

微生物检验新技术在提升感控质量中的作用

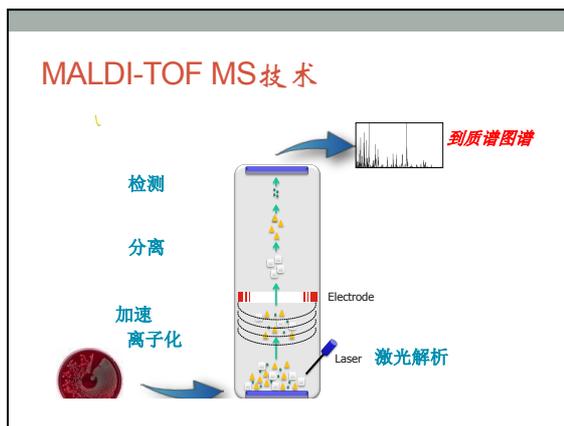
复旦大学附属中山医院微生物实验室
周春妹

内容

- MALDI-TOF MS
- Gene-Xpert
- MAX
- filmArray

内容

- MALDI-TOF MS
- Gene-Xpert
- MAX
- filmArray



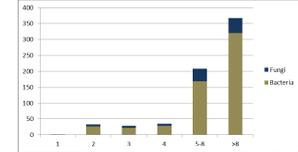
除了细菌真菌鉴定，MS还可以做什么？

- 自主数据库
- 丝状真菌鉴定
- 分支杆菌鉴定
- 混合菌鉴定
- 鉴定之外。。。。。



VITEK MS (IVD) 数据库 v2 内容

- 751 种属
 - 646 细菌 / 110 酵母菌 & 霉菌
- 29,873 光谱
 - 12,524 细菌 / 1,266 酵母菌 & 霉菌
 - 完整的可溯源性 (~15% 已测序)
- 每个种属至少2株菌
- 每个种属至少8个光谱

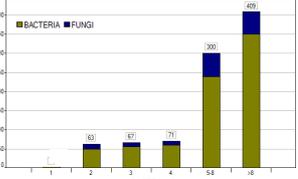
56 种属 > 25 株
25 种属 > 100 株

- S aureus : 328
- E coli : 475
- C albicans : 133
- S pneumoniae : 306

GCS - TM - 9179 - VITEK MS - CHAPTER 3.2 - 20120514

下一代数据库V3 内容

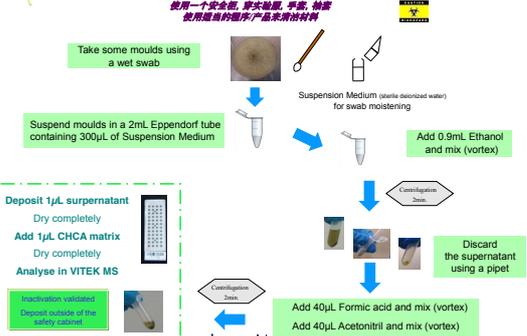
- 临床 & 环境 & 动物源性种属
- 291 新种属
- 1047 种属 (总计)
 - 882 细菌 / 164 酵母菌和霉菌
- 15,572 菌株
- 38,428 光谱

GCS - TM - 9179 - VITEK MS

霉菌提取/失活步骤

使用一个安全柜, 穿实验服, 手套, 袖套
使用适当的程序/产品来消毒



- Take some moulds using a wet swab
- Suspend moulds in a 2mL Eppendorf tube containing 300µL of Suspension Medium
- Add 0.9mL Ethanol and mix (vortex)
- Centrifugation 2min
- Discard the supernatant using a pipet
- Add 40µL Formic acid and mix (vortex)
- Add 40µL Acetonitril and mix (vortex)
- Centrifugation 2min
- Deposit 1µL supernatant
- Dry completely
- Add 1µL CHCA matrix
- Dry completely
- Analyse in VITEK MS

GCS - TM - 9179 - VITEK MS - CHAPTER 3.2 - 20120514

简单安全的实验方案

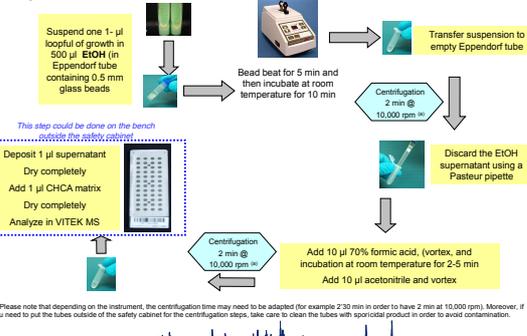
- 从琼脂平板上提取
- 8个简单的步骤
- 不需要特定的材料
- 使用标准和非致畸溶剂,
- 菌丝和孢子都可能鉴定
- 没有仪器污染
- 可以在安全柜外进行



GCS - TM - 9179 - VITEK MS - CHAPTER 3.2 - 20120514

分枝杆菌失活提取方法 (Ethanol - Formic Acid 70% - Acetonitril) - 固体培养

使用一个安全柜, 穿实验服, 手套, 袖套
使用适当的程序/产品来消毒



- Suspend one 1-µl loopful of growth in 500 µl EtOH (in Eppendorf tube containing 0.5 mm glass beads)
- Bead beat for 5 min and then incubate at room temperature for 10 min
- Transfer suspension to empty Eppendorf tube
- Centrifugation 2 min @ 10,000 rpm
- Discard the EtOH supernatant using a Pasteur pipette
- Add 10 µl 70% formic acid, (vortex, and incubation at room temperature for 2-5 min)
- Add 10 µl acetonitril and vortex
- Centrifugation 2 min @ 10,000 rpm
- Deposit 1 µl supernatant
- Dry completely
- Add 1 µl CHCA matrix
- Dry completely
- Analyse in VITEK MS

¹⁰ Please note that depending on the instrument, the centrifugation time may need to be adapted (for example 2:30 min in order to have 2 min at 10,000 rpm). Moreover, if you need to put the tubes outside of the safety cabinet for the centrifugation steps, take care to clean the tubes with sporidicidal product in order to avoid contamination.

GCS - TM - 9179 - VITEK MS - CHAPTER 3.2 - 20120514

简单安全的实验方案

- 快速试验方案(45分钟) 9个简单的步骤
- 从一个小体积的液体介质中提取
- 也可能从固体介质中提取
- 不需要特定的材料, 使用标准、无致畸性溶剂
- 化学和机械处理相结合的分枝杆菌灭活
- 失活步骤后可以在BSL3实验室之外进行



GCS - TM - 9179 - VITEK MS - CHAPTER 3.2 - 20120514

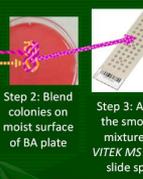
研究的设计

BIOMERIEUX

- 不同属的31株ATCC菌株 (24个细菌和7个真菌)
- 432混合物 (2到3个种属):
 - 56真菌混合物(2种), 比例 1:1, 1:2, 2:1
 - 243细菌混合物(2种), 比例 1:1, 1:2, 2:1
 - 133细菌混合物(3种), 比例 1:1:1, 1:2:3, 3:2:1....



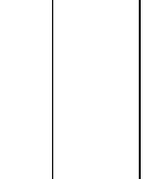
Step 1: Pick well isolated colonies from 2 or 3 fresh ATCC cultures



Step 2: Blend colonies on moist surface of BA plate



Step 3: Apply the smooth mixture to VITEK MS PLUS slide spot



Step 4: Place in VITEK MS PLUS for MALDI-TOF

GCS - TM - 0170 - VITEK MS - CHAPTER 3.2 - 20120514

结果

BIOMERIEUX

- 在376个细菌混合物中:
 - 31个未鉴定 (8,2 %)
 - 340个高度可信的鉴定 (90,4 %)
 - 5个低度可信的鉴定 (1,4%)
- 在56个真菌混合物中:
 - 6个未鉴定 (10,7%)
 - 49个高度可信的鉴定 (87,5%)
 - 1个错误鉴定(1,8%)



GCS - TM - 0170 - VITEK MS - CHAPTER 3.2 - 20120514

鉴定之外

- 分型
 - 有效的工具
 - 需要对每一个种进行评估
 - 需要生物数学工具
- 小分子的检测
 - 高潜力
 - 只是开始
 - 需要注意结果(确证方法)
- 非微生物的鉴定
 - 细胞系, 等....

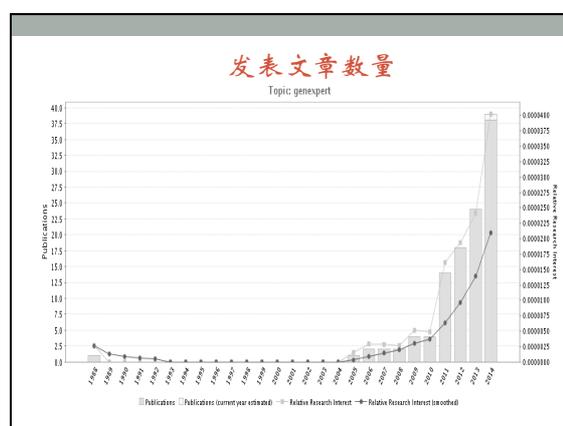
内容

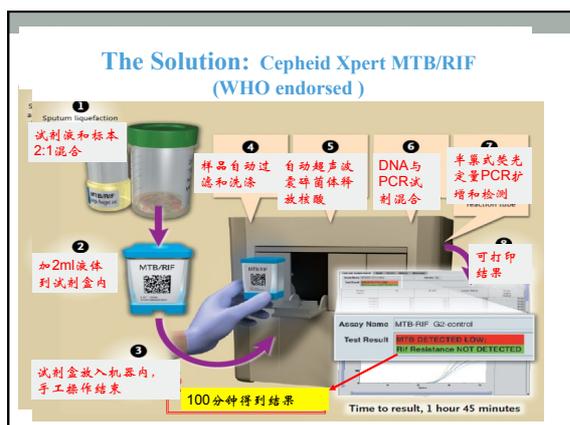
- MALDI-TOF MS
- Gene-Xpert
- MAX
- filmArray

17 14-12-1

GeneXpert system

- 基于 real-time PCR 原理
 - 运用多对引物和探针, 实时监测特异基因扩增产物并进行解析。在半巢式PCR反应体系中加入荧光物质, 并通过 real time PCR 对荧光信号强度进行实时检测, 最终对检测数据进行排列统计, 获得结果。
- 全自动:
 - 自动完成裂解细胞、提取核酸, 将扩增和检测完全整合在一个工作平台上。
- 快速: 1-2h





- ### 试剂盒
- MRSA
 - VRE
 - 艰难梭菌
 - TB
 - B群链球菌
 - 流感病毒A和B
 - 肠病毒
 -

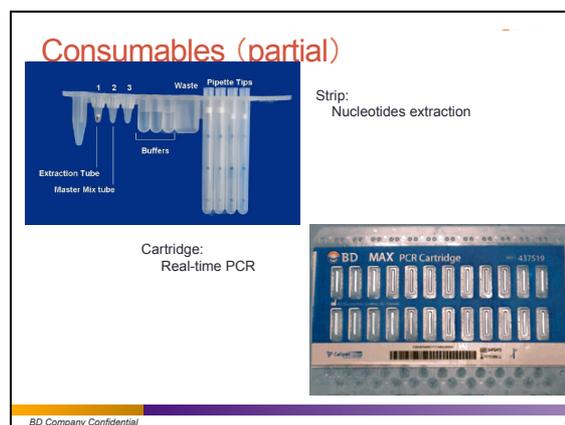
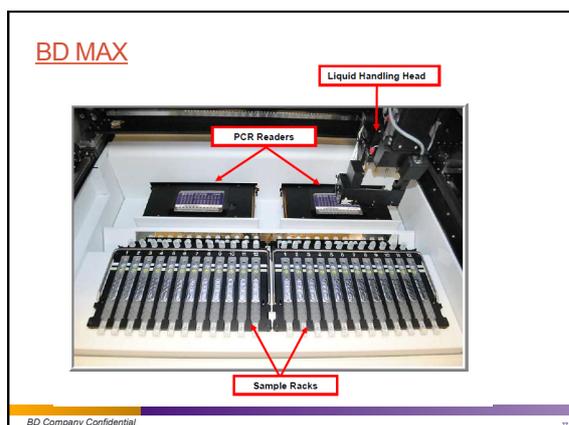
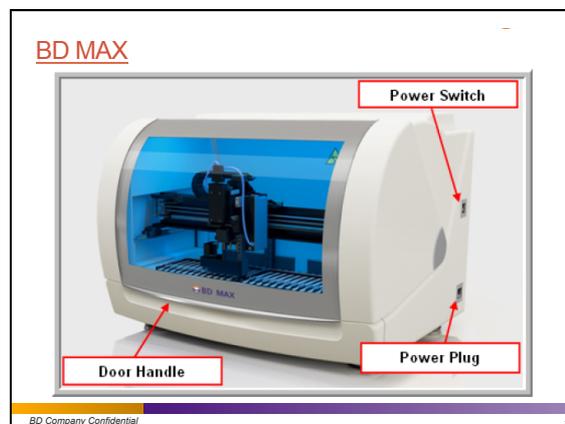
- ### 内容
- MALDI-TOF MS
 - Gene-Xpert
 - MAX
 - filmArray

BD MAX – Fully Automated System BD MAX – 全自动化系统

BD MAX是**全自动化**的分子工作站, 能够对微生物所含有的目的基因进行检测分析, 以达到鉴定筛选病原菌等目的, 可为用户提供**灵活、高效**的检测。

BD MAX从标本裂解到结果检测都是**全自动化**, 用户可按照不同的需求灵活设置**各种程序**, 它是**唯一**能做到这两点的分子核酸检测系统。

BD Company Confidential



- BD MAX**
- **Throughput 处理标本量**
 - Sample lysis, extraction, PCR amp/detection (up to 24 samples/run) 一次运行可同时处理24个标本(标本裂解, 核酸抽提, 实时定量PCR扩增/检测)
 - 72-96 samples per 8 hour shift 8小时可处理72-96个标本
 - Mix assays and specimen types 每次运行可同时进行多种分析, 处理不同的标本类型
- BD Company Confidential 30

BD MAX Specimen Type 标本类型

- Flexible 灵活多用
- Extraction Kits 抽提试剂盒
 - ExK DNA-1 (urine/plasma/serum) ExK DNA-1 (尿/血浆/血清)
 - ExK DNA-2 (CSF/dry swab) ExK DNA-2 (脑脊液/干拭子)
 - ExK DNA-3 (urine/UTM) ExK DNA-3 (尿/UTM运输培养基)
 - ExK DNA-3 (stool) ExK DNA-3 (粪便)
 - Total Nucleic Acid (TNA) Extraction Kits (coming soon) 全核酸抽提试剂盒(即将出品)

BD Company Confidential

11

BD MAX Procedure 运行程序

- Flexible 灵活多用
 - Able to run both DNA and RNA extraction protocols in the same run (different racks)
 - 在一次运行中可以同时执行DNA和RNA抽提程序
- Independently variable PCR protocols 24个标本的PCR程序各自独立设置 ——一次上机可同时运行24个不同的PCR反应条件
- 5-color detection for greater multiplexing capability 强大的多重检测能力, 5通道检测 ——1个PCR反应可一次检测5个基因

BD Company Confidential

12

BD MAX Run Modes 运行模式

- Flexible 灵活多用
- Full Process 全流程模式
 - 标本裂解, 核酸抽提, 实时定量PCR扩增/检测
- Real-time PCR Only 实时定量PCR检测模式
 - 仅进行实时定量PCR检测
- Extraction Only 抽提模式
 - 标本裂解, 核酸抽提
- Melt 熔解曲线分析模式
 - 单独检测熔解曲线

BD Company Confidential

13

BD MAX

- Efficient 高效
 - Walk away automation 全自动化
- Unitized Reagent Strips (URS) minimize set-up 每个反应只需很少试剂
 - Each samples is processed as a discrete, independent test 每个标本独立处理、检测 ——防止交叉污染
- Room temperature storage of all reagents 所有BD配套试剂均只需室温存放
- Systems is ready to perform testing 24/7 系统可7天24小时不间断检测

BD Company Confidential

14

BD MAX Open Reagent System 试剂开放系统

- IVD Assay Kits IVD分析试剂盒
 - Group B Strep (GBS) B组链球菌
 - MRSA 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌
 - C. diff 艰难梭菌
 - Flu A/B A/B型流感病毒
 -
- 包含标本裂解, 核酸抽提, 实时定量PCR扩增/检测全过程所需的所有试剂和耗材 —— 全自动化的分子工作站

BD Company Confidential

15

BD MAX Reagent Open System 试剂开放系统

- 非BD配套实时定量PCR试剂
 - Other Master Mix 其它品牌实时定量PCR试剂
 - ABI, Roche, Bio-Rad, Takara, Toyobo.....

用户在全流程模式, 实时定量PCR检测模式, 熔解曲线分析模式都可使用其它品牌的实时定量PCR试剂 —— 试剂开放系统

Summary 小结

- 唯一的可按照用户设置的不同程序, 实现从样本裂解、核酸抽提到实时定量PCR检测的**全自动化分子工作站**。
- **体积小, 省空间。**
- **一体机, 全封闭——生物安全: 防止交叉污染, 环境污染。**
- **试剂开放系统**
- **灵活多用: 标本类型, 运行程序, 运行模式。**

内容

- MALDI-TOF MS
- Gene-Xpert
- MAX
- filmArray

工作原理



产品特点

简便, 快速



应用广泛

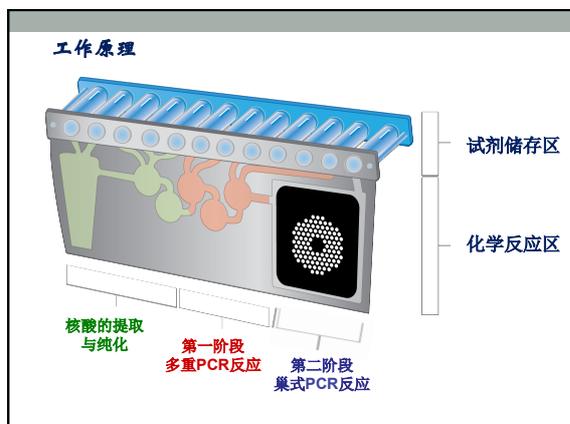
产品特点

上呼吸道病毒 (RP) 测试条	17种病毒, 3种细菌
血流感染(阳性血培养) (BCID) 测试条	19种细菌, 5种真菌, 3种耐药基因
胃肠道疾病 (GI) 测试条	13种细菌, 4种原生虫, 5种病毒
脑炎及脑膜炎 测试条	正在研发中(2015): 6种细菌, 2种真菌, 8种病毒

产品特点

- **操作简单:** 24小时/7天, 无需任何分子专业的知识。
- **反应快速:** 有利于检测紧急标本与优化工作流程。
- **检测范围广:** 三种测试条即可为常见感染性疾病的诊断提供快速便捷的服务。此外, 公司每年研制一种新的测试条, 以满足日益增长的临床检测需求。
- **安全性高:** 全封闭系统, 减少外界污染。
- **仪器外形小巧:** 占地空间小。





工作原理

自动化的结果分析系统

- 共有102个独立的反应孔，每孔只进行一种目的片段的扩增
- 针对每一种目的片段的扩增与检测，有3个重复的反应孔
- 比较3个重复反应孔的熔解曲线，至少有两个结果显著相似，且曲线峰值在特定的区域范围内，其结果可信

Bordetella pertussis
百日咳杆菌

工作原理

结果汇总表

FilmArray [®] Respiratory Panel		BIOFIRE
Run Summary		Run Date: 21 Jun 2013 7:34 PM
Sample ID:	RYNAND0212	Controls: Passed
Detected:	Influenza A H1-2009 Respiratory Syncytial Virus	
Equivalent:	None	
Result Summary		
Not Detected:	Adenovirus	
Not Detected:	Coronavirus 229E	
Not Detected:	Coronavirus HKU1	
Not Detected:	Coronavirus NL63	
Not Detected:	Coronavirus DC43	
Not Detected:	Human Metapneumovirus	
Not Detected:	Human Rhinovirus/Enterovirus	
✓ Detected:	Influenza A H1N1-2009	
Not Detected:	Influenza B	
Not Detected:	Parainfluenza Virus 1	
Not Detected:	Parainfluenza Virus 2	
Not Detected:	Parainfluenza Virus 3	
Not Detected:	Parainfluenza Virus 4	
✓ Detected:	Respiratory Syncytial Virus	
Not Detected:	Bordetella pertussis	
Not Detected:	Chlamydia pneumoniae	
Not Detected:	Mycoplasma pneumoniae	
Run Details		
Panel:	Respiratory Panel v1.7	Protocol: NPS v2.0
Run Status:	Completed	Operator: XMRAP
Barcode:	020451922	Instrument: CFX96 7A2004*
Lot No.:	114612	

上呼吸道感染(RP)测试条(已获得CE和FDA的认证)

病毒(17种):
腺病毒
冠状病毒229E
冠状病毒HKU1
冠状病毒OC43
冠状病毒NL63
人类偏肺病毒
人鼻病毒/肠道病毒
甲型流感病毒
甲型流感病毒H1亚型
甲型流感病毒H1-2009亚型
甲型流感病毒H3亚型
乙型流感病毒

副流感病毒1型
副流感病毒2型
副流感病毒3型
副流感病毒4型
呼吸道合胞病毒

细菌(3种):
百日咳杆菌
肺炎衣原体
肺炎支原体

胃肠道疾病(GI)测试条(已获得FDA认证)

细菌(7种):
弯曲菌属
难辨梭菌(毒素A/B)
类志贺邻单胞菌
沙门菌属

真菌属
霍乱弧菌
小肠结肠炎耶尔森菌

原生动物(4种):
隐孢子虫
环孢子虫
溶组织内阿米巴
兰伯氏贾第鞭毛虫

病毒(5种):
F组腺病毒40/41
星状病毒
诺沃克病毒GI/GII
A群轮状病毒
札幌病毒

致病性大肠埃希氏菌(志贺菌)(6种):
肠道聚集性的大肠埃希氏菌
肠道致病性的大肠埃希氏菌
肠道毒性的大肠埃希氏菌
大肠埃希菌O157
产类志贺毒素的大肠埃希氏菌
志贺菌、肠侵性的大肠埃希氏菌

血流感染(阳性血培养)(BCID)测试条(已获得CE和FDA的认证)

革兰阳性细菌(8种):
肠球菌属
产单核细胞李斯特菌
葡萄球菌属
金黄色葡萄球菌
链球菌属
B族无乳链球菌
A族酿脓链球菌
肺炎链球菌

革兰阴性细菌(11种):
鲍曼不动杆菌
肠杆菌科细菌
阴沟肠杆菌复合群
大肠埃希菌
产酸克雷伯菌
肺炎克雷伯菌
变形杆菌
粘质沙雷菌
流感嗜血杆菌
脑膜炎奈瑟菌
铜绿假单胞菌

真菌(5种):
白假丝酵母
光滑假丝酵母
克柔假丝酵母
近平滑假丝酵母
热带假丝酵母

耐药基因(3种):
mecA
Van A/B
KPC

耐药基因

- **mecA: 甲氧西林(苯唑西林) 耐药基因**
 - 仅在葡萄球菌检出后报告结果
- **vanA/B: 万古霉素耐药基因**
 - 同时检测vanA与vanB
 - 仅在肠球菌检出后报告结果
- **KPC (bla_{KPC}): 肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶基因**
 - 对碳青霉烯类抗生素具有耐药性
 - 当肠杆菌、鲍曼不动杆菌或铜绿假单胞菌检出后报告结果
 - 在肺炎克雷伯菌中最为常见

阳性血培养鉴定/耐药基因测试条

- 1568 例临床阳性新鲜标本
- 97.5% 的总体敏感性
- 99.8% 的总体特异性
- 90% 的阳性标本可以检出致病菌

脑炎 / 脑膜炎测试条(研发中)

细菌(6种):

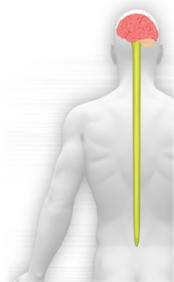
大肠埃希菌
流感嗜血杆菌
产单核细胞李斯特菌
脑膜炎奈瑟菌
无乳链球菌
肺炎链球菌

真菌(2种):

2种新型隐球菌
neoformans/gattii

病毒(8种):

巨细胞病毒
肠道病毒
埃伯斯坦-巴尔病毒
单纯疱疹病毒1型
单纯疱疹病毒2型
人疱疹病毒6型
副肠孤病毒属
水痘带状疱疹病毒



脑炎 / 脑膜炎测试条(研发中)

细菌(6种):

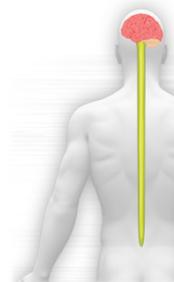
大肠埃希菌
流感嗜血杆菌
产单核细胞李斯特菌
脑膜炎奈瑟菌
无乳链球菌
肺炎链球菌

真菌(2种):

2种新型隐球菌
neoformans/gattii

病毒(8种):

巨细胞病毒
肠道病毒
埃伯斯坦-巴尔病毒
单纯疱疹病毒1型
单纯疱疹病毒2型
人疱疹病毒6型
副肠孤病毒属
水痘带状疱疹病毒



结束语

扩大实验室的诊断功能，以传统细菌培养为基础，建立真菌、厌氧菌、支原体、衣原体、病毒等病原微生物的多元检测技术

关注重大传染病的高通量筛查技术、实验室确认与鉴定技术

质谱技术、生物芯片技术、快速测序技术将在病原微生物检测领域中得到空前的发展与应用