

# 基于液相芯片技术建立快速检测 6 种临床常见血流感染厌氧菌的方法及评价

陈梅莲<sup>1</sup>, 曾见芬<sup>1</sup>, 张欣选<sup>2</sup>, 周文娟<sup>1</sup>, 余洁玲<sup>1</sup>, 彭兰芬<sup>1</sup>, 付文金<sup>1</sup>

(1. 广东省东莞市厚街医院检验科, 广东东莞 523945; 2. 东莞市南城社区卫生服务中心, 广东东莞 523073)

**摘要:** **目的** 基于液相芯片技术建立一种可同时快速检测 6 种临床常见血流感染厌氧菌的方法。**方法** 通过 GenBank 寻找脆弱拟杆菌、厌氧消化链球菌、具核梭杆菌、中间普雷沃菌、产气荚膜梭菌和痤疮丙酸杆菌的 16S rDNA 基因序列, 经序列比对分析, 选择菌内保守菌间特异的区域作靶序列, 使用 Primer 5.0 软件设计特异性引物及探针, 建立不对称多重 PCR 扩增体系, 将 PCR 产物与偶联核酸探针的荧光微球混合物进行杂交, 建立一种多重检测方法, 并对该方法的特异度、灵敏度和重复性进行评价。收集 2020 年 6 月~2022 年 5 月东莞市厚街医院阳性血厌氧培养瓶 84 例及阴性培养瓶 16 例, 应用建立的方法进行检测, 结果与传统培养法进行比较。**结果** 6 种厌氧菌靶基因序列经 PCR 扩增后, 电泳成像清晰可见 6 条目标条带; 经反应体系优化, 生物素标记与非标记引物浓度比为 4:1 时, 选择退火温度 56℃ 进行多重扩增, 加入 5 μl PCR 产物, 52℃ 温育 20 min 检测效果最佳; 各目标序列荧光强度中位值 (median fluorescence intensity, MFI) > 1 000, 无非特异性信号; 最低检测限可达 10<sup>3</sup>cfu/ml ~ 10<sup>4</sup>cfu/ml; 当菌液浓度为 10<sup>5</sup>cfu/ml 时, 批内及批间的变异系数分别在 7.38% 和 11.10% 以下; 100 例临床样本中 6 种厌氧菌的检测方法与培养法一致。**结论** 成功建立一种快速、简便、高效的液相芯片方法, 可同时检测 6 种常见血流感染厌氧菌。

**关键词:** 厌氧菌; 液相芯片; 多重聚合酶链式反应

**中图分类号:** R446.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2023) 02-075-07

**doi:**10.3969/j.issn.1671-7414.2023.02.014

## Establishment and Evaluation of A Rapid Detection Method for 6 Common Clinical Infected Anaerobic Bacteria in Blood Stream by Liquid Phase Chip Technology

CHEN Mei-lian<sup>1</sup>, ZENG Jian-fen<sup>1</sup>, ZHANG Xin-xuan<sup>2</sup>, ZHOU Wen-juan<sup>1</sup>, YU Jie-ling<sup>1</sup>, PENG Lan-fen<sup>1</sup>, FU Wen-jin<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Dongguan Houjie Hospital, Guangdong Dongguan 523945, China;

2. Dongguan Nancheng Community Health Service Center, Guangdong Dongguan 523073, China)

**Abstract: Objective** To establish a method based on liquid chip technology for simultaneous and rapid detecting of 6 common anaerobic bacteria in blood stream infection. **Methods** The 16S rDNA gene sequences of *Bacteroides fragilis*, *Streptococcus anaerobius*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Clostridium perfringens* and *Propionibacterium acnes* were searched by GenBank. After sequence alignment analysis, specific regions between conserved bacteria in the bacteria were selected as target sequences. Primer 5.0 software was used to design specific primers and probes. After an asymmetric multiplex PCR amplification, the PCR products hybridized with microsphere mixtures that had been coupled to gene-specific probes, and a multiplex detection system was established. Then the specificity, sensitivity and repeatability of the method were evaluated. From June 2020 to May 2022, 84 cases of positive blood anaerobic culture bottles and 16 cases of negative culture bottles were collected from Dongguan Houjie Hospital, and the results were compared with the traditional culture methods. **Results** 6 target bands were clearly visible on electrophoretic imaging. When the concentration ratio of biotin labeled primer to non labeled primer was 4:1, the best detection effect was obtained by multiple amplification at 56 °C, adding 5 μl PCR products and incubating at 52 °C for 20 minutes. The median fluorescence intensity (MFI) of each target sequence was >1 000, and there was no non-specific signal. The minimum detectable concentration of the established method could reach to 10<sup>3</sup>cfu/ml ~ 10<sup>4</sup>cfu/ml. When the concentration of bacterial solution was 10<sup>5</sup>cfu/ml, the inter-batch and intra-batch CVs were lower than 7.38% and 11.10%, respectively. The detection results of 6 anaerobic bacteria in 100 clinical samples were consistent with the culture

**基金项目:** 东莞市社会科技发展 (一般) 项目 (202050715023529), 东莞市社会科技发展 (重点) 项目 (202050715023181)。

**作者简介:** 陈梅莲 (1980-), 女, 大学本科, 副主任技师, 研究方向: 分子诊断, E-mail: Salala2002@sina.com。

**通讯作者:** 付文金, E-mail: 332689892@qq.com。

method. **Conclusion** A liquid chip detection method for rapid, simple and efficient detecting of 6 common anaerobic bacteria in blood stream was successfully established.

**Keywords:** anaerobic bacteria; liquid phase chip technology; multiplex PCR

厌氧菌是人体微生物群的主要成员,特别是在肠道和各种黏膜上,它们是内源性感染的常见原因<sup>[1]</sup>。在所有阳性血培养中,约有0.5%~13%检测到厌氧菌血症<sup>[2]</sup>,脆弱拟杆菌、厌氧消化链球菌、产气荚膜梭菌、梭杆菌属、普雷沃菌属和丙酸杆菌是临床常见血流感染菌属,比例可占到40%~70%<sup>[2-4]</sup>。厌氧菌血症相关的死亡率可高达63%<sup>[5]</sup>,且用药时间越迟患者的死亡率越高<sup>[6]</sup>,因此早期准确诊断和及时治疗是关键。

现有厌氧菌实验室诊断主要靠培养技术,需要严苛的培养环境、生长周期长、技术人员鉴定难度大,导致国内很多实验室难以常规开展<sup>[7]</sup>。基于此,本文引入一种新型的检测技术-液相芯片技术,具有快速简易、高通量、灵敏度及特异度好等特点<sup>[8-9]</sup>。16S rDNA存在于所有细菌当中,其结构序列用于种属鉴定已得到广泛认可<sup>[10]</sup>。因此,本文以细菌16S rDNA序列为分型基础,设计脆弱拟杆菌、厌氧消化链球菌、产气荚膜梭菌、具核梭杆菌、中间普雷沃菌和痤疮丙酸杆菌等6种常见血流感染厌氧菌的特异性引物,经多重PCR扩增各目标菌靶序列,以Luminex 200为平台,通过使用荧光编码微球偶联特异性探针对6种厌氧菌进行快速鉴定,为厌氧菌感染诊断提供帮助。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

1.1.1 菌株:初期试验使用的标准菌株脆弱拟杆菌(*B. fragilis*, ATCC25285)、厌氧消化链球菌(*P. anaerobius*, ATCC27337)、具核梭杆菌(*F. nucleatum*, ATCC25586)、中间普雷沃菌(*P. intermedia*, ATCC25611)、产气荚膜梭菌(*C. perfringens*, ATCC13124)和痤疮丙酸杆菌(*P. acnes*, ATCC11827)均购自上海保藏生物技术中心。特异性试验菌株大肠埃希氏菌(*E. coli*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)、奇异变形杆菌(*P. mirabilis*)、鲍曼不动杆菌(*A. baumannii*)、粪肠球菌(*E. faecalis*)、肺炎链球菌(*S. pneumoniae*)和肺炎克雷伯菌(*K. pneumoniae*)等来自东莞市厚街医院检验科微生物实验室。

1.1.2 标本来源:从2020年6月~2022年5月在东莞市厚街医院住院的所有疑似血流感染患者(发热,体温>38℃,伴有寒战等全身中毒症状或中性粒细胞增多伴PCT升高)进行外周血、肺部灌洗液、深部脓肿脓液和无菌部位体液等厌氧菌血培养的

6 255份标本里,收集仪器报警阳性的血培养瓶84例,并随机挑选16例培养阴性的血厌氧培养瓶。

### 1.2 试剂与仪器

1.2.1 试剂:多重PCR试剂盒(TaKaRa大连宝生物工程有限公司),细菌DNA提取试剂盒(北京天根生化科技公司),2-(N-吗啡基)乙磺酸(MES, Sigma公司),5mol/L氯化四甲基胺(TMAC, Sigma公司),1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐(EDC, Pierce公司),藻红蛋白标记链霉亲和素(SA-PE, Invitrogen公司),荧光微球(Luminex公司)。

1.2.2 仪器:TC-96 PCR扩增仪(博日公司),Luminex 200流式荧光分析仪(Luminex公司),核酸测定仪(柏精BioDrop),凝胶成像仪(东胜龙BIS 910),全自动BACTEC血培养仪器(美国BD公司),VITEK 2 Compact全自动细菌鉴定仪(法国梅里埃)。

### 1.3 方法

1.3.1 引物与探针的设计:根据GenBank数据库发布的6种厌氧菌16S rDNA基因序列,应用DNAMAN 6.0软件进行多序列比对分析,选择菌内相对保守菌间高度特异的区域作靶序列,并使用Primer 5.0序列分析软件设计特异性引物及探针,通过NCBI网站进行BLAST分析,对选用的扩增引物和探针进行同源性对比,确保其特异性。引物及探针由上海生工公司合成,所有下游引物5'端做生物素(biotin)标记,探针5'端进行氨基和C12修饰,在Luminex公司提供的多种编码微球中选择6种型号的微球偶联对应的探针,见表1。

1.3.2 细菌DNA提取:采用DNA吸附柱法。各菌株用生理盐水制成2.0麦氏度的菌悬液,取200μl,血培养瓶混匀后取液体2ml,按照试剂盒说明书操作。核酸测定仪对提取的DNA进行质量浓度和纯度的测定,将DNA样本保存在-20℃,直至后续分析。

### 1.3.3 液相芯片技术检测方法的建立

1.3.3.1 微球探针的偶联:依据Luminex公司提供的配制方案<sup>[11]</sup>,得到偶联好的检测微球(约50 000个/μl),4℃避光保存。

1.3.3.2 多重PCR反应:采用50μl反应体积,每个反应含TaqHS DNA聚合酶0.25μl,10×缓冲液(含15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>) 5μl, dNTP 4μl,标准菌株DNA模板(浓度约25 ng/μl) 2μl,6种菌中除具核梭杆菌上下游引物各1μl外,其余5种菌

各 0.5  $\mu$ l, 上游非标记引物浓度 10  $\mu$ mol / L, 生物素标记下游引物浓度 40  $\mu$ mol / L, 用去离子水补足至 50  $\mu$ l。反应条件: 94  $^{\circ}$ C 1 min; 94  $^{\circ}$ C 30s, 56  $^{\circ}$ C 30s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 共 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min。反应

结束后取 5  $\mu$ l 扩增产物置于 3g/dl 琼脂糖凝胶上电泳 90 min, 电压 125 V, 凝胶成像系统下观察结果。

表 1 6 种厌氧菌引物及探针

菌种	碱基序列	扩增长度 (bp)	微球编码
<i>B.fragilis</i>	Forward: 5'-GGGGATGCGTTCCATTAGG-3'	254	25#
	Reverse Biotin: 5'-GCTGCTGGCAGGAGTTAG-3'		
	Probe NH <sub>2</sub> (C <sub>12</sub> ): 5'-CCTCACTGCTGCTCCCGTA-3'		
<i>P.anaerobius</i>	Forward : 5'-GACGATCAGTAGCCGACCTG-3'	341	13#
	Reverse Biotin : 5'-AGTTTCGGAGGCTAACTACGG-3'		
	Probe NH <sub>2</sub> (C <sub>12</sub> ) : 5'-GGCGTAAAGCGTGCCTAGGT-3'		
<i>F.nucleatum</i>	Forward : 5'-CAACAGAAGAACTGACGGCTAA-3'	153	18#
	Reverse Biotin : 5'-ATCGTTTACGGCGTGGACTA-3'		
	Probe NH <sub>2</sub> (C <sub>12</sub> ) : 5'-GGCTTCCCCATCGGCATT-3'		
<i>P.intermedia</i>	Forward : 5'-GATGGATGCGCGCTGTAG-3'	130	22#
	Reverse Biotin : 5'-CATGTTCTCCGCTTGTGC-3'		
	Probe NH <sub>2</sub> (C <sub>12</sub> ) : 5'-GCGAAAGCATTAAGCATCCCA-3'		
<i>C.perfringens</i>	Forward : 5'-CGTGGGTAACCTGCCTCAT-3'	452	15#
	Reverse Biotin : 5'-AATCATCCGCCTACGCTCC-3'		
	Probe NH <sub>2</sub> (C <sub>12</sub> ) : 5'-CATAGCGGATTGCTCCTTTGGT-3'		
<i>P.acnes</i>	Forward : 5'-GATGGACTCGCGGCTTATCA-3'	302	20#
	Reverse Biotin : 5'-CTCGCACCTACGTATCACC-3'		
	Probe NH <sub>2</sub> (C <sub>12</sub> ) : 5'-CAATGGGCGGAAGCCTGATG-3'		

1.3.3.3 扩增产物杂交及检测: 用 1.5XTMAC 将各偶联微球稀释成 1 000 个 /  $\mu$ l 的工作液, 同时, 用 1  $\times$  TMAC 将 SA-PE 稀释至 4  $\mu$ g/ml。杂交反应条件: 5  $\mu$ l PCR 产物与 33  $\mu$ l 微球工作液混合, 加入 12  $\mu$ l ITE 缓冲液, 95  $^{\circ}$ C 变性 5 min, 52  $^{\circ}$ C 杂交 20 min 后, 取 25  $\mu$ l 混合液加入 4  $\mu$ g/ml SA-PE 75  $\mu$ l, 52  $^{\circ}$ C 温育 15 min。反应结束后用 Luminex 200 流式荧光分析仪检测, 仪器提供的检测结果数值为平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI) 荧光值。

1.3.3.3 结果判断: 每次检测均用去离子水设置 3 个空白对照, 与待检样品同步进行扩增和微球杂交检测。依据 Luminex 公司提供的判断标准<sup>[11]</sup>: 定性比率结果 (LQRR) 等于样品的 MFI (MFIS) 除以空白对照的 MFI (MFIB), 即是  $LQRR = MFIS / MFIB$ 。  $LQRR \geq 3$ , 结果为阳性;  $2 \leq LQRR < 3$ , 结果为灰区, 需重新检测;  $LQRR < 2$ , 结果为阴性。试验须在微球个数不少于 100 个的情况下才成立。

1.3.3.4 扩增产物标记及微球探针杂交条件优化: 采用不对称 PCR 方法扩增特异长度的单链 DNA, 对标记与非标记引物浓度比进行 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 和 6:1 等配比试验, 根据检测结果 MFI 和 LQRR 值确定最佳的比例。杂交优化依据 MFI 和 LQRR 比值, 调整杂交体系中的 PCR 产物用量

(2 ~ 8  $\mu$ l), 杂交温度 (48 ~ 58  $^{\circ}$ C), 时间 (10 ~ 30 min), SA-PE 浓度 (3 ~ 6  $\mu$ g/ml), 孵育时间 (10 ~ 20 min) 等对 MFI 值的影响, 确定最佳反应体系。

1.3.4 液相芯片检测体系性能评估: 将 6 种厌氧菌的标准菌株及 8 种其他菌株的 DNA 作为 PCR 扩增模板, 同时用生理盐水作阴性对照, 利用已建立的检测方法进行杂交检测, 评估该方法的特异度。把各标准菌株调成  $10^1 \sim 10^7$  cfu/ml 浓度梯度稀释的菌悬液, 针对液相芯片系统中目标基因做灵敏度分析。选取各菌种  $10^5$  cfu/ml 浓度做 3 次重复测定并连续检测 3 天, 计算批内和批间的变异系数 (CV), 验证其重复性。

1.3.5 临床样本试验: 报阳的 84 例样本包括外周血、肺部灌洗液、深部脓肿脓液和无菌部位体液, 仪器报阳时, 取增菌液转接入固体培养基分别进行需氧和厌氧培养 1 ~ 2 天, 厌氧血平板若有菌落形成, 做染色、耐氧实验、分纯, 用 VITEK 2 Compat 系统鉴定菌种。同时取阳性培养瓶液体进行核酸提取, 应用建立的芯片法进行检测, 比较两种方法的结果。

1.4 统计学分析 计量资料 (平均荧光值) 用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 计数资料用例数或株数表示, 灵敏度以荧光值表示, 批间、批内以 CV 值表示。

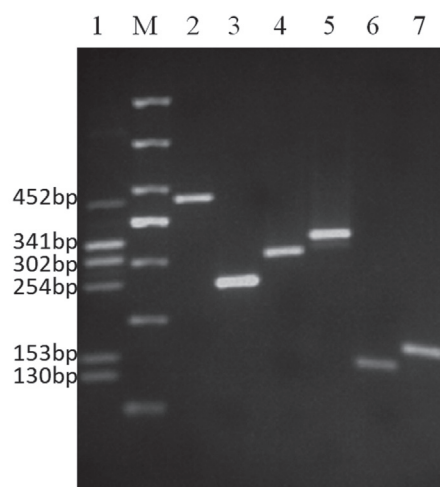
## 2 结果与分析



2.1 反应条件优化 扩增后电泳结果显示,退火温度为 56℃,DNA 质量为 50 ng 时,单重及多重 PCR 均能够同时扩增出 6 条目的条带,见图 1。标记与非标记引物浓度比为 4:1 时,液相芯片系统所测的 6 种厌氧菌的 MFI 平均值最高,见图 2。杂交条件以 5  $\mu$ l PCR 产物,52℃温育 20 min 为最佳。

2.2 液相芯片检测的特异性、灵敏度和重复性 见表 2。该芯片系统单独检测各目标菌的 MFI 值均在 1 000 以上, LQRR 值远高于 3 的判断阈值;其他非目标菌种 LQRR < 2,无非特异性信号。6 种厌氧菌检出限在  $10^3 \sim 10^4$  cfu/ml,各目标菌种 100 cfu/ml 以上的浓度与测得的 MFI 值呈线性,测得的相关系数  $r^2$  分别是脆弱拟杆菌 0.98,厌氧消化链球菌 0.98,中间普雷沃菌 0.98,具核梭杆菌 0.95,产气荚膜梭菌 0.95 和痤疮丙酸杆菌 0.98,见图 3。选择各目标菌液检测限内浓度  $10^5$  cfu/ml 进行重复性试验,批内 CV 值在 5.73% ~ 7.38%,批间 CV 值在

7.79% ~ 11.10%。



注: M: DNA Marker; 1: 6 种目标厌氧菌; 2: *C. perfringens*; 3: *B. fragilis*; 4: *P. acnes*; 5: *P. anaerobius*; 6: *P. intermedia*; 7: *F. nucleatum*

图 1 多重 PCR

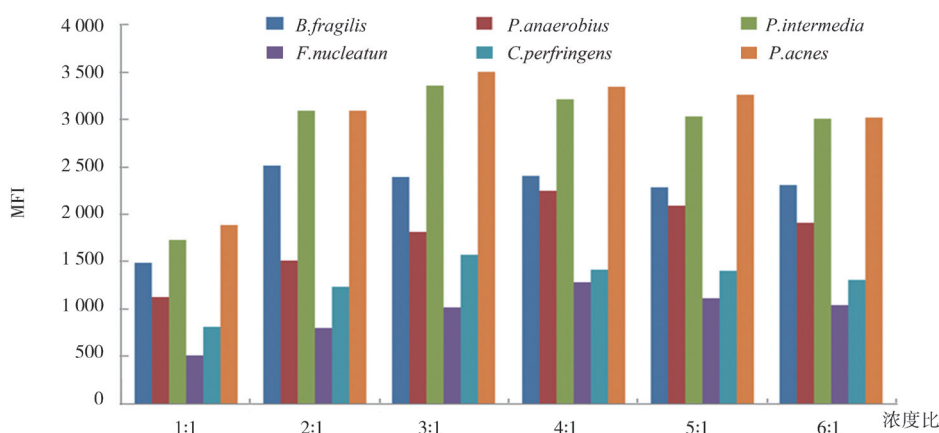


图 2 标记与非标记引物浓度比优化

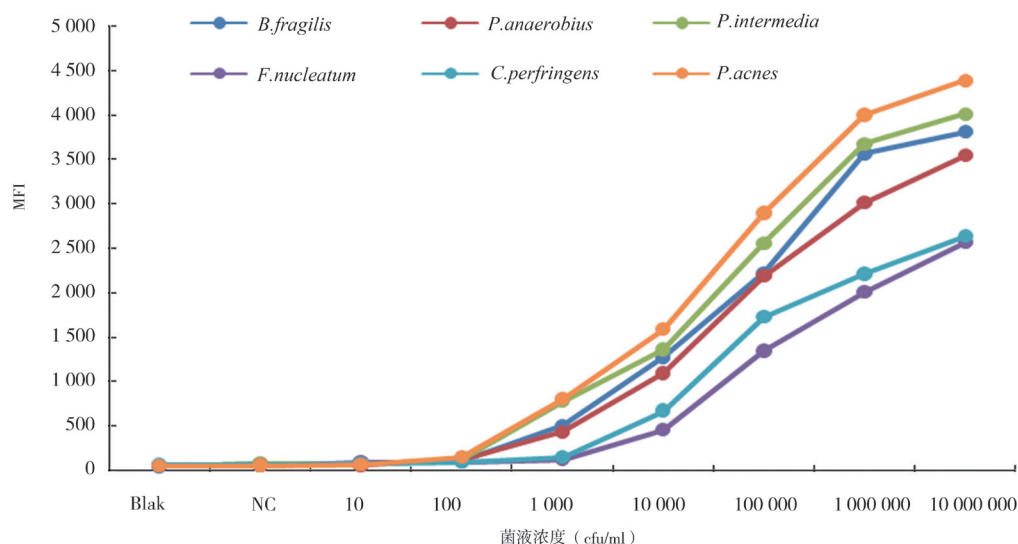


图 3 液相芯片系统灵敏度分析

表2 各目标菌种 (10<sup>5</sup> cfu/ml) 液相芯片检测的重复性

菌 株	批内 (MFI)			CV(%)	批间 (MFI)			CV(%)
	1	2	3		1	2	3	
<i>B.fragilis</i>	2 771	2 577	2 911	6.09	2 771	2 588	2 370	7.79
<i>P.anaerobius</i>	2 347	2 403	2 688	7.38	2 347	2 407	2 023	9.14
<i>P.intermedia</i>	3 533	3 120	3 412	6.33	3 533	3 399	2 978	8.77
<i>F.nucleatum</i>	1 386	1 560	1 345	7.98	1 386	1 354	1 124	11.10
<i>C.perfringens</i>	1 832	1 634	1 723	5.73	1 832	1 712	1 539	8.69
<i>P.acnes</i>	3 899	3 574	4 011	5.93	3 899	3 697	3 298	8.42

2.3 临床样本的检测 见表3。84例血厌氧菌培养瓶报阳的标本中,传统方法鉴定为厌氧菌共56例,需氧或微需氧菌共32例,有4例为需氧和厌氧菌混合感染,1例为两种厌氧菌混合感染。报阳血培养瓶从转接血平板培养到最后鉴定为厌氧菌时间范围为51.3 ~ 96.7 h。液相芯片法检出6种目标厌氧菌共有42例,其分类结果与传统方法一致;另有14例非目标厌氧菌和28例需氧菌检测无反应,随机16例阴性血厌氧培养瓶未检测出阳性信号值。

表3 84例血厌氧报警阳性瓶培养液两种检测方法结果比较 (n=84)

检测菌种	细菌培养法 (株)	液相芯片法 [株 (MFI $\bar{x} \pm s$ )]
<i>B.fragilis</i>	11	11 (3 323 $\pm$ 1 001)
<i>P.anaerobius</i>	6	6 (2 289 $\pm$ 768)
<i>C.perfringens</i>	12	12 (4 706 $\pm$ 2 189)
<i>P.acnes</i>	5	5 (1 389 $\pm$ 899)
<i>P.intermedia</i>	1	1 (1 189)
<i>F.nucleatum</i>	2	2 (1 733 $\pm$ 770)
<i>B.fragilis</i> , <i>P.aeruginosa</i>	1	1 (1 876)
<i>B.fragilis</i> , <i>E.coli</i>	1	1 (3 077)
<i>B.fragilis</i> , <i>E.faecalis</i>	1	1 (609)
<i>S.pharyngitis</i> , <i>P.intermedia</i>	1	1 (823)
<i>F.nucleatum</i> , <i>P.anaerobius</i>	1	1 (478, 1 566)
<i>B.polymorphus</i>	1	ND
<i>B.ovalis</i>	1	ND
<i>Bacteroides</i> spp.	3	ND
<i>Lactobacillus</i> spp.	1	ND
<i>Fusobacterium</i> spp.	2	ND
<i>Veronica</i> spp.	2	ND
<i>P.bivia</i>	1	ND
<i>Bifidobacterium</i> spp.	2	ND
<i>P.melanogenes</i>	1	ND
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	ND
<i>K.pneumoniae</i>	3	ND
<i>S.aureus</i>	4	ND
<i>Coagulase negative staphylococcus</i>	6	ND
<i>S.pneumoniae</i>	2	ND
<i>E.coli</i>	6	ND
<i>P.aeruginosa</i>	4	ND
<i>A.baumannii</i>	2	ND

注: ND 代表未检测。

### 3 讨论

侵入性手术的频繁应用和抗生素的不规范使用加剧了厌氧菌的血流感染风险,对患者的康复和经济造成严重威胁。有效治疗方法的选择依赖于快速识别病原体,而传统厌氧菌培养技术耗时长,成本高,已成为很多基层医疗机构面临的难题。分子快速诊断试验 (mRDT) 被定义为任何能够在血培养阳性后24h内提供诊断的分子方法,如PCR,基因芯片、宏基因二代测序 (NGS) 和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术 (MALDI-TOF MS) 等,被认为是传统实验方法一个很有前途的补充,能减少血流感染患者有效治疗时间,降低医疗成本<sup>[12-13]</sup>。

基于探针的分子检测 (qPCR) 可提供快速和灵敏的结果,被广泛用于病原体检测,但它们检测的靶标有限。使用NGS或MALDI-TOF MS可对绝大多数已知苛养菌进行分类到种,但这些方法检测昂贵,还需要专门仪器及高水平人员分析,不符合基层医疗机构发展需求。液相芯片技术是一种利用多种编码微球结合特异标记物实现对多种基因、抗原识别的新型基因芯片技术,在多种病原体的联合检测方面具有多方优势<sup>[14]</sup>。因此,本研究的目的是建立一种基于Luminex技术的多重检测方法,用于同时检测临床报道的6种常见血流感染厌氧菌。利用该方法检测100份临床样本,目标厌氧菌分类结果与培养法一致,假阳性和假阴性率均为0。该方法从标本的核酸提取、多重PCR反应到探针微球的杂交分析,全程只需5h,相比培养法需2天以上的鉴定时间,显著改善了厌氧菌检测周转时间。且该方法易于操作,不需要特殊的知识或技能。在检测成本上,液相芯片法检测1个样品仅需要80元左右,低成本高效益,更符合基层机构的实际情况。液相芯片平台可根据需求自由增减目标数量,更易满足不同研究领域的要求。JAKUB等<sup>[15]</sup>利用该技术成功建立一种快速检测7种食物和水源性感染病毒的多重检测系统,显示高特异度和稳健性。因此液相芯片技术为病原菌检测提供了有前景的平台,但是该平台也存在不足:仅能检测已知序列病原菌。

在开发分析方法时,我们进行了试剂和反应条件的优化,以达到最佳的性能。实验优化包括不对称多重扩增中的引物比例、扩增期间的退火温度和时间、PCR产物用量、杂交条件、SAPE浓度和孵育时间。值得注意的是,在不对称PCR中优化生物素标记与非标记引物的比例显著提高了杂交效率,这可能是大量生物素化单链DNA增加了与探针微球的结合机率。而标记与非标记引物间的浓度比并非倍数越高,MFI值越大,最终确定当两者比值为4:1时,各厌氧菌目标序列能达到最优的结合,提示上/下游引物的含量比例是影响不对称PCR效率的关键因素<sup>[16]</sup>。实验发现杂交反应时PCR产物和杂交温度对MFI值影响较大。PCR产物用量并非越多越好,超过5 $\mu$ l时,目标信号反而降低,这可能是由于大量剩余的生物素化引物与PCR产物竞争性地结合链霉亲和素(SA-PE)所致。而杂交温度过高,目标信号降低,温度过低,背景信号升高,目标信号不稳定。本研究试验52℃较为合适,能保证杂交反应的特异度和稳定性。

本文研究的新型检测系统能够在高通量反应中同时检测和识别多种厌氧菌独特的DNA靶标,具有良好的灵敏度和特异度。各目标菌液100cfu/ml以上的浓度与测得的MFI值呈线性( $r^2 \geq 0.95$ ),具有定量的效果<sup>[17]</sup>。重复性评价发现批内和批间MFI值的变异系数虽然在10%左右,但数值均保持在1000以上,这些偏差并不影响最终的结果判断。本研究同时存在一些缺点:一是属于小样本研究事件,有待扩大数量评估临床应用。目前仅应用于血培养液的检测,理想情况下该检测方法应直接用于全血标本,而不是血液培养,以增加效益,这也将是我们未来测试的重点。二是快速检测方法敏感度有待提高,下一步我们计划通过再优化液相芯片的反应体系,提高检测方法的灵敏度。三是液相芯片法前期依赖核酸扩增,存在污染的可能性,需对操作流程做好标准化规范。

综上,依赖传统的细菌培养对厌氧菌诊断存在多种局限,难以达到早诊断早治疗的目的。本研究开发了一种将多重PCR与探针微球杂交技术相结合的厌氧菌检测系统,并对该体系的检测参数进行优化及临床样本验证,证实了这是一种可靠、快速、高效、价廉的检测病原体的方法,以期对临床常见厌氧菌血流感染诊断提供快速帮助。

#### 参考文献:

[1] GAJDÁCS M, SPENGLER G, URBÁN E. Identification and antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: rubik's cube of clinical microbiology? [J]. Antibiotics (Basel), 2017, 6(4):25.

- [2] GAJDÁCS M, ABRÓK M, LÁZÁR A, et al. Anaerobic blood culture positivity at a University Hospital in Hungary: A 5-year comparative retrospective study[J]. Anaerobe, 2020, 63(Suppl 2):102200.
- [3] WATANABE T, HARA Y, YOSHIMI Y, et al. Application of MALDI-TOF MS to assess clinical characteristics, risk factors, and outcomes associated with anaerobic bloodstream infection: a retrospective observational study[J]. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 2021,20(1):42.
- [4] 熊燕,张虹,陈炎添.63株厌氧菌血流感染的病原菌分析及原发感染疾病调查[J].检验医学,2018,33(6):521-524.
- XIONG Yan, ZHANG Hong, CHEN Yantian. Pathogen analysis of 63 isolates of anaerobic bacteria for bloodstream infection and investigation of primary infectious diseases[J]. Laboratory Medicine,2018,33(6):521-524.
- [5] DE KEUKELEIRE S, WYBO I, NAESSENS A, et al. Anaerobic bacteraemia: A 10-year retrospective epidemiological survey[J]. Anaerobe, 2016, 39:54-59.
- [6] 邸师红,马倩,代超,等.重症监护病房脓毒血症患者病原学分布及死亡高危因素分析[J].现代检验医学杂志,2020,35(3):141-145.
- DI Shihong, MA Qian, DAI Chao, et al. Etiology distribution and risk factors of death in patients with severe sepsis in intensive care unit[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine,2020,35(3):141-145.
- [7] 陈蓉,刘学杰,徐蓉,等.上海地区厌氧菌检验室间质量评价[J].检验医学,2018,33(2):156-159.
- CHEN Rong, LIU Xuejie, XU Rong, et al. External quality assessment for anaerobic bacterium detection in Shanghai[J]. Laboratory Medicine,2018,33(2):156-159.
- [8] RESLOVA N, MICHNA V, KASNY M, et al. xMAP technology: Applications in detection of pathogens[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8:55.
- [9] 许红丽,邓任堂,陈梅莲,等.液相芯片技术快速检测CYD2C9,CYD2C19,CYD4F2,VKORC1及ABCB1基因多态性[J].中华检验医学杂志,2019,42(12):1042-1050.
- XU Hongli, DENG Rentang, CHEN Meilian, et al. Rapid detection of CYP2C9, CYP2C19, CYP4F2, VKORC1 and ABCB1 gene polymorphisms by liquid phase chip technology[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine,2019,42(12):1042-1050.
- [10] 邱会茹,王佳琳,薛文成,等.PCR-HRM方法分析16S rRNA基因进行细菌鉴定的可行性研究[J].现代检验医学杂志,2019,34(3):37-41.
- QIU Huiru, WANG Jialin, XUE Wencheng, et al. Feasibility study on analysis of 16S rRNA gene for bacterial identification by PCR-HRM method[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(3):37-41.
- [11] STEPHEN A, SHUBHAGATA D, SHERRY D, et al. xMAP cookbook: A collection of methods and protocols for developing multiplex assays with xMAP Technology[M]. 4nd Ed. Austin, TX: Luminex, 2018.



- LEI Zhouman. Application value of white blood cells count, C-reactive protein and PCT in the diagnosis of acute appendicitis in children [J]. Clinical Medicine, 2020, 40(3): 20-22.
- [4] 冯伟, 赵旭峰, 崔华雷. 血液学指标在儿童复杂性阑尾炎诊断中的应用进展 [J]. 山东医药, 2020, 60(3): 105-109.
- FENG Wei, ZHAO Xufeng, CUI Hualei. The application progress of hematological indexes in the diagnosis of complex appendicitis in children [J]. Shandong Medical Journal, 2020, 60 (3): 105-109.
- [5] GORTER R R, WASSENAAR E C E, DE BOER O J, et al. Composition of the cellular infiltrate in patients with simple and complex appendicitis [J]. Journal of Surgical Research, 2017, 214: 190-196.
- [6] THIELE J R, ZELLER J, BANNASCH H, et al. Targeting C-reactive protein in inflammatory disease by preventing conformational changes [J]. Mediators of Inflammation, 2015, 2015: 372432.
- [7] FUJII T, TANAKA A, KATAMI H, et al. Applying the pediatric appendicitis score to predict complicated appendicitis in children [J]. Pediatrics International, 2021, 64 (1): e14918.
- [8] 袁斌, 张家德, 彭建明, 等. 血液中 PCT, CRP 在儿童急性阑尾炎并发腹膜炎的应用 [J]. 哈尔滨医药, 2021, 41 (3): 86-87.
- YUAN Bin, ZHANG Jiade, PENG Jianming, et al. Application of PCT, CRP in acute appendicitis with peritonitis in children [J]. Harbin Medical Journal, 2021, 41 (3): 86-87.
- [9] 邱康华. 中性粒细胞 / 淋巴细胞比值与肝脏疾病关系的临床研究进展 [J]. 赣南医学院学报, 2019, 39(1): 101-104.
- QIU Kanghua. Clinical research progress in the relationship between neutrophil-to-lymphocyte ratio and liver diseases [J]. Journal of Gannan Medical University, 2019, 39 (1): 101-104.
- [10] 林忠泰, 魏少明. 中性粒细胞 / 淋巴细胞比值在急性复杂性阑尾炎诊断中的临床价值 [J]. 中外医学研究, 2020, 18(28): 73-75.
- LIN Zhongtai, WEI Shaoming. Clinical value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in the diagnosis of complicated acute appendicitis [J]. Chinese and Foreign Medical Research, 2020, 18 (28): 73-75.
- [11] HAJIBANDEH S, HAJIBANDEH S, HOBBS N, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts acute appendicitis and distinguishes between complicated and uncomplicated appendicitis: A systematic review and meta-analysis [J]. American Journal of Surgery, 2020, 219 (1): 154-163.
- [12] SEVINÇ M M, KINACI E, ÇAKAR E, et al. Diagnostic value of basic laboratory parameters for simple and perforated acute appendicitis: An analysis of 3 392 cases [J]. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg, 2016, 22(2): 155-162.
- [13] YAMASHITA H, YUASA N, TAKEUCHI E, et al. Diagnostic value of procalcitonin for acute complicated appendicitis [J]. Nagoya J Med Sci, 2016, 78 (1): 79-88.
- [14] 张林, 张聪, 李勇, 等. 白介素 -6、降钙素原及 C-反应蛋白对儿童急性阑尾炎伴穿孔的预测价值研究 [J]. 临床小儿外科杂志, 2021, 20(8): 749-753.
- ZHANG Lin, ZHANG Cong, LI Yong, et al. Predictive values of interleukin-6, procalcitonin and C-reactive protein in acute appendicitis with perforation in children [J]. Journal of Clinical Pediatric Surgery, 2021, 20 (8): 749-753.
- [15] DESTEK S, GÜL V O, MENTEŞ M Ö, et al. Diagnostic efficacy of serum procalcitonin, IL-6, IL-2, and D-dimer levels in an experimental acute appendicitis model [J]. Turk J Gastroenterol, 2019, 30 (7): 641-647.
- [16] BU Xiangmao, CHEN Jiahong, WAN Yanzhen, et al. Diagnostic value of D-Dimer combined with WBC count, neutrophil percentage and CRP in differentiating between simple and other severe appendicitis in children [J]. Clinical Laboratory, 2016, 62 (9): 1675-1681.
- [17] FENG Wei, ZHAO Xufeng, LI Miaomiao, et al. A clinical prediction model for complicated appendicitis in children younger than five years of age [J]. BMC Pediatr, 2020, 20(1): 401.

收稿日期: 2022-06-21

修回日期: 2022-12-14

(上接第80页)

- [12] SHE R C, BENDER J M. Advances in rapid molecular blood culture diagnostics: healthcare impact, laboratory implications, and multiplex technologies [J]. J Appl Lab Med, 2019, 3(4): 617-630.
- [13] PLIAKOS E E, ANDREATOS N, SHEHADEH F, et al. The cost-effectiveness of rapid diagnostic testing for the diagnosis of bloodstream infections with or without antimicrobial stewardship [J]. Clin Microbiol Rev, 2018, 31(3): e00095-17.
- [14] YAN Yong, LUO Jianyong, CHEN Yin, et al. A multiplex liquid-chip assay based on Luminex xMAP technology for simultaneous detection of six common respiratory viruses [J]. Oncotarget, 2017, 8(57): 96913-96923.
- [15] HRDY J, VASICKOVA P, NESVADBOVA M, et al. MOL-PCR and xMAP technology: A multiplex system for fast detection of food- and waterborne viruses [J]. Journal of Molecular Diagnostics, 2021, 23(6): 765-776.
- [16] MARIMUTHU C, TANG T H, TOMINAGA J, et al. Single-stranded DNA (ssDNA) production in DNA aptamer generation [J]. Analyst, 2012, 137(6): 1307-1315.
- [17] WANG Huiyu, WU Shaoqiang, JIANG Li, et al. Establishment and optimization of a liquid bead array for the simultaneous detection of ten insect-borne pathogens [J]. Parasit Vectors, 2018, 11(1): 442.

收稿日期: 2022-09-30

修回日期: 2022-12-16