

• 呼吸系统疾病实验室研究专题 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2025.03.025

LAMP-CRISPR/Cas12a 技术在重症肺炎病原体检测中的应用*

李玲玲¹, 匡歆¹, 王贵平¹, 于风格^{2△}

1. 山东省青岛市胶州中心医院检验科, 山东青岛 266399; 2. 山东省青岛市即墨区急救中心, 山东青岛 266299

摘要:目的 分析环介导恒温扩增技术(LAMP)联合 CRISPR/Cas12a 技术在重症肺炎病原学检测中的应用效果。方法 选取 2019 年 1 月至 2023 年 6 月青岛市胶州中心医院收治的 147 例重症肺炎患者作为研究对象, 取患者支气管肺泡灌洗液或气管内抽吸物标本进行临床病原学检测、血清学检测及 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测, 观察 3 种方法检测结果, 比较 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测方法 with 临床病原学检测结果、血清学检查结果一致性。结果 147 例患者共获得呼吸道标本 147 份, 其中 103 份为泡灌洗液标本, 44 份为呼吸道深部痰液。临床病原学检测病原体标本 100 例, 阳性率为 68.03%。临床病原学检测结果具体为单一病原体感染 85 例, 混合感染 15 例; 未检测出病原体 47 例。147 例患者中检测免疫球蛋白 M 抗体, 共检出 78 例, 阳性率为 53.06%, 其中细菌 0 例, 非典型病原体 32 例, 单一病毒感染 32 例, 混合感染 14 例, 未检测出病原体 69 例。LAMP-CRISPR/Cas12a 检测技术可快速检测重症肺炎病原体。LAMP-CRISPR/Cas12a 检测中共检测出病原体标本 117 例, 阳性率为 79.59%, 其中单纯细菌感染 22 例, 非典型病原体 26 例, 单纯病毒感染 51 例, 混合感染 18 例, 未检测出病原体 30 例。3 种检测方法中, LAMP-CRISPR/Cas12a 检测的阳性率最高, 血清学检测的结果最低。且 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测的阳性率(79.59%)高于临床病原学检测(68.03%)、血清学检测(53.06%), 差异均有统计学意义($\chi^2 = 5.085, 23.164, P = 0.024, < 0.001$)。在重症肺炎病原体检测中, LAMP-CRISPR/Cas12a 检测方法 with 临床病原学检测结果、血清学检查结果一致性均较高(Kappa 均 $> 0.75, P < 0.05$)。结论 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测方法在重症肺炎病原学诊断中的阳性率较高, 尤其适用于细菌性重症肺炎与病毒性重症肺炎检测。

关键词:重症肺炎; 环介导恒温扩增技术; CRISPR/Cas12a 技术; 病原学

中图法分类号: R446.5; R373.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2025)03-0415-06

Application of LAMP-CRISPR/Cas12a technology in pathogen detection for severe pneumonia*

LI Lingling¹, KUANG Xin¹, WANG Guiping¹, YU Fengge^{2△}

1. Department of Clinical Laboratory, Jiaozhou Central Hospital of Qingdao, Qingdao, Shandong 266399, China; 2. Emergency Center of Qingdao Jimo District, Qingdao, Shandong 266299, China

Abstract: Objective To analyze the application effect of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) combined with CRISPR/Cas12a technology in the etiological detection of severe pneumonia. **Methods** A total of 147 patients with severe pneumonia admitted to Jiaozhou Central Hospital of Qingdao from January 2019 to June 2023 were selected as the research objects. Bronchoalveolar lavage fluid or endotracheal aspirates of the patients were collected for clinical pathogen detection, serological detection and LAMP-CRISPR/Cas12a detection, and the results of the three methods were observed. The consistency of LAMP-CRISPR/Cas12a detection method with clinical pathogen diagnosis and serological test results was compared. **Results** A total of 147 respiratory specimens were obtained from 147 patients, including 103 bubble lavage fluid samples and 44 deep respiratory sputum specimens. The positive rate of clinical pathogen detection was 68.03%. The clinical pathogen detection results were single pathogen infection in 85 cases and mixed infection in 15 cases. No pathogen was detected in 47 cases. Immunoglobulin M antibody was detected in 78 of 147 patients, with a positive rate of 53.06%, including 0 case of bacteria, 32 cases of atypical pathogens, 32 cases of single virus infection, 14 cases of mixed infection, and 69 cases of no pathogen was detected. LAMP-CRISPR/Cas12a assay can rapidly detect pathogens of severe pneumonia. A total of 117 cases of pathogens were detected by LAMP-CRISPR/Cas12a assay, with a positive rate of 79.59%, including 22 cases of simple bacterial infection, 26 cases of atypical pathogens, 51 cases of simple viral infection, 18 cases of mixed infection, and 30 cases of no pathogens were detected. LAMP-CRISPR/Cas12a assay showed the highest positive rate and serological assay

* 基金项目: 山东省青岛市医药卫生科研指导项目(2022-WJZD124)。

作者简介: 李玲玲, 女, 副主任技师, 主要从事免疫学方面的研究。△ 通信作者, E-mail: 53473289@qq.com。

showed the lowest results among the three assays. The positive rate of LAMP-CRISPR/Cas12a detection (79.59%) was higher than that of clinical etiological detection (68.03%) and serological detection (53.06%), and the differences were statistically significant ($\chi^2 = 5.085, 23.164, P = 0.024, < 0.001$). In the detection of pathogens of severe pneumonia, LAMP-CRISPR/Cas12a detection method was highly consistent with the results of clinical pathogen diagnosis and serological examination ($Kappa > 0.75, P < 0.05$). **Conclusion** LAMP-CRISPR/Cas12a has a high positive rate in the etiological diagnosis of severe pneumonia, especially for the detection of bacterial severe pneumonia and viral severe pneumonia.

Key words: severe pneumonia; loop-mediated isothermal amplification technology; crisp/cas12a technology; etiology

有研究认为,细菌是肺炎最常见病原体,但随着分子检测技术和细菌疫苗的应用,肺炎的病原体谱已发生明显改变,其中病毒性肺炎占比较高,尤其是新型冠状病毒感染的暴发,让病毒性肺炎受到了广泛关注^[1-2]。目前常用病原学方法中微生物分离培养周期长、抗体检测存在时间窗限制,而聚合酶链反应(PCR)检测需昂贵的设备及配套产品,且需精确把控检测温度计的时间^[3]。恒温扩增技术相较于 PCR 无需变温,在扩增效率、设备要求等方面有明显优势,且环介导恒温扩增技术(LAMP)已被证实在新型冠状病毒、寨卡病毒、真菌、细菌等病原体检测中具有可靠性^[4-5]。CRISPR-Cas 系统源自细菌的适应性免疫系统^[6],被开发为基因编辑工具^[7-8],其中 CRISPR/Cas12a 在特异识别和结合靶标核酸后,表现出强烈的附属切割活性,促使其在病毒检测方面具有巨大前景^[9-10]。有研究表明,一种结合了 LAMP 和 CRISPR-Cas12a 技术的新型病原体检测方法可快速、精准对病原体进行定性^[11-13]。但该技术重症肺炎病原学检测中的研究较少见,鉴于此,本研究观察了 LAMP-CRISPR/Cas12a 技术在重病肺炎病原体检测中的价值,以为临床提供参考依据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2019 年 1 月至 2023 年 6 月青岛市胶州中心医院收治的 147 例重症肺炎患者作为研究对象,其中男 91 例,女 56 例;年龄 50~100 岁,中位年龄为[66.00(60.00,72.00)]岁。纳入标准:(1)符合文献[14]中重症肺炎相关诊断标准;(2)入住重症监护室(ICU)后 24 h 内采集支气管肺泡灌洗液或气管内抽吸物标本并送往实验室进行病原学检测;(3)年龄>18 岁。排除标准:(1)肺部以外部位存在感染;(2)合并肺结核、重度哮喘、肺部肿瘤、肺水肿等肺部原发基础疾病;(3)合并血液病及其他自身免疫性疾病;(4)合并急性创伤性疾病;(5)合并新型冠状病毒感染。剔除或脱落标准:(1)入住 ICU 后 48 h 内病死或出院;(2)样品不符合 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测标准或传统病原学检测标准;(3)临床资料缺失。所有研究对象亲属均知情同意本研究并签署知情同意书。本研究经青岛市胶州中心医院医学伦理委员会审核批准(2022JM068)。

1.2 试剂与仪器 10×磷酸盐缓冲液(PBS);脱氧核

苷酸(dNTP)溶液混合物、RNase 抑制剂(小鼠)、Bst 2.0 聚合酶,10×Cas12a-ssDNA 缓冲液 II 及 Lba-Cas12a 核酸酶,均购自 QIAGEN(MD);扩增引物、修饰序列和 crRNA 由 Sangon Biotech(中国上海)合成;核酸提取试剂盒购自宁波海尔施基因科技有限公司;实时荧光定量 PCR 分析仪 Rotor-Gene Q MDx(德国凯杰);NEXTGEN PCR 热循环仪(荷兰 MBS)。

1.3 方法

1.3.1 灌洗液或痰液标本采集 患者入住 ICU 24 h 内(经验治疗前)由具有支气管镜操作资格的医生,使用 2%利多卡因对患者口咽部进行局部麻醉,经鼻腔置入纤支镜,向可疑肺病变部位进行灌洗(灌洗液为灭菌氯化钠注射液),每次 30~50 mL,连续灌洗 3~4 次后,采用负压吸引下对灌洗液进行回收,收集灌洗液 10~15 mL,标注采集日期、患者信息,立即放入-80℃冰箱保存。若患者不适合进行支气管镜检查,使用吸痰术经人工气道抽吸获得标本,经无菌吸痰管抽吸入无菌痰杯,每份≥6 mL,标注采集日期、患者信息,立即放入-80℃冰箱保存。将采集的标本均分成 2 份,1 份进行临床病原学检测,1 份进行 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测。

1.3.2 临床病原学检测 (1)细菌培养:取每位患者临床病原学检测标本 1 mL,在 35℃孵箱育 30 min 后,接种于麦康凯琼脂平板和巧克力琼脂平板上,5% CO₂、35℃培养箱中孵育 18~24 h 后进行细菌鉴定。(2)常见呼吸道病毒检测:取每位患者临床病原学检测标本 1 mL,采用荧光直接标记法检测常见的呼吸道病毒。(3)非典型病原、人巨细胞病毒、博卡病毒检测:取每位患者临床病原学检测标本 1 mL,提取 DNA 和 RNA,核酸扩增后进行荧光定量 PCR 检测,根据荧光曲线结果判定检测结果。以上任一方法检测结果为阳性则判定为阳性。

1.3.3 血液标本采集及检测 采集患者入住 ICU 24 h 内(经验治疗前)外周静脉血 3 mL,离心处理后取上清液。取 25 μL 上清液样本,并加入 25 μL PBS,取稀释后的 30 μL 血清加入 150 μL 吸附剂中,完全混匀;离心 15 min 后去除沉淀;将处理过的血清加入载玻片中,载玻片每孔之中添加 15 μL 的血清,在另一个载玻片的每一个孔中加入 15 μL 不稀释的阴性对照;37℃湿育 90 min;PBS 冲洗后,将载玻片浸泡

在 PBS 中,并放置在水平摇床上轻摇 10 min,然后将载玻片用蒸馏水冲洗;载玻片晾干后每孔加入 15 μL 异硫氰酸荧光素结合物溶液;37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min;载玻片晾干后每孔再次加入 15 μL 异硫氰酸荧光素结合物溶液;加入几滴封闭介质,并盖上盖玻片,采用奥林巴斯荧光显微镜观察特异性荧光模型获取检测结果,记录每个患者病原体类型。采用呼吸道感染病原体免疫球蛋白(Ig)M 抗体间接免疫荧光检测试剂盒(美国 Chemieon 公司)检测标本,试剂盒包含 10 种单克隆荧光标记的抗体(肺炎支原体、肺炎衣原体、嗜肺军团菌、人巨细胞病毒、呼吸道合胞病毒、腺病毒、博卡病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒和副流感病毒)。

1.3.4 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测

1.3.4.1 实验前准备 将不溶于水的寡核苷酸(crRNA 除外)重悬于 1 \times TE 缓冲液中并于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存;无核酸酶水重悬获得 crRNA 溶液 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。标本则离心处理后取上清液。

1.3.4.2 样本核酸提取 取 2 mL 离心管,加入待检样本 200 μL ,裂解液 600 μL ,上下颠倒 5 s 混匀,静置 10 min;加入磁珠液 20 μL ,上下颠倒 5 s 混匀,将离心管插入磁力架等待 30 s,倾倒或吸掉离心管内的液体;加入清洗液 600 μL ,离心管撤离磁力架,上下颠倒 30 s 混匀,离心管插入磁力架等待 30 s,倾倒或吸掉离心管内的液体;重复一次上述操作;离心管插入磁力架,加入洗脱液 50 μL ,左右摇晃 30 s 混匀,离心管插入磁力架等待 30 s,收集液体至新的离心管,得到核酸纯化样本。

1.3.4.3 LAMP-CRISPR/Cas12a 反应流程 (1) LAMP 反应:通过 4 种引物进行 LAMP 反应,正向内引物(FIP),由 F1c 和 F2 组成;反向内引物(BIP),由 B1c 和 B2 组成;外引物 F3、B3 分别由目的基因上的 F3、B3 区域组成。通过 4 种引物循环反应,从哑铃结构形成茎环 DNA。(2)合成靶基因 LAMP-CRISPR/Cas12a 反应的核酸检测:提前制备好引物混合物(含 20 μM FIP、20 μM BIP、5 μM F3、5 μM B3),LAMP 在总共 50 μL 反应混合物中进行,每个反应混合物含 6 μL 不同拷贝数的合成靶基因、4 μL 引物混合物、4 μL 4 mM dNTP、1 μL 100 mM MgCl_2 、10 μL 5M 甜菜碱。混合物在 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 2 min,冰上冷却 2 min,加入 8 U Bst DNA 聚合酶大片段,60 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 90 min 后,80 $^{\circ}\text{C}$ 加热 20 min 终止反应。(3)实际标本的 LAMP 反应-实时荧光过程:LAMP 在总共 25 μL 反应混合物中进行,每个反应混合物含 3 μL 提取核、2 μL 引物混合物、4 μL 4 mM dNTP、0.5 μL 100 mM MgCl_2 、5 μL 5M 甜菜碱。混合物在 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 2 min,冰上冷却 2 min,加入 8 U Bst DNA 聚合酶大片段触发 LAMP 反应。20 μL 反应液在 PCR 仪中反应 30 min(60 $^{\circ}\text{C}$),获得 LAMP 产物;LAMP 反应液中加入 1.5 μL 20 \times EvaGreen,观察每半分钟的荧光信号图。(4)Cas12a 介导的实际标本的 LAMP 产物荧光测定:

LAMP 产物 60 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 90 min,80 $^{\circ}\text{C}$ 失活 20 min,2 μL LAMP 产物中加入 20 μL 反应体系(500 nM crRNA、200 nM Cas12a、200 nM 报告基因、2 μL 10 \times Cas12a-ssDNA 缓冲液 II),PCR 仪中反应 30 min(37 $^{\circ}\text{C}$),观察每半分钟的荧光信号图。

1.3.4.4 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测结果判断

(1)阳性:30 min 内 FAM 通道荧光曲线上升,阴性质控 FAM 荧光曲线平直;阳性质控 FAM 通道荧光曲线攀升。(2)阴性:30 min 内 FAM 通道荧光曲线保持不变,且阴性质控曲线平直,阳性质控曲线攀升。(3)复检:标本 FAM 通道荧光曲线攀升,且阴性质控曲线攀升。

1.4 统计学处理 采用 SPSS27.0 统计软件进行数据处理与统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验。不符合正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,两组间比较采用 Mann-Whitney U 检验。采用 Kappa(Kappa 值 < 0.4 ,一致性差;0.4 \leq Kappa 值 < 0.75 ,一致性中等;Kappa 值 ≥ 0.75 ,一致性较好)进行一致性分析。计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

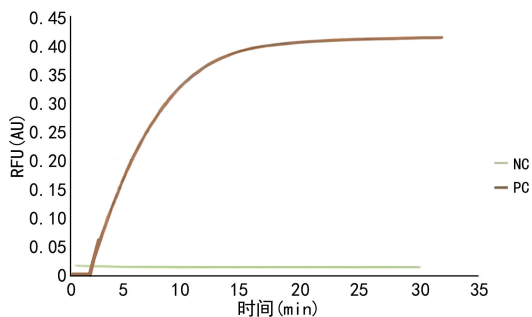
2 结果

2.1 临床病原学检测结果 147 例患者共获得呼吸道标本 147 份,其中 103 份为泡灌洗液标本,44 份为呼吸道深部痰液标本。临床病原学(细菌培养及多种 PCR 检测)检测结果显示,病原体标本 100 例,阳性率 68.03%,其中单纯病毒感染占比较高,为 27.89%(41/147),检测到的病毒前 3 位依次为人巨细胞病毒、腺病毒例、甲型流感病毒。临床病原学检测结果为单一病原体感染 85 例(57.82%);肺炎链球菌 2 例(1.36%,2/147)、金黄色葡萄球菌 3 例(2.04%,3/147)、铜绿假单胞菌 2 例(1.36%,2/147)、鲍曼不动杆菌 6 例(4.08%,6/147)、肠杆菌 1 例(0.68%,1/147)、流感嗜血杆菌 1 例(0.68%,1/147)、肺炎克雷伯菌 4 例(2.72%,4/147)、大肠埃希菌 1 例(0.68%,1/147)、肺炎支原体 13 例(8.84%,13/147)、肺炎衣原体 6 例(4.08%,6/147)、嗜肺军团菌 5 例(3.40%,5/147)、人巨细胞病毒 16 例(10.88%,16/147)、呼吸道合胞病毒 5 例(3.40%,5/147)、腺病毒 8 例(5.44%,8/147)、博卡病毒 3 例(2.04%,3/147)、甲型流感病毒 6 例(4.08%,6/147)、乙型流感病毒 2 例(1.36%,2/147)、副流感病毒 1 例(0.68%,1/147);混合感染 15 例(10.20%);细菌+单一病毒感染 1 例(0.68%,2/147)、2 种病毒 4 例(2.72%,4/147)、3 种病毒 2 例(1.36%,2/147)、非典型病原体+病毒 8 例(5.44%,8/147)。未检测出病原体 47 例(31.97%,47/147)。

2.2 血清学病原学情况 147 例患者中检测 IgM 抗体,共检出 78 例,阳性率为 53.06%,其中细菌 0 例,非典型病原体 32 例[肺炎支原体 17 例(11.56%,17/

147)、肺炎衣原体 7 例(4.76%, 7/147)、嗜肺军团菌 8 例(5.44%, 8/147)], 单一病毒感染 32 例[人巨细胞病毒 13 例(8.84%, 13/147)、呼吸道合胞病毒 4 例(2.72%, 4/147)、腺病毒 7 例(4.76%, 7/147)、博卡病毒 2 例(1.36%, 1/147)、甲型流感病毒 4 例(2.72%, 4/147)、乙型流感病毒 2 例(1.36%, 2/147)、副流感病毒 0 例)], 混合感染例 14 例[(细菌+单一病毒感染 0 例、2 种病毒 4 例(2.72%, 4/147)、3 种病毒 1 例(0.68%, 1/147)、非典型病原体+病毒 9 例(6.12%, 9/147)], 未检测出病原体 69 例(46.94%, 69/147)。

2.3 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测重症肺炎病原学可行性 在 15 min 内重症肺炎病原体组 DNA 的荧光曲线完成指数扩增, 形成 S 形扩增曲线; 阴性对照 30 min 保持不变, LAMP-CRISPR/Cas12a 检测技术可快速检测重症肺炎病原体。见图 1。



注:应用肺炎支原体[MP pl 基因(M21519.1)]的合成靶基因对 CRISPR/Cas12a 检测技术进行可行性验证(NC-阴性对照, PC-合成序列), 扩增曲线均呈 S 形而阴性对照在 30 min 内未变化。

图 1 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测重症肺炎病原学可行性

2.4 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测重症肺炎病原学结果 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测中共检测出病原体标本 117 例, 阳性率为 79.59%, 其中单纯细菌感染 22 例[肺炎链球菌 2 例(1.36%, 2/147)、金黄色葡萄球菌 3 例(2.04%, 3/147)、铜绿假单胞菌 2 例(1.36%, 2/147)、鲍曼不动杆菌 7 例(4.76%, 7/147)、肠杆菌 1 例(0.68%, 1/147)、流感嗜血杆菌 1 例(0.68%, 1/147)、肺炎克雷伯菌 4 例(2.72%, 4/147)、大肠埃希菌 2 例(1.36%, 2/147)], 非典型病原体 26 例[肺炎支原体 14 例(9.52%, 14/147)、肺炎衣原体 6 例(4.08%, 6/147)、嗜肺军团菌 6 例(4.08%, 6/147)], 单纯病毒感染 51 例[人巨细胞病毒 18 例(12.24%, 18/147)、呼吸道合胞病毒 6 例(4.08%, 6/147)、腺病毒 10 例(6.80%, 10/147)、博卡病毒 4 例(2.72%, 4/147)、甲型流感病毒 8 例(5.44%, 8/147)、乙型流感病毒 3 例(2.04%, 3/147)、副流感病毒 2 例(1.36%, 2/147)], 混合感染 18 例[(细菌+单一病毒感染 1 例(0.68%, 1/147)、2 种病毒 6 例(4.08%, 6/147)、3 种病毒 4 例(2.72%, 4/147)、非典型病原体+病毒 7 例(4.76%, 7/147)], 未检测出病原体 30 例(20.41%, 30/147)。

2.5 3 种检测方法阳性率比较 3 种检测方法中,

LAMP-CRISPR/Cas12a 检测的阳性率最高, 血清学检测的结果最低。且 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测的阳性率为 79.59% 高于临床病原学检测的 68.03%、血清学检测的 53.06%, 差异均有统计学意义($\chi^2 = 5.085, 23.164, P = 0.024, < 0.001$)。

2.6 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测与临床病原学检测一致性比较 在重症肺炎病原体检测中, LAMP-CRISPR/Cas12a 检测方法与临床病原诊断结果、血清学检查结果一致性均较高(Kappa 均 $> 0.75, P < 0.05$)。见表 1、2。

表 1 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测与临床病原学检测一致性比较

LAMP-CRISPR/Cas12a 检测	临床病原学检测		合计
	阳性	阴性	
阳性	92	25	117
阴性	8	22	30
合计	100	47	147

表 2 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测与血清学检测一致性比较

LAMP-CRISPR/Cas12a 检测	血清学检测		合计
	阳性	阴性	
阳性	66	51	117
阴性	12	18	30
合计	78	69	147

3 讨论

病毒、细菌、衣原体、支原体等微生物是引起重症肺炎患者呼吸道感染的主要病原体^[15-16], 但因检测手段有限, 约 62% 的肺炎患者无法明确病原体^[17]。有研究表明, 未明确病原体感染的重症肺炎患者病死率较高^[18]。因此, 早期明确重症肺炎患者病原体情况极为重要。对于重症肺炎的病原体, 既往的研究多将关注点集中于细菌、真菌, 但仅部分患者得到合理性治疗, 病原体的精确检测是有效治疗的前提。多重 PCR 技术检测病毒性肺炎的准确率虽较高, 但因温度、仪器、操作技术等限制, 促使其临床应用受限。

本研究基于 LAMP-CRISPR/Cas12a 技术建立检测重症肺炎的新方法, 该技术基于 CRISPR Cas12a 酶具有任意切割单链分子的特性, 通过一段 CRISPR 靶向 RNA 的引导识别目的 DNA 序列后, 进行切割探针分子引发荧光信号; 同时采用 LAMP 进行目的序列的扩增富集, 既保留了 LAMP 方法的高敏感性, 又提升了检测方法的特异性^[19-20]。有研究指出, LAMP-CRISPR/Cas12a 临床样本检测水平与实时荧光定量 PCR 相当, 作为一种高度灵敏的可视化检测方法, LAMP-CRISPR 在基层猪瘟疫病的监测防疫中具有巨大潜力^[21]。有研究也证实, 基于 LAMP-CRISPR/Cas12a 建立的检测方法可实现对新型冠状病毒的精

确检测^[22]。本研究利用 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测方法对 ICU 重症肺炎患者的呼吸道感染病原体进行检测的阳性率高于其他检测方案。因 LAMP 技术是一项突破性的基因扩增技术,在非靶 DNA 共存情况下,其特异性扩增也不受影响;CRISPR/Cas 能够通过编程 gRNA 序列靶向任何基因区域,其在呼吸道病原体检测中最重要的作用是通过使用 Cas 蛋白识别病原体和基于核酸的诊断^[23-24]。因此,LAMP-CRISPR/Cas12a 在识别 DNA/RNA 病原体中具有较高的价值。

目前病原学、血清学检测是判定病毒、细菌检测结果的主要标准,而本研究中 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测和上述 2 种检测方案的一致性较高,提示了该检测方案在病原体检测中的有效性和实用性。LAMP-CRISPR/Cas12a 系统可实现一个体系同时检测多种病原体,不论是 DNA、RNA,还是细菌感染导致的肺炎都可检测,还可进行人类免疫缺陷病毒滴度检测以指导抗病毒治疗等,具有广阔的应用前景。一项 2012 年的研究表明,相较于血清学检测,LAMP 法检测肺炎支原体感染更为快速^[25]。本研究同样也发现 LAMP-CRISPR/Cas12a 系统在测定非典型病原体仍具有可靠性,且与病原学、血清学检测相比,LAMP-CRISPR/Cas12a 系统检测具有简单、快速、准确等优势,在重症肺炎病原学检测中具有一定的优势。且临床已证实,LAMP-CRISPR/Cas 系统在细菌耐药性检测中也具有积极的意义^[24]。因而在临床实践中 LAMP-CRISPR/Cas 系统有望为重症肺炎的抗菌药物的应用提供指导工具。但本研究目前仅是简单的分析 LAMP-CRISPR/Cas12a 系统检测重症肺炎病原学结果,该技术的应用后续还需进行深入探讨。

综上所述,LAMP-CRISPR/Cas12a 检测方法在重症肺炎病原学诊断中的阳性率较高,尤其适用于细菌性重症肺炎与病毒性重症肺炎检测,LAMP-CRISPR/Cas12a 检测方法有望成为即时监测工具。

参考文献

[1] ZHANG L L, XIAO Y, ZHANG G L, et al. Identification of priority pathogens for aetiological diagnosis in adults with community-acquired pneumonia in China; a multicentre prospective study[J]. BMC Infect Dis, 2023, 23(1): 231.

[2] SUBBARAO K, MAHANTY S. Respiratory virus infections: understanding COVID-19[J]. Immunity, 2020, 52(6): 905-909.

[3] 白鹭,陈涔,李园园. 病毒性肺炎病原学检测技术研究进展[J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 31(23): 3675-3680.

[4] SOROKA M, WASOWICZ B, RYMASZEWSKA A. Loop-Mediated isothermal amplification (LAMP): the better sibling of PCR[J]. Cells, 2021, 10(8): 1931.

[5] 崔立慧,姚欣,陈名霞. 环介导恒温扩增芯片技术在医院获得性肺炎病原菌检测中的应用[J]. 中国临床研究, 2022, 35(4): 451-455.

[6] ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product[J]. J Bacteriol, 1987, 169: 5429-5433.

[7] GASIUNAS G, BARRANGOU R, HORVATH P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(39): E2579-E2586

[8] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. Science, 2012, 337(6096): 816-821.

[9] PAUL B, MONTOYA G. CRISPR-Cas12a: functional overview and applications[J]. Biomed J, 2020, 43(1): 8-17.

[10] MELIAWATI M, SCHILLING C, SCHMID J. Recent advances of Cas12a applications in bacteria[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2021, 105(8): 2981-2990.

[11] LI C, CHEN X, WEN R Q, et al. Immunocapture magnetic beads enhanced the LAMP-CRISPR/Cas12a method for the sensitive, specific, and visual detection of campylobacter jejuni[J]. Biosensors(Basel), 2022, 12(3): 154.

[12] DONG J, FENG W, LIN M, et al. Comparative evaluation of PCR-based, LAMP and RPA-CRISPR/Cas12a assays for the rapid detection of diaporthe aspalathi[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(11): 5773.

[13] SHI Y, KANG L, MU R, et al. CRISPR/Cas12a-enhanced loop-mediated isothermal amplification for the visual detection of Shigella flexneri[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2022, 10: 845688.

[14] 中国医师协会急诊医师分会. 中国急诊重症肺炎临床实践专家共识[J]. 中国急救医学, 2016, 36(2): 97-107.

[15] 王坤利,罗璐灵,刘刚,等. 基于 mNGS 检测的重症肺炎病原学特征与危险因素分析[J]. 贵州医科大学学报, 2024, 49(11): 1678-1686.

[16] 孙浩,孙博文,薛楠楠,等. 宏基因组二代测序在免疫抑制合并重症肺炎患者病原体分布中的应用[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2024, 38(10): 1040-1045.

[17] JAIN S, SELF W H, WUNDERINK R G, et al. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U. S. adults[J]. N Engl J Med, 2015, 373(5): 415-427.

[18] GONZÁLEZ-SUÁREZ S, BARBARA FERRERAS A, CAICEDO TORO M, et al. Detection of residual pulmonary alterations with lung ultrasound and effects on postoperative pulmonary complications for patients with asymptomatic SARS-CoV-2 infection undergoing surgeries[J]. BMC Anesthesiol, 2022, 22(1): 186.

[19] SHI Y Y, FU X Y, YIN Y, et al. CRISPR-Cas12a system for biosensing and gene regulation[J]. Chem Asian J, 2021, 16(8): 857-867.

[20] SHARMA S, SINGH J, SEN A, et al. Multiplex loop mediated isothermal amplification (m-LAMP) as a point of care technique for diagnosis of malaria[J]. J Vector Borne Dis, 2022, 59(1): 29-36.

噬菌体抗感染应用及研究进展*

李欣玥, 黄美佳 综述, 张鸿娟[△] 审校

昆明医科大学第一附属医院医学检验科/云南省医学检验临床医学研究中心, 云南昆明 650032

摘要: 抗菌药物的广泛使用导致全球耐药性问题日益严重, 亟需开发新的抗菌药物或探索其他替代疗法。噬菌体作为专门攻击细菌的病毒, 因其高度宿主特异性和不破坏正常菌群的显著优势, 在“后抗菌药物时代”引起了广泛关注。该研究通过回顾国内外文献, 系统总结了噬菌体的基本特性和防御机制, 探讨了噬菌体疗法在细菌感染治疗中的应用与前景, 旨在为临床应用噬菌体抗感染治疗提供理论依据。

关键词: 噬菌体; 噬菌体疗法; 联合疗法; 细菌感染

中图法分类号: R378; R453.9

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2025)03-0420-04

Application and research progress of phage anti-infection*

LI Xinyue, HUANG Meijia, ZHANG Hongjuan[△]

Department of Clinical Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University/Yunnan Medical Laboratory Clinical Medicine Research Center, Kunming, Yunnan 650032, China

Abstract: The widespread use of antimicrobials has led to a growing global problem of drug resistance, and there is an urgent need to develop new antimicrobials or explore other alternative treatments. Bacteriophages, as viruses that specifically attack bacteria, have attracted wide attention in the "post-antimicrobial era" due to their high host specificity and significant advantages of not destroying normal flora. By reviewing the domestic and foreign literature, this article systematically summarizes the basic characteristics and defense mechanisms of phage, and discusses the application and prospect of phage therapy in the treatment of bacterial infections, aiming to provide a theoretical basis for the clinical application of phage anti-infection therapy.

Key words: bacteriophage; phage therapy; combination therapy; bacterial infection

抗菌药物的滥用与不合理使用导致多重耐药菌(MDROs)数量急剧增加, 对患者生命安全及全球公共卫生构成了严重威胁。据世界卫生组织(WHO)2020年发布的报告, 抗菌药物耐药性(AMR)已被列为全球十大公共卫生威胁之一^[1]。若不采取有效措施, 预计到2050年, 耐药性细菌感染将导致约1000万人死亡^[2]。尽管开发新型抗菌药物或延长现有抗菌药物的有效使用期限是解决此问题的关键, 但新药研发进程缓慢, 现有抗菌药物的耐药问题仍在不断加剧。因此, 探索新兴的抗菌策略变得尤为迫切。噬菌体, 亦称细菌病毒, 以其高度宿主特异性、精确的感染能力以及对人体细胞或有益微生物无害的特性, 在治疗耐药细菌感染方面展现出巨大潜力。WHO在全球行动计划中已将噬菌体疗法列为应对抗菌药物耐药性的关键策略之一。本文围绕噬菌体的基本特性进行阐述, 并深入探讨噬菌体疗法在抗感染中的应用潜力、临床应用前景以及面临的挑战, 旨在为相关领域的研究者和临床工作者提供参考依据, 推动噬菌体疗法在抗感染治疗领域的研究与广泛应用。

1 噬菌体的概况

噬菌体, 一种专一性侵染细菌并诱导其裂解的病毒。早在1896年, 英国化学家首次观察到噬菌体的溶菌现象^[3]。1915年, 英国病理学家对噬菌体的存在进行了正式报道, 1917年, 其被命名为噬菌体, 意为细菌的吞噬者^[4]。噬菌体广泛分布于自然界, 庞大的数量在地球上的生物实体中占据着举足轻重的地位。根据噬菌体DNA进入宿主细胞的机制, 可将其分为烈性噬菌体和温和性噬菌体2大类。烈性噬菌体会在侵入细菌细胞后迅速进入复制与蛋白质合成过程, 最终导致细菌裂解并释放出大量子代噬菌体。与此相对, 温和性噬菌体则选择将自身DNA与宿主的染色体整合, 形成一种称为溶原状态的共生关系, 并在特定应激条件下激活裂解周期。作为细菌的主要天敌, 噬菌体在自然界中的数量远超细菌, 几乎每一种细菌都面临着至少一种噬菌体的威胁。在长期的共同进化过程中, 噬菌体与细菌之间发展出了复杂的攻防关系。细菌为了抵御噬菌体的侵袭, 演化出了多种防御机制, 包括超感染排斥系统、限制-修饰系统以及

* 基金项目: 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项(202301AY070001-291)。

[△] 通信作者, E-mail: z121159143@qq.com。