

Research and Development of Biomedical New Products of Selective Fast Separation Haemophilus Genus XV AGAR Medium

Ruili Yao

Tianjin Chuanhe Medical Technology Co., Ltd., Tianjin
Email: ycbysl@163.com

Received: Apr. 7th, 2015; accepted: Apr. 23rd, 2015; published: Apr. 29th, 2015

Copyright © 2015 by author and Hans Publishers Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Haemophilus influenzae (Hi) is a key to respiratory tract infection pathogens, clinical disease for meningitis, pneumonia, cellulitis, sepsis, osteomyelitis and cp, and is the most common disease in pediatric hospital. The strain infection directly harms the people healthy body. How to quickly detect infection strain cultivation, convenient for the doctor's right medication for a long time, focuses on major issues. Because the wide detection range, the low sensitivity and the poor accuracy of the conventional *in vitro* diagnostic reagents result in the low separation rate and the poor detection rate, providing biomedical new products of selective fast separation Haemophilus genus XV agar medium to clinic has be imperative. By using the factorial effect, the product adds X and V factors to prepare the sterile culture medium. It does not need to add blood so as to avoid the problems such as blood collection, bacterial contamination and high cost, and to achieve the highest purity in China. Rapid isolation of Haemophilus XV agar medium in biomedicine and new products with high selectivity, clinical mainly for respiratory tract infections in patients with sputum and throat swab specimens for analysis, identification of strains with high selectivity, is used to isolate Haemophilus isolated strains, and rapid detection of infection, to facilitate clinicians in patients infected with strains and correct use of antibiotics, medication, control and treatment, to solve the clinical diagnosis, observation, judgment and analysis.

Keywords

Haemophilus influenzae, XV AGAR Medium, Bacitracin, Inhibition Rate

高选择性快速分离嗜血杆菌属 XV琼脂培养基生物医学 新产品研究与开发

要瑞丽

天津川禾医疗科技有限公司，天津

Email: ybyrl@163.com

收稿日期：2015年4月7日；录用日期：2015年4月23日；发布日期：2015年4月29日

摘 要

流感嗜血杆菌(Hi)是呼吸道感染关键致病菌，临床疾病为脑膜炎、肺炎、蜂窝织炎、败血症、骨髓炎和心包炎等，是导致小儿住院最常见疾病，该菌株感染直接危害着人们身体健康，如何快速检测分离培养感染菌株，便于医师正确用药是长期以来关注的重大问题，由于常规体外诊断试剂检测范围广、灵敏度低、准确度差等致使分离率偏低、检出率差等，因此向临床提供高选择性快速分离嗜血杆菌属XV琼脂培养基生物医学新产品已势在必行。该产品利用因子效应加入X、V因子制备无菌培养基，不需要加入血源，避免了血源采集、杂菌污染和成本高难题，达到国内最高纯度。高选择性快速分离嗜血杆菌属XV琼脂培养基在生物医学新产品中，临床主要针对呼吸道感染患者的痰液及咽拭子等标本进行分析、鉴定菌株，用于分离培养嗜血杆菌属，并快速检测分离感染菌株，便于临床医生针对患者感染的菌株正确使用抗生素，进行用药、控制和治疗，解决了临床诊断、观察、判定和分析等步骤。

关键词

流感嗜血杆菌， XV琼脂培养基， 杆菌肽， 抑制率

1. 引言

嗜血杆菌(学名 *Haemophilus influenzae*)是流感嗜血杆菌的简称，前称费佛氏杆菌(或译拜菲尔氏菌)或流感杆菌，属孤菌科嗜血杆菌属。是一种没有运动力的革兰氏阴性杆菌，大部份流感嗜血杆菌都是机会性感染细菌，即它们会在寄主体内生存而不引起任何疾病，但当某一些因素(如病毒感染或免疫力下降)出现后则会引发病症。流感嗜血杆菌一般有六种菌株，称为 a 型、b 型(又称乙型)、c 型、d 型、e 型及 f 型。流感嗜血杆菌(Hi)是呼吸道感染关键致病菌，临床疾病为脑膜炎、肺炎、蜂窝织炎、败血症、骨髓炎和心包炎等，是导致小儿住院最常见疾病，该菌株感染直接危害着人们身体健康，临床上常用呼吸道感染患者的痰及咽拭子等标本及无呼吸道感染对照组咽拭子标本做检测，有的应用玻片凝集法及反向间接血凝法对分离出的 Hi 进行血清分型，并检测 Hib 和不可分型株(NTHi)产 β 内酰胺酶情况作出判断疾病的情况，长期由于疾病困扰，大量抗生素、化药、激素类药物滥用，引起剂量增大、疗程长、临床检测准确性差，快速检测分离培养感染疾病的菌株，正确使用抗生素，确保国民机体健康，是长期以来国家和人们关注的重大问题，因此向临床提供“高选择性快速分离嗜血杆菌属 XV 琼脂培养基新产品”已势在必行。我公司研制直接将微量的 X 因子和 V 因子加入基础培养基中，控制反应温度，满足了嗜血杆菌的生长。同时本产

品改进的杆菌肽纸片技术,解决了成本高的和杂菌污染分不出嗜血杆菌等诸多问题。经处方筛选、工艺考核、质量研究、稳定性试验等制成国内新型微生物培养基,属高选择性快速分离嗜血杆菌属体外诊断试剂,不仅能快速分离检测流感嗜血杆菌,而且从根本上解决了临床分析和进一步推断的各种问题。高选择性快速分离嗜血杆菌属 XV 琼脂培养基生物医学新产品主要针对临床呼吸道感染患者的痰液及咽拭子等标本进行分析、鉴定菌株,用于分离培养嗜血杆菌属,并快速检测分离培养感染疾病的菌株,便于临床医生针对患者感染的菌株正确使用抗生素,进行用药、控制和治疗,解决了临床诊断、观察、判定和分析等步骤,呼吸道感染是临床常见疾病中支出用药最多的项目。国内外尚无该配方产品研制开发和生产,也尚未有同类产品的上市销售,该产品满足了临床多年来的检测需要,弥补国内市场空白[1]-[3]。

2. 研制与方法

2.1. 仪器与试剂

HZ-K600AB 电子天平,福州衡之展电子有限公司;HH17A 电陶炉,茂名市茂港华虹电器有限公司;YX-24LDJ 手提式压力蒸汽灭菌器,江阴滨江医疗设备有限公司;YXQ-LS-50A 立式压力蒸汽灭菌器,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;一列四孔 S 电热恒温水浴锅,天津市华北实验仪器有限公司;SW-CJ-1F 单人双面净化工作台,苏州净化设备有限公司;EM800 非接触式红外测温仪,伊莱科电器有限公司;8611B 热风枪,上海正峰工业有限公司;XM-T 系列臭氧发生器,青岛欣美净化有限公司;BHC-1300 II A/B2 生物安全柜,苏州净化设备有限公司;GM8902 数字风速风量计,深圳市聚茂源科技有限公司;CLJ-E 型激光尘埃粒子计数器,苏州源水净化设备有限公司;XSP-2CA 生物显微镜,上海迪也姆光学仪器有限公司;PHB-1 型便携式酸度计,杭州奥立龙仪器有限公司;牛肉浸出粉,胰酪蛋白胨、氯化钠、琼脂、酵母粉、血红素、辅酶 I、万古霉素、纯化水。

2.2. 血红素与辅酶 I 最佳比例替代无菌脱纤维羊血血源的研制

无菌脱纤维羊血(Sterile Defibrinated Sheep Blood)主要成分为多种蛋白质。此外,尚含少量脂类(包括磷脂和胆甾醇)、葡萄糖及无机盐等,蛋白质主要是血红蛋白,其次是血清白蛋白、血清球蛋白和少量纤维蛋白。是临床匹克氏肉汤基础、改良 MRS 琼脂、Skirrow 氏基础、血琼脂基础、改良 Camp-BAP 使用,适用于细菌培养生物医学研究基础。羊血是细菌生长繁殖的良好营养物质,在 45℃~50℃的基础培养基中加入血液可以保存血液中某些不耐热的生长因子,同时血细胞不被破坏,但在高温的基础培养基中加入血液可以将血细胞破坏使其释放出 X 因子与 V 因子,以利于嗜血杆菌和奈瑟菌的生长培养,羊血是细菌生长繁殖的良好营养物质[4]。

血红素(heme)是(血红蛋白、肌红蛋白、脑红蛋白)分子上的主要稳定结构,分子式: $C_{34}H_{32}N_4FeO_4$, 是一种铁卟啉化合物,它是血红蛋白、肌红蛋白、细胞色素、过氧化氢酶和过氧化物酶的辅基。血红素在体内分解产生胆色素(bile pigment)。胆色素包括胆红素、胆绿素、胆素原和胆素等多种化合物,其中以胆红素为主。血红素由四个亚基构成,分别为两个 α 亚基和两个 β 亚基,在环境相似的电解质溶液中血红素的四个亚基可以自动组装成 $\alpha_2\beta_2$ 的形态。除了运载氧,血红素还可以与二氧化碳、一氧化碳、氰离子结合,结合的方式也与氧完全一样,所不同的只是结合的牢固程度,一氧化碳、氰离子一旦和血红素结合就很难离开[5]。

辅酶 I 别名烟酰胺腺嘌呤二核苷酸;烟酰胺腺嘌呤双核苷酸;烟酰胺腺嘌呤双核甙酸,分子式为 $C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2$, 分子量为 663.43。经反复的正交试验和微生物学试验验证得到,多次试验结果表明血红素和辅酶 I 按 1:1 的最佳配比混合均匀,有助于嗜血杆菌属的生长,可替代无菌脱纤维羊血(Sterile Defibrinated Sheep Blood),降低血源的使用,不需要加入血源,避免了血源采集、杂菌污染和成本高难题,达到国内最高纯度,国内外尚未有该比例和产品的文献和试验报道[6]。

3. 制剂研制开发及产品工艺流程图

3.1. 制剂研制开发

根据临床需要、疾病情况、用户要求和临床诊断以不同比例的加入牛肉浸出粉 3 g；胰酪蛋白胨 10 g；氯化钠 5 g；琼脂 15 g；酵母粉 5 g；血红素 0.015 g；辅酶 I 0.015 g；万古霉素 0.032 g；纯化水 1000 ml 原辅料进行处方筛选，采用先后加入顺序不同、温度(46℃~55℃)、不同 pH 值 6.8~7.6 调节等工艺考核及 4500 LX 光照、高温(45℃, 60℃)、高湿(60%, 75%, 95%)的稳定性研究[6]，并以外观、培养基性能、细菌生长效果、培养基营养能力、抑制能力、无菌、pH 值作为考核技术指标进行处方筛选和工艺考核，进一步确定最佳处方和最佳生产工艺见产品工艺流程图，通过连续生产三批小试样品验证最佳生产工艺和技术路线，获得完整的高选择性快速分离嗜血杆菌属 XV 琼脂培养基新产品处方和工艺，杆菌肽 MIC 抑菌技术，加入抗生素万古霉素成分使 G⁺菌受到抑制，用量仅为国外改良培养基几十分之一，攻克了嗜血杆菌分离难的问题。小试研究及方法学研究：对小试样品进行破坏性试验、高温、高湿、光照和降解等试验，并对主要项目参数外观、培养基性能、细菌生长效果、培养基营养能力、抑制能力、无菌、pH 值、稳定性等进行方法学研究，建立稳定可控的高质量标准见下面的质量标准及技术指标。中试生产：连续生产三批中试样品，并依据制定的质量标准进行全项检测。临床试验模型的建立和研究：检索嗜血杆菌属机理、临床使用药物及现状、用药情况分析、呼吸道感染疾病种类、国内外临床使用分离嗜血杆菌属培养基、XV 琼脂培养基特性、高选择性分离机理等有关信息情报、专利和文献，联系国内具有临床资质的试验基地，建立临床试验模型，与伦理委员会制定临床实验方案，实施临床，TSS 统计学分析临床数据，出具临床报告。

关键技术和技术路线：

采用血红素与辅酶 I 最佳比例试验配制不同成分的培养基产品，进行外观、培养基性能、细菌生长效果、培养基营养能力、抑制能力、无菌、pH 值检验，并进行嗜血杆菌分离、检测和培养，与无菌脱纤维羊血培养基进行比较，进一步确定血红素与辅酶 I 的最佳比例和替代无菌脱纤维羊血的优越性，达到国内最高纯度。加入不同比例的万古霉素抗生素做成培养基，检测使 G⁺菌抑制情况，用量与国外改良培养基比较，攻克嗜血杆菌分离难的问题，达到高选择性的迅速分离嗜血杆菌，并将直接取得的标本划线接种在培养基上，放置在 35℃ ± 2℃，5%~10% 二氧化碳环境下恒温培养箱中孵育 18~24 小时观察结果，质控菌株嗜血杆菌 ATCC49247 在 XV 琼脂培养基上生长，金黄色葡萄球菌 ATCC29213 和粪肠球菌 ATCC29212 的生长被抑制情况进行分析。以正交试验并根据临床诊断以不同比例的加入血红素、辅酶 I、万古霉素、牛肉浸出粉、胰酪蛋白胨、酵母粉、氯化钠和琼脂等原辅料进行筛选，以外观、培养基性能、细菌生长效果、培养基营养能力、抑制能力、无菌、pH 值作为考核技术指标进行处方筛选和工艺考核，确定最佳处方和生产工艺。以确定的处方和工艺连续生产并检验，进行临床试验，临床检测迅速、快捷、灵敏、准确。

3.2. 需要解决的关键问题

1) 血红素与辅酶 I 最佳比例替代无菌脱纤维羊血血源问题

血红素与辅酶 I 不同比例的调整，再与加入的无菌脱纤维羊血血源培养基的对比、检测和营养性能的培养，观察质控菌株嗜血杆菌 ATCC49247 在两者培养基上生长情况，观察金黄色葡萄球菌 ATCC29213 和粪肠球菌 ATCC29212 在两者培养基上生长被抑制的情况对比，测量菌落的大小，外观和形状，进一步确定血红素与辅酶 I 的营养比例，并以军团菌属、弯曲菌属、螺旋菌属、分枝杆菌属作检测，确定其培养基的高选择性和快速性。

2) 高选择性快速分离嗜血杆菌属 XV 琼脂培养基新产品质量标准的制定问题

对小试样品进行破坏性试验、高温、高湿、光照和降解等试验，并对主要项目参数外观气泡 ≤ 4 个/

平皿；培养基性能细菌生长效果的流感嗜血杆菌 ATCC10211 生长，金黄色葡萄球菌 ATCC29213 和粪肠球菌 ATCC29212 的生长被抑制；培养基营养能力的定量接种的质控菌株应保持成活，误差不超过 ± 1 log 菌落形成单位。例如接种菌液为 1×10^8 菌落形成单位/ml，成活菌落范围应在 1×10^7 到 1×10^9 菌落形成单位/ml 之间；抑制能力的定量接种的质控菌株如被抑制可根据抑制物的不同可以表现全部抑制或部分抑制(抑制率 $\geq 90\%$)；无菌检查；pH 值以灭菌后， $20^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$ 时，该培养基 pH 值为 7.3 ± 0.1 。进行方法学研究，建立稳定可控的高质量标准[7]。

3) 临床试验数据的建立问题

收集急性上、下呼吸道感染患者的痰及咽拭子、鼻咽分泌物标本及无呼吸道感染对照组咽拭子标本，应用国外改良哥伦比亚培养基、巧克力培养基和该产品培养基进行分离培养，应用玻片凝集法及反向间接血凝法对分离出的 Hi 进行血清分型，并检测 Hib 和不可分型株(NTHi)产 β 内酰胺酶情况。测定统计分离率和检出率。并对鼻咽分泌物进行 Hi 分离培养，用 Kirby Bauer (KB)法和 Etest 法测定，对阿莫西林克拉维酸、头孢曲松、头孢克洛等抗菌药物的耐药率，以 Nitrocefin 纸片法测定 β 内酰胺酶的产生率，以玻片凝集法分离出 b 型株。分析统计 Hi 总分离率、 β 内酰胺酶总产生率[8]。

3.3. 产品工艺流程图

高选择性快速分离嗜血杆菌属 XV 琼脂培养基处方配制方法和生产技术指标工艺流程见图 1。

3.4. 结果

精密称取牛肉浸出粉 3 g、胰酪蛋白胨 10 g、氯化钠 5 g、琼脂 15 g、酵母粉 5 g、血红素 0.015 g 加入纯化水 1000 ml，原辅料充分溶解，调节 pH 值为 7.2~7.4，配制液经压力蒸汽灭菌器 121°C 高压灭菌 15 分钟，冷却至 50°C ，在无菌环境下加入辅酶 I 0.015 g、万古霉素 0.032 g，旋转式充分摇匀，在无菌环境下倾注平板，轻摇均匀，要求每个平板厚度为 $4 \text{ mm} \pm 1 \text{ mm}$ 。检测外形尺寸；外观；pH 值为 7.2~7.4；细菌生长效果：流感嗜血杆菌生长良好，金黄色葡萄球菌和粪肠球菌生长被抑制；培养基营养能力：误差 $\leq \pm 1$ log 菌落形成单位；培养基抑制能力：抑制率 $\geq 90\%$ ；无菌；稳定性：3 个月。

4. 质量标准及技术指标[9]

4.1. 培养基平皿尺寸

培养基平皿盖直径 70 mm 或 90 mm、底直径 69 mm 或 86 mm 圆形平皿，平皿盖、底尺寸允许误差为 $\pm 2 \text{ mm}$ 。培养基厚度为 $4 \pm 1 \text{ mm}$ 。

4.2. 外观

培养基外观无裂纹、伤斑等缺陷，培养基充碟均匀，无裂纹，气泡 ≤ 4 个/平皿，培养基平皿无裂纹，无斑点无污染，色泽均匀呈浅黄色。

4.3. 性能检测

细菌生长效果：流感嗜血杆菌 ATCC10211 生长，金黄色葡萄球菌 ATCC29213 和粪肠球菌 ATCC29212 的生长被抑制。

4.4. 培养基营养能力

定量接种的质控菌株应保持成活，误差不超过 ± 1 log 菌落形成单位，接种菌液为 1×10^8 菌落形成单位/ml，成活菌落范围应在 1×10^7 到 1×10^9 菌落形成单位/ml 之间。



“▲”关键工制点：设备：电子天平和精密电子天平 - 工艺参数：精密密度为 0.1 mg；人员：经过培训的熟练工人；特殊工序：灭菌 - 控制点：高压灭菌 - 设备：压力蒸汽灭菌器 - 工艺参数：121℃ 15 分钟；人员：经过培训的熟练工人；称量、配制、灭菌和冷却均为十万级洁净环境，分装为百级洁净环境。

Figure 1. Product process flow chart
图 1. 产品工艺流程图

4.5. 培养基抑制能力

定量接种的质控菌株如被抑制可根据抑制物的不同可以表现全部抑制或部分抑制，抑制率 ≥ 90%。

4.6. 无菌

培养基应无菌。

4.7. pH 值

灭菌后，20℃~25℃时，pH 值应为 7.3 ± 0.1。

4.8. 质控菌株来源

WS/T 232-2002 规定培养基质量检测使用的质控菌株来源于 ATCC (American Type Culture Collection 美国标准菌株收藏中心)，也可使用商业来源的 ATCC 演化的菌株或我国国家菌种库贮存的各级标准菌株。

4.9. 质控菌株种类

流感嗜血杆菌 ATCC10211、金黄色葡萄球菌 ATCC29213、粪肠球菌 ATCC29212。

4.10. 质控菌株的保存

WS/T 232-2002 中 2.2 规定。

4.11. 冷冻菌种的制备

符合 WS/T 232-2002 中 2.3 规定但质控菌株流感嗜血杆菌 ATCC10211 需划线接种于两或三个不含抗生素的 GC 琼脂培养基上, 在含有二氧化碳、温度为 $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 下孵育 24~48 小时。

5. 生物医学临床机理及使用

【检验原理】 血红素和辅酶 I 等物质有助于嗜血杆菌属的生长, 万古霉素可以抑制革兰阳性菌的生长, 避免革兰阳性菌生长干扰嗜血杆菌属的生长。

【贮存条件及有效期】 培养基应放在周围环境洁净, $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 冷库或冰箱内贮存, 防止贴壁, 防止冷冻; 有效期 3 个月, 用前复温。

【样本要求】 标本采集注意事项: 1) 临床发现感染应及时采集微生物标本作病原学检查, 二、三级医院微生物标本送检率不应低于 60%~70%。2) 应在抗菌药物使用前采集标本。3) 标本采集时应严格执行无菌操作, 减少或避免机体正常菌群及其他杂菌污染。能够保证样本稳定的储存、处理和运输方法: 1) 标本采集后应立即送至实验室。床边接种可提高病原菌检出率。2) 以棉拭子采集的标本如咽拭、肛拭或伤口拭子, 宜采用插入运送培养基送检。3) 混有正常菌群的标本如咳痰、尿液、伤口拭子, 不可置肉汤培养基内送检。4) 盛标本容器须经灭菌处理, 但不得使用消毒剂。5) 送检标本应注明来源和检验目的, 使实验室能正确选用相应的培养基和适宜的培养环境[10]。

【检验方法】 本试验方法对湿度没有特殊要求。直接将取得的标本划线接种在培养基上, 放置在 $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 5%~10% 二氧化碳环境下恒温培养箱中孵育 18~24 小时观察结果。

【检验结果的解释】 质控菌株嗜血杆菌 ATCC49247 在 XV 琼脂培养基上生长, 金黄色葡萄球菌 ATCC29213 和粪肠球菌 ATCC29212 的生长被抑制。

【注意事项】 本产品仅用于体外诊断; 不适用分离培养营养要求特殊的一些细菌如军团菌属、弯曲菌属、螺旋菌属、分枝杆菌属等; 使用前必须检查本产品, 若本产品有污染迹象或超过有效期不得使用; 培养基存放过程中要注意温度, 防止冷冻; 产品使用完毕 121 摄氏度 20 分钟高压灭菌消毒后, 方可丢弃[11]。

6. 产品在生物医学应用、技术、工艺、结构等方面的创新点及优势

1) 利用因子效应技术加入 X、V 因子制备的无菌培养基, 不需要加入无菌脱纤维羊血的血源, 避免了血源采集、杂菌污染、保存困难和成本高难题, 达到国内最高纯度, 能够高选择性快速分离嗜血杆菌属, 便于临床使用和疾病的迅速判定, 提高临床检测速度和患者疾病菌株的准确检测, 省时省力使国内临床诊断提高一个高度[12] [13]。

2) 采用湿热灭菌和质控菌株技术, 解决了国内常规培养基有效期短难保存的不足, 使培养基有效期长达 12 个月, 达到外观透明易于识别菌株生长性能, 便于临床观察、分析和判定, 使国内微生物培养基的生产制造达到一个长期有效的贮存高度。

3) 采用独特杆菌肽 MIC 抑菌技术, 加入的抗生素万古霉素使 G+ 菌显著受到抑制, 用量仅为国外改良培养基添加用量的几十分之一, 攻克了嗜血杆菌分离难的问题, 解决了选择性低不易分辨的临床难题[14]。

4) 国内尚无该配方产品的研制开发生产和上市, 弥补国内市场空白。

7. 结论

近年来抗生素滥用和临床常规体外诊断试剂检测的灵敏性差, 致使分离率偏低, 检出率差, 使用不便等种种难题, 另外由于临床用于嗜血杆菌的分离培养的巧克力培养基难以配制, 且不易观察形成的菌落易造成漏检等现状。该产品的研制节省了无菌脱纤维羊血的血源, 避免了血源采集、杂菌污染、保存

困难和成本高难题,达到国内最高纯度,能够高选择性快速分离嗜血杆菌属,便于临床使用和疾病的迅速判定,提高临床检测速度和患者疾病菌株的准确检测,省时省力使国内临床诊断提高一个高度。该产品从能量危害、生物学危害、环境危害、使用危害、由功能失效维护及老化引起的等危害分析,该产品使用安全、检测迅速准确、灵敏度高,用时短,给生物医学者带来更方便准确的诊断,从而提高了我国生物医学者的临床诊断和鉴定[15]-[17]。

参考文献 (References)

- [1] 吴宏 (1987) 新生儿嗜血性流感杆菌败血症. *中国新生儿科杂志*, **5**, 22.
- [2] 贾杰 (1980) 流感杆菌脑膜炎的液体处理. *国际流行病学传染病学杂志*, **3**, 15.
- [3] 丁载道 (1980) 乙型嗜血性流感杆菌脑膜炎: 一种小儿接触性传染病. *国际流行病学传染病学杂志*, **5**, 37.
- [4] 中华医学会儿科学分会 (2010) 儿童肺炎链球菌性疾病防治技术指南(2009年版). *中华儿科杂志*, **2**, 104.
- [5] 王丹侠, 等 (2002) 血红素的应用分析研究进展. *上海预防医学杂志*, **5**, 219.
- [6] 《中国药典》2010年版二部.
- [7] WS/T 232-2002 (2002) 商业性微生物培养基质量检验规程. 中华人民共和国卫生部.
- [8] 李翠英 (2003) 儿童急性呼吸道感染流感嗜血杆菌的分离、分型及耐药性分析. *齐鲁医学检验*, **5**, 81.
- [9] GB/T 14233.2-2005 (2005) 医用输液、输血、注射器具检验方法. 第2部分: 生物学试验方法. 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.
- [10] 《全国临床检验操作规程》(第3版). 中华人民共和国卫生部医政司.
- [11] GB 18278-2000 (2000) 医疗保健产品灭菌确认和常规控制要求. 工业湿热灭菌. 国家质量技术监督局.
- [12] 梁志强, 等 (2006) 凝血因子 V 基因 Leiden 突变和早产儿脑室内出血的关系研究. *中国急救医学*, **4**, 44.
- [13] 傅启华, 等 (2003) 2种新的凝血因子 V 基因突变导致的遗传性凝血因子 V 缺乏症. *中华医学杂志*, **4**, 312.
- [14] 雷波 (2006) 杆菌肽发酵的培养基优化及影响其检测的因素. *食品与生物技术学报*, **6**, 98.
- [15] YY/T0316-2008 (2008) 医疗器械风险管理对医疗器械的应用. 国家食品药品监督管理局.
- [16] 张智州, 等 (2010) 流感嗜血杆菌耐药性分析. *国际检验医学杂志*, **11**, 1244.
- [17] Lipuma, J.J. and Sharetsky, C. (1992) Haemocin production by encapsulated and nonencapsulated *Haemophilus influenzae*. *Journal of Infectious Diseases*, **165**, S118-S119.