

• 综 述 •

临床病原微生物快速诊断技术进展*

吕 游¹综述,王 辉²,姜可伟¹,王 杉^{1△}审校

(北京大学人民医院:1. 外科肿瘤实验室胃肠外科;2. 检验科,北京 100044)

关键词:细菌学技术; 微生物学技术; 分子生物学

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.07.035

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)07-0827-03

病原菌能引起多种感染和传染病,对病原菌进行准确的检测和鉴定可以为疾病的诊断、治疗及流行病学调查提供有效的依据。随着抗菌药物的大量使用,导致出现大量严重耐药菌株以及新的病原微生物的出现,给临床诊断和治疗带来了极大的困扰,这也给病原微生物的检测和诊断提出来更高的要求。传统微生物检测和鉴定方法难以实现快速诊断和治疗,已远不能满足对各种病原微生物的诊断及流行病学的研究。实现准确、快速检测及鉴定病原微生物成为目前临床微生物检验亟待解决的问题,随着分子诊断技术、生物化学及免疫学的不断发展,不仅对微生物感染进行准确的病因学诊断,还可以对感染性病原体进行基因分型和耐药性监测,极大的提高了病原微生物检测的速度,同时明显提高了微生物的诊断水平。本文就近年来临床病原微生物快速诊断技术研究进展做一综述。

1 自动化微生物鉴定和药敏系统的应用

自动化微生物鉴定系统根据微生物代谢特点,通过设计一系列反应底物,检测阳性和阴性反应模式,与已建立的数据库进行比较,根据一套判断规则提高检测质量,大多数系统通过检测 PH 改变、产色或荧光复合物释放的酶反应、不同碳源代谢活动的四唑盐指示剂、挥发性或非挥发性酸或细菌生长识别阳性和阴性反应,鉴定时间约 15~24 h。而基于肉汤稀释法的自动化药物敏感性实验系统常采用比浊测量法检验液体培养基中细菌生长,或者检测特殊培养基中荧光物质的水解作用。近年来以荧光底物水解为基础的确定细菌对抗菌药物耐药性的药敏试验系统加快了药敏试验的速度,缩短了检验的报告时间,从结构判读来看,理论上,荧光检测法的灵敏度高于浊度发,可更快的评价微生物的生长状况,但荧光法间接检测微生物的生长,并基于所有细菌都可以代谢荧光底物,非繁殖体酶的活性无意义及荧光底物不干扰所有被检抗菌药物的活性的假设,因此尚无法确切比较二者优势。目前商业化微生物鉴定和药敏系统主要为 Vitek 2 (bio-Mérieux)、MicroScan (Siemens)、Phoenix (Becton Dickinson)、ATB Plus Expert 和 Mini API^[1]。VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定药敏分析仪能快速鉴定出细菌类型并提供细菌药物敏感数据,其所携带的高级专家系统(AES)能分析鉴定结果与药敏数据结果的一致性与合理性,确定菌株的耐药表型并对细菌药敏结果进行合理的修改与解释,该系统细菌耐药表型库达 2 000 多种,建立在对 20 000 多个最低抑菌浓度(MIC)分布格局的研究基础上分析能力强大,药敏试验需 4~7 h, Vitek 2 检测准确率可达 97.4%~100%^[2-4]。MicroScan WalkAway 系统采用标准尺寸

的微量稀释平板,孵育一定时间后,通过光度测量及或荧光测量计检测生长终点,以生长指数超过预定水平为判断标准,对于敏感或高度耐药菌药敏检测 4.5~5.5 h 可获得结果, MicroScan WalkAway-96 检测凝固酶阴性葡萄球菌耐药性检出准确率为 94.6%^[5]。

自动化药物敏感性试验系统提高了药敏试验的可重复性,缩短了检测时间,与手工操作相比其大大降低劳动强度,但无论仪器自动化程度有多高,仍然需要常规方法分离细菌、制备细菌悬液,而接种量的准确性、细菌的纯度是影响所有仪器结果的主要因素,此外商业化试验板中的抗菌药物难以根据医疗机构使用的品种进行调整,目前的系统尚不能检测所有与临床相关菌群的药物敏感性,拓展检测种类、准确检测耐药机制方面还需要进一步完善。

2 免疫学检测技术在临床病原微生物鉴定和诊断的应用

免疫学检测技术是感染性疾病诊断和病原生物鉴定的重要手段之一,包括免疫学鉴定和免疫学诊断两个方面。免疫学鉴定使用已知的特异性抗体检测标本中或分离培养物中的未知病原生物,以确定病原生物的种或型;免疫学诊断是用已知的病原生物或其特异性抗原检测患者血清中相应的特异性抗体及其效价的动态变化。该技术方法已成为微生物实验室常用的快速检测技术。

利用免疫学特异性反应与荧光示踪技术相结合的显微镜检查手段,既保持了血清学的高特异性,有极大地提高了检测的敏感性。应用单克隆抗体结合各种形式的放射免疫分析、酶免疫分析、荧光免疫分析、时间分辨荧光免疫分析、化学发光免疫分析、生物发光免疫分析等,可检测临床标本中微量微生物抗原,节省了细菌或病毒培养过程,直接完成微生物感染的快速诊断。目前临床标本直接快速诊断技术主要有:肥达反应、产志贺毒素的大肠埃希菌乳胶凝集试剂^[6]、新型隐球菌乳胶凝集试验、结核分枝杆菌抗体检测、艰难梭菌毒素检测、布氏杆菌血清凝集试验、半乳甘露聚糖(GM)试验、(1,3)- β -D-葡聚糖(G试验)^[7]、荧光抗体检测技术及酶联免疫测试技术等已经应用于细菌分型和鉴定,这些检测方法具有较好的敏感度和特异性,但一般适用于抗原性较强及病程较长的传染病诊断,单份血清往往不能区分现症感染或既往感染,只有抗体效价明显高于正常人水平或虽病程进展改变更具有诊断价值。

3 分子生物学技术在临床病原微生物检测中的应用

分子生物学技术的不断发展与完善,为病原生物的鉴定提供了新的更加快捷、简便和准确诊断手段,“分子革命”已经显

* 基金项目:国家科技支撑计划资助项目(2012EP00102);高等学校博士学科点专项科研基金新教师类资助项目(20110001120086);北京大学人民医院发展与研究基金资助项目(RDC2011-14, RDU2011-06)。 作者简介:吕游,男,讲师,主要从事外科肿瘤发病机制及感染相关基础与临床研究。 △ 通讯作者, E-mail: dr. wangshan@sohu. com。

著地影响了其他微生物学分支;传统以培养为基础的感染诊断技术逐步被更为先进的分子诊断方法取代^[8],通常包括核酸杂交、特异性序列扩增(常用 real-time PCR,巢式 PCR 等)、特异性核酸片段测序、溶解曲线分析、特异性探针反向杂交、基因芯片检测等^[9-10]。

3.1 核酸杂交技术的应用 核酸分子杂交技术是利用核酸变性和复性的性质,使具有一定同源性的 2 条核酸单链在一定条件下按照碱基互补配对原则形成异质双链的过程。依照探针的来源和性质,核酸探针分为基因组 DNA 探针、cDNA 探针、RNA 探针和寡核苷酸探针 4 类,它们具有各自的特点和适用范围,其标记物有放射性核素和非放射性核素,后者包括生物素、地高辛、荧光素、酶和化学发光标记。核酸分子杂交可分为固相杂交盒液相杂交两大类。常用的固相杂交类型包括 Southern 印迹杂交、Northern 印迹杂交、斑点或狭缝杂交、菌落杂交。该技术为一种特异性强、敏感、简便、快速的检测方法,可直接检测出临床中的病原菌,而不受非致病菌的影响,尤其对那些尚不能分离培养或很难培养的细菌的检测具有特殊的意义;在细菌耐药性检测方面,根据决定细菌耐药性的基因制成探针,以检测待检标本中是否存在相应的耐药基因,例如根据耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的 *mecA* 基因设计的 DNA 探针,检测标本中是否存在 *mecA* 片段,从而检测菌株对抗菌药物的耐药情况,检测时间从 48~72 h 缩短至 2~5 h^[11]。

3.2 聚合酶链反应(PCR)的应用 随着分子生物学技术的迅速发展,对病原微生物的鉴定已不再局限于外部形态结构及生理特性等一般检验上,特别在核酸水平的检测上,使人们对微生物的认识从外部表型逐渐转向内部基因结构特征,微生物的检测也从生化、免疫方法转向基因水平检测。PCR 是一种模拟天然 DNA 复制过程,简便而快速的特异性 DNA 体外扩增技术,应用这种技术可在数小时内将研究的基因或片段扩增百万倍,PCR 产物可以通过琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳法、PCR-限制性片段长度多态性分析法、核酸探针杂交法、PCR-ELISA、单链构型多态性分析法、PCR-寡核苷酸连接试验和 PCR 产物测序等方法检测。

PCR 技术已成为微生物学研究最有力的工具之一并在细菌感染性疾病的诊断中得到日益广泛的应用。(1)细菌的快速检测:只要选择合适的引物,所有细菌都可用 PCR 进行检测,但大多数细菌感染通过细菌培养 3~4 d 即可得到结果^[12]。对于尚无其他诊断技术或现有的技术不成熟或敏感性低及不能及时反映感染情况的疾病,如结核分枝杆菌培养需要 1~2 个月,ZN 染色及培养敏感性为 27.7%和 19.9%,而采用 multiplex PCR 和 RFLP 敏感性分别为 92.9%和 95.7%^[13],麻风病的病原诊断只能从组织活检中取材做抗酸染色镜检阳性率低,采用 RT-PCR-HRM 方法可快速、简便及高通量诊断和筛选耐药突变^[14],以及肺炎支原体、立克次体等均适宜用 PCR 检测诊断。(2)细菌毒素的检测:不同的细菌产生不同的毒素,根据各毒素基因序列设计合成特异的引物,扩增特异的毒素基因片段,如金黄色葡萄球菌产生的肠毒素,剥脱毒素等都可通过 PCR 进行基因检测,特异性强敏感性高。(3)细菌耐药性的检测:根据耐药基因序列设计不同的引物,进行扩增并检出耐药基因。如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 *mecA* 基因^[15],耐 β -内酰胺抗菌药耐药(ESBLs)的 CTX-M、OXA、VIM 及耐万古霉素肠球菌 *vanA*、*vanB* 检测等的检测^[16-17]。(4)细菌流行病学调查:通过 PCR 扩增后酶谱分析及 PCR-限制性片段长度多态

性分析法等可为细菌分型和流行病学调查提供依据。

实时荧光定量 PCR 技术是 DNA 定量技术的一次飞跃,运用该技术可对 DNA、RNA 样品进行定量和定性分析,目前该技术已被应用于 DNA 或 RNA 的绝对定量分析包括病原微生物或病毒含量检测等,与传统 PCR 比较具有快速、简单、定量及低污染风险等优点,特别是对难培养病原菌诊断具有明显优势,目前已有多种结核分枝杆菌诊断试剂盒如 real-time PCR-based Xpert MTB/RIF 试剂盒在国外广泛应用^[18]。

3.3 生物芯片技术的应用 基因芯片技术具有多样品并行进行处理,分析速度快、所需样品少、污染少等优点,近年来给基础研究、临床诊断、药物筛选、指导临床药及治疗等研究领域带来革命性的影响^[19]。迄今为止,已知的 51 个人类致病菌很可能出现在大多数病原样品中,多个细菌感染约占感染的 21.7%,而这个数据常由于检验技术水平的限制而低估^[20]。而基因芯片技术在感染性疾病诊断中可在一张芯片上一次对多个样本或对混合感染的一个标本进行检测,用极少量样品,即可在极短时间内获得大量信息。病原微生物的不同亚型、不同的突变株会导致患者的发病程度、患者对药物的敏感程度等差异,对于病原微生物耐药基因的检测可以帮助医生了解病情,从而制定最佳的治疗方案。基因芯片技术已用于临床常见感染性细菌混合感染、耐药菌及毒力的检测^[21-22]。

蛋白芯片是将经过特殊处理的固相材料表面固定了许多蛋白质分子的硅片、玻片及塑料片等材料,这些蛋白质分子可以是抗原、抗体及配体,可以检测相应的抗体、抗原及蛋白质。功能蛋白芯片作为高通量检测工具克服了 DNA 芯片的局限,提供了蛋白功能分析平台用于临床蛋白组学研究包括病原菌素质之间的作用及标志物鉴定等^[23]。

随着快速诊断技术的发展,其他如基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF)^[24]、变性高效液相色谱检测(DHPLC)^[25]、变性梯度凝胶电泳(DGGE)^[26]等为实验室提供更加快速、准确的检测并能及时、有效地为临床治疗提供了多样性分析检测方法。无论采取哪一种检测技术都应当根据具体患者群体和实验环境对其性能进行评价,达到最佳的检测效果。

参考文献

- [1] Winstanley T, Courvalin P. Expert systems in clinical microbiology[J]. Clin Microbiol Rev, 2011, 24(3): 515-556.
- [2] Crowley E, Bird P, Fisher K, et al. Evaluation of the VITEK 2 Gram-negative(GN) microbial identification test card: collaborative study[J]. J AOAC Int, 2012, 95(3): 778-785.
- [3] Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, et al. Comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility system with the clinical and laboratory standards institute(CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing(EUCAST) Broth Microdilution Reference Methods and with the Sensititre YeastOne and Etest techniques for in vitro detection of antifungal resistance in yeast isolates[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(5): 1782-1786.
- [4] 黄烈, 张银辉, 裴署萍, 等. 全自动微生物分析仪检测细菌耐药表型性能评价[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(5): 602-603
- [5] Patteet L, Goossens H, Ieven M. Validation of the MicroScan-96 for the species identification and methicillin susceptibility testing of clinical significant coagulase-negative staphylococci[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012, 31(5): 747-751.

- [6] Li R, Harada T, Honjoh K, et al. Phylogenetic analysis and Shiga toxin production profiling of Shiga toxin-producing/enterohemorrhagic *Escherichia coli* clinical isolates[J]. *Microb Pathog*, 2010, 49(5):246-251.
- [7] Acosta J, Catalan M, del Palacio-Pérez-Medel A, et al. Prospective study in critically ill non-neutropenic patients: diagnostic potential of (1,3)- β -D-glucan assay and circulating galactomannan for the diagnosis of invasive fungal disease[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012, 31(5):721-731.
- [8] Bullman S, Lucey B, Sleator RD. Molecular diagnostics: the changing culture of medical microbiology[J]. *Bioeng Bugs*, 2012, 3(1):1-7.
- [9] Katano H, Kano M, Nakamura T, et al. A novel real-time PCR system for simultaneous detection of human viruses in clinical samples from patients with uncertain diagnoses[J]. *J Med Virol*, 2011, 83(2):322-330.
- [10] Romanelli AM, Sutton DA, Thompson EH, et al. Sequence-based identification of filamentous basidiomycetous fungi from clinical specimens: a cautionary note[J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(3):741-752.
- [11] Stürenburg E. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from clinical samples: methods, effectiveness and cost considerations[J]. *Ger Med Sci*, 2009, 6(1):7.
- [12] Insa R, Marin M, Martin A, et al. Systematic use of universal 16S rRNA gene polymerase chain reaction (PCR) and sequencing for processing pleural effusions improves conventional culture techniques[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2012, 91(2):103-110.
- [13] Chowdhury IH, Sen A, Bahar B, et al. A molecular approach to identification and profiling of first-line-drug-resistant mycobacteria from sputum of pulmonary tuberculosis patients[J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(6):2082-2084.
- [14] Li W, Matsuoka M, Kai M, et al. Real-time PCR and high-resolution melt analysis for rapid detection of *Mycobacterium leprae* drug resistance mutations and strain types[J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(3):742-753.
- [15] Söderquist B, Neander M, Dienus O, et al. Real-time multiplex PCR for direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in clinical samples enriched by broth culture[J]. *APMIS*, 2012, 120(5):427-432.
- [16] Woodford N. Rapid characterization of beta-lactamases by multiplex PCR[J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 642(1):181-192.
- [17] Mark A, Miller MA, Chong G, et al. Comparison of PCR and culture for screening of vancomycin-resistant *Enterococci*: highly disparate results for vanA and vanB[J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(12):4136-4137.
- [18] Hoek KG, Van Rie A, van Helden PD, et al. Detecting drug-resistant tuberculosis: the importance of rapid testing[J]. *Mol Diagn Ther*, 2011, 15(4):189-194.
- [19] McLoughlin KS. Microarrays for pathogen detection and analysis[J]. *Brief Funct Genomics*, 2011, 10(6):342-353.
- [20] Balmer O, Tanner M. Prevalence and implications of multiple-strain infections[J]. *Lancet Infect Dis*, 2011, 11(11):868-878.
- [21] Cohen Stuart J, Dierikx C, Al Naiemi N, et al. Rapid detection of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae using ligation-mediated amplification with microarray analysis[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(7):1377-1381.
- [22] Peterson G, Bai J, Nagaraja TG, et al. Diagnostic microarray for human and animal bacterial diseases and their virulence and antimicrobial resistance genes[J]. *J Microbiol Methods*, 2010, 80(3):223-230.
- [23] Zhu H, Cox E, Qian J. Functional protein microarray as molecular decathlete: a versatile player in clinical proteomics[J]. *Proteomics Clin Appl*, 2012, 6(11/12):548-562.
- [24] Seng P, Rolain JM, Fournier PE, et al. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology[J]. *Future Microbiol*, 2010, 5(11):1733-1754.
- [25] Matsumoto M, Shigemura K, Shirakawa T, et al. Mutations in the *gyrA* and *parC* genes and in vitro activities of fluoroquinolones in 114 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* derived from urinary tract infections and their rapid detection by denaturing high-performance liquid chromatography[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2012, 40(5):440-444.
- [26] Chen Z, Trivedi HM, Chhun N, et al. Using DGGE and 16S rRNA gene sequence analysis to evaluate changes in oral bacterial composition[J]. *Chin J Dent Res*, 2011, 14(2):95-103.

(收稿日期:2012-08-09)

• 综 述 •

基因表达谱在肿瘤防治研究及临床应用中的进展^{*}

孟爽爽 综述, 张艳亮, 段 勇[△] 审校

(昆明医科大学第一附属医院检验科, 云南昆明 650003)

关键词: 基因; 基因表达谱; 肿瘤; 微阵列技术

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.07.036

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)07-0829-03

肿瘤是威胁人类健康的主要疾病之一, 每年都有超过 1 千万人诊断为肿瘤, 并且有 760 万人死于肿瘤^[1]。单个基因的异常并不足以引起肿瘤, 现已证实多阶段多基因的异常的遗传累积作用是各型肿瘤发生和发展的主要因素^[2]。由于多种基因

组基因的畸变, 在同一个肿瘤内, 存在多种基因不同的细胞亚群^[3]。这种多基因的畸变导致不同基因表达水平的不同, 研究不同基因在肿瘤发生、发展中的变化, 不仅可以初步探究肿瘤发生的机制, 同时也可以为早期诊断和预后提供依据。基因表

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81160292)。 作者简介: 孟爽爽, 女, 在读研究生, 主要从事分子生物学和生物化学研究。

[△] 通讯作者, E-mail: duanyong992003@yahoo.com.cn。