

· 指南与共识 ·

临床微生物学实验室建设基本要求专家共识

马筱玲 胡继红 徐英春 孙自镛 张莉萍 刘文恩 王辉 府伟灵 任健康 戴二黑
 谢鑫友 阿祥仁 魏莲花 许建成 孙长贵 徐修礼 苏建荣 罗燕萍 李敏 顾兵
 吕火焯 苏丹虹 张红梅 徐元宏 刘根焰 胡云建 魏超君 刘瑛 杨滨 孙恩华
 梁宏洁 陶传敏 刘家云 伍勇 倪安平 余方友 胡志东 韩晓旭 闵嵘

微生物可引起个体或群体的感染性疾病,近年来国内外报道的重大公共卫生事件,如超级耐药细菌传播、重症急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndromes, SARS)流行、炭疽杆菌生物恐怖事件、分枝杆菌医院感染等均由微生物所致。临床微生物学检验可鉴定感染的病原菌种类并检测其对抗菌药物的敏感性,在疾病的诊断、治疗和预防控制等方面均具有重要作用^[1]。然而,与其他检验方法不同,微生物学检测有其自身的特殊性和复杂性。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2016.11.006

作者单位:230001 合肥,安徽省立医院检验科(马筱玲);北京医院国家老年医学中心 国家卫生计生委临床检验中心微生物室(胡继红);中国医学科学院北京协和医学院检验科(徐英春);华中科技大学同济医学院附属同济医院检验科(孙自镛);重庆医科大学附属第一医院检验科(张莉萍);中南大学湘雅医院检验科(刘文恩);北京大学人民医院检验科(王辉);第三军医大学第一附属医院检验科(府伟灵);广州金域医学检验中心(任健康);石家庄市第五医院检验科(戴二黑);浙江大学医学院附属邵逸夫医院检验科(谢鑫友);青海省人民医院检验科(阿祥仁);甘肃省人民医院临床检验中心(魏莲花);吉林大学白求恩第一医院检验科(许建成);解放军第一一七医院检验科(孙长贵);第四军医大学西京医院检验科(徐修礼);首都医科大学附属北京友谊医院检验中心(苏建荣);解放军总医院微生物科(罗燕萍);上海交通大学医学院附属仁济医院检验科(李敏);徐州医科大学附属医院检验科(顾兵);浙江省人民医院检验科(吕火焯);广州医科大学附属第一医院检验科(苏丹虹);石河子大学医学院第一附属医院检验科(张红梅);安徽医科大学附属第一医院检验科(徐元宏);南京医科大学第一附属医院检验学部(刘根焰);北京医院检验科(胡云建);甘肃省人民医院检验科(魏超君);上海交通大学医学院附属新华医院检验科(刘瑛);福建医科大学附属第一医院检验科(杨滨);山东大学齐鲁医院检验科(孙恩华);广西医科大学第一附属医院检验科(梁宏洁);四川大学华西医院实验医学科(陶传敏);第四军医大学西京医院检验科(刘家云);中南大学湘雅三医院检验科(伍勇);中国医学科学院北京协和医学院检验科(倪安平);温州医科大学附属第一医院检验科(余方友);天津医科大学总医院医学检验科(胡志东);中国医科大学附属第一医院检验科(韩晓旭);首都医科大学宣武医院检验科(闵嵘)

通信作者:马筱玲,电子邮箱:xiaolingma@126.com

第一,检测的对象大多是活的微生物,离体后容易死亡,标本需要及时处理;第二,标本中的病原微生物是未知的,具有传染性,存在生物安全隐患^[2];第三,引起人类感染的微生物种类繁多,检测方法复杂,对检测人员的技术水平要求较高。

目前我国基层实验室存在仪器设备简单陈旧,检验质量缺乏保证,操作程序不规范,操作人员没有受过正规培训等问题^[3]。微生物学检验是临床检验中的“短板”,一些二级医院尚未建立微生物实验室或不能开展必要的检验项目。为了规范临床微生物学实验室硬件和软件建设,中华医学会检验分会微生物学组委员和国家卫计委临床检验中心专家共同讨论制定了本共识。

一、环境和设备

(一)实验室面积和环境

临床微生物实验室(以下简称微生物室)应有足够的空间进行试验操作和结果报告^[4]。根据我国目前的现状,大多数微生物室仅从事细菌培养、鉴定和药敏试验,建议二级医院使用面积最好不低于 60 m²,三级医院不低于 160 m²(如果同时开展感染性免疫检验,则面积相应扩大)。设置防虫纱窗和门禁,并按检测功能进行相对分区,如分为标本处理、涂片镜检、分离培养、鉴定/药敏、培养基制备和结果报告等区域。三级医院应有独立的分枝杆菌和真菌检测室。实验室内要有充足的照明,宜有适当的给排水管道、良好的通风设施和完善的信息管理系统。

(二)仪器和设备

1. 二级医院微生物室必备的仪器设备有:生物安全柜、高压消毒灭菌器、紫外灯、试剂冰箱、低温冰箱、普通培养箱(至少 2 个温度)、显微镜、比浊计、烛缸、离心机等。有条件或标本量较多的医院应配备血培养仪、半自动/全自动微生物分析仪。

2. 三级医院微生物室必须增加配备的仪器设

备有:血培养仪、自动微生物分析仪、浊度仪、CO₂ 培养箱、细胞离心机、荧光显微镜等。

根据标本量和所开展的检验项目,有条件的微生物室可配备(但不限于):自动染片机、标本自动接种仪、基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱仪、基因诊断平台(包括扩增仪、测序仪等)、冷冻干燥机、化学发光仪、酶标仪、洗板机等设备。

二、人员资质

根据我国目前的现状,二级医院微生物室至少有固定人员 2~3 人,建议 5 人及以上,其中实验室负责人至少为中级技术职称,有临床医学或检验医学专业学习背景,并有在三级医院微生物室进修 6 个月以上的经历和 3 年以上临床微生物工作经验,有持续学习的热情和能力,且每 2 年至少外出学习或进修培训 1 次。

三级医院微生物室至少有固定人员 6~8 人,建议 10 人及以上,其中实验室负责人至少为副高技术职称,有临床医学或检验医学专业本科或以上学历,有 5 年以上临床微生物工作经验,并有持续学习的热情和能力,且每年至少外出学习或进修培训 1 次。

进入微生物实验室工作的人员应经过专业技术、医院感染知识和生物安全培训。有颜色视觉障碍的人员不应从事涉及辨色的微生物学检验^[5]。从事特殊岗位检验,如性病、HIV、结核菌和基因扩增检验的人员应通过相应的岗位培训,并具有上岗资格证^[5]。

微生物室专业组长应对新入岗人员进行培训,并定期(至少每 6 个月 1 次)对在岗人员进行评估考核。对由多个人员进行的手工检验项目(如显微镜检查、培养结果判读、抑菌圈测量、结果报告等)应进行人员比对。

三、检验技术

(一)二级医院必备技术

重点要求能够通过染色镜检和分离培养等技术及时发现标本中所存在的病原菌。

1. 染色镜检:能够进行革兰染色、抗酸染色、墨汁染色和乳酸棉酚兰染色等,并识别常见病原菌。

2. 细菌培养:能够采用手工方法或血培养仪对血液及无菌体液进行增菌培养。能够根据需要对各类标本进行普通细菌培养、苛氧菌培养(可使用烛缸)、厌氧菌(可使用厌氧袋或厌氧罐)和真菌培养。

3. 细菌鉴定:可采用全自动、半自动或手工方法(如编码方法)对临床常见的需氧菌、兼性厌氧菌、苛氧菌和酵母菌鉴定到种或属的水平;对于厌氧

菌可仅报告革兰染色性和细菌形态。

4. 药敏试验:能够对临床常见细菌进行规范化的药敏试验,并报告敏感/中介/耐药结果。

5. 免疫学检测:根据临床需要和科室工作安排,可进行病原菌抗原或抗体检测(如肝炎病毒抗原抗体检测)。

(二)三级医院必备技术(在二级医院基础上)

1. 染色镜检:能开展六胺银染色、免疫荧光染色和其他特殊染色。

2. 细菌鉴定:能够将分离的细菌(包括分枝杆菌、常见丝状真菌、厌氧菌)鉴定到种或属水平。

3. 药敏试验:能够开展苛氧菌、厌氧菌和酵母菌的药敏试验。

4. 非培养诊断技术:根据临床需求可使用 PCR、基因测序、芯片、质谱等技术进行病原菌鉴定/分型/耐药性检测和同源性分析。可开展病原体血清免疫学检测、降钙素原、真菌-(1,3)- β -D-葡聚糖检测、真菌半乳甘露聚糖检测、结核 T 细胞斑点试验等项目。

四、质量和服务

(一)检验前程序

1. 检验申请单的设计和应用:由于微生物学检验的特殊性,所以检验申请单除常规信息外还应包括:标本采集方法(如中段尿、导尿、膀胱穿刺尿等)、采集部位、采集时间、采集前是否已使用抗菌药物、临床拟诊感染类型和(或)可疑目标菌等信息^[4]。

2. 标本采集的指导和培训:通过编写《微生物标本采集手册》(供医护人员使用)、《痰、尿、便标本采集和送检须知》(供患者使用),配合多媒体及视频宣传等多种形式进行标本采集方法指导和培训,提高有价值的标本(如血液和无菌体液)以及合格标本的送检率,对不合格标本应及时反馈,并根据需要进行沟通和再培训。

3. 标本运送:(1)所有标本均应视为有潜在生物危险,运送过程中应防止溢出;(2)应根据标本中的疑似病原菌选择适宜的运送培养基和保温措施;(3)所有标本均应尽快运送(在 2 h 内),特殊标本(如厌氧培养标本、脑脊液标本)应立即运送。

4. 标本验收:除常规的验收程序以外,应重点关注:(1)送检标本的容器是否为无菌、封闭、无泄漏;(2)标本类型是否与申请项目相符合(如痰液标本申请项目为厌氧培养,则为不合格);(3)肉眼观察标本性质是否合格(如送检的拭子已干燥,送检

的痰标本为唾液等为不合格);(4)标本送检时间是否已超过允许范围。对不合格的标本应及时进行登记和反馈。

(二) 检验程序

1. 染色镜检:(1)能够根据检验申请、标本类型及可疑的病原菌种类选择正确的染色方法(如怀疑隐球菌性脑膜炎,选择墨汁染色)。(2)对痰标本应进行涂片革兰染色,判断标本质量,观察细菌分布。(3)至少每周用已知的阳性和阴性质控菌株进行 1 次质控(若检测频率小于每周 1 次,则在实验当日进行质控)^[5]。

2. 细菌分离培养:(1)能够根据检验申请信息、标本类型及可疑的病原菌选择正确的培养基和培养条件(如培养温度、气体环境和培养时间)。(2)每一批培养基(包括自制或购买)均应进行质量和性能验证(无菌试验、生长试验、必要时做生长抑制试验和生化反应)。记录培养基制备过程(仅对自制培养基)、生产日期、有效期、外观和性能验证结果。应在有效期内使用^[4]。(3)能正确判别各类标本在培养基上生长的有意义的结果。(4)需要定量培养的标本(如尿液、肺泡灌洗液)应按要求接种,并进行菌落计数。

3. 细菌鉴定:(1)能根据细菌菌落形态和涂片染色结果选择适当的鉴定试验项目,并采用适宜的方法将细菌鉴定到种。(2)对细菌鉴定所需要使用的血浆凝固酶、触酶、氧化酶试验及诊断性抗血清等至少应在每个实验当日做阳性和阴性质控^[5]。(3)对细菌鉴定所需的其他生化反应试剂至少应在每一批次产品使用前做阴性和阳性质控,并在有效期内使用^[4]。

4. 药敏试验:(1)能根据本单位条件及所检测的病原菌种类选择纸片扩散法、稀释法、浓度梯度扩散法(E 试验)或自动化仪器法进行抗菌药物敏感性试验。(2)试验过程应遵循标准化操作方法或制造商建议进行操作。(3)药物敏感性试验结果解释至少应遵循上一年度 CLSI 药敏试验的判断标准^[5]。(4)使用自动化仪器进行药敏试验的实验室应按制造商的要求进行质控。(5)应定期(至少每 1~2 年 1 次)使用最新的 CLSI 文件标准对仪器的药敏试验判断折点进行评估,仅报告符合文件标准的抗菌药物药敏试验结果,对评估不符合要求(如药物稀释度不包括药敏判断折点、折点设置错误、检测结果偏离)的仪器应暂停使用,并与仪器供应商沟通。(6)使用纸片扩散法进行药敏试验的实验室应按要求对

每一批号的药敏试验纸片进行质控,如果质控在控,则改为每周质控 1 次(若检测频率小于每周 1 次,则应在每个检测日进行质控)^[4]。

(三) 检验后程序

能够对各类标本染色镜检和细菌培养鉴定结果进行及时准确的报告,并能进行结果解释,以及与临床进行良好的沟通。有检验医师的微生物室,可发出“临床微生物检验诊断报告”^[6]。

对各类标本培养阴性结果应进行规范报告:如血液增菌培养报告“培养 5 d 无菌生长”;脓液、引流液、脑脊液、穿刺液等培养报告“培养 ×× 小时无菌生长”;咽拭子、痰液等报告“正常菌群生长”或“未分离出致病菌”;粪便或肛拭子等报告“未培养出志贺菌、沙门菌”或“未培养出霍乱弧菌”等。

血液、脑脊液、骨髓等无菌体液标本检出细菌(镜检或培养)应分级报告,并按危急值报告和登记。

当鉴定出高致病性病原微生物(如布鲁菌、弗朗西斯菌)时,应按相关法规要求进行上报和处理。

短时间(5~7 d)内在同一科室分离出 3 株或以上同种病原菌,或某种耐药菌分离率异常增高时报告医院感染管理部门。

对药敏试验结果应按规定进行审核和报告,应特别关注天然耐药、罕见耐药菌株和特殊部位分离的病原菌药敏试验结果的审核和报告^[7-8]。

对医院感染管理规定监测的多重耐药菌要进行报告和预警。

应定期(至少每年 1~2 次)对抗菌药物敏感性试验结果进行统计分析,并向医院感染部门和临床医师通报。

应参加全国或地区性的耐药监测。

(四) 仪器设备质量控制和性能验证

对冰箱、培养箱和水浴箱至少每日观察并记录 1 次温度;CO₂ 培养箱应每日记录 CO₂ 浓度;紫外灯应每日记录消毒时间^[4],应定期(每 6 个月)监测紫外线强度并监测紫外灯消毒的效果。

压力灭菌器应每次使用化学指示剂,每周使用生物指示剂监测灭菌效果。

细菌浊度仪至少每 6 个月应进行检定或校准 1 次。

生物安全柜的高效过滤器、气流和负压等参数,压力灭菌器的压力表以及卡尺、温度计、湿度计、移液器的准确性应定期验证、检定或校准^[4]。

(五) 能力验证

按要求参加相应的能力验证/室间质评。

应对“不满意”和“不合格”的能力验证/室间质评结果进行分析并采取纠正和预防措施。

对没有开展能力验证/室间质评的项目,应至少每 6 个月与其他实验室(或其他试验方法)进行 1 次性能比对评估试验。

五、生物安全

临床微生物室属于二级生物安全实验室,应按照国家法规要求进行实验室设计和管理^[2,4]。

临床微生物室应定期(至少每年一次)进行生物安全风险评估^[2]。

应根据风险评估结果配备必要的生物安全防护设备,如生物安全柜、高压消毒灭菌器、紫外灯、应急灯、洗眼和喷淋设施。根据所配备的生物防护设施 and 个体防护能力明确规定本实验室所能开展的检验项目^[2,9]。

应根据风险评估结果对检验人员进行生物安全防护教育,并配备个人防护装备和用品(如手套、口罩、帽子、实验用鞋、防护服、防护眼罩等)^[2,9]。

二级医院不建议保存菌种(质控菌株和需要进一步确认的临床菌株除外),三级医院可以保存非高致病性病原微生物菌种,但应指定专人负责,应有存储、使用、转运、销毁记录,谨防滥用、误用^[2]。实验中如遇到疑似高致病性菌(按照《人间传染的病原微生物名录》)^[10],应立即向上级汇报,不要再进行后续的试验和标本处理。

对超过规定保存时间的标本和培养物应高压灭

菌后再交保洁人员进行处理,并进行交接记录。

针对在试验过程中可能产生的生物安全意外事故(如针刺伤、皮肤、黏膜或环境污染)应有相应的应急预案和事故记录。

参 考 文 献

- [1] 丛玉隆,尹一兵,陈瑜. 检验医学高级教程[M]. 北京:人民军医出版社,2010.
- [2] 祁国明. 病原微生物实验室生物安全[M]. 北京:人民卫生出版社,2005.
- [3] 尚红,崔巍,张曼,等. 中国 31 个省市自治区部分县乡医院检验人员技术能力培训的实践[J]. 中华医学杂志, 2015, 95(36): 2943-2946. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0376-2491. 2015. 36. 012.
- [4] 尚红,王毓三,申子瑜,等. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2015.
- [5] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL42: 2012 医学实验室质量和能力认可准则在临床微生物检验领域的应用说明[S]. 2012-9-13.
- [6] 中国医师协会检验医师分会感染性疾病检验医学专家委员会. 临床微生物检验诊断报告模式专家共识[J]. 中华医学杂志, 2016, 96(12): 937-939. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0376-2491. 2016. 12. 006.
- [7] 王辉,宁永忠,陈宏斌,等. 常见细菌药物敏感性试验报告规范中国专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(1): 18-22. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1009-9158. 2016. 01. 006.
- [8] 马筱玲,鲁怀伟,张艳. 认识细菌的天然耐药和获得性耐药[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(8): 762-763. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1009-9158. 2012. 08. 025.
- [9] 周庭银,倪语星,胡继红,等. 临床微生物检验标准化操作[M]. 3 版. 上海:上海技术出版社,2015.
- [10] 中华人民共和国卫生部. 人间传染的病原微生物名录[S]. 2006-4-11.

(收稿日期:2016-04-04)

(本文编辑:武昱)

· 学界与业内新动态 ·

第一届上海肿瘤检验学术交流大会召开

由上海市抗癌协会检验医学专业委员会与复旦大学附属肿瘤医院共同主办的第一届上海肿瘤检验学术交流大会于 2016 年 10 月 19 至 21 日在上海市成功召开。

上海市抗癌协会检验医学委员会主任委员郭林教授发表欢迎致辞。上海市卫计委科研处张勤处长、上海市抗癌协会理事长叶定伟教授、中华医学会检验医学分会主任委员潘柏申教授、上海市医学会检验分会主任委员李莉教授出席会议并致辞。

会议邀请了众多国内外知名专家,包括来自临床、基础研究和检验领域的复旦大学附属华山医院钦伦秀教授、复旦大学附属肿瘤医院虞先濬教授、第二军医大学附属东方肝胆

外科医院程树群教授、同济大学高华研究员、上海交通大学糜军研究员等,共同探讨肿瘤研究的热点问题;美国康奈尔大学罗丹教授的“玩转 DNA”创意新颖;美国哈佛医学院 Masood Shammis 研究员在基因组不稳定中研究成果,为攻克肿瘤提供新视野;美国 Broad 研究所朱平教授关于肿瘤靶向治疗新分子的发现及机制,令人耳目一新。同时,大会也设立青年论坛,为年轻学者提供思想碰撞的良机。

与会专家一致认为,随着肿瘤新分子、新靶点的不断涌现以及不断深入的新标志物转化研究,将为恶性肿瘤的早期诊断和个体化治疗提供依据。

上海市抗癌协会检验医学专业委员会