提示标本被唾液污染,不继续培养”	
支气管吸出物 成人患者:大于 10 个 SECs/LPF 或未见细菌 患儿:未见细菌	不继续培养,报告“标本污染或未见细菌,需重送标本”; 未见细菌,但 WBCs 数量达到 4+,并可见纤维细胞时,建议重新涂片做吡啶橙染色,用荧光显微镜观察确认弹性纤维上是否有细菌;假单胞菌属和嗜血杆菌属细菌因与弹性纤维不易区分,涂片时可能漏检;还可见军团菌,此类感染中多形核白细胞不常见	
少于 10 个 SECs/LPF,大量多形核白细胞(大于 25 个 WBCs/LPF),存在肺泡巨噬细胞和柱状上皮细胞	提示合格的深部痰标本,可培养	
大于 25 个 WBCs/LPF,小于 25 个 SECs/LPF; 或 WBCs:SECs 大于 10:1,单一形态的细菌量达到 3+~4+	可接受标本并培养	
大量多形核白细胞	提示感染;对于免疫抑制患者或粒细胞缺乏患者即使未见白细胞,但无鳞状上皮细胞,仍提示可疑感染,可培养	
胞内细菌	提示感染	
弹性蛋白或胶原纤维、库什曼螺旋纤维、坏死的白细胞	提示感染	
淀粉样小体(corpora amylacea)	见于长期迁延的呼吸道疾病,如慢性阻塞性肺病(COPD)	
粉色絮状物	提示呼吸道疾病治疗产生的雾化高渗盐水	
夏科雷登结晶	提示可能有过敏性肺曲霉菌病或寄生虫	
大量多形核 白细胞,白 细胞内或外 主要见:	革兰阳性球菌成对或成短链排列	可疑肺炎链球菌性肺炎
	革兰阳性球菌成堆排列	可疑金黄色葡萄球菌性肺炎
	革兰阴性双球菌	可疑卡他莫拉菌局限性肺炎
	革兰阴性小球杆菌	可疑流感嗜血杆菌性肺炎
	革兰阴性椭圆杆菌	可疑克雷伯菌或其他肠杆菌科细菌引起的肺炎
大量多形核白细胞,大量革兰阴性小杆菌、球杆菌,革兰阳性链球菌及其他不同形态的细菌	需在报告中特别提示:吸入性肺炎,因培养结果会显示只生长正常菌群	
出芽的酵母样孢子和假菌丝	通常提示鹅口疮或上呼吸道酵母菌感染,并非肺炎,仅当其为其所见主要菌时报告	
其他异常结构,如真菌、分枝的革兰阳性丝状杆菌或异形状细菌(可能是抗菌药物治疗的结果)	请高年资技师确认,可能需补充实验,如:抗酸染色等	

痰、支气管吸出物标本涂片革兰染色结果解释应注意以下情况：

- a) 白细胞和优势菌(不粘附在鳞状上皮细胞上)有助于预测肺部致病菌,应该报告；
- b) 每个油镜视野可见大于 10 个或小于 10 个单一形态细菌并与白细胞相关(在白细胞周围,特别是位于白细胞内的细菌),有助于预测肺部致病菌,应该报告；涂片中少于 1 个菌/20 个油镜视野的少量细菌不必报告；
- c) 虽然由两种致病菌同时引起的感染不常见,但当两种形态的细菌均与白细胞相关时也应报告；
- d) 即使涂片未见细菌时仍有助于评价患者状况,可能隐藏着某些特殊菌,如军团菌、内源性真菌、结核分枝杆菌或其他可引起非典型肺炎的致病菌；
- e) 质量合格的标本中,涂片有正常菌群及多种细菌(通常白细胞内有空泡或液泡),提示有吸入性肺炎,应该报告。

### 6.1.2 BAL 细胞离心涂片报告

若是细胞离心机制作的 BAL 标本的革兰染色涂片,检测敏感度为  $10^5$  个细胞/mL 或  $10^4$  个细胞/mL,若每个油镜视野可见 1 个或多个细菌,报告革兰染色形态及白细胞结果,提示此细菌与活动性肺炎相关。

### 6.1.3 PSB 涂片报告

报告 PSB 涂片的革兰染色形态及白细胞结果,提示此细菌与活动性肺炎相关。

## 6.2 报告有临床意义的微生物

### 6.2.1 应报告的病原菌

经分离鉴定,应报告的病原菌如下：

- a) 化脓链球菌；
- b) B 群  $\beta$ -溶血性链球菌(儿童)；
- c) 博德特菌属,特别是支气管博德特菌；
- d) 奴卡菌属；
- e) 新生隐球菌；
- f) 弗朗西斯土拉菌(高致病菌)；
- g) 鼠疫耶尔森菌(高致病菌)；
- h) 炭疽芽孢杆菌(高致病菌)；
- i) 丝状真菌(排除腐生菌污染)。

### 6.2.2 培养和涂片相符合时报告的病原菌

处理培养物应参考涂片的结果,应根据革兰染色所见炎症细胞和细菌的形态与培养物进行对照,当培养与涂片结果不相符时应重新读片。

当培养生长的细菌在涂片中亦和炎症细胞相关时,报告以下两种病原菌：

- a) 肺炎链球菌,并报告药敏结果；
- b) 流感嗜血杆菌,常规报告  $\beta$ -内酰胺酶。

### 6.2.3 判断有临床意义数量的分离菌

以下情况可判断分离菌的数量具有临床意义：

- a) 定性培养生长的病原菌数量达到以下情况时,判断为有临床意义：

- 1) 在平板第 2 区划线仍大量生长,或培养物生长量超过 1/4 平板;
  - 2) 培养中少量生长且革兰染色涂片可见此形态细菌与炎症细胞相关联的病原菌;
  - 3) 在平板划线第 1 区生长且纯度超过 90%以上时,同时革兰染色涂片可见此形态细菌与炎症细胞相关的病原菌。
- b) 定量培养有临床意义的数量:
- 1) BAL:菌落计数 $\geq 10^4$  CFU/mL;
  - 2) PSB:菌落计数 $\geq 10^3$  CFU/mL。

注:分别计数生长有细菌的最高稀释度平板上的不同形态菌落数量,乘上稀释倍数即为此细菌的菌落数。

#### 6.2.4 报告有临床意义数量的非优势菌

当培养的某种细菌达到 6.2.3 所示有临床意义的数量时,即使不是优势菌也应报告的病原菌包括:

- a) 卡他莫拉菌、脑膜炎奈瑟菌,常规应报告  $\beta$ -内酰胺酶试验结果;
- b) 只对住院患者报告的条件致病菌有:
  - 1) 铜绿假单胞菌,并报告药敏结果;
  - 2) 嗜麦芽窄食单胞菌,并报告药敏结果;
  - 3) 不动杆菌属,特别是鲍曼不动杆菌,并报告药敏结果;
  - 4) 洋葱伯克霍德菌,并报告药敏结果。

#### 6.2.5 报告有临床意义数量的优势菌

生长菌达到有临床意义的数量并呈优势菌时,特别当涂片提示分离菌与多形核白细胞相关时报告的病原菌包括:

- a) 金黄色葡萄球菌,并报告药敏结果;
- b) B 群  $\beta$ -溶血性链球菌(成人)、C 群或 G 群  $\beta$ -溶血性链球菌;
- c) 单一形态革兰阴性杆菌(特别是肺炎克雷伯菌),并报告药敏结果;
- d) 苛养的革兰阴性杆菌,通常报告  $\beta$ -内酰胺酶试验结果;
- e) 脲酶阳性的棒状杆菌或分离来自 ICU 的患者的棒状杆菌;
- f) 分离自免疫抑制患者的马红球菌。

### 6.3 对非致病菌的报告

#### 6.3.1 报告“肠杆菌科细菌”

在麦康凯平板上生长 2 种或多种革兰阴性杆菌,经氧化酶阴性、乳糖产酸等试验初步鉴定为肠杆菌科细菌,报告:经鉴定有“肠杆菌科细菌”生长。

#### 6.3.2 报告“非发酵细菌”

在麦康凯平板上生长 2 种或多种革兰阴性杆菌,经氧化酶阳性、克氏双糖铁不发酵葡萄糖等试验初步鉴定,报告:经鉴定有“非发酵细菌”生长。

#### 6.3.3 只生长肠球菌和凝固酶阴性葡萄球菌时的报告

若只生长肠球菌属和/或凝固酶阴性葡萄球菌(有或无酵母样真菌),报告“革兰阳性球菌混合生长”;若培养物几乎为纯培养时,则做初步鉴定到属水平并分别列出。

#### 6.3.4 报告“分离到口咽部正常菌群”

若未分离到致病菌,对分离的:草绿色链球菌和/或非致病奈瑟菌、类白喉杆菌、凝固酶阴性葡萄球

菌、罗斯菌属(*Rothia* spp.)、F 群链球菌、厌氧菌、嗜血杆菌属(非流感嗜血杆菌)、艾肯菌属、放线杆菌属、二氧化碳嗜纤维菌属、莫拉菌属、肠球菌属、酵母样真菌,和未达到有意义数量的金黄色葡萄球菌(如果医院感染控制要求可做药敏试验)、革兰阴性杆菌及脑膜炎奈瑟菌,均报告:“分离到口咽部正常菌群”(可列出相应菌属)。

#### 6.4 平板上无细菌生长

如任何平板上无细菌生长,报告“无细菌生长”。出现此种情况可能是使用抗菌药物抑制了正常菌群等原因。

#### 6.5 与结果有关的说明

除以上结果解释外,与结果相关的说明:

- a) 当实验室报告分离菌是肺炎链球菌或流感嗜血杆菌时,应注意也可能仅是定植菌;
- b) 仅当培养生长的革兰阴性杆菌或金黄色葡萄球菌是优势菌,且涂片也提示这些形态的细菌与感染相关时才报告;
- c) 培养阴性时也不能排除患者的下呼吸道感染,因培养的阳性率低,且有可能会受到临床使用抗菌药物的影响而致阴性结果;
- d) 培养阴性不能排除患者可能存在由非典型 CAP 病原引起的下呼吸道感染,需用分子诊断、血清学等方法检测肺炎支原体、肺炎衣原体和军团菌属抗体确诊;
- e) CAP 治疗大部分是经验性治疗,若有效则不必确定病原体,经验性治疗失败则需确定病原体;对于住院患者应争取确定病原体。



附 录 A  
(规范性附录)

下呼吸道感染的主要类型及主要病原体

下呼吸道感染的主要类型及主要病原体见表 A.1。

表 A.1 下呼吸道感染的主要类型及主要病原体

类型/免疫状态	最常见病原菌	少见病原菌
社区获得性(典型)肺炎 <sup>a</sup>	肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、肺炎克雷伯菌	金黄色葡萄球菌、卡他莫拉菌、脑膜炎奈瑟菌
社区获得性非典型肺炎 <sup>b</sup>	肺炎支原体、呼吸道病毒、流感病毒、肺炎衣原体、军团菌属	沙眼衣原体、结核分枝杆菌、真菌等
吸入性肺炎	厌氧菌、金黄色葡萄球菌、需氧革兰阴性杆菌	
医院获得性肺炎	革兰阴性杆菌(肠杆菌属/克雷伯菌属/不动杆菌属/假单胞菌属)、金黄色葡萄球菌、厌氧菌、社区获得性肺炎的典型菌	军团菌,肺炎链球菌
血液播散性肺炎	金黄色葡萄球菌、链球菌	需氧革兰阴性杆菌
免疫抑制宿主条件致病菌感染性肺炎	社区获得性肺炎典型菌、奴卡菌属、念珠菌属、条件致病真菌、曲霉菌	
环境暴露 <sup>c</sup> 引起的肺炎	结核分枝杆菌、军团菌属、双相真菌、曲霉属、肺炎支原体、肺炎衣原体	鼻疽假单胞菌、假鼻疽假单胞菌、鼠疫耶尔森菌、贝纳柯克斯体、图拉热弗朗西斯菌
急性气管炎	病毒,百日咳博德特菌,肺炎支原体和肺炎衣原体	

<sup>a</sup> 肺炎链球菌和流感嗜血杆菌是引起儿童和老年人肺炎的最常见致病菌;卡他莫拉菌、脑膜炎奈瑟菌多发于基础病患者或病毒感染后的继发感染;金黄色葡萄球菌肺炎可引发肺脓肿;肺炎克雷伯菌大叶性肺炎常合并脓肿或肺粘连,死亡率较高。

<sup>b</sup> 通常可用分子生物学方法快速诊断,也可在感染后期用血清学方法检测肺炎支原体、肺炎衣原体和军团菌属抗体确诊。由生物恐怖病原菌,如鼠疫耶尔森菌引起的感染,血清学检测可作为辅助诊断方法。结核分枝杆菌可用罗氏培养基或快速结核杆菌液体培养仪培养,或分子诊断方法检测。

<sup>c</sup> 暴露在特殊气溶胶环境:与飞沫有关的结核分枝杆菌、与尘暴和鸟排泄物有关的双相真菌等。

## 附 录 B

(规范性附录)

## 纤维支气管镜采集的标本适合诊断的病原体和检验项目

纤维支气管镜采集的标本适合诊断的病原体和检验项目见表 B.1。

表 B.1 纤维支气管镜采集的标本适合诊断的病原体和检验项目

标本类型	适合诊断的病原体	推荐试验
支气管灌洗液(BS) <sup>a</sup>	只用于诊断由严格致病菌引起的肺炎,如结核分枝杆菌、军团菌属、内源性真菌	1. 用选择性培养基分离培养分枝杆菌、真菌 2. 并做真菌涂片和抗酸染色 3. 直接荧光抗体法(DFA)检测军团菌和肺孢子菌
保护毛刷标本(PSB)	只用于诊断细菌性肺炎	1. 定量细菌培养 2. 革兰染色
支气管肺泡灌洗液(BAL) <sup>b</sup>	适用于检测条件致病菌引起的肺部感染的所有试验	1. 定量细菌培养 2. 分枝杆菌培养和抗酸染色 3. 真菌培养和染色 4. 直接荧光抗体法检测病毒 5. 直接荧光抗体法检测肺孢子菌

<sup>a</sup> BAL 适用于诊断:机械通气相关肺炎、免疫低下患者肺炎、慢性阻塞性肺疾病急性加重(AECOPD)、ICU 病房重症患者、经抗菌药物治疗未获改善者、艾滋病患者、痰检阴性、疑似肺结核或支气管结核者等。

<sup>b</sup> BS 来自自主气道,从外观上无法与 BAL 区别,含有上呼吸道污染菌。

**附录 C**  
(规范性附录)

**常见可疑菌落形态及常规快速鉴定方法**

常见可疑菌落形态及常规快速鉴定方法见表 C.1。

**表 C.1 常见可疑菌落形态及常规快速鉴定方法**

细菌	可疑鉴定	附加试验、最终鉴定	特殊要求
化脓链球菌 (A 群)	1. G+链球菌, 成对 2. 触酶阴性 3. 溶血 4. 菌落直径>0.5 mm, 边缘明显	PYR 阳性	用血清学方法确认
无乳链球菌 (B 群)	1. G+链球菌, 成对 2. 触酶阴性 3. 透明菌落小溶血环	CAMP 阳性 或马尿酸水解阳性	若用侵入性方法采集的标本或菌落不溶血, 需确认马尿酸水解试验、PYR(阴性)、CAMP 或血清学结果
草绿色链球菌群	1. G+链球菌 2. 触酶阴性 3. α-溶血 4. 胆汁溶菌阴性或菌落发白	PYR 阴性	—
肺炎链球菌	1. G+矛头状双球菌 2. 触酶阴性 3. α-溶血	胆汁溶菌阳性 或荚膜肿胀阳性	若胆盐不溶菌但菌落典型, 需确认 OP 敏感
流感嗜血杆菌	1. G-球杆菌 2. 巧克力平板 24 h 生长良好但血平板上不生长, 但血平板上葡萄球菌周围呈卫星生长	吡啉 ALA 阴性	非致病性溶血嗜血杆菌在马血、兔血和羊血平板上呈 β-溶血, ALA 阴性, 因自身溶血可在血平板上独立生长。弗朗西斯吐拉菌(高致病菌)在巧克力板上 48 h 生长更小的菌落, 血平板上不生长
侵蚀艾肯菌	1. G-杆菌 2. 氧化酶阳性 3. 触酶阴性 4. MAC 平板上不生长 5. 不溶血	有漂白粉味道 鸟氨酸阳性	—
卡他莫拉菌	1. G-双球菌 2. 氧化酶阳性 3. 在血平板上推菌落可移动	丁酸盐试验阳性	将革兰染色形态“双球菌”与其他莫拉菌的“球杆菌”区别
脑膜炎奈瑟菌	1. G-双球菌 2. 氧化酶阳性 3. 血平板上生长	糖发酵仅葡萄糖和麦芽糖阳性或用奈瑟菌属试剂盒鉴定	应在 II 级生物安全柜中处理可疑脑膜炎奈瑟菌培养物
铜绿假单胞菌	1. 氧化酶阳性 2. 吡啉阴性 3. 生姜气味	若无水果气味, 蓝绿色色素可判断	若无水果气味或蓝绿色色素, 有绿色、荧光色素, 42 °C 生长

表 C.1 (续)

细菌	可疑鉴定	附加试验、最终鉴定	特殊要求
荧光假单胞菌腐 败假单胞菌	1. 氧化酶阳性 2. 吡啶阴性	有荧光, 但无气味或 42℃生长	明胶或卵磷脂试验鉴别
金黄色葡萄球菌	1. 触酶阳性 2. G+球菌, 成堆 3. 试管法/玻片法或乳胶凝集试 验阳性	需试管法凝固酶试验 确认	—
凝固酶阴性葡萄 球菌	1. 触酶阳性 2. G+球菌, 成堆 3. 试管法/玻片法或乳胶凝集试 验阴性	菌落不黏	对于玻片法凝固酶试验阴性菌株, 需再 做试管法凝固酶试验确认; 达 90% 以上 生长纯度时才继续鉴定到种水平和/或 做药敏试验
肠球菌属	1. G+链球菌, 成对 2. 触酶阴性 3. 不溶血	PYR 阳性 溶血菌落可能是 A 群链球菌, 若溶血肠 球菌则胆汁七叶灵 阳性	若菌落溶血、胆汁七叶苷阳性是肠球菌
芽孢杆菌属(及 相关有芽孢菌 属)	1. G+大杆菌 2. 触酶阳性 3. 有芽孢	动力(无动力则检测 炭疽芽孢杆菌)	蜡样芽孢杆菌群(非炭疽芽孢杆菌)为β- 溶血及青霉素耐药, 菌落直径>1 μm
棒状杆菌属	1. G+杆菌, 不大 2. 触酶阳性 3. 不溶血 4. 无色素 5. 无动力	无分枝, 或部分菌体 抗酸染色阳性	用试剂盒可鉴定到种水平
奴卡菌属	1. G+细长, 分枝, 串珠状, 丝状菌 2. 或染色不规则杆菌 3. 培养物涂片多形分枝球状	改良抗酸染色法, 部 分菌体抗酸染色阳性	—

## 参 考 文 献

- [1] 叶应妩, 等. 全国临床检验操作规程. 3 版. 南京: 东南大学出版社. 2006.
- [2] 王辉, 任健康, 王明贵. 临床微生物学检验. 北京: 人民卫生出版社. 2015.
- [3] 宁永忠, 王启斌. 浅析痰细菌培养与肺炎的关系. 中华医学杂志. 2015, 95(40): 3251-3255.
- [4] 胡继红, 胡云建. 正确应用药敏标准 提供准确药敏结果. 中华检验医学杂志. 2012, 35(8): 685-689.
- [5] Lynne S. Garcia, editor in chief. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Third Edition and 2007 Update. ASM Press, 1752 N St., N.W., Washington, DC.
- [6] Susan E. Sharp, Ann Robinson and Michael Saubolle, ect. 2004. *Cumulative Techniques and Procedures in Clinical Microbiology 7B, Lower Respiratory Tract Infections*. ASM Press, Washington, D.C.
- [7] Murray P.R., Baron, E.J., Tenover, F., and Tenover, R. 2006. *Manual of Clinical Microbiology*, 9th ed. ASM Press, Washington, DC.
- [8] James V., Karen C.C., James H. J., Guido F., Marie L.L., David W.W. 2011. *Manual of Clinical Microbiology*, 10th ed. ASM Press, Washington, DC.
- [9] Giuseppe Cornaglia, Rene Courcol, Jean-Louis Herrmann, Gunnar Kahlmeter, Helene Peigue-Lafeuille, Jordi Vila. *Eropean Manual Microbiology*. 1<sup>st</sup> edition. EMCM, 2012.
- [10] Nagendra, S., P. Bourbeau, S. Brecher, M. Dunne, M. LaRocco, and G. Doern. 2001. Sampling variability in the microbiological evaluation of expectorated sputa and endotracheal aspirates. *J. Clin. Microbiol.* 39:2344-2347.
- [11] Roson, B., J. Carratala, R. verdaguer, J. Dorca, F. Manresa, and F. Gudiol. 2000. Prospective study of sputum Gram stain in the initial approach to community-acquired pneumonia requiring hospitalization. *Clin. Infec. Dis.* 31:869-874.
- [12] Gleckman, R., J. DeVita, D. Hibert, C. Pelletier, and R. Martin. 1988. Sputum gram stain assessment in community-acquired bacteremic pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 26:846-849.
-