

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.09.008

液相芯片技术检测儿童急性呼吸道感染病原体的研究^{*}

曹广进¹, 张福真¹, 汉聪慧¹, 胡亮彬², 李 凌^{1△}, 曹东林^{2▲}

(1. 南方医科大学公共卫生学院三级生物安全实验室, 广州 510515;

2. 广东省第二人民医院临床检验中心, 广州 510317)

摘 要:目的 探讨液相芯片技术快速检测呼吸道病原体的可行性, 为重大传染病病原体核酸快速应急检测平台的建立提供实验依据。**方法** 采用 xTAG[®] Respiratory Viral Panel Fast v2 试剂盒对 74 例咽拭子临床标本进行检测, 结果与实时荧光定量 PCR(RT-PCR)进行比较。**结果** 74 例咽拭子临床标本经液相芯片技术与 RT-PCR 检测, 阳性率分别为 77.0% 和 68.9%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 其中呼吸道合胞病毒、鼻病毒、肠道病毒、甲型 H1N1 流感病毒、腺病毒及人博卡病毒检出率差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 液相芯片技术可以较准确地鉴定呼吸道病原体和检测混合感染的临床标本, 具有快速、高通量等优势, 可应用于呼吸道病原体的快速应急检测。

关键词:液相芯片技术; 呼吸道病原体; 应急检测

中图分类号:R183.3

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)09-1179-05

Study on detection of acute respiratory infection pathogen in children by using liquid-phase microarray^{*}

CAO Guangjin¹, ZHANG Fuzhen¹, HAN Conghui¹, HU Liangshan², LI Ling^{1△}, CAO Donglin^{2▲}

(1. BSL-3, School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou,

Guangdong 510515, China; 2. Department of Clinical Laboratory Center, Guangdong Second People's Hospital, Guangzhou, Guangdong 510317, China)

Abstract: **Objective** To explore the feasibility of rapid detection of respiratory pathogens with liquid-phase microarray technology and provide experimental basis for the establishment of rapid emergency detection platform for nucleic acid of major infectious pathogens. **Methods** The 74 cases of pharyngeal swab clinical specimens were detected with xTAG[®] Respiratory Viral Panel Fast v2 kit and fluorescence quantitative RT-PCR. **Results** The positive rates of 74 clinical samples of pharyngeal swab were 77.0% and 68.9% respectively by using liquid-phase microarray and RT-PCR, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Among them, respiratory syncytial virus, Rhinovirus, Enterovirus, H1N1, Adenovirus and Human Bocavirus had statistically significant differences in the detection rates ($P < 0.05$). **Conclusion** Liquid-phase microarray technology can accurately identify respiratory pathogens and detect clinical samples of mixed infection, which has advantages of rapid and high throughput. This method can be applied to rapid emergency detection of respiratory pathogens.

Key words: liquid-phase microarray; respiratory pathogen; emergency detection

突发公共卫生事件的应急处理是医护人员工作的重点, 其中能够对重大传染病的病原体核酸进行快速检测, 更是应急处理的关键。近年来, WHO 报道在全球范围内急性呼吸道疾病是传染性疾病预防和死亡的主要原因。每年大约有 400 万人死于急性呼吸道疾病, 其中婴儿、儿童和老年人的病死率非常高, 绝大部分分布在中低收入国家。而导致急性呼吸道疾病最常见的病原体是病毒, 或者是细菌与病毒的混合

感染。目前已发现超过 20 种呼吸道病毒能够引起急性呼吸道疾病, 而且病毒容易发生突变, 从而产生了易感人群不能抵抗的新型病毒, 同时这类新型病毒大多都具有高致病性的, 导致近几年来高致病性病毒引起的急性呼吸道疾病的病例报道时有发生^[1-3]。因为急性呼吸道疾病的临床症状不典型, 所以如何通过实验室快速检测呼吸道病原体是诊断的关键。

液相芯片技术是一种使用悬浮在液体中的荧光

^{*} 基金项目: 广东省级财政技术研究开发与推广应用专项资金项目(粤财工[2013]401 号)。

作者简介: 曹广进, 男, 在读硕士, 主要从事病原微生物方向的研究。 △ 通信作者, E-mail: lilong@smu.edu.cn; ▲ 共同通信作者,

E-mail: caodl@126.com。

编码微球作为反应及信号检测载体的,集流式细胞术、激光技术、高速数字信号处理和计算机等技术于一体的高通量分子生物检测技术^[4]。液相芯片技术在 20 世纪 90 年代中期得到蓬勃发展,美国 Luminex 公司研发了 XMAP 技术,并获得了美国食品药品监督管理局(FDA)可用于临床诊断的认证^[5]。液相芯片技术具有高通量、高灵敏度和高特异度等优点。本文应用液相芯片技术对 74 例咽拭子临床标本进行检测,同时与实时荧光定量 PCR(RT-PCR)技术进行比较,评价液相芯片技术在呼吸道病原体快速检测的应用前景。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2017 年 7—9 月于广东省第二人民医院就诊的 74 例患有疑似急性呼吸道疾病伴发热的门诊患者的咽拭子,包括男 41 例、女 33 例;年龄 1 个月至 9 岁。所有标本收集后放置于 -80°C 保存。

1.2 仪器与试剂 xTAG[®] Respiratory Viral Panel Fast v2 试剂盒(美国 Luminex 公司,可平行检测 10 种病毒:呼吸道腺病毒、甲型 H1N1 流感病毒、乙型流感病毒、呼吸道合胞病毒、人偏肺病毒、鼻病毒、肠病毒、副流感病毒、冠状病毒及人博卡病毒);QIAamp MiniElute Virus spin kit(德国 Qiagen 公司);核酸检测 RT-PCR 试剂盒(探针法)(中国中山大学达安基因公司);AxyPrep PCR 清洁试剂盒(Axygen 公司);所有试剂均在有效期内使用;Luminex XMAP 液态悬浮芯片仪(美国 Luminex 公司);Roche Light Cycler 96 RT-PCR 仪;SENSOQUEST Labcycler PCR 仪;Gel-Doc-It 荧光看胶仪。

1.3 方法

1.3.1 液相芯片检测 (1)标本预处理:准备 100 mL 足量的灭菌生理盐水,分别向 74 例咽拭子试管中加入 600 μL 生理盐水,充分混匀。其中 200 μL 样品用于液相芯片检测,200 μL 用于 RT-PCR 检测,最后的 200 μL 作为重复实验的备份样品保存在 -80°C 中。(2)核酸的提取:同一份咽拭子样品,分别取 200 μL 样品液用 Qiagen QIAamp MinElute Virus Spin kit 核酸提取试剂盒手工提取咽拭子样品的核酸。具体操作按照试剂盒操作手册进行,最后分别得到 100 μL 的核酸洗脱液,其中 100 μL 核酸洗脱液用于液相芯片检测,另外 100 μL 用于 RT-PCR 检测。(3)多重 RT-PCR 反应:将 xTAG[®] Respiratory Viral Panel Fast v2 Primer Mix、xTAG[®] OneStep Buffer(5X)、xTAG[®] dNTP Mix 和不含 xTAG[®] RNase 的水解冻至室温。分别震荡混匀 2~5 s 并短暂离心 2~5 s 使试剂沉至底部。准备使用前,从冰箱取出 xTAG[®] OneStep Enzyme Mix,使用后立即放回冰箱,通过颠倒和轻弹试管进行混合,短暂离心 2~5 s 使试剂沉至底部。整个 PCR Master Mix 的配置需要在冰上进行。按照一个 0.2 mL PCR 管混合 1.3 μL 的

xTAG[®] RNase-free Water、4.0 μL 的 xTAG[®] OneStep Buffer(5X)、1.1 μL 的 xTAG[®] dNTP Mix、2.0 μL 的 xTAG[®] Respiratory Viral Panel Fast v2 Primer Mix 和 xTAG[®] Onestep Enzyme Mix 共 10.0 μL 的体系的比例配制 78 例的试剂量,其中包含了 74 例咽拭子实验标本和 1 例阴性对照质控品;将其涡旋振荡 5 s 后短暂离心 2~5 s 将混合试剂沉至底部。取出 10 μL 的 PCR Master Mix,分配至冰盒上的 0.2 mL 的 PCR 管中。每个 PCR 管分配 10 μL 提取的核酸标本,加样立即盖上盖子。对于 PCR 阴性对照标本,将 10 μL 不含 RNase 的水加入管中,最后一个管必须为阴性对照样品。对 PCR 管进行 2~5 s 震荡混合以混匀试剂,并离心 2~5 s,使试剂沉至底部。将 PCR 管放置于预热(50°C)的 PCR 仪上,按下列反应条件进行多重 PCR 反应: 50°C 20 min,1 次循环; 95°C 15 min,1 次循环; 95°C 30 s, 59°C 30 s, 72°C 30 s,36 次循环; 72°C 2 min,1 次循环;维持在 4°C ,结束反应。PCR 仪升降温速度为最快速度。(4)分子杂交:将 xTAG[®] Respiratory Viral Panel Fast v2 试剂盒提供的 xTAG[®] Respiratory Viral Panel Fast v2 Bead Mix 和 xTAG[®] Reporter Buffer 解冻至室温。震荡混合 xTAG[®] Reporter Buffer 2~5 s。震荡混合 xTAG[®] 0.22 SAPE 2~5 s。以下全程在冰上避光操作。在 15 mL 聚丙烯离心管内,用 xTAG[®] Reporter Buffer 将 SAPE 稀释 74 倍,用量是按照一个 PCR 管混合 74.0 μL 的 xTAG[®] Reporter Buffer 和 0.1 μL 的 xTAG[®] 0.22 SAPE 作为 SAPE report solution,配制 78 例标本的试剂量,使用封口膜覆盖离心管口并避光涡旋振荡 10 s,备用。对装有 xTAG[®] Respiratory Viral Panel Fast v2 Bead Mix 的试管进行 10 s 的震荡混合,然后进行 10 s 超声处理,使微球分散,重复此操作 1 次。将 RT-PCR 产物涡旋振荡 5 s,短暂离心将产物沉至底部。以每个 PCR 管空中加入 20 μL 的 xTAG[®] Respiratory Viral Panel Fast v2 Bead Mix、5 μL 的 RT-PCR 产物和 74.0 μL 的 SAPE reporter solution 的体系,配置 76 例标本和 2 个阴性对照 PCR 管,并且按此顺序依次加入试剂,每加 1 种试剂后用移液枪反复吹打 5 次,完成配置后不得离心操作。提前预热 PCR 仪至 45°C ,杂交程序为: 45°C ,20 min。(5) xTAG[®] Respiratory Viral Panel Fast 检测 预热 Luminex XMAP 液态悬浮芯片仪至 40°C ;更换好足量的鞘液;运行检测标本步骤,使用 TDAS RVP Fast 进行数据分析。

1.3.2 RT-PCR 检测 使用呼吸道腺病毒、甲型 H1N1 流感病毒、乙型流感病毒、呼吸道合胞病毒、人偏肺病毒、鼻病毒、肠病毒、副流感病毒、冠状病毒、人博卡病毒核酸检测 RT-PCR 试剂盒(探针法)对之前步骤提取到的 74 例咽拭子临床标本的 100 μL 核酸,

续表 2 xTAG® Respiratory Viral Panel Fast 和 RT-PCR 法对每种呼吸道病毒检测结果比较 (n=74)

病毒	xTAG® Respiratory Viral Panel Fast	RT-PCR		χ^2	P	灵敏度 (%)	特异度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)
		P	N						
副流感病毒	P	0	1	—	—	0.00	98.65	0.00	100.00
	N	0	73						
冠状病毒	P	1	0	—	—	100.00	100.00	100.00	100.00
	N	0	73						
H1N1	P	1	4	6.201	0.013	100.00	94.52	20.00	100.00
	N	0	69						

注:P 代表阳性,N 代表阴性;— 为此项无数据

3 讨 论

在新发和再发传染病威胁人类健康的时代,应该重视急性传染病的预防和控制措施。急性传染性疾病病原体的快速检测技术是一个日新月异的话题。病原微生物的快速检测在传染病的诊治中至关重要,为临床诊断带来积极的影响。病毒和细菌均可引起急性呼吸道疾病,而且基于传播途径简单,传播范围广泛等特点,呼吸道病毒引起的急性呼吸道疾病尤为突出。目前,呼吸道病原体检测的常规方法(RT-PCR)的灵敏度和特异度有一定的局限性,且所需要的样本量多,实验检测耗费的时间长,给急性呼吸道传染性疾病的应急处理带来了困难。

本研究采用的液相芯片技术可平行检测 10 种呼吸道病毒,在本研究的 74 例标本中检测出其中 8 种,未检出乙型流感病毒和人偏肺病毒。同一例标本经液相芯片与 RT-PCR 检测,两者检测结果的一致率高,且大部分实验结果提示液相芯片灵敏度高于 RT-PCR。本研究还发现 xTAG® Respiratory Viral Panel Fast 液相芯片法对每种病毒所检出的特异度很好(均>89.66%),这与国内相关报道的相似^[6]。伊洁等^[7]研究表明,xTAG® Respiratory Viral Panel Fast 液相芯片法对呼吸道病毒的检测性能优于其他方法。本研究将 74 例临床标本分别通过液相芯片技术与 RT-PCR 技术检测,对结果进行对比后发现,共有 15 例结果不一致。经过对临床标本进行 PCR 及测序发现,测序结果跟 RT-PCR 结果一致,所以判定这 15 例不一致的结果为液相芯片的假阳性结果。分析原因为以下几点:(1)国内其他研究发现液相芯片的灵敏度很高,检出下限可达 10 copy/ μ L^[8];(2)实验过程中产生气溶胶导致交叉污染。对以上原因可提出如下的解决办法:(1)多重 PCR 扩增和杂交反应在不同的实验室内进行,防止气溶胶污染;(2)全程使用带滤芯移液枪枪头,防止气溶胶污染;(3)保持杂交反应实验室的洁净,减少气溶胶污染;(4)实验操作过程轻微、快速,减少气溶胶的产生。通过以上办法可以减少液相芯片的假阳性结果,提高与 RT-PCR 方法的一致率和特异度。

本研究主要的研究对象是儿童,急性呼吸道感染是一种常见和多发的儿科呼吸道传染病^[9-11]。JOHNSTONE 等^[12]研究报道,90%以上的儿童呼吸道感染由非细菌性病原菌引起,其中有腺病毒、呼吸道合胞病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒和副流感病毒等呼吸道病毒,以及肺炎支原体最为常见,通常以混合感染形式出现,且上呼吸道标本的混合感染率较高,病原学表现较为复杂。其他研究发现 7—9 月儿童上呼吸道混合感染率为 27%^[12],与本研究检测的混合感染率相近,该研究还表明混合感染主要是肠道病毒或鼻病毒跟其他病毒混合感染,与本研究所发现的混合感染情况相符。文献^[13-16]报道引起儿童急性上呼吸道感染的主要致病原有流感病毒、肠道病毒、鼻病毒、腺病毒和呼吸道合胞病毒,本研究所使用的试剂盒对以上病毒及其混合感染均可进行快速高效的检测,为儿童呼吸道感染的临床诊断提供准确的病原学参考依据。还有研究表明,儿童上呼吸道感染 10%~20%与鼻病毒相关,本研究中鼻病毒检出率为 29.7%,检出率的略高可能与病毒季节性流行有关。肺炎支原体也是能够引起儿童呼吸道感染的常见病原体之一^[17-18]。本研究使用的液相芯片试剂盒的局限之处在于不能检出肺炎支原体,后续可以根据肺炎支原体核酸的保守序列设计探针偶联到微球上,扩大试剂盒应用范围,便于作出更全面的快速临床诊断。

虽然 xTAG® Respiratory Viral Panel Fast 液相芯片试剂盒较贵,但相对于常规方法 RT-PCR 所需要的试剂耗材、人力、物力、耗时的总和要少。整个实验操作简单,完整的流程只需 4~6 h。液相芯片技术凭借以微球作为载体锚定多种病原体核酸探针的技术及高通量的优势,识别患者的多种病原体混合感染的情况,为患者的临床治疗提供可靠而准确的临床诊断,减少不必要的医疗费用。液相芯片技术凭借灵敏度高、特异度好等优点,在疾病诊断领域及应对重大传染病的爆发流行和突发公共卫生应急事件方面有非常广阔的应用前景^[19]。

参考文献

[1] Control of Communicable Diseases Manual 20th Edition.

- American Public Health Association (2015)[M]. APHA Press, Washington DC, 2015.
- [2] LI Q, ZHOU L, ZHOU M H, et al. Epidemiology of human infections with avian influenza a (H7N9) virus in China[J]. N Engl J Med, 2014, 370(6): 520-532.
- [3] JONGES M, WELKERS M R, JEENINGA R E, et al. Emergence of the Virulence-Associated PB2 E627K substitution in a fatal human case of highly pathogenic avian influenza virus a(H7N7) infection as determined by illumina Ultra-Deep sequencing[J]. J Virol, 2014, 88(3): 1694-1702.
- [4] 张保强, 张晓. Luminex 液态芯片在临床及科研中的应用[J]. 当代医学, 2012, 18(4): 18-20.
- [5] 黎俊宏, 姚萍, 李琼, 等. 多重 PCR 液相芯片技术在腹泻病原体检测中的应用[J]. 现代预防医学, 2017(18): 3390-3394.
- [6] 冯伟明, 顾秀丽, 隋文君, 等. xTAG(R) GPP 多重核酸技术在北京地区感染性腹泻诊断中的应用及流行病学研究[J]. 中华医学杂志, 2015, 95(6): 435-439.
- [7] 伊洁, 徐英春, 窦亚玲. 多重荧光定量 PCR 和液态芯片技术对下呼吸道病毒检测的应用比较[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(7): 544-547.
- [8] 王洁, 王卫萍, 胡毓安, 等. 靶序列富集多重 PCR-液相芯片联合检测 4 种常见呼吸道病毒的初步应用[J]. 医学研究生学报, 2016, 29(9): 958-963
- [9] DEL VALLE-MENDOZA J, ORELLANA-PERALTA F A, VERNE E, et al. High prevalence of mycoplasma pneumoniae and chlamydia pneumoniae in children with acute respiratory infections from Lima, Peru [J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0170787.
- [10] WISHAUP T J O, PLOEG T V, SMEETS L C, et al. Pitfalls in interpretation of CT-values of RT-PCR in children with acute respiratory tract infections[J]. J Clin Virol, 2017, 90(1): 1-6.
- [11] 汤美玲, 刘洪根, 胡丽娟. 深圳市儿童急性呼吸道感染的病原学流行特点[J]. 临床儿科杂志, 2016, 34(10): 796-797.
- [12] JOHNSTONE J, MAJUMDAR S R, FOX J D, et al. Viral infection in adults hospitalized with community-acquired pneumonia: prevalence, pathogens, and presentation[J]. Chest, 2008, 134(6): 1141-1148.
- [13] 齐英, 陈叶, 王冰, 等. 沈阳市学龄前儿童上呼吸道感染病原谱及流行特征分析[J]. 国际病毒学杂志, 2018, 25(5): 1673-4092.
- [14] 谢爱香. 呼吸道九项病原体检测在儿童呼吸道感染中的应用价值[J]. 实验与检验医学, 2018, 36(3): 1129-1674.
- [15] 顾艳红, 刘兰吉, 孙利, 等. 儿童急性上呼吸道感染夏季和冬季病毒病原学分析[J]. 中国全科医学, 2012, 15(35): 4079-4082.
- [16] 许晶, 张蕾, 史伟, 等. 西安市儿童呼吸道病毒感染谱分析[J]. 中华疾病控制杂志, 2015, 19(7): 663-666.
- [17] 王慧玲. 鼻病毒感染研究进展[J]. 医学综述, 2010, 16(13): 2032-2034.
- [18] 赖科峰, 连距飞, 陈柳青, 等. 广州地区 12 359 例急性呼吸道感染儿童呼吸道 9 项病原体检测结果分析[J]. 中国妇幼保健, 2018, 33(13): 1001-4411.
- [19] 闫俊平, 曹东林. 液相芯片技术在传染病快速诊断中的应用[J]. 现代医院, 2017, 17(12): 1782-1785.

(收稿日期: 2018-10-25 修回日期: 2019-01-22)

(上接第 1178 页)

- [10] 黄业亚, 孙鸿高. 尿沉渣定量检测白细胞及细菌总数对尿路感染的诊断价值[J]. 海南医学, 2017, 28(14): 2309-2311.
- [11] BARAKE S S, EMRICK A, TABAK Y, et al. Impact of automation process on microbiological laboratory efficiency[J]. Open Forum Infect Dis, 2017, 4(Suppl 1): S593-S593.
- [12] KIM Y, PARK K G, LEE K, et al. direct identification of urinary tract pathogens from urine samples using the vitek MS system based on matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. Ann Lab Med, 2015, 35(4): 416-422.
- [13] WANG J, ZHANG Y, XU D W, et al. Evaluation of the sysmex UF-1000i for the diagnosis of urinary tract infection[J]. Am J Clin Pathol, 2010, 133(4): 577-582.
- [14] MONSEN T, RYDEN P. A new concept and a comprehensive evaluation of SYSMEX UF-1000i flow cytometer to identify culture-negative urine specimens in patients with UTI[J]. Euro J Clin Microbiol Infect Dis, 2017, 36(9): 1691-1703.
- [15] MONSEN T, RYDÉN P. Flow cytometry analysis using sysmex UF-1000i classifies uropathogens based on bacterial, leukocyte, and erythrocyte counts in urine specimens among patients with urinary tract infections[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(2): 539-545.
- [16] SHANG Y J, WANG Q Q, ZHANG J R, et al. Systematic review and meta-analysis of flow cytometry in urinary tract infection screening[J]. Clin Chim Acta, 2013(424): 90-95.

(收稿日期: 2018-10-09 修回日期: 2018-12-28)