



2021

检以精准 验以求真

质谱技术在临床微生物检验中的应用



赣州市人民医院 林燕

2021年5月19日



目录

Contents



临床微生物检验现状



质谱技术的临床应用



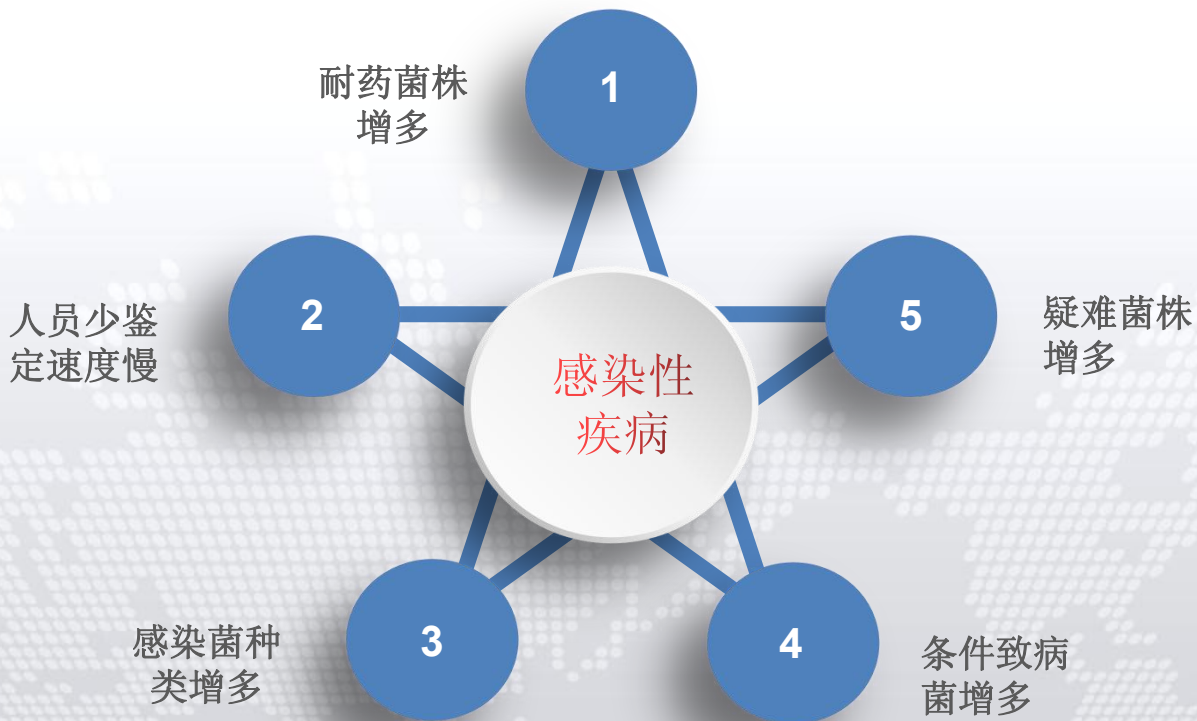
质谱技术的应用体会



临床微生物检验现状



现代感染性疾病特点





临床微生物检验报告现状



病原	生长时间	报告时间
需氧菌	24h	2-3个工作日
厌氧菌	48h	
酵母菌	2-5天	2-5个工作日
丝状真菌	2-5天	



接种



培养



鉴定



药敏



临床诊疗的迫切需求



图片来源: 视觉中国 www.vcg.com

帅哥，微生物培养
帮我加急一下呗



没戏...

友谊的小船，说翻就翻...T_T





微生物检验遇到的困惑



- ★ 呼吸道、肠道标本的细菌种类繁多，常规的鉴定成本高或者操作麻烦，容易漏掉或者忽视某些细菌。
- ★ 厌氧菌、弯曲菌、分枝杆菌和真菌：细菌鉴定的死角，技术上不好掌握或者目前的方法难以实施。
- ★ 微生物的分级报告：存在很多变数，使得初次报告的结果可靠性得不到临床的认可。
(比如：直接涂片，初步能估计细菌大类，但是无法确切的到种和耐药情况。)

实验室要求：操作方便的、结果准确的、成本便宜的、性价比高的，临床迫切需要提供早诊断的诊据。



- 将实验室人员从一些技术要求较低的、能由仪器完成的工作中解脱出来，提高标本处理效率，缩短**TAT**时间。
- 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱称为“微生物实验室的革命”。
- 质谱技术打破微生物传统的鉴定方法，实现了临床细菌检测和鉴定的常规分析，开辟了细菌鉴定的新时代，从而快速的完成微生物准确鉴定，具有自动化、快速、高通量的特点，大幅度缩短鉴定**TAT**时间，可患者更早开始正确的抗生素治疗。



质谱技术的临床应用



质谱技术的应用领域

食品微生物



兽医微生物



临床微生物

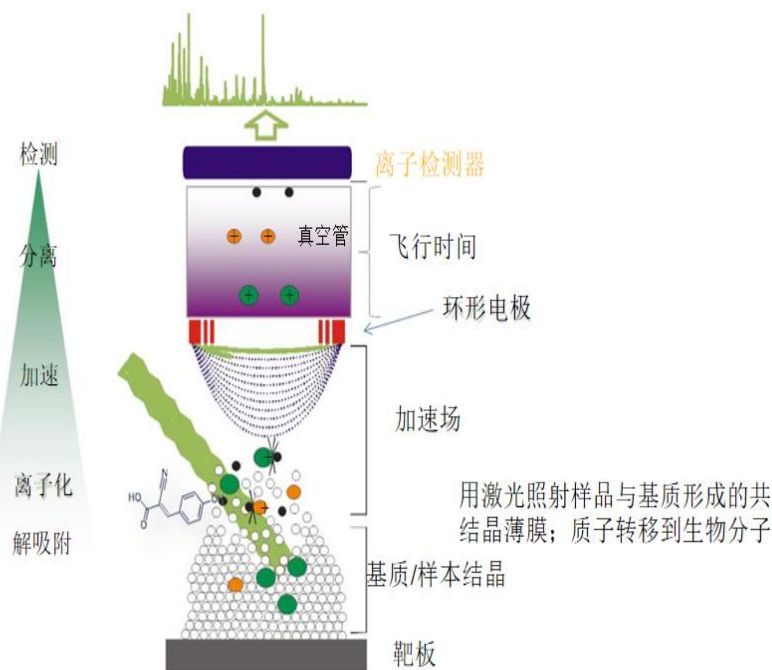


环境微生物监测





MALDI-TOF原理



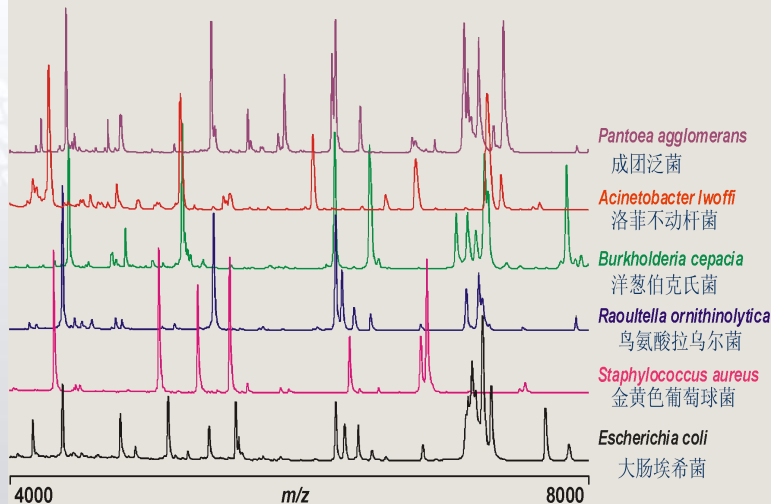
- 用激光照射微生物标本与基质形成的共结晶体，基质吸收激光能量并传递给微生物所含生物分子（主要是蛋白质），同时将 H^+ 转移到生物分子而发生电离。带电荷离子在电场作用下离开微生物-基质表面进入一定长的真空管。在真空管飞行过程没有外力作用,电离后的生物分子到达真空管顶端的离子检测器时间与其质量有关，从而鉴别不同质量蛋白并获得微生物蛋白质质量指纹图。



MALDI-TOF原理



不同菌种的蛋白指纹图谱



- 蛋白质是生命的物质基础，不同的细菌或不同疾病的样品，其蛋白质的种类和含量不同。不同的蛋白质解析后形成的多肽片段的种类、数量和分子量也不一样，因而在一定的条件下，在电离空间的运动速度和距离不同。用质谱仪将各种蛋白质解析后在电离空间的运动速度和距离的轨迹记录和描绘下来，则会形成不同的曲线图形。



质谱技术的基本操作步骤

Step 1

挑去单克隆菌落，涂布靶板。

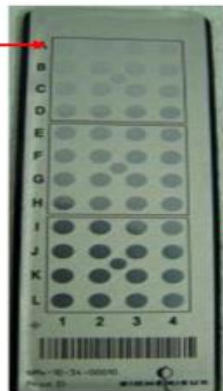


细菌、酵母菌、霉菌、分枝杆菌

Step 2

加入基质液*

干燥1-2min.



靶板
48 孔

Step 3

放置靶板



Step 4

上机，开始检测，分析结果



- 基质液: (1 μ l α -cyano-4-hydroxycinnamic acid)

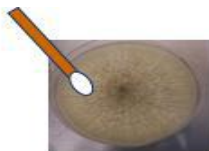


细菌、酵母菌、诺卡菌（未嵌入琼脂）标本准备流程





丝状真菌标本准备流程



1. 用潮湿的拭子收集
1-2cm直径的霉菌

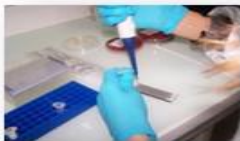


2. 将霉菌悬于含900 μ l
70% 乙醇的 2ml圆底无
色离心管中



3. 充分混匀 (涡旋震荡)

灭活



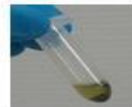
7. 10000-
14000g离心
2min

8. 立刻取1 μ l上清涂靶板(双孔)
待完全干燥
加1 μ l CHCA基质, 待干燥

6. 加40 μ l 70% 甲酸并涡旋震
荡混匀(3秒);
然后加40 μ l 乙腈并涡旋震荡混
匀(3秒)。

提取

4.
10000-14000g
离心2min



5. 用移液器吸出
上清丢弃



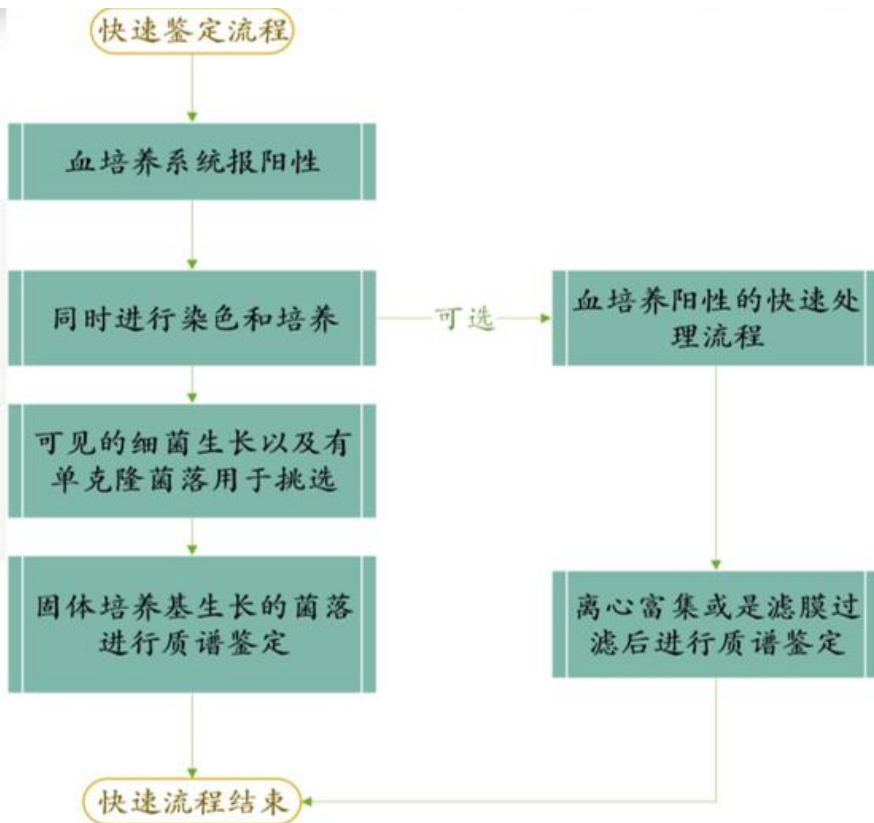
分枝杆菌/诺卡菌标本准备流程





血培养的快速鉴定流程

• 血培养的快速鉴定





鉴定结果的解释

VITEK® MS Review Detail

Isolate information
Accession ID: S1501-Z Specimen Type: Confidence Level:

Number of identifications: 2 List of identifications

Position	Analysis Date	Organism Name	Pathogenicity	Confidence Value	Confidence Level	Acquisition/Computation message(s)
1	4/22/11 5:59 PM	Staphylococcus epidermidis		99.9		
2	4/22/11 5:59 PM	Staphylococcus epidermidis		99.9		

Key: Valid Invalid

Peak list not found

可信度	选项	%可信度	注解
好的鉴定	仅1个鉴定结果选项	60 - 99.9	
低分辨	2~4个鉴定选项	> 60	补充试验区别
不能鉴定	无鉴定选项	< 60	与数据库的任何 质谱不匹配
	低分辨, 4个以上鉴定 选项 (只显示前4种菌)		



质谱技术的应用体会



靶板涂布过程要注意的细节

01

注意

关键步骤是涂菌和加基质，建议涂菌后立刻加基质，便于基质穿透细菌涂层

02

注意

靶板应保存在无尘环境，取靶板时避免手接触靶板的点位表面，防止污染

03

注意

涂菌时应戴无粉乳胶手套，菌涂的太多或太少均会影响鉴定结果，需要不断练习体会

04

注意

确保在挑取菌落时不要带有任何琼脂



靶板涂布过程要注意的细节

05

注意

粘菌落：**1 μ l**接种环涂布，菌量容易取多，建议用**200 μ l**枪头取更少的菌量涂布

06

注意

黏液型细菌：建议用**200 μ l**枪头挑取适当的菌量，涂布然后用干棉签去除黏液

07

注意

小菌落（如链球菌、阴道加德纳菌、人型支原体）：用一次性接种环或灭菌后的**200 μ l**枪头挑取多个相同菌落涂布靶板

08

注意

干燥型菌落：浸润的棉签挑取菌落，尝试提取总蛋白



低质量图谱与无鉴定结果

- 没有加基质液或**40%甲酸**；
- 基质液开瓶时间过长；涂布菌体的蛋白量太多或太少；
- 细菌不新鲜，培养时间过长（**>72h**）；
- **SS**平板上产硫化氢的细菌鉴定较差，可以转种非选择性培养基；最好选择血平板上的菌落，含指示剂的平板容易降低检出得分，鉴定准确性受影响；
- **Vitek MS IVD**没有定期**Finetuning**（根据使用强度，最好**2~4**个月进行一次）；
- 细菌与真菌库选择错误；
- 质控菌株的传代次数！标准菌株作为校准和内质控，需新鲜培养以备日常使用。



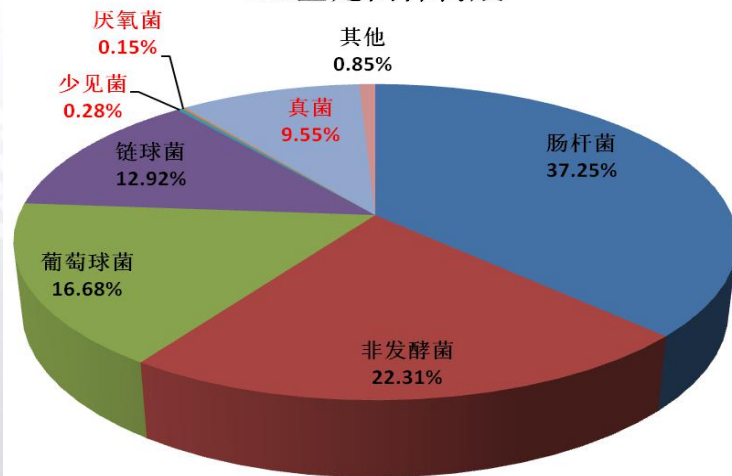
质谱技术鉴定的优势

- 操作简单：靶板涂布、添加基质液，打靶，菌株结果查询;操作标准化;
- 高通量：**Vitek MS**一次可以同时鉴定**192**株菌;
- 快速：平均**1-3**分钟鉴定一株菌;
- 准确：**95%**。非发酵菌**API20NE(75.1%)、VITEK-2(83%)、MS(88.9%)**;嗜麦芽窄食单胞菌 **API20NE(76.2%)、VITEK-2(80.8%)、MS(92.9%)**;
- 成本低：试剂耗品非常经济;
- 数据库不断在更新：**vitek MS IVD3.0**有**>1000**个菌种，**RUO**库**>1500**个菌种;
- 对临床的意义：分级报告缩短了**TAT**时间，优化微生物报告流程，尤其是厌氧菌、奴卡菌等难鉴定的菌提供巨大的帮助。

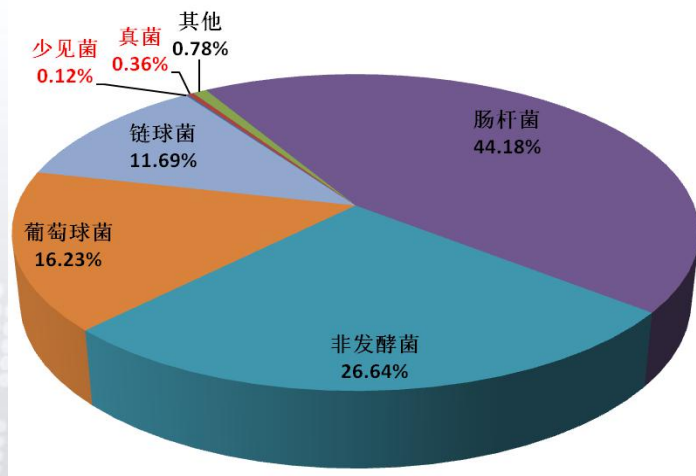


质谱技术鉴定的优势

MS鉴定菌株构成



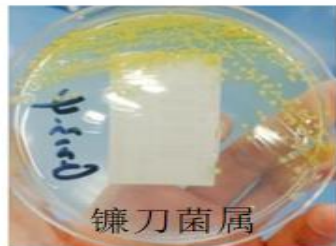
VITEK鉴定菌株构成



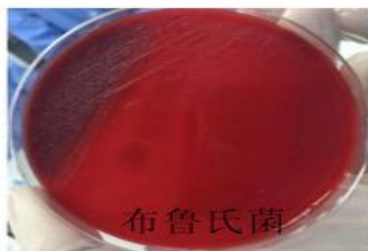
- 少见菌：人型支原体、皮疽诺卡菌、偶发分枝杆菌、阴道加德纳菌、脆弱拟杆菌等



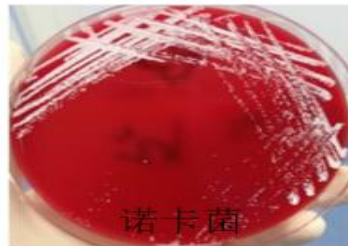
鉴定的部分少见菌



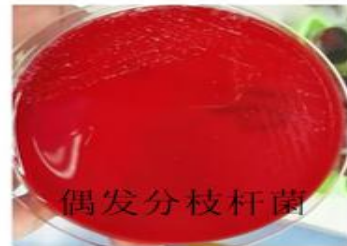
镰刀菌属



布鲁氏菌



诺卡菌



偶发分枝杆菌



烟曲霉



黄曲霉



淡紫拟青霉



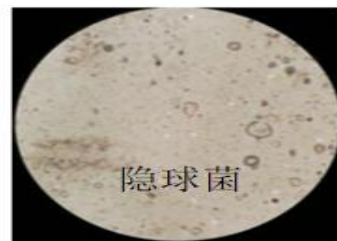
诺卡菌



人型支原体



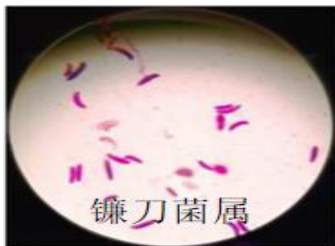
阴道加德纳菌



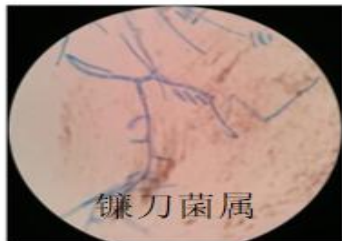
隐球菌



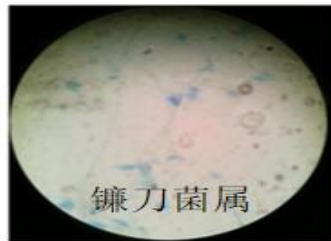
鉴定的部分少见菌



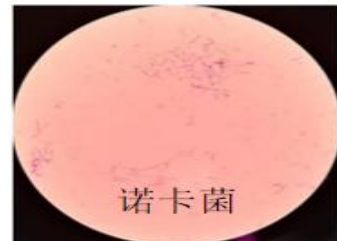
镰刀菌属



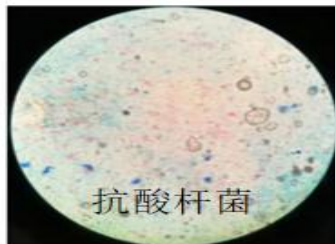
镰刀菌属



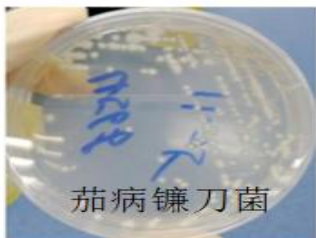
镰刀菌属



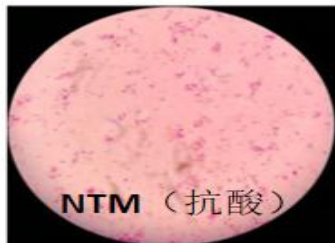
诺卡菌



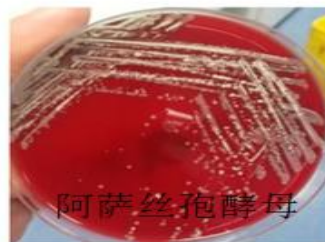
抗酸杆菌



茄病镰刀菌



NTM (抗酸)



阿萨丝孢酵母



质谱技术鉴定的局限性



- 样品必须单一、纯净；
- 对某些相似性高的菌种无法鉴定到种水平或出现错误；
- 某些菌只能鉴定到属的水平，不能鉴定到种或亚种；
- 仪器购买和维护保养费用较贵。

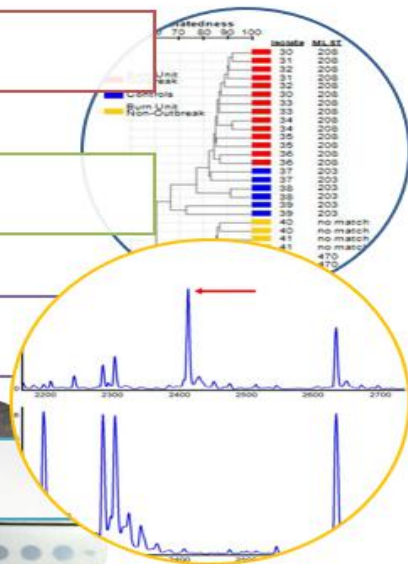


菌株分型及亚型鉴定

耐药性预测分析

感染相关生物标记物检测、毒力分析

微生物以外的鉴定?





质谱快速鉴定与差异化药敏试验



社会效益：实现多赢



长风破浪会有时，直挂云帆济沧海



检验人是临床医师的“慧眼”



是临床医学和基础医学之间的桥梁



加强临床沟通改善服务品质我们一直在路上.....



谢谢聆听！欢迎莅临指导和交流！