



中山大學 孙逸仙纪念医院

SUN YAT-SEN MEMORIAL HOSPITAL, SUN YAT-SEN UNIVERSITY

新一代病原体RNA检测 在实验室诊断中的应用

段朝晖

Department of Clinical Laboratory

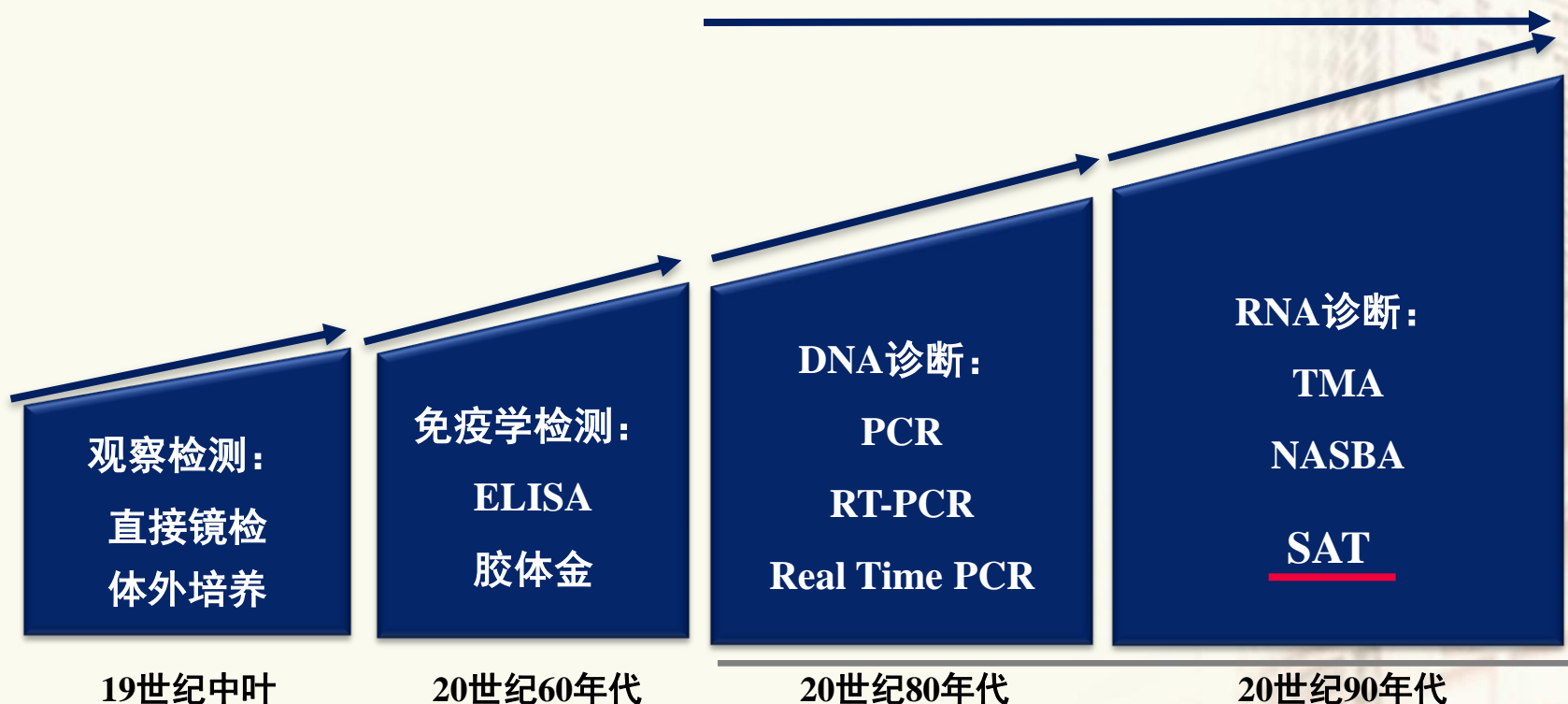
Sun Yat-Sen Memorial hospital, Sun Yat-Sen University

博愛 崇德 求精 奮進



体外诊断行业发展趋势

分子诊断时代





RNA实时荧光恒温扩增检测

Simultaneous Amplification and Testing

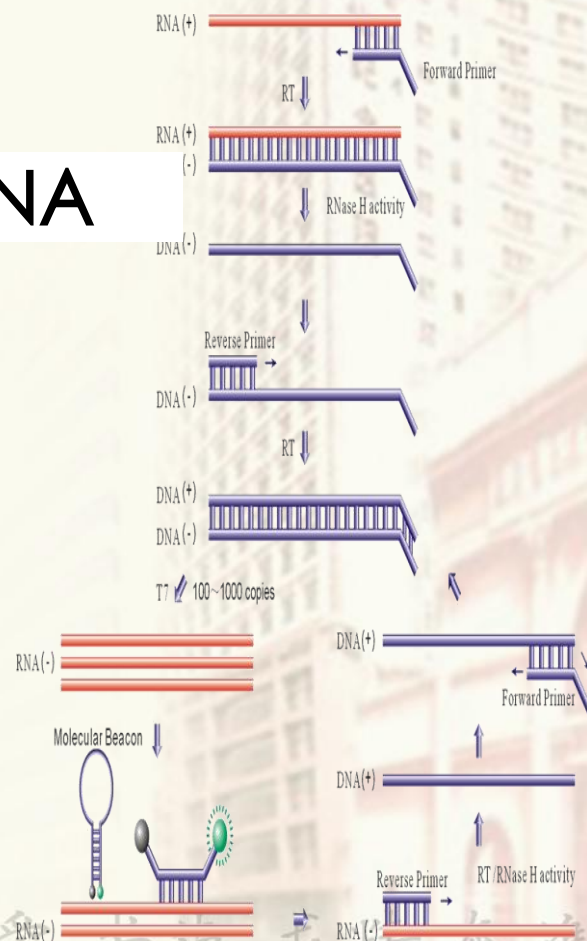
一条RNA → cDNA → 成千上万RNA

“看”不到



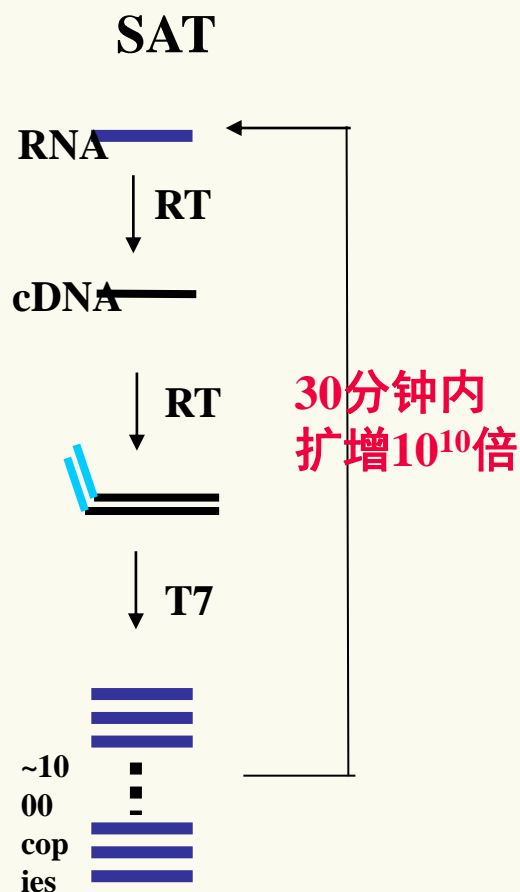
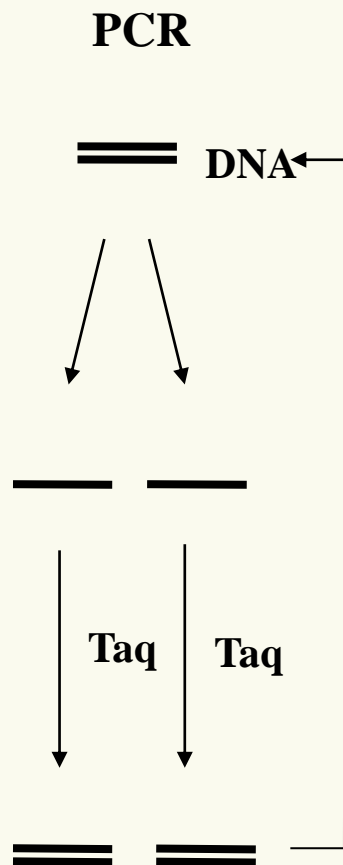
积累

“看”得到





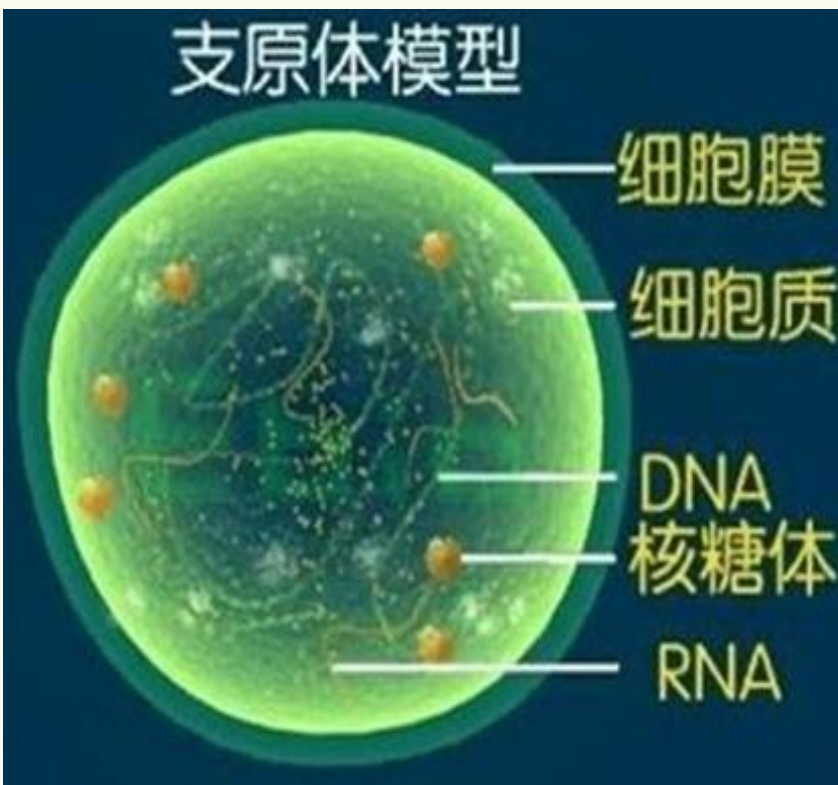
SAT技术与PCR技术原理比较



- 起始模板为RNA，最终产物为RNA；
- 扩增检测方式为：逆转录—转录
- 40min完成扩增检测过程
- 42℃恒温扩增



(一) 检测为RNA，模板量大，灵敏度高

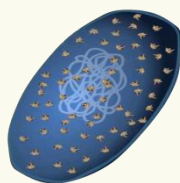
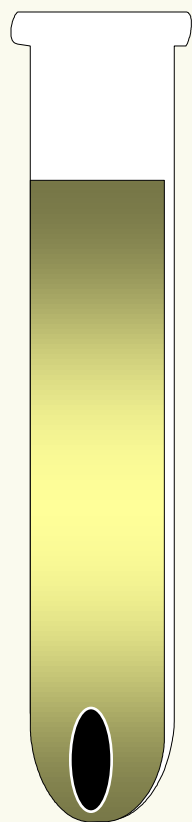




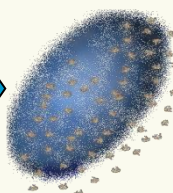
(二) 取样效率大大提高

A、如果2ml样本
含有1个细菌

取0.2ml样本，
最终得到细菌
的几率是1/10。



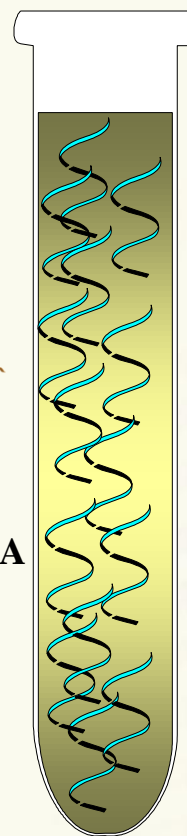
•Sample



•Cell Lysis



•Target RNA
•Released



- B、如果2ml样本
含有1个细菌
- 先裂解，后取
样，
- 2ml样本含有
10000个rRNA。
- 取0.2ml样本，
可得到 1000个分

•使用rRNA为靶标，大大提高了取样效率和检测灵敏度。



(三) 不易造成假阳性

- DNA和RNA的主要区别就在骨架上的糖基。
- DNA很稳定，RNA很不稳定
- 自然界中RNA酶广泛存在
- 故可减少有气溶胶造成的交叉污染

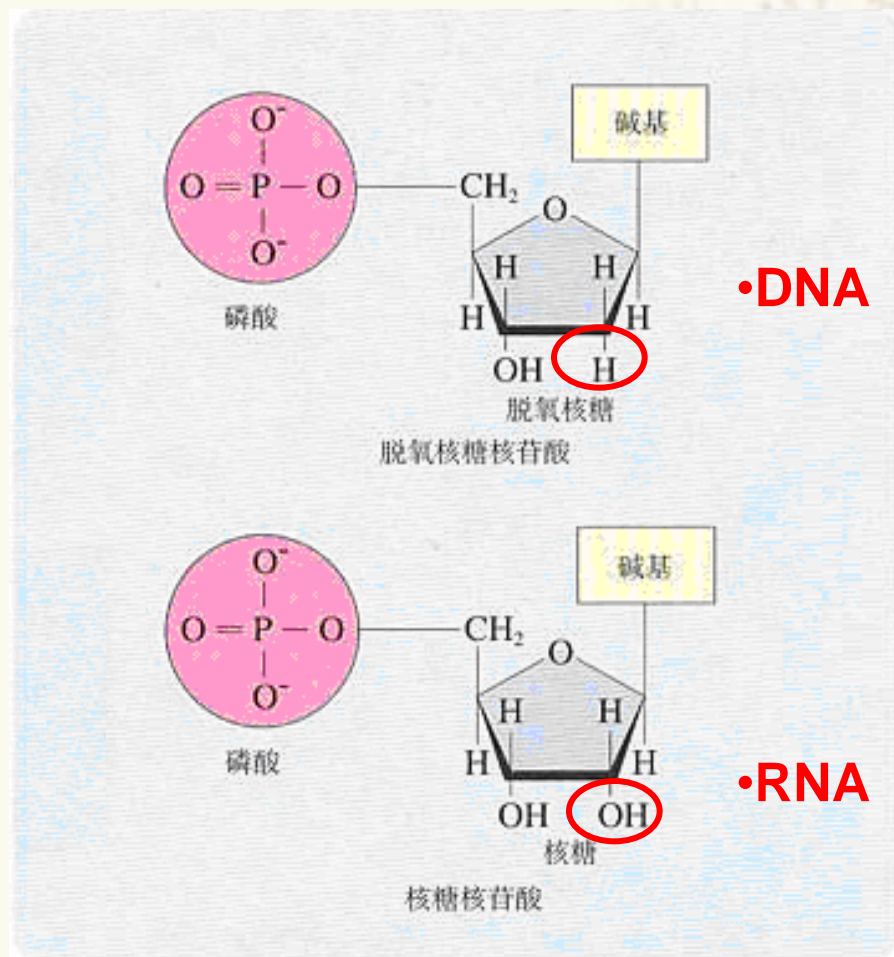
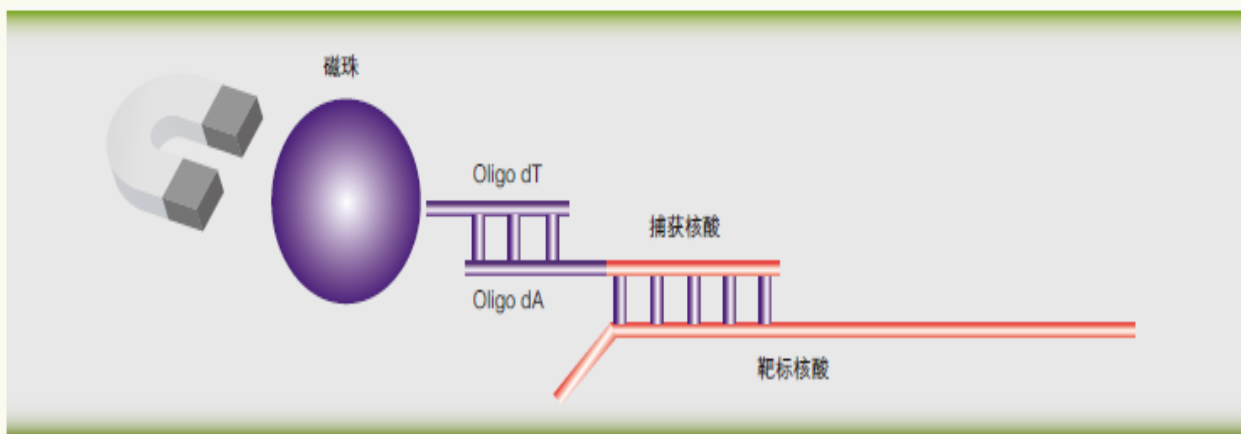


图2-8 脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸



(四) 特异性靶标捕获法磁珠提取

特异性高

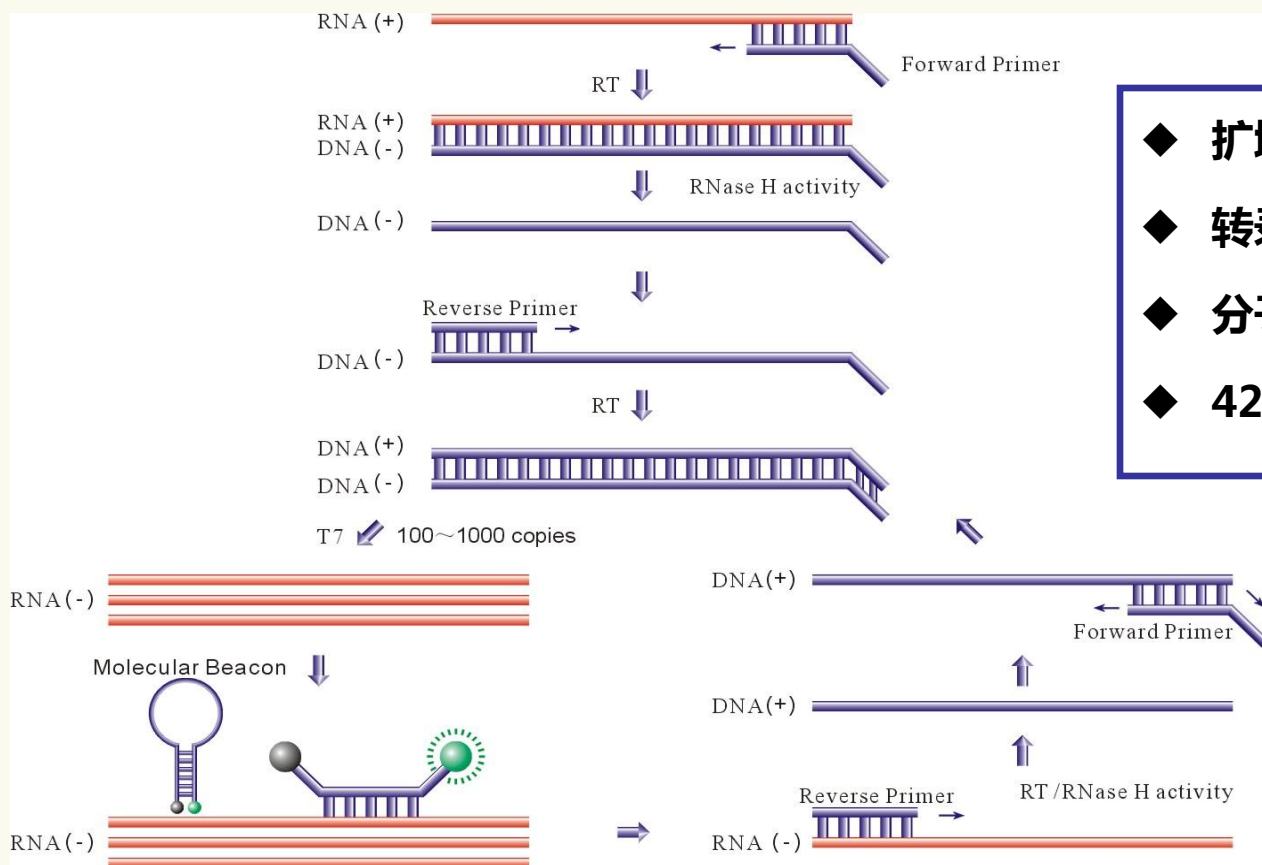


- ◆ 特点： 特有的杂交+磁珠
- ◆ 彻底去除反应抑制剂



SAT—RNA实时荧光恒温扩增技术

速度快，特异性高，**避免假阳性**



- ◆ 扩增产物为RNA，不易污染
- ◆ 转录速度快，40min完成扩增检测
- ◆ 分子信标检测，特异性高
- ◆ 42℃恒温扩增，仪器损耗小



RNA检测优势

- **灵敏度高，不易漏检**：RNA 拷贝数 \geq DNA拷贝数（ e.g, 16s rRNA 10^4 copy/cell ）
- **与临床相关性好，可进行疗效评估和辅助判愈**：病原体死亡，RNA很快降解，可减少无效治疗，比如抗生素滥用。 **但DNA检测死菌也阳性**
- **不易误检**：RNA容易降解，靶标和扩增产物都是RNA，不易污染，不易出现假阳性。
- **对仪器要求低，损耗小**：42℃ 恒温扩增
- **可使用MagX全自动提取，实现分子全自动化检测。**



RNA检测技术的发展历程

- TAS (Transcription-based amplification system,
• 转录依赖的扩增系统)
- 1989, Kwoh

• 1989

• NASBA有荷兰阿克苏公司推出，现在属于法国生物梅里埃公司

• 1989

• TMA
• Gen-probe

• 2007

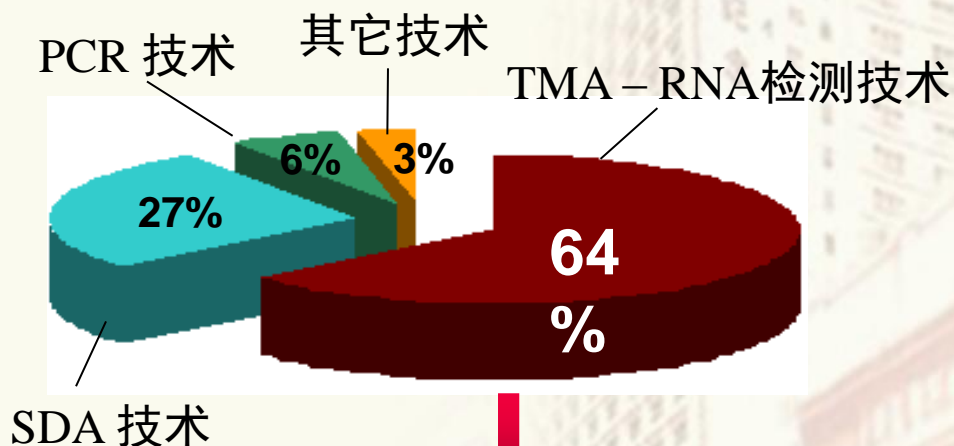
• SAT
• 上海仁度



SAT技术应用于CT/NG/UU/MG检测

- ✓ **尿液样本检测：**显著降低病人的采样痛苦和检测依从性；
- ✓ 更高灵敏度，**避免假阴性**；
- ✓ **避免假阳性：**菌体死亡后RNA很快降解，利于用药监测及判愈。

美国市场占主导地位的CT/NG检测技术：**TMA**



real-time TMA——SAT

数据来源：Gen-Probe Company (2009)



WHO建议用RNA检测MG

- WHO明确指出核酸扩增检测（NAAT）是诊断MG的唯一可行方法;通过RNA检测技术检测生殖支原体比PCR方法要更准确。

- NAAT is the only practical method for diagnosis of *M. genitalium*.

Quantification of *M. genitalium* DNA does not appear to be of value for routine diagnostics.

As an alternative to PCR, a transcription-mediated amplification (TMA) assay targeting 16S rRNA has been available for research use only (Gen-Probe, San Diego, CA, USA). The advantage of this approach is the presence of multiple copies of 16S rRNA molecules per cell, leading to a potentially increased sensitivity of detection in comparison with the sensitivities of PCR assays that target single-copy genes. This TMA assay has been shown to be a sensitive, specific, and high-throughput test for *M. genitalium* detection.

核酸扩增检测（NAAT）是诊断MG的唯一可行方法

利用16S rRNA为靶标的**RNA检测技术**，在**灵敏度上比PCR要高**，它是目前一种灵敏度、特异度均非常高的MG检测技术。



中国诊疗指南推荐 用SAT诊断生殖道病原体

中华皮肤科杂志 2014 年 5 月第 47 卷第 5 期 Chin J Dermatol, May 2014, Vol. 47, No. 5

● 中国 2014 版
365

• 《梅毒、淋病、生殖器疱疹、生殖道沙眼衣原体感染诊疗指南》
· 指南与共识

梅毒、淋病、生殖器疱疹、生殖道沙眼衣原体感染 诊疗指南(2014)

生殖道沙眼衣原体感染

生殖道沙眼衣原体感染(genital chlamydial infections)是常见的性传播疾病。沙眼衣原体引起的疾病范围广泛,可累及眼、生殖道、直肠等多个脏器,也可导致母婴传播。因而,沙眼衣原体感染的防治具有重要的公共卫生和临床意义。

一、诊断¹⁻³

1. 流行病学史:有不安全性行为,多性伴或性伴感染史。新生儿感染者的母亲有泌尿生殖道沙眼衣原体感染史。

2. 临床表现:(1)男性特有的表现:①尿道炎:潜伏期 1~3 周。表现为尿道不适、尿痛或有尿道分泌物。尿痛症状比较轻,有时仅表现为尿道的轻微刺痛和痒感,尿道分泌物为黏液性或黏液脓性,较稀薄,量较少;②附睾炎:如未治疗或治疗不当,少数患者可引起附睾炎。表现为单侧附睾肿大、疼痛、水肿、硬结,局部或全身发热,硬结多发生在附睾的曲细精管,可触及痛性的附睾硬结。有时睾丸也可累及,出现睾丸肿大、疼痛及触痛、阴囊水肿等;③前列腺炎:患者既往有衣

原体,吸烟、酗酒,既往有泌尿系统感染,既往有性传播疾病,日久可致瘢痕、微血管翳等;②新生儿肺炎:常在 3~16 周龄发生。表现为鼻塞、流涕,呼吸急促,特征性的(间隔时间短、断续性)咳嗽,常不发热。体检发现呼吸急促,可闻及湿啰音。

3. 实验室检查^{1-2,4-5}:①显微镜检查:涂片姬姆萨染色、碘染色或帕氏染色直接镜检可发现沙眼衣原体包涵体。只适用于新生儿眼结膜刮片的检查;②培养法:沙眼衣原体细胞培养阳性;③抗原检测:酶联免疫吸附试验、直接免疫荧光法或免疫层析试验检测沙眼衣原体抗原阳性;④抗体检测:新生儿衣原体肺炎中沙眼衣原体 IgM 抗体滴度升高,有诊断意义;⑤核酸检测:PCR、RNA 实时荧光核酸恒温扩增法(SAT)、转录介导核酸恒温扩增法(TMA)等检测沙眼衣原体核酸阳性。PCR 检测应在通过相关机构认证的实验室开展。

4. 诊断分类:①确诊病例:同时符合临床表现和实验室检查中的任一项者,有或无流行病学史;②无症状感染:符合实验室检查中的任一项(主要为培养法、抗原检测和核酸检测),且无临床症状者。

中山大学 孙逸仙纪念医院

梅毒、淋病、生殖器疱疹、生殖道沙眼衣原体感染诊疗指南。中国疾病预防控制中心、中华医学会皮肤性病学分会性病组。2014。



生殖道支原体感染诊治专家共识

生殖道支原体感染诊治专家共识

张岱^{1,2} 刘朝晖^{1,2△}

1 北京大学第一医院妇产科, 北京 100034

2 中国性学会性医学专业委员会生殖道感染学组, 北京 100034

【摘要】 生殖道支原体感染是临床关注的热点问题, 涉及多个学科。中国性学会性医学专业委员会生殖道感染学组组织多学科讨论, 对临床支原体相关问题形成了共识。泌尿生殖道支原体存在无症状携带, 以解脲支原体 (*U. urealyticum*, Uu) 为主, 解脲支原体可分为微小脲原体和解脲支原体两种亚型, 其中微小脲原体特别容易见于无症状携带。Uu 和生殖支原体 (*M. genitalium*, Mg) 是导致尿道炎的重要致病微生物, Mg 还是宫颈炎、盆腔炎的重要致病微生物。采用核酸分析的方法进行支原体检测更有利于支原体的诊治。如果男女双方均无泌尿生殖道感染的相关症状, 仅 Uu 阳性, 考虑为携带者, 不必治疗。男性为 Uu 性尿道炎, 建议同时治疗性伴。孕期下生殖道检出 Uu 的患者不需要进行干预和治疗。男性精液质量异常且有生育需求时, 男女双方建议同时治疗一疗程。男女双方生殖道 Uu 培养阳性对 IVF 无明显影响。

【关键词】 解脲支原体; 微小脲原体; 生殖支原体; 人型支原体

尿液检测:一般仅适用于 RNA 检测方法, 优点为无创、方便、敏感性和特异性高。可用于大规模人群筛查。目前新的核酸检测方法可以采用尿液检测, 减轻了男性患者采样的痛苦, 便于男性筛查。

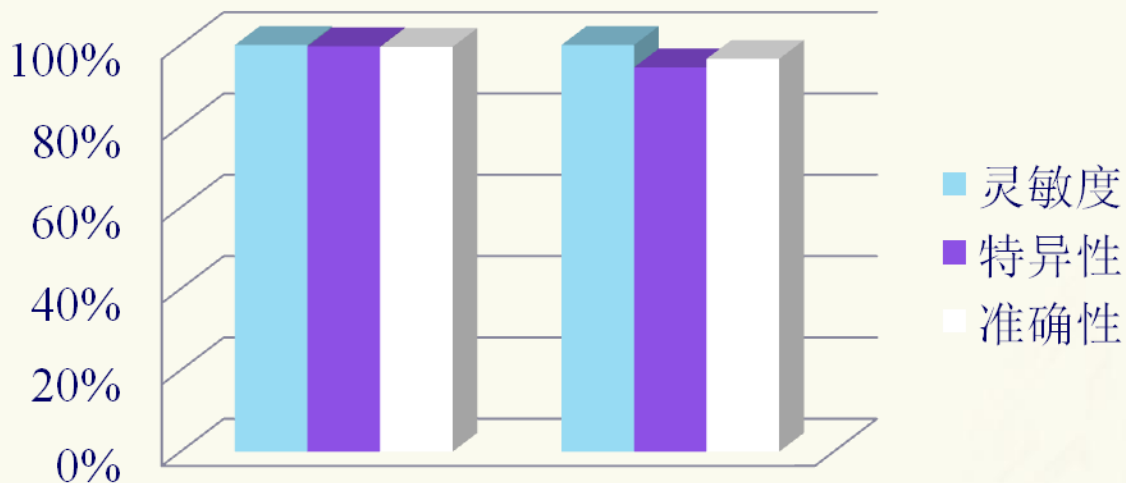
5.2 女性受检者检测样本

宫颈拭子与阴道拭子:是女性最常进行的检测手段, 可培养或核酸检测, 如前所述, 女性下生殖道内有很高的比例出现支原体定植, 因此需要审慎的评估感染风险, 确定是否需要治疗。以 Uu 为例, 如果不能进行 Up 和 Uu 的区分, 判断 Uu 导致的感染性疾病时则需要更加谨慎。

尿液检测:同样适用于 RNA 检测方法, 优点为无创、方便、敏感性和特异性高, 可用于大规模人群筛查。



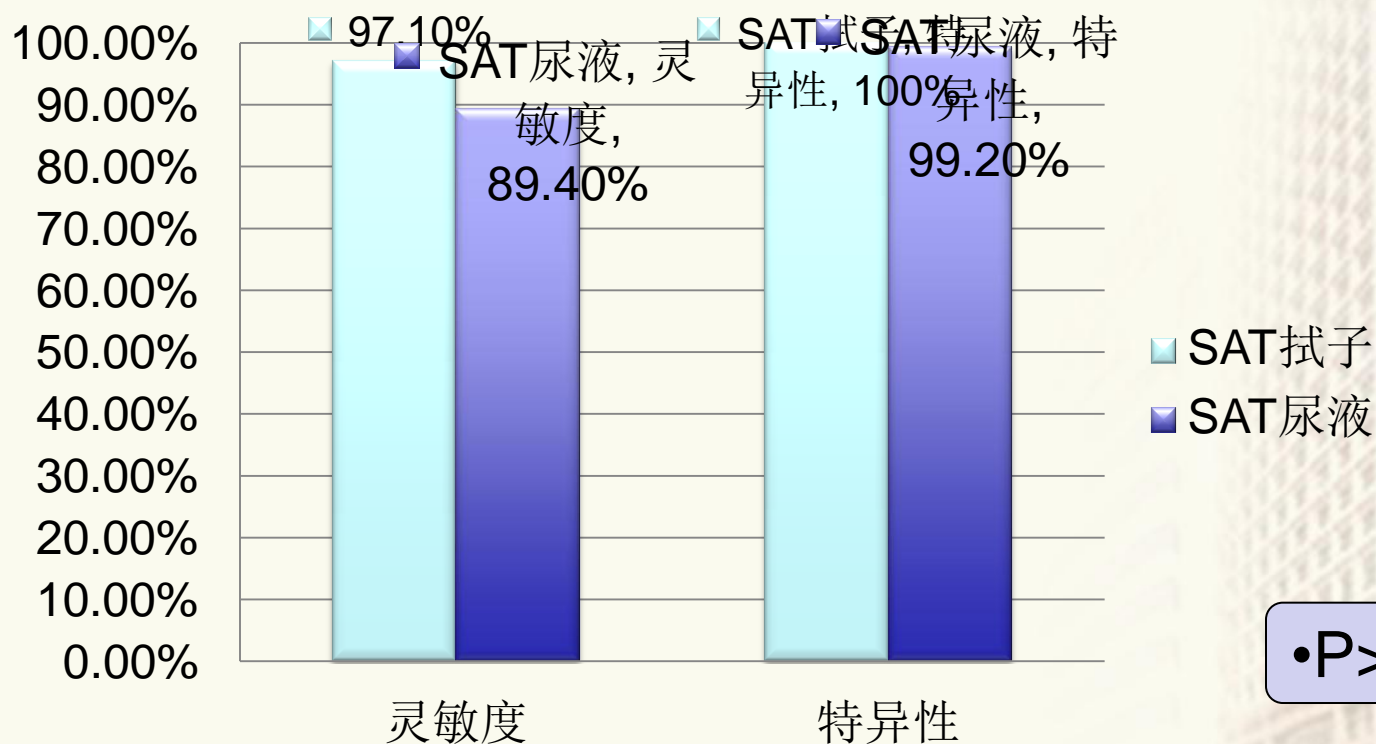
以培养为参照，SAT检测NG具有高灵敏度和特异性



	东莞市南方医科大学广济医院	中国医学科学院北京协和医学院皮肤病研究所
灵敏度	100%	100%
特异性	99.72%	94.5%
准确性	99.54%	96.6%



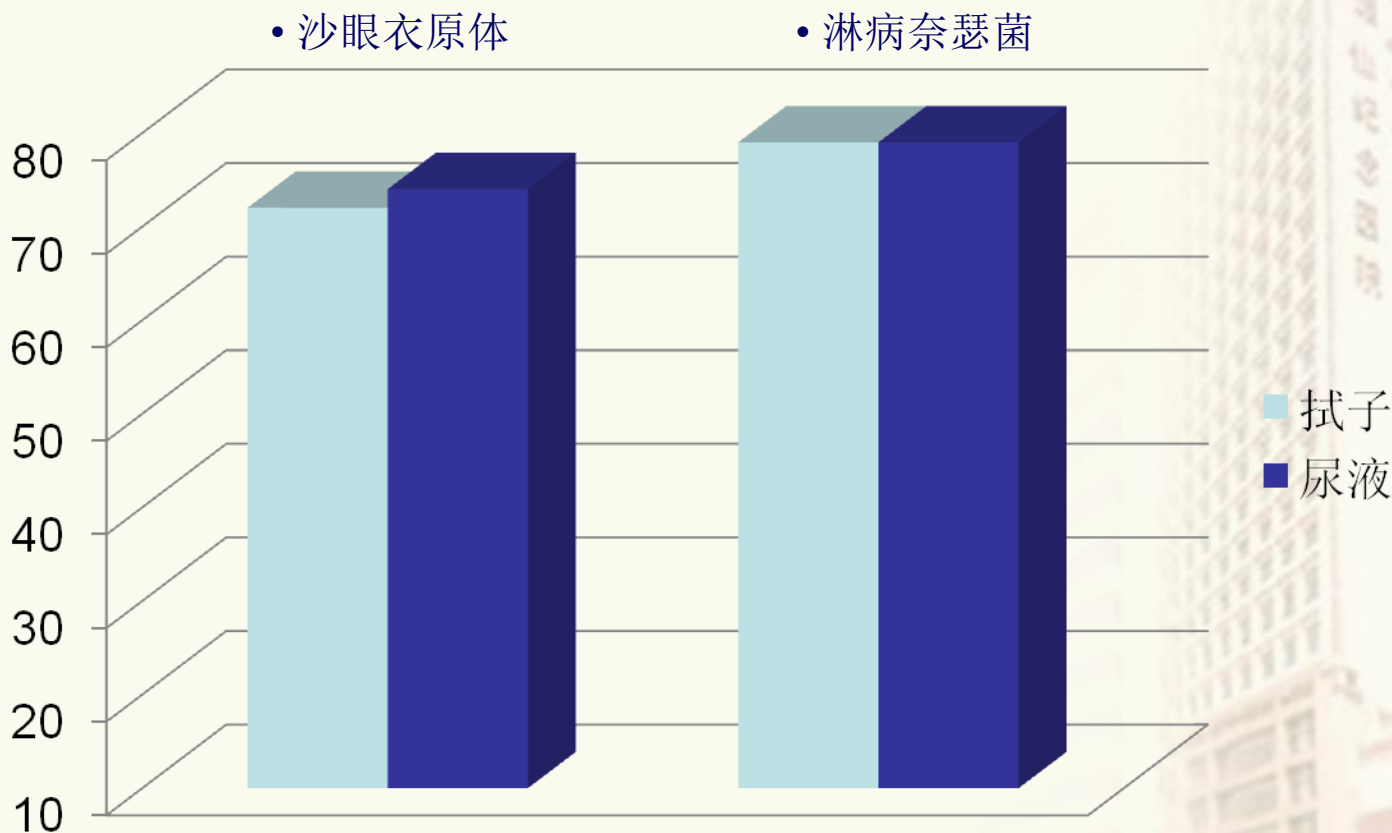
SAT检测CT，尿液与拭子样本灵敏度和特异性相当



• $P > 0.05$



临床结果显示SAT检测拭子和尿液标本阳性率基本一致



• 浙大医学院附属妇产科医院 • 金华中心医院
• 样本类型：宫颈拭子、尿液



北京协和医院：SAT检测CT,NG,UU

不同样本类型的阳性检出率[n(%)]

项目	n	尿液		宫颈拭子		尿道拭子	
		n	阳性率	n	阳性率	n	阳性率
CT	2196	1324	121 (9.14)	800	51 (6.38)	72	7 (9.72)
NG	1749	1080	50 (4.63)	617	12 (1.94)	52	6 (11.54)
UU	2317	1462	441 (30.16)	855	550 (64.33)	0	0 (0)

- UU在女性宫颈拭子检出率最高，未在男性中检出，提示UU在女性中的感染率较高，需关注其对生殖系统影响
- 男性尿道拭子主要检出为CT和NG
- 尿液检出CT和NG的阳性率高于女性宫颈拭子，但低于男性尿道拭子



SAT技术应用于MTB检测



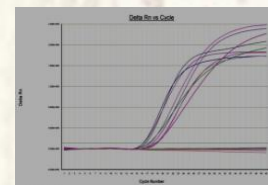
痰液预处理



超声破碎15min



恒温扩增检测



报告结果

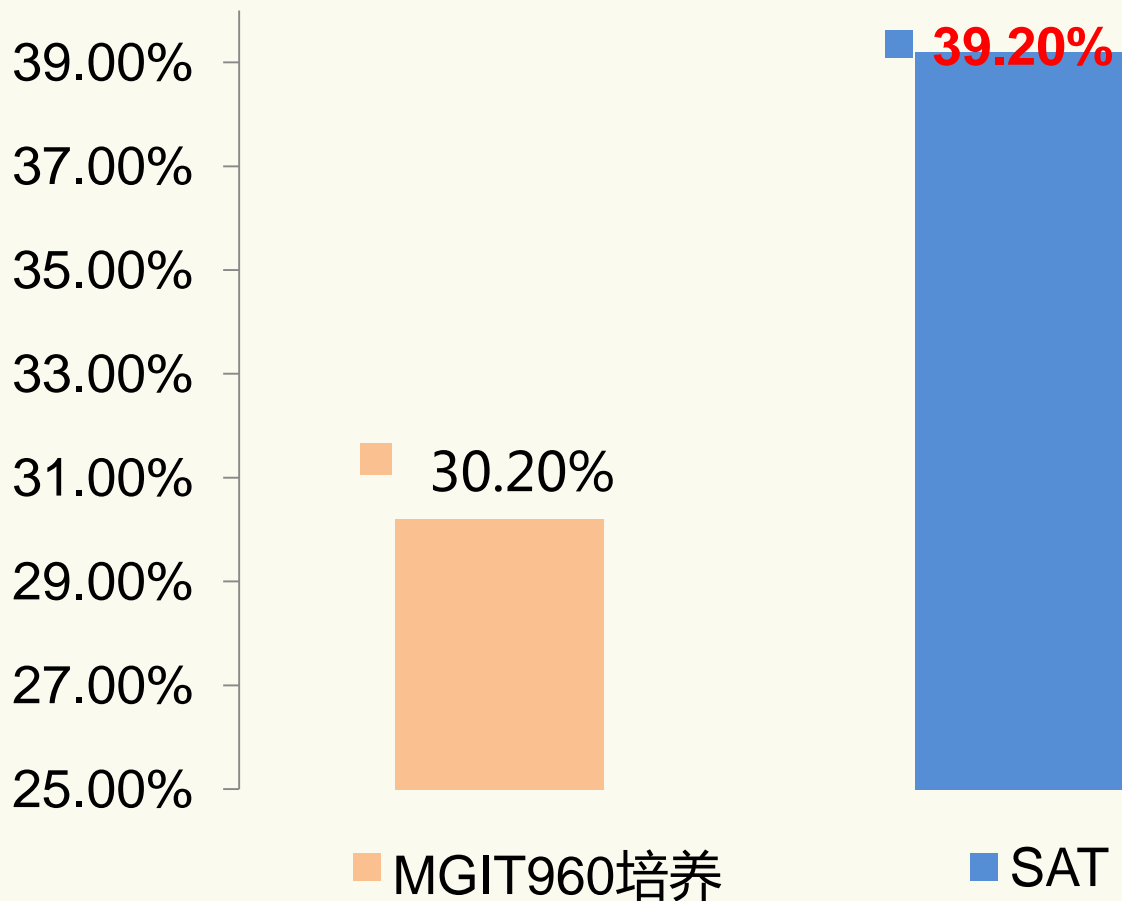
2个小时出实验报告

- ✓ RNA检测灵敏度高，可比涂片的检出准确率高近40%；
- ✓ 活菌检测，检测阳性即为开放性性结核，辅助临床判断用药效果
- ✓ 可区分NTM和MTB，不错检；
- ✓ 操作简单，报告快速



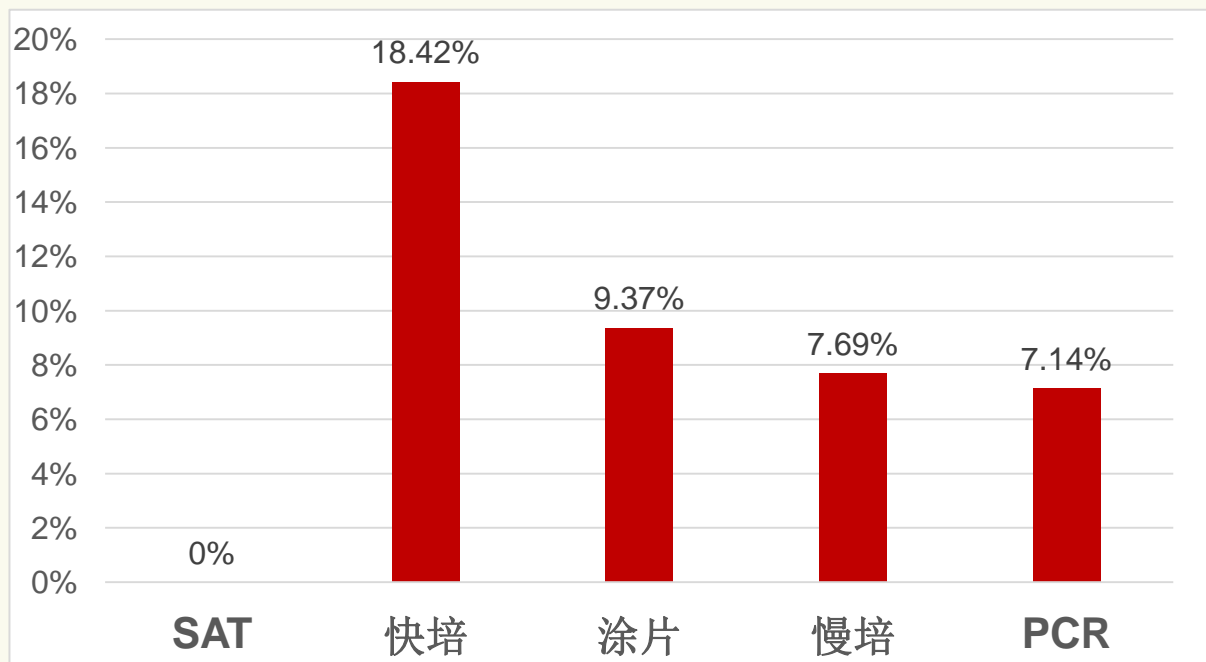
涂阴样本中阳性检出率比较

(以最终临床诊断结果为标准)





实验室常用方法NTM的误检率



•SAT是检测肺结核（结核分枝杆菌）的优秀方法

- 数据来源：上海肺科医院201310-201401常规检测数据统计
- 样本数量：总共125例患者同时进行了SAT/PCR/快培/慢培/涂片检测
- 金标准：快培（960）+菌种鉴定



RNA 恒温扩增法快速检测结核分枝杆菌 专家研讨会会议纪要

为了解上海仁度生物科技有限公司研发的“RNA 恒温扩增法快速检测结核分枝杆菌技术”对结核病检测的敏感性、特异性，评估该技术对国家结核病防治规划应用的可行性。2012 年 6 月 9 日，受上海仁度生物科技有限公司的委托，中国防痨协会组织邀请了部分传染病重大专项专家、中国疾病预防控制中心和中国防痨协会专家等，召开了“RNA 恒温扩增法快速检测结核分枝杆菌技术”专家研讨会”。

专家对该技术的优势、创新点和适应性给予了高度的肯定。会议建议进一步由国家级组织大样本、多中心的实用性验证，并进行成本-效益的研究，以获得更加科学、有权威性数据。为早期推广应用到国家结核病防治策略中提供科学依据。

附件：RNA 恒温扩增法快速检测结核分枝杆菌专家研讨会
参会人员名单

**中国防痨协会专家研讨会共识：RNA 恒温扩增法（SAT）敏感性
好，特异性高，操作简便，可区分死菌活菌。**

会上系统介绍了“RNA 恒温扩增法快速检测结核分枝杆菌技术”的工作原理、临床检测结果以及该技术的创新性和实用性等特点。

与会专家一致认为：“RNA 恒温扩增法快速检测结核分枝杆菌技术”是一种自主创新的新型的分子生物学检测技术，该技术敏感性好、特异性高、操作简便，在实验室污染控制方面与各项 DNA 分子诊断技术相比，有其独特的优势；与目前使用的传统的痰涂片抗酸染色检查方法、传统的改良罗氏培养法及液体培养法比较，能显著提高结核分枝杆菌的阳性检出率，对早期发现传染性肺结核患者，控制结核病传染源有极其重要的意义；同时，该方法可以区分死菌与活菌，对治疗过程中的疗效检测评价具有重要的作用，适合于不同结核病防治机构和医疗机构开展结核病筛查和诊断、评价治疗效果使用。与会





SAT技术应用于MP检测

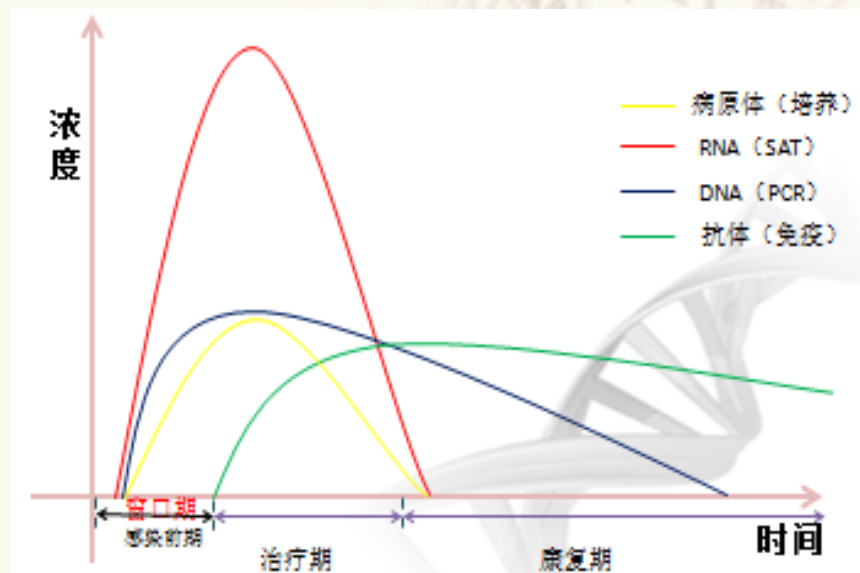
- IgM检测疾病早期阳性率低，且与其他支原体属有一定交叉反应；只能判断是否有
- 感染过MP，但不能得知患病状态；而PCR检测容易过高估计MP感染的发病率。

➤ RNA可提高早期诊断阳性率：

- 检测灵敏度高，不受患者年龄、免疫力或疾病严重程度影响，可合理指导用药。

➤ RNA检测可评估用药疗效，避免抗生素滥用或患者过度治疗：

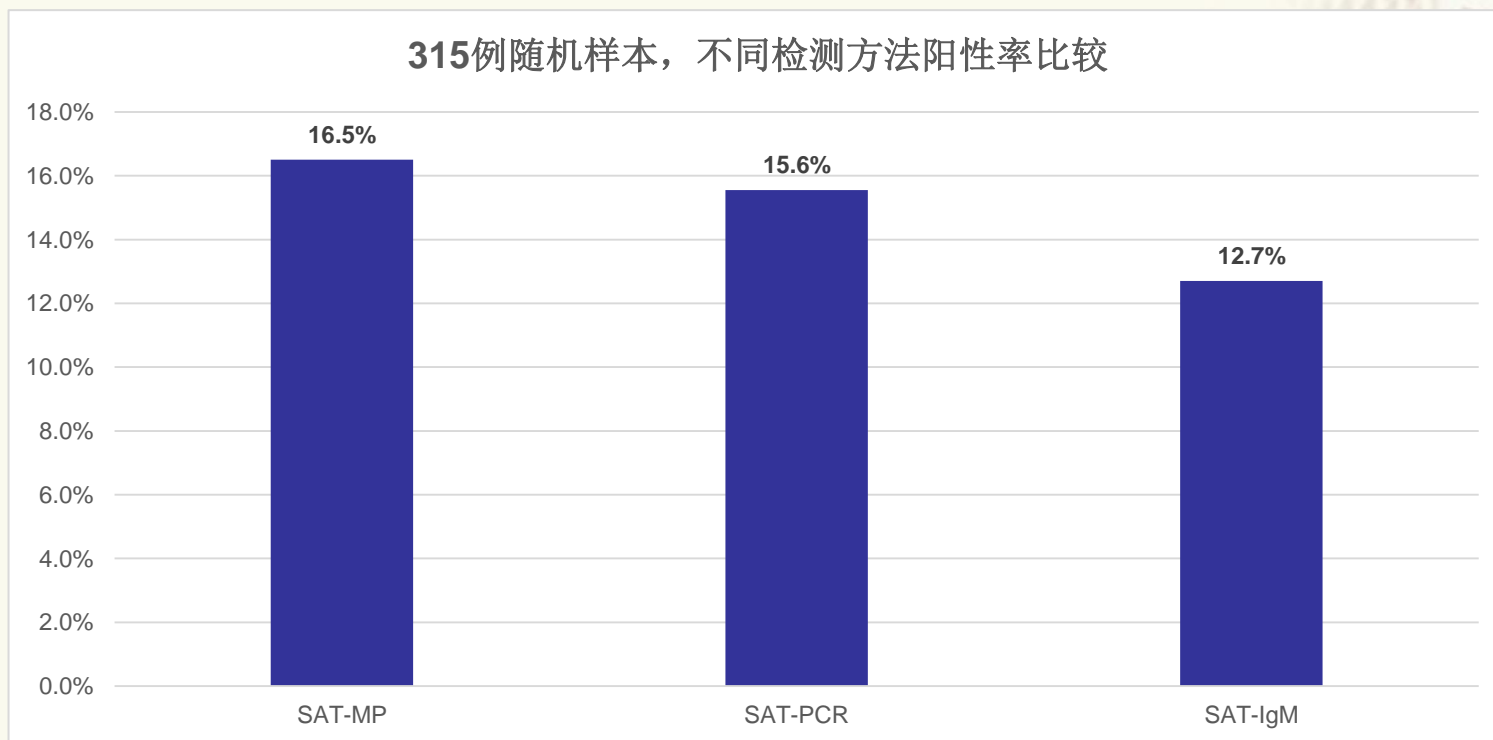
病原体死亡，RNA很快降解。





MP-SAT检测灵敏度较高

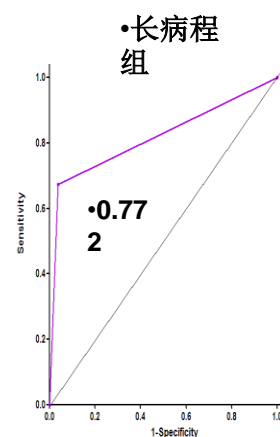
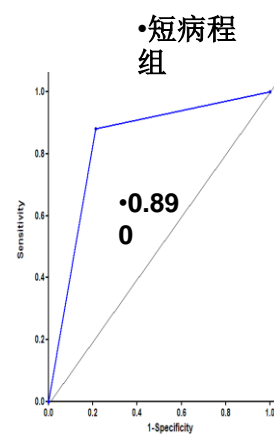
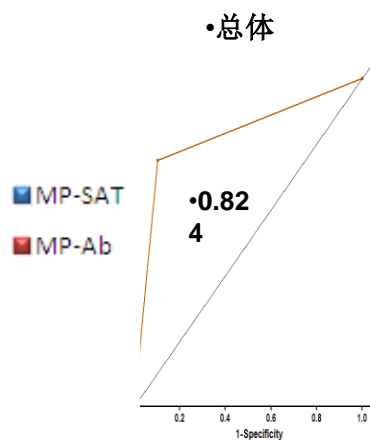
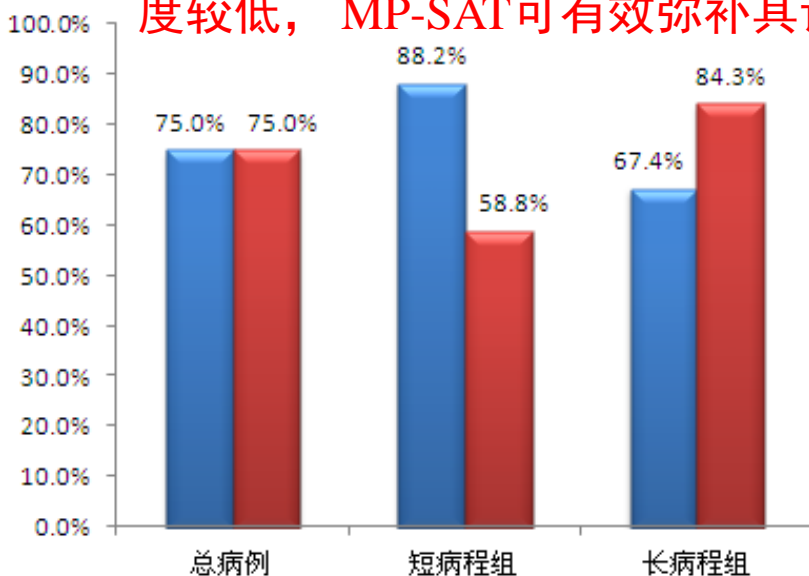
➤ 浙江省儿童医院正常开展的样本中，对315例样本用MP-SAT、MP-PCR和MP-IgM三种检测方法进行检测，结果显示，MP-SAT阳性率最高。





MP-SAT在感染早期阳性检出率更高

- 在MPP感染患者中，MP-SAT和MP-Ab入院时的阳性率相同；在短病程组中MP-SAT的阳性率显著高于MP-Ab，而在长病程组中，MP-SAT的阳性率低于MP-Ab；
- 提示MP-SAT在早期诊断中具有很好的应用价值，而MP-Ab在疾病的早期抗体滴度较低，MP-SAT可有效弥补其诊断的“窗口期”。



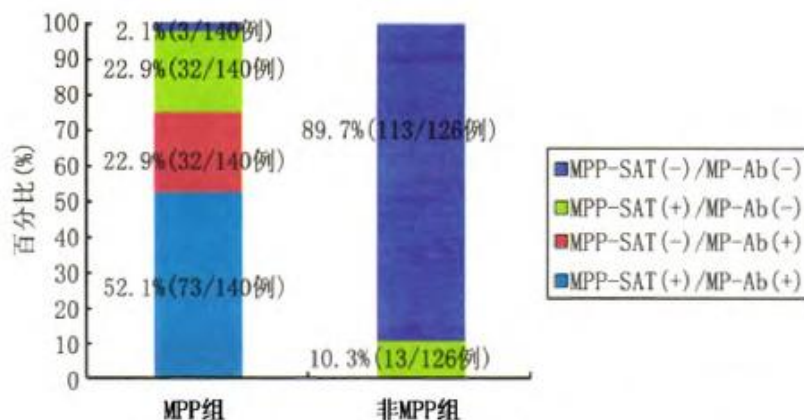


MP-SAT在感染早期阳性检出率更高

➤ MP-SAT与MP-Ab检测有45.8%不一致。其中：

- 22.9%患儿SAT (+) Ab (-)，其中62.5%患儿病程 ≤ 7 天，71.9%的患儿有大环内酯类药物治疗史；
- 22.9%患儿SAT (-) Ab (+)，其中84.4%的患儿病程 > 7 天，96.9%患儿有大环内酯类药物治疗史。

➤ 32例患儿入院时SAT (+) Ab (-)，分别在入院9~19天，其MP-Ab都有四倍以上提高。

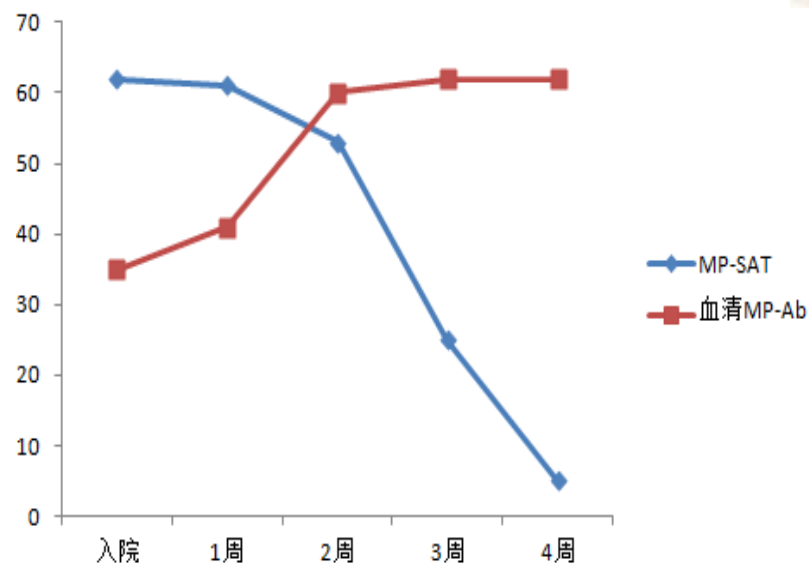
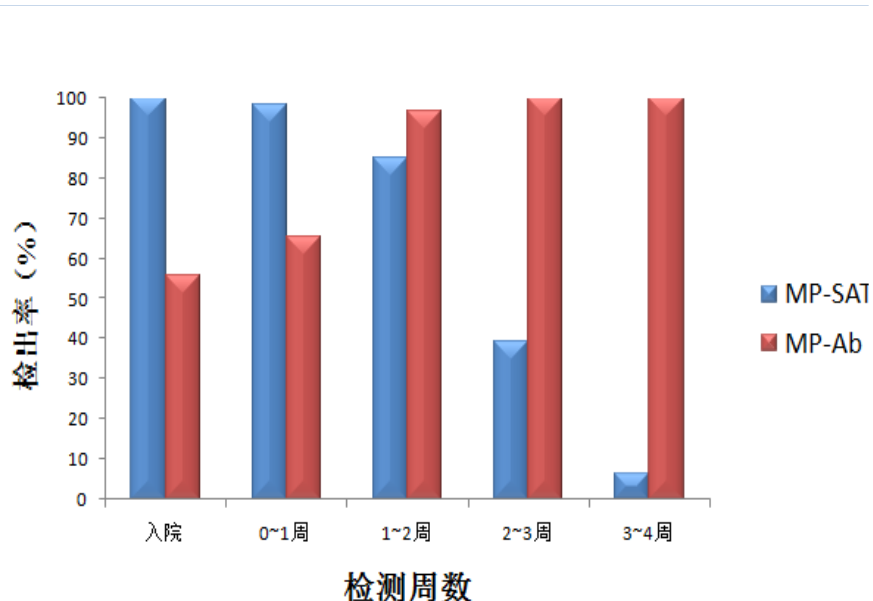


注：MP-SAT:肺炎支原体-RNA 恒温扩增检测；MP-Ab:肺炎支原体抗体；MPP:肺炎支原体肺炎 MP - SAT: Mycoplasma pneumonia - RNA si-



•MP-SAT可以辅助评估用药疗效

- 在MP感染患病不同时期，随着用药疗程进展，MP-SAT阳性率逐渐降低。MP-SAT阳性患者在第2周开始部分转阴，在第4周大部分患者都是阴性。。
- **结论：MP-SAT在肺炎支原体肺炎后期可辅助评估治疗疗效，为疾病分期提供有效参考。**

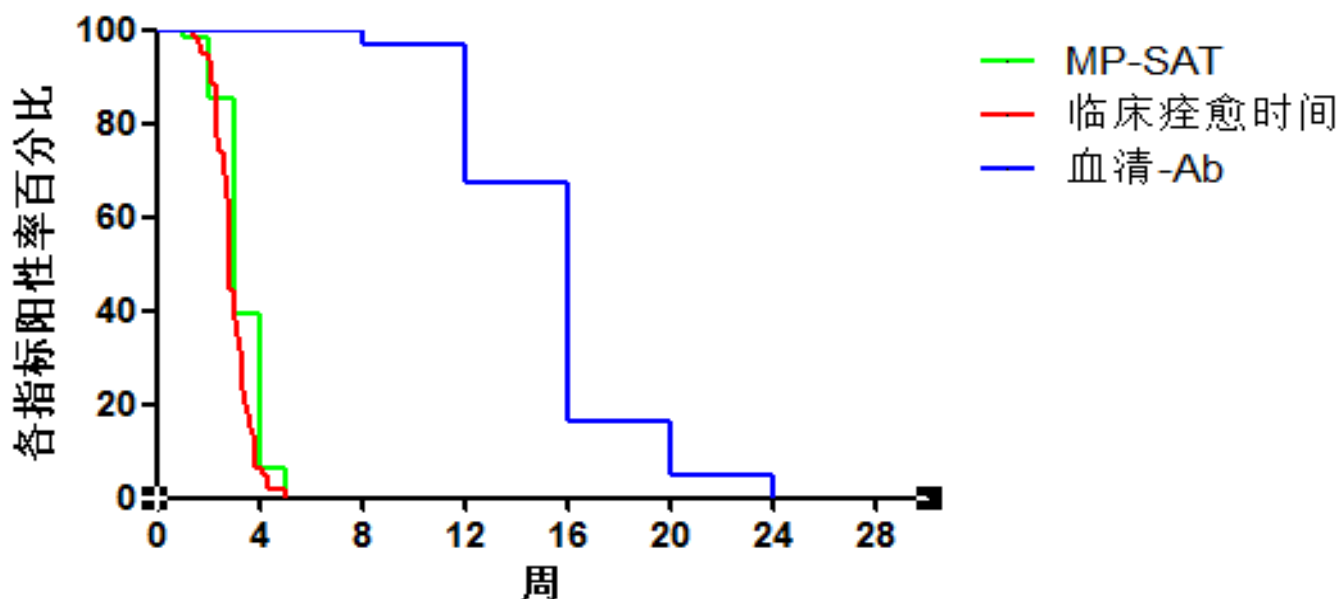


患儿不同病程MP-SAT、血清MP-IgM的检出率的比较



MP-SAT与临床痊愈时间符合度较高

- 血清MP-Ab转阴时间远远超过临床痊愈和MP-SAT转阴时间；
- 提示MP-SAT可间接反映MPPI临床痊愈情况，可对临床用药疗效进行评估。



MP-SAT、临床痊愈情况、血清MP-Ab随时间变化的结果分析



•MP-SAT与疾病严重程度有相关性

- 发现MP-SAT转阴时间与患儿发热持续时间、入院时中性粒细胞百分比、CRP值以及LDH值正相关；与入院时淋巴细胞百分比成反相关；
- 入院时存在肺实变的患者MP-SAT转阴时间较长。

不同组别的患儿的临床症状、影像学结果及实验室检查的比较

项目	MP-SAT转阴时间 (n)					P
	1周 (n=1)	2周 (n=8)	3周 (n=28)	4周 (n=20)	4周以后 (n=4)	
发热天数 (d)	1	2(0-3)	3.5(3-4)	6(5-6)	6.5(5.3-7)	P<0.01
大片肺实变[n(%)]	0 (0%)	0 (0%)	2(7.1%)	5(25%)	4(100%)	P<0.01
外周血白细胞($\times 10^9/L$)	6.7	7.5(6.0-10.6)	9.5(7.4-10.8)	9.1(7.8-11.7)	8.1(6.2-9.7)	p>0.05
淋巴细胞(%)	36.3	36.0(28.2-41.8)	30.0(26.7-36.4)	28.7(22.9-33.2)	14.8(8.4-25.5)	P<0.05
中性粒细胞(%)	53.3	55.2(52.3-60.7)	59.1(53.1-65.6)	66.4(57.8-71.4)	82.6(63.5-89.0)	P<0.05
CRP (mg/L)	2	9.5(8.3-13.8)	12(5.3-17.0)	15.5(10-24.8)	28.5(11.3-48.0)	P<0.01
LDH(IU/L)	156	213(146-250)	232(201-299)	243(183-291)	302(271-384)	P<0.05

儿童肺炎支原体肺炎诊治专家共识(2015 年版)

中华医学会儿科学分会呼吸学组 《中华实用儿科临床杂志》编辑委员会

【摘要】 肺炎支原体肺炎(MPP)占儿童社区获得性肺炎的 10%~40%,是儿科医师广泛关注的临床问题。近年来,儿童 MPP 呈现不少新的特点,其诊断和治疗问题需要规范。为此,中华医学会儿科学分会呼吸学组和《中华实用儿科临床杂志》编辑委员会制定了《儿童肺炎支原体肺炎诊治专家共识》。共识简要介绍了肺炎支原体(MP)病原学、MP 感染的发病机制和流行病学,重点介绍了儿童 MPP 的临床表现、影像学改变和实验室诊断,介绍了抗菌药物、糖皮质激素、丙种球蛋白等药物在儿童 MPP 中的治疗作用和方案。

【关键词】 肺炎;肺炎支原体;共识;诊断;治疗;儿童

MP-IgM 抗体尽管是感染以后出现的早期抗体,但一般感染后 4~5 d 才出现,持续 1~3 个月甚至更长,婴幼儿由于免疫功能不完善、产生抗体的能力较低,可能出现假阴性或低滴度的抗体,因此评价结果时需要结合患儿的病程及年龄综合考虑。此外还要注意目前市场

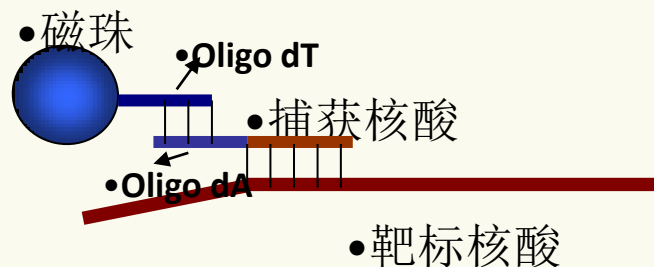
满足基层和现场调查的需要,SAT 能反映 MP 在人体内的生存情况,为疾病分期提供参考。核酸扩增诊断技术不受年龄、产生抗体的能力、病程早晚及用药等因素的影响,在 MP 感染早期的检出率最高,但要与 MP 感染后的携带状态区别,有研究显示,MP 感染后 1 个月时其 DNA 的检出率仍然高达 50%,MP-DNA 持续携带的中位数时间为 7 周,个别长达 7 个月之久^[33]。

研究显示核酸和血清学 2 种方法的联合检测可以提高检出率^[34],因此,建议有条件的单位开展联合检测。



SAT技术应用于手足口病检测

•特异性靶标捕获磁珠法提取:



◆ 特点： 特有的杂交+磁珠

◆ 彻底去除反应抑制剂

•RNA实时荧光恒温法扩增检测:

• 用EV71-SAT检测：

解脲脲原体、屎肠球菌、沙眼衣原体、流感病毒、柯萨奇病毒A16型、人巨细胞病毒、EB病毒、埃克病毒、副流感病毒、博卡病毒、轮状病毒、柯萨奇 B 型病毒、阴性对照。

EV71-SAT 与上述12种病原体RNA均无交叉反应。

•**EV-71-SAT 检测下限为10拷贝 / 反应，优于荧光探针法数10倍。**



手足口病SAT法检测数据

➤ EV71-SAT 检测与PCR对比结果

		PCR		合计
		阳性	阴性	
SAT-EV71	阳性	394	35	429
	阴性	0	631	631
合计		394	666	1060

- 差异样本经测序鉴定显示：有**32例为EV71**
- 感染与SAT检测结果相一致**，3例测序失败。
- 准确度为99.7%。

•【1】Qian Chen, Zheng Hu, Qihua Zhang, Minghui Yu.2014. Development and evaluation of a real-time method of simultaneous amplification and testing of enterovirus 71 incorporating a RNA internal control system . *Journal of Virological Methods*.196 , 139-144。

•【2】Jin Xu, A new accurate assay for Coxsackievirus A 16 by fluorescence detection of isothermal RNA amplification, *Journal of Virological Methods* 193(2013) 459-462

➤ CA16-SAT 检测与PCR对比结果

		PCR		合计
		阳性	阴性	
SAT-CA16	阳性	82	5	87
	阴性	0	117	117
合计		82	122	204

- 对5例差异样本测序验证，发现其中**4例**
- 检测结果与SAT一致，为肠道病毒感染。**
- 1例测序失败。



SAT检测—MagX全自动化实验方案

- ◆ 样本---提取纯化RNA--- 酶反应混合液（一体化）
- ◆ 可同时处理4个项目
- ◆ 48个样本/2 小时
- ◆ 可处理尿液、咽拭子、拭子、粪便
全血、血清等样本
- ◆ 武装到牙齿的防污染措施



（ MagX ）



中山大學 孙逸仙纪念医院

SUN YAT-SEN MEMORIAL HOSPITAL, SUN YAT-SEN UNIVERSITY

Thank you!

博愛 崇德 求精 奮進