

· 实验技术 ·

# GeXP多重PCR法同时检测5种致泻性大肠埃希菌

陈建才, 陈鸿鹤, 张云怡, 张俊彦, 张政, 潘军航, 占利

浙江省疾病预防控制中心微生物所, 浙江 杭州 310051

**摘要:** **目的** 基于GeXP多重基因表达遗传分析系统, 建立快速、同时检测5种致泻性大肠埃希菌的方法。**方法** 根据肠产毒性大肠埃希菌 (ETEC)、肠侵袭性大肠埃希菌 (EIEC)、肠致病性大肠埃希菌 (EPEC)、肠集聚性大肠埃希菌 (EAEC) 和肠出血性大肠埃希菌 (EHEC) 的12种毒力基因的保守序列设计特异性引物, 用单引物分别进行PCR扩增, 验证单模板单引物PCR的特异性。分别以5种致泻性大肠埃希菌基因组DNA为模板, 每个体系中混合12种引物进行PCR扩增, 验证单模板多重PCR的特异性。采用GeXP多重PCR分别扩增 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$  CFU/mL的5种致泻性大肠埃希菌混合菌悬液DNA模板, 分析该方法的灵敏度。用购自超市和农贸市场的食品制作34份加标样品, 采用GeXP多重PCR鉴定5种致泻性大肠埃希菌, 并与多重实时荧光PCR检测试剂盒检测结果比较。**结果** 单模板单引物PCR产物中, 12种毒力基因 *sth*、*pic*、*bfpB*、*astA*、*lt*、*escV*、*aggR*、*stx1*、*uidA*、*invE*、*stx2*、*stp* 扩增片段大小与设计相符, 荧光信号值良好, 均在25 000 A.U.以上。GeXP单模板多重PCR体系中, 5种致泻性大肠埃希菌的12种毒力基因PCR产物片段大小与设计相符, 特异性良好。菌液浓度为 $10^3$  CFU/mL时, GeXP多重PCR可同时检测出12种毒力基因, 荧光信号强度良好, 重复检测结果相同, 变异系数 $<10\%$ 。采用GeXP多重PCR检测34份加标样品, 检出ETEC 3株, EAEC 12株, EIEC、EPEC和EHEC各1株, 与商品化的5种致泻性大肠埃希菌多重实时荧光PCR检测结果一致。**结论** 本研究建立了一种同时检测5种致泻性大肠埃希菌12种毒力基因的GeXP多重PCR方法, 可用于致泻性大肠埃希菌的临床鉴别诊断及流行病学调查研究。

**关键词:** GeXP系统; 致泻性大肠埃希菌; 毒力基因; 多重PCR

中图分类号: R378.21 文献标识码: A 文章编号: 2096-5087 (2022) 10-1075-06

## A rapid GeXP-based multiplex reverse transcription-PCR assay for simultaneous detection of 5 subtypes of diarrheogenic *Escherichia coli*

CHEN Jiancai, CHEN Honghu, ZHANG Yunyi, ZHANG Junyan, ZHANG Zheng, PAN Junhang, ZHAN Li

Department of Microbiology, Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou, Zhejiang 310051, China

**Abstract: Objective** To establish a rapid GeXP-based multiplex reverse transcription-PCR assay (GeXP assay) for simultaneous detection of 5 subtypes of diarrheogenic *Escherichia coli*. **Methods** Specific primers were designed according to reserved sequences of 12 virulence genes in enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC) and enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), and PCR amplification was performed with a single pair of primers to validate the specificity of PCR assay with a single template and a single pair of primers. The specificity of the GeXP assay was evaluated with the genomic DNA of 5 subtypes of diarrheogenic *E. coli* as the template in a mixture of 12 pairs of primers, and the sensitivity of the GeXP assay was evaluated with the mixed suspensions of 5 subtypes of diarrheogenic *E. coli* at concentrations of  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  and  $10^3$  CFU/mL as the template. Foods purchased from supermarkets and agricultural retail markets were prepared into 34 spiked samples, and 5 subtypes of diarrheogenic *E. coli* were detected using the GeXP assay and compared with the fluorescent re-

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2022.10.020

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFC1601503); 浙江省自然科学基金 (LY20H190001); 浙江省医药卫生科技计划 (2019KY354, 2020KY524)

作者简介: 陈建才, 硕士, 主管技师, 主要从事食源性微生物检验工作

通信作者: 张政, E-mail: zhzhang@cdc.zj.cn

al-time multiple PCR assay. **Results** The sizes of *sth*, *pic*, *bfpB*, *astA*, *lt*, *escV*, *aggR*, *stx1*, *uidA*, *invE*, *stx2* and *stp* genes amplification products were consistent with expected sizes using a single template and a single pair of primers, with a fluorescent signal intensity of more than 25 000 A.U. The sizes of the GeXP assay amplification products of 12 virulence genes in 5 subtypes of diarrheogenic *E. coli* were consistent with expected sizes, with a high specificity. If the concentration of the mixed suspensions of 5 subtypes of diarrheogenic *E. coli* was  $10^3$  CFU/mL, the GeXP assay was effective for simultaneous detection of 12 virulence genes, with a high fluorescent signal intensity, consistent repeated detection results and a less than 10% coefficient of variation. The GeXP assay detected 3 ETEC isolates, 12 EAEC isolates, one EIEC isolate, one EPEC isolate and one EHEC isolate among the 34 spiked samples, which was in agreement with the detection of 5 subtypes of diarrheogenic *E. coli* with commercial fluorescent real-time multiple PCR assay kits. **Conclusion** A GeXP assay has been successfully established for simultaneous detection of 12 virulence genes in diarrheogenic *E. coli*, which is effective for clinical differential diagnosis and epidemiological surveys of diarrheogenic *E. coli*.

**Keywords:** GeXP assay; diarrheogenic *Escherichia coli*; virulence gene; multiplex reverse-transcription PCR assay

致泻性大肠埃希菌是引起感染性腹泻的主要食源性病原菌之一<sup>[1]</sup>,近年来,浙江省由该细菌引起的食源性疾病有上升趋势,严重危害人群尤其是儿童的健康<sup>[2-6]</sup>。根据致病性的不同,致泻性大肠埃希菌分为肠产毒性大肠埃希菌(enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC)、肠侵袭性大肠埃希菌(enteroinvasive *Escherichia coli*, EIEC)、肠致病性大肠埃希菌(enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC)、肠集聚性大肠埃希菌(enteroaggregative *Escherichia coli*, EAEC)和肠出血性大肠埃希菌(enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC)。目前主要采用PCR检测多种毒力基因鉴别这5种致泻性大肠埃希菌,但普通PCR通量低,耗时长,样品需求量大,荧光定量PCR检测中不同的标记荧光间会互相影响,4重以上体系优化困难,对模板的需求量较大,不适合珍贵样品的检测。GeXP技术基于GeXP多重基因表达遗传分析系统,可将多重PCR和毛细管电泳巧妙结合,采用荧光标记的通用引物与特异性嵌合引物引发多重体系扩增,将多重PCR转变成2种引物的反应过程,可在同一PCR反应体系进行高通量、高灵敏度和高特异性的检测。本研究基于GeXP技术建立同时检测5种致泻性大肠埃希菌12种毒力基因的方法,现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 菌株** EPEC、EIEC、ETEC、EHEC和EAEC菌株均来源于浙江省疾病预防控制中心。

**1.2 仪器与试剂** 细菌基因组DNA提取试剂盒购自天根生化科技有限公司。GeXP多重基因表达遗传分析系统分子量标尺(DNA Size Standard-400, DSS-400),上样缓冲液,分离胶和分离缓冲液均购自美国贝克曼公司。5种致泻性大肠埃希菌多重实时

荧光PCR检测试剂盒购自卓诚惠生。

### 1.3 方法

**1.3.1 DNA提取** 采用细菌基因组DNA提取试剂盒提取5种致泻性大肠埃希菌菌液基因组DNA,于-20℃保存备用。

**1.3.2 引物设计** 根据GenBank中5种致泻性大肠埃希菌12种毒力基因的保守区序列,通过GeXP自带引物设计系统设计特异性引物,见表1。引物由杭州擎科生物科技有限公司合成,采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)纯化。

**1.3.3 毛细管电泳试验** 将1 μL PCR产物和30 μL SLS+DSS-400混合液混合后进行GeXP毛细管电泳分析。采用仪器默认分析参数对毛细管电泳结果进行片段分析<sup>[7]</sup>:进样电压2.0 kV,时间15 s;分离电泳电压4.8 kV,时间60 min。

**1.3.4 单模板单引物基因特异性验证试验** 以致泻性大肠埃希菌DNA为模板,双蒸水为阴性对照,分别混合模板上对应毒力基因的单引物,采用GeXP技术进行PCR扩增,PCR反应体系:Ex Taq 0.125 μL,10×缓冲液2.5 μL,dNTP混合液2 μL,上、下游引物(10 μmol/μL)3 μL,模板DNA2 μL,灭菌双蒸水补足25 μL。PCR反应条件:95℃10 min;95℃30 s,55℃30 s,72℃30 s,35个循环;72℃5 min。对PCR产物进行GeXP毛细管电泳分析。

**1.3.5 GeXP多重PCR体系建立及单模板特异性验证试验** 分别以5种致泻性大肠埃希菌基因组DNA为模板,双蒸水作为阴性对照,每个体系中混合12种引物进行PCR扩增。PCR反应体系:Ex Taq 0.25 μL,5×缓冲液10 μL,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>溶液1.5 mmol, dNTP混合液1 μL,上、下游嵌合引物混合物(1 μmol/μL)6 μL,上、下游通用序列引

表 1 5种致泻性大肠埃希菌 12种毒力基因 GeXP 特异性引物及其相关信息

Table 1 The specific primers for 12 virulence genes of 5 diarrheogenic *Escherichia coli* for the GeXP assay

基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5'-3')	产物长度 Product length/nt
<i>escV</i>	F: AGGTGACACTATAGAATAACGCTGAATTCGCGGAGACTGG R: GTACGACTCACTATAGGGAGCATTAGCCTCGCATACGG	241
<i>bfpB</i>	F: AGGTGACACTATAGAATATGTCTTCGAGACACCCCTGTAGG R: GTACGACTCACTATAGGGATTCATCTTGAAGTATCAACA	214
<i>stx1</i>	F: AGGTGACACTATAGAATAGTTGATGCTCAAACCCACGAAG R: GTACGACTCACTATAGGGAAGAAAGTGTGCAAGCTCTGTA	279
<i>stx2</i>	F: AGGTGACACTATAGAATACTACGGCCTCAAACAGAACCA R: GTACGACTCACTATAGGGACGACATACATCGGAATTCAGTAA	308
<i>lt</i>	F: AGGTGACACTATAGAATAAGCCTTACATCGCTGTATTGGTTG R: GTACGACTCACTATAGGGATCTTCAACCAAGACATGACAG	233
<i>stp</i>	F: AGGTGACACTATAGAATATCTGTGCTGGTTTTTATTCCG R: GTACGACTCACTATAGGGACACTTCCAAGTCCGTACAATG	319
<i>sth</i>	F: AGGTGACACTATAGAATACGCCATCCCAAGAGTTGAGG R: GTACGACTCACTATAGGGATCTTTTAACTCGGTTTCAT	191
<i>invE</i>	F: AGGTGACACTATAGAATATTTCCAGAGTCCCATTGACAGG R: GTACGACTCACTATAGGGATCCATCGTCCGTACTCGGT	296
<i>astA</i>	F: AGGTGACACTATAGAATATTGCTGGTGTTCGCTGGTGG R: GTACGACTCACTATAGGGACATTGTCCGCGCGTGTG	224
<i>pic</i>	F: AGGTGACACTATAGAATATTTATAGATCAGGACCATGCTTTT R: GTACGACTCACTATAGGGACGTTGGAATGTCCCGGCTAATG	200
<i>aggR</i>	F: AGGTGACACTATAGAATAGCATCAACATAATTTCAACTT R: GTACGACTCACTATAGGGATTCCATAAAGTCCGTGTTTTTC	255
<i>uidA</i>	F: AGGTGACACTATAGAATATCGTGAACACAAGACTCAAGTATT R: GTACGACTCACTATAGGGAGCAATCCGTTACTGTTTCACTT	287

物 (10 μmol/μL) 2 μL, 模板 DNA 1 μL, 灭菌双蒸水补足 50 μL。PCR 反应条件: 95 °C 10 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 10 个循环; 95 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 30 s, 10 个循环; 95 °C 30 s, 48 °C 30 s, 72 °C 30 s, 20 个循环; 72 °C 5 min。对 PCR 产物进行 GeXP 毛细管电泳分析。

1.3.6 GeXP 多重 PCR 的灵敏度分析 将浓度为 10<sup>6</sup> CFU/mL 的 5 种致泻性大肠埃希菌的混合菌悬液进行 10 倍梯度稀释至浓度分别为 10<sup>6</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup> 和 10<sup>3</sup> CFU/mL, 进行基因组 DNA 提取。采用 1.3.5 的 GeXP 多重 PCR 方法进行特异性验证并进行 GeXP 毛细管电泳分析, 确定其最低检测限。每个梯度浓度均在非同日重复 3 次。

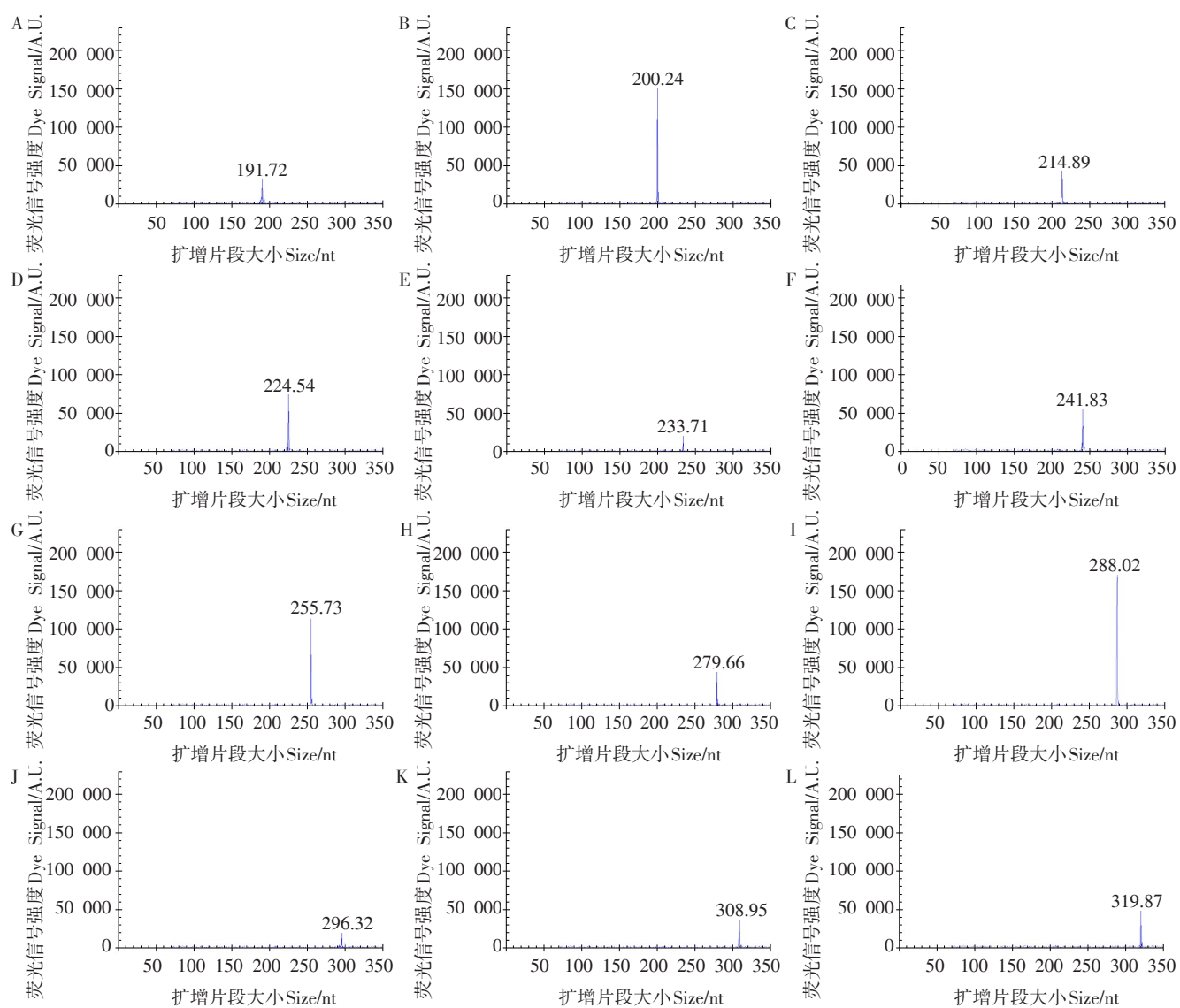
1.3.7 GeXP 多重 PCR 检测加标样品 从超市和农贸市场采购食品样品 34 份, 包括猪肉 10 份、鸡肉 10 份、牛肉 7 份和凉拌菜 7 份。加入由浙江省疾病预防控制中心提供的未知菌株和 5 种致泻性大肠埃希菌菌悬液 10<sup>3</sup> CFU/mL, 均质。每种食物样品取 25 g, 加入营养肉汤 225 mL, 均质, 36 °C 培养过夜。取

1.5 mL 培养物进行基因组提取, 分别采用 1.3.5 的 GeXP 多重 PCR 方法和 5 种致泻性大肠埃希菌多重实时荧光 PCR 检测试剂盒进行 DNA 检测。根据 GB 4789.6—2016 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验标准》, 通过检测菌种包含的毒力基因鉴定致泻性大肠埃希菌型别。

## 2 结果

2.1 GeXP 单模板单引物 PCR 结果 单模板单引物 PCR 产物中, 毒力基因 *sth* 片段大小为 190~192 nt, *pic* 为 199~201 nt, *bfpB* 为 213~215 nt, *astA* 为 223~225 nt, *lt* 为 232~234 nt, *escV* 为 240~242 nt, *aggR* 为 254~256 nt, *stx1* 为 278~280 nt, *uidA* 为 286~288 nt, *invE* 为 295~297 nt, *stx2* 为 307~309 nt, *stp* 为 318~320 nt。见图 1。扩增片段大小与设计相符, 信号值均在 25 000 A.U. 以上, 阴性对照信号值低于 2 000 A.U., 无显著条带。

2.2 GeXP 单模板多重 PCR 体系特异性验证结果 GeXP 单模板多重 PCR 体系中, 5 种致泻性大肠埃希



注: A ~ L 依次为 *sth*、*pic*、*bfpB*、*astA*、*lt*、*escV*、*aggR*、*stx1*、*uidA*、*invE*、*stx2* 和 *stp*。Note: A to L represent *sth*, *pic*, *bfpB*, *astA*, *lt*, *escV*, *aggR*, *stx1*, *uidA*, *invE*, *stx2* and *stp*, respectively.

图 1 GeXP 单模板单引物 PCR 的特异性验证结果

Figure 1 The specificity results of the GeXP assay with a single template and a single pair of primers

菌的 12 种毒力基因 PCR 产物片段大小与设计相符, 毒力基因均得到有效扩增。每个反应只出现特异信号, 无交叉反应, 特异性良好。见图 2。

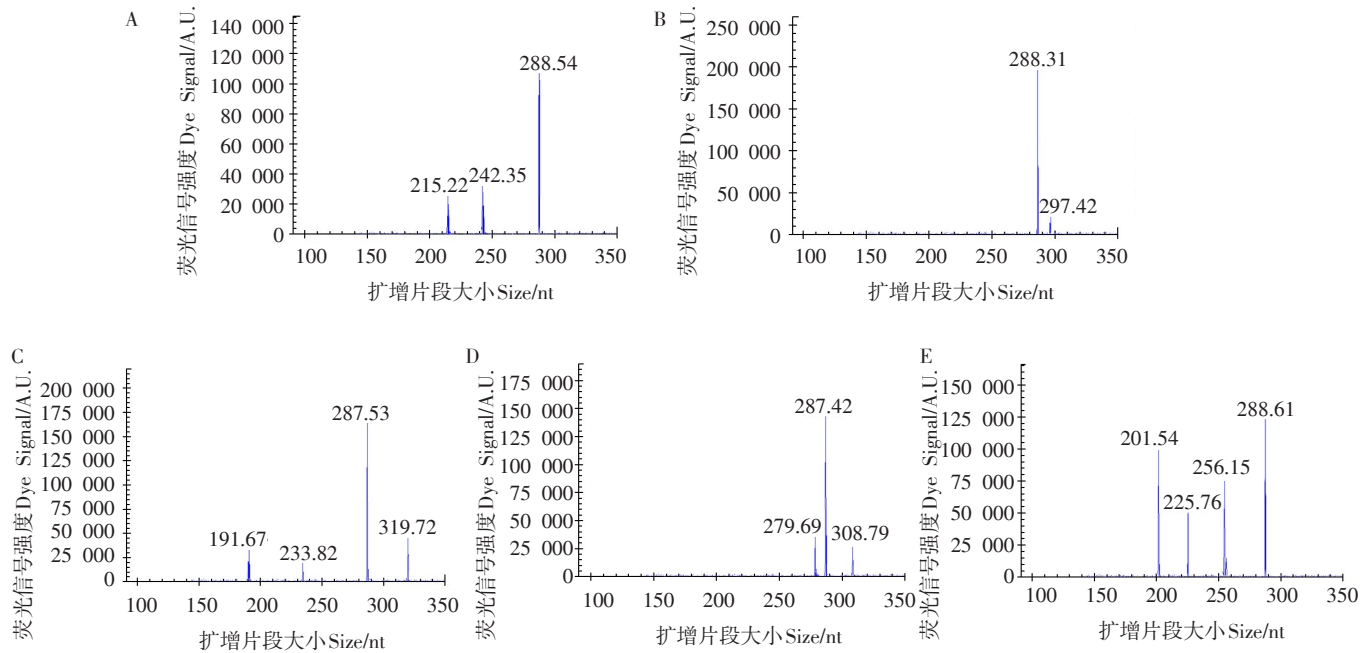
2.3 GeXP 多重 PCR 体系灵敏度分析结果 菌液浓度为  $10^3$  CFU/mL 时, GeXP 多重 PCR 体系中 12 种毒力基因均可被同时检测到, 荧光信号强度良好。每个浓度的 3 次非同日重复检测结果相同, 变异系数 < 10%。见图 3。

2.4 GeXP 多重 PCR 检测加标样品结果 采用 GeXP 多重 PCR 体系检测 34 份加标样品, 其中 ETEC 3 株, EAEC 12 株, EIEC、EPEC 和 EHEC 各 1 株, 与商品化的 5 种致泻性大肠埃希菌多重实时荧光 PCR 检测结果一致。

### 3 讨论

本研究采用 GeXP 多重基因表达遗传分析系统成功建立了一种多重 PCR 方法, 能够同时、快速、灵敏并高通量地鉴别 5 种致泻性大肠埃希菌。目前, 临床已知的致泻性大肠埃希菌毒力基因有 12 种, 全面检测相关毒力基因才能准确评估细菌致病性, 确定致病型。GeXP 技术基于特有的扩增和检测策略, 能维持样品中不同基因的比例, 克服传统多重 PCR 中基因扩增效率差异导致的目的基因扩增不均和假阴性问题, 大幅提高了检测的速度和灵敏度, 特别适用于致泻性大肠埃希菌的多毒力基因检测。由于以上优点, GeXP 已经被用于多种肝癌相关长非编码 RNA、

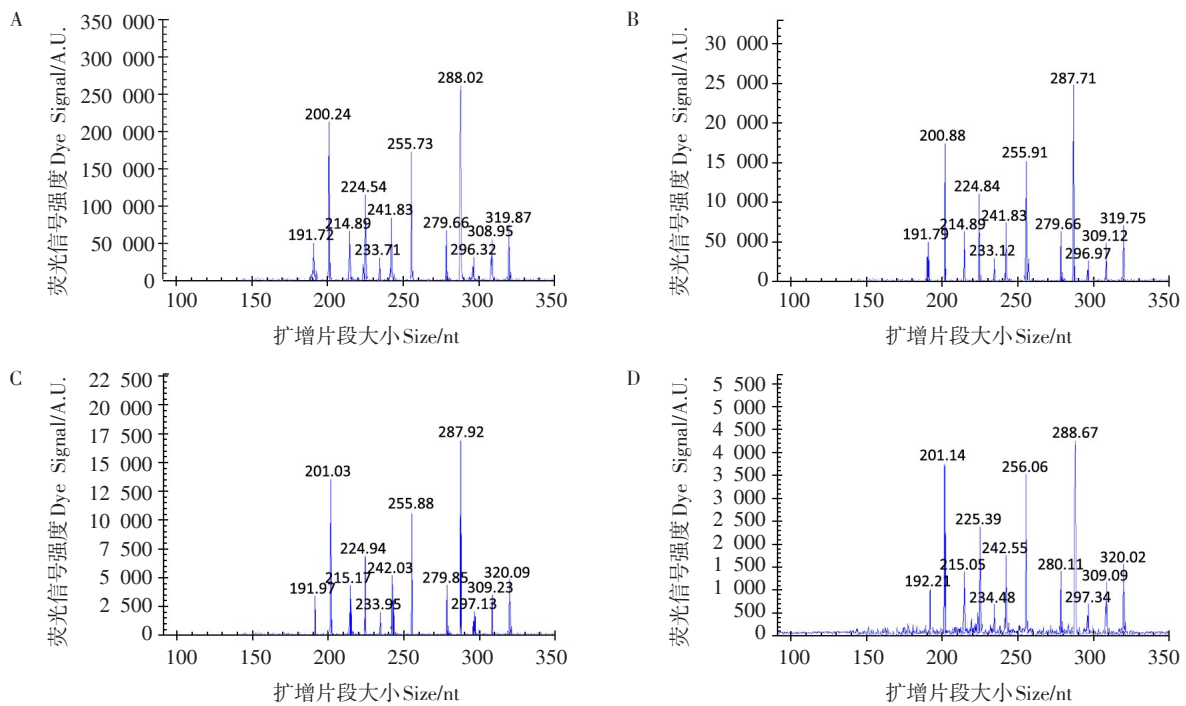




注: A~E依次为EPEC (*bfpB, escV, uidA*), EIEC (*invE, uidA*), ETEC (*sth, lt, stp, uidA*), EHEC (*stx1, stx2, uidA*), EAEC (*pic, astA, aggR, uidA*)。Note: A to E represent EPEC (*bfpB, escV, uidA*), EIEC (*invE, uidA*), ETEC (*sth, lt, stp, uidA*), EHEC (*stx1, stx2, uidA*), EAEC (*pic, astA, aggR, uidA*), respectively.

图2 GeXP多重PCR体系单模板特异性验证结果

Figure 2 The specificity results of the GeXP assay with a single template



注: A~D依次为 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$  CFU/mL混合菌悬液的GeXP多重PCR扩增结果。Note: A to D represent the amplification results of 5 kinds of diarrhea *Escherichia coli* at the level of  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  CFU/mL, respectively.

图3 GeXP多重PCR体系混合模板灵敏度分析结果

Figure 3 The sensitivity results of the GeXP assay with multiplex templates

肉及肉制品中 6 种致病菌, 以及 9 种禽流感病毒等的多重快速检测<sup>[8-11]</sup>。

本研究的 12 对引物在设计时经比对验证避免形成引物二聚体, 单模板单引物基因特异性验证结果均为单一信号, 引物特异性良好。单模板多重 GeXP 引物特异性验证结果仅出现特异信号, 无交叉反应, 而 GeXP 多重 PCR 体系在  $10^3$  CFU/mL 水平可以同时检测到 5 种致泻性大肠埃希菌的 12 种毒力基因。有研究显示, 利用 GeXP 多重 PCR 体系检测多模板, 随着样品菌液浓度降低, 数值较高的 PCR 产物信号值下降明显, 而数值较低的产物信号值下降缓慢<sup>[12-13]</sup>, 可能是由于在高浓度菌悬液中, 峰值高的信号峰抑制了峰值低的信号峰<sup>[14-15]</sup>。本研究中 GeXP 多重 PCR 方法的加标样品验证结果与商品化的 5 种致泻性大肠埃希菌多重实时荧光 PCR 试剂盒检测结果一致。该商品化试剂盒的研发基于 GB 4789.6—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验标准》。因此, 本研究建立的 GeXP 多重 PCR 方法为致泻性大肠埃希菌的临床鉴别诊断以及后续治疗提供了可靠的依据, 并对其流行病学调查研究提供有力的工具。

#### 参考文献

- [1] PHILIPSBORN R, AHMED S M, BROSI B J, et al. Climatic drivers of diarrheagenic *Escherichia coli* incidence: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Infect Dis*, 2016, 214 (1): 6-15.
- [2] 郑书发, 余斐, 陈晓, 等. 2009—2014 年浙江省哨点医院急性腹泻患者病原监测研究 [J]. *中华预防医学杂志*, 2016, 50 (12): 34-39.  
ZHENG S F, YU F, CHEN X, et al. Monitoring and research on pathogen spectrum in patients with acute diarrhea from sentinel hospital of Zhejiang Province during 2009 to 2014 [J]. *Chin J Prev Med*, 2016, 50 (12): 34-39.
- [3] 洪程基, 李毅, 孙宝昌, 等. 婴幼儿感染性腹泻病原微生物及耐药性分析 [J]. *浙江预防医学*, 2016, 28 (5): 453-457.  
HONG C J, LI Y, SUN B C, et al. An analysis on the distribution and drug resistance of pathogenic bacteria in infectious diarrhea among infants [J]. *Zhejiang J Prev Med*, 2016, 28 (5): 453-457.
- [4] 陈云, 袁永娟, 朱建民, 等. 浙江嘉善 2014 年—2015 年感染性腹泻监测结果分析及菌株耐药性研究 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2017, 14 (3): 400-403.  
CHEN Y, YUAN Y J, ZHU J M, et al. Analysis of surveillance results of infectious diarrhea in Jiashan, Zhejiang from 2014 to 2015 and research on the antibiotic resistance of isolates [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2017, 14 (3): 400-403.
- [5] 张睿, 赵雪琴, 商晓春, 等. 杭州地区婴幼儿腹泻病原菌构成与耐药性分析 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 12 (6): 901-903.  
ZHANG R, ZHAO X Q, SHANG X C, et al. Analysis of pathogens isolated constitution and drug resistance of nursing diarrhea in Hangzhou area [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2015, 12 (6): 901-903.
- [6] 李平, 戎江瑞, 陆璐, 等. 鄞州区食源性疾病监测结果分析 [J]. *预防医学*, 2020, 32 (1): 77-79.  
LI P, RONG J R, LU L, et al. Surveillance data analysis of foodborne diseases in Yinzhou District [J]. *Prev Med*, 2020, 32 (1): 77-79.
- [7] DENAMUR E, CLERMONT O, BONACORSI S, et al. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli* [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19 (1): 37-54.
- [8] 杨梦婕, 任佳, 李洋, 等. GeXP 多重聚合酶链式反应法检测 5 种常见食源性致病菌 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2020, 32 (4): 386-390.  
YANG M J, REN J, LI Y, et al. Detection of 5 kinds of common foodborne pathogens by GeXP multiplex polymerase chain reaction [J]. *Chin J Food Hyg*, 2020, 32 (4): 386-390.
- [9] MU X, CHEN W, SHI J, et al. Development of a GeXP-based multiplex RT-PCR assay for detection of long noncoding RNA in hepatocellular carcinoma [J]. *Lab Med*, 2019 (2): 180-188.
- [10] 杨梦婕, 徐玲丽, 马学军, 等. 肉及肉制品中 6 种致病菌的 GeXP 多重 PCR 检测 [J]. *食品研究与开发*, 2021, 42 (13): 168-173.  
YANG M J, XU L L, MA X J, et al. GeXP multiplex PCR assays for detection of six pathogenic bacteria in meat and meat products [J]. *Food Res Dev*, 2021, 42 (13): 168-173.
- [11] LUO S, XIE Z, HUANG J, et al. Simultaneous differentiation of the N1 to N9 neuraminidase subtypes of avian influenza virus by a GeXP analyzer-based multiplex reverse transcription PCR assay [J/OL]. *Front Microbiol*, 2019 (10) [2022-09-05]. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01271>.
- [12] WANG H, GU J, LI X, et al. Broad range detection of viral and bacterial pathogens in bronchoalveolar lavage fluid of children to identify the cause of lower respiratory tract infections [J/OL]. *BMC Infect Dis*, 2021, 21 (1) [2022-09-05]. <http://doi.org/10.1186/s12879-021-05834-0>.
- [13] MARQUATDT P, WERTHMANN B, RÄTZEL V, et al. Quantifying 35 transcripts in a single tube: model-based calibration of the GeXP multiplex RT-PCR assay [J/OL]. *BMC Biotechnol*, 2021, 21 (1) [2022-09-05]. <http://doi.org/10.1186/s12896-021-00689-4>.
- [14] LI M, XIE Z, XIE Z, et al. Simultaneous detection of eight avian influenza A virus subtypes by multiplex reverse transcription-PCR using a GeXP analyser [J/OL]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1) [2022-09-05]. <http://doi.org/10.1038/s41598-018-24620-8>.
- [15] HUANG H, CHEN S, ZHANG X, et al. Detection and clinical characteristics analysis of respiratory viruses in hospitalized children with acute respiratory tract infections by a GeXP-based multiplex-PCR assay [J/OL]. *J Clin Lab Anal*, 2020, 34 (4) [2022-09-05]. <http://doi.org/10.1002/jcla.23127>.

收稿日期: 2022-06-27 修回日期: 2022-09-05 本文编辑: 徐文璐