

自动化一站式呼吸道病原核酸检测平台 在县域医院本地化应用的探索

江文洪^{1*} 周华² 徐林燕¹ 张玲¹ 林雪梅¹ 王伟华¹

1. 江山市人民医院 浙江江山 324100

2. 浙江大学医学院附属第二医院 浙江杭州 310000

摘要: 目的 探讨自动化呼吸道病原核酸检测平台 (iChip-400) 在县域医院对社区获得性肺炎 (CAP) 病原学诊断的应用价值。方法 选取 2023 年 7 月至 2024 年 1 月临床诊断为 CAP 的住院患者 72 例, 采集肺泡灌洗液 (44 例) 和痰液 (28 例) 标本。所有标本采用 iChip-400 检测, BALF 标本同时进行靶向测序 (tNGS) 检测, 并行常规涂片和培养。以临床综合诊断为 "金标准", 比较各方法的病原体检出率、检测效能及检测时间。结果 iChip-400 检测时间显著短于 tNGS 和培养, 在两类样本中均表现出较好的诊断优势。对肺炎支原体和肺炎链球菌具有高灵敏度和阳性预测值。结论 iChip-400 平台快速、自动化、操作简便, 对常见 CAP 病原体检测灵敏度高, 适用于县域医院, 有助于实现早期病原诊断和抗菌药物合理应用。

关键词: 自动化核酸检测; 病原体; iChip-400 检测平台; 社区获得性肺炎; 县域医院

背景

肺部感染因发病年龄跨度大、进展迅速、病情危重、并发症众多等因素常年占据感染性疾病死亡率之首^[1]。在美国, 成人社区获得性肺炎每年的门急诊就诊人数超 450 万, 约占总人口的 0.4%, 其中 65-79 周岁年龄组的发病率达 63.0/10000 人, 80 周岁以上的年龄组则高达 164.3/10000 人^[2]。肺部感染因其高发病率和高病死率, 早期快速识别病原体并精准选用抗菌药物至关重要, 尤其对危重症患者具有决定性意义^[3-4]。然而, 病原种类多样、传统培养技术局限、耐药菌蔓延及新诊断技术成本较高等因素, 使病原诊断和精准治疗面临挑战^[5-7]。基层医院常因实验室条件有限及送检流程不完善, 导致诊断依据不足, 影响治疗效果并加剧抗生素耐药^[8]。本研究评价 iChip-400 自动化平台在县域医院 CAP 病原诊断中的应用效能, 以期提升基层病原检测能力、促进抗菌药物合理使用提供依据。

iChip-400 恒温核酸扩增分析仪 (百康芯 (天津) 生物科技有限公司) 是一台小型、全自动的多重 PCR 装置, 可在 1.5 小时内完成对 1-32 种常见致病菌及耐药分型的全自动快速并行检测。本研究配套平台能够检测 7 种常见呼吸道细菌, 包括流感嗜血杆菌、卡他莫拉菌、肺炎链球菌、嗜肺军团菌、肺炎支原体、肺炎衣原体和结核分枝杆菌。检测在封闭体系下完成, 样本处理时间为 15-30 分钟, 通常 50 分钟后自动

出结果。

1 方法

1.1 一般资料

选取 2023 年 7 月至 2024 年 1 月期间, 江山市人民医院临床诊断为社区获得性肺炎的住院患者, 纳入标准包括: 1) 临床符合社区获得性肺炎诊断; 2) 病原学尚不明确, 且明确病原体对临床治疗有指导价值; 3) 临床医生判断可获得合格的肺泡灌洗液/支气管抽吸物/痰液进行病原学诊断; 4) 患者知情并签署知情同意书。排除标准包括: 1) 孕妇及哺乳期妇女; 2) 合并其他部位感染, 如心内膜炎、中枢神经系统感染、尿路感染等; 3) 未能获得患者知情同意。最终纳入 72 例患者, 其中包括 28 个痰液和 44 个肺泡灌洗液样本。所有样品采集后立即送往检验。本研究遵循《赫尔辛基宣言》(2013 年修订), 并获得我院医学伦理委员会的批准 (伦理批准号: KY-2022-41), 所有患者均签署书面知情同意。

1.2 样品检测方法

在本研究中, 44 个肺泡灌洗液样本分别进行了常规病原学检测 (涂片、培养)、iChip-400 平台检测以及 tNGS 检测; 28 例痰液样本分别进行了常规病原学检测 (涂片、培养) 以及 iChip-400 检测。研究记录了检测所需时间及检测结果。

靶向病原体高通量测序 (tNGS) 技术是利用多重 PCR 扩增对临床关注的多种病原体进行富集, 结合高通量测序和

生信分析,对捕获的病原体进行种属鉴定,以获得疑似致病微生物的信息。每位入组患者的最终临床诊断作为判断检测方法敏感性、特异性等指标的金标准。最终临床诊断在每位入组患者出院时由所在科室 2 位呼吸病学医生讨论后明确,如讨论意见不统一,提请本研究小组组织 3 位专家开会讨论决定。诊断参考患者的临床特点、传统病原学检测结果、iChip-400 检测结果、tNGS 检测结果、治疗效果及患者预后等作出综合判断。

1.3 统计学处理

统计分析使用 R (cloud.r-project.org/)。使用秩和检验、t 检验以及卡方检验对不同检测方式所需时间进行统计分析。以临床诊断作为参考标准,对每个 PCR 目标的灵敏度、特异度、阳性预测值 (PPV) 和阴性预测值 (NPV) 进行了分析。

2 结果

2.1 iChip-400 平台和 tNGS 的病原检测结果比较 (44 例样本)

对比使用 iChip-400 平台和 tNGS 检测的 44 例样本, tNGS 检测出的病原体包括肺炎支原体、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、鹦鹉热衣原体、人偏肺病毒和卡他莫拉菌,其中 7 例未检测出病原体。iChip-400 平台检测出的病原体包括肺炎支原体、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌和卡他莫拉菌,其中 21 例样本检测结果阴性。

tNGS 检测出的病原体包括肺炎支原体 (16 例)、鹦鹉热衣原体 (12 例)、混合感染 (4 例)、流感嗜血杆菌 (2 例)、肺炎链球菌 (2 例) 和人偏肺病毒 (1 例)。iChip-400 平台检测出的病原体包括肺炎支原体 (13 例)、流感嗜血杆菌 (4 例)、卡他莫拉菌 (3 例)、肺炎链球菌 (2 例) 和混合感染 (1 例)。然而, iChip-400 平台未覆盖鹦鹉热衣原体检测靶标。

表 1 iChip-400 平台和 tNGS 样本符合“金标准”检测结果分布

	iChip-400 (n=16)	tNGS (n=37)	金标准 (n=37)
肺炎支原体	12	16	15
肺炎链球菌	2	2	2
流感嗜血杆菌	1	2	2
鹦鹉热衣原体	0	12	12
人偏肺病毒	0	1	1
卡他莫拉菌	0	0	0
混合感染	1	4	5
未检出	28	7	7

以高年资临床医生结合临床及各项病原检测结果的综合判断作为病原学依据, tNGS 检测识别病原体的灵敏度为 97.3%, 特异度为 87.5%, 阳性预测值为 97.3%, 阴性预测值为 87.5%。iChip-400 平台检测识别病原体的灵敏度为 43.2%, 特异度为 50%, 阳性预测值为 69.6%, 阴性预测值为 25%。在检测肺炎支原体和肺炎链球菌方面, iChip-400 的灵敏度分别为 80.0% 和 100%, 特异度分别为 87.5% 和 100%, 阳性预测值均高于 80% (分别为 92.3% 和 100%)。然而, iChip-400 平台检测流感嗜血杆菌的灵敏度仅为 50%, 阳性预测值为 25%。

表 2 iChip-400 平台在 44 例肺泡灌洗液的检测效力

病原体	灵敏度	特异度	阳性预测值 PPV	阴性预测值 NPV
肺炎支原体	80.0	87.5	92.3	70.0
肺炎链球菌	100	100	100	100
流感嗜血杆菌	50.0	75.0	25.0	87.5

2.2 iChip-400 平台和培养的病原检测结果比较 (72 例样本)

对比使用 iChip-400 平台和痰培养检测的 72 例样本, 其中包含 44 例肺泡灌洗液以及 28 例痰液样本。总体上, iChip-400 平台检测病原体主要有肺炎支原体 (16)、流感嗜血杆菌 (15 例)、肺炎链球菌 (6 例)、卡他莫拉菌 (3 例) 和混合感染 (4 例), 28 例样本未检测出病原体。而痰培养结果中仅检测出 1 例, 病原体为肺炎链球菌。

表 3 iChip-400 平台和培养样本符合“金标准”检测结果分布

	iChip-400 (n=36)	痰培养 (n=1)	金标准 (n=57)
肺炎支原体	15	0	18
肺炎链球菌	6	1	6
流感嗜血杆菌	11	0	12
鹦鹉热衣原体	0	0	12
人偏肺病毒	0	0	1
卡他莫拉菌	0	0	0
混合感染	4	0	8
未检出	36	71	15

总体样本分析结果显示, 培养识别病原体的灵敏度为 1.7%, 特异度为 100%, 阳性预测值为 100%, 阴性预测值为 21.1%。iChip-400 平台检测识别病原体的灵敏度为 63.2%, 特异度为 68.2%, 阳性预测值为 83.7%, 阴性预测值 41.7%。在检测肺炎支原体和肺炎链球菌方面,

iChip-400 的灵敏度分别为 83.3% 和 100%，特异度分别为 93.8% 和 100%。iChip-400 平台检测流感嗜血杆菌的灵敏度为 91.7%，特异度为 78.9%。

表 4 iChip-400 平台在总体样本中的检测效力

病原体	灵敏度	特异度	阳性预测值 PPV	阴性预测值 NPV
肺炎支原体	83.3	93.8	93.8	83.3
肺炎链球菌	100	100	100	100
流感嗜血杆菌	91.7	78.9	91.7	93.8

2.3 三种检测方法的结果回报时间比较

经统计分析结果显示，在总体样本中，iChip-400 平台检测的中位时间为 4 小时，tNGS 检测的中位时间为 47.06 小时，痰培养的中位时间为 70.23 小时。三种检测方式所需时间差异分析均有统计学意义（ $p < 0.05$ ）。

3 讨论

近年来，多重 PCR 已成为一种检测呼吸道病原体的简单、快速和高度敏感的方法 [9,10]。痰培养通常至少需要 70 多个小时，tNGS 结果报告通常需要数个工作日，并且，常规病原微生物检测方式往往需要更高的样本质量 [11]。相比之下，虽然实时荧光检测（RT-PCR）灵敏度高，单次检测可在 4 小时左右完成，但其对标本数量有一定要求，且对实验室环境以及操作者要求高，需要严格的实验分区以及繁琐的人工实验操作，容易出现假阳性或假阴性结果 [12,13]。这些因素均限制了 PCR 技术在基层医院的推广。本研究通过与传统培养、tNGS 等方法对比，证实了 iChip-400 自动化核酸检测平台在县域医院 CAP 病原诊断中具有快速、高效的显著优势。

在本研究中，无论是在支气管肺泡灌洗液样本或是痰液样本中，iChip-400 检测平台相较于常规痰培养均表现出较强的诊断优势（63.2% vs 1.7%）。常规痰培养诊断效率低下的原因可能在于疾病需要显著进展后，常规病原体检测手段才能检测到相关病原体。iChip-400 平台检测标本所需中位时间为 4 小时，远短于 tNGS 检测和痰培养所需时间。这些优势使得 iChip-400 检测平台不仅具有便携性，而且为其在基层医院代替其他标准检测方案奠定了坚实基础。

本研究中，社区获得性肺炎病例的病原微生物学分析显示，肺炎支原体、流感嗜血杆菌、鹦鹉热衣原体、肺炎链球菌是主要的病原体，基本与既往统计结果相似 [14]。针对 44 例肺泡灌洗液样本，鹦鹉热衣原体并非 iChip-400 检测平

台检测范围内的病原体，其诊断主要依据病史和 tNGS 检测。在本研究数据中，鹦鹉热衣原体位居呼吸道病原体前三，存在一定的地域性 [15]，可能与当地禽类接触史密切相关。除鹦鹉热衣原体外，其他三类病原体的阳性率，iChip-400 检测平台近乎与 tNGS 检测结果相当，且用时更短。对于 28 例痰液样本，iChip-400 检测平台检出阳性率媲美 tNGS 在肺泡灌洗液样本中的表现。这些证据表明，无论在肺泡灌洗液或痰液标本中，iChip-400 检测平台均可作为呼吸道病原体检测的首选方式，尤其是在无法获得其他精确检测手段的基层医院。这将进一步提高基层医院对于社区获得性肺炎病原体的检出速度及效率，对指导早期精准治疗、减少抗生素滥用、降低人力成本和缓解患者经济压力有重大意义 [16]。对于少数复杂且无法经快速检测明确的病例，可以考虑进一步采用 tNGS 检测 [17]。此外，iChip-400 检测平台的高灵敏度和快速检测能力使其在流行病学监测和传染病防控中也具有潜在的应用价值。

然而，这项研究也存在局限性。样本量相对较小，可能影响结果的普遍性和可靠性。未来的研究应扩大样本量，增加不同地区和人群的多样性。虽然 iChip-400 检测平台覆盖了多种常见病原体，但仍有部分病原体未能检测。未来的研究可以考虑扩大检测范围，包括更多罕见和新出现的病原体。

4 结论

综上所述，本研究分析了 iChip-400 多重 PCR 平台在检测 7 种呼吸道病原体方面的高灵敏度和快速周转优势。该平台能够快速识别传染性病原体，为其在基层医院的推广使用奠定了基础。未来的研究应进一步验证其在不同临床场景中的应用效果，特别是在基层医院中的应用，并探索其在公共卫生领域的潜在价值。

参考文献：

- [1]Lapa, S.A., et al., Development of Multiplex RT-PCR with Immobilized Primers for Identification of Infectious Human Pneumonia Pathogens. *Mol Biol*, 2021. 55(6): p. 828-838.
- [2].Abelenda-Alonso, G., et al., Impact of comprehensive molecular testing to reduce antibiotic use in community-acquired pneumonia (RADICAP): a randomised, controlled, phase IV clinical trial protocol. *BMJ Open*, 2020. 10(8): p. e038957.
- [3]Kerneis, S., et al., Molecular diagnostic methods for

pneumonia: how can they be applied in practice? *Curr Opin Infect Dis*, 2021. 34(2): p. 118–125.

[4]Shrestha, A., A. Georgiou, and N. Wabe, Timeliness of Microbiology Test Result Reporting and Association with Outcomes of Adults Hospitalised with Unspecified Pneumonia: A Data Linkage Study. *Int J Clin Pract*, 2022. 2022: p. 9406499.

[5] 吕晶南, 余方友. 分子生物学技术在感染性疾病诊断中的应用进展 [J]. *临床检验杂志*, 2021,39(02):81–85.

[6]Gerace, E., et al., Recent Advances in the Use of Molecular Methods for the Diagnosis of Bacterial Infections. *Pathogens*, 2022. 11(6).

[7] 金君, 孙仁华, 呼邦传. 血流感染的分子诊断研究进展 [J]. *中国现代医生*, 2020,58(36):182–187.

[8] 杨萍, 徐逸鸣, 冯芳, 等. 基层医院病原菌的分布及感染控制 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2010,20(21):3412–3413..

[9].Zhu, H., et al., PCR past, present and future. *Biotechniques*, 2020. 69(4): p. 317–325.

[10] 黄晓园, 郑凯文, 张俊杰, 等. 基于多重 PCR 靶向测序技术建立临床病原菌检测方法 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2023,15(09):1473–1477.

[11].Walter, J.M. and R.G. Wunderink, Testing for Respiratory Viruses in Adults With Severe Lower Respiratory Infection. *Chest*, 2018. 154(5): p. 1213–1222.

[12].Luchsinger, V., et al., Comparison of Luminex xTAG RVP fast assay and real time RT–PCR for the detection of

respiratory viruses in adults with community–acquired pneumonia. *J Med Virol*, 2016. 88(7): p. 1173–9.

[13]Calabretta, D., I. Mart ì n–Loeches, and A. Torres, New Guidelines for Severe Community–acquired Pneumonia. *Semin Respir Crit Care Med*, 2024. 45(2): p. 274–286.

[14].Eshwara, V.K., C. Mukhopadhyay, and J. Rello, Community–acquired bacterial pneumonia in adults: An update. *Indian J Med Res*, 2020. 151(4): p. 287–302.

[15].Hogerwerf, L., et al., Chlamydia psittaci (psittacosis) as a cause of community–acquired pneumonia: a systematic review and meta–analysis. *Epidemiol Infect*, 2017. 145(15): p. 3096–3105.

[16].Serigstad, S., et al., Impact of rapid molecular testing on diagnosis, treatment and management of community–acquired pneumonia in Norway: a pragmatic randomised controlled trial(CAPNOR). *Trials*, 2022. 23(1): p. 622.

[17]Zhang, P., et al., Clinical application of targeted next–generation sequencing in severe pneumonia: a retrospective review. *Crit Care*, 2024. 28(1): p. 225.

作者简介: 江文洪 (1990—10), 女, 汉族, 浙江省衢州市人, 大学本科, 江山市人民医院, 老年科主任助理、诊疗组长, 研究方向: 呼吸慢病的规范化诊治, 呼吸系统感染的诊治。

基金项目: 浙江省医学会临床医学科研专项资金项目 2022ZYC–B27