

# 病原检测规范化有利于遏制细菌耐药性发展

张秀珍

(卫生部北京医院检验科, 北京 100073)

**关键词:** 病原检测; 规范化; 遏制细菌耐药性

由于细菌学报告不能即时获取, 经验用药已成为医生主要的用药方式, 而临床经验性选择有效的抗菌药物依赖于本地区正确的病原细菌的检测及细菌耐药性监测数据。正确的数据来自于标准化的试验方法和规范的操作程序。不规范的操作所获得的错误结果只能误导用药, 加速细菌耐药性发展, 增加医疗风险, 因此加强病原微生物实验室规范化建设有利于遏制细菌耐药性发展。下面对至今仍被忽略的 6 个方面做评述。

## 1 临床微生物实验室要建立合格的室内和室间质量控制系统

室内质量控制是室间质量控制的基础, 而室间质量控制是对室内质量控制的验证。质量控制是临床微生物实验室的生命, 每一位临床微生物工作者必须认真执行, 临床微生物实验室开展质量控制已 20 余年, 但实验室的自觉质量控制还做得很不够。在新发感染性疾病 (emerging infectious disease) 不断发生的形势下, 临床微

生物室的检验质量保证尤其重要, 现从 5 个方面谈临床微生物室的质量控制问题。

### 1.1 建立标本接种前的质量控制制度

没有高质量的标本, 实验室采取任何先进的分离、鉴定和药物敏感性技术都是无济于事的。建议成立由医生、护士和微生物室参与的监督责任程序, 对不同的标本规定不同的接种时间范围, 如痰标本应规定在留取标本后 1 h 内送至实验室, 微生物室应在收到标本后 30 min 内接种完毕; 粪便标本应采集后立即接种; 血液标本种入培养血瓶后立即送检或于室温下保存, 切不能放冰箱; 尿标本应于 2 h 内送实验室, 实验室收到标本后应于 30 min 内接种完毕; 拭子标本采集后应全部采用输送培养基送到实验室检查。

### 1.2 建立细菌分离率质量控制系统

呼吸道标本或可能含嗜血杆菌的标本一定要接种巧克力培养基; 含 5% 脱纤维绵羊血琼脂; 采用 5% ~ 10% 的 CO<sub>2</sub> 培养系统; 培养周期 24 ~ 72 h。考察指标: 嗜血杆菌属在常规送检标本中的分离率应

不低于 30% ~ 50%; 肺炎链球菌的分离率不低于 5% ~ 10%; 卡他莫拉菌的分离率不低于 2% ~ 5%。如果在 1 周中未分离出上述苛养菌, 应认真查找原因。

### 1.3 药物敏感性质量控制系统的规范化

质量控制的抗菌药物种类应包括全部常用的抗菌药物; 正确选择质量控制菌株, 如金黄色葡萄球菌 (ATCC 25923) 用于纸片法药物敏感性的质量控制, 而金黄色葡萄球菌 (ATCC 29213) 用于稀释法药物敏感性的质量控制; 建立 3 种系统药物敏感性质量控制: 30 d 初始质量控制, 在 30 d 内失控不超过 3 次时可进入 1 周质量控制; 如失控超过 3 次应进入 5 d 的纠控系统, 经 5 d 纠控, 合格后方可进入 1 周质量控制; 1 周质量控制是维持日常质量制控的形式, 一旦失控应进入纠控系统, 按纠控规则处理<sup>[1]</sup>。

### 1.4 鉴定质量控制系统

鉴定质量控制系统包括自动化设备鉴定系统、商品鉴定系统, 如 API、单一的生化反应管及原材料, 原则上每换批号时都要有质量控制, 这也称为批批检。特别容易被忽略的是羊血的质量, 如羊血中是否含抑制细菌生长的物质; 水解酪蛋白胨 (MH) 琼脂中胸腺嘧啶含量。可通过平皿抑制试验观察, 在涂有细菌的平皿上不同方位滴入羊血数滴, 35℃ 培养过夜观察结果。要求在滴有羊血的部位不出现抑菌环; 用粪肠球菌 (ATCC 29212) 或粪肠球菌 (ATCC 33186) 质量控制菌株测试 MH 琼脂上氨苄西林的抑菌环, 若产生 20 mm 或

更大的抑菌环, 表示合格<sup>[1]</sup>。

### 1.5 质量控制记录

质量控制记录要真实, 要有失控 (超过质量控制允许范围的结果称为失控), 记录中应包括失控原因和解决问题后的结果。

## 2 药物敏感性试验规范

### 2.1 建立合理的常规药物敏感性种类

不同抗菌药物的抗菌谱不同、抗菌强度不同、细菌耐药谱不同, 对不同的病原菌建立正确的常规药物敏感性种类是非常必要的, 错误的药物敏感性种类的报告会误导医生, 按美国临床实验室标准化协会 (CLSI) 要求, 结合本单位用药习惯建立药物敏感性试验的种类<sup>[1]</sup>。

### 2.2 MH 琼脂定量

在琼脂扩散法药物敏感性试验中, MH 琼脂厚度是严重影响纸片药物敏感性试验结果的重要因素, 琼脂培养基越厚抑菌环直径越小, 反之则越大, 克服的办法是在保持水平的平台上 (水平仪) 定量倾注培养基。这个问题至今未被充分重视。

### 2.3 抗菌药物纸片贮藏

纸片失效是造成药物敏感性结果错误的最重要的原因, 必须在 -20℃ 或更低温度的低温冰箱中保存纸片, 近期使用的纸片只需放 4℃ 冰箱, 1 周后弃取, 更换新纸片。

### 2.4 特殊菌药物敏感性试验规范化<sup>[1]</sup>

2.4.1 万古霉素中介菌株的报告 中介肠球菌药物敏感性试验应用含 6 mg/L 万古霉

素的琼脂, 点种 0.5 麦氏单位菌液, 35℃ 培养 18 ~ 24 h, 点种菌生长者示为耐药, 不生长者示为敏感。葡萄球菌对万古霉素中介(中度敏感)时, 应再进行其最低抑菌浓度(MIC)的确定。

**2.4.2 葡萄球菌苯唑西林中介株** 用含 4% NaCl 和含 6 mg/L 苯唑西林的琼脂, 点种 0.5 麦氏单位的待测菌液, 置 35℃ 培养 24 h, 生长者为耐药株, 不生长者为敏感株。

**2.4.3 克林霉素报告** 必须在“D”试验的基础上, “D”试验是在琼脂或血琼脂平皿上均匀涂被测试菌, 稍后在相距 15 ~ 26 mm 处分别贴 15 μg/片的红霉素纸片和 2 μg 的克林霉素纸片, 培养 18 ~ 24 h 后, 在克林霉素侧出现切痕为“D”试验阳性, 应报告克林霉素耐药, 无切痕可报告敏感。

**2.4.4 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)** 用头孢西丁纸片代替苯唑西林纸片, 试验结果仍应报告为苯唑西林敏感或耐药。

### 3 危重患者药物敏感性试验报告制度

对危重患者的细菌报告应与常规细菌报告有所区别, 血液及体液分离菌, 尤其在血液、脑脊液、胆汁和胸腹水标本中出现有细菌时应认为是危重的表现。

#### 3.1 危重患者的3级报告程序

第 1 级报告是指培养一旦指示阳性时做出的报告, 由于标本中细菌浓度不同, 出现的时间也不同。报告内容主要是直接细菌涂片结果, 同时直接用阳性肉汤做初

步药物敏感性试验; 第 2 级报告是在第 1 级报告后的 18 ~ 24 h, 报告初步药物敏感性试验结果, 并用分离出的单个菌落做正式鉴定和药物敏感性试验; 第 3 级报告常在第 1 级报告后的 36 ~ 48 h、在第 2 级报告后的 18 ~ 24 h, 报告内容包括正式鉴定和药物敏感性试验结果。

#### 3.2 及时与临床医生沟通

在获得初步药物敏感性试验结果后应及时与主管医生沟通, 建议补充或纠正错误的治疗方案。如果主管医生不能接到报告, 可由相关人员记录结果, 并要记录其姓名, 要求其尽早做出合理的处理。

## 4 血液培养的规范化<sup>[2]</sup>

#### 4.1 采血量

血液或其他体液标本与肉汤比例应是 1:5 ~ 1:10, 血液量太多可能会减低病原菌检测的阳性率, 太少比例的肉汤培养基不足以对血液中可能存在的抑制因子进行稀释, 从而影响病原菌检测的阳性率。

#### 4.2 采血次数和时间

菌血症: 立即在不同部位采血 2 ~ 3 份, 快速培养; 不明原因发热患者: 24 h 内自不同部位采血 2 ~ 3 份; 感染性心内膜炎: 1 ~ 2 h 内不同部位采血 3 份, 如 24 h 培养结果阴性再重新采 3 份血做培养。采血时机: 宜在患者发生寒战时采血, 或在寒战后立即采血, 因为细菌会在 1 h 内被杀死<sup>[2]</sup>。虽然上述方法在我国实行会有困难, 但可根据中国实际条件做适当修改, 如每次采集需氧和厌氧 2 瓶血标本、尽可

能在不同部位采血 2 ~ 6 瓶或适当增加采血的次数等, 不要认为 1 次培养阴性就可排除血液感染。

#### 4.3 报告

分 3 级报告, 第 1 级报告阳性肉汤直接细菌涂片结果, 并用阳性肉汤做初步药物敏感性试验; 第 2 级报告初步药物敏感性试验结果, 并将分离的单个菌落做正规的鉴定和药物敏感性试验; 第 3 级报告是正规鉴定和药物敏感性试验结果。

**4.3.1 非致病菌的报告** 如凝固酶阴性葡萄球菌、棒状杆菌、曲霉、毛霉菌等是否报告? 如何报告? 出现阳性的时间可作为致病菌或污染菌判断的参考, 24 h 在 2 个培养瓶出现阳性结果并是同样细菌, 应进行鉴定和药物敏感性试验并报告临床医生。如在 72 h 后出现的阳性结果, 应了解病情后再对培养所得细菌是病原菌或污染菌做出判断。

**4.3.2 未知微生物的报告** 对不常见病原菌不要放弃鉴定, 应按科属种原则做出初步鉴定, 用国际公认的标准方法做复检, 同时求助于本地区的临床检验中心实验室或国家疾病预防控制中心以便及早获得鉴定结果。在未做出鉴定前首先应尽可能确认是致病菌还是污染菌, 并用稀释法进行药物敏感性试验, 供临床医生参考。

### 5 真菌检测的规范化<sup>[1,3]</sup>

低免疫人群的增长、超广谱抗菌药物的广泛应用使侵袭性真菌感染迅速增加, 侵袭性念珠菌及曲霉感染使重症监护病房 (ICU) 患者的病死率明显上升, 50% 的病

例不能获得细菌学的阳性结果, 因此加强真菌检测的规范化操作, 提高检测阳性率及药物敏感性试验的正确率十分必要。

#### 5.1 真菌涂片的规范化

涂片一定要检测菌丝。对痰及口腔标本要进行定量 (菌落计数) 或半定量 (用加号表示, 在分区划线的 3 个区都丰富生长报告为 +++, 依次类推 2 个区生长为 ++, 1 个区生长为 +)。分级涂片报告: 如对无菌标本发现真菌作为 1 级报告, 对非无菌标本中真菌占 50% ~ 70% 以上时应作为 2 级报告, 非无菌标本真菌占 30% ~ 50% 应作为 3 级报告, 1 级报告提示对诊断侵袭性真菌感染的参考意义最大, 依次 2 级和 3 级减小。组织标本涂片要粉碎后涂片, 研磨会把菌丝的结构破坏, 在标本量许可的前提下涂片不应少于 3 张。

#### 5.2 真菌鉴定的规范化

由于不同种类真菌对抗真菌药物的敏感性不同, 应报告真菌到种的水平或治疗有意义的不同类真菌加以初步分类, 如区分毛霉和曲霉、白念珠菌和非白念珠菌等。即不能轻易把痰标本分离的真菌作为致病真菌, 也不要对不常见的真菌因为不认识轻易作为污染菌报告。对酵母样真菌已经有较成熟的鉴定方法, 但对丝状真菌的常规鉴定仍然是以培养过程中的形态改变为主要手段。

#### 5.3 真菌药物敏感性试验的规范化

真菌感染不需要常规做药物敏感性试验, 因为抗真菌药物对其抗真菌谱范围内的真菌有很好的预期疗效。对无菌体液分

离的真菌，当需要长期治疗或疗效不能达到预期效果时要做药物敏感性试验。建立稀释法药物敏感性试验，可用于已建立判断标准或还未建立判断标准的任何抗真菌药物。报告 MIC 值有利于决定治疗剂量。正确掌握终点判断标准，氟康唑、伊曲康唑、氟胞嘧啶等药物终点允许有 20% 菌生长，而两性霉素 B 应将无真菌生长作为终点。

#### 5.4 要重视组织标本的培养

组织标本培养结果是诊断侵袭性真菌感染的金标准，实验室要珍惜临床送来的组织标本，首先要告诉临床必须无菌采集组织标本，接种前要无菌粉碎或轻轻研磨，避免破坏菌丝，每一份组织标本必须同时做涂片和培养。

#### 5.5 开展非培养方法的检查试验

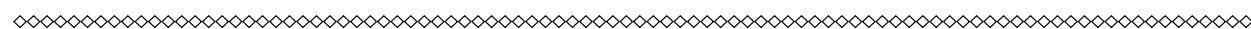
1-3-β-D 葡聚糖检测 (G 试验) 和 / 或半乳甘乳聚糖 (GM 试验)、降钙素原 (PCT) 用于区别真菌或细菌感染。

循证医学的理念逐渐深入广大医生和

患者，细菌学检测也已成为医生诊断的重要依据。正确的检验报告是感染性疾病诊断和治疗的重要参考，反之则可能误导医生。细菌学检验工作者要适应临床需要，在不断提高技术水平的同时首先是树立规范化操作意识，深入临床，了解医生的需要，建立标准化的检验方法和规范的操作程序，为医生提供可信的细菌报告<sup>[4]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility test[S].M100-S20, CLSI, 2010.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Principles and procedures for blood cultures[S]. Approved M47-A, CLSI, 2007.
- [3] Murray PR. Manual of clinical microbiology [M]. 8th ed.Washington: ASM Press, 2003: 1039-1178.
- [4] 王 辉, 陈民钧. 加强临床微生物室在感染性疾病诊治中的作用 [J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(1):2-4.



北京金山川与梅里埃大学技术合作签约仪式