

基于 OpenArray 技术检测呼吸道病原微生物的 全流程解决方案

在本应用文档中，我们将介绍以下内容：

- Applied Biosystems™ Qualified TaqMan™ Assay用于呼吸道微生物病原检测时，符合严格的性能标准要求
- Applied Biosystems™ OpenArray™技术可同时检测多达 42种呼吸道微生物和3种对照，可定制检测靶标，极具灵活性
- 具有成本效益、高通量的检测工作流程，最大限度地缩短了手动操作时间，其中包括Thermo Scientific™ KingFisher™仪器、Applied Biosystems™ TaqMan™ OpenArray™检测芯片以及Applied Biosystems™ QuantStudio™ 12K Flex实时荧光定量PCR系统

前言

上呼吸道感染和下呼吸道感染是由多种微生物引起的，包括RNA和DNA病毒、细菌甚至真菌，但通常临床症状相似。这些病原体的检测通常具有挑战性：

免疫法仅检测少数呼吸道病原体且灵敏度低；基于培养的方法耗费劳动力、周转时间长，并且常因培养过程中微生物生长条件挑剔而导致假阴性结果。尽管分子检测的灵敏度更高，但大多数商品化的分子检测产品的价格高昂，并且主要集中于病毒检测或细菌检测，缺乏根据实验室需求自定义靶标列表的灵活性。此外，病毒和细菌病原体并发的发病率受到日益关注，因此急需有效的检测方法。

为了满足全面覆盖呼吸道病原体检测的需求，我们推出了一种基于panel的分子检测解决方案，可用于同时检测多种呼吸道病毒、细菌和真菌。TaqMan OpenArray检测芯片是基于qPCR的高通量检测方式，可检测极低浓度的病原微生物。内容灵活并可定制，满足所有实验室的检测需求。结合KingFisher仪器和QuantStudio 12K Flex实时荧光定量PCR系统使用时，检测芯片为呼吸道病原体检测提供了一个完整的端到端解决方案(图1)。



图1. 呼吸道病原体检测工作流程。使用KingFisher仪器和Applied Biosystems™ MagMAX病毒/病原体超核酸分离试剂盒(MagMAX Viral/Pathogen Ultra Nucleic Acid Isolation Kit)提取呼吸道样品中的总核酸并进行预扩增，然后使用TaqMan OpenArray检测芯片和QuantStudio 12K Flex系统进行实时荧光定量PCR分析。结果以42个靶标检出或未检出的形式提供，包括细菌、RNA和DNA病毒以及真菌，以及*B. atrophaeus*提取和Xeno RNA加标对照。

材料与amp;方法

分离呼吸道样品中的总核酸

Applied Biosystems™ MagMAX病毒/病原体超核酸分离试剂盒(MagMAX™ Viral/Pathogen Ultra Nucleic Acid Isolation Kit)用于分离呼吸道样品中的总核酸(TNA)。该试剂盒已经过优化，可用于提取呼吸道样品中不同微生物(RNA病毒、DNA病毒、细菌和真菌)的TNA。结果表明，该试剂盒非常适用于这些呼吸道样品类型，包括鼻咽拭子、鼻咽抽吸物和支气管肺泡灌洗液。使用KingFisher仪器分离96个样品中的TNA大约需要1.5小时，包括30分钟的手动操作时间。

基于OpenArray平台检测呼吸道微生物

TaqMan Assay的设计经过了全面的呼吸道病原微生物靶序列生物信息学选择和分析，确保提供广泛的覆盖范围和高特异性。此外，使用合成模板和多种核酸提取样品(从整个微生物标准品中提取的核酸以及从临床研究样品中提取的核酸)对这些Assay进行了广泛的性能测试，确保获得高准确度、重现性、灵敏度和特异性的结果。用于呼吸道病原微生物检测的完整TaqMan Assay列表见表1。

OpenArray技术是一种用于实时荧光定量PCR分析的高通量、格式灵活的系统，它利用显微镜载玻片大小、带有3072个孔的不锈钢芯片进行反应，其每个孔体积为33 nL，单独进行反应；可根据客户定制要求将TaqMan Assay点样进OpenArray芯片。本研究使用的定制格式的TaqMan OpenArray检测芯片含有针对42种呼吸道微生物靶标的所有44种呼吸道病原微生物Assay以及3种对照Assay；在每张芯片上，每个Assay至少进行3次技术重复。对照Assay针对的相应对照品为Applied Biosystems™ TaqMan™通用提取对照*B. atrophaeus* (Applied Biosystems™ TaqMan™ Universal Extraction Control Organism *B. atrophaeus*)、TaqMan™通用RNA加标/逆转录(Xeno)对照(TaqMan™ Universal RNA Spike-In/Reverse Transcription (Xeno) Control)以及人RNase P基因(RPPH1)。商品化的Applied Biosystems™ TaqMan™ OpenArray呼吸道微生物检测芯片

(Applied Biosystems™ TaqMan™ OpenArray Respiratory Tract Microbiota Plate)可用于鉴定31种关键呼吸道病原微生物靶标，外加3种对照Assay。这种包含112种Assay的布局模式可同时对所有呼吸道微生物群重复测定3次，每张芯片最多可检测24个样品。

使用经优化的呼吸道微生物病原检测方案对本次临床研究中的所有样品进行了检测。逆转录与预扩增步骤的加入最大程度提高了检测灵敏度，同时节省了样品。合成模板或纯化的基因组核酸样品先进行逆转录和纯化，具体如下：将5μL的样品与2.5μL Applied Biosystems™ TaqPath™一步法RT-qPCR预混液，CG (Applied Biosystems™ TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG)和2.5μL Applied Biosystems™ TaqMan™呼吸道微生物预扩增引物池(Applied Biosystems™ TaqMan PreAmp Pool, Respiratory Tract Microbiota)混合，然后进行逆转录并扩增14个循环。使用无核酸酶水将预扩增样品稀释10倍，再将2.5 μL稀释样品与2.5 μL Applied Biosystems™ TaqMan™ OpenArray™实时PCR预混液(Applied Biosystems™ TaqMan™ OpenArray™ Real-Time PCR Master Mix)混合，转移至OpenArray™ 384孔样品检测板的孔中。然后，使用Applied Biosystems™ QuantStudio™ 12K Flex AccuFill™系统将每个反应转移至TaqMan OpenArray芯片的子阵上。然后，在QuantStudio 12K Flex实时荧光定量PCR系统上运行检测。最后，通过仪器软件分析数据。

有关样品提取、标靶、对照检测和运行实验的详细信息，请参阅应用指南《呼吸道病原微生物检测实验：基于TaqMan Assay和OpenArray芯片的呼吸道病原微生物检测实验方案》(Respiratory tract microbiota profiling experiments: TaqMan Assays for respiratory tract microbiota profiling experiments using OpenArray plates”，文献编号MAN0017952)。

表1. 呼吸道微生物的分类。

| 微生物类型 | 核酸类型 | Assay ID | Assay 名称 | 微生物名称 | | |
|---------------|----------------------|---------------|---------------------|---------------------------|--------------------|-----------------|
| 病毒 | DNA | Vi99990001_po | AdV_1of2 | 腺病毒1/2* | | |
| | | Vi99990002_po | AdV_2of2 | 腺病毒2/2* | | |
| | | Vi99990003_po | HBoV | 人博卡病毒 | | |
| | | Vi06439647_s1 | HHV3 | 人疱疹病毒3型(HHV3 — 水痘带状疱疹病毒) | | |
| | | Vi06439675_s1 | HHV4 | 人疱疹病毒4型(HHV4 — 爱泼斯坦巴氏病毒) | | |
| | | Vi06439643_s1 | HHV5 | 人疱疹病毒5型(HHV5 — 巨细胞病毒) | | |
| | | Vi06439627_s1 | HHV6 | 人疱疹病毒6型(HHV6) | | |
| | RNA | Vi06439671_s1 | CoV_229E | 人冠状病毒229E | | |
| | | Vi06439674_s1 | CoV_HKU1 | 人冠状病毒HKU1 | | |
| | | Vi06439673_s1 | CoV_NL63 | 人冠状病毒NL63 | | |
| | | Vi06439646_s1 | CoV_OC43 | 人冠状病毒OC43 | | |
| | | Vi06439631_s1 | EV_pan | 人肠道病毒(pan) | | |
| | | Vi06439669_s1 | EV_D68 | 人肠道病毒D68 | | |
| | | Vi99990004_po | hMPV | 人类偏肺病毒(hMPV) | | |
| | | Vi06439642_s1 | hPIV1 | 人副流感病毒1型(hPIV1) | | |
| | | Vi06439672_s1 | hPIV2 | 人副流感病毒2型(hPIV2) | | |
| | | Vi06439670_s1 | hPIV3 | 人副流感病毒3型(hPIV3) | | |
| | | Vi99990005_po | hPIV4 | 人副流感病毒4型(hPIV4) | | |
| | | Vi99990006_po | HPeV | 人小RNA病毒 | | |
| | | Vi99990014_po | RSVA | 人呼吸道合胞病毒A亚型(RSVA) | | |
| | | Vi99990015_po | RSVB | 人呼吸道合胞病毒B亚型(RSVB) | | |
| | | Vi99990007_po | RV_1of2 | 人鼻病毒1/2* | | |
| | | Vi99990008_po | RV_2of2 | 人鼻病毒2/2* | | |
| | | Vi99990011_po | Flu_A_pan | 甲型流感 | | |
| | | Vi99990009_po | Flu_A_H1 | 甲型流感/H1-2009 | | |
| | | Vi99990010_po | Flu_A_H3 | 甲型流感/H3 | | |
| | | Vi99990012_po | Flu_B_pan | 乙型流感 | | |
| | | Vi99990013_po | Measles | 麻疹病毒 | | |
| | | Vi06439644_s1 | MERS_CoV | 中东呼吸综合征冠状病毒(MERS) | | |
| | | Vi06439657_s1 | Mumps | 腮腺炎病毒 | | |
| | | Vi06439634_s1 | SARS_CoV | 严重急性呼吸系统综合症冠状病毒(SARS) | | |
| | | 细菌 | DNA | Ba06439624_s1 | <i>Bordetella</i> | 支气管鲍特菌、副百日咳或百日咳 |
| | | | | Ba06439621_s1 | <i>B.holmesii</i> | 霍氏鲍特菌 |
| Ba06439623_s1 | <i>B.pertussis</i> | | | 百日咳鲍特菌 | | |
| Ba06439616_s1 | <i>C.pneumoniae</i> | | | 肺炎衣原体 | | |
| Ba06439618_s1 | <i>C.burnetii</i> | | | 贝氏柯克斯体 | | |
| Ba06439625_s1 | <i>H.influenzae</i> | | | 流感嗜血杆菌 | | |
| Ba04932083_s1 | <i>K.pneumoniae</i> | | | 肺炎克雷伯氏菌 | | |
| Ba06439617_s1 | <i>L.pneumophila</i> | | | 嗜肺性军团菌 | | |
| Ba06439622_s1 | <i>M.catarrhalis</i> | | | 卡他莫拉菌 | | |
| Ba06439620_s1 | <i>M.pneumoniae</i> | | | 肺炎支原体 | | |
| Ba04646259_s1 | <i>S.aureus</i> | | | 金黄色葡萄球菌 | | |
| Ba06439619_s1 | <i>S.pneumoniae</i> | | | 肺炎链球菌 | | |
| 真菌 | DNA | | | Fn06439626_s1 | <i>P.jirovecii</i> | 卡氏肺孢子虫 |
| 对照 | RNA | Ac00010014_a1 | Xeno | Xeno RNA对照 | | |
| | DNA | Hs04930436_g1 | RPPH1 | 核糖核酸酶P H1RNA | | |
| | | Ba06596576_s1 | <i>B.atrophaeus</i> | 萎缩芽孢杆菌或枯草芽孢杆菌, globigii亚种 | | |

* 对于腺病毒和鼻病毒, 需要两种Assay才能完全覆盖所有毒株。有关各Assay的更多信息, 请访问 thermofisher.com/taqman。

结果

TaqMan Assay的灵敏度和线性动态范围

对Applied Biosystems™ TaqMan™呼吸道微生物扩增对照(Applied Biosystems™ TaqMan™ Respiratory Tract Microbiota Amplification Control)进行连续稀释, 评估TaqMan Assay用于检测呼吸道微生物群的灵敏度、效率和线性动态范围(LDR)。扩增对照品为线性质粒DNA对照品, 包含所有靶标序列。使用与呼吸道样品和微生物对照样品相同的优化方案, 对扩增对照品进行预扩增和实时荧光定量PCR分析, 无需样品制备步骤。使用定制格式的TaqMan OpenArray芯片对扩增对照品的连续稀释液(10^5 至

0.1拷贝/ μL)进行检测, 该检测芯片涵盖所有44种呼吸道微生物群靶标及对照(图2)。

在本次实验中, 呼吸道微生物靶标的检测限(LOD)低至1-10拷贝/ μL (图2), 灵敏度高, 低浓度下的偏差极小。所有靶标的LDR均为5个数量级(10^5 -1拷贝/ μL), 其中 R^2 大于0.99 PCR效率极其接近100%。图3显示了四种病毒靶标和两种细菌靶标的代表性LDR数据图。标准误差线表明, 重复样品之间的偏差很小。

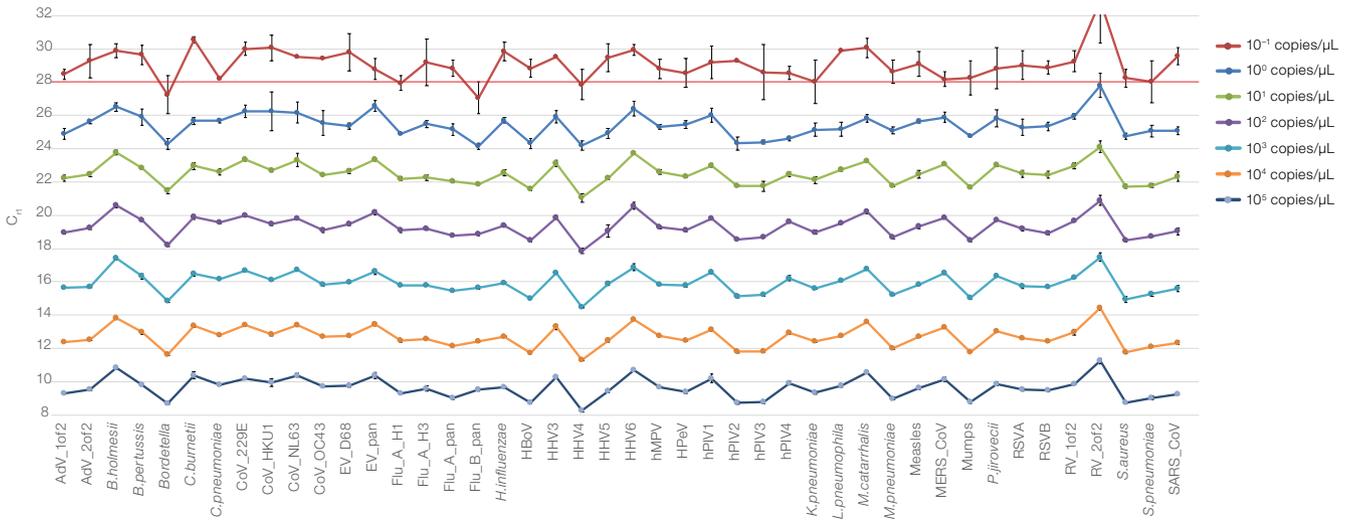


图2. TaqMan呼吸道微生物扩增对照的检测限。使用经优化的预扩增步骤、实时荧光定量PCR方案以及TaqMan OpenArray芯片(56 Assay格式)对扩增对照品的连续稀释液(稀释液浓度为 10^5 -0.1拷贝/ μL)进行检测。该检测芯片包含所有44种呼吸道微生物群靶标。每个浓度进行四次技术重复。所有靶标的检测下限低至1-10拷贝/ μL , C_t 阈值为28 (用红线标示)。注意: RV_2of2靶标的 C_t 值和标准偏差比RV_1of2的高, 因为它与扩增对照品鼻病毒的序列相比, 有1个核苷酸序列不匹配。

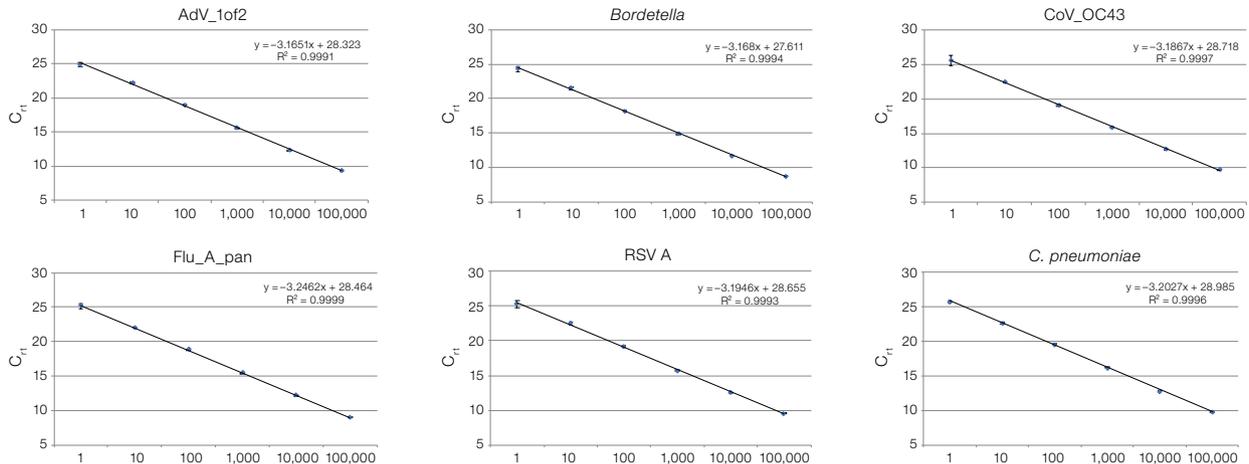


图3. 代表性呼吸道病原微生物TaqMan Assay的LDR结果。使用图2中TaqMan呼吸道微生物扩增对照的数据, 计算呼吸道微生物群靶标的LDR值。稀释液浓度为 10^5 -1拷贝/ μL 。显示了6种代表性检测靶标的数据图。所有靶标的LDR均为5个数量级, R^2 大于0.99, PCR效率接近100%。

同时使用22种商品化的低浓度完整生物样品(加入病毒转运培养基中)测定一部分病毒和细菌呼吸道靶标生物的工作流程LOD值。使用MagMAX病毒/病原体超核酸分离试剂盒(MagMAX Viral/Pathogen Ultra Nucleic Acid Isolation Kit)提取TNA, 对样品等分后进行逆转录和预扩增, 然后在TaqMan OpenArray芯片上进行实时荧光定量PCR分析。

对两倍连续稀释液(涵盖每个生物体的LOD估测值)进行12次重复检测。然后, 通过概率回归分析计算LOD值。对0.25X、1X和4X LOD浓度下的其他12份提取液进行检测, 测定LOD值。表2中的LOD值与文献中使用其他qPCR平台检测呼吸道微生物获得的结果相似。

表2. 使用TaqMan OpenArray芯片检测呼吸道微生物群获得的TaqMan Assay LOD值。

| 微生物(毒株) | Assay名称 | LOD值(单位/mL)* | 95%置信区间 |
|-----------------------------|----------------------|-----------------------|--|
| 腺病毒(1) | AdV_1of2 | 7.81×10 | $(2.09 \times 10, 2.92 \times 10^1)$ |
| 冠状病毒229E | CoV_229E | 1.40×10^{-1} | $(4.11 \times 10^{-2}, 4.77 \times 10^{-1})$ |
| 冠状病毒NL63 | CoV_NL63 | 2.94×10^{-3} | $(1.02 \times 10^{-3}, 8.44 \times 10^{-3})$ |
| 冠状病毒OC43 | CoV_OC43 | 4.15×10^{-1} | $(8.96 \times 10^{-2}, 1.92 \times 10^0)$ |
| 肠道病毒68型(2007年分离株) | EV_D68 | 4.01×10^{-2} | $(1.26 \times 10^{-2}, 1.28 \times 10^{-1})$ |
| 肠道病毒71型(2003年分离株) | EV_pan | 6.95×10^{-2} | $(1.70 \times 10^{-2}, 2.85 \times 10^{-1})$ |
| 人类偏肺病毒(IA-2002) | hMPV | 7.83×10^{-2} | $(2.25 \times 10^{-2}, 2.73 \times 10^{-1})$ |
| 甲型流感H1N1 (A/Brisbane/59/07) | Flu_A_pan | 6.48×10^{-3} | $(2.49 \times 10^{-3}, 1.69 \times 10^{-2})$ |
| 甲型流感H1N1pdm (NY/03/09) | Flu_A_H1 | 4.87×10^{-3} | $(1.27 \times 10^{-3}, 1.87 \times 10^{-2})$ |
| 甲型流感H1N1pdm (NY/03/09) | Flu_A_pan | 1.63×10^{-2} | $(1.14 \times 10^{-3}, 2.32 \times 10^{-1})$ |
| 甲型流感H3 (A/Wisconsin/67/05) | Flu_A_H3 | 1.91×10^{-2} | $(4.45 \times 10^{-3}, 8.21 \times 10^{-2})$ |
| 甲型流感H3 (A/Wisconsin/67/05) | Flu_A_pan | 1.31×10^{-2} | $(4.64 \times 10^{-3}, 3.70 \times 10^{-2})$ |
| 乙型流感(B/Florida/04/06) | Flu_B_pan | 6.11×10^{-2} | $(1.96 \times 10^{-2}, 1.91 \times 10^{-1})$ |
| 副流感病毒1型 | hPIV1 | 2.58×10^{-3} | $(1.40 \times 10^{-3}, 4.79 \times 10^{-3})$ |
| 副流感病毒2型 | hPIV2 | 2.70×10 | $(8.99 \times 10^{-1}, 8.14 \times 10^0)$ |
| 副流感病毒3型 | hPIV3 | 2.83×10 | $(9.13 \times 10^{-1}, 8.75 \times 10^0)$ |
| 副流感病毒4型 | hPIV4 | 1.85×10 | $(7.60 \times 10^{-1}, 4.51 \times 10^0)$ |
| 呼吸道合胞病毒A亚型(2006年分离株) | RSVA | 8.48×10^{-2} | $(2.15 \times 10^{-2}, 3.34 \times 10^{-1})$ |
| 呼吸道合胞病毒B亚型(CH93 (18) -18) | RSVB | 2.62×10^{-1} | $(6.86 \times 10^{-2}, 1.00 \times 10^0)$ |
| 鼻病毒/肠道病毒(1A) | RV_1of2 | 1.49×10^{-1} | $(4.08 \times 10^{-2}, 5.43 \times 10^{-1})$ |
| 百日咳鲍特菌(E595) | <i>Bordetella</i> | 2.16×10^4 | $(3.74 \times 10^3, 1.25 \times 10^5)$ |
| 百日咳鲍特菌(E431) | <i>B.pertussis</i> | 9.87×10^3 | $(2.31 \times 10^3, 4.21 \times 10^4)$ |
| 百日咳鲍特菌(E431) | <i>Bordetella</i> | 9.63×10^3 | $(2.37 \times 10^3, 3.91 \times 10^4)$ |
| 嗜肺性军团菌(费城) | <i>L.pneumophila</i> | 2.12×10^2 | $(6.71 \times 10^1, 6.70 \times 10^2)$ |
| 肺炎支原体(M129) | <i>M.pneumoniae</i> | 8.71×10 | $(1.38 \times 10^0, 5.49 \times 10^1)$ |

* 病毒的LOD单位为TCID₅₀/mL, 细菌的LOD单位为CFU/mL。

TaqMan Assay提供高特异性呼吸道病原微生物检测

用于呼吸道病原微生物群检测的TaqMan Assay经由严格的生物信息学分析筛选，确保尽可能覆盖所有菌株/毒株，同时尽可能减少脱靶交叉反应。此外，还使用包容性样品Panel对每个Assay进行了测试(表3)，该样品Panel从靶标微生物(从ATCC获得的核酸)上分离的在靶和脱靶基因组RNA或DNA。该综合样品panel涵盖42个呼吸道微生物群靶标中的29个(占69%)；缺少的几个微生物为无法培养、生物安全等级为3和4的微生物。

当使用TaqMan OpenArray芯片同时对这些呼吸道微生物基因组进行筛查时，可获得高特异性结果(表4)。此外，通过排他性样本组合对非靶标微生物进行检测获得的结果也表明，这些呼吸道微生物靶标不会与密切相关的物种和其他呼吸道微生物发生交叉反应(见表5，数据未显示)。

表3. 呼吸道微生物群包容性对照。

| 微生物类型 | 核酸类型 | 微生物 | ATCC ID* |
|---------|------------|--------------|-----------|
| 病毒 | DNA | 腺病毒C | VR-846D |
| | | 腺病毒E | VR-1572D |
| | | HHV3 | VR-1367DQ |
| | | HHV5 | VR-538DQ |
| | | 人冠状病毒229E | VR-740D |
| | | 人冠状病毒OC43 | VR-1558D |
| | RNA | 肠道病毒D68 | VR-1823D |
| | | 肠道病毒71 | VR-1432DQ |
| | | 鼻病毒B | VR-1663DQ |
| | | 甲型流感病毒(H1N1) | VR-1736D |
| | | 乙型流感病毒(BY) | VR-1813D |
| | | 麻疹病毒 | VR-24D |
| | | 腮腺炎病毒 | VR-106D |
| | | hPIV1 | VR-94D |
| | | hPIV2 | VR-92D |
| | | hPIV3 | VR-93D |
| | | hPIV4b | VR-1377D |
| | | RSVA | VR-1540D |
| | | RSVB | VR-1803D |
| | | 细菌 | DNA |
| 霍氏鲍特菌 | 51541_D2 | | |
| 副百日咳鲍特菌 | BAA-587D-5 | | |
| 百日咳鲍特菌 | 9797D-5 | | |
| 肺炎衣原体 | VR-1360D | | |
| 流感嗜血杆菌 | 51907DQ | | |
| 肺炎克雷伯氏菌 | 700721DQ | | |
| 嗜肺性军团菌 | 33152DQ | | |
| 卡他莫拉菌 | 25240D-5 | | |
| 肺炎支原体 | 15531D | | |
| 金黄色葡萄球菌 | BAA-1718DQ | | |
| 肺炎链球菌 | 700669DQ | | |

* 基因组核酸对照品来源于ATCC。

表4. 使用ATCC包容性样品Panel对呼吸道病原微生物特异性进行检测。

| | 腺病毒C | 腺病毒E | 霍氏鲍特菌 | 百日咳鲍特菌 | 副百日咳鲍特菌 | 支气管炎鲍特菌 | 肺炎衣原体 | 冠状病毒229E | 冠状病毒OC43 | 肠道病毒D68 | 肠道病毒71 | 甲型流感(H1N1) | 乙型流感 | 流感嗜血杆菌 | HHV3 | HHV5 | PIV1 | PIV2 | PIV3 | PIV4b | 肺炎克雷伯氏菌 | 嗜肺性军团菌 | 卡他莫拉菌 | 肺炎支原体 | Measles | Mumps | RSVA | RSVB | 鼻病毒B | 金黄色葡萄球菌 | 肺炎链球菌 |
|---------------------|-------|-------|-------|--------|---------|---------|-------|----------|----------|---------|--------|------------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|--------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|-------|---------|-------|
| AdV_1of2 | 17.98 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AdV_2of2 | | 19.84 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>B.holmesii</i> | | | 17.44 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>B.pertussis</i> | | | | 17.96 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Bordetella</i> | | | | 17.71 | 17.87 | 17.79 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>C.pneumoniae</i> | | | | | | | 15.09 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CoV_229E | | | | | | | | 22.87 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CoV_OC43 | | | | | | | | | 16.35 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| EV_D68 | | | | | | | | | | 16.80 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| EV_pan | | | | | | | | | | 23.14 | 21.85 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Flu_A_H1 | | | | | | | | | | | | 16.70 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Flu_A_pan | | | | | | | | | | | | 14.76 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Flu_B_pan | | | | | | | | | | | | | 15.87 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>H.influenzae</i> | | | | | | | | | | | | | | 17.69 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| HHV3 | | | | | | | | | | | | | | | 14.48 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| HHV5 | | | | | | | | | | | | | | | | 15.68 | | | | | | | | | | | | | | | |
| hPIV1 | | | | | | | | | | | | | | | | | 16.76 | | | | | | | | | | | | | | |
| hPIV2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 15.96 | | | | | | | | | | | | | |
| hPIV3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 15.72 | | | | | | | | | | | | |
| hPIV4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 16.56 | | | | | | | | | | | |
| <i>Kpneumoniae</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 14.94 | | | | | | | | | | |
| <i>Lpneumophila</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 15.76 | | | | | | | | | |
| <i>Mcatarrhalis</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 15.75 | | | | | | | | |
| <i>Mpneumoniae</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 15.16 | | | | | | | |
| Measles | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 16.72 | | | | | | |
| Mumps | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 16.76 | | | | | |
| RSVA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 14.66 | | | | |
| RSVB | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 27.45 | 16.63 | | | |
| RV_1of2 | | | | | | | | | | 18.04 | 19.70 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 17.40 | | |
| RV_2of2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 18.29 | | |
| <i>S.aureus</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 13.68 | |
| <i>S.pneumoniae</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 13.63 | |

* 使用TaqMan OpenArray芯片，针对所有44个靶标，同时对31种ATCC可培养呼吸道微生物的基因组RNA或DNA (10³个拷贝/μL)进行了筛查。列中显示了微生物基因组样品，行中显示了靶标。这些Assay特异性地对目的靶标进行了扩增，未检测到明显脱靶扩增现象。阴影框中显示了靶标与样品混合物的C_t均值(N=3，采用相对阈值方法计算C_t)。当加入预扩增步骤并使用qPCR方案检测时，其符合呼吸道微生物Assay的推荐筛选标准(C_t≤28, AmpScore≥1.2, C_t置信度≥0.7)。注意，百日咳鲍特菌样品使用*B.pertussis* Assay和*Bordetella* Assay进行检测；甲型流感(H1N1)样品使用Flu_A_H1 Assay和Flu_A_pan Assay进行检测。肠道病毒D68样品使用EV_D68 Assay和EV_pan Assay进行检测，即便EV_pan Assay的检测效率低很多(相差几个C_t值)，无法用于检测所有肠道病毒D68样品。RV_1of2 Assay用于检测鼻病毒B样品以及肠道病毒D68和71样品。以上是预期做法，因为RV_1of2 Assay可以同时检测鼻病毒和肠道病毒的毒株，而EV_D68 Assay和EV_pan Assay专门用于检测肠道病毒毒株。由于RSVA和RSVB具有高序列相关性，因此可以通过RSVA Assay专门检测RSVA样品，或以更低的效率(C_t差值约为13)通过RSVB Assay进行检测。

表5. 呼吸道微生物群排他性对照品。

| 微生物类型 | 核酸类型 | 微生物 | ATCC ID* | 临近区域或环境 |
|-------|------|-----------------|-------------|-------------------------------------|
| 病毒 | DNA | 牛痘病毒 | VR-1508D | 人呼吸道病原体 |
| | RNA | 风疹病毒 | VR-315D | 人呼吸道病原体 |
| | | 轮状病毒 | VR-2018DQ | 人胃肠道病原体 |
| 细菌 | DNA | <i>盐晶嗜冷杆菌</i> | BAA-1226D-5 | <i>卡他莫拉菌</i> |
| | | <i>多杀巴斯德菌</i> | 700806 | <i>流感嗜血杆菌</i> |
| | | <i>植生拉乌尔菌</i> | 33531 | <i>肺炎克雷伯氏菌</i> |
| | | <i>木糖氧化无色杆菌</i> | 27061 | <i>支气管炎鲍特菌、百日咳鲍特菌、副百日咳鲍特菌或霍氏鲍特菌</i> |
| | | <i>皮炎芽生菌</i> | 26199D-2 | 人呼吸道病原体 |
| | | <i>白喉棒状杆菌</i> | 700971D-5 | 人呼吸道病原体 |
| | | <i>伯克氏菌</i> | 25416D-5 | 人呼吸道病原体 |
| | | <i>脑膜炎球菌</i> | 700532D-5 | 人呼吸道病原体 |
| | | <i>新型隐球菌</i> | MYA-565D-5 | 人呼吸道病原体 |
| | | <i>腐生性葡萄球菌</i> | 15305D-5 | 人呼吸道病原体 |
| | | <i>轻型链球菌</i> | 49456D-5 | 人呼吸道病原体 |
| 真菌 | | <i>烟曲霉菌</i> | 1022D | 人呼吸道病原体 |

* 基因组核酸对照品来源于ATCC。

准确识别呼吸道样品中的微生物以进行临床研究

使用TaqMan OpenArray芯片对近500个购买的临床研究呼吸道样品进行检测，进一步验证了对呼吸道病原微生物靶标的检测灵敏度、特异性和准确度。这些临床研究呼吸道样品之前已采用各种方法对呼吸道微生物进行了检测确认，包括免疫检测、培养检测和核酸检测。

使用我们的Assay进行检测时，这些样品中的标识性呼吸道微生物的总体检出率非常高。表6中显示了已经过商业化核酸检测方案检测过的400份样品的一致性分析结果。此外，本项研究还对包含17种关键呼吸道病毒的样品进行了检测。与其他检测平台的阳性结果一致性高达97%以上。

表6. 临床研究样品检测：与其他核酸检测方法的结果一致。

| 病原体 | 真阳性* | 假阴性** | 阳性结果一致性% |
|----------|------|-------|----------|
| 腺病毒 | 31 | 1 | 96.88% |
| 冠状病毒229E | 2 | 0 | 100.00% |
| 冠状病毒HKU1 | 1 | 0 | 100.00% |
| 冠状病毒OC43 | 1 | 0 | 100.00% |
| 甲型流感 | 6 | 0 | 100.00% |
| 甲型流感H1 | 7 | 0 | 100.00% |
| 甲型流感H3 | 54 | 0 | 100.00% |
| 乙型流感 | 28 | 0 | 100.00% |
| hMPV | 25 | 1 | 96.15% |
| hPIV | 2 | 0 | 100.00% |
| hPIV1 | 20 | 1 | 95.24% |
| hPIV2 | 10 | 1 | 95.24% |
| hPIV3 | 45 | 1 | 97.83% |
| RSV | 6 | 0 | 100.00% |
| RSVA | 40 | 1 | 97.56% |
| RSVB | 58 | 1 | 98.31% |
| 鼻病毒、肠道病毒 | 75 | 5 | 93.75% |
| 总数 | 411 | 12 | 97.16% |

* 源于供应商。注意：经qPCR分析、Sanger测序和Ion Torrent™新一代测序(NGS)分析证实，4个hPIV3样品被一家商业供应商误表征为hPIV1样品。经qPCR分析、Sanger测序、Ion Torrent NGS和正交商业分子检测平台证实，由一家商业供应商出售的另外5个乙型流感样品为乙型流感病毒阴性，RSVA (2个样品)、RSVB、甲型流感(H1)阳性或无靶标。这些样品的正交确认结果见真阳性列。

** 呼吸道病原微生物Assay未检出。

用于呼吸道病原微生物检测的所有TaqMan Assay可同时筛查42种呼吸道微生物，并且包含一致性研究参考检测项中未涉及的其他病毒、细菌和真菌。对于许多临床研究样品来说，这些呼吸道微生物Assay都可以检测参考检测项中存在或不存在的其他靶标。为了确定检测结果的准确性，对200多个其他靶标以及一致性靶标对照品进行了Sanger测序。但是，由于一些靶标含量低(例如， C_t 值高)或测序引物未检测到这些靶标，在尝试进行了50次测序以后，均未获得测序结果。而所有获得测序结果的172个靶标对呼吸道微生物Assay检测到的靶标进行了识别确认(数据未显示)。

值得注意的是，使用呼吸道病原微生物assay在OpenArray芯片上检测的180个临床研究呼吸道样品也已在Applied Biosystems™ TaqMan™微流体芯片(TaqMan™ Array Cards)上进行了检测。结果表明，检测结果高度一致，呼吸道病原微生物Assay在不同平台上的功能等效(有关更多信息，请参阅应用文档《基于TaqMan Array Card微流体芯片检测呼吸道病原微生物的全流程解决方案》(A complete workflow solution for detecting respiratory tract microbiota using TaqMan Array Cards, 文献编号COL33409)。

除使用临床研究样品外，还使用来源于QCMD机构(Quality Control for Molecular Diagnostics)的全生物检测能力对照品(whole-organism proficiency test controls)对TaqMan OpenArray芯片进行了测试。使用三个QCMD样品panel，其涵盖17种常见呼吸道病原体的阴性和阳性对照(表7)对TaqMan Assay的准确性进行了评价。所有对照微生物的检测一致性为100%。

表7. 使用TaqMan OpenArray检测板对QCMD能力测试(PT)对照样品进行检测。

| QCMD对照品名称 | 样品数 | TaqMan OpenArray检测板结果 |
|---------------|-----|-----------------------|
| 腺病毒1型 | 1 | 检出 |
| 冠状病毒NL63 | 2 | 两者均检出 |
| 冠状病毒OC43 | 1 | 检出 |
| 肠道病毒68 | 1 | 检出 |
| hMPV | 3 | 全部检出 |
| 甲型流感(H1N1) | 1 | 检出* |
| 甲型流感 | 3 | 全部检出 |
| 乙型流感 | 2 | 两者均检出 |
| 副流感病毒1型 | 1 | 检出 |
| 呼吸道合胞病毒A亚型 | 2 | 两者均检出 |
| 呼吸道合胞病毒B亚型 | 2 | 两者均检出 |
| 鼻病毒 | 2 | 两者均检出 |
| <i>百日咳鲍特菌</i> | 1 | 检出 |
| <i>流感嗜血杆菌</i> | 2 | 两者均检出 |
| <i>嗜肺性军团菌</i> | 2 | 两者均检出 |
| <i>肺炎支原体</i> | 1 | 检出 |
| <i>肺炎链球菌</i> | 2 | 两者均检出 |
| 阴性 | 3 | 已确认 |
| 全部 | 32 | 全部检出 |

* 甲型流感(H1N1)样品仅使用Flu_A_pan Assay进行检测，而不使用Flu_A_H1 Assay。从2013年开始，针对正在传播的毒株开发了不同的流感病毒Assay。Flu_A_H1 Assay用于检测2009年大流行的H1N1毒株，但可能无法检测其他早期毒株。QCMD甲型流感(H1N1)样品的Sanger测序结果显示，其与Flu_A_H1 Assay探针结合位点的序列不匹配，从而解释了检测缺失的原因。其序列与2008年流行的甲型流感H1毒株的序列相匹配，而在进行该Assay设计时未予以考虑。

结论

- 呼吸道病原微生物Applied Biosystems™实时荧光定量PCR解决方案提供了准确、可靠的工作流程，可识别各种常见和机会致病性呼吸道病原体。
- 用于呼吸道微生物群检测的TaqMan Assay在各种样品类型的灵敏度和特异性试验中均呈现出较高的准确度。
- 针对微生物样品制备进行优化的MagMAX病毒/病原体超核酸分离试剂盒(MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid

Isolation Ultra Kit)提供了一种自动提取总核酸的解决方案，可进一步使用TaqMan Assay panel对呼吸道病原微生物进行检测。

- 精选的呼吸道病原微生物TaqMan Assay与格式灵活、高通量的TaqMan OpenArray芯片相结合，提供了一种低成本检测解决方案，可同时检测呼吸道感染中的病毒、细菌和真菌病原体。

订购信息

| 产品 | 规格 | 货号 |
|---|-------------|---------|
| TaqMan OpenArray检测芯片及Assay | | |
| TaqMan OpenArray Respiratory Tract Microbiota Plate (112-assay format, 24 samples)* | 1 plate | A41237 |
| TaqMan OpenArray Real-Time PCR Plate with Inventoried Assays (56-assay format, 48 samples) | 1 (10 pack) | 4471125 |
| TaqMan OpenArray Real-Time PCR Plate with Inventoried Assays (112-assay format, 24 samples) | 1 (10 pack) | 4471126 |
| TaqMan OpenArray Real-Time PCR Plate with Inventoried Assays (168-assay format, 16 samples) | 1 (10 pack) | 4471127 |
| 对照品和预混液 | | |
| TaqPath 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG | 5 x 1 mL | A15299 |
| TaqMan PreAmp Pool, Respiratory Tract Microbiota, 4X | 1 x 1 mL | A39573 |
| TaqMan OpenArray Real-Time PCR Master Mix | 1 x 5 mL | 4462164 |
| TaqMan Universal RNA Spike In/Reverse Transcription (Xeno) Control | 5 x 200 µL | A39179 |
| TaqMan Universal Extraction Control Organism (<i>B. atrophaeus</i>) | 3 vials/kit | A39180 |
| TaqMan Respiratory Tract Microbiota Amplification Control | 5 x 50 µL | A39178 |
| 仪器和样品制备 | | |
| KingFisher Flex Purification System with 96 Deep-Well Head | 1 system | 5400630 |
| KingFisher Duo Prime Purification System | 1 system | 5400110 |
| MagMAX Viral/Pathogen Ultra Nucleic Acid Isolation Kit | 100 preps | A42356 |
| QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System with OpenArray Block | 1 system | 4472380 |
| QuantStudio 12K Flex AccuFill System | 1 system | 4471021 |
| Veriti 96-Well Thermal Cycler (or equivalent thermal cycler) | 1 system | 4375786 |

* 商品化检测芯片包含针对31种关键呼吸道病原体的33种Assay，以及针对TaqMan通用提取对照(*B. Atrophaeus*)、TaqMan通用RNA加标/逆转录(Xeno)对照和人RNase P基因(*RPPH1*)的Assay。检测芯片可对每个呼吸道微生物群assay和Xeno assay重复测定3次，可对*B. atrophaeus*和RNase P assay重复测定2次。每个检测芯片上可至多运行23个样品以及1个对照样品。更多详细信息，请参见应用指南(文献编号MAN0017952)。

赛默飞世尔科技

上海

上海市浦东新区新金桥路27号3,6,7号楼
邮编 201206
电话 021-68654588

成都

成都市临江西路1号川投大厦1406室
邮编 610041
电话 028-65545388*5300

南京

南京市中央路201号金茂广场南楼1103室
邮编 210000
电话 021-68654588*2901

北京

北京市东城区北三环东路36号环球贸易
中心C座7层/8层
邮编 100013
电话 010-87946888

沈阳

沈阳市沈河区惠工街10号卓越大厦3109室
邮编 110013
电话 024-31096388*3901

西安

西安市高新区科技路38号林凯国际大厦
1006-08单元
邮编 710075
电话 029-84500588*3801

广州

广州国际生物岛寰宇三路36、38号合景
星辉广场北塔204-206单元
邮编 510000
电话 020-82401600

武汉

武汉市高新四路22号58众创光谷产业园A座1楼2-5楼
邮编 430075
电话 027-59744988*5401

欲了解更多信息, 请扫描二维码关注我们的微信公众账号与官方网站。

赛默飞世尔科技在全国有共14个商业办公室。本资料中的信息, 说明和技术指标如有变更, 恕不另行通知。

有关更多详情, 请访问 thermofisher.com/rtm



赛默飞
官方微信



赛默飞
官方微信

Applied Biosystems

官方微信

免费 800 820 8982

服务电话 400 820 8982

ThermoFisher
SCIENTIFIC