

泛病原体生物芯片技术快速检测不明原因 腹泻患者病原体

张学慧 李杰 高翔 靳森 阚飙 张鑫磊 张华 张亮 闫梅英

【关键词】 泛病原体EOPM芯片; 轮状病毒

A rapid screening of diarrheal pathogens in adult patients using a pan-microbial microarray platform

Zhang Xuehui¹, Li Jie², Gao Xiang³, Jin Miao², Kan Biao², Zhang Xinlei⁴, Zhang Hua⁵, Zhang Liang⁵, Yan Meiyong². 1 Department of Clinical Laboratory, Cancer Institute and Hospital, Tianjin Medical University, National Clinical Research Center of Cancer, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy of Tianjin, Tianjin 300040, China; 2 State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention; 3 Beijing Tongzhou Center for Disease Control and Prevention; 4 Beijing Genestone Technology Company Limited; 5 BioChain(Beijing) Science and Technology Company Limited

Corresponding author: Yan Meiyong, Email: yanmeiyong@icdc.cn

【Key words】 Easy Operating Pathogen Microarray; Rotavirus

泛微生物基因芯片能够同时检测多种病原体,具有全面、快速、无偏向性等优点,目前国际上已有 Virochip^[1]、Greenechip^[2]、MDA^[3]等泛病原体芯片,国内也开发了EOPM(Easy Operating Pathogen Microarray)芯片^[4],本研究利用EOPM基因芯片检测不明病原体感染的成年人腹泻样本。

1. 材料与与方法:

(1)EOPM芯片检测:利用天根生化科技(北京)有限公司病毒基因组DNA/RNA提取试剂盒提取2例腹泻患者的水样粪便[中国疾病预防控制中心传染病预防控制所腹泻病室保留的2012年1月北京某地区腹泻症候群监测中常见致病性细菌(包括致病性弧菌、非伤寒沙门菌、志贺菌、致泻性大肠埃希菌、弯曲菌、耶尔森菌、嗜水气单胞菌及类志贺邻单胞菌)分离培养阴性]以及10份正常人群粪便样本中的核酸,然后将10份正常人群粪便样本提取的核酸等量混合作为对照,参照文献[4]报道的方案进行EOPM芯片检测,将芯片上每条探针信号值导入基于web界面的EOPM芯片(www.

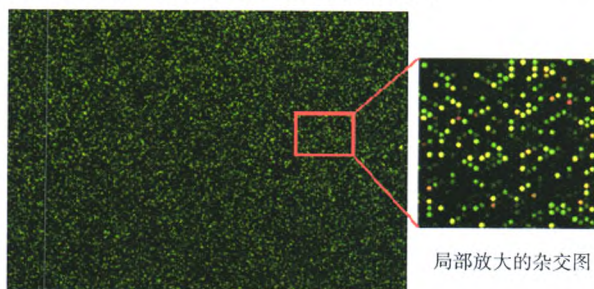
genestone.com.cn:8080/microbial/cpage.jsp)进行判读,并利用软件对芯片结果进行统计学排序。

(2)芯片结果验证:针对轮状病毒VP6基因的保守序列设计引物,利用PCR对上述2份样本进行PCR检测。引物序列:F1:GAC GGV GCR ACT ACA TGG T;R1:GTC CAA TTC ATN CCT GGT GG。PCR条件:94℃ 3 min;94℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 30 s,45个循环;72℃ 2 min。扩增产物送北京诺赛基因组研究中心进行序列测定,然后与GenBank中的序列进行比对。

(3)粪便样本ELISA检测A组轮状病毒抗原:根据芯片结果,利用ProSpect™轮状病毒试剂盒(美国Fisher公司)对另外37份疑似腹泻患者粪便样本(包含上述2份样本)进行检测。 A_{450} 值大于临界值的样本判定为阳性。

2. 结果:

(1)EOPM芯片分析:芯片上红绿颜色点阵分布明显。芯片杂交信号导入软件进行分析,从种的富集度排序上来看,排在前5位的为Rotavirus A, Faecalibacterium prausnitzii, Bacteroides vulgatus, Escherichia coli (some_gene)和Human rotavirus HRUKMI;从属的富集度排序上来看,排在前5位的为Rotavirus, Bacteroides, Bacteroides.opt, Faecalibacterium.opt和Parabacteroides.opt,统计学分析显示轮状病毒在2例不明原因腹泻病例粪便样本中含量最高,见图1。



注:红色为患者粪便样本杂交信号,绿色为对照杂交信号

图1 不明病原体感染的成年人腹泻样本EOPM芯片杂交图

(2)EOPM芯片结果验证:2例不明原因腹泻病例粪便样本均扩增出长度375 bp的特异性片段,序列比对显示为A组轮状病毒。

(3)其他腹泻样本验证:根据芯片结果,利用ELISA方法对包含上述2份样本的37份常见致病性细菌培养阴性的成年人腹泻粪便样本进行A组轮状病毒抗原检测。结果显示,37份样本中有18份样本阳性,阳性率为48.6%。34份样本 A 值 >0.5 (表1)。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.04.030

作者单位:300040 天津医科大学肿瘤医院检验科,国家肿瘤临床医学研究中心,天津市肿瘤防治重点实验室(张学慧);中国疾病预防控制中心传染病预防控制所腹泻病室(李杰、靳森、阚飙、闫梅英);北京市通州区疾病预防控制中心(高翔);北京健数通科技有限公司(张鑫磊);博尔诚(北京)科技有限公司(张华、张亮)

张学慧、李杰同为第一作者

通信作者:闫梅英, Email: yanmeiyong@icdc.cn

表 1 不明病原体感染的成年人腹泻粪便样本 A 组轮状病毒 ELISA 检测

样本编号	性别	年龄(岁)	最高体温(°C)	腹痛	粪便性状	红细胞数	白细胞数	血常规	A 组轮状病毒 ELISA(A 值)
1	女	41	36.3	否	稀	0	0	正常	+(0.747)
2	男	32	37.5	是	稀	0~2	15~20	正常	+(0.795)
6	女	38	36.4	否	稀	0	0	正常	+(0.436)
10	女	24	36.5	否	稀	3~5	15~18	正常	+(1.180)
12	男	34	37.5	否	稀	0	0	正常	+(0.320)
13	女	79	36.5	否	稀	0	0	正常	-(0.007)
14	男	22	36.3	否	稀	0	0	正常	-(0.007)
17	男	21	37.5	否	稀	0	0~1	正常	+(0.209)
18	男	77	38.0	否	水样	0	0	白细胞升高,中性粒细胞升高	+(0.338)
19	女	39	36.5	否	水样	0	0	正常	-(0.006)
20	女	25	37.6	否	稀	0	6~8	正常	-(0.006)
21	女	90	36.4	是	水样	0	偶见	正常	+(0.786)
23	女	25	36.4	是	稀	0	0	正常	-(0.015)
24	男	62	36.5	否	稀	偶见	0	正常	+(0.265)
25	男	52	36.4	是	稀	1~2	0	正常	-(0.017)
26	女	31	36.4	是	水样	0	0	正常	+(0.241)
27	女	59	36.4	否	水样	0	0	正常	+(0.763)
28	男	32	36.5	否	稀	0	0	正常	-(0.007)
30	男	25	36.5	是	稀	0	1~2	正常	-(0.007)
31	男	17	36.5	是	水样	0	0	正常	-(0.005)
33	女	40	36.4	否	稀	0	0	正常	+(0.589)
39	男	56	37.6	是	水样	0~3	5~6	白细胞升高,中性粒细胞升高	+(0.869)
52	男	22	36.9	是	稀	偶见	0	正常	+(0.248)
53	女	31	36.5	是	稀	0	0	正常	-(0.004)
54	男	58	36.4	否	黏液	2~3	10~12	正常	+(1.033)
55	男	30	36.4	否	稀	0	3~5	正常	+(0.517)
56	男	65	36.4	否	稀	0	0	正常	+(0.142)
57	男	58	36.6	是	水样	0	0	正常	-(0.017)
58	女	50	36.4	是	稀	0	0	正常	-(0.009)
59	男	16	36.4	否	水样	0	3~5	正常	-(0.009)
60	男	57	36.6	是	水样	0	5~10	正常	-(0.006)
61	男	22	36.5	是	水样	0	0	正常	-(0.006)
62	女	34	36.4	是	水样	3~5	满视野	正常	-(0.014)
63	女	34	36.4	否	稀	0	0	正常	-(0.005)
689	男	80	36.4	是	稀	0	0	正常	+(0.829)
694	男	32	37.9	是	水样	18~20	10~12	正常	-(0.007)
696	男	53	36.4	否	水样	0	0	正常	-(0.013)

3. 讨论:本研究病例均为成年人腹泻病例,初期考虑细菌性腹泻的可能性较大,对霍乱菌、沙门菌、志贺菌进行分离培养检测,但结果均为阴性,然后采用泛病原体生物芯片对 2 例样本进行病毒检测,并利用 PCR 测序进行验证,结果显示 2 例成年人腹泻样本为 A 组轮状病毒感染。一般情况下 A 组轮状病毒通常引起 6~24 月龄幼儿腹泻^[5]。经 EOPM 芯片进行检测,结果显示轮状病毒感染的可能性较大。采用针对 A 组轮状病毒抗原的 ELISA 试剂盒进行检测,发现轮状病毒的感染率较高,提示在成年人腹泻监测中需加强轮状病毒检测。本研究结果显示,A 组轮状病毒感染引起的成年人腹泻在临床上无特异性表现,易造成漏诊、误诊,应引起临床医务工作者的重视。

参 考 文 献

[1] Wang D, Coscoy L, Zylberberg M, et al. Microarray-based detection

and genotyping of viral pathogens[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(24): 15687-15692.

[2] Palacios G, Quan PL, Jabado OJ, et al. Panmicrobial oligonucleotide array for diagnosis of infectious diseases[J]. Emerg Infect Dis, 2007, 13(1): 73-81.

[3] Gardner SN, Jaing CJ, McLoughlin KS, et al. A microbial detection array (MDA) for viral and bacterial detection[J]. BMC Genomics, 2010, 11: 668.

[4] Huang W, Yang Y, Zhang X, et al. An easy operating pathogen microarray (EOPM) platform for rapid screening of vertebrate pathogens[J]. BMC Infect Dis, 2013, 13: 437.

[5] Grimwood K, Lambert SB. Rotavirus vaccines: opportunities and challenges[J]. Hum Vaccin, 2009, 5(2): 57-69.

(收稿日期:2013-12-10)

(本文编辑:万玉立)