

病原微生物的检测新技术—PCR 质谱仪

曲芬 毛远丽

作者单位:100039 北京市,解放军 302 医院临床检验医学中心

通讯作者:毛远丽, E-mail:maoyuanlee@yahoo.com

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2012.02.012

近年来,随着耐药微生物的不断增多、新发和再发的传染病疫情的频发,以及政府部门的高度重视,使得微生物的分子诊断技术得到迅猛发展,特别是自动化技术的发展,明显提高了检测速度和诊断能力,在微生物的快速检测中发挥越来越重要的作用。PCR 质谱仪 Ibis T5000 是多重聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)和电喷雾质谱电离(electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)分析技术整合的一种新型技术,能够通过快速、高通量、精确的数字分析,检测和鉴定临床和环境分离菌株或标本中病原微生物,并能定量鉴定对人和动物致病的病原微生物(包括所有细菌、主要的真菌和大部分病毒),也能够检测毒力因子和抗生素的耐药性,可以应用于临床微生物的快速诊断、突发事件流行病学调查、提供传染病生物体传播的相关信息和解决的干预措施^[1,2]。

1 PCR 质谱仪的特点

Ibis T5000 的技术特点在于检测并鉴定病原微生物快速、准确、灵敏度高、特异性高,通常不需要测序,更适用于预先无法确定病原方向性的突发疫情和不明原因感染的诊断。首先是标本中的核酸纯化,经过精心选择的核苷酸引物进行多重 PCR 扩增,之后对扩增产物进行全自动的 ESI-MS 分析检测,质谱仪可对扩增产物进行准确至碱基组成的精确定量,所获数据经与校准过的已知微生物标准数据库进行比对,便可确定所检测病原微生物的种类。

2 PCR 质谱仪的应用

2.1 常见病原菌的检测 Ibis T5000 已有临床研究显示其应用的优越性。在鉴别可培养的细菌分离株中,Ibis T5000 与基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(matrix assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)比较,并以表型和生化反应作为参考标准,两者鉴定结果在菌属和菌种水平正确率上 PCR-ESI/MS 均高于 MALDI-TOF-MS,对于血培养阳性细菌的鉴定能力和速度上两种技术无差别,均显示了快速准确的优势^[3]。而对于培养阴性或难培养的细菌,PCR-ESI/MS 能够诊断并定量检测,如取自下肢深部创口的标本病原分析,可明确慢性伤口的菌群

状况包括厌氧菌,并提示伤口慢性愈合与细菌的量和种类明显增多有关,特别是放线菌与伤口不愈关系最密切,假单胞菌也有明显增多,对慢生长的结核分枝杆菌能够快速鉴定到种并鉴别出耐药基因^[4,5]。

2.2 细菌生物膜的检测 另一临床感染的诊治难点是细菌生物膜,由于细菌产生的胞外多聚物与上皮细胞表面受体结合而黏附,使其以非常精细的方式相互黏连,并间断释放浮游菌而使感染反复发作,导致临床诊治困难。如假体相关细菌生物膜,Ibis T5000 可在踝关节置换术前细菌培养阴性时也能够检测到多种细菌生物膜,可以检测软组织和硬组织的金属成分中有关的金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、耐甲氧西林的 mecA 基因,成为辅助诊断假体关节生物膜细菌感染的可靠的新技术^[6]。致病细菌生物膜也是慢性化脓性中耳炎的主要原因,并可能导致病原体持久存在、反复发作并对抗生素产生耐药。腺样体可作为慢性化脓性中耳炎病原体储存地,由于病原体被碳水化合物的基质包围并存在上皮细胞的表面,通常方法很难检测到,Ibis T5000 利用 16 对引物检测到腺样体内定植多种病原生物膜,检测结果以流感嗜血杆菌增多明显^[7]。体现了 Ibis T5000 对临床标本检测的强大能力,特点为不是针对一种病原,而是包括需氧菌和厌氧菌等的较宽的检测范围,速度快。

2.3 病毒的检测 不同于细菌感染,病毒感染由于培养的复杂性和种类繁多而使病原诊断困难。如经蚊子或蜱等虫媒传播的黄病毒,由于其种间高度遗传多样性和免疫亲缘性,对诊断提出了较高的挑战。Ibis T5000 用 13 对不同的黄病毒引物,从人体血液、血清和尿液可以检测到西尼罗病毒,感染的老鼠血液和脑组织中可检测到卡尔西病毒,硬蜱虱中发现了波瓦桑病毒亚型-鹿蜱病毒。所有的病毒都被正确地鉴定到种,同时验证了蚊传病毒的检测极限,西尼罗病毒的 RNA 敏感度达 0.2 斑块形成单位^[8]。高通量的 ESI-MS 技术实验能够检测多种蜱和蚊传播黄病毒感染,为临床诊断和流行病学调查提供了更好的新工具。同样,美国加利福尼亚州的 Ibis 生物科技公司设计对痘病毒的 DNA 检测鉴定了痘病毒属,经过 PCR 扩增引物经优化筛选 4 对,每对引物特异性地针对一

种病毒,一个实验技术可以同时检测并鉴定出痘病毒属的不同种,包括天花病毒、猴痘、牛痘、骆驼痘、鼠痘和其他啮齿类动物源性人畜共患痘病毒,敏感性达到 6.3 个斑块形成单位,重复性 100%,特异性强,与疱疹病毒、腺病毒无交叉反应,研究表明,该试剂盒可以准确检测和识别痘病毒的多个种^[9,10]。

2.4 在流行病学调查中的应用 医院感染的流行病学调查对于迅速查明导致爆发的主要因素、提出针对性措施以控制流行蔓延或爆发再度发生有重要意义。Ibis T5000 对院内鲍曼不动杆菌医院感染的流行病学调查与 PFGE 基因分型具有相同的效果,但过程简单,并与 REP-PCR 有相同的快速检测速度^[11]。环境中多种病原的监测也是卫生检验的重要环节,格鲁吉亚的研究用 Ibis T5000 快速检测环境中的所有已知的致病性弧菌,首先利用标准弧菌株建立了方法和质谱库,再针对弧菌科设计了广泛覆盖的 8 对引物,检测不同环境中的样本,每种弧菌都有其特殊的质谱图(见图 1),并且检测到霍乱毒素 A 基因(ctxA)阳性,证明其适用于对天然环境中病原微生物的监测^[12]。

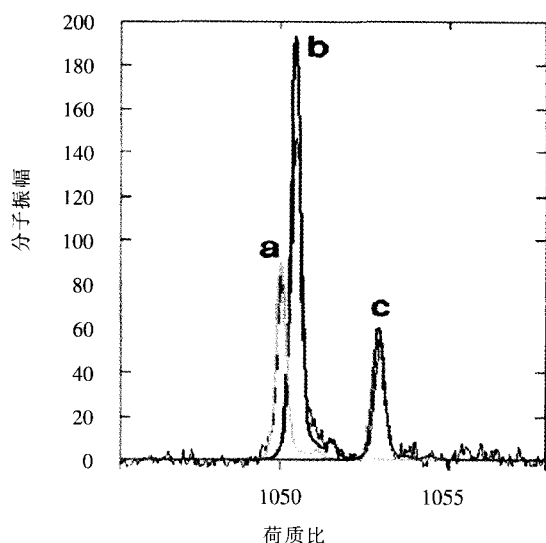


图 1 三种弧菌的质谱图

注:a 为副溶血弧菌;b 为创伤弧菌;c 为霍乱弧菌

对于新发传染病病原的诊断,可以用 Ibis T5000 首先通过通用引物确定为病毒、细菌还是真菌,进一步锁定到属,放大 PCR 产物,产生信息通过质谱 PCR 扩增,通过测序诊断出新的病原^[13,14]。目前,Ibis T5000 已开发了检测真菌、耐药基因、致病毒素、生物战剂相关病原、食物中毒病原的检测试剂盒^[15-17],进一步扩大了其实用性。

总之,Ibis T5000(PCR 质谱技术)相较于其他分子生物学技术,具有很多优点,包括可直接检测标本,也可以检测纯培养物,精确测量提供高效的鉴定能力;可同时检测多种病原,为微生物的快速检测提供了新的选择,也为处理突发疫情和新传染病诊断提供了保障^[18]。但是仪器设备成本及耗材费用

较高,成为广泛推广的障碍。因此,PCR 质谱仪的临床应用推广普及之路,还很漫长。

3 参考文献

- 1 Ecker DJ, Sampath R, Massire C, et al. Ibis T5000: a universal biosensor approach for microbiology. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6: 553-558.
- 2 Ecker DJ, Massire C, Blyn LB, et al. Molecular genotyping of microbes by multilocus PCR and mass spectrometry: a new tool for hospital infection control and public health surveillance. *Methods Mol Biol*, 2009, 551: 71-87.
- 3 Kaleta EJ, Clark AE, Cherkaoui A, et al. Comparative analysis of PCR-electrospray ionization/mass spectrometry (MS) and MALDI-TOF/MS for the identification of bacteria and yeast from positive blood culture bottles. *Clin Chem*, 2011, 57: 1057-1067.
- 4 Tuttle MS, Mostow E, Mukherjee P, et al. Characterization of bacterial communities in venous insufficiency wounds using conventional culture and molecular diagnostic methods. *J Clin Microbiol*, 2011, 49: 3812-3819.
- 5 Massire C, Ivy CA, Lovari R, et al. Simultaneous identification of mycobacterial isolates to the species level and determination of tuberculosis drug resistance by PCR followed by electrospray ionization mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, 2011, 49: 908-917.
- 6 Stoodley P, Conti SF, DeMeo PJ, et al. Characterization of a mixed MRSA/MRSE biofilm in an explanted total ankle arthroplasty. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2011, 62: 66-74.
- 7 Nistico L, Kreft R, Gieseke A, et al. Adenoid reservoir for pathogenic biofilm bacteria. *J Clin Microbiol*, 2011, 49: 1411-1420.
- 8 Grant-Klein RJ, Baldwin CD, Turell MJ, et al. Rapid identification of vector-borne flaviviruses by mass spectrometry. *Mol Cell Probes*, 2010, 24: 219-228.
- 9 Eshoo MW, Whitehouse CA, Nalca A, et al. Rapid and high-throughput pan-Orthopoxvirus detection and identification using PCR and mass spectrometry. *PLoS One*, 2009, 4: e6342.
- 10 Grant RJ, Baldwin CD, Nalca A, et al. Application of the Ibis-T5000 pan-Orthopoxvirus assay to quantitatively detect monkeypox viral loads in clinical specimens from macaques experimentally infected with aerosolized monkeypox virus. *Am J Trop Med Hyg*, 2010, 82: 318-323.
- 11 Schuetz AN, Huard RC, Eshoo MW, et al. Identification of a novel *Acinetobacter baumannii* clone in a US hospital outbreak by multilocus polymerase chain reaction/electrospray-ionization mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2012, 72: 14-19.
- 12 Whitehouse CA, Baldwin C, Sampath R, et al. Identification of pathogenic *Vibrio* species by multilocus PCR-electrospray ionization

- mass spectrometry and its application to aquatic environments of the former soviet republic of Georgia. Appl Environ Microbiol, 2010, 76: 1996-2001.
- 13 Metzgar D, Baynes D, Myers CA, et al. Initial identification and characterization of an emerging zoonotic influenza virus prior to pandemic spread. J Clin Microbiol, 2010, 48:4228-4234.
- 14 Leslie T, Whitehouse CA, Yingst S, et al. Outbreak of gastroenteritis caused by Yersinia pestis in Afghanistan. Epidemiol Infect, 2011, 139:728-735.
- 15 Wang F, Massire C, Li H, et al. Molecular characterization of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates circulating in China by multilocus PCR and electrospray ionization mass spectrometry. J Clin Microbiol, 2011, 49:2719-2721.
- 16 Gu Z, Hall TA, Frinder M, et al. Evaluation of repetitive sequence PCR and PCR-mass spectrometry for the identification of clinically relevant Candida species. Med Mycol, 2012, 50:259-265.
- 17 Saito H, Inoue M, Tomiki M, et al. Identification and sequence determination of recombinant Clostridium perfringens alpha-toxin by use of electrospray ionization mass spectrometry. Rinsho Biseibutshu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi, 2009, 20:9-20.
- 18 Ecker DJ, Sampath R, Li H, et al. New technology for rapid molecular diagnosis of bloodstream infections. Expert Rev Mol Diagn, 2010, 10: 399-415.

(本文编辑:2011-11-14)

(收稿日期:杨军)

消 息

临床检验杂志(电子版)创刊及四部论著出版上市新闻发布会报道

由人民军医出版社、《临床检验杂志(电子版)》和解放军总医院临床检验科编辑部共同承办的《临床检验杂志(电子版)》创刊及论著《现代医学实验室管理与认可实践》、《实用血细胞分析技术与临床》、《实用临床实验室管理学》、《临床实验室仪器管理》出版上市新闻发布会于 2012 年 4 月 27 日在北京杏林山庄举行。

本次发布会由丛玉隆主任亲自主持,首先是领导们发言,各位领导对《临床检验杂志(电子版)》的创办以及四部论著的出版所带来的学术影响力和社会效益予以肯定,并表达了支持的态度。其中,李勇副社长热情洋溢的发言感染了大家,为会场带来了轻松愉悦的气氛,表达了对丛主任的钦佩崇敬之情,并高度赞誉了《临床检验杂志(电子版)》的高效务实的工作风格,对期刊未来发展寄予无限厚望。随后,丛主任对《临床检验杂志(电子版)》的创刊及四部论著的创作过程、背景等作了详细介绍,使大家了解了期刊创办的意义、四部论著出版的实用价值。会议最后是记者提问环节,各大媒体纷纷对杂志的创刊以及四部论著的出版向丛主任提出相关问题,丛主任就记者提出的问题一一做了解答与阐述。会场气氛异常热烈。

《临床检验杂志(电子版)》是以光盘-网络为载体,附纸质导读本的多媒体出版物,是集“纸质版”、“光盘版”、“网络版”多形式、多方位、多层次学术刊物。“纸质版”、“光盘版”为季刊,网络版根据作者互动程度随时增加、滚动刊登内容。杂志将发挥网络版空间大、更新快、易交流的特点,并会随着杂志的不断发展,设计更多模块。杂志读者定位于中级检验和临床医护人员兼顾高、低级技术人员,注重临床与检验的结

合,重视基础教育和规范化培训,兼顾和临床医师、仪器试剂生产厂商的交流沟通,同时做好医疗检验基础实用知识的宣传和普及,以期进一步促进检验与临床相互沟通与合作,加强检验医学队伍的学习与建设。

《现代医学实验室管理与认可实践》涵盖了质量管理、安全管理、信息管理和人力资源管理等现代管理理念,理论联系实际,介绍了解放军总医院临床检验科在学科建设中的经验与体会,并将国际管理理念与我国国情和医学实验室管理现状相结合,总结推广国内外医学实验室建设、管理的宝贵经验,以达到推动医学实验室建设发展的需要。《实用血细胞分析技术与临床》一书全面介绍了自动化血细胞分析质量管理体系的建立,过程控制措施,流程管理方法等;总结了编者及临床医师应用血细胞分析仪对疾病诊断、治疗、预后分析的经验、科研成果和使用体会。且本书编写人员均有 20 年以上的血液学检验专业的医疗、教学、科研经验和长年在一線使用血细胞分析仪的经历,这些经验及科研成果的积累必将成为读者了解血液分析仪的使用及发展动态等方面的良好借鉴。《实用临床实验室管理学》是众多编委集多年实验室管理经验与心得精心撰写的论著。对于医学实验室的实际工作与科室领导框架的高效构建具有重要的指导作用。设备、人才、管理是医学实验室学科建设的三大基本要素,也是学科健康发展的基石。因此,仪器设备管理作为三大支柱之一,在医学实验室建设中不可忽视。论著《临床实验室仪器管理》正满足了这一需求,全书对医学实验室仪器管理作了详尽而系统的阐述。对于实验室领导及具体操作人员提供了规范化章程的指导。