

· 论 著 ·

微流控芯片环介导恒温扩增技术快速检测 8 种肠道致病菌*

宋娜, 刘朝阳, 李梦蓝, 王玉飞, 杨晓莉, 孙振学[△]
解放军总医院第三医学中心检验科, 北京 100039

摘要:目的 结合微流控芯片环介导恒温扩增技术(LAMP), 建立可同时检测粪便中 8 种肠道致病菌的微流控芯片 LAMP 检测方法, 为感染性腹泻的临床诊断提供依据。方法 根据 8 种肠道致病菌(志贺菌、沙门菌、副溶血性弧菌、空肠弯曲菌、肠聚集性大肠埃希菌、肠侵袭性大肠埃希菌、肠致病性大肠埃希菌、肠产毒素大肠埃希菌)的特异目的基因分别设计微流控芯片 LAMP 引物, 加入 EvaGreen 荧光染料, 采用微流控芯片 LAMP 对 8 种肠道致病菌同时进行实时荧光监测; 提取 8 种肠道致病菌的基因组 DNA, 对建立微流控芯片 LAMP 的特异度和灵敏度进行评价; 制备模拟粪便样本对该技术的最低检出限进行评价。结果 微流控芯片 LAMP 可实现 8 种肠道致病菌的特异性检测, 对福氏志贺菌、鼠伤寒沙门菌、副溶血性弧菌、空肠弯曲菌、肠聚集性大肠埃希菌、肠侵袭性大肠埃希菌、肠致病性大肠埃希菌和肠产毒素大肠埃希菌的检测灵敏度可达 100 CFU/mL; 对模拟粪便样本中福氏志贺菌、鼠伤寒沙门菌、副溶血性弧菌、肠道侵袭性大肠埃希菌、肠道致病性大肠埃希菌、肠产毒素大肠埃希菌的最低检出限均为 100 CFU/mL; 对空肠弯曲菌和肠聚集性大肠埃希菌的最低检出限为 1 000 CFU/mL。结论 该实验建立的微流控芯片 LAMP 特异性好、灵敏度高、结果准确, 可用于粪便中 8 种肠道致病菌的同步快速检测。

关键词:微流控芯片; 环介导恒温扩增技术; 肠道致病菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.12.004

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2022)12-1425-05

文献标志码:A

Rapid detection of eight enteric pathogenic bacteria by isothermal amplification with microfluidic chip loop-mediated isothermal amplification*SONG Na, LIU Chaoyang, LI Menglan, WANG Yufei, YANG Xiaoli, SUN Zhenxue[△]

Department of Clinical Laboratory, Third Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039, China

Abstract: Objective To establish a method that can simultaneously detect eight enteric pathogenic bacteria in stool specimens by combining microfluidic chip loop-mediated isothermal amplification technology and then provide technical support for clinical diagnosis of infectious diarrhea. **Methods** The primers were designed according to the specific target genes of the eight pathogenic bacteria (Shigella, Salmonella, Vibrio parahaemolyticus, Campylobacter jejuni, Enterococci, Enteroinvasive E. coli, Enteropathogenic E. coli, Enterotoxigenic E. coli), and EvaGreen fluorescent dye was added. Microfluidic chip loop-mediated isothermal amplification was used for simultaneous real-time fluorescence monitoring of 8 enteric pathogens. The genomic DNA of enteric pathogens were extracted, and the specificity and sensitivity of the established microfluidic chip loop-mediated isothermal amplification method were evaluated. Stool samples were simulated and prepared to evaluate the detection limit. **Results** The detection sensitivity of Shigella flexneri, Salmonella typhimurium, Vibrio parahaemolyticus, Campylobacter jejuni, Enterococci, Enteroinvasive E. coli, Enteropathogenic E. coli, and Enterotoxigenic E. coli were all 100 CFU/mL. The minimum detection limit of Shigella flexneri, Salmonella typhimurium, Vibrio parahaemolyticus, Enteroinvasive E. coli, Enteropathogenic E. coli, and Enterotoxigenic E. coli in simulated stool samples were all 100 CFU/mL. The minimum detection limit of Campylobacter jejuni and Enterococci in simulated stool samples were 1 000 CFU/mL. **Conclusion** The microfluidic chip loop-mediated isothermal amplification method has good specificity, high sensitivity, and accurate results. The method can be used for rapid detection of eight enteric pathogenic bacte-

* 基金项目:国家重点研发计划(2018YFC1603705)。

作者简介:宋娜,女,主管技师,主要从事分子诊断学研究。△ 通信作者, E-mail:wjsunzhenxue@163.com。

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20220527.1043.002.html\(2022-05-30\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20220527.1043.002.html(2022-05-30))

ria in stool specimens.

Key words: microfluidic chip; loop-mediated isothermal amplification; intestinal pathogenic bacteria

肠道是致病菌定植和感染的主要器官^[1]。肠道致病菌主要是通过污染的食物或水进入消化道,并最终定殖在肠道内引起感染性腹泻等疾病^[2]。据统计,全球每年有 17~50 亿人发生腹泻,140 万人因腹泻死亡^[3-5]。志贺菌、沙门菌、副溶血性弧菌、弯曲菌、致泻型大肠埃希菌是引起腹泻的主要致病菌。因此,快速、准确、灵敏地检测出致病菌,对腹泻的临床诊断及用药有重要的指导意义。

微流控芯片环介导恒温扩增技术(LAMP)是一种新兴的分子诊断技术^[6],它将微流控芯片的微型化、高通量、低污染、低成本等优点与 LAMP 技术的简便、快捷、高灵敏度等优点相结合^[7],集成了一个新型的诊断技术。本文分别以志贺菌、沙门菌、副溶血性弧菌、空肠弯曲菌、肠聚集性大肠埃希菌、肠侵袭性大肠埃希菌、肠致病性大肠埃希菌、肠产毒素大肠埃希菌的特异性目的片段设计引物,利用微流控芯片 LAMP 技术,在反应体系中加入荧光染料 EvaGreen,在恒温扩增过程中进行实时荧光监测,建立 8 种肠道致病菌同步检测的微流控芯片 LAMP 检测方法。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株 实验所用标准菌株购自北京陆桥技术股份有限公司。具体菌株信息见表 1。

1.2 试剂与仪器 反应预混液(主要成分包括 Bst DNA 聚合酶、dNTPs、EvaGreen);细菌裂解液(北京热景生物技术股份有限公司);粪便提取试剂盒(北京热景生物技术股份有限公司);肠道致病菌微流控芯片(北京热景生物技术股份有限公司);微流控恒温扩增 PCR 多重核酸检测仪(北京热景生物技术股份有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 引物设计与合成 本文使用的志贺菌、沙门菌、副溶血性弧菌、空肠弯曲菌、肠聚集性大肠埃希菌、肠侵袭性大肠埃希菌、肠致病性大肠埃希菌、肠产毒素大肠埃希菌基因组 DNA 引物均由北京热景技术股份有限公司提供。

1.3.2 模板 DNA 的制备 吸取 1 mL 含有实验菌株的培养液,加入到 1.5 mL 无菌离心管中,10 000 r/min 离心 2 min,尽量弃除上清液;加入 100 μ L 细菌裂解液悬浮菌体,95 $^{\circ}$ C 加热 5 min,上清液即为待检测 DNA 模板。

1.3.3 恒温扩增反应体系配制 恒温扩增反应体系为 90 μ L,包括 10 μ L 待检测 DNA 模板、45 μ L 反应预混液、35 μ L DNase/RNase-Free 去离子水。

1.3.4 微流控芯片 LAMP 反应 将恒温扩增反应体系加入肠道致病菌微流控芯片中,使用微流控恒温

扩增 PCR 多重核酸检测仪进行恒温扩增。以 1×10^4 CFU/mL 的福氏志贺菌、鼠伤寒沙门菌、副溶血性弧菌、空肠弯曲菌、大肠埃希菌混合菌液制备的基因组 DNA 为检测靶标测试扩增效率,以高压灭菌水作为反应条件特异性初筛模板,设置恒温扩增温度分别为 60、63、65 $^{\circ}$ C,反应时间 30 min。

表 1 实验用菌株

序号	菌株名称	菌株编号
1	福氏志贺菌	CMCC(B)51572
2	鼠伤寒沙门菌	CMCC(B)50115
3	副溶血性弧菌	ATCC 17802
4	空肠弯曲菌	ATCC 29428
5	大肠埃希菌	ATCC 25922
6	小肠结肠炎耶尔森菌	CMCC(B)52004
7	阪崎肠杆菌	ATCC 29544
8	单核细胞增生李斯特菌	ATCC 19115
9	金黄色葡萄球菌	ATCC 6538
10	铜绿假单胞菌	ATCC 27853
11	肺炎克雷伯菌	ATCC 4352
12	粪肠球菌	ATCC 29212
13	长双歧杆菌	CICC 6068
14	干酪乳杆菌	Casei GIM 1.159

1.3.5 微流控芯片 LAMP 特异度实验 提取福氏志贺菌、鼠伤寒沙门菌、副溶血性弧菌、空肠弯曲菌、大肠埃希菌、小肠结肠炎耶尔森菌、阪崎肠杆菌、单核细胞增生李斯特菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、粪肠球菌、长双歧杆菌、干酪乳杆菌的基因组 DNA,采用 1.3.3 和 1.3.4 的反应体系和扩增方法进行扩增,以此来验证各个检测引物的特异性是否满足检测要求。

1.3.6 微流控芯片 LAMP 灵敏度实验 用无菌生理盐水分别将福氏志贺菌、鼠伤寒沙门菌、副溶血性弧菌、空肠弯曲菌、大肠埃希菌的菌液稀释至 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 CFU/mL,并进行平板菌落计数。然后再将上述菌液混合稀释至 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 CFU/mL 系列浓度,并分别对混合菌液的每个梯度进行模板 DNA 的制备,采用 1.3.3 和 1.3.4 的反应体系和扩增方法进行检测。

1.3.7 模拟样本的检测 将福氏志贺菌、鼠伤寒沙门菌、副溶血性弧菌、空肠弯曲菌、大肠埃希菌的菌液混合,稀释至终浓度分别为 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 CFU/mL 的混合致病菌菌液。取不同浓度的混合致病菌菌液 1 mL 分别加入黄豆粒大小的健康人粪便(约 2.3 g)中,使用菌液将粪便悬浮混匀,4 $^{\circ}$ C 放置过夜,使细菌与粪便充分吸附,即为制备的模拟污染粪便样本。每个浓度制备 3 份模拟污染粪便样本,共制备 15 份,同时制备 3 份只加灭菌纯化水的

未被污染的模拟粪便样本作为阴性对照。使用粪便提取试剂盒提取模拟粪便样本 DNA, 采用 1.3.3 和 1.3.4 的反应体系和扩增方法进行检测。

2 结果

2.1 反应温度优化 在恒温扩增反应体系中, 温度不仅影响着扩增效率还直接关系着体系的特异性。温度高时特异性强, 但引物不能与模板牢固结合, 扩增效率下降; 温度低时产量高, 但可能造成引物与模

板错配, 产生非特异性产物。因此, 在保证特异性的前提下为了提高扩增效率, 需要对恒温扩增反应体系进行温度优化, 以选取最佳的反应条件。综合 8 种肠道致病菌, 在 65 °C 条件下, 扩增效率最佳, 检出时间 (CT) 最短, 且无非特异扩增产物。这表明在相同的时间内, 恒温扩增反应体系在 65 °C 条件下有着更多的特异性产物, 更有利于检测。见表 2。

表 2 反应温度优化结果 (min)

芯片反应孔	致病菌	混合菌液				灭菌纯化水			
		60 °C	63 °C	65 °C	67 °C	60 °C	63 °C	65 °C	67 °C
1	阴性对照	—	—	—	—	—	—	—	—
2	志贺菌	9.5	6.5	7.0	13.5	—	20.0	—	—
3	沙门菌	8.0	5.5	5.5	12.0	—	—	—	—
4	副溶血性弧菌	—	9.0	8.0	—	—	—	—	—
5	空肠弯曲菌	10.0	5.5	5.0	13.0	—	—	—	—
6	肠聚集性大肠埃希菌	13.0	7.5	7.5	16.5	—	—	—	—
7	肠侵袭性大肠埃希菌	—	11.0	10.5	—	—	—	—	—
8	肠致病性大肠埃希菌	—	11.0	10.5	—	—	—	—	—
9	产肠毒素大肠埃希菌	22.5	8.5	9.0	—	—	15.0	—	—
10	阳性对照	14.0	10.0	10.0	15.0	13.0	8.5	9.0	14.5

注: “—”表示未检出, 即无扩增。

2.2 微流控芯片 LAMP 特异性分析 本研究分别将 1.3.5 提取的各菌液基因组 DNA 作为检测模板, 配制成恒温扩增反应体系并加入肠道致病菌微流控芯片中进行恒温扩增, 结果显示, 福氏志贺菌的基因组 DNA 在反应孔 2 和 10 中显示阳性, 在其他反应孔中均为阴性; 鼠伤寒沙门菌的基因组 DNA 在反应孔 3 和 10 中显示阳性, 在其他反应孔中均为阴性; 副溶血性弧菌的基因组 DNA 在反应孔 4 和 10 中显示阳性, 在其他反应孔中均为阴性; 空肠弯曲菌的基因组 DNA 在反应孔 5 和 10 中显示阳性, 在其他反应孔中均为阴性; 大肠埃希菌的基因组 DNA 在反应孔 6~10 显示阳性, 在其他反应孔中均为阴性; 小肠结肠炎耶尔森菌的基因组 DNA、阪崎肠杆菌的基因组 DNA、单核细胞增生李斯特菌的基因组 DNA、金黄色葡萄球菌的基因组 DNA、铜绿假单胞菌的基因组 DNA、肺炎克雷伯氏菌的基因组 DNA、粪肠球菌的基因组 DNA、长双歧杆菌的基因组 DNA、干酪乳杆菌的基因组 DNA, 均只有反应孔 10 显示阳性, 在其他反应孔中全部为阴性。以上结果说明 8 项致病菌的反应体系均未与其他细菌出现交叉反应, 特异性好, 同时也说明芯片的密闭性良好, 各反应孔之间独立, 无交叉反应。说明建立的 8 种肠道致病菌微流控芯片 LAMP 能够为临床诊断提供可靠依据。

2.3 微流控芯片 LAMP 灵敏度分析 为验证

LAMP 对 8 种肠道致病菌的灵敏度, 将提取的 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 CFU/mL 的混合菌液基因组 DNA 进行微流控芯片 LAMP 扩增。结果显示, 混合菌液浓度在 1×10^2 CFU/mL 及以上时 8 种致病菌的荧光值均逐渐增强直至扩增完成, 发生扩增反应, 即该方法对福氏志贺菌、鼠伤寒沙门菌、副溶血性弧菌、空肠弯曲菌、肠聚集性大肠埃希菌、肠侵袭性大肠埃希菌、产肠毒素大肠埃希菌、肠致病性大肠埃希菌的最低检测限均为 100 CFU/mL; 并且随着混合菌液浓度的降低, 引物与模板接触的可能性减少, 导致反应所需时间变长; 当混合菌液浓度为 1×10^1 CFU/mL 时, 因浓度太低与引物结合失败而无法完成扩增反应。

2.4 模拟粪便样本检测 模拟粪便样本中各致病菌的浓度分别为 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 、0 CFU/mL, 提取基因组 DNA 后检测。本实验建立的微流控芯片 LAMP 对模拟粪便样本中福氏志贺菌、鼠伤寒沙门菌、副溶血性弧菌、肠侵袭性大肠埃希菌、肠致病性大肠埃希菌、肠产毒素大肠埃希菌的最低检出限为 100 CFU/mL; 对空肠弯曲菌和肠聚集性大肠埃希菌的最低检出限为 1 000 CFU/mL, 同时对灭菌纯化水处理的粪便未检出上述致病菌。对模拟粪便的检测结果表明, 微流控芯片 LAMP 能够成功检测粪便中的致病菌, 且与对菌液的检测时间一

致,最快可在 10 min 内获得阳性判定结果,而对于最低检出限浓度的粪便样本,在 30 min 内获得阳性判定结果,整个过程不超过 30 min。见表 3。

表 3 不同浓度模拟粪便样本中各致病菌 CT 检测结果 (min)

芯片反应孔	致病菌	1×10 ⁵ CFU/mL			1×10 ⁴ CFU/mL			1×10 ³ CFU/mL			1×10 ² CFU/mL			1×10 ¹ CFU/mL			灭菌纯化水		
		N ₁	N ₂	N ₃	N ₁	N ₂	N ₃	N ₁	N ₂	N ₃	N ₁	N ₂	N ₃	N ₁	N ₂	N ₃	N ₁	N ₂	N ₃
1	阴性对照	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	志贺菌	6.5	7.0	6.5	7.5	7.5	8.0	10.5	11.0	11.5	16.0	17.5	17.0	—	—	—	—	—	—
3	沙门菌	5.0	5.5	5.5	6.0	5.5	6.0	12.0	11.5	12.0	17.5	16.5	18.0	—	—	—	—	—	—
4	副溶血性弧菌	7.0	7.0	7.0	8.5	8.0	8.5	11.0	11.5	11.0	19.0	20.0	20.0	—	—	—	—	—	—
5	空肠弯曲菌	5.5	5.0	5.0	5.5	6.0	6.0	9.0	9.5	8.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	肠聚集性大肠埃希菌	7.0	7.0	6.5	7.5	7.5	8.0	12.0	13.0	13.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7	肠侵袭性大肠埃希菌	9.0	9.0	9.0	10.5	10.0	10.5	15.0	16.0	15.5	22.0	22.5	24.0	—	—	—	—	—	—
8	肠致病性大肠埃希菌	9.5	9.0	9.5	10.5	11.0	10.5	13.0	14.0	13.5	24.0	22.5	21.5	—	—	—	—	—	—
9	产肠毒素大肠埃希菌	9.0	8.5	8.5	9.0	10.0	9.5	12.5	12.0	13.0	23.0	23.5	25.0	—	—	—	—	—	—
10	阳性对照	9.5	10.0	10.0	9.5	9.5	9.5	10.0	9.5	10.0	10.0	10.0	9.5	10.0	9.5	10.0	9.5	10.0	9.5

注:表格中“—”表示未检出,即无扩增;N₁、N₂、N₃ 分别代表第 1 份、第 2 份、第 3 份样本。

3 讨 论

无论在发达国家还是发展中国家,急性腹泻仍然是一个严重的公共卫生问题^[8]。志贺菌、沙门菌、副溶血性弧菌、空肠弯曲菌、肠聚集性大肠埃希菌、肠侵袭性大肠埃希菌、肠致病性大肠埃希菌、产肠毒素大肠埃希菌是肠道感染的常见致病菌,能够经过消化道传播,引起局部暴发流行^[9-10]。所以,亟需一种快速、准确、灵敏、便捷的检测手段,用于检测粪便样本中的肠道致病菌群,预防疾病流行,并有效指导抗菌药物的使用。

本研究通过优化传统的 LAMP 检测方法,建立多通道微流控芯片 LAMP,并采用对扩增反应抑制较小的 EvaGreen 荧光染料来进行实时荧光监测,实现了 8 种重要肠道病原体快速、特异、灵敏和一体化检测。检测结果显示,志贺菌、沙门菌、副溶血性弧菌、空肠弯曲菌、肠聚集性大肠埃希菌、肠侵袭性大肠埃希菌、肠致病性大肠埃希菌、产肠毒素大肠埃希菌共 8 种致病菌可通过同一张芯片同时检测。所需试剂量少,且微流控芯片 LAMP 无须进行变性、退火、延伸等复杂步骤即可实现扩增,与实时荧光定量 PCR 方法需要昂贵、精密实验仪器相比,反应成本低。同时,微流控芯片 LAMP 技术,灵敏度较高,芯片中 8 种致病菌的检测灵敏度均为 100 CFU/mL,比传统 LAMP 方法灵敏度高出 10 倍左右^[11]。在模拟粪便样本中,福氏志贺菌、鼠伤寒沙门菌、副溶血性弧菌、肠侵袭性大肠埃希菌、肠致病性大肠埃希菌、产肠毒素大肠埃希菌的最低检出限均为 100 CFU/mL,空肠弯曲菌和肠聚集性大肠埃希菌的最低检出限为 1 000 CFU/mL,优于多重 PCR 检测方法^[12-13]。此外,这 8 种致病菌的扩增检测可以在 30 min 之内判定结果,比大部分相同灵敏度水平的分子生物学快速检测方法用

时短^[14-15]。

本研究针对志贺菌、沙门菌、副溶血性弧菌、空肠弯曲菌、肠聚集性大肠埃希菌、肠侵袭性大肠埃希菌、肠致病性大肠埃希菌、产肠毒素大肠埃希菌的保守基因分别设计了一套特异性引物,使其适合于该 8 种致病菌的核酸诊断。此外,微流控芯片 LAMP 实现了全封闭操作,避免了气溶胶的污染^[16-17]。同时,在微流控芯片上还设置了内参对照,可以监控实验过程是否正常,实现了扩增反应体系的全封闭化和微量化,从而避免了人员操作造成的人为实验污染,大大提高了检测的准确性和特异度^[12,18-19]。

综上所述,针对志贺菌、沙门菌、副溶血性弧菌、空肠弯曲菌、肠聚集性大肠埃希菌、肠侵袭性大肠埃希菌、肠道致病性大肠埃希菌、产肠毒素大肠埃希菌设计引物并建立微流控芯片 LAMP,可应用于粪便样本检测。8 种致病菌均能在 30 min 内获得阳性判定结果,且检测灵敏度可达 100 CFU/mL。模拟粪便样本中福氏志贺菌、鼠伤寒沙门菌、副溶血性弧菌、肠侵袭性大肠埃希菌、肠致病性大肠埃希菌、产肠毒素大肠埃希菌的最低检测限可达 100 CFU/mL;空肠弯曲菌和肠聚集性大肠埃希菌的最低检出限为 1 000 CFU/mL,说明微流控芯片 LAMP 具有用时短、反应快、特异度和灵敏度高且操作简单等特点,从而使病原微生物床旁检测(POCT)成为可能。

参考文献

[1] CAMERON E A, SPERANDIO V. Frenemies: signaling and nutritional integration in pathogen-microbiota-host interactions[J]. Cell Host Microb, 2015, 18(3): 275-284.
 [2] LUSTRI B C, SPERANDIO V, MOREIRA C G, et al. Bacterial chat: intestinal metabolites and signals in host-microbiota-pathogen interactions [J]. Infect Immun,

- 2017,85:e00476-17.
- [3] World Health Organization. Diarrhoeal disease[EB/OL]. (2017-05-02) [2021-06-18]. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>.
- [4] LOZANO R, NAGHAVI M, FOREMAN K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010; a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010[J]. *Lancet*, 2012, 380(9859):2095-2128.
- [5] BENNETT J E, DOLIN R, BLASER M J. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases(8th ed.) [M]. Philadelphia: Churchill Livingstone/Elsevier, 2014.
- [6] 林文慧, 邹秉杰, 宋沁馨, 等. 多重环介导恒温扩增技术研究进展[J]. *遗传*, 2015, 37(9):899-910.
- [7] 黄世光, 靳翔宇, 林荣赞, 等. 微流控芯片核酸分析系统及其精准医学应用[J]. *中国激光*, 2018, 45(3):124-131.
- [8] LYNCH O A, CAGNEY C, MCDOWELL D A, et al. Occurrence of fastidious *Campylobacter* spp. in fresh meat and poultry using an adapted cultural protocol[J]. *Int J Food Mic*, 2011, 150(2/3):171-177.
- [9] BRUSCA S B, ABRAMSON S B, SCHER J U. Microbiome and mucosal inflammation as extra-articular triggers for rheumatoid arthritis and autoimmunity[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2014, 26(1):101-107.
- [10] SCHER J U, SCZESNAK A, LONGMAN R S, et al. Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis [J]. *ELife*, 2013, 2:e01202.
- [11] 李玉锋, 李帅, 黄丽娟, 等. LAMP 技术在食品致病菌检测中的研究进展[J]. *西华大学学报*, 2011, 30(1):16-18.
- [12] 刘金华, 史艳宇, 马路遥, 等. 几种常见肠道致病菌多重 PCR 检测的效果评价[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2012, 38(2):382-385.
- [13] 张明娟, 王娟, 袁磊, 等. 多重聚合酶链式反应技术在食源性致病菌检测上的应用研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(2):305-310.
- [14] 陈秀琴, 黄梅清, 郑敏, 等. 食源性致病菌快速检测技术及其应用研究进展[J]. *福建农业学报*, 2018, 33(4):438-446.
- [15] CHAUMPLUK P, PLUBCHAROENSOOK P, PRA-SONGSUK S. Rapid detection of aflatoxigenic *Aspergillus* sp. in herbal specimens by a simple, bendable, paper-based lab-on-a-chip[J]. *Biotechnology*, 2016, 11(6):768-779.
- [16] 北京卓诚惠生生物科技有限公司. 十四种食源性致病菌多重 PCR 检测引物组和试剂盒: CN103484546B[P]. 2015-07-01.
- [17] 南京美宁康诚生物科技有限公司. 11 种肠道致病菌核酸多重 PCR 检测试剂盒及其应用: CN105525031A[P]. 2016-04-27.
- [18] BECKMAN A K, FERRIERI P. Prospective Investigation of an Automated PCR/Nucleic Acid Microarray-Based Platform for Enteric Pathogen Testing [J]. *Lab Med*, 2019, 50(4):390-395.
- [19] ZHANG H, MORRISON S, TANG Y W. Multiplex polymerase chain reaction tests for detection of pathogens associated with gastroenteritis[J]. *Clin Lab Med*, 2015, 35(2):461-486.

(收稿日期:2021-10-12 修回日期:2021-12-31)

(上接第 1424 页)

- [20] ZHANG R, LIU L, ZHOU H, et al. Nationwide Surveillance of Clinical Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) Strains in China[J]. *EBio Medicine*, 2017, 19:98-106.
- [21] TAMMA P D, GOODMAN K E, HARRIS A D, et al. Comparing the Outcomes of Patients With Carbapenemase-Producing and Non-Carbapenemase-Producing Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Bacteremia [J]. *Clin Infect Dis*, 2017, 64(3):257-264.
- [22] LOGAN L K, WEINSTEIN R A. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace[J]. *J Infect Dis*, 2017, 215(Suppl 1):S28-S36.
- [23] 刘婧娴, 俞静, 刘瑛. 产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌的耐药基因及流行病学研究进展[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2015, 15(1):91-96.
- [24] 韩仁如, 胡付品. 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌中 OXA-48 家族碳青霉烯酶分子流行病学研究进展[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2019, 19(6):687-690.
- [25] YIN D, WU S, YANG Y, et al. Results from the China Antimicrobial Surveillance Network (CHINET) in 2017 of the In Vitro Activities of Ceftazidime-Avibactam and Ceftolozane-Tazobactam against Clinical Isolates of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, 63(4):e02431-18.
- [26] 陆燕飞, 郑秀华, 张晓慧, 等. 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌头孢他啶/阿维巴坦的敏感性分析及疗效评价[J]. *临床检验杂志*, 2021, 39(5):367-369.
- [27] 任艳丽, 王云英, 蒋敏, 等. 不同碳青霉烯酶型肠杆菌科细菌感染的治疗策略研究[J]. *中国抗生素杂志*, 2021, 46(4):339-345.
- [28] 李静, 耿志军, 郑晶, 等. 胶体金免疫层析法快速检测 CRE 碳青霉烯酶的效果评价[J]. *蚌埠医学院学报*, 2021, 46(8):1089-1092.

(收稿日期:2021-09-12 修回日期:2022-01-28)