

# 临床微生物实验室的质量控制

魏衍超

临床微生物检验,在感染性疾病及相关病患的诊断治疗预防及研究工作中起着越来越重要的作用,为了保障检验结果的准确性和可靠性,日常工作中要注意开展质量控制,包括室间质量控制和室内质量控制。

室间质量控制是各地实验室之间进行质量控制的一种方式,也是上一级实验室对各实验室进行质量管理的手段。参加由各省临床检验中心或卫生部临床检验中心组织的室间质控,会遇见一些平时罕见或未见过的菌株,通过质控检验对它们的生长条件、菌落形态、染色、镜下形态等有了较深的感性认识。日后工作中倘若再遇见这些菌将不再会漏检。

室间质控建立在一个较好的室内质控的基础上的,做好室内质控直接关系到日常检验工作的质量。室内质控主要包括几个方面:实验室前的质量控制、标本接种前的质量控制、培养基的质量控制、染色液及染色方法质量控制、常用仪器的质量控制、药敏实验的质量控制、及发报告前的质量控制。

要想获得可靠的检验结果,首先要取得一份合格的标本,所以实验室前的质量控制是保障检验结果准确性的关键。包括标本采集时间(时机)、采集方法与运送等。采集时间一般应在发病早期,应用抗生素前或下次用药前(血药浓度相对较低)。呼吸道标本的采集要尽量减少上呼吸道正常菌群干扰,如采集晨痰、随意痰要用清水漱口2~3次后深呼吸用力咳出气管内之痰块直接吐于无菌器皿内,迅速盖上器皿盖、送检。注意收集浓痰或粘稠液而非唾液。咽拭子、湿润无菌生理盐水、湿润无菌拭子,越过舌根到达咽后壁或悬雍垂后侧或咽喉部发红、灰白色可疑假膜部位,反复涂抹数次后小心退出,随即置于无菌试管内塞紧塞子送检。拭子退出时注意避免接触口腔黏膜、舌头等部位。泌尿道标本的采集要尽量避免或减少尿道口正常菌群干扰。采集中段尿,无论男性、女性、儿童病人都应先冲洗尿道口,弃去开始排出的尿液,

留取中段尿4~6毫升于无菌试管内塞紧塞子,尽快送检。尿量不宜太多,试管塞子与尿液不应直接接触。留取导尿管尿要排空导尿管内陈旧尿液,接取新引出尿液4~6毫升。倘留置尿管超过三天,尿管内难免有细菌滋生,应避免采用。血液标本的采集要严格采血部位的皮肤消毒及选择恰当采血时机,最新一期中华检验医学杂志(2004年第2期)有详细介绍,本文从略。粪便标本的采集要挑取含脓、黏液、血等病理改变或水样粪便送检。直肠拭子采样量要足够,拭子上肉眼应可见粪便。脓液标本要尽量避免病灶表面细菌污染。开放性脓肿,采样前无菌盐水冲洗伤口,拭去表面污染脓液,挑取病灶深部脓液;封闭性脓液,严格病灶皮肤或黏膜表面的消毒后无菌干燥注射器穿刺抽取,置无菌试管内送检,或切开排脓时无菌拭子采集深部脓液。当创面出血、或受伤12小时、换药2小时内等情况不宜采集标本。为了采集到各种比较合格的临床标本,实验室人员平时须与临床医生、护士、多些沟通;与护理部联系进行有关讲座,让护士们清楚各种标本如何留取;或制作一些正确留取标本的指南、便条、打印好,分发给临床。

各种临床标本送到实验室后,大致检查其是否合格,很有必要。这就是标本接种前质量控制。对呼吸道标本要了解其受正常口腔菌污染或影响程度。具体做法一是记录标本外观:分为脓痰(P)、粘液(M)、血(B)、唾液(S)、水样(W)五个级别,以P、M、B级别适合细菌培养;二是涂片镜检:无菌拭子挑取少量痰块于洁净玻片,直接镜检或革兰染色后镜检。低倍镜记录白细胞、上皮细胞数量,倘白细胞>25个、上皮细胞<10个,或白细胞>>上皮细胞数,视为合格的标本;油镜检查有否革兰氏阳性、阴性细菌及数量多寡,倘有特征性表现,可先电话报告临床。对泌尿道标本要了解尿液中各种细胞数,初步判断有否尿路感染。具体做法取尿沉渣直接镜检,低倍镜,平均5视野,记录白细胞、红细胞、上皮细胞及管型等数量,记录于检验单背后,对血液细菌培养标本,要记录采血量是否足够,即血量与增菌液量之比是否

达到 1: 5-10。对粪便标本肉眼检查是否有脓液、血液、黏液等病理改变的粪便或肛拭子上有否足够的标本。

培养基质量控制包括 3 方面。一是原料选择：基础培养基一定挑选优质品牌，如梅里埃产品，Oxoid 等；二是配制方法，每次配制均按实验操作手册的方法与分量，记录配制量与操作者、日期，并于包装上标明使用期限。三是质量检查，用特定菌株接种看其长势是否符合规定，如巧克力平板接种流感嗜血杆菌；血平板接种  $\beta$  溶血链球菌和  $\gamma$  溶血链球菌；SS 平板接种痢疾杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌。以保证各种培养基能培养分离出相应的致病菌，提高分离率。

染色液及染色方法质量控制。染色液的配置必须按标准方法与分量，过滤后使用，每次记录配置量与操作者。还要进行染色步骤质控。如革兰染色在一张玻片上同时涂有金葡菌和大肠杆菌；抗酸染色同时加入一张分枝杆菌的涂片，等等。以保证染色性判断准确无误。

常用仪器质量控制包括对冰箱、二氧化碳孵箱、普通孵箱、水浴箱等基本设备的每日温度、气体浓度的监控记录；细菌鉴定仪、血培养仪等仪器的使用、保养、维修记录。以保障实验室各种设备、仪器的正常运转。可在基本设备的箱壁贴上一张记录表，每月或两月一表。每日上班打开设备前先观测记录，倘有超出规定范围马上找原因，及时纠正。在仪器的旁边置一记录本，每次使用、保养、维修都要记下来，发生故障于寻找原因。使用细菌鉴定仪要注意维持比色的清洁，不要在比色板上方添加试剂；取、放鉴定条要小心，以免打翻溢出；比色完毕即将比色板送入机体内。定期请工程师校对比色、比浊系统，也可用标准菌株作质控对照，使用 ATB 细菌鉴定仪的实验室为了保证鉴定结果准确，可在仪器自动鉴定，后用肉眼，再核对一次。目测看看鉴定板上 20~32 个生化反应的判断是否妥当。比如肺炎克雷伯菌与阴沟肠杆菌、产气肠杆菌在 ID32E 鉴定条上第 3~10 组的生化反应结果多半是相同的，区别主要在第 1、2、11 组，所有我们要特别留意这 3 组生化反应的判断。肺炎克雷伯菌第一组的赖氨酸阳性、鸟氨酸、精氨酸阴性，第二组的尿素酶阳性；阴沟肠杆菌鸟氨酸、精氨酸阳性，赖氨酸、尿素酶阴性；产气肠杆菌则鸟氨酸、赖氨酸阳性、精氨酸、尿素酶阴性、且第 11 组的 Aspa 阳性；所以鸟、精、赖、尿素及 Aspa 五个关键生化反应的判断一定要准确。

目前我国医院的药敏试验都是依照美国临床实验室标准化委员会 (NCCLS) 所颁发的操作方法和判断标准。要保证药敏实验结果可靠，一定要在每天的操作中严格执行 NCCLS 的要求，如新购 M-H 琼脂要用粪肠球菌 ATCC29212 复方新诺明纸片质控合格后使用；M-H 琼脂的配置除了 PH7.2~7.4；强调平板厚度 4mm，用量筒分装，9 cm 平板倾入 23~25ml，一般 7 日内用完，8℃ 储藏，用前孵箱预温至琼脂表面无水滴；药敏纸片要选购标准含量、质量稳定的产品，储藏于 -20℃ 以下，常用置 4-8℃，用前置室温 1h 后方启用；菌液须调至适宜浊度；标准比浊管储藏室温、暗处。半年更换；把菌液涂布于 M-H 平板时棉拭子上多余菌液要在试管壁挤出，划线涂布 M-H 平板，旋转平板 60 度，重复涂布三次，最后拭子在平板边缘涂布一圈；5~10 分钟后贴药敏纸片，无菌镊子轻压纸片使完全与平板表面接触，9cm 平板贴 6~7 张试纸，两纸片中心距离  $\geq 24$ mm，纸片一旦贴上就不能改变位置，10~15 分钟后倒置 35℃ 普通孵箱培养 16~24 小时；读抑菌圈要用尺子量，以没有明显肉眼可见生长物区域为抑菌圈，一般极细小菌落生长可忽略不计，变形杆菌抑菌圈内迁移生长的薄层菌苔、复方新诺明抑菌圈内轻微生长小于 20% 也可忽略不计。等等。对药敏菌株的选择也有明确要求，符号药敏实验的菌株都应选自原始的琼脂平板，不同菌种的混合物不能在同一药敏平板上进行实验。避免用临床标本直接去做药试，倘直接做了，必须按标准方法重做第二次。此外，每周用 ATCC25923 金葡、25922 大肠及 27853 铜绿三株标准菌株测试相应药敏纸片看其抑菌圈是否落在 NCCLS 规定范围，检查日常药试结果是否可靠的周质控是必不可少的工作。倘有超出规定范围，马上得寻找原因纠正，或恢复每日的标准菌株质控，这时工作量很大但也无别的选择。

最后，发出细菌鉴定与药敏报告填写验单前还要质控，主要指两方面把关：一是肉眼大致对照原始平板上被鉴定的细菌菌落形态与仪器或手工编码鉴定出来的菌种是否相吻合。比如鲍曼不动杆菌由于其氧化酶阴性，常被安排上 ID32 鉴定条进行鉴定，又由于其生化反应不活泼，常被细菌鉴定仪鉴定为铜绿假单胞菌，这时就要复查氧化酶实验和对照原始板看看菌落形态到底相似鲍曼还是铜绿，核实后再填写菌种；又如大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌等常见肠杆菌科菌的菌落既有相似又有区别，在原始平板上对照一以免误报均有必要。此外，对于呼吸道之类与外界相通的标本如被鉴定菌是条件致病菌，也须

再于原始平板上最后检视到底是否为优势菌，是否真的需要或值得鉴定与报告，以免误导临床用药。因为当初作鉴定的决定时可能会因各种细菌的长势未充分表达而把握不准确，需要在发报告前作最后的审核。二是检查药敏结果与菌种是否吻合。即分析药敏结果与鉴定出来的菌种是否一致，有无矛盾。一般来说各种细菌对抗生素的敏感性有一些比较固定的药敏谱，每间医院的分离菌又有一些特定的表现。比如阴沟肠杆菌对头孢西丁多半耐药、肺炎克雷伯菌对氨卞青霉素天然耐药、洋葱伯克霍尔得菌对复方新诺明、氧哌嗪青霉素、氧哌嗪青霉素/他唑巴坦等纸片的抑菌圈多半很大，对丁胺卡那、庆大霉素则多半耐药，又比如本院的大肠埃希菌对环丙沙星的耐药率比本地医院的高些，等等。倘若发现药敏谱与菌种的普遍表现有异常时，就得分析这异常到底是来自于药敏实验差错或鉴定差错，还是源自于这株菌自身产生的

变异或特殊表现。这时就得把原始板与药敏板一起对照比较，看问题到底出自那一环节，弄清楚了再填写验单发报告。在配置有先进细菌鉴定仪的实验室可以通过仪器内设专家系统得到有关鉴定菌与药敏结果的分析与提醒，这是不小的帮助，但原始板的检查只能靠自己，在没有先进细菌仪的医院这最后的把关就更重要，更要靠长年累月的工作经验和高度的责任心。最后的质控是前面所有质控效果的总体表现，也是质控的最终目的：临床微生物实验室发出的检验报告准确、可靠，对临床医生就有较高的诊断、治疗参考价值。

质控，尤其室内质控要做好，最难在于坚持，持之以恒。实验室制定了自己的实验室程序化文件，即操作手册后，就得在日常工作中执行，不要松懈。为了保障检验结果的准确与可靠，我们只有努力。原各位同行一起努力，把我们的质控工作做得更好。