

• 论 著 •

基于微流控芯片对流感嗜血杆菌的快速检测

高菊逸 吴传安 杨伟康 罗裕旋 徐小平

作者单位: 518109 广东深圳, 深圳市龙华区妇幼保健院检验科(高菊逸、吴传安、杨伟康、罗裕旋)

518053 广东深圳, 香港大学深圳医院(徐小平)

通信作者: 徐小平, Email: 245765608@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2020.01.015

【摘要】 目的 分析微流控芯片快速检测流感嗜血杆菌(HI)的优势。**方法** 采用计算机辅助软件设计并制作微流控芯片,筛选最佳进样流速和进样时间,结合免疫荧光法进行 HI 捕获检测实验,并与平板培养法进行一致性对比。**结果** 选择最佳进样流速(4 $\mu\text{L}/\text{min}$),进样 30 min 进行检测。建立的微流控芯片检测方法对 HI 的捕获率为 95%,检测限为 10^2 cfu/mL,特异性为 100%,与其他几类常见呼吸道感染菌无交叉反应,检测过程可在 30 min 内完成,与平板培养法的总符合率为 95%。**结论** 微流控芯片检测方法对 HI 具有较高的捕获率,且具有简便、快速、特异性强的优点,对比目前临床先进的全自动快速微生物质谱检测系统,大大减少了检测成本,可适用于基层医疗单位及社区健康医疗服务中心。

【关键词】 流感嗜血杆菌; 微流控芯片; 快速检测**基金项目:** 深圳市卫生计生系统科研项目(SZFZ2017047)**Rapid detection of *Haemophilus influenzae* based on microfluidic chip**

Gao Juyi, Wu Chuan'an, Yang Weikang, Luo Yuxuan, Xu Xiaoping. Department of Laboratory, Shenzhen Longhua District Maternity and Child Hospital, Shenzhen 518109, Guangdong, China (Gao JY, Wu CA, Yang WK, Luo YX) Hong Kong University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518053, Guangdong, China (Xu XP)

Corresponding author: Xu Xiaoping, Email: 245765608@qq.com

【Abstract】 Objective To analyze the advantages of a microfluidic chip for rapid detection of *Haemophilus influenzae* (HI). **Methods** The microfluidic chip was designed by computer-aided software and manufactured, and the best injection flow rate and injection time were optimized. The detection of HI was performed by immunofluorescence, and the results were compared with those by plate culture. **Results** The best injection flow rate was selected as 4 $\mu\text{L}/\text{min}$, injecting for 30 minutes for detection. The established microfluidic chip for detection of HI had the capture efficiency of 95%, with the detection limit of 10^2 cfu/mL and specificity of 100%. There was no cross-reactivity with several other common respiratory infection bacteria, and the detection process can be completed within 30 minutes, with the total coincidence of 95% compared with plate culture method. **Conclusions** The microfluidic chip detection method has a high capture rate for HI, and has the advantages of simplicity, fastness and strong specificity. Compared with the current clinically advanced fully automatic fast microbial mass spectrometry detection system, it greatly reduces the cost, and is applicable to primary medical units and community health service centers.

【Key words】 *Haemophilus influenzae*; Microfluidic chip; Rapid detection**Fund program:** Shenzhen Health and Family Planning System Research Project (SZFZ2017047)

流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*, HI)是一种没有运动能力的革兰阴性(G^-)小杆菌,关于儿童社区获得性肺炎的大量研究证明,HI是引起细菌性肺炎较为常见的病原体之一,仅次于肺炎链球菌。根据 HI 荚膜多糖抗原的不同,可将其分为 6 个血清型(a~f 型),其中 b 型 HI(又称乙型 HI)是引起 5 岁以下儿童细菌性脑膜炎的主要原因^[1-4]。近年来,

不少研究显示 HI 在免疫人群中的感染率也在不断地上升,不可分型的 HI 成为引起呼吸道感染的主要原因之一^[3]。因此,研究一种快速经济的检测方法对于 HI 的早期鉴定及诊断具有重要的研究意义。

随着科技的不断发展,微流控芯片技术的集成化、小型化、高通量等特点在细菌检测中凸显优势^[5-8]。本研究利用微流控芯片的以上特点建立了

一种针对 HI 的快速检测技术平台,可在 30 min 内完成检测,且该方法具有灵敏度高、特异性强等优点,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验菌株 HI ATCC49247,肺炎克雷伯菌(香港大学深圳医院微生物科提供)。

1.2 仪器与试剂 对准型光刻机(韩国 Midas 公司),表面轮廓仪(中国威尔量仪公司),等离子清洗仪(成都铭恒公司),SU8 光刻胶(美国 Microchem 公司),三甲基氯硅烷(德国 ABCR 公司),聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS, 美国 Dow Corning 公司),环烯烃聚合物(cycloolefin polymer, COP, 美国 Dow Corning 公司),OCA(optically clear adhesive)光学透明胶(3M 中国有限公司),倒置荧光显微镜(日本尼康仪器有限公司);EC 肉汤培养基(广东环凯公司)。

1.3 微流控芯片的设计制作及抗体固定 采用计算机辅助软件(Auto CAD)设计芯片通道及内部鱼骨结构,通道长 120 mm,宽 30 μm ,鱼骨每段长 60 μm ,宽 30 μm ,高 10 μm 。根据设计的图形制作掩膜,取干净硅片进行等离子清洗,旋涂 SU8-3025 光刻胶制作通道模板,同样操作使用 SU8-3010 光刻胶制作鱼骨模板,再使用三甲基氯硅烷进行硅烷化处理,5 min 后倒入 1:10 PDMS 184 后水平静置 30 min,置于 80 $^{\circ}\text{C}$ 电热干燥箱烘烤 30 min。将制作好的 PDMS 模板在 120 $^{\circ}\text{C}$ 下压印在 COP 上,最后采用雕刻好的 OCA 光学透明胶将上下两层 COP 进行不可逆的键合,放入 80 $^{\circ}\text{C}$ 电热干燥箱烘烤 10 min,芯片制作完成。通过注射泵控制反应通道内反应液的流动,利用巯基-马来酰亚胺基团硅烷化偶联法,对反应检测区进行表面修饰和抗体固定^[9-10]。

1.4 细菌菌悬液的配制 将 HI 过夜培养,取培养后的营养肉汤菌悬液 0.2 mL,使用无菌生理盐水配制成浓度为 1.5×10^4 cfu/mL 的菌液,通过平板菌落计数确定浓度。使用无菌生理盐水倍比稀释到 1.5×10^3 、 1.5×10^2 、 1.5×10^1 cfu/mL,共 4 个浓度,每个浓度各取 1 mL 菌液,沸水中煮 30 min 灭活后离心备用。肺炎链球菌 ATCC49619、肺炎克雷伯菌按上述同样方法制备菌悬液备用。以高压灭菌的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)为阴性对照。

1.5 检测方法

1.5.1 选择最佳进样流速和进样时间 根据芯片设计的尺寸及检测样本的不同确定最佳进样流速和进

样时间,参照本团队之前的研究数据为基础进行调整^[11],最终选择 4 个进样流速(2、4、6、8 $\mu\text{L}/\text{min}$)进行调试对比,每间隔 5 min 记录 1 次荧光信号强度值,直至 60 min。

1.5.2 样品检测 取 5 μL FITC 标记羊抗 HI 抗原单克隆抗体,以上述实验中确定的最佳进样速度通入芯片内,反应 30 min 后用 PBS 冲洗,再将 20 μL 制备好的待测样品通入芯片,30 min 后用 PBS 冲洗,在倒置荧光显微镜下观察芯片检测区域内的荧光信号,并使用高速电荷耦合器件(charge coupled device, CCD)拍照记录(20 倍放大,曝光时间为 1.25 s),采用 Image-Pro Plus 5.0 软件分析各检测区域的荧光信号强度。

1.5.3 检测芯片的检测限和特异性 将 1.4 项中制备的浓度为 $1.5 \times 10^1 \sim 1.5 \times 10^4$ cfu/mL 的 HI 菌悬液分别以最佳进样流速和进样时间通入芯片内,以 PBS 作为阴性对照,在显微镜下观察并记录数据,利用公式:捕获率=入口细菌浓度/出口细菌浓度 $\times 100\%$,计算对细菌的捕获率,得出芯片的检测限。将不同浓度肺炎链球菌 ATCC49619、肺炎克雷伯菌按上述方法进行检测。采用 SPSS 20.0 软件对结果进行独立样本 *t* 检验,确定该微流控芯片的特异性。

1.5.4 检测芯片与平板培养法结果的总符合率 取 30 份浓度为 1.5×10^3 cfu/mL 的 HI 菌悬液作为待测样本,30 份无菌 PBS 作为阴性对照,分别进行平板过夜培养及芯片检测,计算微流控芯片的灵敏度及其与平板培养法的总符合率。

2 结果

2.1 微流控芯片的制作及优势 本研究根据 HI 的特性,在流体通道中增设了鱼骨结构,有效加大了 HI 与抗体的接触面积,并且通过阻力效应增加了 HI 与抗体反应的时间,显著提高了芯片的检测效率。

另外,HI 大小仅为 $0.3 \sim 0.4 \mu\text{m} \times 1.5 \mu\text{m}$,芯片内检测通道的高度对检测结果的影响重大,如果通道过高可能会导致 HI 无法接触表面抗体从而降低检出率,所以芯片的高度设计对其检测结果至关重要。本研究制作完成的芯片利用表面轮廓仪测量高度为 24.870 μm ,其中鱼骨高 10 μm ,将通道高度有效减少到了 14.870 μm ,对于 HI 的检出提供了有力的支持。见图 1~2。

2.2 确定最佳进样流速和时间 不同流速下反应区域荧光信号强度变化见图 3。当流速为 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ 时,反应区的荧光信号强度于 1 h 时可达到最高;当

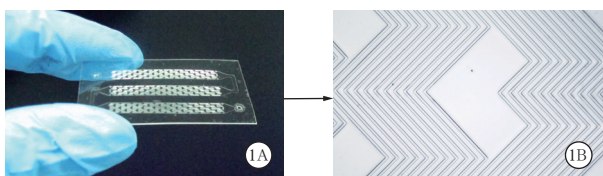


图 1 1A 为微流控芯片实物图，
1B 为显微镜下 40 倍放大鱼骨式设计

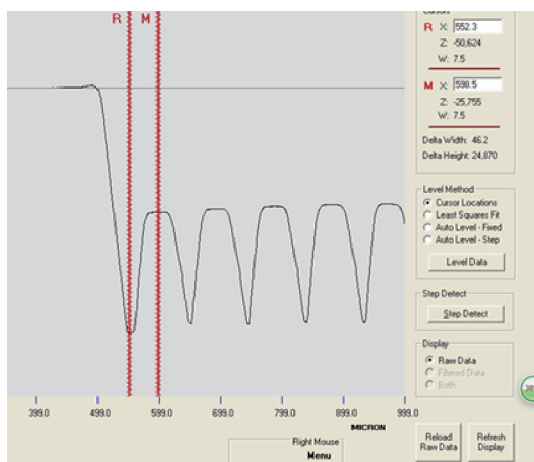


图 2 微流控芯片内通道高度 (精确到 0.000 μm)

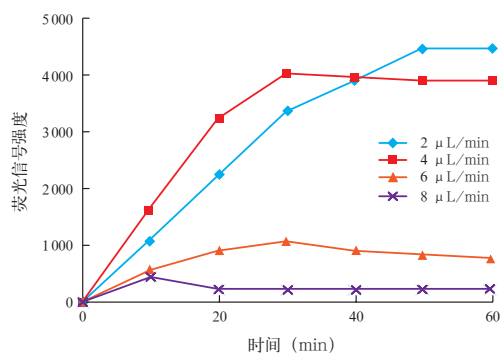
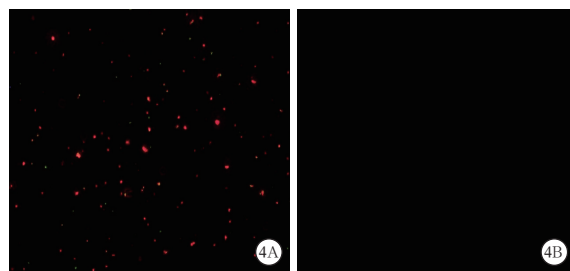


图 3 不同进样流速下反应区荧光强度随时间变化曲线

流速为 $4 \mu\text{L}/\text{min}$ 时, 荧光信号强度仍然保持高水平, 达到最高值只需要 30 min, 并且存在较长时间的稳定期, 有利于提高芯片内细菌检测的稳定性, 之后当

流速逐渐增快时, 反应区内的荧光信号强度逐渐减弱。最终选择 $4 \mu\text{L}/\text{min}$ 和 30 min 为最佳进样速度和反应时间。流速为 $4 \mu\text{L}/\text{min}$ 时, 芯片检测反应区的荧光信号见图 4。



注: 4A 为进样流速 $4 \mu\text{L}/\text{min}$ 时检测区域的荧光信号强度图,
4B 为阴性对照

图 4 微流控芯片检测反应区荧光信号强度图 (40 倍放大)

2.3 检测限 当 HI 浓度为 $1.5 \times 10^4 \text{ cfu}/\text{mL}$ 时, 通道内对 HI 的捕获率明显较高, 随着浓度的不断降低, 捕获率也随之减少, 当浓度为 $1.5 \times 10^1 \text{ cfu}/\text{mL}$ 时, 通道内无法检测到荧光信号, 捕获率为 0。见图 5。不同浓度 HI 菌悬液通过微流控芯片的捕获率比较见图 6。根据捕获率及荧光强度确定本方法对 HI 的检测限为 $10^2 \text{ cfu}/\text{mL}$ 。

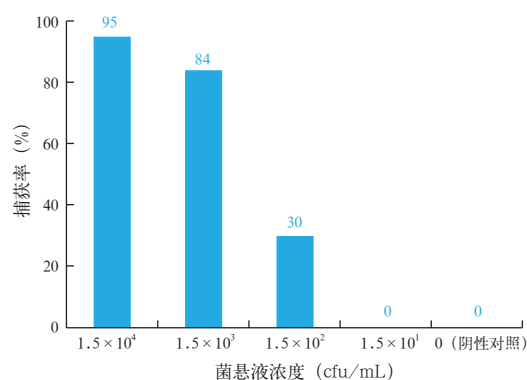
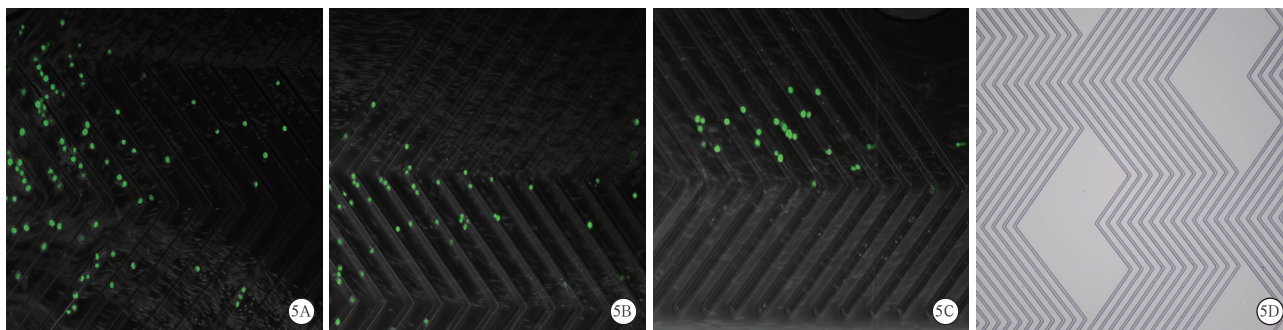


图 6 不同浓度 HI 菌悬液通过微流控芯片的捕获率



注: 5A 为 $1.5 \times 10^4 \text{ cfu}/\text{mL}$, 5B 为 $1.5 \times 10^3 \text{ cfu}/\text{mL}$, 5C 为 $1.5 \times 10^2 \text{ cfu}/\text{mL}$, 5D 为 $1.5 \times 10^1 \text{ cfu}/\text{mL}$

图 5 不同浓度 HI 菌悬液通过微流控芯片检测反应区的荧光信号强度图 (40 倍放大)

2.4 特异性 HI 的捕获率为 95%, 明显高于肺炎链球菌和肺炎克雷伯菌(捕获率均为 0), 差异均有统计学意义($t_1=5.114$, $t_2=5.001$, 均 $P<0.01$), 证明此方法对 HI 的特异性为 100%。

2.5 符合率 根据表 1 内数据计算芯片的灵敏度为 90% (27/30), 与平板培养法相比, 总符合率为 95% (57/60)。

表 1 微流控芯片检测法与平板培养检测法结果比较

微流控芯片 检测法	例数 (例)	平板培养检测法	
		阳性(例)	阴性(例)
阳性	27	27	0
阴性	33	3	30
合计	60	30	30

3 讨论

HI 不仅是引起儿童呼吸道感染的常见病原菌, 也是导致细菌性脑膜炎的主要原因^[12]。长期以来, 国内外对 HI 开展了大量的研究, 并已成功将分子生物学、质谱等新技术应用于 HI 的检测^[13], 但绝大部分是针对侵袭力较强的 b 型 HI。目前临床上针对 HI 的检测方法较多, 但仍然存在检测方法复杂、试剂成本较高、检测时间较长等缺点, 且二级及以下医院及社区健康医疗服务中心无法满足设备与试剂需求, 尚未有能力开展分子诊断及质谱诊断。针对以上不足, 陶冶等^[14]研制了一种胶体金试纸, 以 HI 外膜蛋白 P6 为检测标志物, 基于双抗体夹心免疫层系技术, 可在 15 min 内完成检测, 检测限为 1×10^5 cfu/mL, 此方法虽然实现了快速检测, 但检测限较高, 容易出现假阴性现象。

近年来, 微流控芯片的小型化、集成化特点在药品检测、肿瘤富集检测、微生物多重耐药检测等医学研究方面显示出特有的优势^[15]。文小霞等^[16]研制的微流控芯片能在 15 h 内完成细菌鉴定, 检测限可达 10^3 cfu/mL, 检测结果与传统方法的一致性达到 96.3%。本研究制作的这款微流控芯片与其相比缩短了检测时间, 在设计时增加的鱼骨结构能够有效将通道高度与 HI 大小匹配, 经实验验证, 该芯片灵敏度为 90%, 特异性为 100%, 与平板培养法检测结果比较, 总符合率为 95%。微流控芯片与临床上现有的检测方法相比, 大幅度降低了样本和试剂的使用量, 有效减少了检测时间, 为临床早期治疗疾病

提供了有力的诊断依据, 适用于基层医疗单位及社区健康医疗服务中心, 应用较为广泛。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- 胡惠丽, 胡翼云, 何乐健, 等. 儿童社区获得性肺炎死亡病例中 b 型流感嗜血杆菌的检测[J]. 中华流行病学杂志, 2005, 26 (8): 604-607. DOI: 10.3760/j.issn: 0254-6450.2005.08.014.
- 严瑾, 李炜焯. 肿瘤患者下呼吸道感染流感嗜血杆菌的临床分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37 (14): 2025-2027. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.14.055.
- Rahimkhani M, Daneshvar HK. Detection and evaluation of haemophilus influenza in bacterial meningitis in children [J]. Acta Paediatrica, 2011, 100: 66.
- 王萍, 强鑫华, 周丽华. 儿童下呼吸道感染流感嗜血杆菌的分离及耐药性分析[J]. 浙江临床医学, 2016, 18 (6): 1135-1136.
- Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology [J]. Nature, 2007, 450 (7173): 1235-1239. DOI: 10.1038/nature06385.
- Lien KY, Chuang YH, Hung LY, et al. Rapid isolation and detection of cancer cells by utilizing integrated microfluidic systems [J]. Lab Chip, 2010, 10 (21): 2875-2886. DOI: 10.1039/c005178k.
- Suehiro J, Ohtsubo A, Hatano T, et al. Selective detection of bacteria by a dielectrophoretic impedance measurement method using an antibody-immobilized electrode chip [J]. Sensors Actuators B, 2006, 119 (1): 319-326. DOI: 10.1016/j.snb.2005.12.027.
- Yang L, Banada PP, Chatni MR, et al. A multifunctional micro-fluidic system for dielectrophoretic concentration coupled with immuno-capture of low numbers of *Listeria monocytogenes* [J]. Lab Chip, 2006, 6 (7): 896-905. DOI: 10.1039/b607061m.
- 张望. 集成化微流控芯片的研制及其在大肠埃希菌 O157:H7 检测中的应用[D]. 南昌: 南昌大学, 2014.
- 张望, 徐小平, 高菊逸, 等. 阀控多通道微流控芯片高通量快速检测大肠埃希菌 O157:H7 [J]. 临床检验杂志, 2013, 31 (11): 829-832.
- 高菊逸, 杜晶辉, 张望, 等. 简易型微流控芯片捕获循环肿瘤细胞的研究 [J]. 化学学报, 2014, 72 (1): 69-74. DOI: 10.6023/A13080902.
- 胡琼, 莫丽亚, 李先斌, 等. 儿童呼吸道感染流感嗜血杆菌的耐药性分析及复合感染特点[J]. 实用检验医师杂志, 2019, 11 (4): 196-199. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2019.04.002.
- 陆伟桃, 郭菁, 邓晨晖, 等. 探讨全自动快速微生物检测系统在鉴定流感嗜血杆菌的应用[J]. 检验医学与临床, 2016, 13 (7): 944-945. DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.07.032.
- 陶冶, 郝惠文, 李杰, 等. 流感嗜血杆菌快速检测胶体金试纸的研制[J]. 生物工程学报, 2019, 35 (5): 901-909. DOI: 10.13345/j.cjb.180428.
- Watt JP, Levine OS, Santosham M. Global reduction of Hib disease: what are the next steps? Proceedings of the meeting Scottsdale, Arizona, September 22-25, 2002 [J]. J Pediatr, 2003, 143 (6 Suppl): S163-187. DOI: 10.1067/s0022-3476(03)00576-6.
- 文小霞, 徐邦平, 王伟鑫, 等. 微流控芯片快速鉴定多重细菌[J]. 分析化学, 2014, (6): 791-798. DOI: 10.3724/SP.J.1096.2014.31222.

(收稿日期: 2020-02-21)

(本文编辑: 邵文 张耘菲)