

临床微生物实验室 工作流程、时间节点监控与改进

复旦大学附属中山医院
微生物实验室
鲍容

**工作流程?
时间节点?
持续改进?**

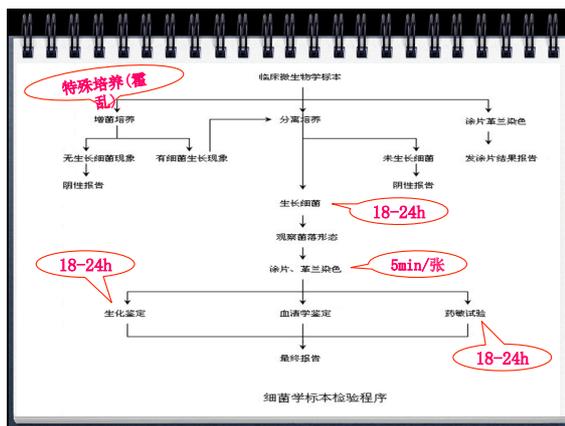
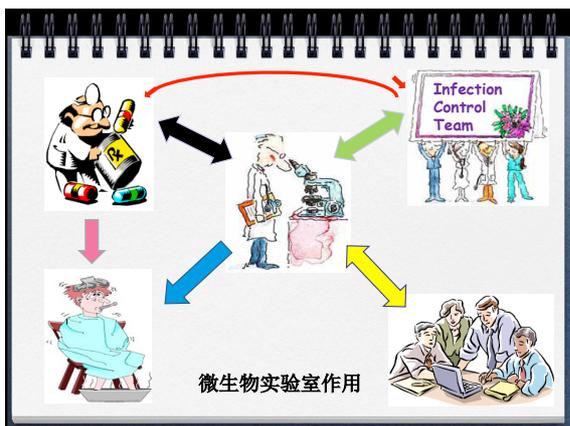
前几天送的标本, 现在才有药敏结果啊, 病人已经走了.....

前几天送的血培养, 怎么还没报告啊...

重症VAP, 用抗生素... 细菌室报告太慢了... 先用哪个啊...

医生啊, 可不可以加急做我的标本, 我付加急费...

结核培养, 60天, 太长了...等结果出来, 我也快了...



怎么办?

软件

硬件

制度

- 标本接收 (1-2min)
 - 标本接种、涂片 (5min)
 - 细菌培养 (18-48h)
 - 细菌鉴定、药敏试验 (18-24h or 48h)
 - 结果报告 (5min)
- 软件 硬件

标本接收



1. 胸水标本，检验项目胸腹水常规，送至细菌室，仅**作废**处理.....
2. 脓液，需氧培养+厌氧培养，置于痰杯送检，仅作需氧培养.....
3. 门诊患者，标本**无任何标识**，送检，无报告.....
4. 手工标号、整理、登记，平板编号，手续**繁琐**.....



1. 安排专人，微生物标本**及时**接收、涂片和接种。
2. 建立院内微生物实验室**信息化**系统，实时查看核对标本状态。
3. 标本**自动**编号，条码打印系统。



信息化系统

标本核对，实时查看标本状态信息。

The image shows two screenshots of a software interface. The top screenshot displays a form for specimen registration with fields for name, date, and ID number (30357). The bottom screenshot shows a similar form with ID number 10442. To the right, a photograph shows a hand holding a petri dish with a barcode label, demonstrating the integration of physical and digital data.

培养基的选择

痰标本

- 血平板 (BP)
- 巧克力平板 (CH)
- 麦康凯平板 (Mac)

抑制C+G，抑制变形杆菌迁徙生长趋势，区分非发酵菌。节省OF等传统生化鉴定时间约一天。

The image displays several petri dishes with different colored agar media. A callout box highlights the benefits of these media for sputum samples, specifically mentioning the inhibition of certain bacteria and the saving of time in biochemical identification.

手工接种 (30s)

V.S.

全自动接种仪 (15s)

This section compares manual and automated inoculation. On the left, a series of images show the manual process of streaking bacteria onto a petri dish, labeled '手工接种 (30s)'. On the right, a photograph of an '全自动接种仪' (Automatic Inoculator) is shown, labeled '全自动接种仪 (15s)'. A 'V.S.' (Versus) symbol is placed between the two to highlight the time difference.

涂片&染色

加热板

涂片无法现涂现象? 临床要求个别关注怎么办?

全自动染片机

The image shows laboratory equipment for staining. A '加热板' (Heating Plate) is used for heat-fixing smears. A callout box asks, '涂片无法现涂现象? 临床要求个别关注怎么办?' (What if the smear cannot be stained immediately? What to do if clinical requirements require individual attention?). Below, an '全自动染片机' (Automatic Staining Machine) is shown, which automates the staining process.

培养

L-J罗氏培养基 (60天)

MGIT 960液体培养基 (42天)

全自动血培养系统

- 孵育和检测同时进行，及时发现阳性结果并报告。
- 无须盲传，减少了血培养污染机会。
- 2天内可报告90%以上的阳性结果。
- 添加多种促细菌生长因子，适合各种细菌的生长。
- 可进行需氧菌、厌氧菌的培养，也可进行结核菌培养。

血培养上机流程

鉴定——特殊染色

墨汁染色

乳酸酚棉蓝染色

鉴定与药敏

传统生化各种试管

生化鉴定板条 (API, ENTEROTUBE)

鉴定与药敏

Phoenix (12h)

MS (1h)

2000年欧洲上市
2001年中国实验室评估完毕, 上市

BD Phoenix™-100

凤凰全自动细菌鉴定/药敏检测系统

最大的标本容量:
对100个标本同时进行鉴定与药敏测试!



BD

先进的鉴定/药敏复合板设计

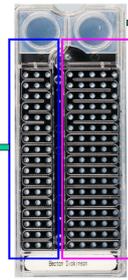
封闭式设计, 安全无泄漏

鉴定部分:

- 51孔鉴定实验
- 改良经典实验
- 显色+荧光检测
- 无需附加实验与试剂

药敏部分:

- 85孔药敏实验
- 比浊+氧化还原 (专利)
- 实测倍比稀释MIC值
- 药物种类与浓度梯度最多
- 耐药机制检测同步进行



BD

Phoenix™100鉴定板

革兰氏阳性板、革兰氏阴性板生化反应组合

Loculus-cool			Loculus-cool			Loculus-cool			Loculus-cool		
A1	B02N	B1	MTY	C1	DYAG	A1	B4L1	B1	CLST	C1	ACT
A2	B02G	B2	IMP	C2	MAI	A2	B02N	B2	OMNT	C2	ADP
A3	B02A	B3	RYE	C3	ORF	A3	B02F	B3	CFE	C3	SEI
A4	B02D	B4	BDCEL	C4	ARABR	A4	B02L	B4	P2R	C4	VGA
A5	B02U	B5	LACT	C5	GLP2B	A5	B02J	B5	LTRY	C5	TIG
A6	B02	B6	B02U	C6	B02C	A6	B02A	B6	LPFR	C6	LYALD
A7	CLST	B7	LPFR	C7	LLERH	A7	B02K	B7	LPFR	C7	B02M
A8	P2R	B8	LPFR	C8	NAG	A8	LARA	B8	LARDN	C8	GLP2B
A9	K2L	B9	PLR	C9	PLR	A9	MROU	B9	PLR	C9	PLR
A10	OMNT	B10	LPFR	C10	LPH2U	A10	NDA	B10	LPFR	C10	GLYR
A11	WAA	B11	LTRY	C11	PHOT	A11	NDA	B11	NAG	C11	ARABR
A12	TRY	B12	PHOS	C12	LHMT	A12	D02T	B12	LETA	C12	LLERH
A13	P02U	B13	WEA	C13	URE	A13	D02C	B13	ORN	C13	URE
A14	PHOL	B14	ADOLU	C14	B02AL	A14	OPH	B14	LPFR	C14	BPHD
A15	VANLA	B15	ALAMH	C15	URE	A15	STU	B15	LOOH	C15	B02U
A16	LPFR	B16	PHO	C16	URE	A16	LARA	B16	ESC	C16	
A17	BT	B17	CLT	C17							

革兰氏阳性菌鉴定板 革兰氏阴性菌鉴定板

鉴定部分:

- 51孔鉴定实验,改良经典实验
- 显色+荧光检测, 无需附加实验与试剂

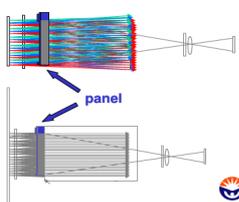
BD

鉴定实验方法

- 在研究了上百种反应底物基础上, 选择了45种反应底物。
- 检测板每20分钟检测一次

Green, blue and red
检测显色反应

UV light
检测荧光反应



BD

药敏实验方法

检测反应孔内微生物生长情况

- 浊度 (传统方法):**
微生物生长形成小颗粒和聚集成团块
- 氧化还原作用 (BD专利技术):**
通过药敏实验指示剂颜色变化检测微生物的新陈代谢
- 浊度与氧化还原的变化通过红、蓝、绿光每20分钟检测一次

仪器判读结果

- 仪器自动记录每次判读的每个反应孔的结果。
- 将反应结果与上一次判读结果进行比较。
- 当两次结果没有差别, 则该反应结束。
- 内置的运算法则: 颜色比率的变化
- 依时间而变的数据库: 2、3、4、6、12小时, 依据每个测试周期的判读结果产生“百分比图”, 如获得足够的信息, 则给出鉴定结果。
- 标准菌量, 可信度 > 90%, 给出结果。

仪器特点

- 同时进行100个样本的鉴定/药敏测试
- 独特的加样方式，准确均匀
- 图形界面，仪器操作简单
- 完备的细菌菌种库
- 药敏实验准确，真正的MIC检测
- 多种细菌耐药机制的检测，延迟耐药检测，无须附加实验
- 完善的专家系统，保障药敏结果的准确性，内置多种标准规则 (NCCLS, DIN, SFM)
- LIS 接口，适应实验室联网需求
- 系统无需特别的维护
- 有中文统计报告软件




VITEK MS

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 技术



MALDI技术的原理

1. 样品与基质，在样品靶表面形成的共结晶薄膜。
2. 激光照射，基质吸收能量。
3. 基质把能量传递给样品分子，将电荷转移给样品，样品电离。

高通量

- 4位技师同步准备
- 4 x 48 spots = 192 标本/批
- 可追溯性及内部质控
- 节省时间



不同鉴定方法时间比较

API — 24~48h

Phoenix — 约15h

MS — 1~2 min

样本号	C17	C45	C55	C61	C67	...
时间	15h 6min	15h 5min	14h 58min	14h 43min	15h 5min	...

1分钟完成1-2个菌株鉴定

工作步骤	时间(分钟)		
	n = 5 标本	n = 24 标本	n = 96 标本
准备标本	1	5	16
准备基质	1	3	10
干燥	2	2	7
读数及分析	5	12	43
总计	9	22	76

VITEK MS 优势

- 更简单：无需革兰染色
- 更灵活：所有的微生物只需简单样品制备，即可鉴定
- 更准确：满足临床+科研的需要
- 更快速：出结果时间以“分钟”计
- 高通量：可同时检测192个样本
- 低耗材成本：可减少一半

样板板有可追 (ISO 15189)



纸片扩散药敏试验 (K-B法)

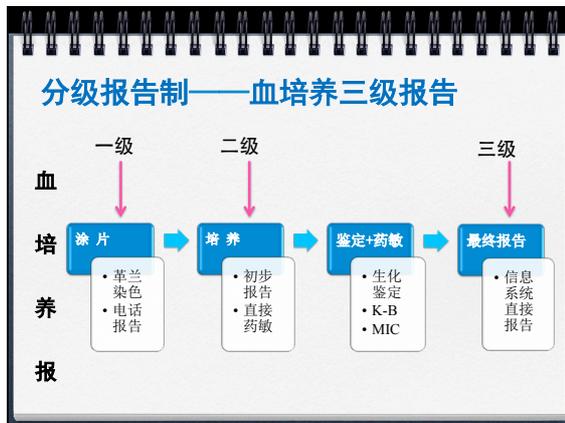
用于葡萄球菌，肠杆菌科细菌，链球菌单菌属，脑球菌，和其他在MH平板上35℃空气中培养生长良好的菌

- #1 用接种环或棉签 挑取4-5个形态 相同的待菌落； 需要纯培养
- #2 将菌液均匀于 5ml的生理盐水中 制成悬液， 均匀的悬液
- #3 用带链条的 卡片比量； 增加量使 加样器能以调整 菌液浓度， 使之达到0.5个 麦氏单位
- #4 将一棉签的 拭子浸泡在 悬液液中， 在试管壁刮去 多余的菌液
- #5 将拭子按画 3个不同的 方向涂3遍， MH平板上形成 一层均匀的 接种层
- #6 在15min 内贴抗生素 纸片
- #7 轻轻按压纸片 以确保 不会掉下来
- #8 36℃ 空气中孵育 16-18小时
- #9 孵育后， 用直尺或游标卡尺 测量抑菌圈的直径， 以毫米为单位 5mm=无抑菌圈
- #10 参照CLSI的标准 解读不同菌 对不同药物的 药敏结果

© Ellen Jo Baron 2007. Use with proper attribution

药敏试验

传统K-B纸片法 —— 抑菌圈直径
 仪器法 (phoenix) —— MIC
 自动药敏加样器 —— MIC
 Biomic软件 —— 自动读取抑菌圈



阳性血培养

需氧瓶: BP、CH
 厌氧瓶: BP、厌氧平板
 真菌瓶: BP、SDA/科玛嘉

厌氧发生袋。

常见念珠菌可由显色情况直接鉴定菌种, 报告临床。节省鉴定时间约24h。

无选择性巧克力平板, 利于苛养菌生长, 降低漏检率。



情景假设

同时有N件事 (血培养报警, 一堆标本, 出报告, 病人取报告), 哪个顺序最好?

- 血培养、标本、报告、病人。
- 标本、病人、血培养、报告。
- 病人、血培养、报告、标本。
- 报告、病人、标本、血培养。



标本送检

Table 1
Median (IQR) laboratory transport time for three tertiary-care hospitals by time of sampling.

	Karolinska University Hospital, Huddinge		Stockholm South General Hospital		Södertälje Hospital	
	No. of samples	Median (IQR)	No. of samples	Median (IQR)	No. of samples	Median (IQR)
Weekdays	274	4 (2-13)	250	8 (3-13)	133	14 (4-18)
Weekends	102	10 (2-15)	98	11 (6-15)	52	17.5 (11-21)
8-16	161	2 (1-3)	117	3 (2-5)	90	18 (4-21)
16-24	154	13 (10-15)	159	13 (11-15)	70	16 (13-17)
24-8	61	6 (4-7)	72	6 (4-8)	25	7 (4-9)

IQR = interquartile range.

Transport time for blood culture bottles: underlying factors and its consequences
— Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 76 (2013) 286-290

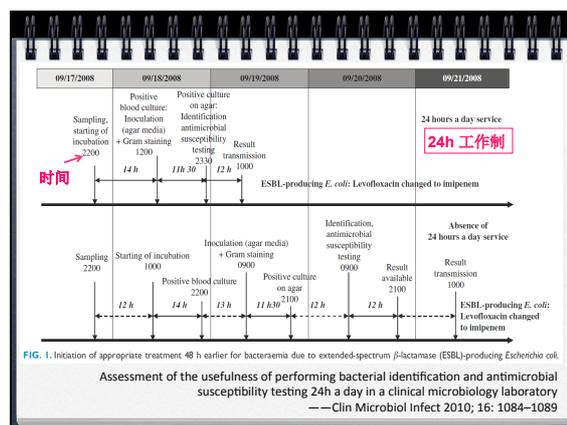


24小时值班制

TABLE 1. Benefits provided by the night service according to the nature of bacteriological samples

Sample	N	Early antibiotic treatment N (days)	Early reduced-spectrum antimicrobial treatment N (days)	Confirmation of appropriate treatment N	Confirmation of the relevance of the absence of antibiotic treatment N
Urine culture	231	48 (48)	1 (2)	74	22
Blood culture	103	39 (51)	16 (20)	44	11
Fluid culture (other)	56	11 (12)	5 (5)	18	4

Assessment of the usefulness of performing bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing 24h a day in a clinical microbiology laboratory
— Clin Microbiol Infect 2010; 16: 1084-1089



微生物实验室制度适合临床需求

- 微生物实验室值班制度保证阳性标本及时处理和危机报告发放, 24h有人值班
- 开展多种病原多种方法的检测项目
- 质量控制的有效性
- 纵览每天的报告单

- 流感的检测**
 - 血清学检测: 需要2周多时间获取结果
 - 病毒培养: 5-10天获得结果, 常常是在患者已经快恢复时
 - PCR: 1-2天获取结果
 - 免疫荧光: 2-4小时
 - EIA: 2小时
- 流感的治疗**
 - 现有抗流感病毒药物有两类: 即离子通道M2阻滞剂和神经氨酸酶抑制剂。
 - 离子通道M2阻滞剂: 有金刚胺 (amantadine) 金刚乙胺 (rimantadine)
 - 神经氨酸酶抑制剂: 奥司他韦 (oseltamivir, 达菲) 和扎那米韦 (zanamivir)。

流感快速检测的意义

- 流感快速检测的**意义**:
 - 及早应用抗流感病毒药物治疗: 抗流感病毒药物治疗只有早期(起病1-3天内)使用, 才能取得最佳疗效。
 - 及早进行患者隔离
 - 减少不必要的抗生素的应用
 - 高致病性禽流感筛查
- 带给患者的**好处**:
 - 获得有效的抗病毒治疗
 - 减少住院天数
 - 减少抗生素使用
 - 减少住院费用



甲/乙感病毒快速检测

- 标本类型**: 鼻咽拭子、鼻腔拭子、鼻洗液或鼻吸出物
- 虽然每年流感病毒毒株在改变, 但是由于该检测**靶向分析流感病毒中的核蛋白**, 因此在**特定浓度**下不受病毒变异的影响。



甲型/乙型流感快速检测性能指标



产品名称	反应时间	敏感性	特异性
甲型/乙型流感	15分钟	甲型81% 乙型65%	甲型97% 乙型100%

如何使用FluA/B test

BinaxNOW® Influenza A & B Test Procedure



采集洗液或洗脱液拭子样本 加入100µl至样品垫 等待15分钟 判读检测结果

BinaxNOW 肺炎链球菌抗原检测试剂盒

优势:

- 快速鉴定肺炎球菌引起的肺炎和脑膜炎
- 使用简便, 15分钟读结果
- 结果不受先前抗生素治疗的影响
- 结果准确可靠, 大大提高了肺炎球菌的阳性检出率



产品	敏感性	特异性
S. Pneumonia test	尿液86% 脑脊液97%	尿液94% 脑脊液99%

如何使用BinaxNOW肺炎链球菌抗原检测试剂盒

Performing the test is easy. Heading the test couldn't be easier.

- Place sample swab into device.  One line = negative 
- Add reagent to swab, then close device.  Two lines = positive 
- Read at 15 minutes. 

加强管理，缩短检验结果报告时间

软件

- 安排专人，微生物标本及时涂片、接种、培养
- 提高技术，注意划线接种技巧，减少菌落纯分
- 学会使用电话报告：如血培养、痰涂片、抗酸杆菌等

硬件

- 选择多种培养基，选择培养基、显色培养基
- 引进更多设备：染片机、血培养仪、MGIT960
- 采用先进的鉴定和药敏设备、试剂，减少补充试验

制度

- 24小时值班、保证周末有足够工作人员
- 调整报告单发放时间：9AM（外科8AM）和4PM前
- 建立院内网络的微生物报告体系，促进分级报告制度

