

出國報告(出國類別: 進修)

美國艾默里大學附設教學醫院
-Grady 紀念醫院微生物科自動化實
驗室進修報告

服務機關: 行政院退輔會台北榮民總醫院

姓名職稱: 吳易企 醫檢師

派赴國家: 美國

出國期間: 101 年 8 月 2 日至 101 年 9 月 23 日

報告日期: 101 年 10 月 19 日

摘要

美國艾默里大學附設教學醫院-Grady 紀念醫院檢驗部門不僅無紙化作業，在微生物檢驗也採用許多自動化儀器，包括檢體接種劃開儀器(automated plate streaker)、自動染片機、自動鑑定及抗生素最低抑制濃度(minimal inhibition concentration, MIC)、自動化分生檢驗儀器、質譜儀鑑定儀器(matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)。利用準確且先進的自動化儀器，在短時間內提供臨床微生物檢驗報告，協助診斷，提供臨床病人最適當的抗生素用藥，提升醫療品質，縮短住院天數，節省醫療資源。

。

關鍵字:

最低抑制濃度(minimal inhibition concentration, MIC)，質譜儀鑑定儀器(matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)

目次

- 一、 目的-----4
- 二、 過程-----5
- 三、 心得-----10
- 四、 建議事項-----11

一、 目的

此次進修選擇美國艾默里大學附設教學醫院-Grady 紀念醫院微生物科，是因為其微生物實驗室自動化現況堪稱先驅，而且 Grady 紀念醫院為美國東南部最具規模的醫院，訓練出各類優秀的醫事人員不計其數。美國疾病管制中心與 Grady 紀念醫院都位於美國喬治亞州亞特蘭市，所以兩單位聯繫頻繁，對於微生物的鑑定與管控共同合作。不僅美國東南部醫院常派人來觀摩學習，台灣疾病管制局也曾派人到 Grady 紀念醫院微生物科進修，是值得學習的對象。

職此次到 Grady 紀念醫院微生物科，最主要目的是學習微生物科檢驗的自動化，希望能改善本院目前微生物科的作業流程，縮短檢驗時間，在最短時間提供臨床微生物檢驗報告，以期能提供病人最適當的抗生素用藥及時間，縮短住院天數，節省醫療資源。

二、過程

1. 檢體收受及簽收

Grady 紀念醫院整個檢驗部門檢體收受窗口設在生化科，生化科 24 小時皆有人上班，檢體處理同仁收到檢體同時就做簽收的作業。檢體上的所貼的條碼貼紙，從檢體採集處產生，不論是門診或護理站或醫院外門診皆採用一致的條碼資訊系統，貼紙上有病人資料、檢體別、檢驗項目、檢體流水號條碼，除了此貼紙無其他醫囑單，也就是無紙化。

各科負責檢體處理之技術員助理自行到生化科拿回檢體並處理。微生物科檢體皆在生物安全操作櫃內處理，其中 swab 及尿液檢體可以由自動劃開機來接種，但 swab 檢體先接種到含無菌水之試管。接著將貼有條碼檢體管送入自動劃開機 previ Isola(圖一)，當儀器掃描到管子上的條碼，會自動印出相同條碼貼紙貼到指定使用之培養基，自動劃開機再以刷子狀劃開器在培養基上做劃開動作，完成後自動送出培養基，再由人員送入適當溫箱培養。

血液培養瓶收到後，在儀器掃條碼處掃瞄血瓶條碼及檢體流水號後，放入血液培養儀器 Bact/ALERT 3D，當有菌生長時，儀器會自動有響聲通知，陰性報告自動由 LIS 發出。

黴菌及結核菌的檢體接種皆在個別獨立的負壓實驗室，其中黴菌的血液培養先將血倒入特定檢體管(Isolator Microbial tube)，離心後，倒掉上清液，取沉澱物劃在黴菌培養基，將培養基封口，放入培養箱培養，這樣可以增加黴菌血液培養陽性率，並縮短培養時間。

結核菌培養，痰檢體消化處理後打入結核菌專用液體培養瓶，血液標本用結核菌專用血液培養瓶，培養儀器用 Bact/ALERT 3D，當有菌生長儀器會自動有響聲通知，陰性報告自動由 LIS(laboratory information system)發出。

2. 細菌革蘭氏染色

Grady 紀念醫院微生物科有自動染色機(previ Color Gram)，除了可讓染色流程標準化，還可以節省染劑。

每個工作站旁就有顯微鏡及電腦，所以看完片子就馬上將結果輸入電腦，檢體送達檢驗部 1 小時之內臨床就有染色報告。

3. 細菌鑑定與藥物敏感度試驗

在 Grady 紀念醫院微生物科有 3 套自動鑑定儀器，分別為 Biomerieux VITEK MS、Siemens Microscan 及 Biomerieux VITEK2，分述如下。

3.1 Biomerieux VITEK MS

為快速鑑定菌種的質譜儀儀器，其原理為 Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight，簡稱 MALDI-TOF(圖二)。在檢體接種到培養基後 20 到 24 小時，若有致病菌生長，且符合鑑定標準，會先取單一菌落，塗到專

用的 slide 上的圓形區域，再加上 2 μ l 的 matrix solution，就可以放入 MALDI-TOF 質譜儀儀器來分析，每個圓形區域分析時間大約 2 到 4 分鐘，就可以得到菌種結果了，非常快速。每片 slide 上面共有 48 個位置，有 2 個位置是要塗上品管菌株 E.coli，所以可以有 46 個位置來塗待測菌株，儀器最多放入 4 片 slide，共有 184 個檢體待測位置(圖三)。因為此台儀器尚未通過美國 FDA 認可，所以目前在 Grady 紀念醫院微生物科是將此快速報告以 presumptive data 在 24 小時內提供給醫師做參考，確認報告及藥物敏感度試驗是在以下兩種儀器執行。

3.2 Siemens MicroScan Walkway 96 S1(圖四)

Siemens MicroScan S96 可同時容納 96 個測試盤，測試盤主要分兩大類，分別是格蘭氏陽性鑑定與藥敏(MIC)，格蘭氏陰性鑑定與藥敏(MIC)，還有針對 *Streptococcus pneumoniae*、*Neisseria-Haemophilus*、*Listeria monocytogenes*、fastidious aerobic gram positive cocci 設計的測試，此儀器利用光學法來測試反應結果。實驗準備步驟如下，取純的待測菌株加到專用的含 3 ml 無菌水瓶，調整菌液濃度到 0.5 McFarland，在將調好的菌液取 100 μ l 到含 10 ml 無菌水瓶，混合均勻，倒入平盤。若遇到小菌落或略過調菌液濃度步驟，可利用 Siemens microscan prompt Inoculation System-D 來沾取 3 個菌落，放入裝有 30 ml 稀釋液瓶。接著利用專用的 Inoculum-D set 吸取菌液到適當的測試盤(圖五)，蓋上蓋子，放入儀器培養 16-24 小時，鑑定與藥敏結果自動回傳到發報告系統。此儀器也有快速鑑定測試盤，大約 2-3 小時會有結果。此儀器的測試盤較大，生化反應試劑及藥敏試劑皆在測試盤上，為乾燥狀態，需要外部手工加入稀釋菌液到測試盤，另外所需耗材較多，但其特性是可以將測試盤放到外部無 CO₂ 的 35 $^{\circ}$ C 培養箱，用肉眼觀察生化反應及藥敏結果，若遇到生長緩慢的菌株，超過儀器測定時間，可以用此方法替代。

3.3 Vitek 2

可分為 60 與 120 兩型，分別可容納 60 及 120 張測試卡片，Grady 紀念醫院微生物科及本科皆是 Vitek 2 60。其測試卡片有格蘭氏陽性鑑定、格蘭氏陰性鑑定、酵母菌鑑定、藥敏試驗，及針對 *Neisseria-Haemophilus*、anaerobic species、gram positive spore forming bacilli 設計的測試卡片，此儀器利用光學法來測試化學反應及藥敏結果。實驗準備步驟如下，取純的待測菌株加到含 3 ml 0.45% normal saline 的塑膠管，調整菌液濃度到 0.5-0.63 McFarland(yeast 1.8-2.2, NH 2.7-3.3)，放到基座上，輸入工作號，掃描卡片條碼，將卡片放入儀器培養及測試 6-8 小時，若遇到生長緩慢的菌株，超過測試時間還沒結果，無法利用外部培養箱繼續培養卡片，用肉眼觀察卡片上生化反應及藥敏結果。

若有需要做某些抗生素的最低抑制濃度，可使用人工方法 E test(E test 藥敏條上面藥物濃度由高到低)，先將菌液塗到 Mueller-Hinton 培養基，再以鑷子夾取 E test 藥敏條鋪上，在無 CO₂ 的 35 $^{\circ}$ C 培養箱培養 16-18 小時後判讀(圖六)。

4. 血液培養

檢體處理人員收到血液培養瓶後，因為從採檢處已貼上條碼，所以簽收後，在儀器掃條碼處掃描血瓶條碼及檢體流水號後，放入血液培養儀器 Bact/ALERT 3D(六個模組，每個模組可放 240 個血液培養瓶)，當有菌生長時，儀器會自動有響聲通知，陰性報告自動由 LIS 發出。培養陽性之血瓶皆在生物安全操作櫃內操作，以避免取樣針插入血瓶時，氣體噴出所造成的生物性危害，而且取樣針一端插入血瓶上部，另一端是鈍端，直接拿起血瓶，就可將血樣本由鈍端滴到培養基及玻片上(圖七)，減少針頭扎傷的危害(本科現行是利用一般的注射筒將血抽出，拔出注射筒，再滴到培養基及玻片上，再回套)。隔天取培養基上之菌落上 MALDI-TOF 做鑑定先給快速報告，以及上 Microscan 做鑑定及藥敏(MIC)。若要在血瓶培養陽性結果當天就上 MALDI-TOF，可以取血瓶血液樣本經過處理再上 MALDI-TOF。

血液培養陰性報告，培養 7 天後沒有菌生長，由 LIS 自動回傳陰性報告。一出現陽性報告，負責同仁在 LIS 輸入初步陽性及染色結果，由檢驗部的客服中心(client service center)負責電話通知臨床。

黴菌的血液培養先用 Isolator tube 處理後，用一般黴菌培養方式，不佔用血液培養儀器的位置(本科目前黴菌的血液培養在 Bact/ALERT 3D 培養 14 天)，也較快得到結果。結核菌血液培養有另外專用的 Bact/ALERT 3D。

5. 厭氧培養

Grady 微生物科的厭氧培養原本也是使用專用的厭氧培養箱，但是後來改用可設定氣體濃度的儀器連接氣瓶及培養缸(jar)，這樣方便拿取要觀察的培養基，不需像專用厭氧培養箱，要先排氣進氣戴連接儀器的手套，再拿培養基到進出口處，既費時又費氣體。而且此儀器可依需求設定氣體濃度，如厭氧(85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂)、microaerophilic(85%N, 25% O₂, 10% CO₂)，適用於 CAMPY 培養基(Campylobacter 專用)。此儀器開始會先偵測培養缸的密閉性，再偵測培養缸內指示劑是否有效，再依設定來調整氣體濃度。厭氧培養 48 小時後觀察，有加種 enriched broth(thioglycollate)，陰性報告第 5 天就可以發。

6. 尿液培養

尿液檢體皆是由自動劃開機(previ isola)在培養基上劃開，依照標準做定量判讀，用的培養基為 BAP 及 MacConkey，若有致病菌生長，挑選菌落上 MALDI-TOF 及 MicroScan 自動鑑定儀器做鑑定及藥敏(MIC)。

7. Exudate 培養

此站檢體有 wound/pus，以及 stool。wound/pus 共使用 4 種培養基，分別是 BAP、chocolate(for Nesseria, Haemophilia)、PEA(inhibit proteus)、MacConkey(for

Gram negative)，不使用 enriched broth，只有眼睛檢體培養基觀察 5 天，其他檢體若隔天培養基沒有長就發 no aerobic growth。若有致病菌生長，挑選菌落上 MALDI-TOF 及 MicroScan 自動鑑定儀器做鑑定及藥敏(MIC)。

Stool 培養針對 Salmonella、Shigella 使用 XLD 及 HE 培養基，並用 selenite enriched broth 35°C 培養後，隔天同樣劃到 XLD 及 HE 培養基，若有生長再用 TSI、Urea 生化管來鑑定及上自動化儀器鑑定，並做血清抗原分類，另外送到州政府實驗室做出種名，做流行病管控。Yersinia 用 CIN 培養基，室溫培養(本科是 35°C 培養)，隔天觀察，若有 dark pink 菌落出現，再進一步用 citrate 生化管來鑑定及上自動化儀器鑑定。Campylobacter 用 Preston 培養基，放入培養缸，以調整氣體濃度的儀器，選擇 microaerophilic，調整好適合 Campylobacter 的氣體濃度(5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂)，放入 42°C 培養箱，48 小時後觀察。Clostridium difficile 在本科用厭氧培養的方式來做鑑定，但在 Grady 微生物科是用免疫反應法偵測 Clostridium difficile 的毒性抗原，當天就可以知道結果，省去耗時的厭氧培養方法。

7. 微生物抗原偵測

利用免疫分析套組來測細菌或病毒的抗原，如下列

7.1 H.pylori Ag

7.2 S. pneumoniae Ag

7.3 Streptococcus B Ag

7.4 N. meningitidis Ag

7.5 Rota virus Ag

7.6 Cryptococcus Ag

7.7 C. difficile toxin Ag

另外有 group A streptococcus、HIV Ab fast screening、H.flu type B Ag，屬於快篩，由生化科執行。

8. 分生方法

檢驗項目如下：

8.1 CEREBROSPINAL FLUID (CSF) HSV, CMV, and EV

8.2 CHLAMYDIA / GC Detection

8.3 HIV-1 RNA PCR (quantitative-viral load)

8.4 HIV-1 DNA PCR (qualitative)

8.5 HCV PCR (quantitative –viral load, genotype).

8.6 HPV

8.7 MTD GenProbe

8.8 HIV western blot

核酸的萃取是使用 Quigen kit，用 Abbott 自動核酸萃取儀器(圖八)，省去人

工操作。

CHLAMYDIA / GC Detection 是使用自動分生儀器 **Gen-Probe**(圖九)，試劑為 **APTIMA® Combo 2 Assay**，也就是同時偵測 *C. Trachomatis* 及 *N. gonorrhoeae*，其原理是複製 *C. trachomatis* 23S rRNA 特定區域及 *N. Gonorrhoeae* 16S rRN 特定區域，再利用標誌冷光的探針(chemiluminescent DNA probes)來結合所複製的產物，再測產物冷光強度來判斷陽性及陰性結果。檢體來源可以是尿液或陰道採檢，所用的檢體容器是專用的。

另外有一台正在測試的分生自動化儀器 **Cepheid geneXpert**(圖十)，是利用 **real time PCR** 的原理，每個檢體所需的試劑皆在一個卡夾槽(cartridge)，只要在生物安全操作櫃內將檢體加入稀釋液處理，再加入卡夾槽(cartridge，圖十一)，放入儀器內，只要 45 分鐘(*C. difficile*)就有報告。職此次在 **Grady** 微生物科，也參與使用 **Cepheid geneXpert** 來鑑定 *C difficile*，並與兩種免疫試劑組套結果做比對。

9. 檢驗部客服中心

此中心成立 4 年，可透過資訊系統看到所有檢驗部的檢驗結果，負責所有臨危值的臨床通知，以及全院血糖機的品管監控等事務。

三、心得

職有此次機會到美國 Grady 醫院微生物科進修，非常感謝長官對醫檢人員進修的重視。本院的微生物科工作負荷大，是大部分醫檢同仁不願意從事的科別，但是職到了 Grady 醫院微生物科，發現微生物科自動化可以改善作業模式，讓同仁有時間思考並進行教學活動，而不是一進入微生物科實驗室，就開始一系列的人工判讀鑑定及測量藥敏結果，到了下午又是人工塗劃藥敏培養基，人工放入藥物紙錠，很多單調劃菌動作是可以用自動化儀器取代。雖然本科在短時間內要完全自動化是很困難，但是可以先買小的塗菌儀器取代人工塗菌。

資訊在任何實驗室都是很重要的，尤其在手工實驗居多的實驗室，良善的資訊系統可以讓同仁使用起來方便，而且可信任度，才能讓同仁願意學習新的資訊系統，全面自動化及無紙化才能順利推行。

四、建議事項

1. 目前本院實施的 BCST(條碼輔助抽血及檢體傳送資訊系統)已臻至成熟，但僅限於抽血項目，若能將各類檢體都納入系統，不僅可全面做到檢體傳送追蹤，杜絕醫囑已被取消卻又採檢所造成的醫療浪費(護理人員人力、採檢容器、檢驗室檢體處理及簽收作業)，微生物科各類檢體容器上能貼上 BCST 條碼，接續所有檢驗作業皆採用此條碼，減少二次編號可能造成的錯誤。

2. 本院微生物檢驗量大，在標本接種應採用自動化接種培養基及劃菌儀器，以確保病人檢體辨識正確，培養基劃菌水準一致，以利接續的鑑定與藥物敏感度試驗。

3. 本院微生物科雖有鑑定及藥物敏感度試驗自動化儀器，但因為成本考量因素，所以大部分仍為人工鑑定及藥物敏感度試驗，耗時費力，不符合檢驗時代潮流及耗用太多人力，以永續經營的角度來看，應盡速全面自動化來做鑑定及藥物敏感度試驗，以期達到提供病人快速且正確的檢驗結果。

4. 本院微生物科的 wound/pus 嗜養培養可考慮不要加種 enrich broth(thioglycollate)，簡化流程。

5. 本院微生物科的 *Yersinia* 培養可考慮改在室溫培養，提高鑑定率。



圖一、檢體處理及自動劃開機 previ Isola



刷子狀劃開器



培養結果



圖二、筆者正在準備上 MALDI-TOF 的檢體，左方儀器即是 MALDI-TOF



圖三、MALDI-TOF 檢體準備過程圖



圖四、Siemens MicroScan Walkway 96 S1



圖五、Siemens MicroScan Walkway 96 S1 檢體準備



圖六、E test MIC 結果



圖七、血液培養瓶與取樣針頭



圖八、Abbott 自動核酸萃取儀器



圖九、自動分生儀器 Gen-Probe



圖十、Cepheid geneXpert



圖十一、Cepheid geneXpert cartridge