

快速检测技术在感染性疾病诊治中的作用

温州医科大学附属第一医院
温州医科大学检验医学院 生命科学院
周铁丽

感染性疾病诊断的实验室手段

- 形态学检查
- 病原菌分离培养和药敏试验
- 抗原、抗体、代谢产物检测
- 基因检测：PCR、测序等
- 蛋白分析：质谱技术等
-

传统微生物实验室鉴定及药敏流程

第一天	第二天	第三天
8:00 ↓ 接收标本 标本接种	8:00 ↓ 染色+镜检	10:00 ↓ 鉴定 及药 敏仪 分析
	10:00 ↓ 获得部 分快生 长细菌 鉴定和 药敏结 果	15:00 ↓ 获得全 部细菌 鉴定和 药敏结 果
		3:00 ↓ 发报告

疑难菌、慢生长菌.....

传统细菌培养鉴定和药敏试验

- 报告速度
- 指导药物选择
- 结果评价
-

细菌培养结果意义评价问题

- 如何正确界定分离自带常居菌部位标本中的细菌，到底定植菌还是感染菌？
- 如何正确界定分离自无菌部位标本中的细菌到底是感染菌还是污染菌？

临床微生物鉴定方法学的演化

形态学

传统的生化反应测试管

快速测试(血清, 免疫)

商品化手工鉴定条

自动化鉴定系统

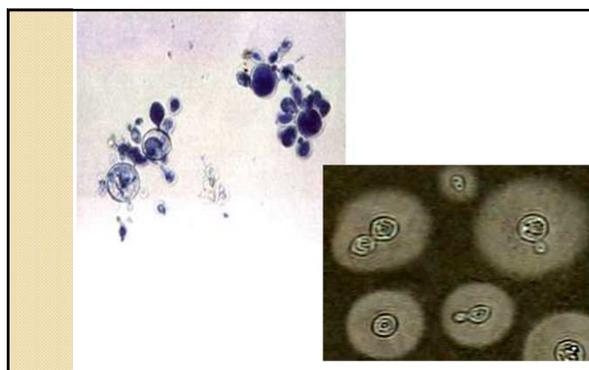
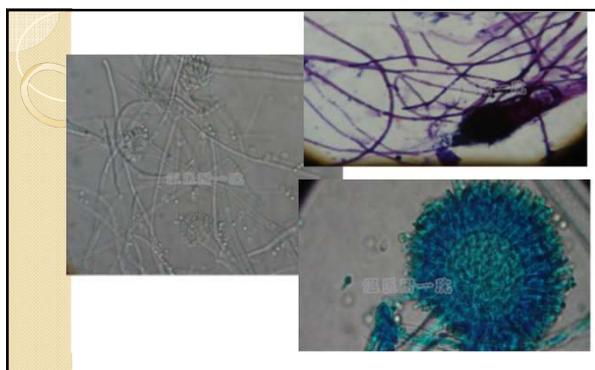
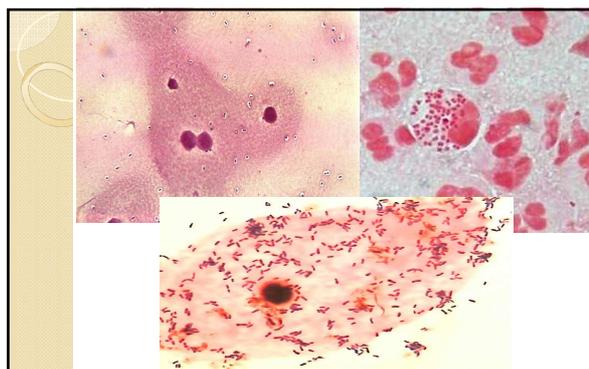
分子测序

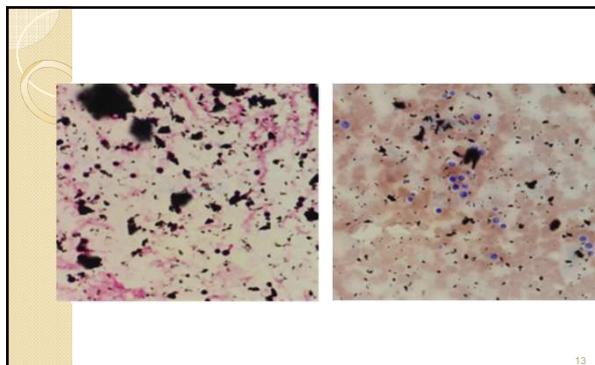
质谱分析

形态学检查 感染标志物检测

3

- ## 细菌形态学检查的意义
- 迅速了解临床标本中有无细菌及大致的数量，根据其形态、结构和染色性大致决定其种属。
 - 可为细菌进一步鉴定提供依据
 - 验证培养物是否纯种
 - 标本合格与否的判定
 - 界定标本中的细菌为感染/污染、定植
 - 有少数细菌可根据形态学的检查得出初步诊断



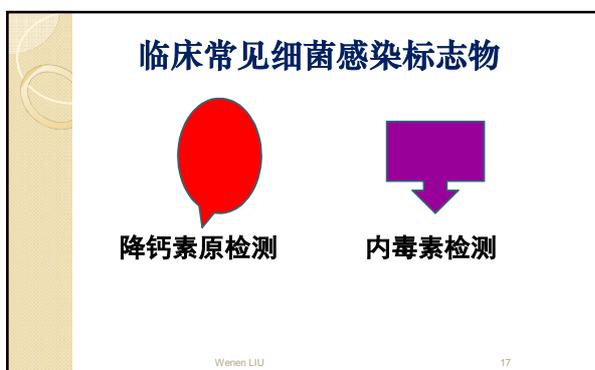


直接显微镜检测

病原体	推荐染色方法
普通细菌	革兰染色
真菌	10%KOH、棉酚兰
新型隐球菌	墨汁染色
结核分枝杆菌	抗酸染色、荧光染色
奴卡菌	弱抗酸染色
细胞壁缺陷菌(支原体)	吖啶橙染色
卡氏肺孢子菌	六胺银染色
疟原虫	吉姆萨染色
肠道寄生虫	碘染色

- ### 涂片检查在血培养中的价值
- 初报
 - 预报
 - 最后报告

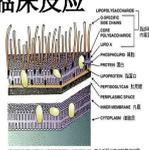
- ### 常用的非培养感染标志物
- 广泛的感染标志物
- 白细胞计数与分类
 - 血沉
 - C-反应蛋白(CRP)
 - 白介素-6
 -
- 相对特异的感染标志物
- 临床常见细菌感染的标志物
 - 真菌感染的标志物
 -



- ### PCT与其它感染性指标的比较
- PCT 和WBC :特异性高
全身性感染既可导致白细胞升高,也可以引起白细胞减少。
 - PCT 和CRP: 灵敏度好
PCT可在感染后2个小时后检测; CRP在炎症过程开始8~12h 后,才能从血清中检测出。
 - PCT 和IL- 1、IL- 6、TNF- α :稳定性好
PCT 的半衰期较长(20~24h); IL半衰期很短(数分钟至几小时)。

细菌内毒素

- 革兰阴性菌细胞壁上的一种脂多糖 (LPS) 和蛋白的复合物, 细菌死亡或自溶后释放
- 进入机体将会出现发热、血压降低、寒颤、引起DIC、内毒素败血症等一系列临床反应
- 内毒素水平不仅可用于感染类别的鉴别诊断, 也可用于感染控制和病情转归的参数。



Wenen LIU

临床常用真菌感染标志物

G试验
GM试验隐球菌荚膜多
糖抗原

Wenen LIU

20

GM试验与G试验

- GM试验:** 血浆、血清、BAL、胸水、CSF, 检测半乳糖甘露聚糖, 诊断是否曲霉菌感染。假阳性反应可以在青霉菌属中出现; 部分含青霉素衍生物的抗菌药物可以诱发阳性反应。
- G试验:** 检测1-3-β-D-葡聚糖, 诊断是否真菌感染, 但不能区别是曲菌或酵母样真菌; 对隐球菌、接合菌、毛霉、根霉呈阴性反应。

G试验的临床意义

- 当真菌进入人体血液或深部组织后, 经吞噬细胞的吞噬、消化, (1-3)-β-D-葡聚糖可从胞壁中释放出来, 从而使血液及其他体液中(1-3)-β-D-葡聚糖含量增高; 在浅部真菌感染中, (1-3)-β-D-葡聚糖未被释放出来, 故在体液中含量不高。
- G试验先于临床诊断平均4天提供临床深部真菌感染依据, 提高深部真菌感染的早期诊断。
- 评价疗效: 应用抗真菌药物后, 定期检测血浆中葡聚糖浓度变化, 评价选用药物的有效性。

G试验检测范围

- 检测底物: (1,3)-β-D-葡聚糖
- 诊断: 侵袭性真菌病 (IFD)
- 检测频率: 2次/周
- 真菌细胞壁成分: 念珠菌, 曲霉, 镰刀菌, 毛孢子菌, 卡氏肺孢子菌, 支顶孢属, 酵母菌属
- 不能检测: 接合菌 (毛霉、根霉)、隐球菌

•23

曲霉菌半乳糖甘露聚糖 (GM)

- 曲霉菌细胞壁上一种多聚糖抗原
 - 可以从血清、脑脊液、胸水、BALF检测到
 - 方法: ELISA
 - 最低检测1ng/u1
 - 灵敏度: 50%~90%; 特异性: 80%~90%
- 大于100ng/u1即可考虑侵袭性肺曲霉菌病

GM试验的应用

- 诊断：侵袭性曲霉感染（IA）
- 检测底物：半乳甘露聚糖
 - 曲霉细胞壁成分
 - 曲丝在组织中生长时释放
 - 热稳定
 - 可溶性：serum, BAL, CSF
- 检测频率：2次/周

25

隐球菌荚膜多糖抗原检测

检测循环荚膜抗原，诊断是否新生隐球菌感染。
敏感性和特异性高

最有价值和应用最广的免疫学方法

抗原滴度与疾病转归呈正相关

可指导治疗与判断预后

方法包括**乳胶凝集试验**、酶联免疫吸附试验、单克隆抗体法

26

乳胶凝集试验对隐球菌脑膜炎的诊断价值

168 例患者中隐球菌抗原乳胶凝集法检测阳性19 例，18 例为隐球菌脑膜炎，1 例为病毒性脑膜炎。

墨汁染色涂片：敏感性**61.1%**，特异性100%，
脑脊液真菌培养：敏感性**38.9%**，特异性100%。

脑脊液隐球菌抗原检测：敏感性**100%**（18/18），特异性**99.3%**（149/150）。

李娟等，四川大学学报（医学版），2010,41（6）：1074-107

27

PCT，内毒素检测 G试验，GM试验，隐球菌抗原等

- 早期诊断
- 快速诊断
- 指导用药
- 评价效果
- 动态观察

2017/6/16

28

血清学鉴定

- ❖ 试剂（诊断血清）：含抗体
- ❖ 检测对象：特异性抗原
- ❖ 方法：直接凝集试验（玻片法）、荚膜肿胀试验

伤寒杆菌诊断血清 + 待检测细菌 → 细菌凝集
(含抗伤寒沙门菌抗体)

玻片凝集试验：**阳性**

报告：**检出伤寒沙门菌**

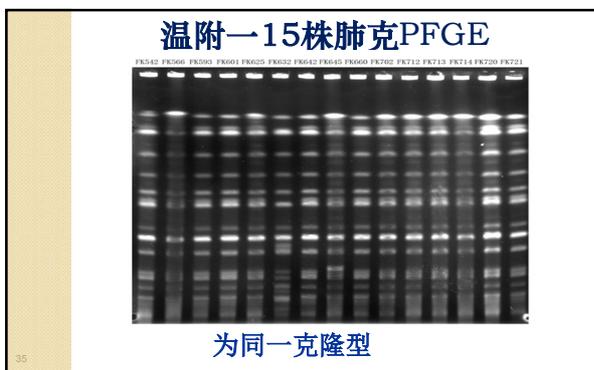
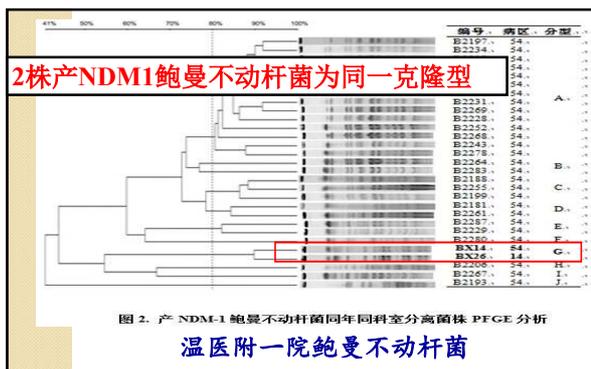
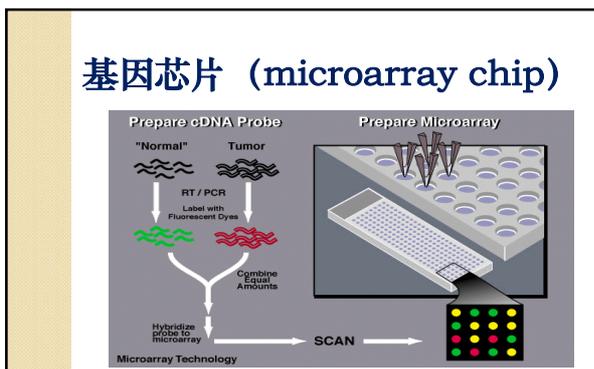
血清学诊断

- ❖ 试剂：含已知抗原
- ❖ 检测目的：检测待检者血清中是否有相应的抗体
- ❖ 方法：玻片或试管凝集试验、沉淀试验、补体结合试验和冷凝集试验。
- ❖ 应用：作为某些病原菌感染的辅助诊断。

分子生物学技术 质谱技术

3

- ## 细菌分子生物学检测
- 常用技术
 - 核酸杂交
 - 核酸扩增技术
 - 主要应用
 - 菌种鉴定
 - 细菌耐药基因检测
 - 菌株同源性分析



- ## 分子微生物诊断结果的解释
- 分子诊断及其结果与传统的培养和血清学及其结果具有不同的含义
 - 微生物培养阳性清楚地表示活的微生物的存在
 - 特异微生物的抗体的滴度上升表示感染后的反应
 - 核酸探针或扩增过程决定是否有特殊的病原菌的特殊的核酸序列 (DNA或RNA) 存在于标本中
 - 耐药基因检测和耐药的关系
 -

MALDI-TOF 微生物质谱仪 在鉴定某些重要微生物中的优势

酵母菌

传统方法 → 比较难以确定及耗时

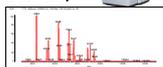
非常简单从培养基挑选菌落 (MALDI-TOF MS)



分枝杆菌

生长时间: 不同菌种, 时间不同

使用MALDI-TOF MS: 更快, 更便宜的分子方法



阳性血培养瓶

传统方法: 传代 + 检测 → 鉴定结果需要最短24小时后

MALDI-TOF MS: 鉴定病原至少快1天

质谱临床微生物检测应用的几个要素

- 速度
平均1分钟完成1-2菌株鉴定
- 菌谱
>1000种 (包含丝状真菌、厌氧菌、奴卡氏菌、分枝杆菌等等)
- 成本
¥ 5-20 /测试



质谱鉴定的样本要求

菌落

临床标本

尿液样本 脑脊液 血培养阳性瓶……

39

MALDI-TOF MS用于临床样本直接检测 需要考虑的因素

样本中细菌的量

MALDI-TOF MS 技术对置于靶板上的细菌的最低检测限约为 $(1 \times 10^4) \sim (1 \times 10^6)$ cfu /mL。血培养阳性报警瓶及似泌尿系统感染的中段尿中的病原菌数往往达不到此要求, 首先必须富集细菌。

样本的质

由于血液和血培养瓶中的大分子成分如血及血红蛋白和其它蛋白成分、尿液中的白细胞等有机成分会干扰细菌的谱峰, 所以直接检测前需要采取预处理措施去除这些干扰因素。

短暂孵育后直接鉴定, 具有更大优势

- 成本、流程、时效
- 不会受血培养系统的影响
- 同时达到增菌和减少血液成分干扰的目的
- 成本低, 易于操作
- 提升了鉴定分数, 使鉴定结果更可信



革兰阳性球菌平均鉴定到种所需要的孵育时间是5.9 h,
革兰阴性杆菌平均鉴定到种所需要的孵育时间是2 h。

41

MALDI-TOF 在临床微生物其他领域的应用

- MALDI-TOF进行细菌耐药性分析
MRSA、ESBLs、CRE等
- MALDI-TOF进行分型和毒力研究
对沙门菌、大肠埃希菌、霍乱弧菌和副溶血性弧菌等多血清型细菌进行鉴定和分类也有初步应用
金黄色葡萄球菌毒力因子杀白细胞素的检测

42

案例分享

总结

---常规检测方法：微生物学方法速度慢，受敏感性、特异性限制，不易早期诊断，并且不易提供病原体分型方面的信息。

---多种方法联合可提高感染性疾病病原学诊断!

---微生物检验结果需结合实验室和临床资料综合分析评估。

44

