

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 807—2022

# 临床微生物培养、鉴定和药敏检测系统的 性能验证

Performance verification of clinical microbial culture, identification and  
antimicrobial susceptibility testing systems

2022-11-02 发布

2023-05-01 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会 发布

## 目 次

前言 .....	II
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 风险评估 .....	3
5 性能验证相关通用要求 .....	4
6 细菌、真菌形态学检查的性能验证 .....	4
7 细菌、真菌分离培养的性能验证 .....	7
8 细菌、真菌手工和自动化鉴定系统的性能验证 .....	10
9 商品化药敏检测系统的性能验证 .....	13
10 分子 POCT 系统和部分感染免疫学试验的性能验证 .....	14
附录 A（资料性） 常见标准菌株/质控菌株的培养与保存方法 .....	18
附录 B（资料性） 微生物鉴定系统和药敏检测系统性能验证 .....	19
附录 C（资料性） 全自动微生物药敏检测系统性能验证示例 .....	21

## 前 言

本标准由国家卫生健康标准委员会临床检验标准专业委员会负责技术审查和技术咨询，由国家卫生健康委医疗管理服务指导中心负责协调性和格式审查，由国家卫生健康委医政司负责业务管理、法规司负责统筹管理。

本标准起草单位：北京大学人民医院、北京医院/国家卫生健康委临床检验中心、上海市东方医院、中国人民解放军总医院、河北省临床检验中心、空军军医大学第一附属医院、首都医科大学附属北京友谊医院、中日友好医院、中国医学科学院北京协和医院。

本标准主要起草人：王辉、胡继红、吴文娟、沈定霞、赵建宏、刘家云、胡云建、苏建荣、鲁炳怀、孙宏莉。

# 临床微生物培养、鉴定和药敏检测系统的性能验证

## 1 范围

本标准规定了临床微生物形态学检查、培养、鉴定、药敏、分子即时检测等系统性能验证的要求。本标准适用于开展临床微生物检验的医学实验室。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本标准必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本标准；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

- GB 19489 实验室生物安全通用要求
- WS/T 442 临床实验室生物安全指南
- WS/T 639 抗菌药物敏感性试验的技术要求
- WS/T 640 临床微生物学检验标本的采集和转运

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

### 3.1

#### 参考方法 reference method

一种无系统误差，随机误差可控，且准确清晰地描述了测定一个或多个性能参数的检测方法，可用于评估其他检测方法的性能。

### 3.2

#### 比对方法 comparator method

用于评估新系统的方法，包括参考方法或已获得药监局批准的商品化方法。

### 3.3

#### 接种物浓度 inoculum

接种于微生物检测系统的菌悬液中微生物的浓度，以每毫升菌落形成单位（colony-forming units per milliliter, CFU/mL）表示。

### 3.4

#### 标准菌株 reference strain

由菌种保藏机构保藏，遗传学特性得到确认和保证并可追溯的菌株。

### 3.5

#### 性能验证 verification

通过提供客观证据，确认微生物检测系统在用于患者标本及标本分离株检测之前能达到与制造商说明书一致的性能。

### 3.6

#### 能力验证 proficiency testing; PT

利用实验室室间比对，按照预先制定的准则评价参加者的能力（ISO/IEC 17043, 3.7）。

注：能力验证活动包括获认可的能力验证提供者的能力验证计划，以及卫生系统权威机构提供的比对（实验室间质量评价）。

### 3.7

#### 准确度 accuracy

测量值和真实值之间的一致性接近程度。本标准用以描述准确鉴定同一待测菌的能力或准确确定同一待测微生物/抗微生物药物组合敏感性结果的能力。

### 3.8

#### 精密度 precision

在规定条件下，对同一或相似被测对象重复测量得到的测量示值或测得量值的一致程度。

### 3.8.1

#### 可重复性 repeatability

在一组测量条件下，包括相同检测程序、相同操作者、相同测量系统、相同操作条件和相同地点，短时间内对同一或相似被测对象重复测量的精密度。

### 3.8.2

#### 再现性 reproducibility

在包括了不同的地点、不同的操作者、不同的测量系统的测量条件下对同一或相似被测对象重复测量的精密度。

### 3.9

#### 符合率 agreement rate

采用不同方法对同一待测物定性检测结果的一致程度，也称一致率。

### 3.10

#### 定量限 limit of quantitative; LOQ

在规定的实验条件下，样品中待测组分能以规定的准确度（作为总误差或作为偏差和精密度的特定要求）被定量测定的最低量值。

### 3.11

#### 检出限 limit of detection; LOD

指某一分析方法在给定的可靠程度内可以从样品中检测待测物质的最小浓度或最小量。

### 3.12

#### 最低抑菌浓度 minimal inhibitory concentration; MIC

在琼脂或肉汤稀释法药物敏感性检测试验中，能抑制肉眼可见的微生物生长的最低药物浓度。

### 3.13

#### 分类一致性 category agreement; CA

被评估的药敏方法与参考方法或比对方法相比，判断结果为敏感、中介、剂量依赖性敏感和耐药的一致性。

### 3.14

#### 基本一致性 essential agreement; EA

待测系统MIC值与参考方法或比对方法MIC值相差不超过1个对倍稀释度（细菌）或2个对倍稀释度（酵母菌）。待评估方法为纸片扩散法时，不计算EA。

### 3.15

#### 极重大偏差 very major discrepancy; VMD

待评估的药敏系统检测为敏感，而现有商品化检测系统检测为耐药，即假敏感。

### 3.16

#### 极重大误差 very major error; VME

待评估的药敏系统检测为敏感，而参考方法检测为耐药，即假敏感。

### 3.17

#### 重大偏差 major discrepancy; MD

待评估的药敏系统检测结果为耐药，而现有商品化检测系统检测为敏感，即假耐药。

### 3.18

#### 重大误差 major error; ME

待评估的药敏系统检测结果为耐药，而参考方法检测为敏感，即假耐药。

### 3.19

#### 小偏差 minor discrepancy; MD

待评估的药敏系统将现有商品化检测系统的中介判为敏感或耐药、或者将耐药或敏感判为中介。

### 3.20

#### 小误差 minor error; ME

待评估的药敏系统将参考方法的中介判为敏感或耐药、或者将耐药或敏感判为中介。

## 3.21

**专家系统 expert system**

提示非典型或异常药敏结果的抗微生物药物敏感性的分析软件。

## 3.22

**即时检测 point-of-care testing; POCT**

亦称近患检验 (Near-patient testing)，在患者附近或其所在地进行的、其结果可能导致患者的处置发生改变的检验。

## 3.23

**临界值 cut-off value**

作为判断特定疾病、状态或被测量存在或不存在的界限的数值或量值。

## 3.24

**正确度 trueness**

多次重复检测所得量值的平均值与一个参考量值间的一致程度。通常用“偏倚”表达，是对系统误差的衡量。

## 4 风险评估

4.1 风险评估是评估危害发生的概率和危害严重程度。风险评估应考虑到错误结果、结果延迟、结果缺失或治疗延误的风险。

## 4.2 错误检测结果带来的风险

新检测系统未执行全面验证方案或现有系统部分改变时未执行部分验证方案，可能造成鉴定错误、药敏检测错误等，从而给患者带来一定风险，详见表1。错误结果带来的风险因致病菌种类或菌种/药物组合而异，如漏检苯唑西林耐药的金黄色葡萄球菌（假敏感）所带来的风险较将大肠埃希菌氨苄西林报告为假耐药更为严重。当错误结果带来的风险较高时，实验室应增加附加检测试验。

表1 微生物检测系统错误结果所带来的风险

项目	错误检测	风险
形态学检查	将革兰阴性菌报告为革兰阳性菌	致临床选用抗菌药物错误
	将革兰阳性菌报告为革兰阴性菌	
	未检测到标本中的可疑致病菌	漏检，延误患者治疗时机，严重者可引发传播风险，如结核分枝杆菌
分离培养	培养基、血培养或培养条件不能检出可能致病菌	漏检，延误患者治疗
	接种物浓度不足或过量	定量培养判读错误
细菌鉴定	将定植菌、非致病菌报告为致病菌	1. 干扰医生诊断 2. 不必要的抗菌药物治疗
	仪器错误鉴定细菌	引向错误治疗方向
	质谱仪器： 1. 数据库未覆盖待测菌 2. 自建数据库错误鉴定待测菌	1. 菌种鉴定错误 2. 引向错误治疗方向 3. 出现防控漏洞
	沙门菌属/志贺菌属血清学检测： 1. 不能检出沙门菌属/志贺菌属 2. 不能准确分型	1. 漏检，延误传染病防治时机 2. 错误发放分型结果
药敏检测	仪器错误报告MIC或S/I/SDD/R <sup>注</sup>	产生VME、ME 误导临床选用抗菌药物
	没有折点的细菌报告S/I/SDD/R	误导临床选用抗菌药物及剂量
	天然耐药的药物常规检测，且检测结果为敏感	误导医生选错抗菌药物
	体外测试敏感，体内无效的药物	误导医生选错治疗方案
感染免疫学定性/定量检测	未检测到标本中的可能致病菌	漏检 延误治疗时机
	方法学干扰因素等阴性标本检出结果为阳性	引向错误治疗方向
分子POCT检测	检出限未达标不能检出可疑致病微生物或耐药基因	漏检致病菌或耐药菌 延迟临床选用药物及延误治疗时机

表 1 微生物检测系统错误结果所带来的风险（续）

项目	错误检测	风险
	阴性标本检出结果为阳性	引向错误感染病防治方向
注：S, susceptible, 敏感；I, Intermediate, 中介；SDD, susceptible-dose dependent, 剂量依赖性敏感；R, resistant, 耐药。		

#### 4.3 验证样品量、样品类型带来的风险

验证样品量或验证类型不足带来的风险包括：

- 分离培养系统标本多样性不足，不能准确判断相应标本各类目标菌种的分离概率。
- 培养、鉴定系统入选菌种或标本多样性不足，不能鉴定同一属细菌亲缘关系近的菌种；对于少见菌、不常见菌可能造成漏检或错误鉴定。
- 验证药敏检测系统时，不覆盖耐药或中介的菌株或折点附近的菌株，可能产生较高的 VME、ME。
- 选用的菌株均是低 MIC 或高 MIC 值的菌株，易造成系统验证结果偏差。

### 5 性能验证相关通用要求

#### 5.1 性能验证应在以下情况下执行，具体不同的检验项目见本标准各章条内容。

性能验证应在以下情况下执行：

- 检验程序常规应用之前。
- 任何严重影响检验程序分析性能的情况发生后，应在检验程序重新启用前对受影响的性能进行验证。

#### 5.2 验证后的质量保证

常规使用期间，为能满足检验结果的预期用途，可基于检验程序的稳定性，利用日常工作产生的检验和质控数据，定期对检验程序的分析性能进行评估。包括但不限于如下：

- 持续的质量控制（quality control, QC）。
- 能力验证（PT）/室间质评不适用时，采用替代方法，应至少每半年评估一次准确度。
- 人员的培训和能力测试：定期评估人员的检测能力，如培训新出现的耐药表型、分类学变化和折点的更新等。
- 仪器和软件维护：检测到仪器和软件的问题应采取相应措施，并跟踪评价纠正措施。
- 按照制造商使用说明书要求进行年度评估。
- 异常结果的再审核：如药敏专家系统鉴定的异常结果应进行其他确认试验。确认后的异常结果（如新的耐药表型）应及时上报负责人。

### 6 细菌、真菌形态学检查的性能验证

#### 6.1 染色方法的性能验证

##### 6.1.1 验证时机

实验室使用新的染色方法前、更换厂家或品牌后应进行性能验证。

##### 6.1.2 验证菌株

实验室常用的细菌、真菌形态学显微镜检查项目有：革兰染色、抗酸染色（萘尼法、荧光法）、弱抗酸染色、墨汁染色、真菌钙荧光白染色、乳酸酚棉蓝染色和六胺银染色等。标准菌株、QC菌株或经过明确鉴定（如质谱或DNA序列分析确定）的临床菌株均可用于染色方法的性能验证。常用染色方法性能验证所使用的菌种及性能特点见表2。

每项染色应至少选择5株菌，包括不同染色性能和形态特征的菌株。

表2 常用染色方法性能验证所使用的菌种及性能特点

染色方法	验证用菌株	性能特点或结果解释
革兰染色	金黄色葡萄球菌	革兰染色阳性，呈紫蓝色
	大肠埃希菌	革兰染色阴性，呈粉红色
抗酸染色 (萋尼法、荧光法)	分枝杆菌属（快生长分枝杆菌或灭活后的结核分枝杆菌）	萋尼法抗酸染色阳性，呈红色 荧光法抗酸染色阳性，呈亮黄色
	大肠埃希菌	萋尼法抗酸染色阴性，呈蓝色 荧光法抗酸染色阴性，无颜色
弱抗酸染色	诺卡菌属	弱抗酸染色阳性，呈红色
	大肠埃希菌	弱抗酸染色阴性，呈蓝色
墨汁染色	新型隐球菌（脑心浸液培养物）	黑色背景下可见酵母样孢子周围有明亮的荚膜
	白念珠菌	黑色背景下未见明亮的荚膜
真菌钙荧光白染色	白念珠菌	真菌的菌丝及孢子均呈亮蓝色，结构清晰明显
	大肠埃希菌	呈弱蓝色荧光
乳酸酚棉蓝染色	丝状真菌（如曲霉菌属）	真菌染成蓝色，孢子及菌丝结构清晰
六胺银染色	肺孢子菌六胺银染色既往阳性标本或白念珠菌	肺孢子菌，包裹壁应呈棕黑色，圆形或椭圆形 真菌孢子和菌丝染成棕黑色

### 6.1.3 验证前准备工作

菌株要求：验证用细菌、真菌或分枝杆菌等应在相应培养基上复苏、传代后，使用新鲜（对数生长期）的纯菌落。

人员要求：所有从事涂片染色镜检的工作人员均需接受各种染色方法标准操作的培训，且需进行辨色力检查。

### 6.1.4 验证方案

#### 6.1.4.1 验证过程

由本岗位人员进行菌株传代、菌落涂片、染色和镜检，填写性能验证记录表，明确记录各种染色方法的实际性能特点。

#### 6.1.4.2 可接受标准

若全部菌株符合预期染色性能特点，则验证通过。

## 6.2 显微镜检查的性能验证

### 6.2.1 验证时机

检验程序常规应用之前。任何严重影响检验程序分析性能的情况发生后，应在检验程序重新启用前对受影响的性能进行验证。现用检验程序的任一要素（仪器、染液等）变更，应重新进行验证。

### 6.2.2 验证标本

#### 6.2.2.1 验证标本的类型

所有标本及容器应当作为具有传染性的物质，应按照实验室生物安全要求操作（参见 GB 19489 和 WS/T 442）。优先使用已知结果的留样标本，不可获取时可采用模拟标本。各种检查项目的标本类型：

- 革兰染色适用于除血液、导管、粪便、喉部标本外的各种标本。
- 抗酸染色适用于除血液和导管外的各种标本。
- 弱抗酸染色主要适用于呼吸道、中枢神经系统、脓液等标本。
- 墨汁染色用于脑脊液标本。
- 真菌钙荧光白染色用于除血液、导管外的各种标本。
- 六胺银染色主要用于呼吸道和组织标本。
- 乳酸酚棉蓝染色适合丝状真菌培养物。

#### 6.2.2.2 验证标本的数量



每项检查至少选择5份标本进行验证，各染色项目对标本选择的要求如下：

- a) 革兰染色：应覆盖革兰阳性菌、革兰阴性菌、未查见细菌等结果的标本。
- b) 抗酸染色、弱抗酸染色、墨汁染色：应覆盖各种染色阳性、阴性结果的标本。
- c) 真菌钙荧光白染色：应覆盖真菌孢子、真菌丝、假菌丝、未查见真菌等结果的标本。
- d) 乳酸酚棉蓝染色：应覆盖丝状真菌（如曲霉菌属）的标本。
- e) 六胺银染色：宜覆盖肺孢子菌的标本。

### 6.2.3 验证前准备工作

设备要求：细菌、真菌形态学检查涉及的设备如普通离心机、细胞离心机、自动染片机、显微镜等均需进行日常维护保养及例行校准，确保设备的性能稳定。

人员要求见本标准第6.1.3条。

### 6.2.4 验证方案

#### 6.2.4.1 验证过程

由本岗位人员进行涂片、染色、镜检及结果报告，由专人进行结果统计，评价检测结果与留样（模拟）样品之间的符合率。

#### 6.2.4.2 样品的制备要求

所有样品的制备均需在生物安全柜内进行。适合直接涂片的临床标本应挑选脓性或带血部分，涂成均匀薄片。尿液、胸腹水等体液标本离心后取沉淀物涂片。肺泡灌洗液、无色透明的脑脊液等用细胞离心机离心制片。

#### 6.2.4.3 结果报告

##### 6.2.4.3.1 镜检观察视野的要求

痰涂片质量评估需低倍镜下观察最少20~40个视野。萋尼法抗酸染色若阴性需观察油镜下300个视野，报告1+时至少观察300个视野，报告2+至少观察100个视野，3+、4+时至少观察50个视野。荧光法抗酸染色若阴性需观察50个视野，报告2+至少观察50个视野，3+及以上的阳性结果至少观察20个视野。

##### 6.2.4.3.2 数量的报告

数量的报告如下：

- a) 革兰染色细菌半定量报告：0~1个/油镜，1+；2~5个/油镜，2+；6~30个/油镜，3+；>30个/油镜，4+。痰涂片标本应计算有细胞视野的细胞平均数量，分别记录低倍镜下鳞状上皮细胞、多形核白细胞的数量，评估痰标本质量是否合格（若多形核白细胞数量>25个/LPF，鳞状上皮细胞数量<10个/LPF，即痰标本质量合格）。
- b) 萋尼法抗酸染色观察300个视野（油镜）若未发现抗酸杆菌，报告抗酸杆菌阴性；1~8条抗酸杆菌/300视野，报告抗酸杆菌数量（若1~2条抗酸杆菌/300视野，不确定，需重复试验）；1~9条/100视野，报告抗酸杆菌1+；1~9条/10视野，报告抗酸杆菌2+；1~9条/每视野，报告抗酸杆菌3+；>9条/每视野，报告抗酸杆菌4+。
- c) 荧光法抗酸染色观察50个视野（高倍）若未发现抗酸杆菌，报告荧光染色抗酸杆菌阴性；1~9条/50视野，报告荧光染色抗酸杆菌数量；10~49条/50视野，报告荧光染色抗酸杆菌1+；1~9条/1视野，报告荧光染色抗酸杆菌2+；10~99条/1视野，报告荧光染色抗酸杆菌3+；100条及以上/1视野，报告荧光染色抗酸杆菌4+。

##### 6.2.4.3.3 形态学描述

形态学的描述如下：

- a) 革兰染色：报告每种菌体的染色特征（阳性、阴性）、形态（杆菌、球菌）、排列（成对、四联、短链或长链等）。
- b) 墨汁染色：描述菌体特征（出芽、荚膜等）。
- c) 六胺银染色：描述肺孢子菌包囊特征（椭圆形或半月形包囊，特征性圆括号样结构的囊壁）。

d) 其他真菌相关染色：描述真菌孢子、菌丝形态以及某些丝状真菌的产孢结构等。

#### 6.2.4.4 可接受标准

半定量染色的结果偏差 $\leq\pm 1$ 判断为结果一致。革兰染色、抗酸染色项目符合率应为100%；其他少见染色项目符合率 $\geq 80\%$ 即合格。

### 6.3 自动化染片机的性能验证

#### 6.3.1 验证时机

自动化染片机在投入使用前应通过性能验证。仪器搬迁、仪器故障维修后、仪器更新升级、更换新品牌的染液，应重新进行验证。

#### 6.3.2 验证标本或菌株

自动化染片机的性能验证宜选择临床标本或菌株（标准菌株、QC菌株或经过明确鉴定的临床菌株）进行性能验证。应满足：

- a) 革兰染色适用于除血液、导管、粪便、喉部标本外的各种标本，至少5份；菌株应覆盖革兰阳性菌、革兰阴性菌，至少5株。
- b) 萋尼法抗酸染色适用于除血液和导管外的各种标本，至少5份；菌株应覆盖抗酸阳性菌、抗酸阴性菌，至少5株。

#### 6.3.3 验证前准备工作

检查仪器状态，包括喷嘴、冲洗管路、容量、废液排空等是否符合要求。

#### 6.3.4 验证方案

##### 6.3.4.1 验证过程

留样标本同时制备两份；菌株选择生长对数期的纯菌落配制0.5麦氏单位菌悬液涂片两份，并分别进行手工染色和自动化染片。

##### 6.3.4.2 镜检与结果记录

分别记录各种菌株、各种标本分别在手工染色和自动化染片两种方法中的实际染色性状。

##### 6.3.4.3 可接受标准

各标本或菌株染色结果与预期染色性能符合率为100%。

### 7 细菌、真菌分离培养的性能验证

#### 7.1 培养基的性能验证

##### 7.1.1 细菌、真菌分离培养常用培养基的性能验证

###### 7.1.1.1 验证时机

培养基的性能验证应在首次启用新种类培养基前和更换厂家或品牌后。

###### 7.1.1.2 验证用标准菌株和培养基

###### 7.1.1.2.1 常用培养基性能验证所使用的标准菌株、性能特点及作用

将不同种属的细菌或真菌接种在相应培养基上，观察细菌或真菌的生长情况及性能特点，进行培养基的性能验证。若不能获得相应标准菌株时，可采用经过准确鉴定并且性能特点符合表3要求的质控菌株或临床分离菌株进行性能验证。常见标准菌株/质控菌株的培养与保存见附录A.1。

表3 常用培养基性能验证所使用的标准菌株、性能特点及作用

培养基	性能验证菌株	性能特点	作用
营养肉汤培养基	金黄色葡萄球菌ATCC 25923	24 h 生长良好	用于标本中各类非苛养细菌的增菌培养
	大肠埃希菌ATCC 25922		
牛脑心浸液培养基	肺炎链球菌ATCC 49619	24 h 生长良好	用于标本中各类营养要求较高的细菌的增菌培养
	流感嗜血杆菌ATCC 49247		
血琼脂培养基	肺炎链球菌ATCC 49619	生长良好, α 溶血, 24 h 菌落大于1 mm, 菌落扁平脐窝状	用于一般病原菌的分离培养、溶血性鉴别及菌种的保存
	无乳链球菌ATCC 13813或化脓链球菌ATCC 19615	生长良好, β 溶血, 24 h 菌落大于0.5 mm	
厌氧血琼脂培养基	脆弱拟杆菌ATCC 25285	48 h 菌落生长良好	用于厌氧菌的分离培养
	产气荚膜梭菌ATCC 13124	48 h 菌落生长, 双溶血环	
巧克力琼脂培养基	流感嗜血杆菌ATCC 49247	生长良好, 24 h 菌落大于1 mm	主要用于嗜血杆菌属的分离培养, 亦可用于奈瑟菌属的培养
淋病奈瑟菌选择培养基	淋病奈瑟菌ATCC 49226	生长, 24 h 菌落大于0.5 mm	可用于淋病奈瑟菌的分离培养
麦康凯琼脂培养基(或中国蓝琼脂培养基)	大肠埃希菌ATCC 25922	24 h 粉红色大菌落(或蓝色菌落)	用于革兰阴性细菌的分离培养及非发酵菌的鉴别
	粪肠球菌ATCC 29212	不生长	
SS琼脂培养基	鼠伤寒沙门菌ATCC 14028	24 h 无色菌落, 有黑色中心	用于粪便标本中沙门菌属和志贺菌属的分离培养
	宋内志贺菌CMCC(B) 51592	24 h 无色透明小菌落	
	大肠埃希菌ATCC 25922	红色菌落, 生长受抑制	
	粪肠球菌ATCC 29212	不生长	
XLD培养基(木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂培养基)	鼠伤寒沙门菌ATCC 14028	24 h 菌落有黑色中心, 培养基红色	用于粪便标本中沙门菌属和志贺菌属的分离培养
	宋内志贺菌CMCC(B) 51592	24 h 菌落呈红色	
	大肠埃希菌ATCC 25922	24 h 菌落黄色, 有白色絮状沉淀	
	粪肠球菌ATCC 29212	不生长	
TCBS琼脂培养基	副溶血弧菌ATCC 17802	24 h 生长良好, 绿色大菌落	用于霍乱弧菌、副溶血弧菌等弧菌属的分离培养
CCFA琼脂培养基	艰难拟梭菌ATCC 43593	厌氧环境下, 48~72 h 菌落生长	用于艰难拟梭菌的培养
双相培养基	金黄色葡萄球菌ATCC 25923	细菌生长时可见液体混浊、液面有菌膜或管底出现絮状沉淀, 固相培养基上有菌落生长	用于正常无菌体液的增菌培养
	大肠埃希菌ATCC 25922		
	(用于苛养菌)肺炎链球菌ATCC 49619		
罗氏固体培养基或分枝杆菌液体培养基 <sup>注</sup>	堪萨斯分枝杆菌ATCC12478	生长粗糙, 黄色菌落, 在预期时间内生长	用于分枝杆菌属的分离培养
沙保弱琼脂培养基	白念珠菌ATCC 90028	生长良好, 白色菌落	分离真菌的常规培养基
念珠菌显色培养基	白念珠菌ATCC 90028	生长良好, 翠绿色菌落	用于分离和鉴定常见念珠菌
	热带念珠菌ATCC 750	生长良好, 蓝色菌落	
注: 如难以获得推荐标准菌株, 可选用如下临床分离的分枝杆菌的一种或多种: 鸟分枝杆菌、胞内分枝杆菌、脓肿分枝杆菌或偶发分枝杆菌, 在预期时间内生长。			

#### 7.1.1.2.2 培养基性能验证数量

对于新启用的培养基, 每种类型使用2个培养基进行性能验证。如为选择性培养基, 应覆盖不同生长特性的菌株。

#### 7.1.1.3 验证方案

##### 7.1.1.3.1 验证过程

根据培养基种类选择合适的验证菌株, 复苏、传代以获得新鲜的纯菌落。挑取纯菌落, 按实验室操作程序规定的方法进行接种和培养, 在相应的培养条件、培养时间内进行结果观察和记录。

### 7.1.1.3.2 可接受标准

标准/质控菌株在相应培养基上生长，若符合性能特点，验证通过，可用于临床标本检测。如果直接接种法时，验证未通过，则改用标准化菌悬液进行再验证，以满足性能特点的要求。未进行性能验证或性能验证未通过的培养基不能用于临床检测。

## 7.2 自动化接种仪的性能验证

### 7.2.1 验证时机

自动化接种仪在正式投入使用前应进行性能验证。仪器主要部件故障、升级等情况时也应进行性能验证。

### 7.2.2 验证标本

实验室应至少对其所用自动化接种仪接种的标本类型进行性能验证。对于痰、粪便等质地较为粘稠的标本，在采用自动化接种仪接种之前，应做好标本的前处理。对于脑脊液等量少的标本、体积较小的活检组织以及导管等标本不宜使用自动化接种仪进行接种。

标本数量：模拟标本10个，临床标本（包括尿、痰、胸腹水等）10个。

### 7.2.3 验证方案

#### 7.2.3.1 验证过程

首次对自动化接种仪进行性能验证应以手工接种法为参照，比较其对标本分离的有效性。即对同一标本，分别采用两种方法（仪器法和手工法）进行接种，对最终分离出的菌种数、每种菌的单个菌落数量、定量或半定量结果分别进行统计学比较。

对于尿液，可使用生理盐水，将大肠埃希菌ATCC 25922配制成不同浓度（ $10^3$  CFU/mL、 $10^4$  CFU/mL、 $10^5$  CFU/mL和 $10^6$  CFU/mL）的菌悬液，制作成模拟标本，分别使用密涂法进行接种，并与仪器法的定量结果进行比对。

#### 7.2.3.2 结果判读

##### 7.2.3.2.1 尿液和肺泡灌洗液标本

在接种相同浓度菌悬液的情况下，进行菌落计数，比较仪器法和手工法的差异。

##### 7.2.3.2.2 除尿液和肺泡灌洗液外的其他类型标本

半定量结果判读标准如下：只在一区有菌落生长为+；只在一区和二区有菌落生长为++；同时在一区、二区和三区有菌落生长，且三区的菌落数 $<5$ 个为+++；同时在一区、二区和三区有菌落生长，且三区的菌落数 $>5$ 个为++++。

确定半定量结果之后，比较仪器法和手工法的差异。

#### 7.2.3.3 可接受的标准

对于尿液和肺泡灌洗液等定量标本，若仪器法的菌落计数结果与手工法在同一数量级，则视为性能验证通过；对于其他半定量培养标本，若仪器法的半定量结果与手工法相差一个+，则视为性能验证通过。

## 7.3 全自动血培养系统的性能验证

### 7.3.1 验证时机

全自动血培养系统的性能验证应在新系统投入使用前、系统主要部件故障、系统整体更新或升级后进行，评估与全自动血培养系统配套使用的血培养瓶以及相应的自动化监测设备是否能在规定时间内检出临床常见微生物（包括需氧菌、厌氧菌、苛养菌、酵母菌等）。

### 7.3.2 验证菌株

标准菌株、QC菌株及经过明确鉴定的临床菌株均可用于对全自动血培养系统的性能验证。

验证每类血培养瓶的菌株数均应至少5株。需氧瓶和儿童瓶均应覆盖专性需氧菌、兼性厌氧菌、苛养菌和酵母菌4个种类；厌氧瓶应覆盖专性厌氧菌和兼性厌氧菌2个种类；真菌瓶应覆盖酵母菌和兼性厌氧菌，分枝杆菌瓶应覆盖分枝杆菌属细菌（表4）。具体菌株可以不限于表4中所列菌种。

表4 用于不同血培养瓶性能验证的菌株种类和名称

验证用菌株的种类	验证菌株名称	需验证的血培养瓶种类				
		需氧瓶	厌氧瓶	儿童瓶	真菌瓶	分枝杆菌瓶
专性需氧菌	铜绿假单胞菌	√	/	√	/	/
	鲍曼不动杆菌	√	/	√	/	/
专性厌氧菌	脆弱拟杆菌	/	√	/	/	/
兼性厌氧菌	大肠埃希菌	√	√	√	√	/
	金黄色葡萄球菌	√	√	√	√	/
苛养菌	流感嗜血杆菌	√	/	√	/	/
	肺炎链球菌	√	/	√	/	/
酵母菌	白念珠菌	√	/	√	√	/
	近平滑念珠菌	√	/	√	√	/
分枝杆菌属 <sup>注</sup>	慢生长分枝杆菌	/	/	/	/	√
	快生长分枝杆菌	/	/	/	/	√

注：可选用如下分枝杆菌的标准菌株或临床分离菌株，一种或多种：①慢生长分枝杆菌包括鸟分枝杆菌、胞内分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌；②快生长分枝杆菌包括脓肿分枝杆菌或偶发分枝杆菌；或根据产品说明书选择适合的验证菌株。

### 7.3.3 验证方案

#### 7.3.3.1 细菌和酵母菌的稀释和接种

将菌株分别接种至对应的培养基，传代、分纯后并进行系列稀释：首先制成浊度为0.5麦氏单位的菌悬液（细菌浓度为 $10^8$  CFU/mL，酵母菌浓度为 $10^6$  CFU/mL），经适当比例稀释后，获得菌悬液浓度为 $10^2$  CFU/mL，接种适量菌液于血培养瓶中，最终血培养瓶中的菌量为5~30 CFU/瓶。分枝杆菌的培养、稀释应在符合生物安全的条件下进行（参见GB 19489和WS/T 442）。

#### 7.3.3.2 血培养瓶中菌株实际接种量的确定

取上述经过稀释、浓度为 $10^2$  CFU/mL的适量菌液分别接种到合适的平板上，均匀涂布在培养基表面，接种后的平板置于合适的条件下培养，如将嗜血杆菌接种并涂布到巧克力琼脂培养基上，在CO<sub>2</sub>孵箱中培养 24 h~48 h后进行菌落计数。计数得到的菌落数即是实际接种至血培养瓶中的菌量。

#### 7.3.3.3 检测与结果记录

将定量接种菌液的血培养瓶，置于全自动血培养系统内培养。当阳性瓶报警后，转种合适培养基。培养后的纯菌落形态应与接种至血培养瓶前的形态一致，且经鉴定确认菌种的一致性。记录不同菌株实际接种至血培养瓶中的菌量（CFU/瓶）和仪器检测到菌株生长时所需的时间（h）。

#### 7.3.3.4 可接受标准

当全自动血培养系统能够在厂家规定的时间内，80%（5株菌中至少4株菌）以上可准确检出即通过验证。如果验证的5株菌中有≥2株不能在规定时间内检测出来，则视为验证不通过，需要寻找原因，重新进行性能验证。未通过性能验证的设备，不得用于临床检测。

#### 7.3.3.5 需要注意的事项

如下：

- 采用苛养菌做性能验证时，血培养瓶内宜添加适量新鲜、无菌的正常人血或动物血。
- 针对厌氧菌进行性能验证时，尽可能减少厌氧菌暴露于空气的时间。
- 对含有抗微生物药物吸附剂的血培养瓶进行药物吸附的性能验证时，应遵从厂家的建议。
- 如果厂商说明书提供了其血培养系统的检出限，实验室宜进行检出限的验证。

## 8 细菌、真菌手工和自动化鉴定系统的性能验证

## 8.1 手工、半自动和自动化鉴定系统

### 8.1.1 验证时机

实验室引入新的商品化检测系统，使用前应进行全面验证。

实验室使用中的检测系统，对样品类型、试剂、数据库、分析软件和硬件等进行升级后，在原有检测病原谱基础上增加新的病原体扩大检测范围后，应进行部分验证（表5）。

表5 微生物鉴定系统和药敏检测系统性能验证设计要求

验证类型	系统更改类型	验证建议	QC建议
全面验证	引入新检测系统	<b>准确度:</b> 至少30个临床菌株; 与现有系统或参考方法进行比较, 每种药30个结果 <b>精密度:</b> 测试5个菌株(QC和/或临床菌株), 重复检测3次 <b>附加试验:</b> 具有已知耐药表型的其他临床菌株	a) 执行验证方案前, 系统应通过QC的最低可接受标准 b) 验证期间, 执行日QC方案 c) 转周质控前, 应执行20天或30天QC方案或15天重复QC方案
	引入不同制造商的检测系统		
	使同一制造商的不同型号仪器		
	改变检测手段, 如从常规方法变更为MALDI-TOF MS <sup>注1</sup> 的方法、手工系统变更为自动化系统等		
	使用新的检测板条		
部分验证	检测系统在现有系统上进行修改, 如: 更改某组分配方、扩充鉴定的病原谱、增加新的药物或设备重大修理等	<b>准确度:</b> 至少10个临床菌株, 新药耐药株罕见时不必验证 <b>精密度:</b> 1天测试3次QC菌株, 连续检测5天 <b>附加试验:</b> 附加已知新药耐药表型的临床/冻存菌株。新药耐药株罕见时不必验证	a) 验证新药物时, 应执行日QC方案 b) 转周QC前, 执行20天或30天方案或15天重复方案
	引入同一型号的检测系统		
	增加药物稀释浓度以覆盖其新折点	<b>准确度:</b> 至少30个临床菌株; 与参考方法比较 <b>精密度:</b> 1天测试1次QC菌株, 连续检测5天 <b>附加试验:</b> 具有已知新药耐药表型的临床菌株	验证更改稀释度的药物
	增加或减少药物稀释浓度但不更新药物或折点	不适用	执行日QC方案1天后转周QC方案; 但实施周质控需要IQCP <sup>注2</sup>
	软件更新, 如更新或扩展生物信息库、专家系统等	验证实验室信息系统(适用时)	执行连续5天日QC方案, 每天检测1次, 转周QC方案; 但实施周质控需要IQCP
注1: MALDI-TOF MS: Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱。			
注2: IQCP: Individualized quality control plan, 个性化质量控制计划。			

### 8.1.2 验证菌株

结合厂家说明书和本地区/实验室微生物流行病学数据, 选择标准菌株、QC菌株、经质谱或分子等确认DNA序列的临床常见菌(覆盖80%以上种类), 每种鉴定板至少测试30株分离株, 以涵盖最常分离的微生物。适用时, 可增加对少见菌、厌氧菌、苛养菌等的验证。一些大型医院, 其患者复杂、分离的微生物种类多, 这些医院宜纳入更多的菌株。对于特定地区和机构, 考虑到特殊标本不易获取以及患者等因素, 可适当调整验证菌株。

注1: 制造商在设备数据库中列出了可鉴定的微生物清单, 这些微生物可作为验证的目标菌。

注2: 目标微生物范围较窄的检测板(如厌氧菌鉴定卡), 可选3~5株菌。

### 8.1.3 验证方案

#### 8.1.3.1 精密度(再现性)验证

8.1.3.1.1 对于微生物鉴定系统的精密度测试, 应比较患者分离株的鉴定结果, 而不是单独的某一生化反应

全面验证：至少应在三个工作日，重复对五个菌株（QC和/或临床菌株）进行测试。例如，可以选择和测试3个QC菌株和2个临床菌株。由一名或多名操作员进行日间测试。

部分验证：1天测试3次适用于本次方法学变更的QC菌株。

#### 8.1.3.1.2 可接受标准

全面验证：在3个工作日测试5个菌株（QC和/或临床菌株），至少14个鉴定结果一致，验证通过。

部分验证：QC菌株鉴定结果应全部符合。

#### 8.1.3.2 准确度验证

##### 8.1.3.2.1 按厂家说明书对验证菌株进行种属鉴定

鉴定结果与实验室现用方法或参考方法如DNA序列分析比较准确度。如新系统的数据库包括现有系统中未包括的微生物种类，可考虑使用其他方法对这些微生物进行附加测试。

全面验证：至少30个临床菌株；与现有系统或参考方法进行比较。

部分验证：至少10个临床菌株。

##### 8.1.3.2.2 可接受标准

评价鉴定结果符合率时只比对鉴定结果，无需对得分（如鉴定百分率）进行评估。准确度是以正确的或可接受鉴定的菌株数/测试的分离物总数来计算。如果新系统等于或优于现有系统，则认为该测试通过验证。验证的标准/QC菌株准确度应为100%，临床菌株的准确度应在90%以上。

验证未通过时需要采取纠正措施。在采取纠正措施（包括与制造商进行讨论）后，应再次进行验证。

微生物鉴定系统的性能验证指标、要求、方法和可接受标准见附录B.1。

### 8.2 MALDI-TOF MS 质谱鉴定

#### 8.2.1 验证时机

实验室引入新系统时，使用前应进行全面验证。实验室使用 MALDI-TOF MS 后，若对试剂、数据库、分析软件和硬件等进行更换或升级以及扩大检测范围，应进行部分验证。在设备状态、环境、检测方法、人员等维持稳定的情况下，可采用文件和数据审核等定期评审分析系统状态，无需每年实施性能验证。

性能验证包括准确度和精密度。通过 MALDI-TOF MS 和现用方法或参考方法（如测序方法）获得的病原体鉴定结果进行比较以实现准确度验证。精密度验证应包括所有可能存在的主要变量，如不同的培养基、培养条件和提取技术，通常用标准菌株或QC菌株进行精密度验证；应评估批内、批间，操作者之间以及连续几天的重复性或再现性。

#### 8.2.2 验证菌株

选择的菌种应在 MALDI-TOF MS 制造商公布的可鉴定菌谱范围内，包括革兰阳性及阴性球菌、革兰阳性及阴性杆菌、苛养菌、厌氧菌、分枝杆菌属和真菌等。宜覆盖本地区、本实验室以往检出的特殊病原菌，不同地区或专科医院可适当调整。

#### 8.2.3 验证方案

##### 8.2.3.1 准确度验证

###### 8.2.3.1.1 验证过程

全面验证：常见病原菌如革兰阳性及阴性球菌、革兰阳性及阴性杆菌、酵母菌，每类别至少验证30株，厌氧菌、苛养菌、分枝杆菌属（如开展）、丝状真菌（如开展）每种至少10株。比较 MALDI-TOF MS 鉴定结果与实验室现用方法或参考方法（如测序方法）之间的符合率。

部分验证：选择10株以上目标种类病原体。

###### 8.2.3.1.2 可接受标准

验证的标准/QC菌株符合率应为100%，临床菌株的符合率应在90%以上。对质谱技术难以准确鉴定的特定菌种如某些快生长分枝杆菌、链球菌属某些种、志贺菌属等，应在检验程序适用范围中明确告知。

若未能满足上述验证要求，应采取相应措施。修正后的检测系统应再次进行验证。对错误结果的原因分析见附录B.2。

### 8.2.3.2 精密度（再现性）验证

#### 8.2.3.2.1 验证过程

全面验证：选择10个菌株（QC和/或临床菌株），每天重复检测3次，连续3天。

部分验证：1日内重复检测QC菌株（至少革兰阳性菌和革兰阴性菌各一株），3次。

#### 8.2.3.2.2 可接受标准

严格按照制造商使用说明的要求进行结果判读，符合率以最终仪器报告的鉴定结果来评估。菌株鉴定结果符合率应为100%。

## 8.3 血清学鉴定

### 8.3.1 验证时机

验证时机见本标准第5.1条通用要求。

### 8.3.2 验证菌株

血清学鉴定试验包括沙门菌属、志贺菌属等的血清学分型。沙门菌属至少包括伤寒沙门菌、甲型副伤寒沙门菌、乙型副伤寒沙门菌、丙型副伤寒沙门菌；志贺菌属包括福氏志贺菌、宋内志贺菌、痢疾志贺菌和鲍氏志贺菌四种；致病大肠杆菌/弧菌等根据当地卫生行政管理和实验室情况进行选择。

优先选择标准菌株和QC菌株，也可使用实验室确认过的留样临床菌株。本地区常见血清型菌株每种至少1株。

### 8.3.3 验证方案

严格参照实验室操作规程和生物安全要求进行操作（参见GB 19489和WS/T 442）。每次实验以生理盐水作为菌株自凝集对照。

### 8.3.4 可接受标准

要求准确度100%。

## 9 商品化药敏检测系统的性能验证

### 9.1 验证时机

实验室引入经药监部门批准的、未经修改的商品化检测系统时，使用前应进行全面验证。比较新系统与现有系统的全面验证方案示例见附录C表C.1。

实验室使用中的检测系统，对试剂、数据库、分析软件和硬件等进行升级后，增加药物稀释浓度以覆盖药物新折点时，应进行部分验证，详见表5。

### 9.2 验证菌株

#### 9.2.1 菌株的种类

性能验证用菌株应适用于待验证系统且兼顾药敏板的类型、每种药物的抗菌谱、检测的范围。产品说明书中未列出的菌种不列入验证范围。所选敏感和耐药菌株的数量宜均衡；优先使用非冻存的、新鲜的临床菌株；菌株数不够时，也可使用冻存菌株、室间质评或其他来源的菌株。检测前，冻存菌株传代2次，且传代后24 h内使用。

临床菌株包括但不限于以下菌株：

- a) 革兰阳性菌：不同药敏谱型的MRSA、MSSA、凝固酶阴性的葡萄球菌、粪肠球菌和屎肠球菌各2株。
- b) 革兰阴性菌：①含ESBL在内的不同药敏表型谱的大肠埃希菌5~10株；②含ESBL在内的不同药敏表型谱的肺炎克雷伯菌3~5株；③不同药敏表型谱的阴沟肠杆菌、产酸克雷伯菌、弗



劳地枸橼酸杆菌、黏质沙雷菌、摩根摩根菌和普罗威登菌属各 1 株；④不同药敏表型谱的铜绿假单胞菌 4 株；⑤奇异变形杆菌 1 株。

注：MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 苯唑西林耐药的金黄色葡萄球菌；MSSA, methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, 苯唑西林敏感的金黄色葡萄球菌；ESBL, extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, 超广谱  $\beta$  内酰胺酶。

QC 菌株包括但不限于以下菌株：金黄色葡萄球菌 ATCC 29213、粪肠球菌 ATCC 29212、粪肠球菌 ATCC 51299、金黄色葡萄球菌 ATCC 43300、金黄色葡萄球菌 ATCC BAA-977、大肠埃希菌 ATCC 25922、大肠埃希菌 ATCC 35218、铜绿假单胞菌 ATCC 27853 和肺炎克雷伯菌 ATCC 700603。

## 9.2.2 菌株的数量

每种药敏板至少测试 30 株菌。应尽可能选择临床菌株，包括特殊或少见耐药表型菌株，所选 QC 菌株的数量不应超过菌株数量的 50%。

## 9.3 验证方案

### 9.3.1 比对方法的选择

包括参考方法(如微量肉汤稀释法)和其他已验证过的商品化方法。若实验室目前无药敏检测系统，可在新系统上使用已知药敏结果的冻存菌株进行验证；或与通过权威机构认可的实验室联系，将检测结果与该实验室验证过的药敏系统进行比对。

### 9.3.2 准确度、精密度(再现性)验证过程和可接受标准

准确度(CA和EA)和精密度(再现性)验证过程和可接受标准详见表5和附录B表B.1。

### 9.3.3 药敏试验的数据分析和矛盾结果的解决

分析药敏检测系统的结果至少包括CA。如果检测的倍比稀释度有限(如2~3个)，不需评估EA；如果倍比稀释度大于4个，且报告的MIC值可用于指导治疗时，评估EA。分类错误或MIC值差异超过一个倍比稀释度时，保存菌株并补充可能的附加试验。

实验室应重新检测具有主要分类偏差或分类错误的菌株。最好使用相同的接种物同时在两个系统上检测，并重复三次。如重复试验结果仍不一致，使用第三种方法，优选参考方法。

## 10 分子 POCT 系统和部分感染免疫学试验的性能验证

### 10.1 分子 POCT 系统的性能验证

#### 10.1.1 验证时机见本标准第 5.1 条通用要求

#### 10.1.2 验证标本要求

性能验证样品的选择：①可溯源性。可选择标准菌株、获得认证的商品化质控品/标准品，或者经过临床检测阳性的标本。在准备验证标本时，若无法获得足量阳性样品，可采用人工制备样品。若弱阳性标本不好获取，可适当稀释阳性标本。②适用性。要求有代表性的病原体或基因型，对于多重病原体或基因型的核酸检测，应尽量覆盖常见类别。此外，宜选择与临床检测标本具有相同基质的弱阳性样品。③均质性。要求所选样品浓度与预期相符，样品浓度均一。

#### 10.1.3 验证前准备工作

在进行性能验证前，确保仪器状态良好，操作者需经过专业培训。

#### 10.1.4 验证方案

##### 10.1.4.1 定性检测的验证内容包括：符合率验证、LOD 验证和交叉反应。

##### 10.1.4.1.1 符合率验证

##### 10.1.4.1.1.1 验证方案

收集临床标本，应包括阴性（2例）和阳性（3例，其中至少1例为弱阳性）。收集后的标本在一周内检测，结果与已知检测结果进行比对。对于多重病原体或基因型核酸检测，应尽量对常见类别分别进行符合率验证。

#### 10.1.4.1.1.2 可接受标准

检测的阴性和阳性结果与已知检测结果全部一致，即符合率符合要求。

#### 10.1.4.1.2 LOD 验证

##### 10.1.4.1.2.1 验证方案

将一份已知定值的标准品或已用其他方法准确标定浓度的临床标本，稀释到说明书申明的LOD，重复测量20次，也可采用重复检测5次。

##### 10.1.4.1.2.2 可接受标准

重复检测5次时，要求100%检出。重复检测20次，要求 $\geq 17$ 次检出。

#### 10.1.4.1.3 交叉反应

##### 10.1.4.1.3.1 验证方案

产生交叉反应的靶物质可能包括导致类似临床表现的病原以及遗传相关物质。为了评估潜在交叉反应，可以在特定的已知患者标本中加入与之密切相关的病原样品，其浓度水平能代表或超出患者标本中可能出现的水平。

向阴性患者标本中添加密切相关的病原样品，重复检测5次。

##### 10.1.4.1.3.2 可接受标准

检测结果全部为阴性时，则该方法抗交叉反应能力符合要求。

#### 10.1.4.2 定量检测的验证内容包括：正确度、精密度、线性区间和 LOQ 验证。

##### 10.1.4.2.1 正确度验证

##### 10.1.4.2.1.1 验证方案

一种方法是采用参考材料，可来源于室间质量评价正确度验证计划、厂家提供的正确度验证计划的质控品、其他第三方供应商提供等。至少选择两个浓度水平的参考材料，对每个参考材料分别重复测量3次，比较均值与标定浓度值，计算偏倚。

另一种方法是采用患者诊断明确的标本，收集临床标本20例，标本的浓度尽量涵盖线性范围。收集后的标本在一周内集中检测，每个标本重复检测2次。取均值与原检测结果进行比对。计算两者线性相关系数（R），并进一步计算两者各自的回归曲线。分别计算当检测值 $\log_{10}=3、4、5、6、7$ 时的允许总误差（total error, TE）。计算 $TE = \text{偏倚 (Bias)} + 3CV$ （此处 CV 采用精密度性能评估中精密度值）。

##### 10.1.4.2.1.2 可接受标准

与目标TE比较（目标TE为厂商允许的总误差10%）， $TE < 10\%$ 表示可接受。

##### 10.1.4.2.2 精密度验证

##### 10.1.4.2.2.1 验证方案

连续5天，每天检测1个分析批次，浓度水平选择4~5倍LOD，对样品每天重复检测5次，数据通过 $\log_{10}$ 转换后使用，收集 $5 \times 5 = 25$ 个有效数据，并通过统计分析评价方法计算精密度值（精密度值=标准偏差/计算结果的算术平均数 $\times 100\%$ ）。

##### 10.1.4.2.2.2 可接受标准

与试剂说明书上的允许范围进行比较，判断结果是否可接受。

##### 10.1.4.2.3 线性区间验证

#### 10.1.4.2.3.1 验证方案

常用方法为选取一份结果接近线性范围上限的患者标本,用正常人阴性标本按1:10、1:100、1:1000、1:10000、1:100000系列稀释(比制造商声明的分析测量低限低一个数量级),可选择5~7个浓度水平,以稀释计算值作为理论值,各稀释样品的实测值与理论值进行回归分析,对每个样品进行检测,经统计后拟合回归线 $y=bx+a$ 。

#### 10.1.4.2.3.2 可接受标准

将拟合回归线的相关系数 $r \geq 0.975$  ( $r^2 \geq 0.95$ ),  $b$ 值在 $1 \pm 0.05$ 范围作为判断标准。

#### 10.1.4.2.4 LOQ 验证

##### 10.1.4.2.4.1 验证方案

将一份已知定值的标准品或可以量值溯源的定值质控品,稀释到说明书申明的LOQ,重复测量20次。

##### 10.1.4.2.4.2 可接受标准

每个样品的检测结果与该样品的参考值(或均值)的偏差和误差目标进行比较,要求 $\geq 17$ 个检测结果满足上述要求。

### 10.2 部分感染免疫项目的性能验证

#### 10.2.1 验证项目和验证时机

##### 10.2.1.1 验证项目

定性项目主要包括:隐球菌荚膜多糖抗原检测、肺炎链球菌抗原检测、A群链球菌抗原检测、嗜肺军团菌抗原检测、曲霉半乳甘露聚糖检测(GM试验)、艰难拟梭菌毒素A/B检测等。

定量项目主要包括:真菌(1-3)- $\beta$ -D葡聚糖检测(G试验)等。

##### 10.2.1.2 验证时机见本标准第5.1条通用要求

##### 10.2.2 验证前准备工作见本标准第10.1.3条

#### 10.2.3 验证方案

10.2.3.1 定性检测的验证内容包括:符合率验证,精密度(重复性)验证,临界值和检出限验证和抗干扰能力。

##### 10.2.3.1.1 符合率的验证

###### 10.2.3.1.1.1 验证方案

选取标准品或临床标本,其中阴性2份、阳性3份,共5份样品,按照患者标本检测程序进行检测。

###### 10.2.3.1.1.2 可接受标准

要求符合率为100%。

##### 10.2.3.1.2 精密度(重复性)验证

###### 10.2.3.1.2.1 验证方案

选取标准品或临床标本,阴性1份、弱阳性1份及阳性1份,共3份样品,按照患者标本检测程序,每个样品重复检测3次,连续检测5天。在每一批次测量中,应同时测量质控品。

###### 10.2.3.1.2.2 可接受标准

可接受标准为所用厂商检验方法声明的标准。若无可用的厂商标准时,实验室可根据临床诊疗的质量要求确定可接受标准。

###### 10.2.3.1.3 临界值和检出限验证

#### 10.2.3.1.3.1 验证方案

选取处于临界值的标准品或临床标本，检测20次。选处于临界值+20%和临界值-20%（可根据试验适当调整，或采用厂商规定的灰区上限和下限）的标准品或临床标本，检测10次。

#### 10.2.3.1.3.2 可接受标准

临界值标准品或临床标本检测20次，阴性/阳性次数均在7~13次之间，则符合要求。临界值+20%的标准品或临床标本检测10次，阳性次数应 $\geq 9$ 次。临界值-20%的标准品或临床标本检测10次，阴性次数应 $\geq 9$ 次。

#### 10.2.3.1.4 抗干扰能力

验证时应排除实验已知或厂家声称的干扰物质的影响。

10.2.3.2 定量检测的验证内容包括：正确度、线性区间和可报告范围验证，精密度验证和抗干扰能力。

#### 10.2.3.2.1 正确度、线性区间和可报告范围验证

##### 10.2.3.2.1.1 验证方案

无参考方法时，可使用实验室普遍认可的方法作比对。

选择5份标准品或临床标本（可进行稀释），浓度在测量区间内均匀分布，应覆盖定量限（低限和高限），并关注医学决定水平。在相同时段内完成5个浓度的检测，每个浓度重复检测3次，计算每个浓度检测结果的均值、偏倚、SD、CV值。对高值样品，计算乘以稀释倍数后的还原浓度和相对偏差。所有样品应在一次运行中或几次间隔很短的运行中随机测定，最好在1天之内完成。验证正确度、线性区间和可报告范围。

##### 10.2.3.2.1.2 可接受标准

正确度应该以室间质评结果为标准，线性区间和可报告区间参考厂商说明书。

#### 10.2.3.2.2 精密度验证

##### 10.2.3.2.2.1 验证方案

应至少评估低值和高值2个水平样品的精密度。

重复性和中间精密度：每天检测1个分析批，每批检测2个水平的样品，每个样品重复检测3次，连续检测5天。在每一批次测量中，应同时测量质控品。

##### 10.2.3.2.2.2 可接受标准

不超过总允许误差的1/3。

#### 10.2.3.2.3 抗干扰能力

验证时应排除实验已知或厂家声称的干扰物质的影响。

## 附录 A

(资料性)

## 常见标准菌株/质控菌株的培养与保存方法

临床常见标准菌株、质控菌株的培养与保存方法见表A.1。

表A.1 常见标准菌株/质控菌株的培养与保存方法

菌株	培养基	培养条件及时间	保存方法(介质)	保存温度	保存期限
流感嗜血杆菌	巧克力琼脂培养基	5%~10% CO <sub>2</sub> , 35℃~37℃, 18h~48h	冷冻保存法(冻存于脱纤维羊血或脱脂牛奶)	不高于-20℃	6个月
葡萄球菌属、链球菌属	血琼脂培养基	5%~10% CO <sub>2</sub> , 35℃~37℃, 18h~24h	冷藏保存法(高层加液体石蜡)	4℃~8℃	1~3个月
肠杆菌目	血琼脂培养基	5%~10% CO <sub>2</sub> , 35℃~37℃, 18h~24h	冷藏保存法(高层加液体石蜡)	4℃~8℃	1年
肠杆菌目、非发酵菌、葡萄球菌属等	牛肉汤	35℃~37℃, 18h~24h	冷冻保存法(冻存于10%~15%甘油肉汤)	不高于-20℃	6个月
布鲁菌属、鲍特菌属、军团菌属等苛养菌	5%小牛血清肉汤	35℃~37℃, 18h~24h	冷冻保存法(冻存于10%~15%甘油肉汤)	不高于-20℃	6个月
分枝杆菌属	罗氏固体培养基或分枝杆菌液体培养基	35℃~37℃, 罗氏固体培养基1W~8W, 或分枝杆菌液体培养基3d~6W	冷藏保存法(高层加液体石蜡)	4℃~8℃	3个月
奈瑟菌属	淋球菌琼脂培养基	5%~10% CO <sub>2</sub> , 35℃~37℃, 24h~48h	冷冻保存法(冻存于脱脂牛奶)	不高于-20℃	6个月
厌氧菌	厌氧血琼脂培养基或CCFA琼脂培养基	厌氧环境, 35℃~37℃, 48h~72h	冷冻保存法(冻存于脱脂牛奶)	不高于-20℃	6个月
酵母菌	沙保弱琼脂培养基	25℃~30℃, 35℃~37℃, 1d~7d(慢生长真菌1W~4W)	冷冻保存法(10%~15%甘油真菌营养培养基)	不高于-20℃	数年至十余年
	沙保弱琼脂培养基	25℃~30℃, 35℃~37℃, 1d~7d(慢生长真菌1W~4W)	无菌水	室温	数年
丝状真菌	沙保弱琼脂培养基	25℃~30℃, 35℃~37℃, 1d~7d(慢生长真菌1W~4W)产孢子的真菌需形成成熟的孢子, 不产孢子的真菌需生长出健壮的菌丝	冷冻保存法(10%~15%甘油真菌营养培养基)	不高于-20℃	数年至十余年
	沙保弱琼脂培养基	25℃~30℃, 35℃~37℃, 1d~7d(慢生长真菌1W~4W)产孢子的真菌需形成成熟的孢子, 不产孢子的真菌需生长出健壮的菌丝	无菌水	室温	数年

注: 部分真菌例如毛癣菌属, 不适用-80℃低温冷冻保存法。

## 附录 B

(资料性)

## 微生物鉴定系统和药敏检测系统性能验证

B.1 微生物鉴定系统和药敏检测系统的性能验证指标、要求、方法和可接受标准见表B.1。

表B.1 微生物鉴定系统和药敏检测系统的性能验证指标、要求、方法和可接受标准

性能指标或参数		微生物鉴定系统性能验证	药敏检测系统性能验证
准确度	目标	1. 与比对方法的一致性 2. 细菌/真菌正确鉴定准确度	1. CA (S/ I或SDD /R) 2. EA (MIC, 适用时) ①CA可接受时, 不评估EA ②若仅检测有限的倍比稀释度 (如2~3个), 不评估EA ③若倍比稀释度>4个, 且报告的MIC值可用于指导治疗时, 应评估EA
	检测方法	比较新系统和现有系统	应评估每种抗菌/真菌药物的CA和EA
	菌种和数量	临床菌株或冻存菌株, 实验室常规分离菌种占80%~90% 1. 全面验证: 应至少30个临床菌株 2. 部分验证: 应至少10个临床菌株	临床菌株和冻存菌株 1. 全面验证: 应至少30个临床菌株 2. 部分验证: 应至少10个临床菌株
	可接受标准	准确度: 验证的标准/QC菌株准确度应为100%, 临床菌株的准确度应≥90%	针对特定药物/菌株组合的检测系统, 应符合: ①当与现有系统比较时, CA≥90%和EA≥90% ②所有耐药菌株的 VMD 或 VME<3% ③所有敏感菌株的 MD 或 ME<3% 若上述任意一条未满足时, 宜增加附加测试: 重复检测结果不一致的菌株、检测额外的菌株或与参考方法进行比较
精密度 (再现性)	目标	可重复性	1. S/I或SDD/R <sup>±</sup> 结果解释的可重复性 2. MIC值的可重复性, 可接受误差: ①细菌: ±1个梯度稀释度 ②真菌: ±2个梯度稀释度
	检测方法 (包括菌株数量)	1. 全面验证: 5个菌株 (QC和/或临床菌株), 连续测3天 2. 部分验证: 1天测试3次适用于本次方法学变更的QC菌株	1. 全面验证: 5个菌株 (QC和/或临床菌株), 连续测3天 2. 部分验证: 1天测试3次适用于本次方法学变更的QC菌株 新系统: 每株菌采用三份独立的接种物, 同一天或不同天进行检测。现有系统: 不必进行精密度验证。当新系统某一菌株检测结果不可重复时, 应在现用检测系统重新检测。当现有系统的结果仍不可重复, 更换菌株重新进行性能验证
	可接受标准	1. 全面验证: 在3个工作日测试5个菌株, 至少14个鉴定结果一致 2. 部分验证: QC菌株鉴定结果符合率应为100%	EA≥95% ≥95%QC菌株的结果在QC规定的范围内
可报告范围	建议	厂商数据库提供的可鉴定菌种范围	不适用
矛盾结果解决		1. 应重新检测CA不一致的菌株 2. 宜使用相同的接种物同时在两个系统上进行三次重复性检测 3. 当重复试验结果仍不一致时, 采用第三种检测方法, 优先选择参考方法	
注: S, susceptible, 敏感; I, Intermediate, 中介; SDD, susceptible-dose dependent, 剂量依赖性敏感; R, resistant, 耐药。			

B.2 质谱检测系统常见鉴定错误原因见表B.2。

表B.2 质谱检测系统常见鉴定错误原因

异常情况	可能原因	解决方法
多个鉴定结果	样品不纯	挑取纯菌落或重新分纯后进行鉴定
	靶板、试剂导致交叉污染	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 重新配置试剂</li> <li>• 使用标准流程清洗后的靶板进行鉴定</li> </ul>
	质谱仪应用局限性	选取相应菌种进行补充试验或报告结果
图谱质量差/图谱无峰	样品未选择合适的前处理方法	针对不同样品采用合适的样品前处理方法
	基质未添加或浓度过低	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 重新添加基质</li> <li>• 检查基质是否有结晶析出，超声重新溶解或重新配置新基质溶液</li> </ul>
	涂菌过厚或过薄	重新制备样品，挑取少量菌落薄膜状涂抹
	粘液型细菌	重新制备样品，拂去表层粘液，取下层样品涂抹
	菌种老化或低温保存	重新传代培养新鲜菌种
鉴定分值低	靶板不平或有刮痕	更换靶板或靶位
	质量轴偏移	按照标准流程校准仪器
	未选择正确的比对数据库	按照标准流程选择正确的数据库
	样品不纯或交叉污染	重新分纯或重新配置试剂、清洁靶板
	数据库内无参考株	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 选择其他微生物鉴定方法</li> <li>• 可按照标准流程自建数据库</li> </ul>

## 附录 C

(资料性)

## 全自动微生物药敏检测系统性能验证示例

C.1 比较新系统与现有系统的全面验证方案见表C.1。

表C.1 比较新系统与现有系统的全面验证方案

权限说明	新系统未经实验室负责人批准和未进行系统性能验证，不应用于临床检测			
目的	证明新系统在用于临床检测之前达到厂商声称的可接收的性能标准			
	<b>条目</b>		<b>内容</b>	
现有系统：甲制造商，A仪器	软件版本号			
	现有的板条列表			
	测试板条说明书（附件形式）			
新系统：乙制造商，B仪器	软件版本号			
	新的板条列表			
	测试板条说明书（附件形式）			
	<b>菌种及耐药表型菌种列表</b>	<b>鉴定系统（适用时）</b>		<b>菌种名称和数量（株）</b>
		菌株要求：		
		· 实验室常规分离菌种		
		· 新鲜或冻存菌株		
		· 验证药敏检测系统的菌株应同时验证鉴定系统的性能		
		· 鉴定数据库内菌种		
		<b>药敏系统（适用时）</b>		<b>菌种名称（耐药表型）和数量（株）</b>
菌株要求：		<b>一、临床菌株</b>		
· 30个结果/每板条/每药物		<b>1. 革兰阳性菌（耐药表型）</b>		
· 18 h~24 h新鲜菌株				
· 冻存菌株测试前应在非选择性培养基进行二次传代培养		<b>2. 革兰阴性菌（耐药表型）</b>		
· 具有已知耐药表型的临床代表菌株				
· 应在同一天选取同一菌株的相同接种物在新系统和现有系统并行检测		<b>二、QC菌株（新系统验证期间每天检测推荐的QC菌株。现有系统执行常规QC）和数量（株）</b>		
· 每天检测QC菌株		<b>1. 革兰阳性菌</b>		
· 保存所有菌株直到结果审核和验证通过		<b>2. 革兰阴性菌</b>		
		<b>三、附加菌株（附加测试，具有已知耐药表型的临床菌株）</b>		
待验证的板条列表或菌种列表				
现有系统的新功能（如新的抗菌药物）				
用于验证的补充方法				
验证前程序	新系统或系统更改后是否匹配实验室信息系统和电子病案系统的需求			
	验证人员名单			
	人员培训内容及日期			
	性能验证前QC菌株、结果（若失控，记录失控原因分析）			
	数据收集方式及分析方法			
验证程序	<b>测试参数和可接受标准</b>		<b>检测方法</b>	
	准确度（可接受标准：CA $\geq$ 90%，EA $\geq$ 90%）		评估每一种抗菌药物的CA和EA	
	精密性（可接受标准：EA（ $\pm$ 1个梯度稀释度） $\geq$ 95%）			
	矛盾结果的解决方法			
		<b>结果</b>		



## 参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会医政医管局. 全国临床检验操作规程(第四版). 北京: 人民卫生出版社, 2015.
- [2] Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Verification of Commercial Microbial Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing Systems, M52, 2015.
- [3] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 下呼吸道感染细菌培养操作指南: WS/T 499-2017. 2017.
- [4] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 侵袭性真菌病临床实验室诊断操作指南: WS/T 497-2017. 2017.
- [5] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 细菌性腹泻临床实验室诊断操作指南: WS/T 498-2017. 2017.
- [6] 王辉, 马筱玲, 宁永忠, 等. 细菌与真菌涂片镜检和培养结果报告规范专家共识. 中华检验医学杂志, 2017, 40(1): 17-30.
- [7] 周庭银, 倪语星, 胡继红, 等. 临床微生物检验标准化操作(第三版). 上海: 上海科学技术出版社, 2015.
- [8] 中国合格评定国家认可委员会. 临床微生物检验程序验证指南: CNAS GL028-2018. 2018.
- [9] 国家市场监督管理总局、国家标准化管理委员会. 医学实验室 质量和能力的要求 第6部分: 临床微生物学检验领域的要求: GB/T 22576.6-2021. 2021.
- [10] 王辉, 马筱玲, 钱渊, 等. 临床微生物学手册(第12版). 北京: 中华医学电子音像出版社, 2021.
- [11] Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for the Identification of Cultured Microorganisms Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, 1st Edition, M58, 2017.
- [12] 胡继红, 马筱玲, 王辉, 等. MALDI-TOF MS在临床微生物鉴定中的标准化操作专家共识. 中华检验医学杂志, 2019, 42(4): 241-249.
- [13] 罗燕萍, 徐英春, 王辉, 等. 自建MALDI-TOF MS微生物鉴定数据库专家共识. 中华检验医学杂志, 2019, 42(6): 414-419.