专家述评

试论临床微生物学检验技术的创新发展

王金良

作者单位:300042 天津市,天津市公安医院

【摘要】 回顾临床微生物学检验技术的发展历程,明确不断创新是推动其进步的巨大动力。结合笔者从事临床微生物学检验工作 60 余年的经验及教训, 说明我国该学科技术滞后的关键是创新力不足,并就当前应如何推动其检验技术的创新发展提出几点想法。

【关键词】 临床微生物学;检验技术;创新发展

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2015.03.001

临床微生物学检验技术的发展经历了百余年的历程,该领域吸取了自然科学研究的成果,经过无数前人的创新及努力,在防治传统和新兴传染病方面取得了极大的成就[1]。现今,笔者回顾其创新发展历程,正视我国临床微生物学检验技术存在的不足,因此,加强创新意识、增强创新能力,对促进我国临床微生物学检验技术的创新发展,奋力赶超国际先进水平有着重大的意义。

1 临床微生物学检验技术变革的动力——创新发展

回顾临床微生物学检验技术的发展历程,大体上经历了以下 4 个发展阶段。

1.1 传统微生物学检验技术发展阶段 依靠显微镜和染色技术发展起来的形态学检验和传统的细菌培养技术发展起来的细菌鉴定技术日臻完善。该技术自患者的各类标本中分离培养病原菌,依据细菌的形态和染色特征、菌落形态、生化反应、菌体抗原结构形成一系列的分离培养和鉴定手段,构成了经典的细菌检验诊断学。此阶段的病毒检验技术还未普及,支原体、衣原体、螺旋体、立克次体的检验技术尚在起步阶段。

1.2 诊断微生物学检验技术发展阶段 临床微生物学检验技术在此阶段出现了成套鉴定装置(数码鉴定)和半自动微生物鉴定技术,使微生物鉴定系统化。随后发展起来的多种自动化的微生物鉴定和药敏分析仪,其基本原理仍是依据微生物的生长和生化反应,只是检测微生物的酶反应底物不断改进,提高了鉴定的可靠性,且使鉴定所需时间有所减少。此阶段大量吸收了免疫学技术的进步, 包括传统免疫技术、标记免疫分析技术(放射免疫、酶免疫、荧光免疫、化学发光免疫等),形成了诊断微生物学检验技术。

1.3 分子微生物学检验技术发展阶段 上述两个阶段所用的技术是依据微生物的表型特征,而分子结构是其内在本质特征。分子微生物学检验技术所依据的正是微生物的分子结构和特征。创新的分子生物学技术的兴起,使微生物的分离、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分子水平。

1.3.1 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术应用于微生物的快速鉴定与分型的代表性技术是基于传统 PCR 技术。在常规 PCR 技术的基础上又发展了恒温核酸扩增技术、多重 PCR 技术、实时荧光定量 PCR 技术,逆转录 PCR 扩增产物的熔解曲线分析等,使临床微生物学检验技术进入快速发展的新阶段。

1.3.2 质谱技术 与质谱分析技术相结合的分子生物学技术是近年来临床微生物学检验技术的一大进展。采用质谱技术分析微生物成分已应用于微生物的鉴定及分型,还可用于耐药基因和致病机理的检测等。基本的检测方式是通过对微生物培养物采用气相色谱-质谱联用技术检测脂肪酸、多糖组分等进行鉴定。最引人注目的进展是采用基质辅助激光解吸飞行时间质谱技术对微生物的组成分子进行鉴定。所用的仪器和分析鉴定软件已在国内外应用和推广,有望成为最重要和可靠的微生物鉴定手段。其他常用的质谱技术还有采用变性高效液相色谱技术进行细菌分型和细菌耐药酶的鉴定与分型,和采用血清蛋白质组分析技术来鉴定一些难以培养成功的新型病原体(如 Whipple 病的病原体)。另外,正在发展中的还有二维液相色谱血清蛋白质组分析技术。

分子流行病学技术是在此基础上发展起来的又一项新技术,该技术用来确定感染的流行菌(毒)株和医院感染的流行菌(毒)株。常用的技术有 PCR-限制性片段长度多态性分析、PCR-单链构象多态性分析、PCR-随机扩增多态性分析、

基因重复序列的 PCR 分析、PCR–线性探针分析、多位点序列分型和质粒 DNA 酶切指纹图谱分析。

1.4 基因微生物学检验技术发展阶段 由于微生物的一切性状都是由其基因决定的，因此，基因诊断技术就更加体现了微生物的本质特征。基因诊断技术已彻底改变并将继续改变着临床微生物学和微生物学检验技术的面貌[2]。微生物基因测序技术是鉴别微生物的决定性方法，但因仪器昂贵、技术相对复杂而不能常规应用。目前，基因和核苷酸多态性的测序技术几经改进，发展迅速，多种新型自动基因测序仪相继出现。许多微生物的全部基因序列已经确定。新一代的全基因组测序仪可在数小时内完成基因测序，现用于微生物学检验的基因测序技术有微生物的 16S rRNA 基因序列分析（16S rRNA 是公认的原核生物分类鉴定的标准）、18S rRNA 基因序列分析（适用于真菌的鉴定分型）、焦磷酸测序和核苷酸多态性测序等。另外，基因芯片（DNA 微阵列）和液相芯片技术、研究微生物群体的宏基因组学以及扩增血浆游离 DNA 技术、纳米生物技术、生物传感器技术等应运而生[3]。

上述临床微生物学检验技术的发展历程说明，不断地创新是促进其发展的强大动力。通过不断创新才有了今天的临床微生物学检验技术。

2 我国临床微生物学检验技术滞后的关键在于创新力不足

笔者从事临床微生物学检验技术工作已 60 余年，亲历了其发展的各阶段。最初接触到的就是国外创建的技术和名词，如革兰氏染色、大肠埃希氏菌、伤寒沙门氏菌、瓦氏反应、康氏反应等。检验操作要严守国外制定的操作规程，认为不越雷池一步是最好的职业操守。却也因此逐步形成了思想僵化，不愿变革的习惯，但内心里还是有强烈的改变现状的愿望，希望能有我国自己的技术并能得到国外的认可，在世界上占有一席之地。笔者也曾努力钻研技术，注意总结自己的心得体会，60 多年的工作实践，尽管不吝付出，积极向上，也写过不少文章，参与编写过几册著作，但自问有什么创新技术问世吗？茫然！

笔者的个人经历也许就是国内大多数从业者的缩影。我国临床微生物学检验技术依然滞后，且不论在贫困和欠发达地区尚不能运用新技术，即使是在大的综合医疗机构或疾病控制机构也以运用国外的仪器和方法为主，就检验医学整体来讲也是如此。在我国医学专业中，检验医学的科研课题立项和专利申请量都是较低的。创新意识不足、创新教育缺位、创新能力低下，成为我国临床微生物学检验技术甚至检验医学技术滞后的关键问题。

3 抓住机遇，大力促进临床微生物学检验技术的创新发展

当前党中央倡导“万众创业、大众创新”，这正是技术创新的大好时期。我们要抓住机遇趁势而上，大力创新技术。怎样实现技术创新呢？管见所及，提出 5 个方面的建议供同行参考。

3.1 培养、树立和增强创新意识 检验医学工作者作为从事技术工作的人员，工作的要务在于技术创新。创新是在充分运用和掌握前人技术成果的基础上，不断有所发现、有所创新和创造，但这不是无科学依据的异想天开。创新要不断钻研本领域的先进理论，依据科学规律来改革。关键在于要有强烈的、正确的创新意识，善于发现、总结现有技术的不足并进行改善。创新绝非一蹴而就，要培养和积累创新能力，要从大处着眼、小处着手，才能积小革新为大创新。

3.2 临床微生物检验科（室）是技术创新的主阵地 科学研究一向以实验室为主要基地，实验室技术的创新历来带动着科学的进步，不断推动着科学的发展。事实上，我国在临床微生物学检验技术方面的成就也是依靠实验室完成的。如在建国初期，中科院微生物研究所和北京同仁医院的汤飞凡教授用鸡胚培养技术首先发现了沙眼病毒（后被证实为沙眼衣原体），并在国际上获奖。而固守已有观念，缺乏创新意识，可能贻误重大发现的良机。如上世纪 70 至 80 年代，我国胃病专家在电子显微镜下自患者肠黏膜中发现了细菌，同时北京的专家发现口服呋喃唑酮（痢特灵）治疗消化道溃疡有确定的疗效。可惜的是，由于确信胃酸过多是胃溃疡的病因，且认为在高胃酸环境下细菌无法存活，而忽视了实验室的发现和临床证据，痛失了发现幽门螺杆菌的机会[4]。后来，澳大利亚的 Warren 和 Marshall 证实了幽门螺杆菌的存在，且自服幽门螺杆菌菌液证实其致病性。此项成就在 2005 年获得诺贝尔生理学和医学奖。如此深刻的教训提醒我们必须重视实验室的发现，依据线索深究根源，不能固守已有观念。检验医学工作者处在临床检验一线，每天接触众多的临床标本和数据，有很多机会可以有新发现。然而如果我们缺乏发现问题、解决问题的自觉性，缺乏创新意识，就会错失许多创新机会。

令人高兴的是，近些年国内不乏创新成果出现。如重症急性呼吸综合征在我国局部地区的流行极大推动了对新病原体和再现病原体检验技术的发展，对流感病毒 H7N9、H5N1 等的检测技术，自临床标本、环境、水中检测军团菌的系列技术，对细菌鞭毛染色技术等的创新[5,6]，都说明微生物实验室可大有作为。

3.3 从实际出发，从发展适宜技术入手 创新要从实际出发，从切实可行的条件出发，不能好高骛远，不能浮躁取巧。必须承认，临床实验室的条件确实不如科研机构，技术创新有一定难度，但是任何创新都会遇到困难，任何改进都要付出艰辛努力。条件固然是重要的，但在有心人面前，条件又是可以创造的。目前国内大多数微生物实验室还不具备质谱、分子和基因检测的技术手段。有，当然好；没有，也不等于不能做好检验工作和技术创新。笔者赞同发展和提倡适宜技术，即适合国情和适合自己条件的技术，如微生物检验传统

技术中的细菌培养技术。细菌形态学和菌落形态学技术仍是检验的基本功,大有发展余地。陈东科、孙长贵和周庭银教授主编的微生物图谱具有中国特色,为推广此类技术做出重要贡献[7,8]。试想,如果依据细菌和菌落的典型形态和色素生成就能鉴定出铜绿假单胞菌或金黄色葡萄球菌,何需再用复杂而昂贵的分子和基因诊断技术呢?适宜技术绝不排斥分子、基因诊断技术,关键在于如何用得恰到好处。

现在国外也在重视建立简捷微生物学实验室[9],其目的是使诊断流程便捷、增效、节约,即精简人员和检验流程,充分利用信息技术,用简便、实用的技术解决微生物诊断中的问题。其作用与核心实验室相辅相成。

3.4 发挥团队精神,联合一切可用的力量 在先进技术飞速发展的今天,创新已不能靠单打独斗完成,科研创新团队是创新中攻坚克难的最佳组织形式。我们如有创新的想法和意愿而实现条件又不足,就应该与相关机构、部门或个人协作,如科研机构、大学、业内专家、厂家企业等一切可用的力量,共同合作并分享成果。丛玉隆教授主张"产、学、研、用"联合发展大检验医学,这也完全适用于创新发展检验技术。

3.5 创新独具中国特色的检验技术 这是最具艰巨性的任务,最有挑战性的梦想。记得数年前,在一次关于细菌耐药性检验的研讨会中,笔者和陈民钧教授感慨何时我们能有自己的药物敏感试验折点判定标准。目前我国采用临床实验室标准化协会的判定标准并非完全适合,因为我国的流行感染菌株、临床应用抗菌药物的品种和用量均与美国不完全相同,加之人种差异,迫切需要制定适合我国特点的标准。如果我们有组织地群策群力的完成这个任务,将是意义重大的创新。在此基础上,笔者关于实现个体化药物敏感试验报告的想法也就有了实现的基本条件[10]。

我国的微生物药物敏感试验不能忽略中药,对于中药单药的药物敏感试验,前人做了许多尝试。不久前,笔者看到中药煎剂的颗粒剂的抑菌试验[11],这使中药药物敏感试验的研究又前进了一步,而其技术的完善和判定标准的制定仍需进一步探索。当然,需要我们创新的具有中国特色的项目绝非仅此两例。

上述想法也是笔者的梦想。笔者如今已年逾八十,回顾一生从事微生物学检验工作的历程,憾事颇多。殷切希望寄于笔端,望能有益于读者。

4 参考文献

1 王金良.新传染病的快速诊断要求发展微生物检验新技术.实用检验医师杂志.2009,1:2-5.

2 Long SW, Williams D, Valson C, et al. A genomic day in the life of a clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol,2013,51:1272-1277.

3 Rifai N, Diamandis EP, Lo YM, et al. Advancing laboratory medicine through innovation: a tale of six inventors. Clin Chem,2012,58:502-510.

4 刘端祺.一个细菌,多重启迪.中国肿瘤临床,2013,40:1-2.

5 朱庆义,宋亚军,邵祝军,等主编.军团菌和军团菌病.第 1 版.北京:科学出版社,2014.

6 丛玉隆,总主编.实用检验医学.第 2 版(下册),北京:人民卫生出版社,2014,921.

7 陈东科,孙长贵,主编.实用临床微生物学检验与图谱.第 1 版.北京:人民卫生出版社,2010.

8 周庭银,主编.临床微生物诊断与图解.第 3 版.上海:上海科学技术出版社,2012.

9 Samuel L, Novak-Weekley S. The role of the clinical laboratory in the future of health care: lean microbiology. J Clin Microbiol,2014,52:1812-1817.

10 王金良.药敏试验的更高目标—个体化药敏试验报告.中华医学检验杂志,2012,35:764-765.

11 李迺文,谭俊青,王康春,等.5 种中药颗粒剂与水煎剂对 5 种耐药菌株的体外抑菌作用比较.检验医学,2015,30:567-570.

(收稿日期:2015-08-07)

(本文编辑:陈淑莲)

消 息

欢迎订阅《实用检验医师杂志》

《实用检验医师杂志》2009 年 12 月创刊,刊号:CN 11-5864/R,ISSN 1674-7151,季刊,国内外公开发行,邮发代号:6-245,10.00 元/期,全年定价 40 元。欢迎单位和个人在当地邮局或《实用检验医师杂志》编辑部订阅,也可通过中国医师协会检验医师分会网站(www.cmdal.org;www.cmdal.com)信箱及本刊编辑平台(www.cjocp.com;www.cjocp.org)订阅。