

# 新传染病的快速诊断要求发展 微生物学检验新技术

王金良

作者单位:300042 天津市,天津市公安医院

自 21 世纪以来,全球范围内在 2003 年发生了严重的急性呼吸综合征(SARS)的爆发,2004 年发生了禽流感对人类的侵袭,同年我国局部地区出现致死性猪链球菌的爆发性流行。2007 年至今流行小儿手足口病。2009 年开始了甲型 H1N1 的大面积流行,控制的前景现仍不容乐观。对于新传染病的及时诊断和控制流行均急切地需要快速的检验技术,原有的手段已显然不能适应。

分子生物学技术的迅速兴起,使微生物的检出、鉴定、新病原体的发现,微生物致病因素和耐药机理的研究,菌株的分型和流行病学等均发展到基因水平。基因诊断技术彻底改变并将继续改变临床微生物学和微生物检验的面貌。现择其主要者简介如下。

## 1 各种新型的 PCR 技术用于微生物的快速鉴定与分型

**1.1 一致-简并杂交核苷酸引物(consense-degenerate hybrid oligonucleotide prime, CODEHOP)** 用于未知病原微生物的检验<sup>[1]</sup>,其特点是有多重引物构成引物库,引物包括两部分:其 3' 端均不同,是简并的核心区域,长度 11~12 核苷酸;而引物的 5' 端均相同,是非简并的相同夹子,长度 20~30 核苷酸。在初始扩增阶段,如能与 3' 端序列互补则 5' 端使扩增进行成为新一循环的模板,形成产物。由产物检测确定病原体基因。引物库及设计有专用软件。

**1.2 重复序列-PCR** 以特异引物扩增微生物基因组中重复出现的片段。通过扩增产物的比较(大小不等),由分析软件鉴定出微生物<sup>[2]</sup>。

**1.3 新型的不变温 PCR-环介导等温扩增技术(loop mediated isothermal amplification, LAMP)<sup>[3]</sup>** 此技术的特点是针对靶基因的特定区域设计 4 对特异引物,用链置换 DNA 聚合酶在等温(65℃)下进行扩增。在酶的作用下,与置换下的 DNA 形成新的互补链,成环状结构而持续扩增。从 dNTP 析出的焦磷酸根离子与反应液中的 Mg<sup>2+</sup>结合而成副产物——焦磷酸镁沉淀,由其浊度可判定扩增与否(阳性或阴性)。

**1.4 恒温实时荧光核酸扩增检测技术(simultaneous amplification and testing, SAT)** 此技术的特点是恒温扩增,荧光分子信标进行检测。在同一温度(42℃)下,先通过莫洛尼鼠白血

病毒逆转录酶,使靶 RNA 转录为双链 DNA,再在 T7 RNA 多聚酶作用下使之产生多个 RNA(100~1 000 个)拷贝,每一个 RNA 拷贝再逆转录进入下一循环。同时,带有荧光标记的探针与 RNA 拷贝结合产生荧光,由仪器检测荧光信号。

**1.5 多重 PCR (multiplex PCR)** 针对多种病原体设计对应的引物同时进行扩增,扩增条件适合者得以扩增,通过扩增产物的长度用电泳技术分离判定结果。此技术已用于同时扩增 14 种呼吸道病原体<sup>[4]</sup>。用多重巢式 PCR 同时扩增 21 种呼吸道病原体,包括 SARS 病毒、偏肺病毒、支原体、军团菌等<sup>[5]</sup>。且用多重 PCR 还可同时检出多种致腹泻大肠埃希菌及其致病基因<sup>[6]</sup>。

**1.6 实时荧光定量 PCR(real-time PCR)技术** 检测病原体及其定量。此技术的特点是在 PCR 反应体系中设置荧光探针和荧光淬灭探针<sup>[7]</sup>。当引物与靶序列结合而延伸时,两者分离,荧光得以发出。由耐热的 DNA 聚合酶的外切酶活性将荧光分子切下,由仪器检测。荧光发射时间和发射量与靶序列的拷贝数成函数关系,可自动绘出反应曲线并由内参物的反应线性而计算出拷贝数。现已广泛用于病毒、细菌、分枝杆菌、真菌、衣原体、支原体的定量。2008 年出现了一种“宽谱”real-time PCR 针对微生物的 28S rRNA 的大亚基检测病原性真菌,适用于多种标本,结果与培养法完全一致<sup>[8]</sup>。

**1.7 RT-PCR 扩增产物的熔解曲线分析** 此技术原用于基因变异的分析。因基因的核苷酸序列有差异,其 50% DNA 分子双链解开成单链所需的熔解温度(melting temperature, T<sub>m</sub>)也有差异。应用仪器自动设置逐步升温(可差至 0.1℃)而描绘出基因扩增产物的熔解曲线图。由曲线图的差异来鉴别病原体及病原体的分型,检查其致病因子,检出耐药基因等<sup>[9]</sup>。

## 2 基因芯片(DNA 微阵列)和液相芯片技术

**2.1 固相的基因芯片** 芯片已有多种:基因芯片、生物芯片、抗原芯片、蛋白质芯片、组织芯片等在检验技术中功能强大,用途广泛。此类技术的特点是用系列荧光(或其他标记物)标记的已知核苷酸序列在固相上结合而检出未知序列,用激光判读仪和生物信息学实现高通量的同时检测标本中可能存在的多种病原体。已报告的应用很多,如用基因芯片检测呼

吸道的 16 种病原体<sup>[10]</sup>、检测多种细菌及其耐药基因、检测多种病原性真菌和皮肤病原真菌等<sup>[11]</sup>。

**2.2 液相芯片** 此技术是近年迅速发展的高通量检测工具,特点是用标记了不同颜色的荧光的微粒子,以不同比例混合后分别结合于已知分子形成数十(百)探针。标本经扩增后与探针作用,用流式荧光检测仪判读。由不同的荧光颜色可知检出物,由荧光强度可知检出物的量。已报告的应用可同时检出呼吸道的 20 种病原体<sup>[12]</sup>;用多重 PCR 结合液相芯片可分析沙门菌的 O 抗原而分型,比传统的血清学方法更可靠;用于检测乙型肝炎病毒变异而致的对拉夫米定的耐药<sup>[13]</sup>;以及细菌分型、细菌和病毒耐药基因分型等。

### 3 与质谱分析技术结合的分子生物学技术

质谱技术具有强大的分析功能。用质谱技术分析微生物的基因已用于培养标本和非培养本来检出和鉴定微生物、进行分型;检测耐药基因和致病基因等。基本的检测方式有用培养的微生物进行气相色谱-质谱法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)来检测脂肪酸、多糖组分等进行鉴定。用培养的微生物以基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)检测氨基酸、多肽、蛋白进行鉴定。如直接用宫颈刷标本进行 MALDI-TOF-MS 来检测高危人乳头瘤病毒基因型<sup>[14]</sup>。对非培养标本用甲基化特异性的 PCR(methylation specific PCR, MS-PCR)检测,对扩增后的 DNA 进行鉴定。以及用非培养标本直接进行 DNA 分析来鉴定<sup>[15]</sup>。

**3.1 表面加强激光解析电离飞行时间质谱(surface enhanced laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, SELDI-TOF-MS)和电喷雾质谱技术(electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)** SELDI-TOF-MS 是蛋白质组学分析的重要手段,分析微生物的氨基酸、肽和蛋白的组成可进行微生物的鉴定和分型。ESI-MS 是目前应用最广泛的生物质谱技术之一。由于电喷雾电离质谱可产生多电荷峰,因此大大地扩大了检测的分子质量范围,同时灵敏度高,另外也可与高效液相色谱法及高效毛细管电泳分离技术联用,扩大了质谱在蛋白质化学研究中的应用。

**3.2 变性高压液相质谱法(denaturing high performance liquid chromatography, dHPLC)** 其特点是一种高通量筛查 DNA 序列的技术。PCR 扩增产物在变性和复性过程中因序列的差异形成同源双链和异源双链。经高压液相分离时,在层析柱上的保留时间不同,异源双链先被洗脱。故可由序列的差异而判定基因的不同。有文献<sup>[16]</sup>报告用此技术对细菌的内酰胺酶 CTX-M 进行分型,结果与测序一致。

**3.3 血清蛋白质组分析技术 (serological proteome analysis, SERPA)** 其特点是用双相电泳(2 DE)分离微生物的全部菌

体蛋白和代谢蛋白,转印到反应膜上,与微生物感染患者的血清作免疫印迹分析,由反应性抗体谱可发现有效的抗原成分而判定病原体。利用此技术发现了一些难以培养成功的病原体,如 Whipple's 病的病原体等。该技术后发展为双相液相色谱技术的 SERPA<sup>[17]</sup>。

### 4 分子流行病学技术

确定感染的流行菌(毒)株和医院感染的流行株,曾用过血清学、噬菌体、生物性状和耐药表型的聚类分析等技术,但以分子生物学技术最为可靠。常用的技术如下。

**4.1 PCR-限制性片段长度多态性分析(PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)** 扩增的 DNA 产物用内切酶消化,因酶所作用的位点不同,而切出长度不同的片段,经琼脂糖凝胶电泳后分出一定数量的条带。基因相同可见相同的条带。

**4.2 PCR-单链构象多态性分析 (single strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products, PCR-SSCP)** 扩增产物经变性形成单链,单链核苷酸在聚丙烯酰胺凝胶电泳时依赖其大小和空间构型。核苷酸的差异可由电泳图像的差异表现出来。

**4.3 PCR-随机扩增多态性 DNA 分析(PCR-random amplified polymorphic DNA, PCR-RAPD)** 在随机引物引导的扩增条件下,基因核苷酸的差异会出现扩增产物的差异。经电泳图象分析其相同或不同<sup>[2]</sup>。

**4.4 基因重复序列的 PCR 分析** 如前述。

**4.5 PCR-线性探针分析 (PCR-line probe assay, PCR-LiPA)** 在反应膜上固定不同标记的探针,使呈线形排列的条带,扩增后的产物与线形探针杂交后在膜上显色,由显色的条带可判定核苷酸序列的异同。

**4.6 多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)** 直接测定多个(一般为 7 个)菌株的管家基因座内的约 500 个核苷酸序列相比较而分型,即序列型(sequence type, ST)。密切相关菌株有相同的 ST,而不相关的菌株至少有 3 个以上不同的 ST。

**4.7 质粒 DNA 酶切指纹图谱** 该技术是较早期用于流行病学的分型技术。将菌体内质粒提取出后,用限制性内切酶消化,经琼脂糖凝胶电泳后比较酶切片段的大小进行分型。本法只适用于携有质粒的细菌<sup>[18]</sup>。

**4.8 脉冲场凝胶电泳 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)** 技术 PFGE 分型技术是使用对染色体有很少酶切位点的限制性核酸内切酶消化细菌 DNA,产生大的 DNA 片段(10-800 kb),这些大片段不能通过常规电泳方法进行有效分离,在电场方向周期改变(脉冲)的凝胶电泳条件下, DNA 片段根据大小有效分离<sup>[19]</sup>。

**4.9 几种方法的性能比较** 表 1 中的方法各有局限性,注意

应用两种方法相互参照可保证分型的正确性。

表 1 几种方法的性能比较

方法	重复性	分辨力	结果	应用	操作
PFGE	优秀	优秀	优秀	分型	尚可
Rep-PCR	好	好	好	分型	好
PCR-RFLP	好	好	差	分型	好
MLST	优秀	优秀	优秀	鉴定分型	尚可
PCR-RAPD	一般	一般	好	分型	好

### 5 基因测序技术

基因测序是鉴别微生物的决定性方法,但不能作为常规应用。目前,基因和核苷酸多态性(SNP)的测序技术几经改进,发展迅速,多种新型自动测序仪相继出现。许多微生物的全部序列已经确定。新一代的全基因组的测序仪可在数小时内完成,有望用于微生物诊断<sup>[2]</sup>。

**5.1 微生物的 16S rRNA 基因序列分析** 它以多拷贝形式存在于细菌染色体基因组中,编码基因由可变区和保守区组成。可变区具有属或种的特异性,可据此设计引物和探针。16S rRNA 是公认的原核生物分类鉴定的标准。

**5.2 一般的基因测序技术** 基本步骤为自培养物或标本直接提取 DNA, DNA 扩增, 扩增产物纯化, 纯化产物经自动测序仪完成测序。由国际的核酸数据库查询可得结果。

**5.3 焦磷酸测序** 焦磷酸测序仪应用四种酶,即 DNA 聚合酶、硫酸化酶、荧光素酶和双磷酸酶。在同一反应体系中进行酶联化学发光反应。每轮测序只加一种 dNTP, 如与模板互补, 聚合酶就将其掺入引物链, 同时放出等摩尔的焦磷酸, 再转化为光信号, 由仪器转化为一个峰值。每个峰值与反应中掺入的核苷酸数成正比。如此再进入下一轮测序。由峰图可准确读出所测 DNA 的序列<sup>[2]</sup>。

**5.4 SNP 测序** SNP 是指在基因组水平上由单个核苷酸变异(置换、颠换、缺失和插入)引起的序列多态性,是第三代的遗传标志,用于基因分型。生物传感器技术是 SNP 测序的重要手段<sup>[2]</sup>。

### 6 纳米生物技术

纳米技术的迅速发展也为微生物诊断提供了重要的手段。如用固相纳米粒子结合四色荧光进行超速的 DNA 测序。用纳米生物芯片和微阵列用于微生物鉴定。用纳米共聚焦分光镜分辨微生物感染细胞。用荧光标记的纳米量子点(QD)检出细胞内病毒或其他微生物。以及用量子点技术快速检测 HCV 核心抗原<sup>[23-25]</sup>。

### 7 生物传感器技术

国际上用生物传感器技术检测环境(空气、饮用水、食品等)中的微生物已取得巨大进步。常用的传感器有电化学、压电、光学传感器等。基本原理是在金属膜上识别与检测能起

相互作用的物质发生信号变化。应用较多的是表面等离子体谐振(surface plasmon resonance, SPR)生物传感器技术。

SPR 技术在金属膜或芯片上固定标记的特异性核酸探针,与被检的核酸结合后,入射光作用下发生共振信号,仪器检测到其反应动力学的参数。已有报告用 SPR 芯片检测常见病原微生物,包括:大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、淋病奈瑟菌、铜绿假单胞菌,豚原体及人乳头瘤病毒等,与培养的结果一致<sup>[26]</sup>。用此技术也可检测金黄色葡萄球菌的肠毒素 B<sup>[27]</sup>。

### 8 研究群体微生物学的宏基因组学

宏基因组学也称环境基因组学或群体基因组学,是利用现代基因组技术直接研究自然状态环境中的微生物有机体群落,而不需要分离培养成单一的微生物。如:口腔、皮肤、黏膜等部位菌种甚多,且大多数不能培养。对群体微生物学的研究只能用大规模测序技术进行平行的测序。如今,新型的大规模测序技术与仪器已能实现。如瑞士罗氏公司的 454 大规模测序仪, Illumina/Solexa 测序仪、Applied Biosystem 的 SOLiD 测序仪等。宏基因组学为研究微生物生态学、微生物与环境的关系、微生物间的关系及感染形成的原因具有重要的价值<sup>[28]</sup>。

此外,自血浆中扩增游离的 DNA 技术也发展很快,据报道可快速诊断败血症,且无需细菌培养。

### 9 参考文献

- 1 谢珊, 李金明. 一致-简并杂交寡核苷酸引物设计用于未知病原微生物检测的进展. 中华检验医学杂志, 2006, 29: 754-756.
- 2 王庆忠, 姜峰, 宣瑛. 病原菌分子分型方法研究进展. 检验医学, 2009, 24: 397-400.
- 3 蔡哲钧, 冯杰雄. 环介导等温扩增技术在传染性疾病预防中的应用. 国际流行病学传染病学杂志, 2006, 33: 343-345.
- 4 Benson R, Tondella ML, Bhatnagar J, et al. Development and evaluation of a novel multiplex PCR technology for molecular differential detection of bacterial respiratory disease pathogens. J Clin Microbiol, 2008, 46: 2074-2077.
- 5 Lam WY, Yeung Apple CM, Tang JW, et al. Rapid multiplex nested PCR for detection of respiratory viruses. J Clin Microbiol, 2007, 45: 3631-3640.
- 6 王金良. 致腹泻性大肠埃希菌感染的快速检验诊断. 传染病信息, 2007, 20: 204-207.
- 7 鲁辛辛, 袁梁. 新技术在微生物检验中的应用. 中华检验医学杂志, 2009, 32: 596-600.
- 8 Vollmer T, Stormer M, Kleesiek K, et al. Evaluation of novel broad-range real-time PCR assay for rapid detection of human pathogenic fungi in various clinical specimens. J Clin Microbiol, 2008, 46: 1919-1926.
- 9 Reischl U. Melting of the ribosomal RNA gene reveals bacterial

- species identity: a step toward a new rapid test in clinical microbiology. *Clin Chem*, 2006, 52: 1985-1987.
- 10 Lin B, Blaney KM, Malanoski AP, et al. Using a resequencing microarray as a multiple respiratory pathogen detection assay. *J Clin Microbiol*, 2007, 45: 443-452.
- 11 Campa D, Tavanti A, Gemignani F, et al. DNA microarray based on arrayed-primer extension technique for identification of pathogenic fungi responsible for invasive and superficial mycoses. *J Clin Microbiol*, 2008, 46: 909-915.
- 12 Mahony J, Chong S, Marente 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 Clin Microbiol*, 2007, 45: 2965-2970.
- 13 刘红艳, 毛日成, 李义良, 等. 应用液相芯片技术检测拉夫米定耐药相关性 HBV 变异. *中华检验医学杂志*, 2009, 32: 978-983.
- 14 喻爽, 张艾梵, 李亚里, 等. 基质辅助激光解析/电离飞行时间质谱法检测高危型人乳头瘤病毒基因型及临床应用. *中华检验医学杂志*, 2009, 32: 1006-1010.
- 15 Fox A. Mass spectrometry for species or strain identification after culture or without culture: past, present and future. *J Clin Microbiol*, 2006, 44: 2677-2680.
- 16 Xu L, Evans J, Ling T, et al. Rapid genotyping of CTX-M extended-Spectrum beta-lactamases by denaturing high-performance liquid chromatography. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51: 1446-1454.
- 17 陈晔, 林成招, 贺福初. SERPA 技术及其在微生物学研究中的应用. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2008, 28: 282-285.
- 18 俞云松. 分子生物学技术在细菌耐药性研究中的应用. *中华检验医学杂志*, 2008, 31: 610-613.
- 19 Guerra B, Helmuth R, Tsen HY, et al. Pulsed-field gel electrophoresis, plasmid profiles and phage types for the human isolates of *Salmonella enterica* serovar enteritidis obtained over 13 years in Taiwan. *J Appl Microbiol*, 2005, 99: 1472-1483.
- 20 Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem*, 2009, 55: 641-658.
- 21 Luna RA, fasciano LR, Jones SC, et al. DNA pyrosequencing-based bacterial pathogen identification in a pediatric hospital setting. *J Clin Microbiol*, 2007, 45: 2985-2992.
- 22 徐清华, 陈鸣. 应用生物传感器检测单核苷酸多态性. *中华检验医学杂志*, 2009, 32: 111-113.
- 23 Jain KK. Applications of nanobiotechnology in clinical diagnostics. *Clin Chem*, 2007, 53: 2002-2009.
- 24 Soni GV, Meller A. Progress toward ultrafast DNA sequencing using solid-state nanopores. *Clin Chem*, 2007, 53: 1996-2001.
- 25 李蒙, 李玲, 余鹏春, 等. 量子点技术快速检测 HCV 核心抗原的研究. *国际检验医学杂志*, 2009, 30: 430-432.
- 26 田玉峰, 顾大勇, 禹华伟, 等. 表面等离子体共振型基因芯片系统对临床常见病原微生物的检测. *中华检验医学杂志*, 2008, 31: 1051-1054.
- 27 向四海, 崔大付, 蔡浩原, 等. 利用表面等离子体谐振技术检测金黄色葡萄球菌肠毒素 B. *中国实验诊断学*, 2003, 7: 190-194.
- 28 Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, et al. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clin Chem*, 2009, 55: 856-866.

(收稿日期: 2009-10-22)

(本文编辑: 杨军)

## 消 息

### 致谢

《实用检验医师杂志》编辑部全体工作人员衷心感谢以下编委/专家对本刊创刊号出版的大力支持! (地区、姓名以拼音为序)

北京(丛玉隆 刘贵建 张曼) 吉林(谢风 续薇) 内蒙古(冯笑梅) 山东(邹雄) 山西(任建平) 天津(高硕 高卫真 胡志东 贾克刚 焦连亭 刘德敏 刘蕊 李顺天 刘树业 李筱梅 刘运德 彭林 魏殿军 王金良 王瑞琳 吴尚为 张厚亮 张鹏) 云南(陈端)