

# 分子诊断技术在肺部感染病原诊断中的进展

仲成, 陈琳

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.09.003

【中图分类号】 R563.1 【文献标志码】 C 【文章编号】 1671-0800(2024)09-1128-04

肺部感染是指终末气道、肺泡腔及肺间质的炎症,常合并胸膜腔感染<sup>[1]</sup>,其可以由病原微生物、物理化学因素、免疫功能损害、变态反应及使用药物所致。临床上,按其致病微生物可分为细菌、病毒、真菌、非典型病原体及其他病原微生物。近年来,由于广谱抗生素的使用,耐药菌的日益增多,社会老龄化愈发突出及免疫抑制、免疫缺陷人群的涌现,使肺部感染的诊断及治疗难度越发增加<sup>[2]</sup>。目前,就全世界范围内,肺部感染的发病率及死亡率均居第2位<sup>[3]</sup>,每年造成约425万人死亡<sup>[4]</sup>。

精准掌握肺部感染的病原体可有效减缓病情发展,传统的病原微生物培养和涂片往往是诊断的“金标准”,但苦于标本采集困难、标本质量不高、培养基特殊、培养环境要求高以及抗生素暴露等诸多原因,使通过传统方法得到明确病原学的机会相当有限<sup>[5]</sup>。随着医学检验技术的蓬勃发展,越来越多分子诊断技术得到广泛应用,不仅可以区分肺部病灶的性质,还可以明确病原学类型,为临床治疗争取宝贵时间。

## 1 核酸分子扩增技术 (nucleic acid amplification technologies, NAATs)

NAATs 是使用聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 将病原体的某一特异片段进行快速扩增,进而定性或定量检测的一种手段,具有检

测速度快、诊断精确度高的优点<sup>[6]</sup>。由于该技术不依赖于传统严格的病原体培养环境,也不基于病原体的活性水平,早期的经验性抗感染治疗对其最终结果亦无明显影响,这就很好地规避了目标病原体被掩盖的风险<sup>[7]</sup>。

以往常规的 NAATs 对于实验设备、实验环境要求比较苛刻,每次只可以对一种病原体进行一对一检测,对于检测结果往往又无法准确区分致病菌或是定植菌<sup>[8]</sup>。针对这些缺陷与不足,包括靶序列富集多重核酸扩增技术 (Tem-PCR)、定量核酸扩增技术、逆转录核酸扩增技术 PCR (RT-PCR) 及等温核酸扩增技术 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 等 NAATs 新技术逐渐被提出,这其中应用较为广泛的是 Tem-PCR 和 RT-PCR<sup>[9]</sup>。

目前临床上常用的肺部感染病原体 NAATs 检测主要涵盖了肺炎链球菌、流感病毒及肺炎支原体、衣原体及军团菌等非典型病原体,其检测灵敏性和特异性可达到90%以上<sup>[10]</sup>。不仅在病原学的定性方面发挥着显著优势,还可以提示样本中目标病原体的量级情况<sup>[11]</sup>。

Tem-PCR 可以同时检测包括细菌、真菌、病毒等在内的多种病原微生物。但由于不同病原微生物的引物不尽相同,其同时扩增的效率也不一致,所以如何将多种病原微生物的检出效能发挥到最大是其应用于临床的一大难点,也需要更多的科学研究对引物及催化反应进行改进和优化<sup>[12]</sup>。Trm-PCR 技术不仅可以同时检测多种病原微生物,更可以同时对其耐药基因进行检测,在欧美等发达国家使用较为普遍,常见的平台如 Curetis Unvvero P50、eSensor、FilmArray 及 Xpert 等,其操作相对简便,检测过程时间短 (Xpert 平台检测呼吸道病毒在30 min 内即可完成,检测结核菌只需2 h 就能出结果<sup>[13]</sup>),缺陷是成本

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目 (2024KY1357); 宁波市呼吸系统疾病临床医学研究中心 (2022L004)

作者单位: 310005 杭州,浙江省中西医结合医院(仲成); 宁波市第二医院(陈琳)

通信作者: 陈琳,主任医师,硕士生导师。中国老年医学会感染管理质量控制分会常务委员、浙江省医学会微生物与免疫学分会副主任委员、宁波市医学会微生物与免疫学分会主任委员、宁波市中西医结合学会感染病专业委员会主任委员。Email: chenlin2111@163.com

较高,且不能准确区分这些病原微生物是死亡亦或是存活状态,同时也不能准确判断其为致病或是定植状态,且由于同时需检测多种病原体,存在碱基配对错误的可能,使其特异性存在一定程度的偏差<sup>[14]</sup>。此外, Tem-PCR 技术由于设定检测的病原微生物在出厂时已固定完毕,临床上往往无法根据需要选择特定的病原检测,相信日后开发可自由组合的 Tem-PCR 技术是发展的一个重要方向<sup>[15]</sup>。

LAMP 的核酸扩增技术主要是使具有链置换活性的嗜热脂肪芽孢杆菌 DNA 聚合酶(Bst)与合适的引物进行 LAMP 反应,而这些引物可以与 PCR 方法的 6 个不同区域进行结合,并在等温条件下完成,其主要优势为检测效率高、操作简单及成本低廉,适合于基层医疗机构推广<sup>[16]</sup>。

## 2 数字 PCR 技术

PCR 技术,经历了简单 PCR、实时荧光 PCR 及 dPCR 三个阶段,检测能力从定性到定量再到绝对定量的飞跃。1999 年,科学家提出了数字聚合酶链式反应(digital polymerase chain reaction, dPCR),该技术具有高通量、高灵敏性、低试剂损耗、低交叉污染等优点,允许基于正、负信号量对核酸进行绝对定量,且不需要外部校准曲线<sup>[17]</sup>。根据单个微反应器的生成, dPCR 可分为两类,一种是基于室内的数字 PCR,即 cdPCR;另一种是基于油中水液滴生成的液滴 dPCR,也就是 ddPCR 技术。

目前临床上最常使用的 ddPCR 最早于 2011 年被报道,其随着微流控液滴技术的发展而取得很大进步,通过在微流体通道中引入非混溶油相,可以快速生成微尺度单分散水液滴(1 pl ~ 10 nl),由此提高分析的灵敏性<sup>[18]</sup>。目前在微生物检测方面, ddPCR 已被广泛用于细菌和病毒等病原体的检测。此外,还有报道其用于疾病诊断和单细胞的生物学分析,包括突变基因的分析、循环肿瘤细胞的检测等<sup>[19]</sup>。虽然 ddPCR 相较于前两代 PCR 存在很大的优势,但由于其成本高昂,临床应用远没有实时荧光 PCR 来的普遍。

## 3 第一代测序技术

核糖体内的 16S rRNA 亚基基因存在于一切微生物的基因组中,是各类微生物鉴定及检测中最常

见的标记分子。第一代测序技术(Sanger 法)是基于 16S rRNA 基因测序的一种方法,1977 年利用该项技术完成了对噬菌体 X174 全长约 5 375 个碱基的基因组测序,使生命科学向基因组学时代迈进<sup>[20]</sup>。Sanger 法又称为双脱氧终止法,主要是在含有脱氧核苷三磷酸(dNTP)的反应体系中加入一种具有荧光标记的不同的双脱氧核苷三磷酸(ddNTP),由于加入的 ddNTP 缺乏 DNA 延长所需要的 3-OH 基团, DNA 合成便会随机在 G、A、T、C 中的某一处终止,继而通过凝胶电泳对待测 DNA 分子的长度进行测定,以明确微生物的种类。Sanger 法测序读取长度一般为 1 000 ~ 1 500 bp,一次只能完成一条序列的测定,其缺点是成本较高、测序通量低,不能满足临床上大规模应用的需求<sup>[21]</sup>。

## 4 基于高通量测序技术的病原体核酸检测(第二代测序技术)

第二代测序技术主要是通过直接识别和提取已知微生物的核酸完成文库构建,采用生物信息学算法针对临床标本内的包含病原体序列的种类和耐药基因进行分析,快速而准确地完成高通量测序过程,明确目标病原体。相较于第一代测序技术而言,其耗时更短、经济成本更低、检测数据量更大、检测结果不偏倚,能在一次测序中同时测定包括细菌、真菌、病毒在内的多种病原微生物的基因序列,检测量可达几万到几百万条 DNA 分子<sup>[22]</sup>。但随着临床上第二代测序技术的广泛应用,也逐渐认识到这种技术的局限性,即在高通量测序的结果中宿主核酸占比高,最终提供给临床的数据应尽可能降低宿主因素的干扰;对于 DNA 和 RNA 的检测序列需分开检测,全流程成本高;对于某些厚壁病原体、苛养菌以及胞内菌的检查率还需提升<sup>[23]</sup>。

目前第二代测序技术平台包括 ABI 公司的 Solid、Illumina 公司的 Solexa、Hiseq 和 Roche 公司的 454 等测序设备,其原理分别为连续测序技术、边合成边测序和焦磷酸测序<sup>[24]</sup>。这种高通量病原微生物测序主要包括 16S rRNA 基因测序和鸟枪法宏基因组测序两种不同的技术。

4.1 16S rRNA 基因测序技术 采用 16S rRNA 基因测序技术除了可以对呼吸系统感染性疾病的病原

微生物进行鉴定外,其还常被用来半定量检测呼吸道样本中所有病原微生物的16S rRNA基因,用于了解和分析气道菌落的组成及多样性。传统观念认为,人在健康状态下呼吸道是无菌的,这一观点也正随着基因测序的发展,而被认为是不正确的。人类呼吸系统内存在着多种微生物,随着其中微生物成分、数量及分布的改变,预示着肺部感染、慢性阻塞性肺疾病及支气管哮喘等部分呼吸系统疾病的发生与发展<sup>[25]</sup>。

**4.2 鸟枪法宏基因组测序** 基于鸟枪法对病原微生物进行全基因组测序,可以覆盖16S rRNA基因区域外的序列,其可以有效避免PCR技术带来的结果偏倚<sup>[26-27]</sup>。近年来,其被广泛用于肺部感染患者的呼吸道病原体检测,尤其在危重症患者中的优势尤为明显。

第二代测序技术最大的优势在于其不依赖于传统微生物的培养技术,可以提供更加全面、丰富的微生物数据,对于某些不容易培养,亦或需特殊培养技术才能得到的病原体均有较高的检出能力,是肺部感染病原体检测诊断中有效的帮手。此外,通过第二代测序技术,将样本检测得到的结果与已知病原微生物耐药基因进行对比分析,以筛选出其存在的耐药基因也是近年来研究的热门领域之一,受制于临床情况的复杂性、技术以及目前对检测出的耐药基因解读的局限性,我国于2021年发表的《宏基因组高通量测序技术应用于感染性疾病病原检测中国专家共识》中建议:宏基因组高通量测序(mNGS)检测耐药基因仅用于无背景菌存在且采样过程中未受污染的样本<sup>[28]</sup>。

## 5 第三代测序技术

第三代测序技术主要以纳米孔测序为基础,基于电信号的特征性改变,确定通过纳米孔的DNA或RNA的碱基序列。其相较于第二代测序技术,优点有设备小型化、方便携带,可读取超长的基因序列且耗时更短,可实现单分子边解链边测序,无GC碱基偏好,并可根据临床情况,在实时获取所需数据后随时停止后续测序,缺点是读取错误率较高,相比mNGS没有明显的成本优势。第三代测序技术目前主要的平台有Oxford Nanopore公司的Nanopore Technologies (ONT)和Pacific Biosciences公司的SMART (Single Molecule, Real-Time Sequencing)技术。

**5.1 ONT** ONT主要由纳米孔、马达蛋白以及薄膜构成<sup>[29]</sup>。测序工作时,马达蛋白和引导接头一起加在待测的DNA分子上,马达蛋白会使双链DNA解螺旋为单链,并让其以一定速度从纳米孔中通过,从而收集到相应信号进行测序。

**5.2 SMART 技术** SMART技术的关键优势是能够对单个DNA分子的实时测序并予以监控,其由Pacific Biosciences公司于2013年推出并应用于市场,主要由SMART Cell、DNA聚合酶以及零模波导孔(ZMW)组成<sup>[30]</sup>。当测序开始时, DNA分子进入纳米孔,由于从纳米孔底发出的激光不能经传统纳米孔进入到上方的溶液区,只能被限制在底部区域,该区域被检测到DNA序列并被收集,从而产生信号,进而对其进行测序。

第三代测序技术使现场实时测序成为了可能,其能够实现短时间完成从采样到病原微生物的鉴定,在呼吸系统感染性疾病,尤其是不明病因的呼吸道危重症以及新型输入性传染病的诊断中具备巨大潜力。但因为第三代测序技术存在读取错误率较高的缺陷,目前在临床上会同时进行第二代测序技术,以对第三代测序技术的数据进行部分校正。相信随着第三代测序技术的不断改良与发展,该项技术的准确性和数据通量也会得到更好地平衡与进步。

## 6 靶向高通量测序技术

靶向高通量测序(targeted next-generation sequencing, tNGS)是一种针对特定基因或基因组的测序技术。tNGS只针对特定基因序列进行高通量测序,正因为如此,其不适用新发病原体的检测,临床上往往应用于免疫功能正常患者的严重感染。tNGS具备了PCR和mNGS的优势,能解决95%以上肺部感染性疾病的临床需求<sup>[34]</sup>。相比mNGS技术,tNGS对于病原体的灵敏性不受宿主基因的影响,整体检测时间更短,经济成本更低<sup>[32]</sup>。

当今,虽然新型病原检测技术在肺部感染病原学诊断中的优势不断凸显,但作为“金标准”的传统检测手段仍处在不可忽视和取代的地位。传统检测方法存在技术耗时长、样本质量要求高、对混合感染及未知病原学检测能力不足等缺陷,正因为如此,呼吸道病原学的检测需要更多地从分子水平进行诊断

加持,多重PCR和宏基因组测序等新技术可以较好地弥补传统检测方法上的短板,其在鉴定病原学的种类和检测时效性方面具有先天优势,在临床工作中与传统检测手段结合可以起到互补作用。

**利益冲突** 所有作者声明无利益冲突

## 参 考 文 献

- [1] 余瑜曼,王悦虹.胸膜腔感染的病原学特征及诊治进展[J].中华临床感染病杂志,2020,13(3):234-240.
- [2] 余丹阳.社区获得性肺炎病原学诊断技术与临床合理应用[J].中国实用内科杂志,2017,37(11):1037-1040.
- [3] 宋元林,侯东妮.社区获得性肺炎病原学检测新进展[J].中华全科医学,2018,16(9):1530-1534.
- [4] JIANG L X, REN H Y, ZHOU H J, et al. Simultaneous detection of 13 key bacterial respiratory pathogens by combination of multiplex PCR and capillary electrophoresis[J]. Biomed Environ Sci, 2017, 30(8): 549-561.
- [5] 刘洋.重视呼吸道病毒感染的实验室检测[J].实验与检验医学,2020,38(3):419-422,440.
- [6] JIANG L, REN H, ZHOU H, et al. Simultaneous detection of nine key bacterial respiratory pathogens using luminex xTAG® technology[J]. Int J Environ Res Public Health, 2017, 14(3): E223.
- [7] YANG S, LI H, TANG Y, et al. Multiplex tests for respiratory tract infections: The direct utility of the FilmArray respiratory panel in emergency department[J]. Can Respir J, 2020, 2020: 6014563.
- [8] 彭春红,叶贤伟,张湘燕.社区获得性肺炎病原谱的构成及病原菌快速检测方法的进展[J].中华结核和呼吸杂志,2016,39(4):311-312.
- [9] 王洪玉.社区获得性肺炎的分子诊断研究进展[J].中国处方药,2020,18(9):25-26.
- [10] LEE J M, LEE J H, KIM Y K. Laboratory impact of rapid molecular tests used for the detection of respiratory pathogens[J]. Clin Lab, 2018, 64(9): 1545-1551.
- [11] JONES N K, CONWAY MORRIS A, CURRAN M D, et al. Evaluating the use of a 22-pathogen TaqMan array card for rapid diagnosis of respiratory pathogens in intensive care[J]. J Med Microbiol, 2020, 69(7): 971-978.
- [12] LIN W H, CHIU H C, CHEN K F, et al. Molecular detection of respiratory pathogens in community-acquired pneumonia involving adults[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2022, 55(5): 829-837.
- [13] YANAGIHARA K. The role of molecular diagnosis in acute respiratory tract infection[J]. Respir Investig, 2019, 57(6): 511.
- [14] 刘颖梅,曹彬.呼吸道感染定量分子诊断[J].中国实用内科杂志,2016,36(2):98-100.
- [15] 邸红芹,王晓玲.呼吸道病原体分子诊断技术研究进展[J].河北医科大学学报,2016,37(12):1485-1488.
- [16] LIAO S, WANG L, JI X, et al. Simultaneous detection of 15 respiratory pathogens with a fluorescence probe melting curve analysis-based multiplex real-time PCR assay[J]. Int J Mol Epidemiol Genet, 2019, 10(2): 29-37.
- [17] 王怡悦,管桂波,陈红丹.GeneXpert分子诊断技术在疑似结核感染患者中的应用价值分析[J].医药前沿,2020,10(32):126-127.
- [18] 胡晏宁,鲁炳怀.呼吸道感染性疾病病原学诊断的挑战与解决策略[J].中国临床新医学,2021,14(1):8-12.
- [19] SOTO A, QUINONES-LAVERIANO D M, VALDIVIA F, et al. Detection of viral and bacterial respiratory pathogens identified by molecular methods in COVID-19 hospitalized patients and its impact on mortality and unfavorable outcomes[J]. Infect Drug Resist, 2021, 14: 2795-2807.
- [20] QI C, HOUNTRAS P, PICKENS C O, et al. Detection of respiratory pathogens in clinical samples using metagenomic shotgun sequencing[J]. J Med Microbiol, 2019, 68(7): 996-1002.
- [21] 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.
- [22] GONG F, WEI H X, LI Q, et al. Evaluation and comparison of serological methods for COVID-19 diagnosis[J]. Front Mol Biosci, 2021, 8: 682405.
- [23] HOU J, WU H, ZENG X, et al. Clinical evaluation of the loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of common lower respiratory pathogens in patients with respiratory symptoms[J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(51): e13660.
- [24] XU D, ZHANG W, LI H, et al. Advances in droplet digital polymerase chain reaction on microfluidic chips[J]. Lab Chip, 2023, 23(5): 1258-1278.
- [25] VOGELSTEIN B, KINZLER K W. Digital PCR[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(16):9236-9241.
- [26] POHL G, SHIH I E M. Principle and applications of digital PCR[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2004, 4(1): 41-47.
- [27] 邓雪蕾,张苑怡,袁浩钧,等.液滴数字聚合酶链式反应芯片及其在致病菌检测中的应用[J].分析测试学报,2017,36(10):1191-1196.
- [28] 中华医学会检验医学分会临床微生物学组,中华医学会微生物学与免疫学分会临床微生物学组,中国医疗保健国际交流促进会临床微生物与感染分会.宏基因组高通量测序技术应用于感染性疾病病原检测中国专家共识[J].中华检验医学杂志,2021,44(2):107-120.
- [29] WU J, TANG B, QIU Y Z, et al. Clinical validation of a multiplex droplet digital PCR for diagnosing suspected bloodstream infections in ICU practice: A promising diagnostic tool[J]. Crit Care, 2022, 26(1): 243.
- [30] TIPU H N, SHABBIR A. Evolution of DNA sequencing[J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2015, 25(3): 210-215.
- [31] 施毅,赵江南.侵袭性真菌病病原学非培养实验室诊断方法[J].中华结核和呼吸杂志,2019,42(7):500-505.
- [32] 何静,黄丹辉,董航明,等.二代测序技术检测呼吸道非典型病原体应用进展[J].实用医学杂志,2020,36(18):2598-2602.

收稿日期:2024-07-31

(本文编辑:陈志翔)