

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 498—2017

细菌性腹泻临床实验室诊断操作指南

Performance guideline for clinical laboratory diagnosis of bacterial diarrhea

2017-01-15 发布

2017-07-01 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会 发布

目 次

前言	III
1 范围	1
2 术语和定义	1
3 标本采集	1
3.1 粪便标本	1
3.2 十二指肠、结肠造口术或回肠造口术的内容物	1
3.3 直肠拭子	2
3.4 注意事项	2
4 标本运送	2
5 标本接收	2
6 标本拒收	2
7 实验室检查	3
7.1 化验单相关信息	3
7.2 标本外观及显微镜下检测	3
7.3 病原菌的培养及鉴定	3
7.4 抗血清凝集试验及艰难梭菌毒素检测	9
7.5 结果报告	9
7.6 质量控制	11
参考文献	14

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准主要起草单位：中国医学科学院北京协和医院、北京医院、首都医科大学附属北京友谊医院。

本标准主要起草人：孙宏莉、徐英春、胡云建、苏建荣、闫东辉。

细菌性腹泻临床实验室诊断操作指南

1 范围

本标准规定了粪便等肠道标本临床微生物学检验的技术要求。

本标准适用于开展粪便等肠道标本细菌培养、鉴定和药敏试验的临床实验室。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

腹泻 *diarrhea*

排便次数明显超过平日习惯的频率,粪质稀薄,水分增加,每日排便量超过 200 g,或含未消化食物、脓血或黏液,常伴有排便急迫感、肛门不适、失禁等症状。腹泻分急性和慢性两类,急性腹泻发病急剧,病程在 2 周~3 周之内;慢性腹泻指病程在 2 个月以上或间歇期在 2 周~4 周内的复发性腹泻。

2.2

感染性腹泻 *infectious diarrhea*

由细菌、病毒、真菌或寄生虫感染引起肠道炎症所致的急性或慢性腹泻。除霍乱、细菌性和阿米巴性痢疾、伤寒和副伤寒以外的感染性腹泻称为狭义上的感染性腹泻,为《中华人民共和国传染病防治法》中规定的丙类传染病。

2.3

细菌性腹泻 *bacterial diarrhea*

各种细菌引起的腹泻。常见病原菌包括沙门菌属某些种、志贺菌属、弯曲菌属、弧菌属、气单胞菌属、耶尔森菌属、致病性大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和艰难梭菌等。

2.4

旅游者腹泻 *traveler's diarrhea*

旅游者去往其他国家或地区发生的腹泻。可由多种病原体引起,其检出率依次为沙门菌属某些种、弧菌属、产肠毒素大肠埃希菌、志贺菌属及病毒。不同地区所发生的旅游者腹泻病原分布也不同,有些腹泻至今原因不明。

3 标本采集

3.1 粪便标本

病人在干燥清洁便盆(避免使用坐式或蹲式马桶)内自然排便,用无菌竹签挑取大便中异常的部分(有黏液、脓液和血液的部分)2 g~3 g;液体粪便取絮状物(2 mL~3 mL),放入无菌便盒中送检。普通细菌培养粪便标本宜放入运送培养基送检。

3.2 十二指肠、结肠造口术或回肠造口术的内容物

用无菌竹签挑取标本中异常的部分(有黏液、脓液和血液的部分)2 g~3 g 放入无菌便盒中送检。

3.3 直肠拭子

对于患有腹泻但暂时没有大便产生的患者、婴幼儿(尤其是监测患有腹泻后溶血性尿毒综合征的婴幼儿),可采用直肠拭子进行检测。直肠活检标本和结肠黏膜也可按粪便标本处理,对于非免疫缺陷患者,后者优于前者。采集方法:用无菌拭子蘸生理盐水湿润,由肛门插入约 6 cm~7 cm,轻轻在直肠内旋动取出大便少许,将拭子插入运输培养基加盖封口送检。

3.4 注意事项

3.4.1 所挑取的粪便不应接触其他部位(如便盆),粪便样本中不应混入尿液及其他异物,采集过程应尽量无菌操作。

3.4.2 不应用厕纸收集粪便。

3.4.3 粪便艰难梭菌培养应用 10 mL 无菌带盖塑料管留取 2/3 量以上尽快送检。

3.4.4 对同一病人在同一天不宜重复送检。

3.4.5 尽可能在抗生素使用之前收集标本。

3.4.6 宜在感染急性期(通常是 5 d~7 d 内)采集标本。

3.4.7 下列腹泻患者应连续 3 d 送检标本:

——社区获得性腹泻(入院前或 72 h 内出现症状)。

——医院腹泻(入院 72 h 后出现症状),且至少有下列情况之一:大于 65 岁并伴有内科疾病、HIV 感染、粒缺(中性粒细胞 $<0.5\times 10^9/\text{mL}$)及疑似院内暴发。

——怀疑肠道感染的非腹泻性表现。

3.4.8 肠炎和发热病人建议做血培养。

3.4.9 伤寒沙门菌感染时骨髓培养检出高于血培养。

4 标本运送

如新鲜粪便不是通过运输培养基送检,标本应在采集后尽快送检,不应超过 2 h;若新鲜粪便是通过运输培养基送检,标本可在冰箱 4 °C 保存(用于艰难梭菌培养的标本除外),24 h 内送到实验室。常用的运输培养基为改良的 Cary-Blair 培养基(适用于保护大多数细菌性病原体)和甘油磷酸盐缓冲液(不适用于弧菌属和弯曲菌属)。

标本标识要求有唯一标识号或条码。

5 标本接收

收到合格标本后要立即培养处理。

6 标本拒收

干燥的拭子、含钡粪便、黄软成形便、干便、明显污染的粪便、一日内重复送检的标本及以寄生虫检测用运输培养基(含固定液)送检的标本不做实验室相关检测,应设法与临床医师联系,可要求重新留取标本,并做好记录,在没有与医师沟通之前标本不应丢弃,仍按实验室标本保存原则存放。

若采集 2 h 后未使用运输培养基运送、以运输培养基送检但 4 °C 保存超过 48 h 或 35 °C 保存超过

24 h 的标本不能送检,应在报告单上标记“样本运送延迟,培养可能出现假阴性”。

7 实验室检查

7.1 化验单相关信息

临床医师应在化验单中标明疑似何种腹泻(如疑似霍乱)及检测何种细菌(如霍乱弧菌),以便实验室技术人员依据临床信息选择合适的培养基和培养方法。

7.2 标本外观及显微镜下检测

7.2.1 外观检测

描述粪便标本的性状,有无黏液、脓性、血性及水样等。

7.2.2 生理盐水湿片镜下检测

观察是否有中性粒细胞、红细胞及其数量;是否有酵母样真菌大量繁殖,是否有真菌丝和假菌丝;细菌动力特征(用暗视野显微镜观察)等。常见腹泻粪便标本的生理盐水湿片显微镜检查结果见表 1。

表 1 常见腹泻粪便标本的生理盐水湿片显微镜检查结果

微生物或毒素	其他特征	中性粒细胞	红细胞
弯曲菌属	投镖式或螺旋式运动	有	有
艰难梭菌毒素	黏膜样便	有	有
大肠埃希菌 O157:H7,肠出血性大肠埃希菌	水样便	无	有
肠侵袭性大肠埃希菌	黏膜样便	有	有
产肠毒素大肠埃希菌	水样便	无	无
沙门菌属	运动的杆菌	少	有
志贺菌属	无动力的杆菌	有	有
霍乱弧菌	流行状或穿梭样运动	无	无
葡萄球菌毒素	—	无	无

注:表格内容仅供参考,任何腹泻粪便标本的镜检结果都是可变的。

7.3 病原菌的培养及鉴定

7.3.1 培养基

分离培养基的选择应依据病人的临床特征而定。用特殊的选择性培养基检测是否发酵乳糖及是否产生硫化氢来筛检沙门菌属和志贺菌属见表 2;用于培养和筛选其他特殊病原体的培养基见表 3。

表 2 常用分离沙门菌属和志贺菌属的初代培养基和传代肉汤增菌培养基

培养基	培养基类型	分离株	乳糖发酵反应	菌落特征	备注
麦康凯琼脂 (MAC)	选择性培养基	革兰阴性肠道细菌	粉色	无色或透明	5%琼脂将阻止变形杆菌属扩散
中国蓝琼脂	选择性培养基	革兰阴性肠道细菌	粉色	无色或透明	5%琼脂将阻止变形杆菌属扩散
HE 琼脂 (HEK)	选择性培养基	沙门菌属和志贺菌属 (特别是志贺菌属)	橘黄色、橙粉色	志贺菌属呈绿色;沙门菌属呈蓝色或绿色,可有黑色中心,检测硫化氢	柠檬酸菌被抑制,若出现,则呈蓝绿色小菌落;变形杆菌属和普罗维登斯菌属呈黄色或绿色;可有黑色中心,检测硫化氢
沙门志贺琼脂 (SS)	高度选择性培养基	沙门菌属和志贺菌属 (宋内志贺菌被抑制)	粉色、红色	无色或透明;可有黑色中心,检测硫化氢	—
XLD 琼脂培养基	高度选择性培养基	沙门菌属和志贺菌属 (宋内志贺菌被抑制)	粉色、红色	无色或透明;可有黑色中心,检测硫化氢	—
革兰阴性杆菌 (GN) 肉汤培养基 ^a	增菌培养基	志贺菌属和沙门菌属	志贺菌属和沙门菌属最先大量增菌	—	次代培养 6 h~8 h ^b
亚硒酸盐煌绿肉汤 ^a	增菌培养基	沙门菌属和志贺菌属	亚硒酸盐对大肠埃希菌和其他肠道细菌有毒性	—	次代培养 18 h~24 h ^b ;亚硒酸盐液体培养基中的胱氨酸可抑制沙门菌属某些种

注:在没有特别说明的情况下,培养条件为 35℃~37℃空气环境孵育 24 h。

^a GN 肉汤和亚硒酸盐煌绿肉汤培养基为非常规使用,建议当检测少量沙门菌属和志贺菌属时(如培养接触腹泻患者的职业危险人群和食品服务人员的粪便)使用。

^b 如果增菌肉汤培养基孵育时间过长,非致病性肠道细菌可能过度生长,因而应在正确时间段进行增菌肉汤次代培养。

表 3 检测特殊病原体的高度选择性培养基

培养基	分离株	菌落特征	备注
含氨苄西林的血平板 (BAP-A)	气单胞菌属	氧化酶阳性,可有溶血	培养基中添加 20 μg/mL 氨苄西林,气单胞菌属常对氨苄西林耐药,增加该病原体分离率

表 3 (续)

培养基	分离株	菌落特征	备注
头孢磺啉-氯苯酚-新生霉素琼脂(CIN)	小肠结肠炎耶尔森菌、气单胞菌属和其他耶尔森菌	红色中心和透明边缘,或呈牛眼样	25℃ 孵育 48 h。柠檬酸杆菌属、成团泛菌和液化沙雷菌呈红色 阴沟肠杆菌和黏质沙雷菌呈粉色、黏液样突起和扩散生长
艰难梭菌拉氧头孢诺氟沙星琼脂(CDMN)	艰难梭菌	—	厌氧培养 48 h~72 h,革兰氏阳性杆菌
环丝氨酸-头孢西丁-蛋黄琼脂(CCFA)	艰难梭菌	直径约 4 mm、白色或黄色、灰白色,不透明;经紫外线照射可产生荧光;有典型的恶臭味	厌氧培养 48 h~72 h,革兰氏阳性杆菌,很少形成芽孢
山梨醇-MAC 琼脂(SMAC)	大肠埃希菌 O157:H7	大肠埃希菌 O157:H7 呈无色;其他大肠埃希菌样菌落呈粉色	—
碱性蛋白胨水(含 1% NaCl,pH 8.5)	弧菌属	—	弧菌属的增菌
庆大霉素培养基	霍乱弧菌	霍乱弧菌呈无色、圆形半透明、湿润、扁平或稍突起,边缘整齐,菌落中央常呈灰色或灰黑色	—
添加炭墨、头孢哌酮、万古霉素和两性霉素 B 的无血琼脂	42℃ 分离弯曲菌属	多呈灰色、扁平、不规则散在分布;有时呈黏液状、湿润凸起的圆形、薄膜样、淡黄色至灰色或粉色;不溶血	微需氧(10% CO ₂ , 5% O ₂ , 85% N ₂), 42℃ 孵育 72 h
添加炭墨、去氧胆酸和头孢哌酮的无血琼脂(CCDA)	37℃ 分离空肠弯曲杆菌、大肠弯曲杆菌、乌普萨拉弯曲杆菌、海鸥弯曲杆菌		
添加头孢哌酮、万古霉素和两性霉素 B 的 5% 羊血布氏杆菌琼脂(Campy-CVA)			
Skirrow 选择性培养基	42℃ 分离弯曲杆菌	—	—

注: 在没有特别说明的情况下,培养条件为 35℃~37℃ 有氧孵育 24 h。

7.3.2 粪便等肠道标本培养及病原菌鉴定检测流程

在临床诊断排除病毒性、真菌性腹泻的情况下,进行肠道标本病原菌的检测。

粪便等肠道标本培养检测(病原菌)流程见图 1。微生物实验室应对腹泻患者粪便标本常规筛查沙门菌属某些种和志贺菌属。儿童患者应加做空肠弯曲菌的常规筛查。

常见病原菌在其选择培养基上的菌落形态见表 2 和表 3,筛选出疑似菌落后传代至 BAP、克氏双糖

铁琼脂(KIA),常见病原菌的鉴定流程见图2。其他腹泻病原菌的鉴定方法如下:

- DF-3群:菌落不溶血,在MAC上不生长;触酶、氧化酶、吲哚、动力阴性的革兰氏阴性球杆菌,可发酵葡萄糖,不产气,硝酸盐还原试验阴性。
- 芽孢杆菌:菌落有 β 溶血,镜下为革兰氏阳性杆菌,部分分离株形成大的芽孢;蜡样芽孢杆菌触酶、动力、卵磷脂酶阳性且青霉素耐药;疑似炭疽芽孢杆菌时,如菌落不溶血且动力阴性,应立即封存标本和疑似菌株并上报当地CDC进行确认。
- 肠出血性大肠埃希菌(EHEC)血清型O157:H7的检测:从SMAC挑取山梨醇阴性(透明或无色)菌落在BAP上传代;使用大肠埃希菌O157乳胶凝集试剂和H7鞭毛抗血清进行凝集试验;如果凝集试验阳性,则将菌株送至当地CDC或参考实验室进行确证。
- 艰难梭菌:由艰难梭菌引起的腹泻,一般仅通过检测毒素A和毒素B来诊断,因20%无症状住院病人可能有艰难梭菌的定植,其中产毒素的艰难梭菌才具有致病性,毒素检测方法参见7.4.2。艰难梭菌的培养及鉴定检测流程为:将粪便标本直接接种于CCFA和CDMN选择培养基,经48h厌氧培养,同时作耐氧试验。艰难梭菌为中等大小、无芽胞的革兰阳性杆菌,耐氧试验阴性,菌落特征为直径3mm~5mm、圆形、略凸起、白色或黄色、灰白色,不透明、边缘不整、表面粗糙及在紫外线照射下可见黄绿色荧光。以API20A生化鉴定可确定此菌。
- 弯曲杆菌属:将培养皿从微需氧环境中取出后,快速进行镜检和鉴定试验。对可疑菌落进行革兰染色,弯曲杆菌属菌镜下特点为革兰阴性小杆状,弯曲呈螺旋形、箭弓形、逗点形或海鸥展翅形;也可呈球形,尤其是陈旧的、长时间放置于空气中的培养物涂片。湿片法镜下观察细菌运动呈螺旋杆状或弧菌状微生物的特有的投镖式或螺旋式运动特性。弯曲菌属的鉴定流程见图3。
- 霍乱弧菌:霍乱弧菌的检测程序见图4。具体步骤为:
 - 运送人员送来标本后,检验者接收标本并作登记。
 - 悬滴动力试验:取载玻片一张,加生理盐水一滴;取粪便或新鲜培养物少许,与生理盐水混合制成混悬液(如是液体培养物则取表面生长物,不必加盐水),小心放上盖玻片后置光学显微镜下。盖严便盒,将便盒弃于两层包装的黄色医疗垃圾收集袋中。低倍镜观察计数红细胞和白细胞,然后再置于暗视野显微镜下仔细观察细菌是否有穿梭状或流星样运动,若有此现象则高度怀疑霍乱弧菌。
 - 制动试验:取动力阳性的标本少许,分别与O1群霍乱弧菌诊断血清和O139群霍乱弧菌诊断血清混合后置于暗视野显微镜下观察动力,穿梭状或流星样运动被抑制(制动试验阳性),可推测有霍乱弧菌存在。
 - 增菌培养:取新鲜粪便2g~3g或水样便(或其他液体标本)1mL~3mL,或直接将采集标本的棉拭子棍接种于碱性蛋白胨水中。盖严便盒,将便盒弃于两层包装的黄色医疗垃圾收集袋中。接种好的蛋白胨水在37℃孵育6h~8h后要将培养物转接种在庆大霉素琼脂培养基上,再将庆大霉素琼脂培养基置于37℃培养18h~24h,挑取可疑菌落(圆形、光滑、扁平、略带青灰色)分别与O1群和O139群霍乱弧菌诊断血清做凝集试验,观察是否有凝集现象。菌落以生理盐水作对照,对照应不发生凝集。凝集试验阳性,证明分离菌株为霍乱弧菌。

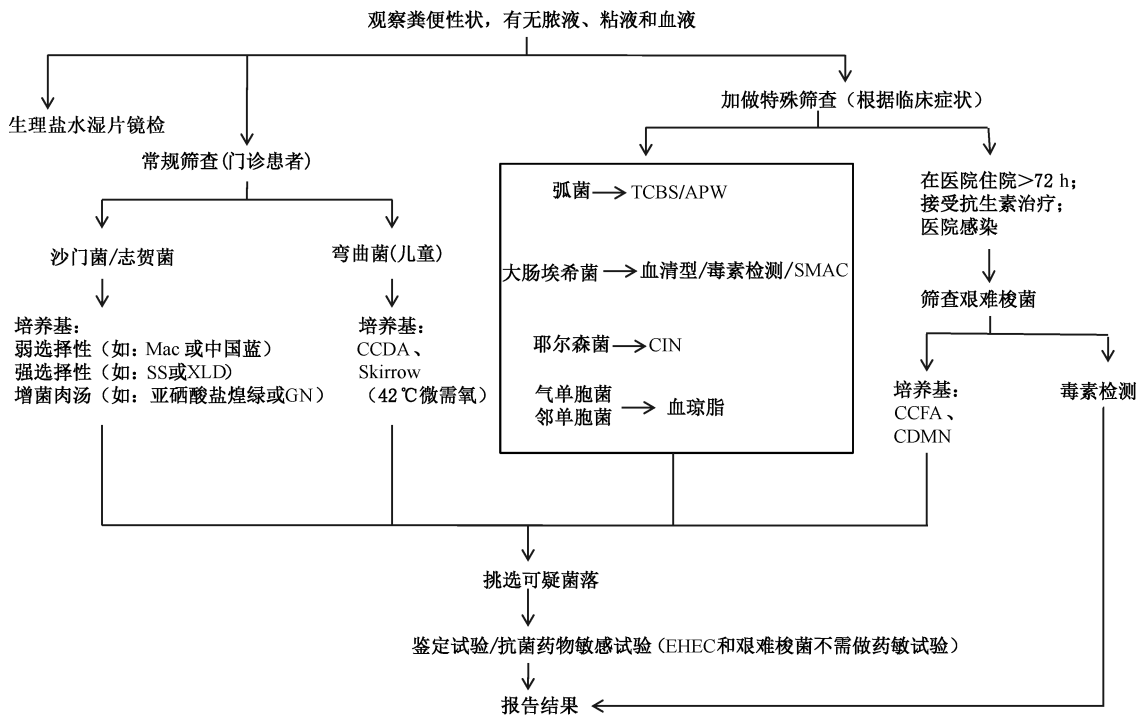


图 1 粪便(病原菌)检验流程

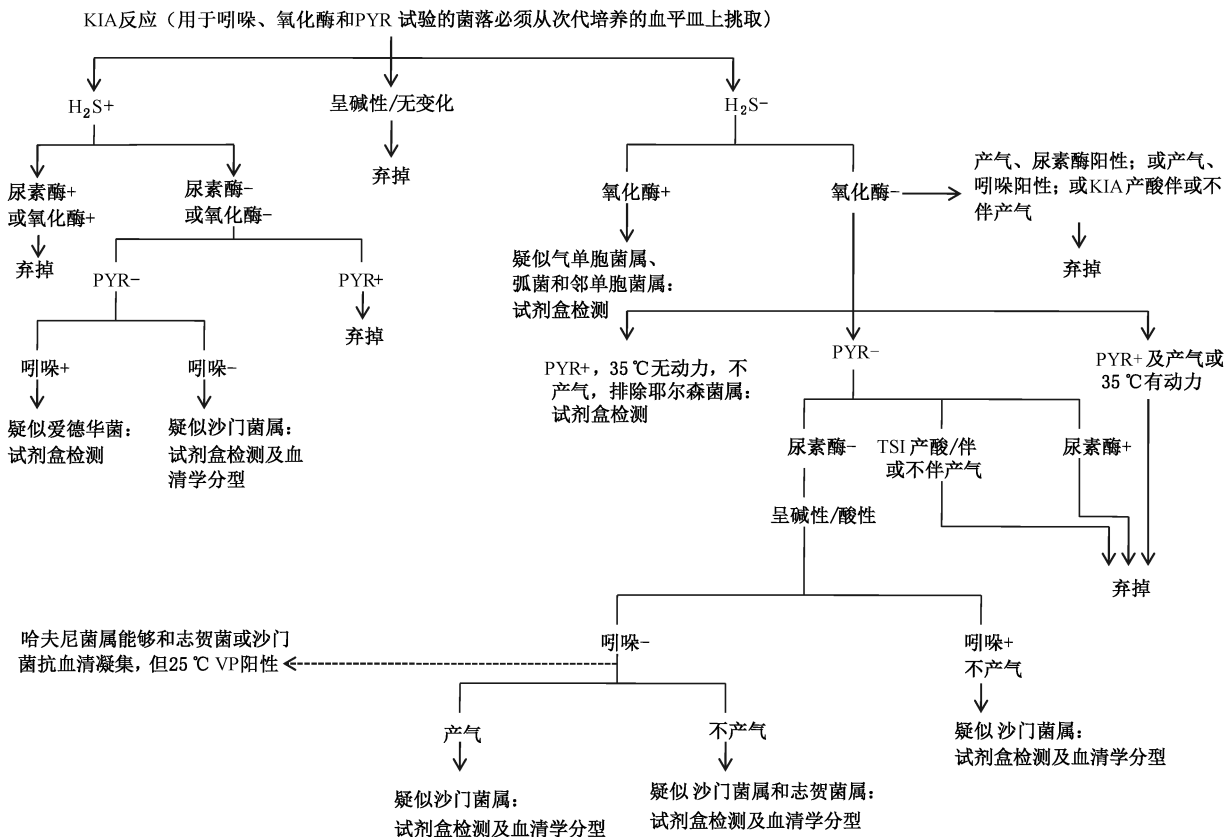
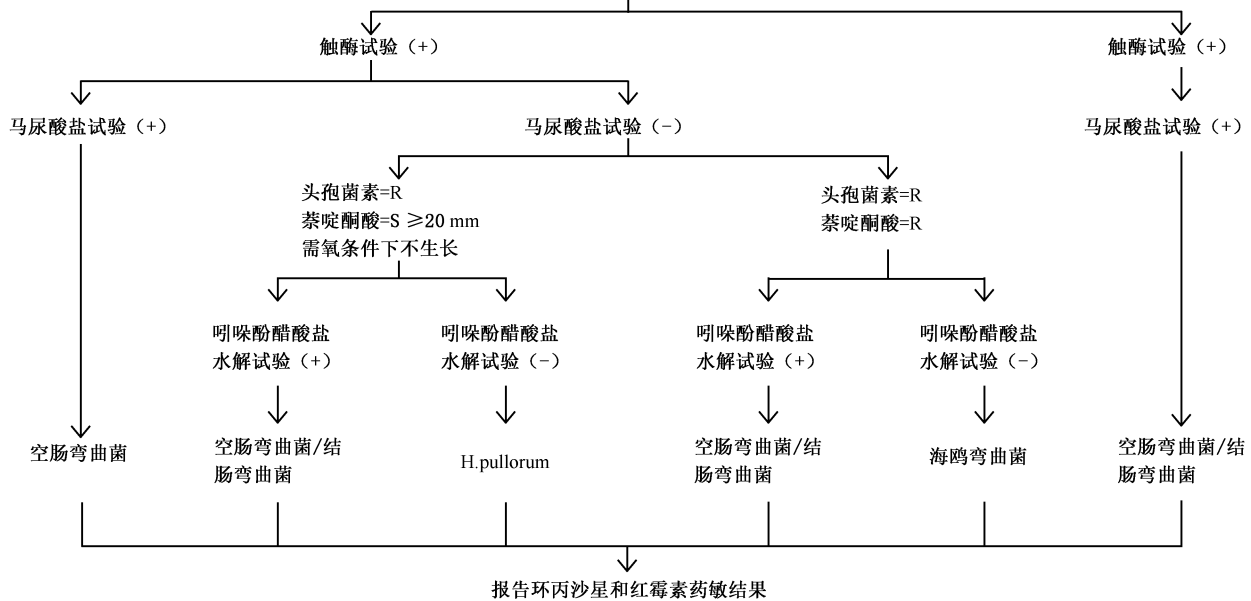


图 2 常见粪便病原菌的鉴定流程

氧化酶试验 (+)，动力 (+) (湿片法镜下观察呈镖式或螺旋式运动)，弯曲\鸥翼状革兰阴性杆菌

发送初检报告“弯曲杆菌属，待鉴定”：接种二块血平板分别置于微需氧/42℃ (贴头孢菌素、萘啶酮酸、罗红霉素和环丙沙星纸片) 和需氧/35℃ (空肠弯曲杆菌不生长) 孵育24h~48h



注：对于方框内附加试验难以操作的临床微生物实验室，亦或使用商品试剂盒鉴定。

图 3 弯曲菌属的鉴定流程

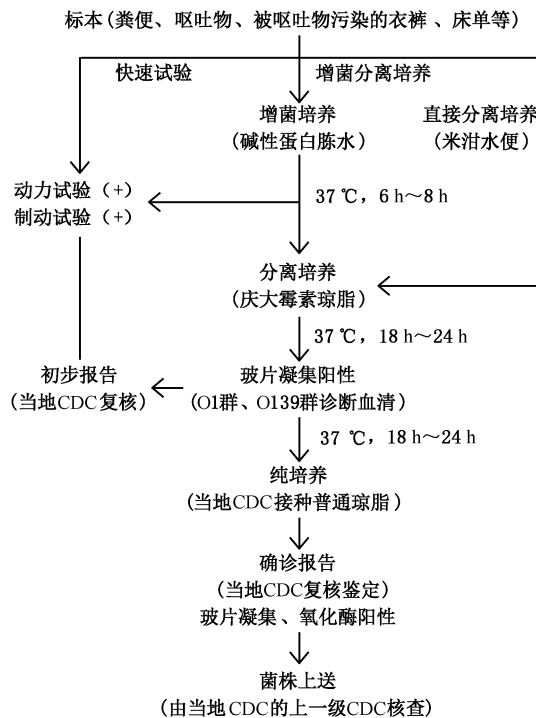


图 4 霍乱弧菌检测流程

7.3.3 基于核酸分子生物学鉴定

主要包括 16SrRNA 序列分析、核酸杂交技术、全基因组测序分析、生物芯片技术等。其中 16SrRNA 序列分析鉴定细菌是近些年较常用于微生物实验室的分子生物学鉴定方法。但上述技术所需试剂和仪器昂贵,专业性和操作性强,不适于基层医院对临床病原性细菌的快速鉴定。

7.3.4 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)鉴定

通过检测获得微生物的蛋白质谱图,并将所得的谱图与数据库中的细菌参考谱图比对后得出鉴定结果。

7.4 抗血清凝集试验及艰难梭菌毒素检测

7.4.1 抗血清凝集试验

7.4.1.1 凝集方法

参照说明书操作,直接挑取纯菌苔与血清凝集(如果不是纯菌落,可能会导致结果有误),混匀抗血清制剂(沙门多价抗血清 A、B、C1、C2、D、E 等,以及 Vi;志贺血清群 A、B、C 和 D)或 O157 型大肠埃希菌乳胶试剂和菌苔,搅拌 1 min,观察有无凝集,可将生理盐水与等量抗血清制剂混匀作为阴性对照。凝集阳性表示该菌存在所检测的抗原。当测试标本和对照均出现凝集时,结果无法解释,需重复凝集试验。结果报告:“菌株名称”后跟血清型的字母和数字,如大肠埃希菌 O157。

7.4.1.2 局限性

有些带有荚膜和鞭毛的菌株可导致结果假阴性,对带有荚膜的菌体可煮沸菌液 5 min 后,用沉淀物做凝集或检测沙门菌 Vi 抗原;大肠埃希菌 O157 乳胶检测并不能确认菌株中含有 H 鞭毛抗原和产毒素菌株,需要进一步检测这些菌株;由于存在共同抗原或者存在交叉反应,病原菌须先经生化鉴定确定种或属,再进行血清型鉴定,不可颠倒次序或直接凝集。

7.4.2 艰难梭菌毒素 A/B 检测

可直接从便标本中检测毒素的产生情况,多采用免疫酶法和免疫层析法。此外,也可采用分子生物学方法进行检测,如扩增毒素基因 *tcdA*、*tcdB*,目前已有实时荧光定量 PCR 的商品化试剂盒。亦可对培养出的菌落进行毒素测定(PCR、免疫酶法、免疫层析法),如果免疫法结果为阴性,推荐用肉汤增菌培养 3 d 后再测定,以提高毒素产量。2011 年 IDSA 和 2012 年美国相关指南推荐两步法进行艰难梭菌毒素的检测:用核酸扩增或 GDH 进行初筛,然后进行毒素检测。

7.5 结果报告

7.5.1 标本外观及直接镜检结果

报告便标本外观:黏膜样便、水样便及脓血便等。

报告标本直接镜检结果:细菌有无动力及运动特征(如穿梭样运动);有无中性粒细胞和红细胞,并对细胞量进行描述(偶见、少量、大量等);有无酵母样孢子及假菌丝,并对菌量进行描述(偶见、少量、大量等)。

7.5.2 培养阴性

按照医师申请单要求,报告“某种细菌培养阴性”。如果医师申请单为“沙门菌、志贺菌培养”,则报告“沙门菌、志贺菌培养阴性”。若培养排除了某些特定致病菌,应在结论中列出该致病菌培养阴性,如“空肠弯曲菌、O157 大肠埃希菌、弧菌属、耶尔森菌属或气单胞菌属等培养阴性”。

7.5.3 培养阳性

沙门菌属的报告:根据抗血清凝集结果报告(伤寒沙门菌、甲型副伤寒沙门菌、猪霍乱沙门菌或沙门菌血清群 A/C/D);如果检测出沙门菌属的某些种,则具体报告种名。

志贺菌属的报告:根据抗血清凝集结果报告(A 群:痢疾志贺菌;B 群:福氏志贺菌;C 群:鲍氏志贺菌;D 群:宋内志贺菌)。

弯曲菌属的报告:如果标本生理盐水湿片镜下观察到投镖式或螺旋式运动动力特性,可报告“疑似弯曲杆菌属”;参照图 3 报告最终鉴定结果(空肠弯曲菌或弯曲杆菌属)。

若针对性检测到其他特定致病菌,则具体报告病原菌种名,如下列某种细菌培养阳性:小肠结肠炎耶尔森菌、气单胞菌属、类志贺邻单胞菌、金黄色葡萄球菌、弧菌属、迟缓爱德华菌、炭疽芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、肠出血型大肠杆菌、其他大肠杆菌(肠致病性、肠侵袭性、肠凝聚型和肠毒素型大肠杆菌)或艰难梭菌。

将炭疽芽孢杆菌属培养阳性结果通知所在医院的感染控制部门及当地疾病预防控制中心(CDC)。

7.5.4 霍乱弧菌

涂片结果:标本外观描述、RBC/WBC 计数(低倍镜)及悬滴试验阳性或阴性。

培养及抗血清凝集结果:O1 群霍乱弧菌诊断血清凝集试验阳性或阴性;O139 群霍乱弧菌诊断血清凝集试验阳性或阴性。

将疑似霍乱弧菌的检测结果显示通知医院感染控制部门及当地 CDC,并将疑似菌株上交当地 CDC 核查。由当地 CDC 进一步报告具体分型和药敏结果。

7.5.5 药敏试验

药敏报告注意事项:

——应选择性报告药敏结果,临床不需常规抗生素治疗,但以下几种情况除外:

- 医师要求;
- 患者为播散性感染(尿、血或其他无菌体液培养均为阳性);
- 伤寒沙门菌感染;
- 气单胞菌属感染;
- 小于 1 岁和大于 65 岁的沙门菌属某些种感染患者;
- 某些免疫缺陷患者(根据医生需要),包括人免疫缺陷病毒感染/AIDS。

——志贺菌属、沙门菌属、气单胞菌属、邻单胞菌属、爱德华菌属、弧菌属以及耶尔森菌属的药敏报告:

- 仅肠内感染时,报告氨苄西林、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑和喹诺酮类药敏结果;
- 有侵袭性感染的病人(如血培养阳性),存在多重耐药株时,同时报告第三代头孢菌素的药敏结果;
- 霍乱弧菌同时应报告多西环素或四环素(由当地 CDC 报告);

- 沙门菌和志贺菌不报告第一、二代头孢菌素及氨基糖苷类药敏结果；
 - 由于喹诺酮类抑制骨骼生长,故 14 岁以下儿童不选用喹诺酮类。
- O157 型大肠埃希菌或肠出血性大肠埃希菌不用报告药敏试验结果。因为抗生素治疗出血性结肠炎时,可诱导细菌裂解,释放毒素,会增加发展成溶血性尿毒综合症的危险,故应在报告中备注“针对此种病原菌不需要做抗菌药物治疗”。
- 弯曲菌属的药敏报告:
- 空肠弯曲菌/结肠弯曲杆菌的药敏折点参见 CLSI 文件 M45-A2;
 - 治疗弯曲杆菌属所致腹泻的首选药物:环丙沙星、红霉素、阿奇霉素及新型大环内酯类;
 - 如果红霉素和环丙沙星药敏纸片周围有抑菌圈,需进一步测定其 MIC 值以确定药物敏感性;
 - 如果在环丙沙星药敏纸片周围没有产生抑菌环,报告“菌株对环丙沙星耐药”;
 - 如果在红霉素药敏纸片周围没有产生抑菌环,报告“菌株对大环内酯类(如红霉素、阿奇霉素和克拉霉素)耐药”。
- 如大量艰难梭菌、产酸克雷伯菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、酵母菌或 DF-3 群细菌生长,应报告但无需做药敏试验。

7.6 质量控制

7.6.1 培养基质控

对每批新制备或购入的不同批号培养基必须做质控。首先肉眼检查培养基或培养皿有无裂缝、盛装不均、溶血、冻结、气泡和污染,并进行无菌测试,之后应用正确的质控菌株做质控。将质控菌株接种在琼脂平板以获得单个菌落,再将此单个菌落接种于欲进行质控的培养基上,一定条件孵育后观察质控结果。质控菌株和它们在相应培养基上孵育条件和反应见表 4。阳性质控菌株需出现阳性结果(如生长或呈现特殊形态),阴性质控菌株则表现为阴性结果。若质控结果失控,应检查质控菌纯度后再重新进行质控,若仍失控,则将失控批次的培养基废弃。

表 4 检测粪便病原体筛选培养基的质控列表

培养基	质控菌株	菌株种类	孵育时间 h	孵育温度 ℃	孵育气体 环境	结果
KIA	大肠埃希菌 ATCC25922	A	18~24	35	需氧	生长:上层黄色/下层黄色/ 产气+/不产 H ₂ S-
	弗劳地枸橼酸杆菌 质控菌株	A	18~24	35	需氧	生长:上层黄色/下层黄色/ 产气+/产 H ₂ S+
	普通变形杆菌质控 菌株	A	18~24	35	需氧	生长:上层红色/下层黄色/ 产气+/产 H ₂ S+
BAP-A	嗜水气单胞菌 ATCC7965	A	18~24	35	需氧	生长
	大肠埃希菌 ATCC25922	B	18~24	35	需氧	部分或完全抑制

表 4 (续)

培养基	质控菌株	菌株种类	孵育时间 h	孵育温度 ℃	孵育气体 环境	结果
中国蓝琼脂	大肠埃希菌 ATCC25922	A	18~24	35	需氧	兰色菌落
	绿脓杆菌 ATCC27853	A	18~24	35	需氧	粉色菌落
	金黄色葡萄球菌 ATCC25923	B	18~24	35	需氧	无菌生长
	粪肠球菌 ATCC29212	B	18~24	35	需氧	无菌生长
XLD	志贺菌属质控菌株	A	18~24	35	需氧	红色菌落
XLD	大肠埃希菌 ATCC25922	B	18~24	35	需氧	黄色菌落
弯曲菌属琼脂	空肠弯曲菌 ATCC33291	A	24~48	42	微需氧	生长
	大肠埃希菌 ATCC33291	B	24~48	42	微需氧	部分或完全抑制
CCFA	艰难梭菌 ATCC9689	A	24~48	35	厌氧	大、黄色菌落
	产气荚膜梭状芽胞 杆菌 ATCC13124	B	24~48	35	厌氧	部分或完全抑制
	脆弱拟杆菌 ATCC26285	B	24~48	35	厌氧	部分或完全抑制
	大肠埃希菌 ATCC25922	B	24~48	35	需氧	部分或完全抑制
	金黄色葡萄球菌 ATCC25923	B	24~48	35	需氧	部分或完全抑制
CIN	小肠结肠炎耶尔森菌 ATCC9610	A	24~48	35	需氧	生长, 菌落红色中心、边界 清晰
	嗜水气单胞菌 ATCC7965	A	24~48	25	需氧	生长, 菌落红色中心, 边界 清晰
	粪肠球菌 ATCC29212	B	24~48	35	需氧	部分或完全抑制
	铜绿假单胞菌 ATCC27853	B	24~48	35	需氧	部分或完全抑制
	大肠埃希菌 ATCC25922	B	24~48	35	需氧	部分或完全抑制

表 4 (续)

培养基	质控菌株	菌株种类	孵育时间 h	孵育温度 ℃	孵育气体 环境	结果
SMAC	大肠埃希菌 O157:H7 ATCC35150	A	24	35	需氧	无色透明菌落、发酵山梨醇
	大肠埃希菌 ATCC25922	B	24	35	需氧	部分或完全抑制、粉色菌落
	奇异变形杆菌 ATCC12453	B	24	35	需氧	发酵山梨醇、部分或完全抑制
MH 琼脂	大肠埃希菌 ATCC25922	A	24	35	需氧	生长
	绿脓杆菌 ATCC27853	A	24	35	需氧	生长
	金黄色葡萄球菌 ATCC25923	A	24	35	需氧	生长
	粪肠球菌 ATCC29212	A	24	35	需氧	生长
<p>注 1: 若实验室无表中所列 ATCC 标准菌株,任何在相应选择培养基上产生与之相同结果的临床分离株都可以作为质控菌株使用。</p> <p>注 2: A 为阳性质控菌株,用于检测培养基中的营养物质(0.5 麦氏单位无菌盐水菌悬液 1:100 稀释,接种 10 μL 于每一个培养基),B 为阴性质控菌株,用于检测培养基中的选择性物质(0.5 麦氏单位无菌盐水菌悬液 1:10 稀释,接种 10 μL 于每一个培养基)。</p>						

7.6.2 抗血清凝集试验质控

在使用新的试剂盒之前及每隔 6 个月用已知阳性和阴性反应的菌株测试每种试剂。测试方法同

7.4.1 抗血清凝集试验。

参 考 文 献

- [1] 王金良,倪语星,徐英春,等. 细菌性腹泻的实验室诊断规范. 上海:上海科学技术出版社,2002
- [2] Giuseppe Cornaglia, Rene Courcol, Jean-Louis Herrmann, et al. European Manual of Clinical Microbiology. 1sted. ESCMID, 2012
- [3] Lynne S. Garcia, Henry D. Isenberg, et al. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Third ed. Washington DC: ASM, 2007
- [4] A Guide to Utilization of the Microbiology Lab for Diagnosis of Infectious Diseases. Recommendations by IDSA and ASM, 2013
- [5] Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty—Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015
- [6] Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline—Second Edition (2010). CLSI document M45-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010
- [7] Bauer TM, Lalvani A, Fehrenbach J, et al. Derivation and validation of guidelines for stool cultures for enteropathogenic bacteria other than *Clostridium difficile* in hospitalized adults. JAMA. 2001 Jan 17;285 (3):313-9
-