

· 专家论坛 ·

重视呼吸道感染病原学检测方法的合理应用和结果解读

艾军红 王然 谢正德

国家儿童医学中心 首都医科大学附属北京儿童医院 北京市儿科研究所感染与病毒研究室 中
国医学科学院儿童危重感染诊治创新单元 国家呼吸系统疾病临床医学研究中心 儿科重大疾病
研究教育部重点实验室 儿童呼吸道感染性疾病研究北京重点实验室,北京 100045

通信作者:谢正德,Email:xiezhengde@bch.com.cn

【摘要】 病原学检测在呼吸道感染的诊疗中具有重要作用,但不同的病原学检测方法各有优缺点。临床医生需要根据患者的临床表现、相关流行病学等信息提示和疑似的病原体种类选择合适的检测方法。不同病原学实验室检测方法结果的临床意义存在差异,临床医师也需要结合疾病的季节性、患者的年龄、临床表现和病程等方面信息综合分析检测结果的临床意义。危重和疑难呼吸道感染疾病的病因复杂,单一的检测结果往往不足以协助临床做出反映疾病病原体的准确判断。临床医生需了解每种病原学检测方法的原理、适用的样本类型及其优缺点,合理选择病原学检查方法,并结合临床综合分析,对呼吸道感染的病原体做出精准判断。

【关键词】 呼吸道感染;病原学检测;结果解读;判断

基金项目:国家科技重大专项(2017ZX10103004-004);中国医学科学院医学与健康科技创新工程(创新单元)
(2019-I2M-5-026)

DOI:10.3760/cma.j.cn331340-20231025-00067

Reasonable application and interpretation of etiological diagnosis methods in respiratory tract infections

Ai Junhong, Wang Ran, Xie Zhengde

Beijing Key Laboratory of Pediatric Respiratory Infection Diseases, Key Laboratory of Major Diseases in Children,
Ministry of Education, National Clinical Research Center for Respiratory Diseases, Research Unit of Critical Infection
in Children, Chinese Academy of Medical Sciences, Laboratory of Infection and Virology, Beijing Pediatric Research
Institute, Beijing Children's Hospital, Capital Medical University, National Center for Children's Health, Beijing
100045, China

Corresponding author: Xie Zhengde, Email: xiezhengde@bch.com.cn

[Abstract] Etiological diagnosis plays a crucial role in the identification and treatment of respiratory tract infections. However, different methods have their own advantages and disadvantages. Clinicians need to select the appropriate detection method based on patients' clinical symptoms, relevant epidemiological data, and suspected pathogens. There are differences in the clinical significance of results from different pathogen laboratory detection methods, and clinicians also need to take into account the factors such as the season of the illness, the patients' age and clinical characteristics, and the progression of the disease. The etiology of severe and complicated respiratory infections is often multifaceted, and a single test result might not be sufficient to accurately identify the causative agent. Clinicians must have a thorough understanding of the principles underlying each etiological diagnosis method, the types of specimens that are suitable for analysis, and the pros and cons of each method. By making informed decisions and combining comprehensive clinical analysis with the results of diagnostic tests, clinicians can achieve an accurate diagnosis of the pathogen responsible for the respiratory tract infection.

[Key words] Respiratory tract infections; Etiological detection; Interpretation of results; Judgment

Fund program: National Science and Technology Major Project (2017ZX10103004-004); CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (2019-I2M-5-026)
DOI:10.3760/cma.j.cn331340-20231025-00067

呼吸道感染是指由病毒、细菌和真菌等微生物引起的一类常见感染性疾病,可表现为上呼吸道感染、支气管炎、肺炎等,其中社区获得性肺炎对人类生命健康的危害较大^[1-2],全球每年有超过 237 万呼吸道感染死亡病例^[3]。在引起呼吸道感染的病原体中,细菌和病毒较常见^[4-5]。因此,明确呼吸道感染的病原体有利于制定精准的治疗方案,改善疾病的预后:细菌感染需要根据菌种选择敏感的抗菌药物进行治疗;病毒感染除对症支持治疗外,某些病毒可以选用特异性抗病毒药物或单克隆抗体进行抗病毒治疗^[6-7]。病原学检测是诊断呼吸道感染病原的重要辅助手段,现有病原检测方法各具优缺点,合理运用和正确解读检测结果有助于临床医生制定及时、恰当、有效的治疗方案,避免抗生素滥用,同时减少或防止重症病例的发生,具有重要的临床意义。

一、呼吸道感染的病原学检测方法及合理应用

呼吸道感染的病原学检测方法主要包括分离培养、抗原检测、血清特异性抗体检测及核酸检测等类型。

1. 分离培养

分离培养方法包括细菌培养、真菌培养和病毒培养。细菌培养和真菌培养是将样本接种在适合的培养基上,通过菌落形态观察、显微镜观察、生化实验和药敏试验等进行鉴定。目前,传统的微生物培养和涂片镜检依然是细菌(如肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、流感嗜血杆菌和结核分枝杆菌)和真菌(如念珠菌、曲霉菌、毛霉菌和隐球菌)感染诊断的“金标准”^[8],其优点是可确认病原体的种类及药敏情况,指导临床选择最有效的抗生素或抗真菌药物进行有针对性的治疗,广泛应用于临床实践。病毒分离培养的方法主要包括动物培养、鸡胚培养和细胞培养,其中细胞培养最常用,该方法为呼吸道病毒感染诊断的“金标准”^[9]。然而,由于呼吸道病毒分离培养的周期长、敏感性低,且质控和对实验室环境及生物安全级别要求较严格,需要熟练和精确的操作技巧以避免污染,部分呼吸道病毒在体外培养条件下不易生长,导致分离培养的成功率较低,故在临床病原学检测中已极少应用,不推荐用于呼吸道病毒感染的诊断^[9]。

2. 抗原检测

常用的抗原检测方法包括快速抗原检测和免疫荧光技术。抗原检测方法的优点是快速、简便、易于操作,缺点是灵敏度不足,对样本质量要求较高,且可能出现假阴性结果。

(1) 快速抗原检测:常为免疫层析法,其中胶体金免疫层析技术发展最为成熟,其原理是以胶体金颗粒为免疫标记物,以硝酸纤维素为载体,滴加液体样本后,通过层析作用实现对特异性抗原的快速检测。

快速抗原检测由于特异性较强、操作简便、耗时短、重复性好,适于急诊和门诊呼吸道感染患者的病原快速初筛,有助于及时做出处理和决策。尽管抗原检测方法已广泛应用于新型冠状病毒、流感病毒、呼吸道合胞病毒和百日咳杆菌等病原感染的诊断,但相对于核酸检测,其灵敏度仍较低,故在某些情况下,为了确诊或排除某种呼吸道感染,需要使用灵敏度高的核酸检测方法。

(2) 免疫荧光检测:包括直接免疫荧光法和间接免疫荧光法。直接免疫荧光法使用单一抗体,抗体偶联荧光素,并靶向病原体抗原,特异性好,但灵敏度偏低。间接免疫荧光法使用两个抗体,一抗靶向病原体抗原,二抗偶联荧光素并靶向一抗,该方法较直接免疫荧光法更为敏感,但存在非特异性荧光的可能。需要强调的是,用于免疫荧光法检测的呼吸道样本中需含有一定数量的呼吸道上皮细胞,以保证检出的真阳性率^[9]。由于免疫荧光法检测耗时相对于免疫层析法更长(需要 1~2 h),且对样本质量要求较高,多适用于临床住院病例。

3. 血清特异性抗体检测

血清特异性抗体检测主要用于检测呼吸道感染患者血清中特定病原体抗体，以 ELISA 法和化学发光法较常用。由于机体在病原感染后一般需 1 周或更长时间后产生的抗体才可被检测到，而呼吸道感染，特别是呼吸道病毒感染，其潜伏期很短，在感染初期，人体尚未产生足够的抗体，在此阶段进行血清特异性抗体检测的阳性率很低，故该方法不适用于急性呼吸道感染的早期诊断；其次，机体产生的抗体存在时间较长，其结果无法精准反映与临床疾病的相关性；另外，免疫功能低下的患者可能无法产生足够的抗体，因此血清特异性抗体检测在急性呼吸道感染的病原学诊断中的应用价值较低。由于抗体产生后可以长期存在于体内，即便病原体已被清除，抗体水平仍能持续一段时间，进行抗体检测可明确感染史。因此，血清特异性抗体检测主要适用于回顾性诊断和流行病学调查。

4. 核酸检测

核酸检测用于检测病原体的核酸序列，包括病原体基因组依赖性核酸检测和基因组非依赖性核酸检测。

(1) 基因组依赖性核酸检测：基于已知病原体的基因组序列设计特异性引物，进行病原体靶向性核酸检测，主要包括 PCR、实时定量 PCR、环介导等温扩增等，其特异性好、灵敏度高，是目前呼吸道感染病原体检测的主要方法^[10]。需指出的是，正确的样本采集和储存是确保核酸检测结果准确的重要因素。近年来，基于多重 PCR 技术的多重核酸检测技术得到了较快发展。多重核酸检测可覆盖常见细菌、病毒和支原体等多种呼吸道感染相关的病原体，技术方法成熟，有效提高了检测效率和准确性，常用于临床诊断和疫情监测^[11-12]。

基因组依赖的核酸检测方法在不同疾病时期都具有较高的灵敏度和特异性，特别是在感染初期就能检测到病原体核酸，适用于细菌、病毒、支原体和寄生虫等多种呼吸道病原体的早期感染诊断，是呼吸道感染病原检测的主要方法。多重核酸检测技术成熟，可同时检测多种病原体，节省样本及检测

时间。对呼吸道感染出现急诊适应证者，所有因急性呼吸道感染性疾病住院，住院期间新出现呼吸道感染症状(伴或不伴发热)，或出现不明原因的呼吸窘迫慢性心肺疾病急性恶化等患者，均可利用多重核酸检测进行鉴别诊断，及早确定病原^[10]。

(2) 基因组非依赖性核酸检测：该检测主要包括宏基因组测序 (metagenomics next generation sequencing, mNGS) 技术和病原微生物靶向测序 (targeted next generation sequencing, tNGS) 技术。mNGS 技术是对样本进行高通量测序，将获得的核酸序列与数据库中的序列进行比对分析，分析样本中的整个微生物组，获得包含病毒、细菌、真菌和寄生虫等多种病原微生物信息。tNGS 技术将超多重 PCR 与高通量测序技术相结合，同时可检测样本中几十至几百种常见病原微生物及耐药基因的高通量检测方法，但 tNGS 技术无法检测新发突发病原体。mNGS 技术的检测不依赖于特异性引物和探针，对病原微生物基因组的无差别检测，避免了基因组依赖性核酸检测可能导致的病原体漏检问题，有助于发现新发突发传染病和临床未知病原体^[10]。然而，mNGS 技术和 tNGS 技术检测需要复杂的生物信息学分析，对于数据的处理和解读需要专业的技术支持，且费用较高，普及存难度。

当病情危重且病因不明，传统病原体检测多次阴性且治疗效果不佳，或疑似新发或特殊病原体感染时，可在常规病原体检测的同时或在其基础上行 mNGS 检测，助力早期确定病原体，指导临床治疗^[10]。

此外，纳米孔测序技术在呼吸道病原检测中也具有一定的应用价值。三代纳米孔测序技术近年来发展迅速，其通过纳米孔测序仪实现对 DNA 和 RNA 单分子的测序，具有实时快速、长片段读长等优点。同时，纳米孔测序所需设备较其他高通量测序平台小巧便携，在检测过程中可实时分析数据，在未知病原鉴定及新发突发呼吸道病原体应急检测中具有突出的优势。然而，由于纳米孔测序准确率较二代测序低，且对于同一物种的多个菌株难以区分，应用时需结合临床，必要时采用传统实验方法如荧光 PCR 进行验证^[13]。

尽管核酸检测是重要的呼吸道感染病原学检测方法,但仍面临一些挑战,如部分较贫困地区的实验室设备和专业人员匮乏,技术可及性有待提高,以及病毒突变可能导致的假阴性结果等。此外,由于核酸检测获得的只是病原体核酸片段信息,无法确定是否存在感染性的病原体,需要结合临床表现、病原体分离培养等结果综合判定。

二、呼吸道感染病原学检测结果的解读

呼吸道病原检测结果的合理解读对明确感染原因,指导治疗决策,避免药物滥用和减少耐药性具有重要意义。呼吸道病原检测结果的判读须结合临床特征、病程和样本来源综合分析。

1. 呼吸道样本的分离培养检测结果

呼吸道样本病毒培养阳性提示产毒性感染,诊断特异性为 100%, 可作为病毒感染诊断的“金标准”。下呼吸道和无菌体液样本中细菌、真菌培养阳性也具有一定诊断价值。但由于上呼吸道存在大量正常菌群,因此上呼吸道来源样本中细菌、真菌培养阳性的诊断价值有限,需根据细菌种类结合临床综合判断。尽管分离培养可作为病毒、细菌和真菌感染诊断的金标准,但由于分离培养灵敏度偏低,阴性结果不能排除病原感染,必要时可选择灵敏度较高的核酸检测。

2. 呼吸道感染的抗原检测结果

呼吸道样本中病毒抗原检测结果阳性提示活动性感染,表明患者具有传染性,较适合于疾病早期的诊断。同样由于抗原检测灵敏度偏低,检测结果阴性不能排除病原感染,需结合临床,必要时选择灵敏度较高的核酸检测。

肺炎链球菌抗原阳性应根据样本来源及样本类型综合分析。上呼吸道样本(如咽拭子)的阳性结果可能会受咽部正常菌群的干扰,因而并不能提示肺炎链球菌感染。尿液样本肺炎链球菌抗原阳性不推荐用于儿童肺炎链球菌感染的诊断。若呼吸道感染患儿脑脊液样本肺炎链球菌抗原阳性,则应考虑合并中枢神经系统感染的可能。尿液肺军团菌 1 型抗原阳性可用于肺军团菌早期快速诊断,特异性接近 100%, 但不推荐下呼吸道样本用于军团菌抗原

检测。此外,咽拭子 A 族乙型溶血性链球菌抗原阳性提示 A 族乙型溶血性链球菌感染,可为临床早期治疗提供重要的参考。肺炎支原体抗原检测结果受采集的细胞数量、其他病原及自身交叉抗体的干扰等多种因素的影响,诊断价值有限,应选择核酸检测和血清特异性抗体检测。

3. 呼吸道感染的血清特异性抗体检测结果

血清特异性抗体检测结果多用于回顾性诊断,可提示是否存在感染从而推测感染的大致时相。由于多数呼吸道病原感染的潜伏期短,血清特异性抗体检测在呼吸道病原诊断中很少单独应用,单份血清特异性 IgM 阳性结果一般不作为诊断标准。然而,对于非典型病原体,如支原体感染,由于其 IgM 抗体一般在感染后 4~5 d 出现,故可作为早期感染的诊断指标,但感染早期抗体滴度较低,检测结果易出现假阴性。

4. 呼吸道样本的核酸检测结果^[10]

应根据样本获得的部位及病原体的类型(病毒、细菌、非典型病原体及真菌)综合考虑呼吸道样本病原体核酸检测阳性结果的临床意义。若实验室检测结果与患者的临床表现严重不符,需分析是否存在实验室污染、引物特异性差等方面的问题。

(1) 病毒: 急性期上、下呼吸道样本核酸检测阳性,可提供病原学参考。由于部分病毒无症状感染率较高,故上呼吸道样本核酸检测阳性结果需结合临床表现综合分析,而下呼吸道样本的病原学阳性则具有较高的诊断价值。(2) 细菌: 对于多数细菌,下呼吸道及无菌体液样本核酸检测阳性具有诊断价值。由于百日咳鲍特菌主要感染鼻咽部,其在上呼吸道样本中核酸阳性也具有诊断价值。(3) 非典型病原体: 对肺炎支原体、衣原体和军团菌等非典型病原体而言,下呼吸道样本核酸阳性更具有诊断价值。(4) 真菌: 下呼吸道样本、鼻窦分泌物、无菌体液、活检组织等检测样本中显示真菌核酸阳性,则提示真菌感染。

需要强调的是,核酸检测结果阴性,不能完全除外病原体感染,需结合患者临床表现综合分析。若核酸检测阴性,而临床高度怀疑某种病原体感

染,应及时与实验室反馈沟通,分析可能原因,如样本是否合格,病原体可能存在变异,试剂的检测阈值和质量,以及实验室检测等方面的问题。

此外,由于 mNGS 的操作流程和结果判读等尚无统一标准,建议由临床医师、临床病原体感染专业人员和生物信息学人员等共同讨论,结合患者临床表现、影像资料及其他实验室检查结果对 mNGS 的结果进行综合分析,避免盲目根据 mNGS 报告开展治疗,从而导致抗微生物药物的滥用^[14]。

三、结语

综上所述,不同的病原学检测方法有各自的优缺点,临床医生需要根据患者的临床表现、相关流行病学等信息提示和怀疑的病原体种类选择合适的检测方法。由于不同病原学实验室检测方法结果的临床意义存在差异,临床医师也需要结合疾病的季节、患者的年龄和临床特征、疾病病程等信息综合分析检测结果。危重和疑难呼吸道感染疾病的病因复杂,单一检测结果可能不足以准确判断病原体。临床医生需了解每种病原学检测方法的原理、适用的样本类型及其方法的优缺点,合理选择病原学检查方法,并结合临床综合分析其检查结果的临床意义,对呼吸道感染的病原体做出精准诊断。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Niederman MS, Torres A. Respiratory infections[J]. Eur Respir Rev, 2022, 31(166): 220150. DOI: 10.1183/16000617.0150-2022.
- [2] GBD 2019 Antimicrobial Resistance Collaborators. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. Lancet, 2022, 400(10369): 2221-2248. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)02185-7.
- [3] GBD 2016 Lower Respiratory Infections Collaborators. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016[J]. Lancet Infect Dis, 2018, 18(11): 1191-1210. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30310-4.
- [4] Verwey C, Madhi SA. Review and update of active and passive immunization against respiratory syncytial virus [J]. BioDrugs, 2023, 37(3): 295-309. DOI: 10.1007/s40259-023-00596-4.
- [5] Barr R, Green CA, Sande CJ, et al. Respiratory syncytial virus: Diagnosis, prevention and management[J]. Ther Adv Infect Dis, 2019, 6: 2049936119865798. DOI: 10.1177/2049936119865798.
- [6] Aziz S, Scherließ R, Steckel H. Development of high dose oseltamivir phosphate dry powder for inhalation therapy in viral pneumonia[J]. Pharmaceutics, 2020, 12(12): 1154. DOI: 10.3390/pharmaceutics12121154.
- [7] Garegnani L, Styrmsdóttir L, Roson Rodriguez P, et al. Palivizumab for preventing severe respiratory syncytial virus (RSV) infection in children[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2021, 11(11): CD013757. DOI: 10.1002/14651858.CD013757.pub2.
- [8] 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. DOI: 10.3760/cma.j.cn112147-20211116-00809.
- [9] 艾军红, 谢正德. 儿童呼吸道病毒感染的实验室诊断方法及合理应用[J]. 中国实用儿科杂志, 2019, 34(2): 104-108. DOI: 10.19538/j.ek2019020610.
- [10] 谢正德, 邓继岿, 任丽丽, 等. 儿童呼吸道感染病原体核酸检测专家共识[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2022, 37(5): 321-332. DOI: 10.3760/cma.j.cn101070-20211222-01490.
- [11] Chung HY, Jian MJ, Chang CK, et al. Novel dual multiplex real-time RT-PCR assays for the rapid detection of SARS-CoV-2, influenza A/B, and respiratory syncytial virus using the BD MAX open system[J]. Emerg Microbes Infect, 2021, 10(1): 161-166. DOI: 10.1080/22221751.2021.1873073.
- [12] Tai CC, Tsai CH, Huang YH, et al. Detection of respiratory viruses in adults with respiratory tract infection using a multiplex PCR assay at a tertiary center[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2021, 54(5): 858-864. DOI: 10.1016/j.jmii.2020.07.020.
- [13] 范帅华, 杜鹏程, 郭军. 纳米孔测序技术在呼吸系统感染病原学诊断中的应用价值与展望[J]. 中华医学杂志, 2021, 101(25): 2013-2015. DOI: 10.3760/cma.j.cn112137-20201027-02942.
- [14] 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. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20201026-00794.

(收稿日期:2023-10-25)