

gastric bypass[J]. Surg ObesRelat Dis, 2020, 16(7): 863-867.

[31] MANES G, PIERAMICO O, UOMO G, et al. Relationship of sliding hiatus hernia to gastroesophageal reflux disease; a possible role for Helicobacter pylori infection [J]. Dig Dis Sci, 2003, 48(2): 303-307.

[32] HAMADA H, HARUMA K, MIHARA M, et al. High incidence of reflux oesophagitis after eradication therapy for Helicobacter pylori: impacts of hiatal hernia and corpus gastritis[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2000, 14(6): 729-735.

[33] MITTAL R, VAEZI M F. Esophageal motility disorders and gastroesophageal reflux disease[J]. N Engl J Med, 2020, 383(20): 1961-1972.

[34] FAN Y P, CHAKDER S, GAO F, et al. Inducible and neuronal nitric oxide synthase involvement in lipopolysaccharide-induced sphincteric dysfunction [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001, 280(1): G32-G42.

[35] LEE S J, PARK H, CHANG J H, et al. Generation of nitric oxide in the opossum lower esophageal sphincter during physiological experimentation [J]. Yonsei Med J, 2006, 47(2): 223-229.

[36] PARK H, CLARK E, CULLEN J J, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in the lower esophageal sphincter of the endotoxemic opossum [J]. J Gastroenterol, 2002, 37(12): 1000-1004.

[37] PRIEGO-RANERO Á, OPDENAKKER G, URIBE-URIBE N, et al. Autoantigen characterization in the lower esophageal sphincter muscle of patients with achalasia[J]. Neurogastroenterol Motil, 2022, 34(9): e14348.

[38] GARGUS M, NIU C, VALLONE J G, et al. Human esophageal myofibroblasts secrete proinflammatory cytokines in response to acid and toll-like receptor 4 ligands [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2015, 308(11): G904-G923.

[39] 刘菊, 柳媛, 金振宇, 等. 旋覆代赭汤对反流性食管炎模型大鼠食管组织及外周血中 IL-18 及相关促炎因子表达的影响[J]. 江苏中医药, 2021, 53(6): 75-79.

[40] NADATANI Y, HUO X, ZHANG X, et al. NOD-like receptor protein 3 inflammasome priming and activation in Barrett's epithelial cells[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2016, 2(4): 439-453.

[41] 刘亚婷, 刘菊, 苗嘉萌, 等. 旋覆代赭汤对反流性食管炎大鼠模型 TLR4/NF-κB 的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40(1): 80-84.

[42] INADA T, HAMANO N, YAMADA M, et al. Inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha in delayed gastric emptying and gastrointestinal transit induced by lipopolysaccharide in mice[J]. Braz J Med Biol Res, 2006, 39(11): 1425-1434.

[43] WEST S D, SULIBURK J W, SMITH G S, et al. Effects of lipopolysaccharide on gastric stasis; role of cyclooxygenase[J]. Dig Dis Sci, 2006, 51(4): 754-765.

[44] YUAN P Q, WU S V, TACHÉ Y. Urocortins and CRF type 2 receptor isoforms expression in the rat stomach are regulated by endotoxin; role in the modulation of delayed gastric emptying [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012, 303(1): G20-G31.

[45] OKUMURA T, SHOJI E, TAKAHASHI N, et al. Delayed gastric emptying by Helicobacter pylori lipopolysaccharide in conscious rats [J]. Dig Dis Sci, 1998, 43(1): 90-94.

[46] ZHANG C L, GENG C H, YANG Z W, et al. Changes in patients' symptoms and gastric emptying after Helicobacter pylori treatment[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(18): 4585-4593.

[47] VERDU E F, BERCIK P, HUANG X X, et al. The role of luminal factors in the recovery of gastric function and behavioral changes after chronic Helicobacter pylori infection[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008, 295(4): G664-G670.

[48] LIU B, DONG J, WANG S, et al. Helicobacter pylori causes delayed gastric emptying by decreasing interstitial cells of Cajal[J]. Exp Ther Med, 2021, 22(1): 663.

[49] MACHADO R S, REBER M, PATRÍCIO F R, et al. Gastric emptying of solids is slower in functional dyspepsia unrelated to Helicobacter pylori infection in female children and teenagers [J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2008, 46(4): 403-408.

· 综 述 ·

(收稿日期: 2022-04-21 修回日期: 2022-09-29)

呼吸道病原体检测平台应用进展*

周承勃森^{1,2}, 贾红¹综述, 鞠长燕^{2△}审校

1. 西南医科大学公共卫生学院, 四川泸州 646000; 2. 广东省深圳市南山区疾病预防控制中心, 广东深圳 518000

摘要: 呼吸道感染(RTIs)是临床感染性疾病的主要死因。随着医学技术的高速发展, 呼吸道病原体检测技术取得了巨大进展, 其中高通量测序技术平台在呼吸道罕见病原体诊断中发挥了重要作用。该文基于传统

* 基金项目: 深圳市“医疗卫生三名工程”引进高层次医学团队项目(SZSM201803081); 深圳市南山区科技计划项目(南科研卫第 2020006 号); 深圳市南山区医学重点学科项目(传染病预防与控制)。

△ 通信作者, E-mail: juchy3572@163.com。

病原体检测技术、生物芯片技术以及二代测序技术,结合呼吸道病原体检测平台的应用,从技术原理、临床应用展开述评,以期对呼吸道病原体高通量检测的临床实践提供参考。

关键词: 呼吸道病原体; 高通量检测; 检测平台; 综述文献

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2022.24.024

中图法分类号: R446

文章编号: 1673-4130(2022)24-3057-08

文献标志码: A

Application progress of respiratory pathogen detection platform*

ZHOU Chengbosen^{1,2}, JIA Hong¹, JU Changyan^{2△}

1. School of Public Health, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China;

2. Nanshan District Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen, Guangdong 518000, China

Abstract: Respiratory tract infections (RTIs) are the main cause of death in clinical infectious diseases. With the rapid development of medical technology, great progress has been made in respiratory pathogen detection technology. Among them, the platform of high-throughput sequence technology has played an important role in the diagnosis of rare respiratory pathogens. Based on the traditional pathogen detection technology, biochip technology and second-generation sequencing technology, combined with the application of respiratory pathogen detection platform, this paper reviews their technical principles and clinical applications in order to provide a reference for the clinical practice of respiratory pathogen detection.

Key words: respiratory pathogens; high-throughput detection; detection platform; review

呼吸道感染(RTIs)是临床感染性疾病的主要死因^[1-2]。呼吸道感染在 2019 年世界常见死亡原因中排名第四,造成了全球超过 290 万人的死亡^[3-4]。近年来,呼吸道感染新发病原体不断出现,从严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)、中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)、甲型流感病毒 H7N9 亚型,到严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2(SARS-CoV-2),新型呼吸道感染病原体给公共卫生防控带来严峻挑战的同时,也给社会造成了巨大的经济损失^[5-7]。

了解呼吸道感染的病原学,并对病原体进行早期、快速、准确的筛查对呼吸道感染性疾病控制至关重要^[8]。由于传统的检验方法在进行呼吸道病原体检测时检测速度慢(2~5 d)、通量低,以及在面对呼吸道未知微生物时存在局限性,高通量的检验方法得以发展^[9-10]。有研究表明,呼吸道感染高通量检测技术不仅能实现快速检测,还可以显著减少抗菌药物的使用,具有很高的社会效益和经济效益^[10-11]。近年来,呼吸道病原体检测技术不断创新,新的呼吸道病原体检测平台不断推出^[12-13]。如何选用呼吸道病原体检测平台以实现成本-效益的最大化,成为专业人员关注的问题。本文对目前常见呼吸道病原体检测的商品化平台进行综述,意在了解目前高通量呼吸道病原体检测平台的性能,以期对呼吸道病原体检测平台的临床实践提供参考。

1 基于传统呼吸道病原体检测技术的检测平台

1.1 基于免疫法的检测平台 免疫化学检测法是利用免疫学抗原抗体反应,以荧光素、酶、放射性核素或电子致密物质等对抗原或抗体加以标记,对某些蛋白质(抗原或抗体)进行检测的技术^[14]。ArcDia 公司的 mariPOC 是一种基于免疫化学检测法的双光子荧光

激发检测系统,其原理是待检抗原先被特异性抗体捕获,带有荧光标记的抗体再与其结合,进而实现病原体检测^[15]。mariPOC 具有完全自动、可现场使用、约 20 min 自动报告的特点^[15]。其呼吸道面板(respi)可检测来自上、下呼吸道的 9 种临床相关病原体^[15]。GUNELL 等^[16]联合芬兰 14 个实验室共进行了 22 485 次检测,证明了 mariPOC[®] respi 在日常监测中的有效性。

1.2 基于多重 PCR 技术的检测平台 多重 PCR 技术可以同时检测同一标本中的呼吸道临床常见病原体。其工作原理主要是应用多重引物,先针对不同的病原体核酸进行特异性扩增,再根据不同病原体的扩增产物判断感染何种病原体^[17]。市场上有多种基于多重 PCR 的呼吸道病原体检测试剂,可同时检测数种呼吸道病原体,适用于绝大多数型号的 PCR 仪,但其检测通量不高。以下是两种试剂与仪器配套的一体化 PCR 检测平台,其检测通量较高,可同时检测十几种呼吸道病原体。

1.2.1 多重荧光 PCR 平台 多重荧光 PCR 技术是在多重 PCR 技术的基础上,加入了几种不同荧光基团,通过检测不同通道的荧光,实现对多个靶标的实时检测^[17]。Unyvero 是由 Curetis 公司开发的一种基于多重荧光 PCR 的检测系统,可对下呼吸道多重病原体与耐药基因进行检测和鉴定^[18],该系统使用单个检测阵列在多孔阵列膜上杂交实现定性扩增检测^[19]。其配套面板包括 Unyvero P50/P55。Unyvero P50 可检测 17 种肺炎病原体及耐药基因^[20]。Unyvero P55 肺炎面板可检测 21 种呼吸道病原体以及 17 种耐药基因^[21]。该系统自动化,检测全程大约需要 5 h^[20-21]。PAPAN 等^[20]报道,与培养相比,Unyvero P50 的总

体特异性较高,对于耐药基因的检测,75%与抗生素图谱一致。

1.2.2 多重反转录聚合酶链反应(多重 RT-PCR)结合毛细管电泳平台 多重 RT-PCR 结合毛细管电泳,即在多重 RT-PCR 的产物分析过程中,以弹性石英毛细管为分离通道,以高压直流电场为驱动力,依据样品中各组分之间分配行为差异实现分离的分析方法^[22]。Beckman Coulter 公司开发的 GeXP 是一种多重 RT-PCR 结合自动毛细管电泳的商品化系统。使用 GeXP,能够在 一根试管中对最多达 30 个基因的表达谱进行差异评估,其周转时间低于 5 h^[23],GeXP 检测成本较低,每次综合检测的成本约为 8 美元^[24]。LUO 等^[25]的研究表明 GeXP 检测中各病毒检测的灵敏度与近年来报道的实时 PCR 方法相似。

1.3 基于多重连接探针扩增(MLPA)技术的检测平台 MLPA 是一种可以同时定量检测多个靶基因的方法。MLPA 技术的基本原理是通过合理设计针对靶序列片段的 2 个特异探针,结合高度特异的杂交反应,并对杂交后的连接产物进行 PCR 扩增和毛细管

电泳,最后比较扩增片段长度或判定扩增片段的有无,实现对未知靶序列的鉴定^[26]。QIAGEN 公司的 RespiFinder 是一种基于 MLPA 技术的多参数测试面板,它通过多重连接探针扩增和电泳分析,通过对每个探针根据其特定长度进行识别,完成病原体检测^[27]。RespiFinder Smart 面板可以同时分析 15 例患者标本,区分 22 种病原体,其运行时间低于 6 h^[28]。REIJAN 等^[27]的研究表明与细胞培养结果相比,RespiFinder 检测的特异度和灵敏度均高于 92%。多项研究结果表明,该方法的灵敏度与单倍实时 RT-PCR 相当,人工操作时间比 RT-PCR 减少了一半以上^[27-29]。

1.4 基于传统检测技术的呼吸道病原体检测平台性能对比 基于传统呼吸道病原体检测技术的商品化平台大大扩展了检测的通量,并缩短了检测的时间,详见表 1。在基于传统呼吸道检测技术的检测平台中,免疫法的 mariPOC 检测时间最短,主要用于呼吸道常见病原体的现场检测。基于多重 PCR 技术的 Unyvero,可实现对下呼吸道病原体的检测,特别的是,它还可用于下呼吸道病原体耐药基因的检测。

表 1 基于传统呼吸道病原体检测技术的检测平台的特性

技术原理	仪器名称	面板	靶标	检测时间	优势
免疫法	mariPOC	respi	9 种呼吸道病原体 ^[15]	20 min ^[15]	用于现场使用,检测时间短 ^[15]
多重 PCR	Unyvero	Unyvero P50	17 种肺炎病原体及 17 种耐药基因 ^[20]	5 h ^[20]	下呼吸道病原及其耐药基因检测 ^[18]
		Unyvero P55	21 种呼吸道病原体以及 17 种耐药基因 ^[21]	5 h ^[21]	
	GeXP		最多达 30 种呼吸道病原体 ^[23]	≤5 h ^[23]	检测的成本较低,检测灵敏度与实时 PCR 相似 ^[24]
多重连接探针扩增	RespiFinder Smart		22 种呼吸道病原体 ^[28]	≤6 h ^[28]	具有较高灵敏度和特异度 ^[27-29]

2 基于生物芯片技术的检测平台

2.1 液相悬浮芯片技术的检测平台 液相悬浮芯片技术也称微球体悬浮芯片技术(SAT),即通过在不同编码的微球上进行抗原抗体、酶底物、配体受体的结合反应及核酸杂交反应,再通过不同的激光分别对微球编码和报告荧光进行定性和定量检测,从而实现蛋白质、核酸等多种生物大分子的多重检测,通过微球的分类标记,可实现一次对标本中多达 100 个不同的目标进行检测^[30-31]。Thermo Fisher 公司的 Luminex 系统采用 SAT 技术。其配套检测试剂盒包括 xTAG RVP、NxTAG RPP。xTAG RVP 适用于 48 个样品,可同时检测 18 种常见呼吸道病毒,检测周期为 5 h;NxTAG RPP 适用于 96 个样品,可同时检测 21 种呼吸道病原体,检测周期小于 4 h^[32]。目前,市售的悬浮阵列试剂盒成本较低^[33]。HANSON 等^[34]的研究表明 Luminex 系统灵敏度高,是 ELISA 灵敏度的 10~100 倍,重复性好,可达 90%以上。

2.2 微流控基因芯片技术的检测平台 微流控基因

芯片技术是微流控系统 将不同实验室系统微缩在玻璃或者塑料机上,在微米级的尺度上构建液流通道、核酸提取池、反转录和 PCR 扩增池、杂交池等部件,整合了标本处理、反应、检测的全部流程,从而实现高通量检测^[35]。微流控基因芯片技术的微型化、高灵敏度、高通量以及低检测时间等技术优势,使其在生物医学研究中应用广泛^[35]。

2.2.1 FilmArray Bio Fire 公司的 FilmArray 是一套基于微流控技术的商品化系统。FilmArray 拥有的呼吸道检测面板包括 BioFire® RP、BioFire® RP2、BioFire® Pneumonia 面板^[36]。其中,RP 面板可靶向 19 种病原体;RP2 面板可靶向 21 种病原体;Pneumonia 面板可靶向 32 种病原体^[36]。手工操作只需 2 min,大约 1 h 即可获得结果^[36]。FilmArray 单次检测价格约为 200 美元,FilmArray 经过 FDA 认证,大量研究表明其对多数病原体的灵敏度和特异度高达 95%以上^[37-38]。

2.2.2 GenMark GNMK 公司的 GenMark 同样是

基于微流控的商品化系统,目前已被 Roche 公司收购。与传统微流控设备不同的是,其病原体检测采用二茂铁标记的寡核苷酸探针,它通过介质上电润湿的方式改变阻抗,从而对病原体进行检测^[39]。GenMark 系统单次最多检测 26 个标本^[40-41]。其 ePlex RP 面板可检测 17 种呼吸道病原体,每次分析的分析时间小于 2 h,单次检测成本约 90 美元^[39]。一项多中心临床试验,使用 BioFire RP 面板作为比较方法,评估 ePlex RP Panel 检测性能,ePlex RP 和 BioFire RP 面板对所有目标的总体一致性超过 95%^[42]。

2.2.3 QuantStudio™ 7 Flex Thermo Fisher 公司的 QuantStudio™ 7 Flex 系统采用集成的 Taqman® (TAC)低密度微流控卡作为面板,最多可同时进行 384 个个体的实时 PCR 反应,每个微流控卡最多可检

测 8 个标本,每个标本最多可同时进行 42 种病原体的检测^[43]。在面板更新的情况下,TAC 可根据研究目的修改引物/探针组,且不需要重新验证整个面板^[43]。LIU 等^[44]的研究中表明,TAC 的灵敏度和特异度均较高。

2.3 基于生物芯片技术的检测平台性能对比 基于生物芯片技术的呼吸道检测平台相较于基于传统呼吸道病原体检测技术的平台具有更高的准确性和更快的检测时间,详见表 2。其中,值得一提的是基于微流控基因芯片的 QuantStudio™ 7 Flex,其 Taqman® (TAC)呼吸道病原体检测面板可在无需验证面板的情况下,根据研究目的修改探针组,最多可实现 42 种病原体的检测。

表 2 基于生物芯片的呼吸道检测平台的特性

技术原理	仪器名称	面板	呼吸道靶标	检测时间	优势
液相悬浮芯片	Luminex	xTAG RVP	18 病毒 ^[32]	5 h ^[32]	检测成本较低
		NxTAG RPP	21 种病原体 ^[32]	<4 h ^[32]	是 ELISA 灵敏度的 10~100 倍 ^[34]
微流控基因芯片	FilmArray	The BioFire® RP	19 种病原体 ^[36]	1 h ^[36]	手工操作时间短,检测时间短 ^[36] 。大量研究表明 FilmArray 检测呼吸道病原体的灵敏度和特异度均较高 ^[37-38]
		The BioFire® RP2	21 种病原体 ^[36]		
		BioFire® Pneumonia	32 种病原体 ^[36]		
	GenMark (已被 Roche 收购)	ePlexRP	17 种病原体 ^[39]	<2 h ^[39]	相比其他微流控芯片成本较低 ^[42]
	QuantStudio™ 7 Flex	TaqMan® (TAC)	42 种病原体 ^[43]	<2 h ^[43]	可根据研究目的修改引物/探针组,且不需要重新验证整个面板 ^[43] 。面板的灵敏度和特异度均较高 ^[44]

3 二代测序技术平台

二代测序技术是基于 PCR 和基因芯片发展而来的 DNA 测序技术,二代测序通过在 DNA 复制过程中(RNA 需反转录为 cDNA),捕捉新添加的碱基所携带的特殊标记来确定目标序列^[45]。由于在二代测序中,随着读长增长,基因簇复制的协同性降低,测序质量下降,因此,二代测序具有通量高但读长短的特点^[46]。

3.1 二代测序平台分类

3.1.1 焦磷酸测序平台 焦磷酸测序,即在 DNA 聚合反应中释放焦磷酸 (PPi),并将焦磷酸用作特定碱基掺入的指示物,依次添加和去除 4 个碱基,通过检测由发光的酶级联释放的焦磷酸盐完成测序^[47]。QIAGEN 公司的 PyroMark 采用焦磷酸测序法,Roche 公司的 Roche 454 在此基础上采用了一种“水包油”的扩增方法,即在扩增时使用了包含 160 多万个光纤孔的平板,其中,每个孔是一个独立的 PCR 体系,所有的 DNA 模板都被链接在孔中水油包被的一个磁珠上^[48]。焦磷酸测序开拓了二代测序,但有其局限性:均聚物测序不准确,添加超过 5 个相同的核苷酸不能有效检测,其成本也相对较高^[48]。目前,焦磷

酸测序已经被淘汰^[48]。

3.1.2 氢离子测序平台 氢离子测序即克隆乳液中单个核糖核酸,然后将其放置在一个包含单个 pH 传感器矩阵的半导体芯片上,当 DNA 克隆通过合成进行测序时,局部 pH 值的变化可确定测序的核苷酸^[48]。Thermo Fisher 公司的 Ion Torrent 平台,采用氢离子测序。在应用中,这项技术检测速度快,可以实时测序,而且成本低^[49-50]。然而,有研究表明,该技术均聚物测序容易出错,因为在一个循环中重复使相应数量的氢离子释放,导致出现更高比例的电子信号^[49-50]。

3.1.3 边合成边测序平台 边合成边测序采用桥式扩增策略,即通过将单个 DNA 分子附着在流动细胞上,然后将其局部扩增成克隆簇;在接下来的测序和合成过程中,它构建互补 DNA,采用荧光标记核苷酸的光学读出,然后确定其碱基身份 (A, T, C, G)^[51]。在每个测序周期中,4 种核苷酸之间的自然竞争减少了与焦磷酸测序相比的固有偏差。因此,均聚物的测序错误被这种技术克服^[52-53]。Illumina 公司开发了这种方法,约 63%的测序工作是在该测序平台上进行的,此外, Illumina 在所有测序仪中拥有最高的

通量^[54]。

3.1.4 杂交与连接测序平台 杂交与连接测序法利用 DNA 连接酶来连接 DNA 序列中给定位置的核苷酸,通过已知序列对未知的目标 DNA 序列进行碱基配对和进行测序^[55]。阅读长度是该方法的一个主要限制^[56]。CG 公司的 Complete Genomics 采用连接法测序,后期被华大基因收购。特别的是,Complete Genomics 在构建测序文库时基因片段的两端加了接头,形成环状 DNA 模板。其拷贝序列采用类似滚环的扩增方式,其单克隆球状体也被称为 DNA 纳米球,利用锚定序列与碱基单链荧光探针混合物在连接酶作用下连接获得 DNA 序列信息。该方法是分段进行的,拥有较高的容错能力,后期的拼接也较容易^[56]。

3.2 基于二代测序技术的呼吸道检测平台性能对比

二代测序技术自焦磷酸测序以来不断发展,目前已成为临床常规病原学检测技术的重要辅助手段,其检测平台特性详见表 3。其中,采用边合成边测序技术的 Illumina 平台占据了大量市场^[54]。我国的华大基因在收购杂交与连接测序平台 Complete Genomics 后,也推出了国产的二代测序仪。

表 3 基于二代测序技术的呼吸道检测平台的特性

技术原理	仪器名称	特点	优势	劣势
焦磷酸测序	PyroMark Roche 454	通过测定释放的焦磷酸盐实现测序 ^[47] 采用“水包油”的扩增方式,再通过测定释放的焦磷酸盐实现测序 ^[48]		均聚物测序不准确 ^[48]
氢离子测序	Ion Torrent	通过测定局部 pH 值的变化实现测序 ^[48]	可以实时测序,成本低 ^[49-50]	均聚物测序容易出错 ^[49-50]
边合成边测序	Illumina	采用桥式扩增方式,再通过测定荧光信号实现测序 ^[51]	克服了均聚物测序不准确的问题 ^[52-53]	
杂交与连接测序	Complete Genomics	采用滚环扩增方式,再利用已知序列识别未知序列,实现测序 ^[56]	具有较高的容错和后期拼接能力 ^[56]	阅读长度受限 ^[56] (已被华大基因收购)

3.3 二代测序技术在呼吸道病原体检测中的应用

(1)病原体检测。MIAO 等^[57]在比较二代测序技术与培养对病原菌诊断效果的同时,评估抗生素暴露对检出率的影响,结果表明,二代测序技术的灵敏性优于培养,二代测序技术具有较高的病原菌识别灵敏性,且不受先前接触抗生素的影响,因此成为一种有前景的传染病检测技术。LI 等^[58]的研究表明,二代测序技术可提供全基因组序列,帮助确定病毒亚型和血清型。(2)多重耐药基因检测。QUAN 等^[59]利用二代测序技术开发了一种靶向测序方法,这种方法快速、廉价、多路复用能力强,而且足够灵活,可以靶向任何感兴趣的序列,并且可检测患者标本中抗菌药物的多重耐药基因。SAHOO 等^[60]开发了一种基于扩增子的高通量测序策略,与现有的耐药突变基因型检测方法相比,该方法对微小变异体的检测更加灵敏,具有更高的多路复用能力。(3)传染病防治。德国一名患者出现急性呼吸窘迫综合征症状,使用 PCR 和分离培养方法检测多种病原体均为阴性,FISCHER 等^[61]通过二代测序技术在 50 h 内快速确定了致病病原体是鸚鵡热衣原体,随后根据基因序列设计引物,并使用 PCR 验证了检测结果。在 2019 年末武汉 SARS-CoV-2 疫情中,研究者们通过二代测序技术实现了对病原体的快速鉴定及病毒全基因组序列的获取,并通过此病毒的特有基因序列,设计 RT-PCR 引物,生产了用于感染者病原学诊断的试剂盒^[62]。

二代测序技术的缺陷在于:(1)实验结果难以解释检出的病原体为背景微生物还是病原微生物^[63]。(2)目前进行二代测序技术检测的工作流程高度个体化,不同的操作流程仅适用于特定的感染类型或标本类型;由于工作流程缺乏方法标准化和验证,容易造成人为污染,最终导致结果的不确定^[64]。(3)中国单次标本的成本是 3 000 元人民币(约合 400 美元),高于任何单一的通用方法^[57]。

4 结 语

目前,对于医疗机构,特别是基层医疗机构而言,因资金不足、样本量太大不能进行检测,或因检测时间、检测结果不能满足临床需求的现象仍普遍存在^[65]。未来,随着分子诊断技术的不断发展,呼吸道疾病病原体核酸检测技术将朝着高通量、快速、自动化、低成本的方向发展。本文对常见的呼吸道病原体检测平台进行综述,将有助于临床医师以及研究人员结合专业知识,合理选用呼吸道病原体的诊断方法,以实现成本-效益的最大化。

参考文献

[1] 周洁楠,赵晓南,孙艳红,等. 2018—2019 年昆明地区严重急性呼吸道感染病例病原学分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2020,34(2):165-168.

[2] 邵楠. 临床呼吸道感染病毒组的研究[D]. 北京:协和医学院,2022.

[3] The top 10 causes of death[EB/OL]. (2020-12-09)[2022-

- 01-25]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
- [4] WHO reveals leading causes of death and disability worldwide;2000-2019[EB/OL]. (2020-12-09)[2022-02-05]. <https://www.who.int/news/item/09-12-2020-who-reveals-leading-causes-of-death-and-disability-worldwide-2000-2019>.
 - [5] ZHOU P, YANG X L, WANG X G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J]. *Nature*, 2020, 579(7798):270-273.
 - [6] 李沛翰, 李鹏, 宋宏彬. 宏基因组学在传染病防控中的应用进展[J]. *生物技术通报*, 2018, 34(3):43-52.
 - [7] 贾会学, 侯铁英, 李卫光, 等. 中国 68 所综合医院医院感染的经济损失研究[J]. *中国感染控制杂志*, 2016, 15(9):637-641.
 - [8] 邹晓辉, 曹彬. 呼吸道感染病原学诊断年度进展 2021[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2022, 45(1):78-82.
 - [9] 李群, 董晨明, 张芳, 等. 基于 ICU 可疑感染患者探讨 mNGS 与传统病原学检测的相关性研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2022, 17(5):568-573.
 - [10] 陈静, 牛培华, 谭文杰. 呼吸道感染样本病毒宏基因组学技术及其应用进展[J]. *病毒学报*, 2020, 36(6):1193-1200.
 - [11] 刘玮, 路颖, 于庆潭. 分子生物学技术在生物战病原微生物检测中的应用[J]. *国际检验医学杂志*, 2021, 42(23):2927-2930.
 - [12] HANSON K E, AZAR M M, BANERJEE R, et al. Molecular testing for acute respiratory tract infections:clinical and diagnostic recommendations from the IDSA's diagnostics committee[J]. *Clin Infect Dis*, 2020, 71(10):2744-2751.
 - [13] CRUZEIRO G A V, SALOMÃO K B, DE BIAGI CAO J R, et al. A simplified approach using Taqman low-density array for medulloblastoma subgrouping[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2019, 7(1):33.
 - [14] 贺淹才. 基因工程概论[M]. 北京:清华大学出版社, 2008.
 - [15] 郑凯文. 基于多重 PCR 与第二代高通量测序技术的下呼吸道病原检测方法研究[D]. 广州:华南理工大学, 2019.
 - [16] GUNELL M, ANTIKAINEN P, PORJO N, et al. Comprehensive real-time epidemiological data from respiratory infections in Finland between 2010 and 2014 obtained from an automated and multianalyte mriPOC® respiratory pathogen test[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2016, 35(3):405-413.
 - [17] 李伟, 陶然, 尚世强. 病原体核酸技术在儿童感染性疾病检测中的发展及应用[J]. *中华检验医学杂志*, 2019, 42(7):489-492.
 - [18] SUN L, LI L, DU S, et al. An evaluation of the Unyvero pneumonia system for rapid detection of microorganisms and resistance markers of lower respiratory infections-a multicenter prospective study on ICU patients[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2021, 40(10):2113-2121.
 - [19] SCHULTE B, EICKMEYER H, HEININGER A, et al. Detection of pneumonia associated pathogens using a prototype multiplexed pneumonia test in hospitalized patients with severe pneumonia[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11):e110566.
 - [20] PAPAN C, MEYER-BUEHN M, LANIADO G, et al. Assessment of the multiplex PCR-based assay Unyvero pneumonia application for detection of bacterial pathogens and antibiotic resistance genes in children and neonates[J]. *Infection*, 2018, 46(2):189-196.
 - [21] GADSBY N J, MCHUGH M P, FORBES C, et al. Comparison of Unyvero P55 pneumonia cartridge, in-house PCR and culture for the identification of respiratory pathogens and antibiotic resistance in bronchoalveolar lavage fluids in the critical care setting[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2019, 38(6):1171-1178.
 - [22] LI M, XIE Z, XIE Z, et al. Simultaneous detection of eight avian influenza A virus subtypes by multiplex reverse transcription-PCR using a GeXP analyser[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):6183.
 - [23] 麦柏盛, 徐曲毅, 刘超, 等. PCR 毛细管电泳法检测嗜水气单胞菌 *gyrB* 和 16SrRNA 基因; 溺死诊断方法[J]. *南方医科大学学报*, 2016, 36(11):1550-1554.
 - [24] YANG M J, LUO L, NIE K, et al. Genotyping of 11 human papillomaviruses by multiplex PCR with a GeXP analyzer[J]. *J Med Virol*, 2012, 84(6):957-963.
 - [25] LUO S, XIE Z, HUANG J, et al. Simultaneous differentiation of the N1 to N9 neuraminidase subtypes of avian influenza virus by a GeXP analyzer-based multiplex reverse transcription PCR assay[J]. *Front Microbiol*, 2019, 10:1271.
 - [26] 王雨萌, 周柯, 邵春艳, 等. 多重连接探针扩增技术 (MLPA) 在病原微生物检测与疾病诊断中的应用[J]. *农业生物技术学报*, 2021, 29(10):2031-2042.
 - [27] REIJAN S M, DINGEMANS G, KLAASSEN C H, et al. RespiFinder: a new multiparameter test to differentially identify fifteen respiratory viruses[J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(4):1232-1240.
 - [28] HATTOUFI K, TLIGUI H, OBTEL M, et al. Molecular Diagnosis of Pneumonia Using Multiplex Real-Time PCR Assay RespiFinder® SMART 22 FAST in a Group of Moroccan Infants[J]. *Adv Virol*, 2020, 2020:6212643.
 - [29] LI F, ZHANG Y, SHI P, et al. Mycoplasma pneumoniae and adenovirus coinfection cause pediatric severe community-acquired pneumonia [J]. *Microbiol Spectr*, 2022, e0002622.
 - [30] DOULL I, JOHNSTON S. Bacterial identification of adult lower respiratory tract infection[J]. *Lancet*, 1993, 341(8853):1160.
 - [31] 周晓芳, 盛海刚. Luminex 系统的技术原理与应用[J]. *临床检验杂志*, 2010, 28(4):247-249.
 - [32] MAHONY J, CHONG S, MERANTE F, et al. Development of a respiratory virus panel test for detection of twenty human respiratory viruses by use of multiplex PCR and a fluid microbead-based assay[J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(9):2965-2970.
 - [33] BIAGINI R E, SAMMONS D L, SMITH J P, et al. Com-

- parison of a multiplexed fluorescent covalent microsphere immunoassay and an enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of human immunoglobulin G antibodies to anthrax toxin[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004, 11(1):50-55.
- [34] HANSON K E, COUTURIER M R. Multiplexed Molecular Diagnostics for Respiratory, Gastrointestinal, and Central Nervous System Infections[J]. *Clin Infect Dis*, 2016, 63(10):1361-1367.
- [35] 周钱, 郭茂泽, 郑青松, 等. 医用微流控芯片研究进展[J]. *中国科学: 化学*, 2022, 52(1):89-101.
- [36] BioFire® FilmArray® Panels Comprehensive Panels and Better Diagnostics 2021[EB/OL]. [2022-02-27]. <https://www.biofire.com/products/the-filmarray-panels/#respiratory>.
- [37] LEBER A L, EVERHART K, DALY J A, et al. Multi-center Evaluation of BioFire FilmArray Respiratory Panel 2 for Detection of Viruses and Bacteria in Nasopharyngeal Swab Samples[J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56(6):e01945-17.
- [38] 范俊平, 肖盟, 王京岚, 等. Biofire Filmarray 下呼吸道感染试剂盒在危重症新型冠状病毒肺炎继发感染患者中的应用效果评价[J]. *协和医学杂志*, 2021, 12(1):38-43.
- [39] SCHMITZ J E, TANG Y W. The GenMark ePlex®: another weapon in the syndromic arsenal for infection diagnosis[J]. *Future Microbiol*, 2018, 13(16):1697-1708.
- [40] VAN ASTEN S A V, BOERS S A, DE GROOT J D, et al. Evaluation of the Genmark ePlex® and QIAstat-Dx® respiratory pathogen panels in detecting bacterial targets in lower respiratory tract specimens[J]. *BMC Microbiol*, 2021, 21(1):236.
- [41] LEE C C, MCMILLIN G A, BABIC N, et al. Evaluation of a CYP2C19 genotype panel on the GenMark eSensor® platform and the comparison to the Autogenomics Infiniti™ and Luminex CYP2C19 panels[J]. *Clin Chim Acta*, 2011, 412(11/12):1133-1137.
- [42] JARRETT J, UHTEG K, FORMAN M S, et al. Clinical performance of the GenMark Dx ePlex respiratory pathogen panels for upper and lower respiratory tract infections[J]. *J Clin Virol*, 2021, 135:104737.
- [43] HARVEY J J, CHESTER S, BURKE S A, et al. Comparative analytical evaluation of the respiratory TaqMan Array Card with real-time PCR and commercial multipathogen assays[J]. *J Virol Methods*, 2016, 228:151-157.
- [44] LIU K, JING H, CHEN Y, et al. Evaluation of TaqMan Array card (TAC) for the detection of 28 respiratory pathogens[J]. *BMC Infect Dis*, 2020, 20(1):820.
- [45] SIMNER P J, MILLER S, CARROLL K C. Understanding the promises and hurdles of metagenomic next-generation sequencing as a diagnostic tool for infectious diseases[J]. *Clin Infect Dis*, 2018, 66(5):778-788.
- [46] MCCOMBIE W R, MCPHERSON J D, MARDIS E R. Next-generation sequencing technologies[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2019, 9(11):a036798.
- [47] MARZORATI M, MAIGNIEN L, VERHELST A, et al. Barcoded pyrosequencing analysis of the microbial community in a simulator of the human gastrointestinal tract showed a colon region-specific microbiota modulation for two plant-derived polysaccharide blends[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2013, 103(2):409-420.
- [48] NAGABABU P, SATYANARAYANA S. DNA Binding and Photocleavage Studies of Cobalt (Ⅲ) Polypyridine Complexes: [Co(en)2PIP]3+, [Co(en)2IP]3+, and [Co(en)2phen-dione]3+[J]. *Bioinorg Chem Appl*, 2021, 2021:7161643.
- [49] MASCHER M, WU S, AMAND P S, et al. Application of genotyping-by-sequencing on semiconductor sequencing platforms: a comparison of genetic and reference-based marker ordering in barley[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10):e76925.
- [50] WANG J, HAN Y, FENG J. Metagenomic next-generation sequencing for mixed pulmonary infection diagnosis[J]. *BMC Pulm Med*, 2019, 19(1):252.
- [51] BENTLEY D R, BALASUBRAMANIAN S, SWERDLOW H P, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry[J]. *Nature*, 2008, 456(7218):53-59.
- [52] BRONNER I F, QUAIL M A. Best practices for Illumina library preparation[J]. *Curr Protoc Hum Genet*, 2019, 102(1):e86.
- [53] REUTER J A, SPACEK D V, SNYDER M P. High-throughput sequencing technologies[J]. *Mol Cell*, 2015, 58(4):586-597.
- [54] WILSON M R, NACCACHE S N, SAMAYOA E, et al. Actionable diagnosis of neuroleptospirosis by next-generation sequencing[J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(25):2408-2417.
- [55] EID J, FEHR A, GRAY J, et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules[J]. *Science*, 2009, 323(5910):133-138.
- [56] LIU L, LI Y, LI S, et al. Comparison of next-generation sequencing systems[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012:251364.
- [57] MIAO Q, MA Y, WANG Q, et al. Microbiological diagnostic performance of metagenomic next-generation sequencing when applied to clinical practice[J]. *Clin Infect Dis*, 2018, 67(Suppl 2):S231-S240.
- [58] LI B, SI H R, ZHU Y, et al. Discovery of bat coronaviruses through surveillance and probe capture-based next-generation sequencing [published correction appears in mSphere][J]. *mSphere*, 2020, 5(1):e00807-00819.
- [59] QUAN J, LANGELEIR C, KUCHTA A, et al. FLASH: a next-generation CRISPR diagnostic for multiplexed detection of antimicrobial resistance sequences[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(14):e83.
- [60] SAHOO M K, LEFTEROVA M I, YAMAMOTO F, et al. Detection of cytomegalovirus drug resistance mutations by next-generation sequencing[J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(11):3700-3710.
- [61] FISCHER N, ROHDE H, INDENBIRKEN D, et al. Rap-

id metagenomic diagnostics for suspected outbreak of severe pneumonia[J]. Emerg Infect Dis, 2014, 20(6):1072-1075.

[62] First NGS-based COVID-19 diagnostic[J]. Nat Biotechnol, 2020, 38(7):777.

[63] 宏基因组分析和诊断技术在急危重症感染应用专家共识组. 宏基因组分析和诊断技术在急危重症感染应用的专家共识[J]. 中华急诊医学杂志, 2019, 28(2):151-155.

[64] DULANTO CHIANG A, DEKKER J P. From the pipeline to the bedside: advances and challenges in clinical metagenomics[J]. J Infect Dis, 2020, 221(Suppl 3):S331-S340.

[65] 王丽萍, 曹怡, 曾令佳, 等. 全国基层医疗机构传染病诊断报告现状分析[J]. 疾病监测, 2014, 29(3):176-180.

(收稿日期:2022-03-01 修回日期:2022-10-31)

• 综 述 •

环介导等温扩增技术在 SARS-CoV-2 核酸检测中的应用研究

何桢硕¹, 高 盼², 张丽月¹综述, 刘万红^{1△} 审校

1. 武汉大学基础医学院, 湖北武汉 430070; 2. 河北省衡水市第六人民医院检验科, 河北衡水 053200

摘 要:严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2(SARS-CoV-2) 的高度传染性导致全球 SARS-CoV-2 感染病例迅速增加。寻找一种较传统实时反转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术更加准确、快速的检测方法对疾病确诊及疫情防控尤为重要。环介导等温扩增技术(LAMP)与反转录酶相结合(RT-LAMP)已成功应用于 SARS 与中东呼吸综合征的检测, 在 SARS-CoV-2 检测中亦表现出潜在优势。该文对 SARS-CoV-2 的结构特点、人类感染机制、LAMP 的检测原理及其在 SARS-CoV-2 检测中的应用研究进展进行详细综述, 以为临床提供一种较 RT-PCR 更加快速、特异且具有明显成本-效益的 SARS-CoV-2 核酸检测方法。

关键词:反转录环介导等温扩增; 实时反转录荧光定量聚合酶链反应; 严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2022. 24. 025 中图法分类号:R446. 5

文章编号:1673-4130(2022)24-3064-06 文献标志码:A

Application of loop-mediated isothermal amplification technique in nucleic acid detection of SARS-CoV-2

HE Zhenshuo¹, GAO Pan², ZHANG Liyue¹, LIU Wanhong^{1△}

1. School of Basic Medical Sciences, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430070, China ;
2. Department of Clinical Laboratory, Hengshui Municipal Sixth People's Hospital, Hengshui, Hebei 053200, China

Abstract: The high infectivity of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has led to a rapid increase in the cases of SARS-CoV-2 infection worldwide. It is particularly important to find a more accurate and rapid detection method than the traditional real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) technique for the disease diagnosis and epidemic prevention and control. The loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique in combination with reverse transcriptase has been successfully applied for the detection of SARS and MERS, and also shows the potential advantage in the detection of SARS-CoV-2. This paper in detail reviews the structural features of SARS-CoV-2, human infection mechanism, detection principle of LAMP detection and the application study advances in the SARS-CoV-2 detection in order to provide a more rapid, more specific and obvious cost-benefit SARS-CoV-2 nucleic acid detection method for clinic.

Key words: loop-mediated isothermal amplification; real time reverse transcription polymerase chain reaction; severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

2019 年出现的新型冠状病毒感染给全球公共卫生系统带来了巨大挑战, 2020 年 2 月国际病毒分类委员会将该新型冠状病毒命名为严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2(SARS-CoV-2), 由 SARS-CoV-2 感染而引起的疾病命名为 COVID-19。虽然 COVID-19 的病死率不及 2003 年的 SARS 以及 2012 年的中东

△ 通信作者, E-mail:157208315@qq. com。
网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20221028.1052.002.html\(2022-10-28\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20221028.1052.002.html(2022-10-28))