

PREVI Isola 自动化微生物接种仪性能评估*

刘文静, 谢秀丽, 宋红梅, 刘世豪, 杨启文, 徐英春 (北京协和医院检验科, 北京 100730)

摘要:目的 评估 PREVI Isola 自动化微生物接种仪的性能。方法 收集北京协和医院送检呼吸道标本 80 份、无菌体液 70 份、粪便 52 份、拭子 69 份、脑脊液 12 份、尿液 80 份。同一份标本分别按照常规手工和 PREVI Isola 接种仪标本操作流程进行接种, 通过与手工法相比, 对 PREVI Isola 进行评估。结果用 SPSS16.0 进行统计分析。结果 PREVI Isola 自动化程度高, 可选择合适的接种平板和贴上标签记录接种平板的类型和接种时间等; PREVI Isola 可精确地吸取标本并使用独特的接种涂布器分离接种, 相当于 17 个接种环并排使用, 划线模式重复性好; 标本分离有效性: 分离得到的菌种数 PREVI Isola 仪器法与手工法呼吸道标本和粪便标本具有统计学差异, 手工法分离得到的菌种数多于 PREVI Isola 仪器法, 其它标本类型两种方法无统计学差异; 均分离菌株单个菌落个数, PREVI Isola 仪器法分离得到菌株单个菌落的个数均多于手工法, 呼吸道标本、无菌体液和粪便标本有统计学差别, 其它 3 种标本拭子、脑脊液和尿液标本无统计学差异; 均能分离得到菌株的半定量结果, 呼吸道标本和尿液标本有统计学差异, PREVI Isola 仪器法分离得到菌株的分布大于手工法。其它标本无统计学差异。接种效率: 如果同批次接种的标本类型比较单一(主要为尿液等液体标本), 且接种的平板类型相同, 则仪器的接种效率比手工法高。如果同批次接种的标本类型比较复杂, 相比手工法仪器的接种效率低; 另外, 并不是所有的标本都适合于用自动化接种仪进行接种, 例如: 脑脊液、导管、组织等。结论 如果实验室的标本类型比较单一, 或优化所需接种琼脂平板类型一致的不同标本同时进行接种, PREVI Isola 是一款高效的自动化接种仪。

关键词: PREVI Isola; 微生物前处理; 自动接种仪

中图分类号: R446 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2016)01-108-04

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-7414. 2016. 01. 031

Evaluation of PREVI Isola Automated Plate Streaker

LIU Wen-jing, XIE Xiu-li, SONG Hong-mei, LIU Shi-hao, YANG Qi-wen, XU Ying-chun

(Department of Clinical Laboratory,

Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the characteristics of the PREVI Isola automated plate streaker (bioMérieux, SA). **Methods** 80 respiratory tract specimens, 70 sterile fluids, 52 stools, 69 swabs, 12 cerebrospinal fluids and 80 urines were collected in Peking Union Mediced College Hospital. Specimens were processed with manual streaking and PREVI Isola system. PREVI Isola system were evaluated comparing to the manual streaking. The quality of results were analyzed by SPSS 16.0, doing Wilcoxon's Sign Rank Test for the results of finally isolated species, overall numbers of isolated colonies and semi-quantitative of the species were both isolated by the two methods. **Results** PREVI Isola system was highly automatic, which could select the right plates and stake the bar code on the back of the plate indicating the type of the agar and inoculation time. PREVI Isola system could accurately absorb the liquid specimen and use a novel comb streaking procedure for processing of fluid specimens on standard agar plates, like 17 inoculating loops work together. It also had a good reproducibility. The quality of PREVI Isola system results: As to the finally isolated species, there was significant statistical difference between PREVI Isola system and manual streaking method in respiratory tract and stools specimen, there were more species isolated by manual streaking method than PREVI Isola system. There were no differences between the two methods for the other of specimen types. As to the amount of pure clones of the species were both isolated by the two methods, there were significant statistical differences between the two methods for respiratory tract, sterile fluid and stool specimens. The amount of clones isolated by PREVI Isola system was more than manual streaking method. In semi-quantitative results, there were significant statistical differences between the two methods for respiratory tract and urine specimen, Species had wider distribution of PREVI Isola system than manual streaking method. Inoculation efficiency: if the batch of specimen type was simple (mainly the urine and so on), using the same plates, PREVI Isola system was more efficient than manual streaking method. However, if the batch of specimen type was complicated, manual method was high-performance. Besides, not all specimen type could be inoculated by PREVI Isola system, such as cerebrospinal fluid, catheter and tissues. **Conclusion** If the lab had simple specimen type, or utilize the specimen type using the same agar plates to be inoculated together, PREVI Isola system belongs to a good performance automated plate streaker.

* 作者简介: 刘文静(1984—), 女, 硕士, 实习研究员, 主要从事临床微生物及分子检验, Tel: 13401082194, E-mail: liuwenjing1220@139.com。

通讯作者: 徐英春(1964—), 男, 本科, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 临床微生物, Tel: 010-69159766, E-mail: xycpumch@139.com。

Keywords: PREVI isola; microbiological pretreatment; automated plate streaker

随着医疗水平的提高,微生物实验室的标本量在逐年提高,现在实验室管理者必须依靠相对较少的人力,甚至在专业技术人员减少的情况下,完成日渐复杂的操作流程。同时,也面临对质量保证及样本到结果可追踪性的更高要求。微生物实验室的前处理过程,近些年由于实验室信息系统(laboratory information systems, LIS)和条码溯源系统的使用,节约了很多的时间,尽管如此花费在接种方面的时间仍占据了24%的工作量^[1~3]。

20年前发明了第一台自动化接种系统,初始的前两代自动化接种仪不能高效、高通量和精确的接种标本,最近各厂家推出了第三代自动化接种仪系统,包括 WASP (Copan), PREVI Isola (BioMerieux), Innova (Becton-Dickinson) 和 Inoqula (Kiestra)^[4]。现将我实验室对 PREVI Isola 自动化微生物接种仪的性能评估总结如下:

1 材料和方法

1.1 研究对象 收集本院临床送检的患者标本^[5],标本类型分布为:呼吸道标本 80 份;无菌体液 70 份;粪便 52 份;各种拭子 69 份;脑脊液 12 份;尿液 80 份。

1.2 试剂和仪器 试验用血琼脂平板、含万古霉素的巧克力琼脂平板、中国蓝琼脂平板、沙保弱琼脂平板(英国 Oxoid 公司);不含万古霉素的巧克力琼脂平板和木糖赖氨酸脱氧胆盐(XLD)琼脂平板均为本实验室制作,分别采用胰蛋白胍大豆琼脂培养基干粉和 XLD 专用琼脂干粉(英国 Oxoid 公司);1 μ l, 10 μ l 接种环(意大利 COPAN 公司);痰消化液 Sputasol(英国 Oxoid 公司);白色真空采血管(BioMerieux);接种涂布器(BioMerieux)。PREVI Isola (BioMerieux)。

1.3 方法

1.3.1 仪器性能评估,主要从以下几个方面进行评估^[6]:①仪器的自动化程度,如标本容器的开盖、关盖和选择合适的接种平板等;②精确的吸取标本和分离接种;③仪器法的接种效率,与手工法进行对比;④标本分离有效性,对同一标本分别采用两种方法最终分离的菌种数、每种菌单个菌落的数量、半定量的结果(只在一区生长为+;只在一区和二区生长为++;同时在一区、二区和三区生长,且三区菌落数 ≤ 5 个为+++;若三区菌落数 > 5 个为++++),用 SPSS16.0 进行 Wilcoxon 符号秩和检验。因 PREVI Isola 为螺旋接种,其三区划分的标准为 $0^\circ \sim 90^\circ$ 为一区、 $90^\circ \sim 180^\circ$ 为二区、 $180^\circ \sim 330^\circ$ 为三区。

1.3.2 标本前处理及接种:手工法和仪器法均一

个平板上接种一个标本,35℃孵育 18~24 h 后观察结果。

手工法:呼吸道标本:用一次性无菌棉签蘸取 Oxoid 痰消化液处理后的标本,涂布于平板第一区,再用 1 μ l 接种环进行三区划线接种。分别接种血琼脂平板、中国兰琼脂平板和含万古霉素的巧克力琼脂平板。尿液标本:尿计数用 1 μ l 接种环垂直蘸取尿液,米字划线后,采用连续划线模式密涂整个血琼脂平板,然后再接连两次旋转 60° 连续划线密涂,进行尿计数。用 10 μ l 接种环垂直蘸取尿液,三区划线接种于中国兰琼脂平板。粪便标本:用一次性无菌棉签蘸取可疑病变部位的粪便,涂抹到平板第一区,然后用 1 μ l 接种环分别接种于 XLD 和中国兰琼脂平板。拭子标本:在拭子中加入 2 ml 生理盐水充分洗脱,用 10 μ l 接种环进行三区划线,分别接种于血琼脂平板和中国兰琼脂平板。无菌体液标本:采用无菌方法用一次性吸管吸取 1~2 ml 无菌体液(用一次性注射器抽取无菌体液阳性培养液)到白色真空管中,用 10 μ l 接种环进行三区划线,分别接种于血琼脂平板和中国兰琼脂平板。

仪器法:将标本转移到白色真空管中(粪便需用 1 μ l 接种环挑取环中心大小的粪便于 1 ml 生理盐水中进行浊化),每个标本用一个一次性吸头吸取 10 μ l 涂布于琼脂平板上,然后用一次性接种涂布器在琼脂板上进行螺旋接种,接种的琼脂平板类型与手工法一致。每接种一个琼脂平板换一个一次性接种涂布器。螺旋接种模式见图 1。仪器法血琼脂平板尿计数的结果解释参考仪器手册。

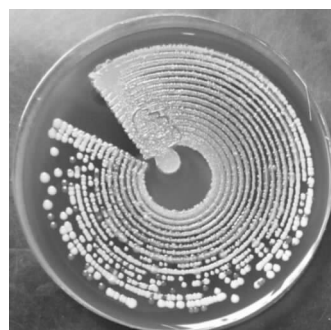


图1 螺旋接种模式

1.3.3 仪器操作主要步骤:在白色真空管管盖上做与条码相关的标记,按接种顺序放置于标本架上,手工开启所有标本的管盖,将管盖倒放于生物安全柜中。每个标本用一个一次性吸头吸取 10 μ l 涂布于琼脂平板上,然后用一次性接种涂布器在琼脂板上进行螺旋接种,仪器首先接种放于第一个舱位的琼脂平板,然后依次接种第二个舱位、第三个舱位和第四个舱位的琼脂平板(平板接种的类型以

标本类型而定),接种完毕后标本架退出到原始位置,最后人工依次将对应的标本管盖盖上。

1.3.4 交叉污染试验:接种一个标本后接种一个无菌生理盐水,35℃孵育 18~24 h 后观察结果,如果接种无菌生理盐水的平板上有菌生长,且为一个标本中的某种菌则为交叉污染试验阳性,无菌生理盐水只接种血琼脂平板。进行该实验的标本分

表 1 手工法和 PREVI Isola 在分离菌种数和分离单个菌落个数方面产生的结果比较

| 分析参数 | 痰标本(n=80) | 无菌体液(n=70) | 粪便(n=52) | 拭子(n=69) | 脑脊液(n=12) | 尿液(n=80) |
|---------------------------|-----------|------------|----------|----------|-----------|----------|
| 手工法比 ISOLA 分离的菌种数多(A1) | 67 | 9 | 31 | 9 | 0 | 9 |
| ISOLA 比手工法分离的菌种数多(C1) | 37 | 13 | 6 | 11 | 0 | 7 |
| 两种方法均未长菌(X) | 26 | 38 | 8 | 46 | 0 | 8 |
| 手工法分离单个菌落个数多于 ISOLA(A)* | 189 | 46 | 77 | 67 | 7 | 63 |
| 两种方法均分离菌单个菌落数量相同(B)* | 59 | 6 | 23 | 19 | 2 | 17 |
| ISOLA 分离单个菌落个数多于手工法(C)* | 263 | 84 | 113 | 60 | 14 | 62 |
| 接种几种琼脂平板共产生的结果(以上几种情况的总和) | 641 | 196 | 258 | 212 | 23 | 166 |

注:* 多生长的菌种不包含在内,() 中字母为原始数据中的标识。

2.1.2 两种方法分离菌种数 Wilcoxon 符号秩和检验结果见表 2。

表 2 手工法和 PREVI Isola 分离菌种数 Wilcoxon 符号秩和检验结果

| 标本类型 | 方法 | n | $\bar{x}\pm s$ | P |
|-------|-------|----|----------------|-------|
| 呼吸道标本 | 手工 | 80 | 7.21±2.893 | 0.016 |
| | ISOLA | | 6.86±3.009 | |
| 无菌体液 | 手工 | 70 | 2.07±1.563 | 0.776 |
| | ISOLA | | 2.13±1.623 | |
| 粪便 | 手工 | 52 | 4.69±2.331 | 0.003 |
| | ISOLA | | 4.29±2.539 | |
| 拭子 | 手工 | 69 | 2.22±1.954 | 0.106 |
| | ISOLA | | 2.35±1.781 | |
| 脑脊液 | 手工 | 12 | 2.17±1.403 | 0.371 |
| | ISOLA | | 2.25±1.545 | |
| 尿液 | 手工 | 80 | 1.89±1.312 | 0.248 |
| | ISOLA | | 1.84±1.297 | |

2.1.3 两种方法均分离菌株单个菌落个数及半定量结果 Wilcoxon 符号秩和检验结果见表 3。

表 3 手工法和 PREVI Isola 均分离菌株单个菌落个数及半定量结果 Wilcoxon 符号秩和检验结果

| 标本类型 | 方法 | 数量(n) | 单个菌落个数 | | 半定量结果P |
|-------|-------|-------|-----------|-------|--------|
| | | | \bar{x} | P | |
| 呼吸道标本 | 手工 | 511 | 17 | 0.000 | 0.000 |
| | ISOLA | | 20 | | |
| 无菌体液 | 手工 | 136 | 35 | 0.002 | 0.353 |
| | ISOLA | | 41 | | |
| 粪便 | 手工 | 213 | 13 | 0.002 | 0.174 |
| | ISOLA | | 15 | | |
| 拭子 | 手工 | 146 | 23 | 0.970 | 0.063 |
| | ISOLA | | 26 | | |
| 脑脊液 | 手工 | 23 | 22 | 0.058 | 0.564 |
| | ISOLA | | 31 | | |
| 尿液 | 手工 | 142 | 22 | 0.580 | 0.014 |
| | ISOLA | | 24 | | |

注:n 为两种方法均分离菌的总数即“A+B+C”。

2.1.4 两种方法均分离菌株半定量结果分布见表 4。

别为:呼吸道标本 59 个、粪便标本 40 个、无菌体液标本 20 个、尿液 12 个、脑脊液标本 2 个。

2 结果

2.1 手工法和 PREVI Isola 自动接种仪两种方法产生结果比较

2.1.1 两种方法在分离菌种数和分离单个菌落个数方面产生的结果见表 1。

表 4 手工法和 PREVI Isola 均分离菌株半定量结果分布

| 标本类型 | 方法 | + | ++ | +++ | ++++ |
|-------|-------|----|-----|-----|------|
| 呼吸道标本 | 手工 | 60 | 115 | 304 | 32 |
| | ISOLA | 56 | 54 | 379 | 22 |
| 无菌体液 | 手工 | 10 | 9 | 70 | 47 |
| | ISOLA | 10 | 6 | 72 | 48 |
| 粪便 | 手工 | 3 | 58 | 143 | 9 |
| | ISOLA | 17 | 14 | 176 | 6 |
| 拭子 | 手工 | 20 | 50 | 65 | 11 |
| | ISOLA | 24 | 19 | 98 | 5 |
| 脑脊液 | 手工 | 4 | 1 | 12 | 6 |
| | ISOLA | 3 | 0 | 15 | 5 |
| 尿液 | 手工 | 17 | 16 | 82 | 27 |
| | ISOLA | 13 | 3 | 102 | 24 |

注: + 只在一区生长; ++ 只在一区和二区生长; +++ 同时在一区、二区和三区生长,且三区菌落数<5 个; ++++ 为三区菌落数>5 个),因 PREVI Isola 为螺旋接种,其三区划分的标准为 0°~90°为一区,90°~180°为二区,180°~330°为三区。

由以上表格可得:

手工法和 PREVI Isola 仪器法在分离菌种数方面,呼吸道标本和粪便标本具有统计学差异,手工法分离得到的菌种数多于 PREVI Isola 仪器法,其他标本类型两种方法 Wilcoxon 符号秩和检验无统计学差异。

手工法和 PREVI Isola 仪器法在均能分离菌株单个菌落个数方面,均是仪器法分离的单个菌落个数大于手工法,但只有呼吸道标本、无菌体液和粪便标本 Wilcoxon 符号秩和检验差异有统计学意义,其他 3 种标本拭子、脑脊液和尿液标本差异无统计学意义。

手工法和 PREVI Isola 仪器法在均分离菌株半定量结果方面,呼吸道标本和尿液 Wilcoxon 符号秩和检验差异具有统计学意义,PREVI Isola 仪器法分离得到菌株的分布大于手工法。其他标本 Wilcoxon 符号秩和检验无统计学差异。

2.2 交叉污染试验 ISOLA 的交叉污染率为 2.3%(3/133),3 个标本分别为粪便 1 份、痰 1 份、粪便 1 份。

3 讨论 PREVI Isola 的性能特点可总结如下:

①自动化程度:PREVI Isola 可以自动选择合适的琼脂平板进行接种,自动对每一个琼脂平板贴条码,自动将需要放于相同孵育条件下进行培养的琼脂平板于不同的舱位输出。②溯源性:在平板接种完成后系统自动打印条码标记每块平板,条码信息包含了患者的姓名、标本 ID 和从 LIS 中导入的信息,标本容器上的信息和琼脂平板上的完全一致,期间无人员的干预,可以保证整个实验过程中信息的准确性。③PREVI Isola 可精确的定量吸取标本和对标本进行分离接种,涂布器上方有一个超声传感器,快速探测琼脂表面高度,优化接种角度,精确地控制接种器的接种压力。同时 PREVI Isola 能够自动根据不同的标本类型采用不同的接种体积和接种器转速,以达到最优的接种效果,且其划线接种模式重复性很好。④仪器的接种效率:PREVI Isola 高通量(180 个标本/h),共有 6 个标本架位置,一次可同时处理多达 114 份标本。如果同批次接种的标本类型比较单一(主要为尿液等液体标本),或者是不同的标本类型但接种的平板类型相同,则仪器的接种效率比手工法高。如果同批次接种的标本类型比较复杂,则增加了受限制的因素,需将标本从不同标本容器中转移到白色真空中,并将不同类型的标本均进行液化处理,进行不同种类琼脂平板的接种,相比手工法,此时仪器的接种效率低;另外,并不是所有的标本都适合于用自动化接种仪进行接种,例如:脑脊液、导管、体积较少的标本和/或较小的活检组织等。⑤标本分离有效性:分离菌种数方面除呼吸道标本和粪便标本外,PREVI Isola 与手工法无统计学差异,可能与这两种标本比较粘稠有关。而在相同菌种分离得到单个菌落个数方面 PREVI Isola 与手工法在呼吸道标本、无菌体液和粪便标本具有统计学差异,可能与 PREVI Isola 使用独特的一次性涂布器环形接种代替传统的手工金属接种环划线接种有关,一个涂布器相当于 17 个接种环并排使用,能更有效利用平板接种面积,从而获得更多单菌落,且易区分不同的菌种。对于脑脊液等标本量较少的标本,PREVI Isola 接种的下限体积为 500 μl ,有时仪器吸液失败,不进行接种,且此类标本一般送检的涂片项目较多需要离心甩片,建议用手工法进行。⑥PREVI Isola 操作界面友好,接种时所有信息整合在一个图形屏幕,清晰易懂、操作简单。触摸屏的操作方式,信息输入很少,只需输入标本信息,上

样后即不再需要人工介入。PREVI Isola 的接种器和吸头都是一次性使用,避免了交叉污染。同时减少接触感染性标本,提高了生物安全性。

综合其他对 PREVI Isola 的评估研究^[7~9],如果 PREVI Isola 能够解决开盖关盖自动化的问题,并且实验室的标本类型比较单一,或不同类型标本但需要接种的琼脂平板类型一致,则可同时进行接种;优化标本接种的顺序也可提高接种效率。总之,PREVI Isola 系统实现了常规操作标准化,可以连接 LIS 系统,直接导入病人与标本信息,优化了现有微生物实验室工作流程,提高了实验室的管理水平,并避免了人为因素,提高了结果的重复性、可比性。未来与质谱技术的联合使用定能使微生物的快速鉴定迎来一个崭新的局面^[10]。

参考文献:

- [1] Willard KE,Shanholtzer CJ. User interface reengineering. Innovative applications of bar coding in a clinical microbiology laboratory [J]. Arch Pathol Lab Med,1995,119(8):706-712.
- [2] Eggert AA,Emmerich KA,Spiegel CA,et al. The development of a third generation system for entering microbiology data into a clinical laboratory information system[J]. J Med Syst,1988,12(6):365-382.
- [3] Aller RD,Friedman W. Rapid accurate entry of microbiology results[J]. Arch Pathol Lab Med,1996,120(1):57-61.
- [4] Dumitrescu O,Dauwalder O,Lina G. Present and future automation in bacteriology[J]. Clin Microbiol Infect,2011,17(5):649-650.
- [5] Jones G,Matthews R,Cunningham R,et al. Comparison of automated processing of flocked swabs with manual processing of fiber swabs for detection of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* [J]. J Clin Microbiol,2011,49(7):2717-2718.
- [6] Greub G,Prod'homme G. Automation in clinical bacteriology: what system to choose? [J]. Clin Microbiol Infect,2011,17(5):655-660.
- [7] Glasson JH,Guthrie LH,Nielsen DJ,et al. Evaluation of an automated instrument for inoculating and spreading sSamples onto agar plates[J]. J Clin Microbiol,2008,46(4):1281-1284.
- [8] Mischnik A,Mieth M,Busch CJ,et al. First evaluation of automated specimen inoculation for wound swab samples by use of the Previ Isola system compared to manual inoculation in a routine laboratory: finding a cost-effective and accurate approach[J]. J Clin Microbiol,2012,50(8):2732-2736.
- [9] Nebbad-Lechani B,Emirian A,Mailllebuau F,et al. New procedure to reduce the time and cost of broncho-pulmonary specimen management using the Previ Isola? automated inoculation system[J]. J Microbiol Methods,2013,95(3):384-388.
- [10] Mulatero F,Bonnardel V,Micolaud C. The way forward for fast microbiology[J]. Clin Microbiol Infect,2011,17(5):661-667.

收稿日期:2015-07-28

修回日期:2015-10-10