

细菌快速检测技术及其应用

赵茂吉, 向 瑶 综述, 杨朝国[△] 审校
(成都中医药大学医学技术学院 611137)

关键词: 细菌; 检测; 生物传感器技术; 飞行时间质谱技术; 生物芯片技术

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.19.053 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2016)19-2828-03

目前,临床微生物实验室对可疑感染标本的细菌检查基于形态学显微镜检、培养和生化反应,其操作繁杂、影响因素多、周期长。随着生物学技术的发展,感染细菌的检查已深入到分子水平,如 PCR 技术、基因芯片技术、质谱技术等,大幅缩短细菌检查周期,且自动化程度高,准确可靠,有的还可高通量检测。

1 微生物传感器技术

微生物传感器技术在床旁诊断中的应用主要是基于核酸或菌体的检测。

1.1 核酸检测 DNA 电化学传感器由一个含有寡核苷酸探针的识别层和电化学信号传感器组成,包含 3 个单层金电极,分别为工作、参考和辅助电极。每个工作电极包含一个捕获探针,其对临床相关病原体具有较高特异性。细菌的 16S rRNA 靶序列与传感器上的捕获探针和检测探针杂交,形成三明治式的复合物。耦合氧化还原酶(报告酶)的检测探针,可通过传感器电极用于氧化还原信号电流的检测。电化学核酸生物传感器与其他检测方法相比,成本效益高、灵敏度和特异度好,与微/纳米制造技术兼容。Sin 等^[1]报道了自组单层电化学生物传感器检测细菌 16S rRNA 基因,可用于泌尿道感染快速诊断。Liu 等^[2]指出交流电动严格控制能减少基体效应和背景噪声,消除在多重检测时的假阳性,增加信噪比超过 20 倍。

1.2 菌体检测 免疫传感器将抗原抗体特异性反应与生物传感器相结合,具有便捷、可重复使用等特点。Wang 等^[3]将磁性纳米颗粒(MNPs)共轭单克隆抗体用于结合 O157:H7 大肠杆菌,金纳米粒子(AuNPs)共轭多克隆抗体,形成一个夹层 MNP-目标细菌-金纳米粒子复合物,用电化学方法测量金纳米粒子的数量,确定目标细菌的存在与否及其数量,其灵敏度为 10 cfu/mL,线性范围为 10~10⁶ cfu/mL。该法只需简单的目标细菌提取,在 1 h 内完成检测。

适配体传感器中的适配体是通过指数富集系统进化技术体外筛选获得的小分子 DNA 和 RNA 寡核苷酸序列,能以高亲和力、选择性结合大量目标(蛋白质、肽、细胞等)并提高目标物的再现性。适配体生物传感器通过传感技术产生化学、物理、光学或电学上的变化,转变成可检测的信号来确定目标物的量。Wu 等^[4]使用大肠杆菌 O157:H7 核酸适配体和鼠伤寒沙门菌核酸适配体,选择性检测细菌,不需专门仪器和细胞裂解等预处理,在小于或等于 20 min 内检测低至 10³ cfu/mL 的目标菌,特异度为 100%。

1.3 核酸或菌体检测 表面等离子体共振(SPR)传感技术可以实时、在线检测 DNA-蛋白质、蛋白质-蛋白质、核酸-核酸、抗原-抗体等生物分子之间的相互作用,是近年发展起来的新型光化学传感器装置。该法具有灵敏度高、特异度高、时间短成本少、在线检测、无样品前处理等优点,可用于大肠埃希菌、沙

门氏菌等抗原检测^[5],也可进行细菌 16S rDNA 的检测^[6],但后者更为稳定、变异程度低。

2 飞行时间质谱技术

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术(MALDI-TOF MS)作为微生物识别和诊断的新技术,具有快速、经济等特点。使用完整细胞或细胞提取物产生特殊的蛋白指纹图谱,与数据库中的指纹图谱比较,鉴定微生物。MALDI-TOF MS 可快速、准确地鉴定纯菌落^[7],且可直接从可疑感染标本中检测微生物,提高检测速率。Loonen 等^[8]报道 MALDI-TOF MS 可检测阳性血培养中的革兰阴性菌、革兰阳性菌、非发酵菌、厌氧菌及酵母菌等。采用皂素和蒸馏水裂解红细胞及甲酸提取蛋白步骤可提供更可靠的鉴定结果,正确率达到 81.9%^[9]。Kim 等^[10]用 MALDI-TOF MS 检测尿液中革兰阴性菌($\geq 10^5$ cfu/mL)的准确率为 98.6%。MALDI-TOF MS 也可直接检测脑脊液中引起脑膜炎的细菌^[11]。但 MALDI 在实际运用中仍存在局限性,其检测结果受人体质谱信号和混合物中物种比例的影响。

3 基因测序技术

基因测序技术逐步运用于临床微生物学,有成为临床微生物实验室诊断工具的潜能。目前该技术主要包括全基因组测序和 16S rRNA 基因测序。

3.1 全基因组测序 有研究显示,单细菌全基因组测序与高通量细菌基因组测序均有益于细菌检测^[12-13]。直接应用于临床标本如尿液检测时,可提供临床相关信息并大幅度减少诊断时间^[14]。全基因组测序能提供细菌识别以外的其他重要信息,如细菌流行病学特性、传染病暴发监测等,对临床和公共卫生具有重要意义。但此法成本较高、技术要求高、海量数据的储存管理及自动化分析存在障碍,在成为常规项目前需进一步改善。

3.2 PCR 联合 16S rRNA 基因测序 Lu 等^[15]对 768 份尿样同时用传统法和 PCR 联合 16S rRNA 基因测序法检测,二者一致性为 98.0%,后者能检测低至 10⁴ cfu/mL 的细菌数。该法同样适用于铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌等常见病原菌^[16],以及弯曲菌和分枝杆菌等临床少见菌的快速、准确鉴定^[17]。PCR 联合细菌 16S rRNA 基因测序省时、准确度较高且高通量,在微生物鉴定方面具有巨大的潜能。

4 荧光原位杂交技术(FISH)

FISH 基于碱基互补配对原则,特异度较高。Almeida 等^[18]用肽核酸-荧光原位杂交法(PNA-FISH)快速检测变形杆菌尿道感染,灵敏度为 100%,特异度为 98%,与培养法(科玛嘉定位显色培养基培养)有相似的准确性,检测限为 1×10⁴ cfu/mL,约 2 h 完成检测。PNA-FISH 也用于细菌性阴道炎的诊断,灵敏度和特异度分别为 84.6%和 97.6%^[19]。

[△] 通讯作者, E-mail: 2641253779@qq.com。

5 环介导等温扩增技术(LAMP)

LAMP 用 2 条内引物(FIP,BIP)和 2 条外引物(F3,B3)特异识别靶基因上的 6 个特定区域,用具有链置换活性的 DNA 聚合酶进行扩增。LAMP 具有反应时间短、设备简单、产物易检测等优点,特别适用于基层单位及现场检测。目前 LAMP 主要用于食源性致病菌、植物致病菌和寄生虫等检测。有报道用 LAMP 检测临床病原菌,特别适用于资源有限的实验室检测结核分枝杆菌^[20]。

6 聚合酶链反应(PCR)技术

Panda 等^[21]认为 PCR 获得阳性结果的可能性比培养法稍大,且成本高、需严格专业知识及有污染的可能性,因此,PCR 作为广泛的筛选工具是受限的。但将 PCR 用于常规诊断是有原因的,它能明显减少诊断时间,并且对最小限度的标本有效。近来,在临床实际应用中,基于常规 PCR 技术改进和发展起来了许多新型技术,如实时荧光定量 PCR、多重 PCR、巢式 PCR 和泛 PCR 等。

6.1 实时荧光定量 PCR 实时荧光定量 PCR 技术具有特异度高、准确性高、灵敏度高、可定量检测、交叉污染机会少等特点。与常规 PCR 对比,实时荧光定量 PCR 法检测标本幽门螺杆菌的特异度和灵敏度均为 100%,检测限为 10 个拷贝数重组质粒^[22]。以培养法为标准,实时荧光定量 PCR 对血液标本和脑脊液检测的灵敏度分别为 71.4%和 60.0%,虽不具有足够的灵敏度取代培养法,但可作培养法及其他方法的补充^[23]。

6.2 多重 PCR 多重 PCR 对多种病原体 DNA 或 RNA 的同时快速鉴定,大大提高了检测效率,尤其适用于多种病原体混合感染的检测,如胃肠炎常见病原菌^[24],尿道病原菌等^[25]。Nagdev 等^[26]用针对结核分枝杆菌 IS6110 和病原菌 16S rDNA 序列的引物,对 150 份临床脑脊液标本的 DNA 进行检测,对已知的结核性脑膜炎、细菌性脑膜炎的检出正确性均为 100.0%,总体特异度为 96.5%,对细菌和结核分枝杆菌的检测限分别为 10^3 cfu/mL 和 10^2 cfu/mL。但在实际运用中,多重 PCR 结果易受到外源性 DNA 污染、引物设计及靶序列选择不当等因素影响。

6.3 巢式 PCR Bhagchandani 等^[27]评价了基于 16S rRNA 基因的巢式 PCR 快速检测脑脊液中 8 种病原菌,灵敏度和特异度均大于或等于 92%,对已知阳性标本的灵敏度为 100%,对已知阴性标本的特异度为 100%。单管巢式 PCR 检测临床标本中结核分枝杆菌具有很好的准确性,无交叉污染,对肺外结核分枝杆菌灵敏度更高,大部分检测分析特异度为 100%^[28]。

7 生物芯片技术

7.1 基因芯片技术 病原菌检测基于所有细菌共有的 16S rRNA 基因,其结构分为可变区和保守区,可变区在不同种属间有一定差异,可用于细菌的分类和鉴别。Kweon 等^[29]使用 STDetect® 芯片检测 13 种泌尿生殖道感染的常见病原菌,灵敏度为 95.1%~100.0%,特异度为 93.4%~100.0%,与直接基因测序法的一致性为 96.5%。基因芯片在临床细菌感染识别和诊断中具有良好的性能,但需已知 DNA 及 cDNA 序列、费用贵、样品制备和标记较复杂、没有统一的质量控制标准、需研究开发全新的生物信息学、系统生物学和计算生物学技术^[30]。

7.2 蛋白芯片技术 蛋白芯片技术是将已知蛋白分子固定在芯片基质上,分析检测样品中能与之特异相互作用的成分。吴友根等^[31]采用结核蛋白芯片技术检测结核分枝杆菌,灵敏度达 67.35%,特异度达 82.28%。蛋白芯片技术具有快速、简

便、高通量等优点,但相对于基因芯片来说,蛋白芯片在制作应用方面更为繁琐。

8 小结

临床可疑感染标本的细菌快速、准确鉴定在临床疾病诊断、治疗上扮演着重要的角色。随着生物学技术的发展,标本需要量少、高通量、快速、自动化程度高且准确可靠的细菌分子水平检测技术不断被研发。当然,在临床实践中,分子水平检测技术还有些问题有待解决,如灵敏度、特异度的提高,成本的降低等,这些都有可能成为其未能广泛应用于临床实验室的原因,但仍有理由相信它们将在细菌的诊断方面起到越来越重要的作用。

参考文献

- [1] Sin MY, Liu TT, Pyne JD, et al. In situ electrokinetic enhancement for self-assembled-monolayer-based electrochemical biosensing[J]. Anal Chem, 2012, 84(6): 2702-2707.
- [2] Liu TT, MSa, Sin ML, et al. Electrokinetic stringency control in self-assembled monolayer-based biosensors for multiplex urinary tract infection diagnosis[J]. Nanomedicine, 2014, 10(1): 159-166.
- [3] Wang Y, Alolcila EC. Gold nanoparticle-labeled biosensor for rapid and sensitive detection of bacterial pathogens[J]. J Biologi Engin, 2015, 9(1): 16-21.
- [4] Wu WH, Li M, Wang Y, et al. Aptasensors for rapid detection of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella typhimurium[J]. Nanoscale Res Lett, 2012, 7(1): 658-661.
- [5] Tennant SM, Zhang Y, Galen JE, et al. Ultrat-fast and sensitive detection of non-typhoidal Salmonella using microwave-accelerated metal-enhanced fluorescence ("MAMEF") [J]. PLoS One, 2011, 6(4): e18700.
- [6] Wang J, Luo Y, Zhang B, et al. Rapid label-free identification of mixed bacterial infections by surface plasmon resonance[J]. J Translat Med, 2011, 9(1): 85-89.
- [7] Blondiaux N, Gaillot O, Courcol RJ. MALDI-TOF mass spectrometry to identify clinical bacterial isolates: Evaluation in a teaching hospital[J]. Pathol Biol (Paris), 2010, 58(1): 55-57.
- [8] Loonen AJM, Wolffs PF, Bruggeman CA, et al. Developments for improved diagnosis of bacterial bloodstream infections[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2014, 33(10): 1687-1702.
- [9] Jakovljevic A, Bergh K. Development of a rapid and simplified protocol for direct bacterial identification from positive blood cultures by using matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. Jakovljevic and Bergh BMC Microb, 2015, 15(1): 258-262.
- [10] Kim Y, Park KG, Lee K, et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples using the Vitek MS System based on matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. Ann Lab Med, 2015, 35(4): 416-422.
- [11] Segawa S, Sawai S, Murata S, et al. Direct application of MALDI-TOF mass spectrometry to cerebrospinal fluid for rapid pathogen identification in a patient with bacteri-

- al meningitis[J]. Clin Chim Acta, 2014, 435(1):59-61.
- [12] Köser CU, Fraser LJ, Ioannou A, et al. Rapid single-colony whole-genome sequencing of bacterial pathogens[J]. J Antimicrob Chemother, 2014, 69(1):1275-1281.
- [13] Bertelli C, Greub G. Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology[J]. Clin Microb Infect, 2013, 19(1):803-813.
- [14] Hasman H, Saputra D, Ponten TS, et al. Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples[J]. J Clin Microb, 2014, 52(1):139-146.
- [15] Lu J, Yu R, Yan Y, et al. Use of Pyromark Q96 ID pyrosequencing system in identifying bacterial pathogen directly with urine specimens for diagnosis of urinary tract infections[J]. J Microbiol Methods, 2011, 86(1):78-81.
- [16] 陈霖祥, 蔡颖, 周广彪, 等. 16S rRNA 基因快速测序法鉴定 3 种常见病原微生物[J]. 现代预防医学, 2014, 41(17):3180-3183.
- [17] 陈茶, 屈平华, 顾全, 等. 基于细菌 16S rRNA 基因的广谱 PCR 扩增与测序分析在临床少见菌鉴定中的应用[C]//中华医学会. 中华医学会第七次全国中青年检验医学学术会议会议论文集, 南京, 2012. 北京: 中华医学会, 2012: 151-152.
- [18] Almeida C, Azevedo NF, Bento JC, et al. Rapid detection of urinary tract infections caused by *Proteus* spp. using PNA-FISH[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2013, 32(1):781-786.
- [19] Machado A, Castro J, Cereija T, et al. Diagnosis of bacterial vaginosis by a new multiplex peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization method[J]. Peer J, 2015, 3(1):e780.
- [20] Neonakis K, Spandidos DA, Petinaki E. Use of loop-mediated isothermal amplification of DNA for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2011, 30(8):937-942.
- [21] Panda A, Singh TP, Satpathy G, et al. Comparison of polymerase chain reaction and standard microbiological techniques in presumed bacterial corneal ulcers[J]. Int Ophthalmol, 2015, 35(1):159-165.
- [22] 张焱, 郭瑞, 居军. SYBR Green 实时荧光定量 PCR 快速检测口腔幽门螺杆菌[J]. 微生物学免疫学进展, 2015, 43(6):30-35.
- [23] Meehan M, Cafferkey M, Corcoran S, et al. Real-time polymerase chain reaction and culture in the diagnosis of invasive group B streptococcal disease in infants: a retrospective study[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2015, 34(1):2413-2420.
- [24] Lint PV, Witte ED, Henau HD, et al. Evaluation of a real-time multiplex PCR for the simultaneous detection of *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp, *Shigella*[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2015, 34(3):535-542.
- [25] Padmavathy B, Kumar RV, Patel A, et al. Rapid and sensitive detection of major uropathogens in a single-pot multiplex PCR assay[J]. Curr Microbiol, 2012, 65(1):44.
- [26] Nagdev KJ, Bhagchandani SP, Bhullar SS, et al. Rapid diagnosis and simultaneous identification of tuberculous and bacterial meningitis by a newly developed duplex polymerase chain reaction[J]. Indian J Microb, 2015, 55(2):213-218.
- [27] Bhagchandani SP, Kubade S, Nikhare PP, et al. Nested PCR assay for eight pathogens: a rapid tool for diagnosis of bacterial meningitis[J]. Mol Diagn Ther, 2015, 20(1):1-10.
- [28] Lima JF, Guedes GM, Lima JF, et al. Single-tube nested PCR assay with in-house DNA extraction for *Mycobacterium tuberculosis* detection in blood and urine[J]. Rev Soci Bras Med Trop, 2015, 48(6):731-738.
- [29] Kweon OJ, Choi JH, Song UH, et al. Performance evaluation of a DNA chip assay in the identification of major genitourinary pathogens[J]. J Microb Meth, 2015, 109(1):117-122.
- [30] James BT, McLoughlin K, et al. Analysis of sensitivity and rapid hybridization of a multiplexed microbial detection microarray[J]. J Virol Method, 2014, 201(1):73-78.
- [31] 吴友根, 杨兴萍, 王军, 等. 结核蛋白芯片检测诊断结核病的价值[J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 14(3):196-198.

(收稿日期:2016-04-08 修回日期:2016-05-08)

• 综 述 •

Notch 信号通路与慢性粒细胞白血病关系的研究进展

张丹阳 综述, 张永清[△]审校

(中国人民解放军第 309 医院血液科, 北京 100091)

关键词: Notch 信号通路; 慢性粒细胞白血病; 分子遗传学

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.19.054 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)19-2830-03

慢性粒细胞白血病(CML)是一种起源于骨髓多能造血干细胞的恶性克隆性肿瘤,其临床分期为慢性期、加速期、急变

期。CML 分子遗传学特征为 BCR/ABL 融合基因,该融合基因编码出具有酪氨酸激酶活性的癌蛋白,干扰细胞凋亡,导致

[△] 通讯作者, E-mail: zhangyongqing0725@163.com。