

## · 呼吸道感染 · 论著 ·

# 基于微流控芯片技术同时检测 8 种常见呼吸道病原体方法的建立及应用

陈毓<sup>1</sup> 吴紫伊<sup>2</sup> 徐杭聪<sup>1</sup> 宋小军<sup>3</sup> 陈乐扬<sup>2</sup> 吕火焯<sup>3</sup> 朱坤<sup>4</sup> 金大智<sup>1</sup>

<sup>1</sup>杭州医学院检验医学院、生物工程学院, 杭州 310053; <sup>2</sup>杭州医学院临床医学院, 杭州 310053; <sup>3</sup>浙江省人民医院/杭州医学院附属人民医院检验中心, 杭州 310014; <sup>4</sup>北京源景泰生物科技有限公司, 北京 101102

通信作者: 金大智, Email: jind@hmc.edu.cn

**【摘要】 目的** 基于微流控芯片和快速荧光 PCR 技术建立针对 8 种常见呼吸道病原体(甲型流感病毒、乙型流感病毒、人博卡病毒、人偏肺病毒、副流感病毒、肺炎支原体、肺炎衣原体及百日咳鲍特菌)的高通量、快速检测方法,为常见呼吸道病原体感染的临床诊断提供一种简便、快速的新技术方法。**方法** 设计优化针对共 8 种病原体的引物、探针及反应体系,设计可同时检测 8 种病原体的扇形微流控芯片,将 8 种反应液冻干预埋在微流控芯片不同孔道,对微流控芯片结合快速荧光 PCR 检测方法的特异性、灵敏度、重复性进行评价。同时,选取 2021 年浙江省人民医院检验中心采集的 192 份咽拭子样本,提取样本核酸,进行 8 种病原体测定,并与现有临床检测试剂进行比较。**结果** 本实验建立了基于微流控芯片和快速荧光 PCR 检测 8 种常见呼吸道病毒的方法,发现在  $10^2\sim 10^3$  拷贝/mL 时灵敏度最高,对多种呼吸道病原体无交叉反应,特异性好;重复性变异系数小于 5%。对收集的 192 份咽拭子样本进行检测,其中 115 份病原体核酸检测阳性,阳性率 59.89% (115/192),94 例为单一病原体感染,阳性率为 48.96% (94/192),主要感染病原体为副流感病毒;21 例为混合病原感染,阳性率为 10.94% (21/192),主要为副流感病毒和肺炎支原体混合感染。与临床现有核酸检测试剂盒相比,该方法检测甲型流感病毒、乙型流感病毒、肺炎支原体、肺炎衣原体、百日咳鲍特菌、人博卡病毒和人偏肺病毒的符合率均为 100.0%,副流感病毒检测的阳性预测值和阴性预测值分别为 96.0% (97/101) 和 97.8% (89/91)。**结论** 本实验建立的微流控芯片和快速荧光 PCR 技术检测 8 种常见呼吸道病原体方法,具有简便、快速、准确、高通量等优点,可用于临床呼吸道疾病的病原体筛查。

**【关键词】** 微流控芯片;快速荧光 PCR;呼吸道病原体;检测

**基金项目:** 国家卫生健康委员会科研基金 (WKJ-ZJ-2107); 浙江省大学生创新创业训练计划 (DS202313023080)

DOI:10.3760/cma.j.cn331340-20240511-00092

## Establishment and application of a method for simultaneous detection of eight common respiratory pathogens based on microfluidic chip technology

Chen Yu<sup>1</sup>, Wu Ziyi<sup>2</sup>, Xu Hangcong<sup>1</sup>, Song Xiaojun<sup>3</sup>, Chen Leyang<sup>2</sup>, Lyu Huoyang<sup>3</sup>, Zhu Kun<sup>4</sup>, Jin Dazhi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Laboratory Medicine, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, China; <sup>2</sup>School of Clinical Medicine, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, China; <sup>3</sup>Laboratory Medicine Center, Department of Clinical Laboratory, Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, China; <sup>4</sup>Beijing Origingene-tech Biotechnology Co. Ltd., Beijing 101102, China

Corresponding author: Jin Dazhi, Email: jind@hmc.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To establish a high-throughput and rapid detection method for eight common respiratory pathogens (including influenza A virus, influenza B virus, human bocavirus, human metapneumovirus, parainfluenza virus, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* and *Bordetella pertussis*) based on the microfluidic chip and rapid real-time quantitative PCR technologies, and provide a simple, rapid new technique for clinical detection of common respiratory pathogens. **Methods** Optimized primers, probes, and reaction systems were designed for the

detection of eight pathogens. A fan-shaped microfluidic chip capable of simultaneously detecting eight pathogens was developed. Eight reaction solutions were freeze-dried and prefabricated in different channels of the microfluidic chip. The specificity, sensitivity, and reproducibility of the microfluidic chip combined with a rapid fluorescence PCR detection method were evaluated. Furthermore, 192 throat swab samples collected from the Laboratory Center of Zhejiang Provincial People's Hospital in 2021 were tested for the eight pathogens by nucleic acid extraction and compared to existing clinical diagnostic kits. **Results** A method based on a microfluidic chip and rapid fluorescence PCR for detecting eight common respiratory pathogens was established. The sensitivity was the highest with the concentration ranging from  $10^2$  to  $10^3$  copies/mL. There was no cross-reactivity with other respiratory pathogens, indicating high specificity. The coefficient of variation for reproducibility was less than 5%. Among the 192 throat swab samples tested, 115 were positive for pathogen nucleic acids, with a positivity rate of 59.89% (115/192). Of these, 94 cases were single-pathogen infections, with a positive rate of 48.96% (94/192), and the predominant pathogen was parainfluenza virus. There were 21 cases of mixed infection, with a positive rate of 10.94% (21/192), and the predominant pathogens were parainfluenza virus and *Mycoplasma pneumoniae*. Compared to the nucleic acid detection kit used in clinical settings, this method demonstrated a 100.0% concordance for influenza A virus, influenza B virus, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, human bocavirus, and human metapneumovirus. The positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) for parainfluenza virus were 96.0% (97/101) and 97.8% (89/91), respectively. **Conclusions** The microfluidic chip-based method combined with rapid fluorescence PCR established in this study is simple, rapid, accurate and high-throughput for detection of eight common respiratory pathogens. It is suitable for clinical pathogen screening in respiratory diseases.

**[Key words]** Microfluidic chip; Rapid real-time quantitative PCR; Respiratory pathogens; Detection

**Fund program:** Scientific Research Fund of National Health Commission (WKJ-ZJ-2107); Zhejiang University Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program (DS202313023080)

DOI:10.3760/cma.j.cn331340-20240511-00092

急性呼吸道感染是中国和全球范围内感染性疾病发病和死亡的主要原因之一,近年来呈显著上升趋势<sup>[1-2]</sup>。呼吸道病原体之间存在相互作用,导致呼吸道疾病的临床症状相似,病原体不易区分<sup>[1]</sup>。因此,亟需针对临床呼吸道症候群的多种常见病原体,开发出快速、准确、高通量诊断和甄别的技术方法,对具有呼吸道感染症状的病原体开展连续、全面地检测和流行病学监测。

目前呼吸道病原体主要的检测手段包括病原体分离与鉴定、血清学诊断、ELISA、等温扩增、数字 PCR、宏基因组、毛细管电泳和荧光定量 PCR 等技术方法<sup>[3]</sup>。上述方法中,分离鉴定与血清学方法检测周期长,灵敏度低;ELISA、等温扩增、数字 PCR 及荧光定量 PCR 等技术为临床常用方法,但是检测的音量较低,无法满足大规模呼吸道感染样本筛查;宏基因组和毛细管电泳方法检测周期长,且操作繁琐<sup>[3]</sup>。而便携式高通量、快速检测技术不仅可用于大规模呼吸道感染患者筛查,还可在发热门诊、急诊及床

旁进行检测,结果产出快,使用范围广,因此是近年分子诊断的重要研发方向之一。

本试验研究针对甲型流感病毒、乙型流感病毒、人博卡病毒、人偏肺病毒、副流感病毒、百日咳鲍特菌、肺炎支原体和肺炎衣原体 8 种病原体,开发基于微流控芯片结合快速荧光 PCR 的高通量检测技术方法,实现一个样本平行检测多种呼吸道病原体,为常见呼吸道病原体感染的临床检测提供一种新技术方法。

## 材料与方法

### 一、材料

#### 1. 实验菌株

本试验采用呼吸道感染相关菌/毒株分别购自中国食品药品检定研究院(批号 370051-201801 和 370052-201801)和 ATCC(www.atcc.org),偏肺病毒核酸来自于二代测序阳性样本。菌毒株名称、来源和编号见表 1。

表 1 实验菌毒种及其编号

序号	菌毒种	菌毒种来源及编号
1	甲型 H1N1	ATCC VR-1736、PC01-PC04(370051-201801)、NC11(370051-201801)
2	甲型 H3N2	PC05(370051-201801)、NC12(370051-201801)
3	甲型 H7N9	PC07(370051-201801)、NC113(370051-201801)
4	甲型 H5N1	PC08(370051-201801)、NC14(370051-201801)
5	脑膜炎双球菌	ATCC 700532、NC01(370051-201801)
6	流感嗜血杆菌	NC02(370051-201801)
7	金黄色葡萄球菌	ATCC25923、NC03(370051-201801)
8	肺炎链球菌	NC04(370051-201801)
9	风疹病毒	NC05(370051-201801)
10	腮腺炎病毒	NC06(370051-201801)
11	呼吸道腺病毒(3型)	NC07(370051-201801)
12	呼吸道腺病毒(7型)	NC08(370051-201801)
13	呼吸道合胞病毒 B 型	NC09(370051-201801)
14	副流感病毒	ATCC VR-94、NC10(370051-201801)
15	B/Victoria	ATCC VR-1807、PC01-04(370052-201801)
16	B/Yamagata	PC05-08(370052-201801)
17	百日咳鲍特菌	ATCC 9797
18	肺炎支原体	ATCC 15531
19	肺炎衣原体	ATCC VR-1736
20	偏肺病毒	二代测序确认的临床样本

## 2. 临床样本

本研究于 2022 年 1—12 月从浙江省人民医院收集临床呼吸道咽拭子检测样本 192 份。该项研究已通过浙江省人民医院伦理委员会的论证和审查(审批号:2020KT026)。由于样本均为剩余样本且只进行呼吸道病原体检测,申请获批免知情同意。

## 3. 仪器和试剂

核酸提取试剂盒(货号:01-07-0001)和核酸提取仪(乾坤一代 32)购自北京源景泰科生物科技有限公司;qPCR Master Mix 购自珠海辉睿生物科技有限公司;RT-PCR Master Mix 购自上海辉睿生物科技有限公司;快速荧光 PCR 仪及配套微流控芯片购自北京源景泰科生物科技有限公司;引物与探针均由通用生物(安徽)股份有限公司合成并修饰;呼吸道病毒核酸六重联检试剂盒(PCR 荧光探针法)购自北京卓诚惠生生物科技股份有限公司(检测病原体

种类为:甲型流感病毒、乙型流感病毒、呼吸道合胞病毒、腺病毒、副流感病毒 I 型及副流感病毒 III 型,本试验仅对甲型流感病毒和乙型流感病毒进行检测);肺炎支原体/肺炎衣原体/腺病毒核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)购自郑州安图生物工程股份有限公司;百日咳杆菌核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)购自上海伯杰医疗科技股份有限公司;人博卡病毒核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)和人偏肺病毒核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)购自广州达安基因股份有限公司。

## 二、实验方法

### 1. 引物与探针设计

根据文献报道,筛选甲型流感病毒<sup>[4]</sup>、乙型流感病毒<sup>[5]</sup>、人博卡病毒<sup>[6]</sup>、人偏肺病毒<sup>[7]</sup>、副流感病毒<sup>[5]</sup>、肺炎支原体<sup>[8]</sup>、肺炎衣原体<sup>[9]</sup>及百日咳鲍特菌<sup>[10]</sup>共 8 种病原体的特异性基因序列作为靶基因,设计引物和探针。利用 Primer express 3.0.1 软件进行引物和探针设计,引物和探针的鸟嘌呤和胞嘧啶比率(GC%)控制在 40%~60%,扩增产物片段长度为 60~170 bp。通过 NCBI 的 BLAST 的在线工具上进行评价,初步验证引物和探针的特异性。引物探针序列见表 2。

### 2. 微流控芯片设置

将上述 8 种病原体对应的引物和探针及反应体系冻干在微流控芯片上,1~8 号流道分别是甲型流感病毒、乙型流感病毒、人博卡病毒、人类偏肺病毒、副流感病毒、百日咳鲍特菌、肺炎衣原体和肺炎支原体,微流控芯片孔道排布见图 1。



图 1 微流控芯片设置

表 2 实验引物和探针序列

病原体	引物/探针名称	序列(5'-3')	扩增片段长度(bp)	GenBank No/参考文献
hBoV	HBov-F	GAAGAGACACTGGCAGACAACCTC	74	MN072359
	HBov-R	AGCCTCTCTCCCCACTGTG		
	HBov-P	FAM-CTGCGGCTCTGCTCCTGTG-BHQ1		
hMpV	HmpV-F	CATAYAARCATGCTATATTTAAAAGAGTCTC	163	KY474538
	HmpV-R	CCTATYTCTGCAGCATATTTGTAATCAG		
	HmpV-P1	FAM-CAACHGCAGTGACACCYTCATCATTGCA-BHQ1		
	HmpV-P2	FAM-CAACAGCAGTAACACCCTCRTCATTGCA-BHQ1		
PIV	PIV-F	ACAYATACCAGGGAAGTACACAA	123	OQ791568
	PIV-R	ACCGACACTGGAAARCACAA		
	PIV-P	FAM-ATGARACCACCCCATGRCARCG-BHQ1		
Mp	MP-F	AACGACGATGTTGATGGTATTG	68	EF656612.1
	MP-R	GCTGTTTGTCTTCCCCTATCTA		
	MP-P	FAM-ACGCACCCCACTCGTGAACATG-BHQ1		
Cp	CP-F	AAACAAACCCAAAGGGCTATAAA	82	CP039761
	CP-R	AGACTTTGTCCAGYAGCTGTTGCT		
	CP-P	FAM-CCTTGCCAACAGACGCTGGCG-BHQ1		
InfA	InfA-F1	AGACCAATCTTGTGACCTCTG	105	OR637808
	InfA-F2	AGACCAATCCTGTGACCTCTG		
	InfA-F3	AGACCAATTCTGTGACCTCTG		
	InfA-R1	GGCATTTTGGACAAAGCGTCT		
	InfA-R2	GGCGTTTGGACAAACCGTCT		
	InfA-R3	GGCATTTTGGATAAAGCGTCT		
	InfA-P	FAM-TCACGCTCACCGTCCCAGTG		
InfB	InfB-F1	GCTGAAACTGCCRTGGGAG	73	OR630807
	InfB-R1	AATTGCTCTCYCTCTTCTGGTGATA		
	InfB-P	FAM-TCCCAATTTGCTCAAGAGCACCGA-BHQ1		
Bp	IS481-F2	TCGACATCAAGAAGCTGGG	105	CP118366
	IS481-R2	TGGCCACGAAGACGAAGT		
	IS481-P2	FAM-CGGTATCGCGTCCGTTGCC-BHQ1		
	IS1002-F3	AAGCCACCGCTACTACG	124	CP134883
	IS1002-R3	CGGATGTGACGGATTCC		
	IS1002-P3	Cy5-CTCCACGCACACCGCCC-BHQ1		

注:hBoV:人博卡病毒;hMpV:人偏肺病毒;PIV:副流感病毒;Mp:肺炎支原体;Cp:肺炎衣原体;InfA:甲型流感病毒;InfB:乙型流感病毒;Bp:百日咳鲍特菌

### 3. 质粒标准品的构建

根据设计引物使用的基因片段作为目的序列,合成带有目的序列的质粒标准品作为各病原体的阳性参考品。参照文献[11],将 8 种呼吸道病原体的靶基因序列插入至大肠埃希菌载体,构建重组质粒菌,测序鉴定。使用质粒提取试剂盒提取质粒,利用核酸/蛋白质荧光定量仪测定质粒浓度,计算拷贝数,后存至-80℃冰箱保存。

### 4. 样本核酸制备

对 192 份样本核酸提取采用北京源景泰科公司的核酸提取试剂盒,按照说明书步骤操作。

### 5. 反应体系和反应条件

将 5 μL 的 2× Reaction Buffer,0.5 μL 的 RT Enzyme Mix,上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL,探针(10 μmol/L)0.5 μL 冻干在每个反应孔道中。将提取的样本核酸注入 80 μL,自动分配到 8 个孔道中,每个孔道终体积为 10 μL。将加注样本核酸的芯片置于快速荧光 PCR 仪,反应条件为 50℃,5 min,95℃,8 s;进入循环,95℃,7 s,60℃,14 s,共 40 个循环,每个循环结束时采集荧光信号。

### 6. 灵敏度和重复性评价

选取甲型流感病毒、乙型流感病毒、人博卡病毒、人偏肺病毒、副流感病毒、百日咳鲍特菌、肺炎

衣原体和肺炎支原体共 8 种呼吸道病原体对应的 9 种标准质粒, 依次稀释至  $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$  和  $10^2$  拷贝/mL, 利用建立的微流控芯片结合快速荧光 PCR 方法进行扩增, 每个浓度进行 3 个重复, 根据循环阈值(cycle threshold, Ct)计算变异系数(CV)。

### 7. 结果判定标准

阳性对照 Ct 值应小于 38, 阴性对照 Ct 值无数据。检测样本 Ct 值小于 36 的样本判为阳性, 检测样本 Ct 值大于 36 的样本建议重做, 重做结果 Ct 值小于 40 为阳性, 否则为阴性。检测样本 Ct 值大于 40 或无数据判为阴性。

## 结 果

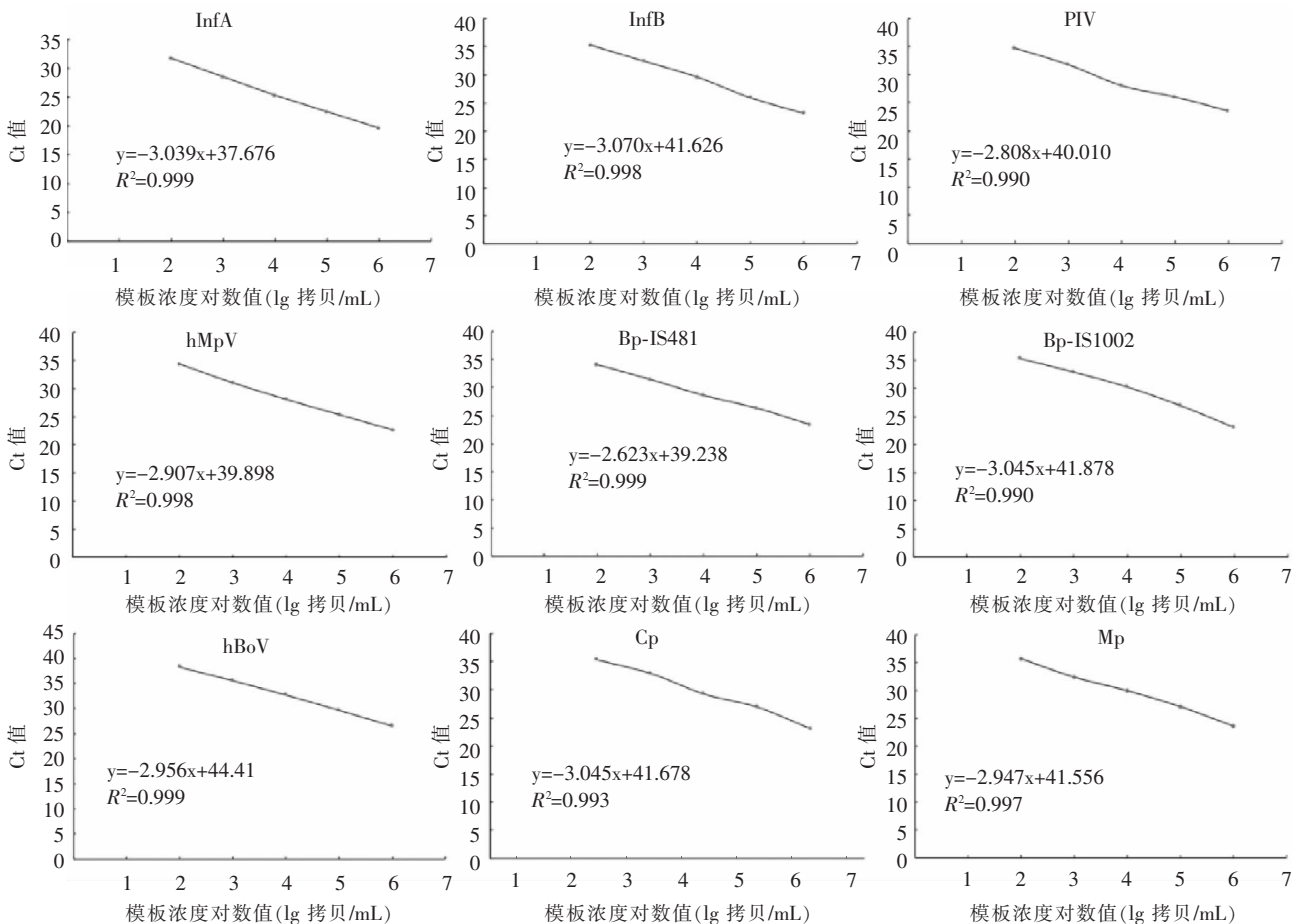
### 一、检测方法的特异性评价

本试验选取 8 种呼吸道病原体 (甲型流感病毒、乙型流感病毒、人博卡病毒、人偏肺病毒、副流

感病毒、肺炎支原体、肺炎衣原体及百日咳鲍特菌) 基因组保守基因作为检测靶点, 设计引物和探针, 通过 BLAST 比对确保引物和探针序列的特异性。同时, 选取表 1 中不同种呼吸道病原体进行特异性评价。结果显示本试验建立的基于微流控芯片结合快速荧光 PCR 方法能特异性检测对应的呼吸道病原体, 出现阳性扩增信号, 其他病原体均无信号产生, 说明本方法筛选的引物探针具有较高的特异性, 能够特异地检测上述 8 种呼吸道病原体。

### 二、检测方法的灵敏度测定

选取  $10^2$ ~ $10^6$  拷贝/mL 共 5 种浓度的重组质粒标准品, 用本研究建立的微流控芯片结合快速荧光 PCR 检测方法进行扩增, 以浓度的对数值为横坐标, 以 Ct 值为纵坐标作图, 分别得到 8 种呼吸道病原体检测反应体系的标准曲线, 如图 2 所示, 结果显示各标准曲线的相关系数  $R^2$  都大于 0.99, 呈良好



注: InfA: 甲型流感病毒; InfB: 乙型流感病毒; PIV: 副流感病毒; hMpV: 人偏肺病毒; Bp: 百日咳鲍特菌; hBoV: 人博卡病毒; Cp: 肺炎衣原体; Mp: 肺炎支原体; Ct: 循环阈值

图 2 8 种呼吸道病原体检测的标准曲线

的线性关系。8 种呼吸道病原体质粒检测的灵敏度评价结果见表 3,结果显示,甲型流感病毒、乙型流感病毒、副流感病毒、人偏肺病毒、百日咳鲍特菌和肺炎衣原体共 6 种病原体在  $10^2\sim 10^6$  拷贝/mL 均出现阳性扩增信号且 Ct 值均小于 36,表明  $10^2$  拷贝/mL 时灵敏度最高;人博卡病毒和肺炎支原体在  $10^3\sim 10^6$  拷贝/mL 均出现阳性扩增信号且 Ct 值均小于 36,表明  $10^3$  拷贝/mL 时灵敏度最高。

### 三、重复性评价

本试验中共选取 8 种病原体对不同浓度的质粒模板( $10^2\sim 10^6$  拷贝/mL)进行重复性评价。如表 3 所示,8 种病原体不同浓度模板检测的变异系数均小于 5%,说明本试验基于微流控芯片结合快速荧光 PCR 检测方法的重复性较好。

### 四、临床样本检测结果

提取前期采集的 192 份咽拭子样本的核酸,采用所建立的微流控芯片结合快速荧光 PCR 方法进行检测。结果表明,甲型流感病毒、副流感病毒、人偏肺病毒、肺炎支原体、肺炎衣原体、人博卡病毒的阳性率分别为 0.5%(1/192)、52.6%(101/192)、2.1%(4/192)、0.5%(1/192)、1.0%(2/192)和 3.6%(7/192),未检出乙型流感病毒和百日咳鲍特菌。与呼吸道病毒核酸六重联检试剂盒相比,甲型流感病毒、乙型流感病毒符合率为 100.0%;与肺炎支原体/肺炎衣原体/腺病毒核酸检测试剂盒、百日咳杆菌核酸检测试剂盒、人博卡病毒核酸检测试剂盒以及人偏肺病毒核酸检测试剂盒相比,肺炎支原体、肺炎衣原体、百日咳鲍特菌、人博卡病毒、人偏肺病毒符合率为 100.0%。副流感病毒检测方法灵敏度、特异性、阳性预测值和阴性预测值分别为 98.0%(97/99)、95.7%(89/93)、96.0%(97/101)和 97.8%(89/91)。

## 讨 论

呼吸道病原体种类繁多,且不同病原体引起的呼吸道感染的临床症状和流行特点非常相似,临床症状的特异性极低<sup>[12]</sup>,多表现为咽部不适、呼吸道卡他症状等,且常常出现“一病多因”的情况<sup>[3]</sup>。如果仅限于对少数几种呼吸道病原体进行单一检测,极大

表 3 8 种呼吸道病原体质粒检测的灵敏度和重复性检测结果

病原体	模板浓度 (拷贝/mL)	重复性试验结果 ( $\bar{x}\pm s$ )	变异系数 (%)
InfA	$10^6$	19.59±0.80	4.08
	$10^5$	22.44±0.50	2.23
	$10^4$	25.31±1.02	4.03
	$10^3$	28.51±0.70	2.46
	$10^2$	31.75±1.32	4.16
InfB	$10^6$	23.23±1.07	4.61
	$10^5$	26.00±0	0
	$10^4$	29.67±1.15	3.88
	$10^3$	32.50±0.71	2.18
	$10^2$	35.33±0.58	1.64
PIV	$10^6$	23.50±0.71	3.02
	$10^5$	25.99±1.01	3.89
	$10^4$	28.00±1.00	3.57
	$10^3$	31.73±1.57	4.95
	$10^2$	34.67±0.58	1.67
hMpV	$10^6$	22.63±0.17	0.75
	$10^5$	25.33±0.58	2.29
	$10^4$	28.06±1.16	4.13
	$10^3$	31.00±0	0
	$10^2$	34.33±0.58	1.69
Bp-IS481	$10^6$	23.42±0.60	2.56
	$10^5$	26.33±0.58	2.20
	$10^4$	28.58±1.30	4.55
	$10^3$	31.40±0.56	1.78
	$10^2$	34.00±1.41	4.15
Bp-IS002	$10^6$	23.07±0.32	1.39
	$10^5$	26.94±0.75	2.78
	$10^4$	30.26±1.41	4.66
	$10^3$	32.91±0.19	0.58
	$10^2$	35.31±0.95	2.69
hBoV	$10^6$	26.52±0.30	1.13
	$10^5$	29.70±0.26	0.88
	$10^4$	32.75±0.97	2.96
	$10^3$	35.62±0.17	0.48
	$10^2$	38.34±0.13	0.34
Cp	$10^6$	23.07±0.32	1.39
	$10^5$	26.94±0.75	2.78
	$10^4$	29.26±1.41	4.82
	$10^3$	32.91±0.19	0.58
	$10^2$	35.31±0.95	2.69
Mp	$10^6$	23.62±0.43	1.82
	$10^5$	27.12±0.15	0.55
	$10^4$	29.98±0.85	2.80
	$10^3$	32.41±0.77	2.28
	$10^2$	35.71±1.13	3.16

注: InfA: 甲型流感病毒; InfB: 乙型流感病毒; PIV: 副流感病毒; hMpV: 人偏肺病毒; Bp: 百日咳鲍特菌; hBoV: 人博卡病毒; Cp: 肺炎衣原体; Mp: 肺炎支原体

可能会造成漏检,对患者的治疗不利。另外,呼吸道感染发病急、病原体传播能力强,因此,呼吸道病原

体快速鉴定和精准诊断是临床实施有效治疗和及时开展传播阻断的重要前提<sup>[3]</sup>。高通量、快速、准确地开展呼吸道病原体检测,且同时平行鉴定多种病原体,短时间获得检测结果,一定程度上缩短临床治疗的周期,具有广泛的应用价值。

微流控芯片是近些年分子诊断领域应用较为广泛的技术方法,以其便携程度高、反应快速、通量高等特点,在传染病检测和肿瘤标志物筛查等方面均实现了良好的应用效果<sup>[13]</sup>。目前,已有报道等温扩增技术的微流控芯片应用在含新型冠状病毒在内的多呼吸道病毒检测<sup>[13]</sup>;采用微流控多重电化学技术实现了对急性上呼吸道感染相关细菌和病毒检测方法<sup>[14]</sup>;采用数字微流控技术完成了针对新型冠状病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒、冠状病毒和中东呼吸综合征冠状病毒的检测,检测灵敏度达到 12 拷贝/反应<sup>[15]</sup>;基因微流控芯片结合荧光 PCR 技术完成了甲型流感病毒、乙型流感病毒、H1N1 和 H3N2 亚型流感病毒及麻疹病毒的检测方法<sup>[16]</sup>。但上述诸多方法未实现微流控芯片结合荧光 PCR 技术开展更多种类呼吸道病原体的同时检测。

### 一、基于微流控芯片结合快速荧光 PCR 的高通量检测技术方法的优势

本试验采用前期开发的扇形微流控芯片,通过单孔注入样本核酸,自动分配到 8 个冻干预制不同引物探针和反应液的孔道,混合均匀后,放置到快速荧光 PCR 仪器中进行检测,实现了单样本多靶标检测,缩短了检测周期,而且仪器可便携在现场或门诊急诊使用。同时,该技术方法可通过在单张芯片上增加反应孔道,进而进一步提高检测通量。本试验所建立方法的特异性主要取决于使用的引物和探针。本试验通过对下载的序列进行比对,选取 8 种常见呼吸道病原体的保守基因作为检测的靶点设计引物和探针,特异性结果显示各体系内的引物和探针只对相应的病原体核酸呈阳性结果,与其他病原核酸不发生非特异性扩增,表明所建立的微流控芯片结合荧光定量 PCR 方法具有较好的特异性。同时,对检测方法的灵敏度和重复性进行了性能评价,结果显示检测灵敏度为  $10^2\sim 10^3$  拷贝/mL。《成人

呼吸道感染病原诊断核酸检测技术临床应用专家共识(2023)》中提及的呼吸道病原体核酸检测技术,包括实时荧光 PCR、多重 PCR、等温扩增、核酸即时检测和 mNGS 的灵敏度为  $10^2\sim 10^3$  拷贝/mL,这与本方法的灵敏度相当<sup>[17]</sup>,且本方法组内和组间的 CV 均小于 5%,说明本试验所建立的方法灵敏度和稳定性均可满足临床检测要求。

### 二、本研究技术方法的性能评价及局限性

本试验在检测的 192 份咽拭子样本中检出 115 份样本病原体核酸阳性,阳性率约为 60%,说明临床存在大量的呼吸道感染病例。单一感染阳性病原体中,副流感病毒的检出率最高。副流感病毒是儿童下呼吸道感染的主要病原体之一,至少有 75%~85% 的 5 岁以下儿童有感染史<sup>[18]</sup>。本试验由于伦理学限制,无法对副流感病毒阳性患者病例进行审查,因此对副流感病毒阳性病例是否为儿童感染无法追溯。另外,本试验检出 21 例混合病原感染病例,主要为副流感病毒和肺炎支原体混合感染。据报道,北京地区 2015—2019 年检测数据表明肺炎支原体感染阳性率在 1.52%~9.30%<sup>[19]</sup>;国家 CDC 对 2009—2019 年急性呼吸道感染监测数据表明,细菌或其他病原体导致急性呼吸道感染的学龄儿童中超过一半检出支原体感染<sup>[20]</sup>,说明肺炎支原体引起的呼吸道感染值得临床和疾病预防控制的重点关注。此外,本研究开发的检测方法与现有试剂相比,检测副流感病毒的结果存在 6 例样本结果不一致,推测可能是由于样本核酸提取过程中操作存在偏差,后续试验将采用病毒分离培养的金标准方法<sup>[18]</sup>进一步验证结果。

由于实验室无法开展全部病原体培养,因此本研究的局限性在于采用了构建的 8 种呼吸道病原体保守基因重组质粒评价方法灵敏度和重复性。在后续研究计划中将通过与可进行病原体培养的实验室合作,采用标准菌株对本方法的灵敏度和重复性进行进一步评价,进而完善该方法的检测性能。此外,本研究的临床样本中甲型流感病毒、乙型流感病毒、肺炎支原体、肺炎衣原体、百日咳鲍特菌、人博卡病毒、人偏肺病毒的数量偏少,不能完全

说明检测结果的一致性。而副流感病毒的检测结果与目前临床检测的结果存在少量的偏差,需要在后续的研究中进一步验证结果。

综上所述,本研究基于微流控芯片结合快速荧光 PCR 技术开发了用于同时检测 8 种呼吸道病原体方法,实现了单样本多靶标检测。该方法特异性好、灵敏度高和重复性好,结果准确可靠,而且便携程度高,可在现场、门急诊等多场景应用,为急性呼吸道感染快速筛查病原体提供了一种高通量、高效率、便携式的筛查手段。

**利益冲突** 朱坤目前就职于北京源景泰科生物科技有限公司;其余作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 陈毓:实验设计、数据统计和分析、文章撰写;吴紫伊:实验研究、数据统计和分析;徐杭聪:临床样本收集及检测;宋小军:实验设计和研究、数据统计和分析;陈乐扬:实验研究、数据统计和分析;吕火焯:临床样本收集;朱坤:微流控设置;金大智:提出全文构思、实验设计、文章撰写及修改

#### 参 考 文 献

- [1] 张海洋. 中国重要急性呼吸道感染的流行特征与影响因素研究[D]. 北京:军事科学院. 2021. DOI: 10.27193/d.cnki.gjsky.2021.000132.
- [2] 傅家祺, 蒋荣猛. 人偏肺病毒感染研究进展[J]. 中华医院感染学杂志, 2024, 34(2): 310-314. DOI:10.11816/cn.ni.2024-231618.
- [3] 中华检验医学培训工程专家委员会, 中华医学会呼吸病学分会. 成人呼吸道感染病原诊断核酸检测技术临床应用专家共识(2023)[J]. 协和医学杂志, 2023, 14 (5): 959-971. DOI: 10.12290/xhyxzz.2023-0338.
- [4] Pasick J. Advances in the molecular based techniques for the diagnosis and characterization of avian influenza virus infections [J]. Transbound Emerg Dis, 2008, 55(8): 329-338. DOI: 10.1111/j.1865-1682.2008.01047.x.
- [5] Lin CY, Hwang D, Chiu NC, et al. Increased detection of viruses in children with respiratory tract infection using PCR[J]. Int J Environ Res Public Health, 2020, 17 (2): 564. DOI: 10.3390/ijerph17020564.
- [6] Neske F, Blessing K, Tollmann F, et al. Real-time PCR for diagnosis of human bocavirus infections and phylogenetic analysis [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(7): 2116-2122. DOI: 10.1128/JCM.00027-07.
- [7] Feng ZS, Zhao L, Wang J, et al. A multiplex one-tube nested real time RT-PCR assay for simultaneous detection of respiratory syncytial virus, human rhinovirus and human metapneumovirus[J]. Virol J, 2018, 15(1):167. DOI: 10.1186/s12985-018-1061-0.
- [8] Chaudhry R, Sharma S, Javed S, et al. Molecular detection of *Mycoplasma pneumoniae* by quantitative real-time PCR in patients with community acquired pneumonia[J]. Indian J Med Res, 2013, 138(2): 244-251. DOI: 10.1080/0158791840050208.
- [9] Hisada K, Hida Y, Kawabata N, et al. Development and evaluation of a novel quenching probe PCR (GENECUBE) assay for rapidly detecting and distinguishing between *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia psittaci*[J]. J Microbiol Methods, 2021, 184: 106212. DOI: 10.1016/j.mimet.2021.106212.
- [10] Roorda L, Buitenwerf J, Ossewaarde JM, et al. A real-time PCR assay with improved specificity for detection and discrimination of all clinically relevant *Bordetella* species by the presence and distribution of three insertion sequence elements[J]. BMC Res Notes, 2011, 4:11. DOI: 10.1186/1756-0500-4-11.
- [11] 罗芸,金大智,叶菊莲,等. KPC 型碳青霉烯酶基因荧光定量 PCR 快速鉴定[J]. 中国公共卫生, 2013, 29(1): 138-141.
- [12] 李静,柳鸿敏,侯程程,等. 长春市儿童急性下呼吸道感染的病原学分析 [J]. 中国实验诊断学, 2023, 27 (5): 553-556. DOI: 10.3969/j.issn.1007-4287.2023.05.012.
- [13] 李顺基,肖育劲,陈鹏,等. 微流控芯片技术在体外诊断领域中的应用进展[J]. 分析科学学报, 2020, 36(5):639-645. DOI:10.13526/j.issn.1006-6144.2020.05.004.
- [14] 夏韬然,邹伟,刘晶. 微流控芯片技术在肺部炎症性疾病研究和诊断中的进展[J]. 生物工程学报, 2021, 37(11): 3905-3914. DOI: 10.13345/j.cjb.210025.
- [15] 李伟刚,蒋晓霞,汪海波,等. 基于数字微流控技术的上呼吸道易感病毒多靶标快速检测方法的建立[J]. 热带医学杂志, 2022, 22(11): 1487-1492. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3619.2022.11.006.
- [16] 任琴,张星艳,杜寿文,等. 基于微流控芯片技术的 5 种呼吸道病毒核酸快速荧光 qPCR 检测方法的建立[J]. 新发传染病电子杂志, 2020, 5(2): 95-99. DOI: 10.3877/j.issn.2096-2738.2020.02.008.
- [17] 徐英春,瞿介明,中华检验医学培训工程专家委员会等. 成人呼吸道感染病原诊断核酸检测技术临床应用专家共识 (2023)[J/OL]. 协和医学杂志, 2023, 14(5):959-971. DOI:10.12290/xhyxzz.2023-0338.
- [18] 国家儿童健康与疾病临床医学研究中心, 中华医学会儿科学分会临床检验学组. 儿童副流感病毒感染临床实验室诊断专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2024, 47(1): 24-34. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20230817-00063.
- [19] Wang X, Li M, Luo M, et al. *Mycoplasma pneumoniae* triggers pneumonia epidemic in autumn and winter in Beijing: A multicentre, population-based epidemiological study between 2015 and 2020[J]. Emerg Microbes Infect, 2022, 11(1): 1508-1517. DOI: 10.1080/22221751.2022.2078228.
- [20] Li ZJ, Zhang HY, Ren LL, et al. Etiological and epidemiological features of acute respiratory infections in China[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 5026. DOI: 10.1038/s41467-021-25120-6.

(收稿日期:2024-05-11)