

· 论 著 ·

细菌及真菌血流感染宏基因组学检测标本预处理方法探索*

朱 盈^{1,2}, 杨启文^{1△}

1. 中国医学科学院北京协和医院检验科, 北京 100730; 2. 中国医学科学院北京协和医学院, 北京 100730

摘要:目的 本研究主要针对血流感染患者标本存在大量人类核酸, 对细菌及真菌宏基因组学测序检测带来的干扰进行探讨, 设计了 3 种去宿主(人源)核酸方法: 皂素去宿主核酸法(Saponin 法)、SDS 去宿主核酸法(SDS 法)和水洗法, 从中选出最优方法。方法 向无菌血液标本中分别注入金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、白色念珠菌模拟临床血流感染患者血液标本, 对标本进行去宿主核酸处理、核酸提取、实时荧光定量聚合酶链反应, 通过比较对照组及实验组标本的 ΔCt 值评价各种方法的去人源核酸效果及病原菌核酸丢失量。结果 Saponin 法和 SDS 法人源核酸去除效果较好; *GAPDH* 基因 $\bar{\Delta Ct}$ 分别为 10.13 和 11.13; β -*actin* 基因 $\bar{\Delta Ct}$ 分别为 12.76 和 14.30; 水洗法中人源基因核酸发生了富集, *GAPDH* 基因 $\bar{\Delta Ct} = -4.23$, β -*actin* 基因 $\bar{\Delta Ct} = -4.05$ 。同时 Saponin 法和水洗法中肺炎克雷伯菌和白色念珠菌的核酸均发生富集; Saponin 法 $\bar{\Delta Ct}$ 分别为 4.24、1.07, 水洗法 $\bar{\Delta Ct}$ 分别为 2.41、0.88, 金黄色葡萄球菌的核酸发生丢失; SDS 法中肺炎克雷伯菌、白色念珠菌和金黄色葡萄球菌均发生了丢失; $\bar{\Delta Ct}$ 分别为 -1.09、-1.75、-4.56。结论 综合考虑去宿主核酸及病原菌核酸丢失量 2 个方面, 使用 Saponin 法处理含菌血液标本效果最理想。

关键词: 血流感染; 去宿主核酸; 病原菌核酸; 标本前处理; 宏基因组学

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.23.004

中图法分类号: R446.5

文章编号: 1673-4130(2021)23-2834-05

文献标志码: A

Exploration of pretreatment methods for metagenomics detection specimens of bacterial and fungal bloodstream infection*

ZHU Ying^{1,2}, YANG Qirwen^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China; 2. Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

Abstract: Objective This study mainly explores the interference caused by a large number of human nucleic acids in the samples from bloodstream infection patients on bacterial and fungal metagenomics sequencing detection. Three methods for de-host (human source) nucleic acids are designed: saponin de-host nucleic acid method (Saponin method), SDS de-host nucleic acid method (SDS method) and wash method, select the best method. **Methods** Injected *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Candida albicans* into sterile blood samples to simulate the blood samples of patients with clinical blood stream infection, the samples were treated with de-host nucleic acid, nucleic acid extraction and real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction. By comparing the ΔCt value of the samples of the control group and the experimental group, the effect of various methods of depleting human-derived nucleic acid and the amount of nucleic acid loss of pathogenic bacteria were evaluated. **Results** Saponin method and SDS method human-derived nucleic acid removal effect was better; *GAPDH* gene $\bar{\Delta Ct}$ were 10.13 and 11.13, respectively; β -*actin* gene $\bar{\Delta Ct}$ were 12.76 and 14.30, respectively. In the wash method, human-derived gene nucleic acid was enriched, *GAPDH* gene $\bar{\Delta Ct} = -4.23$; β -*actin* gene $\bar{\Delta Ct} = -4.05$. At the same time, the nucleic acids of *Klebsiella pneumoniae* and *Candida albicans* in the Saponin method and the wash method were enriched; $\bar{\Delta Ct}$ of Saponin method was

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82072318); 国家重点研发计划(2018YFC1200105); 北京市临床重点专科医学检验科卓越项目(ZK201000)。

作者简介: 朱盈, 女, 在读硕士研究生, 主要从事细菌耐药流行病学、耐药机制方面的研究。△ 通信作者, E-mail: yangqirwen81@vip.163.com。

本文引用格式: 朱盈, 杨启文. 细菌及真菌血流感染宏基因组学检测标本预处理方法探索[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(23): 2834-2838.

4.24, 1.07, respectively, and $\bar{\Delta}Ct$ of wash method was 2.41, 0.88, respectively, and the nucleic acid of *Staphylococcus aureus* lost. In the SDS method, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* were all lost, $\bar{\Delta}Ct$ were -1.09, -1.75, -4.56, respectively. **Conclusion** Considering both the de-host nucleic acid and the loss of pathogenic nucleic acid, Saponin method is the best method to treat blood samples containing bacteria.

Key words: bloodstream infection; de-host nucleic acid; pathogen nucleic acid; pretreatment of samples; metagenomics

近年来,由于静脉导管留置、机械通气、肠外给药等侵入性设备及治疗的广泛应用,免疫抑制剂及大量抗菌药物的滥用,血流感染的发病率逐年上升^[1]。然而,临床血流感染标本中病原微生物水平较低,部分标本病原菌甚至无法培养,导致标本阳性检出率较低,临床诊断困难。宏基因组学近年来被广泛应用于环境学、农业学等方面的研究。宏基因组学直接从环境样品中提取全部微生物的 DNA,或通过测序探究环境中微生物的群落结构和功能,克服了传统培养方法的缺陷,极大地丰富了对标本微生物多样性及其功能的认识^[2]。宏基因组学在医学微生物方面的研究有以下优势:不受靶标限制、可以预测耐药性、快速制备文库和实时采集数据^[3]。将宏基因组学测序技术应用于临床微生物诊断可以全面快速地探索标本中病原菌的分布特征及耐药基因组学和毒力基因组学的特征。研究有效的去宿主核酸处理方法有助于提高检测的灵敏度和准确度,减少数据分析困难,并且能在一定程度上降低检测成本。为此,本研究将临床常见的 3 种病原微生物(金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌和白色念珠菌)注入到健康人血液中制备模拟标本,以综合评估 3 种标本预处理方法[皂素去宿主核酸法(Saponin 法)、SDS 去宿主核酸法(SDS 法)和水洗法]的去人源核酸效果,旨在对将来的宏基因组学测序技术流程进一步发展及改进提供参考。

1 材料与方法

1.1 标本来源 本研究使用临床模拟血液标本,将健康献血者含白细胞血浆与悬浮红细胞按体积 1:1 混合,模拟全血标本。实验菌株使用临床质控菌株金黄色葡萄球菌 ATCC 25923、白色念珠菌 ATCC 90028 和临床肺炎克雷伯菌(R16)。将菌悬液注入到全血标本中,最终得到浓度为 10^3 cfu/mL 的含菌血液^[4]。每份标本进行 2 次重复平行试验。

1.2 仪器与试剂 核酸提取选用 Zymo BIOMICS DNA minipre Kit 核酸提取试剂盒。实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)使用罗氏 LightCycler[®] 480 仪器,选用 Takara TB Green Premix Ex Taq 酶或 Applied Biosystems TaqMan Universal Master Mix II 试剂进行检测。在去宿主核酸处理步骤中使用热不稳定性耐高盐核酸酶(HL-SAN)(ActicZymes[®])、Saponin 干粉(Sigma-Aldrich[®])、SDS、蛋白酶 K 冻干粉

(Solarbio)。

1.3 方法

1.3.1 Saponin 法^[3] 取 8 mL 含菌血液,800 r/min 离心 5 min,留取血浆,弃下层血细胞;将血浆以 9 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,200 μ L 磷酸盐缓冲液(PBS)重悬沉淀,再加入 200 μ L 5% Saponin 溶液(终浓度为 2.5%),37 $^{\circ}$ C 振荡孵育 15 min,孵育过程中每 2 min 混匀 1 次,保证中间充分反应;加入 350 μ L 无菌纯水,静置 30 s,再加入 12 μ L NaCl 溶液(5 mol/L),涡旋混匀。8 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,100 μ L PBS 重悬沉淀,再加入 100 μ L HL-SAN buffer(5.5 mol/L NaCl,100 mmol/L MgCl₂ 水溶液),混匀。加入 10 μ L HL-SAN,立即混匀,37 $^{\circ}$ C 1 300 r/min 孵育 15 min;每管加入 1 mL PBS,8 000 r/min 离心 3 min;弃上清液,1 mL PBS 重悬,8 000 r/min 离心 3 min;弃上清液,用 250 μ L PBS 重悬沉淀,重悬液用于核酸提取。

1.3.2 SDS 法 取 8 mL 含菌血液,8 000 r/min 离心 5 min,留取血浆,弃下层血细胞;将血浆以 9 000 r/min 离心 5 min。弃上清液,加入 160 μ L 无菌 PBS 重悬沉淀,再加入 80 μ L 无菌 5% SDS 溶液(终浓度为 1.6%),37 $^{\circ}$ C 振荡孵育 15 min,孵育过程中每 2 min 混匀 1 次,保证中间充分反应;加入 350 μ L 无菌纯水,静置 30 s,再加入 12 μ L NaCl 溶液(5 mol/L),涡旋混匀。8 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 PBS 洗涤 SDS,再以 8 000 r/min 离心 5 min。重复上一步。100 μ L PBS 重悬沉淀,再加入 100 μ L HL-SAN buffer,混匀。加入 10 μ L HL-SAN,立即混匀,37 $^{\circ}$ C 1 300 r/min 孵育 15 min;每管加入 1 mL PBS,8 000 r/min 离心 3 min;弃上清液,1 mL PBS 重悬,8 000 r/min 离心 3 min;弃上清液,用 250 μ L PBS 重悬沉淀,重悬液用于核酸提取。

1.3.3 水洗法 取 8 mL 含菌血液,3 200 r/min 离心 30 s,留取血浆,弃下层血细胞;量取血浆于新的 5 mL 低吸附管内,并加入等体积无菌超纯水,涡旋混匀;室温孵育 5 min,期间不断混匀;13 300 r/min 离心 2 min;弃上清,250 μ L PBS 重悬沉淀,重悬液用于核酸提取。

1.3.4 核酸提取 严格按照 Zymo BIOMICS DNA minipre Kit 核酸提取试剂盒说明书进行核酸提取。

1.3.5 qPCR 分别使用 *nuc*^[5]、*phoE* 和 *CALB*^[6] 基因对标本中的金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌和白色念珠菌进行荧光定量分析。采用 *GAPDH*^[7] 和 β -*actin*^[7] 基因对标本中的人源核酸进行荧光定量分析。其中 *GAPDH*、 β -*actin*、*nuc*、*phoE* 基因的检测采用

探针法 qPCR, *CALB* 基因的检测采用染料法 qPCR。均采用 25 μ L 体系,程序设定为 95 $^{\circ}$ C 10 min 1 个循环;预变性;40 个循环(95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min);变性,退火,延伸;40 $^{\circ}$ C 1 s 1 个循环;冷却。具体引物及探针序列见表 1。

表 1 实验所用引物和探针

物种	目的基因	引物/探针	序列 (5'→3')
人	<i>GAPDH</i> ^[7]	Forward	CCCCACACACATGCACTTACC
		Reverse	CCTAGTCCCAGGGCTTTGATT
		Probe	FAM-AAAGAGCTAGGAAGGACAGGCAACTTGGC-TAMRA
人	β - <i>actin</i> ^[7]	Forward	CCACACTGTGCCCATCTACG
		Reverse	AGGATCTTCATGAGGTAGTCAGTCAG
		Probe	HEX-ATGCCCTCCCCATGCCATCTGCGT-BHQ1
金黄色葡萄球菌	<i>nuc</i> ^[5]	Forward	GTTGCTTAGTGTTAACTTTAGTTGTA
		Reverse	AATGTGCGCAGGTTCTTTATGTAATTT
		Probe	CY5-AAGTCTAAGTAGCTCAGCAAATGCA-BBQ
肺炎克雷伯菌	<i>PhoE</i>	Forward	GCACCTCGTTAAGCTATGA
		Reverse	GTCGCCAGGTAGATATTGT
		Probe	ROX-CCTACACCAGCTCCGACCGTACCAA-BQ2
白色念珠菌	<i>CALB</i> ^[6]	Forward	TTTATCAACTTGTCACACCAGA
		Reverse	ATCCCGCCTTACCACTACCG

1.4 统计学处理 将制备的未去宿主处理和去宿主处理的临床模拟标本组的核酸作为模板,进行 qPCR 检测,获得各标本中不同目的基因的 Ct 值。因 Ct 值与核酸水平呈反比,故比较其 Ct 值即可对比其中人源核酸及病原菌核酸的数量。按如下公示计算:未进行去宿主处理的标本 Ct 值 - 对应的去宿主处理后的标本 Ct 值 = Δ Ct

2 结 果

2.1 3 种方法标本中核酸总体变化 各种标本中人源核酸与病原菌核酸的 Ct 值变化见表 2、图 1。结合表 2 及图 1 分析各种方法对人源核酸的影响,使用 Saponin 法处理的标本 *GAPDH* 基因 Δ Ct = 10.13, $s^2 = 1.02$; β -*actin* 基因 Δ Ct = 12.76, $s^2 = 0.63$ 。使用 SDS 法处理的标本 *GAPDH* 基因 Δ Ct = 11.13, $s^2 = 0.30$; β -*actin* 基因 Δ Ct = 14.30, $s^2 = 1.29$,其标本的去人源核酸效果与 Saponin 法相同(Δ Ct > 10),并且

各种标本中人源核酸去除效果较稳定。而使用水洗法处理的标本中人源核酸量大于未处理的标本核酸量(*GAPDH* 基因 Δ Ct = -4.23, $s^2 = 0.38$; β -*actin* 基因 Δ Ct = -4.05, $s^2 = 0.96$),与另外两种方法的结果相差较大。

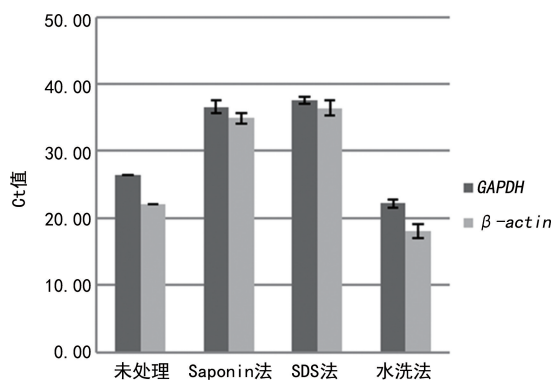


图 1 标本中人源核酸变化

表 2 3 种方法标本中核酸总体变化

方法	<i>GAPDH</i>		β - <i>actin</i>		<i>nuc</i>		<i>PhoE</i>		<i>CALB</i>	
	Δ Ct	s^2	Δ Ct	s^2	Δ Ct	s^2	Δ Ct	s^2	Δ Ct	s^2
Saponin 法	10.13	1.02	12.76	0.63	-1.34	2.86	4.24	0.92	1.07	0.94
SDS 法	11.13	0.3	14.30	1.29	-1.09	5.78	-1.75	0.16	-4.56	0.54
水洗法	-4.23	0.38	-4.05	0.96	-1.02	3.29	2.41	2.92	0.88	-

注: Δ Ct 和 s^2 为 2 次平行试验结果的平均 Δ Ct 和方差; - 为水洗法处理白色念珠菌标本仅有 1 例,无法计算方差。

2.2 不同方法对病原菌核酸的影响 见图 2。使用 Saponin 法和水洗法处理后的标本中,金黄色葡萄球菌核酸均发生了丢失($\Delta Ct < 0$),而肺炎克雷伯菌和白色念珠菌的病原菌核酸发生了富集($\Delta Ct > 0$)。SDS 法处理的标本中,3 种病原菌核酸均发生了丢失($\Delta Ct < 0$),尤其是白色念珠菌核酸丢失较严重($\Delta Ct = -4.56, s^2 = 0.54$)。SDS 法对于病原菌核酸的影响最大,其次是水洗法,Saponin 法在富集病原菌核酸方面效果最好。3 种方法对于金黄色葡萄球菌标本的处理效果最差,均使其病原菌核酸发生了丢失,对于肺炎克雷伯菌和白色念珠菌标本的处理效果相对较好。

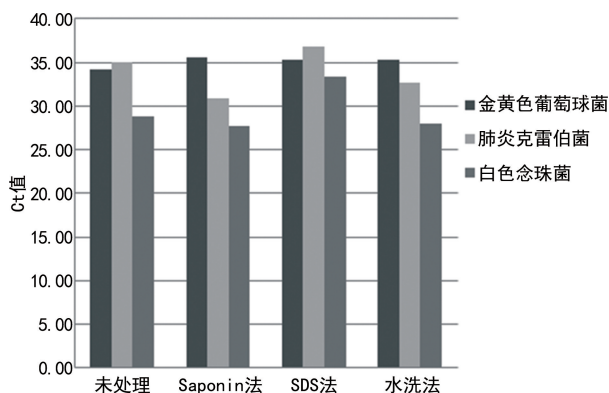


图 2 标本中病原菌基因变化

3 讨 论

本研究采用 Saponin 法和 SDS 法进行去宿主核酸的原理类似,Saponin 和 SDS 皆为表面活性剂,可以起到裂解细胞膜的作用,因为细菌、真菌均有细胞壁,对细胞膜有保护作用,所以可以针对性地裂解人源细胞膜,暴露人源核酸,并且通过渗透裂解进一步裂解细胞膜,同时使用非特异性核酸内切酶 HL-SAN 进行核酸降解。由于 SDS 法对 HL-SAN 的酶发挥作用有影响,所以在 SDS 法的流程中增加了洗涤的步骤。水洗法的实验原理是通过 ANSON 等^[8] 实验中评估的不同离心条件来分离菌体与人类细胞,选择最佳离心条件,同时使用低吸附管,减少核酸耗损,然后再用等体积无菌纯水涡旋、孵育,达到低渗裂解的效果,再离心,分离暴露的人源核酸和完整的菌体,最终达到去宿主核酸的目的。

Saponin 法整体效果最优,去宿主核酸处理步骤使病原菌菌体充分暴露,核酸提取效率明显增加。而 SDS 法虽有效去除了人源核酸,但病原菌核酸也发生了丢失,判断可能是因为 SDS 解构蛋白能力较强,导致在去宿主核酸处理的步骤中,病原菌核酸也发生了丢失。

本研究结果显示,水洗法去宿主核酸效果劣于 Saponin 法和 SDS 法,考虑到操作误差及检测中的随机误差同时存在于另外两种方法,故可以排除随机误差的影响,认为是方法学的问题:一方面水洗法的步

骤较为简单,低渗裂解比较温和,核酸去除效果不佳;另一方面去宿主处理后的标本经过了稀释重悬,在核酸提取步骤中破膜效果更好,核酸提取效率提高。对标本进行水洗法去宿主核酸处理后再提取核酸虽然提高了病原菌核酸提取效率,但同时也提高了人源核酸的提取效率,并且对人源核酸的富集效果优于病原菌核酸,因此,没有达到理想的去宿主核酸效果。

目前,去宿主核酸处理主要包括细胞处理和核酸处理两种方法。本实验中,水洗法利用了人源细胞与菌体的密度差异去除宿主细胞,在人源核酸去除方面效果略差于 Saponin 法和 SDS 法。而在关晴辉^[9] 的研究中,利用人类细胞与细菌直径的差异,使用过滤膜处理模拟痰标本,最终的去宿主核酸效果与 NEB 试剂盒相近且耗时更短。细胞处理法试剂耗材少、成本低、耗时短,值得进一步研究优化。

核酸层面的处理方法包括商品化试剂盒、渗透压裂解细胞膜和细胞裂解液(Saponin、Triton X-100、吐温-20)等。MAROTZ 等^[10] 研究表明,渗透压裂解细胞膜的效果比较差,不宜单独使用,但可以在实验流程中配合其他细胞裂解液使用以提高去宿主核酸效率。PMA、Saponin、Triton-100、吐温-20 等均为表面活性剂,能够裂解膜蛋白,配合核酸内切酶(HL-SAN、Turbo DNase 等)使用可以达到去宿主核酸效果^[10-15],本研究中 Saponin 法和 SDS 法就是采用该原理,联合使用渗透压裂解液、表面活性剂和核酸内切酶,证明该方法可行且效果较好。

本方案还有待改进,下一步实验应考虑将方案应用于真实多样的临床标本,并采用宏基因组学测序对去宿主核酸处理方法的灵敏度、重复性和特异性进行验证,同时对于 Saponin 及 SDS 裂解液的水平还可以进一步进行探索。尽可能提高方法的检测下限及排除干扰是分子诊断技术将来的发展方向。检测下限降低能够保证检测方法的灵敏度,并且在患者发病早期甚至还未发病前进行预测诊断,提前干预,减少不恰当的诊疗。而高灵敏度的检测方法带来的也可能是更多的干扰信息,环境中诸多的污染菌群及人体定植菌群极易混入检测标本中,规范标本采集技术、缩短标本周转时间、提高临床结果判读能力是解决该问题的关键。对于背景更复杂的其他标本(如痰液、肺泡灌洗液等),各种方法的处理流程及效果尚需进一步探讨。且本研究未将病毒纳入研究对象,在之后的研究中可以考虑扩大研究范围,全面探索细菌、真菌及病毒感染标本的去宿主处理方法。

未来的去宿主处理方法可以从技术层面研究新方法,降低人源细胞的干扰,富集病原菌,提高检出率。同时,还可以探索新物质,寻找更高效的去除标本中人类细胞或核酸的试剂或酶,或者寻找新的方法,在尽可能剔除人源细胞或核酸的基础上,减少病

原菌核酸丢失。解决标本前处理问题,提高标本中原菌核酸占比,能进一步推动宏基因组学测序技术在病原微生物诊断及预测方面的应用,最大限度地缩短病原菌鉴定及耐药基因检测的时间。快速准确的血流感染诊断、及时高效的耐药基因筛查能够帮助临床医生尽早选择适当的抗菌药物进行治疗,改善治疗疗效,减少临床不恰当的经验用药案例,为临床诊疗提供极大的便利。同时,随着病原菌基因组学研究的进一步深入,临床对于耐药基因的认识也会越来越深,使用宏基因组学测序技术可以更快、更全面地获得菌株耐药信息,帮助临床优化抗菌药物管理,对应对突发流行性疾病十分重要。同时也能为宏基因组学测序技术在其他方面的应用提供思路,如肿瘤 DNA 检测、流行病学调查研究等。

参考文献

- [1] 梁琚,张洲,徐元宏. 血流感染现状及诊断方法研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(24):3020-3021.
- [2] 邸鹏月,彭宇,李晨,等. 基于宏基因组分析桑葚酵素的微生物多样性[J]. 中国食品学报,2020,20(5):251-257.
- [3] CHARALAMPOUS T, KAY G L, RICHARDSON H, et al. Nanopore metagenomics enables rapid clinical diagnosis of bacterial lower respiratory infection[J]. Nat Biotechnol, 2019, 37(7):783-792.
- [4] LOONEN A J M, BOS M P, MEERBERGEN B V, et al. Comparison of pathogen DNA isolation methods from large volumes of whole blood to improve molecular diagnosis of bloodstream infections[J]. PLoS One, 2013, 8(8):e72349.
- [5] GOTO M, AL-HASAN M N. Overall burden of bloodstream infection and nosocomial bloodstream infection in North America and Europe[J]. Clin Microbiol Infect, 2013, 19(6):501-509.
- [6] ZHANG J, HUNG J C, NAGAMINE K, et al. Development of candida-specific real-time PCR assays for the detection and identification of eight medically important candida species[J]. Microbiol Insights, 2016, 9:21-28.
- [7] BUEHLER S S, MADISON B, SNYDER S R, et al. Ef-

fectiveness of practices to increase timeliness of providing targeted therapy for inpatients with bloodstream infections: a laboratory medicine best practices systematic review and Meta-analysis[J]. Clin Microbiol Rev, 2016, 29(1):59-103.

- [8] ANSON L W, CHAU K, SANDERSON N, et al. DNA extraction from primary liquid blood cultures for bloodstream infection diagnosis using whole genome sequencing[J]. J Med Microbiol, 2018, 67(3):347-357.
- [9] 关晴辉. 基于新一代高通量测序的病原体快速检测技术开发及应用[D]. 广州:华南理工大学,2017.
- [10] MAROTZ C A, SANDERS J G, ZUNIGA C, et al. Improving saliva shotgun metagenomics by chemical host DNA depletion[J]. Microbiome, 2018, 6(1):42-46.
- [11] CASPAR Y, GARNAUD C, RAYKOVA M, et al. Superiority of SDS lysis over saponin lysis for direct bacterial identification from positive blood culture bottle by MALDI-TOF MS[J]. Proteomics Clin Appl, 2017, 11(5/6):1002-1006.
- [12] GLATTER T, AHRNE E, SCHMIDT A. Comparison of different sample preparation protocols reveals lysis buffer-specific extraction biases in gram-negative bacteria and human cells[J]. J Proteome Res, 2015, 14(11):4472-4485.
- [13] GUIRRO M, HERRERO M, COSTA A, et al. Comparison of metaproteomics workflows for deciphering the functions of gut microbiota in an animal model of obesity[J]. J Proteomics, 2019, 209:103489.
- [14] WESTON L A, BAUER K M, HUMMON A B. Comparison of bottom-up proteomic approaches for LC-MS analysis of complex proteomes[J]. Anal Methods, 2013, 5(18):10-19.
- [15] HASAN M R, RAWAT A, TANG P, et al. Depletion of human DNA in spiked clinical specimens for improvement of sensitivity of pathogen detection by next-generation sequencing[J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(4):919-927.

(收稿日期:2021-03-09 修回日期:2021-09-27)

(上接第 2833 页)

- [13] HR R, LH W, WK H, et al. Prognostic value of the c-reactive protein/prognostic nutritional index ratio after hip fracture surgery in the elderly population[J]. Oncotarget, 2017, 8(37):61365-61372.
- [14] STEVENS N E, CHAPMAN M J, FRASER C K, et al. Therapeutic targeting of HMGB1 during experimental sepsis modulates the inflammatory cytokine profile to one associated with improved clinical outcomes[J]. Sci Rep,

2017, 7(1):5850-5855.

- [15] WANG Z, WANG H, YANG L, et al. High platelet-to-lymphocyte ratio predicts poor survival of elderly patients with hip fracture[J]. Int Orthop, 2021, 45(1):13-21.
- [16] 胡天野,任少君,林道超. 预后营养因子 PNI 对老年髋部骨折预后的预测价值[J]. 实用骨科杂志, 2019, 25(8):686-689.

(收稿日期:2021-05-15 修回日期:2021-09-17)