

• 论 著 •

多重 PCR 毛细管电泳细菌快速鉴定方法的建立和临床应用研究*

汤荣睿, 陈瑶, 李娟, 李蓉, 王芳, 裴光德[△]

重庆市沙坪坝区人民医院医学检验科, 重庆 400033

摘要:目的 针对引起人类感染的常见病原菌建立一种基于多重 PCR 毛细管电泳技术的快速细菌鉴定方法, 评估其临床应用价值。方法 建立 23 种常见病原菌的多重 PCR 毛细管电泳检测体系。收集 150 例临床微生物检测标本, 分别用多重 PCR 毛细管电泳法(以下简称多重 PCR 法)、培养法进行检测。对两种方法的检测结果进行比较, 评价多重 PCR 法的检测效能。结果 150 例标本中多重 PCR 法检出 15 种病原菌、培养法检出 14 种病原菌。多重 PCR 法检测阳性率为 73.3%, 培养法为 70.0%, 差异无统计学意义($P>0.05$)。多重 PCR 法对肺炎链球菌的检出率为 16.0%, 培养法为 6.0%, 差异有统计学意义($P<0.05$)。多重 PCR 法对混合菌标本的检出率为 15.3%, 培养法未检出混合菌标本。多重 PCR 法与培养法检测结果的符合率为 79.3%。多重 PCR 法检测时间为 3~6 h, 培养法为 2~4 d。结论 与培养法比较, 多重 PCR 法具有较高的时效性, 对肺炎链球菌及混合菌标本具有较高的检出率, 可满足临床标本病原微生物快速初筛的需求。

关键词: 多重 PCR 毛细管电泳; 培养法; 肺炎链球菌

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2024.05.004

中图法分类号: R446.5

文章编号: 1673-4130(2024)05-0529-05

文献标志码: A

Establishment and clinical application of multiplex PCR capillary electrophoresis for rapid identification of bacteria*

TANG Rongrui, CHEN Yao, LI Juan, LI Rong, WANG Fang, PEI Guangde[△]

Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Shapingba

District of Chongqing, Chongqing 400033, China

Abstract: **Objective** To establish a rapid bacterial identification method based on multiplex PCR capillary electrophoresis for common pathogens causing human infections, and to evaluate its clinical application value. **Methods** Established a multiplex PCR capillary electrophoresis detection system for 23 common pathogens. A total of 150 clinical microbiological test specimens were collected and tested by multiplex PCR capillary electrophoresis (hereinafter referred to as multiplex PCR method) and culture method respectively. The results of the two methods were compared, and the detection efficacy of the multiplex PCR method was evaluated. **Results** In 150 clinical microbial samples, 15 kinds of pathogens were detected by multiplex PCR and 14 kinds of pathogens were detected by culture method. The positive rate of multiplex PCR was 73.3%, and that of culture method was 70.0%, the difference was not statistically significant ($P>0.05$). The detection rate of *Streptococcus pneumoniae* by multiplex PCR method was 16.0%, and that by culture method was 6.0%, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The detection rate of mixed bacterial samples by multiplex PCR was 15.3%, and no mixed bacterial samples were detected by culture method. The coincidence rate of multiplex PCR and culture method was 79.3%. The detection time of multiplex PCR method was 3~6 h, and that of culture method was 2~4 d. **Conclusion** Compared with the culture method, the multiplex PCR method has a higher detection rate of *Streptococcus pneumoniae* and mixed bacteria samples, which can meet the needs of rapid primary screening of pathogenic microorganisms in clinical specimens.

Key words: multiplex polymerase chain reaction-capillary electrophoresis; bacterial culture; streptococcus pneumoniae

快速、准确地为临床提供细菌鉴定报告有利于临床及时诊断感染性疾病、合理使用抗菌药物、降低病

死率、减少患者治疗费用、提高医院感染防控能力。有研究表明, 有效的抗菌药物治疗每延迟 1 h, 感染性

* 基金项目: 重庆市卫生健康委医学科科研项目(2022WSJK023)。

作者简介: 汤荣睿, 女, 主任技师, 主要从事临床微生物检验相关研究。

[△] 通信作者, E-mail: 329827677@qq.com。

休克患者出现低血压后的存活率平均下降 7.6%^[1]。临床实践中,细菌鉴定采用的传统方法为培养法,检测周期一般为 2~4 d,难以实现快速报告检测结果。多重 PCR 技术是指通过一次 PCR 反应同时对多个靶标进行扩增,结合一定的检测手段对扩增产物进行检测从而实现对多个靶标进行诊断的技术^[2]。该技术操作简便快速,灵敏度高,可直接提取标本核酸进行扩增检测^[3-10]。省去了转种分离培养的大部分时间,在时效上明显优于传统培养法。本研究拟建立基于多重 PCR 毛细管电泳技术的细菌快速鉴定方法,与培养法进行结果比对,评估其临床应用价值,为提高细菌鉴定速度、提升临床感染性疾病诊疗效果、推进抗菌药物合理使用提供参考。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集本院 2022 年 1 月至 2023 年 2 月临床送检的微生物培养标本 150 例,包括血液 44 例(29.33%)、尿液 52 例(34.67%)、痰液 41 例(27.33%)、胸腹水 8 例(5.34%)、脑脊液 5 例(3.33%)。标本的采集、送检、接收均严格按照《全国临床检验操作规程》要求执行,对痰标本按照《WS/T 499-2017 下呼吸道感染细菌培养操作指南》进行质量筛查与评估,判定为可接收标本的标准为鳞状上皮细胞<10 个/低倍视野,白细胞>25 个/低倍视野。

1.2 仪器与试剂 A100 型 PCR 仪(杭州朗基科学仪器有限公司)、Qsep400 型全自动毛细管电泳仪[光鼎生物科技(江苏)有限公司]、HH-1 型恒温水浴锅(嘉兴俊恩电子有限公司)、VORTEX-GENIE 2 型涡旋混匀仪(美国 Scientific Industries 公司)、5424R 型高速离心机(德国 Eppendorf 公司)、NanoDrop 1000 型微量紫外可见分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司)。High Resolution S1 cartridge(一种高分辨率卡夹,用于与 Qsep 系列仪器搭配进行核酸片段的检测)、DNA 标记物 1K Size marker、1K Alignment marker 均为光鼎生物科技(江苏)有限公司产品, Triton X-100(北京博远泰隆生物科技有限公司)、矿物油(美国 BBI 公司)、无核酸水(Invitrogen 公司)。TDR-300BPLUS 型全自动细菌鉴定及药敏分析仪(天地人公司)、TDR-Z200 型细菌浊度仪(天地人公司)、DH-160 I 型二氧化碳培养箱(上海三腾仪器有限公司)、肠杆菌科细菌生化药敏试验卡、非发酵菌生化药敏试验卡、葡萄球菌生化药敏试验卡、链球菌生化药敏试验卡、奈瑟菌/嗜血杆菌生化药敏试验卡均为天地人公司产品。

1.3 方法

1.3.1 检测的病原菌 根据感染相关指南中感染病原谱^[11-13]、全国细菌耐药监测网^[14]以及一些大型三甲医院的统计数据^[15-16]。选取 23 种常见病原菌作为研究对象,分别是大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、醋酸钙不动杆

菌、医院不动杆菌、皮特不动杆菌、尿肠球菌、粪肠球菌、嗜麦芽窄食单胞菌、阴沟肠杆菌、流感嗜血杆菌、肺炎链球菌、化脓性链球菌、表皮葡萄球菌、无乳链球菌、普通变形杆菌、奇异变形杆菌、黏质沙雷氏菌、产气肠杆菌、脆弱类杆菌、粪产碱杆菌。

1.3.2 建立多重 PCR 毛细管电泳检测体系 (1)引物设计:通过细菌靶标筛选软件选出 23 种细菌特异性检测靶标,用 Primer5.0 软件设计其特异性引物并筛选出最优的多重引物组。(2)引物验证:分别用每对引物对质粒标准品和目标菌株基因组 DNA 为模板进行单引物单模板的 PCR 扩增,将 PCR 扩增产物进行毛细管电泳检测,分析 PCR 产物是否单一特异性扩增和 PCR 产物水平,并将 PCR 产物进行 Sanger 测序,验证引物敏感性。除去待验证目标菌株 DNA,将非检测范围内的菌株 DNA 和人基因组 DNA 混合,使用目标菌株的特异性引物进行单引物单模板的 PCR 扩增,将 PCR 扩增产物进行毛细管电泳检测,分析 PCR 产物有无非特异性条带验证引物特异性,建立各病原菌单重 PCR 检测体系。(3)多重 PCR 检测体系:在单重 PCR 检测体系基础上依次增加反应重数,以质粒标准品和标准菌株为模板(各模板拷贝数浓度保持一致),通过调整退火温度和优化引物浓度等方法,建立最优的多重 PCR 检测体系。每组多重 PCR 检测体系在一个反应管中进行,每组中均含有需检测病原菌的引物对。第 1 组检测的病原菌为铜绿假单胞菌、表皮葡萄球菌、嗜麦芽窄食单胞菌、肺炎克雷伯菌和鲍曼不动杆菌;第 2 组检测的病原菌为流感嗜血杆菌、大肠埃希菌、肺炎链球菌和阴沟肠杆菌;第 3 组检测的病原菌为金黄色葡萄球菌、化脓性链球菌、粪产碱杆菌、皮特不动杆菌、尿肠球菌、普通变形杆菌和无乳链球菌;第 4 组检测的病原菌为粪肠球菌、医院不动杆菌、黏质沙雷菌、醋酸钙不动杆菌、产气肠杆菌、奇异变形杆菌和脆弱类杆菌。(4)多重 PCR 毛细管电泳法(以下简称多重 PCR 法)的检测步骤。①核酸提取释放:将 1.5 mL 离心管中的样本吹打混匀,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清;在沉淀中加入 20~100 μ L 0.1% TritonX-100,涡旋混匀,将沉淀悬浮液置于 100 $^{\circ}$ C 沸水浴 10 min;沸水浴后迅速冰浴 5 min,然后 8 000 r/min 离心 5 min,取上清液于新的 1.5 mL 离心管中,所得上清液即为检测模板,置-80 $^{\circ}$ C 备用。②PCR 反应体系配制与检测:将反应液分别加入 8 联管或 96 孔板中,每孔加 17.5 μ L,并往反应孔中分别依次加入 2.5 μ L 的阴性质控品、待测样本和阳性质控品,最后加入 10 μ L 矿物油后,盖好盖子,充分混匀并离心。上述配制好的试剂进行 PCR 扩增,扩增程序如下,98 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,98 $^{\circ}$ C 10 s、60 $^{\circ}$ C 10 s、72 $^{\circ}$ C 30 s,循环 35 次,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,4 $^{\circ}$ C 结束反应。③毛细管电泳检测及结果分析:按照仪器说明书使用 Qsep400 全自动毛细管电泳

仪对 PCR 产物进行电泳,根据预期 PCR 扩增片段大小对结果进行判定。

1.3.3 临床标本检测 将每例临床标本分成 2 份,一份采用培养法,严格按照《全国临床检验操作规程(第 4 版)》进行细菌培养鉴定,采用 TDR-300BPLUS 全自动细菌鉴定分析系统及配套细菌鉴定卡;一份采用多重 PCR 法进行细菌鉴定。

1.4 统计学处理 使用 SPSS22.0 进行统计学分析,计数资料采用频数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 培养法检测结果 150 例临床标本中,细菌培养检测出阳性标本 105 例,分离出 14 种共 105 株细菌,阳性率为 70.0%(105/150),其中大肠埃希菌 34 株、流感嗜血杆菌 12 株、肺炎克雷伯菌 10 株、肺炎链球菌 9 株、奇异变形杆菌 8 株、金黄色葡萄球菌 6 株、粪肠球菌 6 株、尿肠球菌 6 株,其他细菌 7 种 14 株。

2.2 多重 PCR 法检测结果 在 150 例标本中,多重 PCR 法检测出阳性标本 110 例,分离出 15 种 138 株细菌,阳性率为 73.3%(110/150),其中大肠埃希菌 35 株、肺炎链球菌 24 株、流感嗜血杆菌 16 株、肺炎克雷伯菌 10 株、尿肠球菌 9 株、金黄色葡萄球菌 8 株、奇异变形杆菌 8 株、粪肠球菌 8 株、鲍曼不动杆菌 6 株,其他细菌 6 种 14 株。

2.3 两种方法检测的阳性率比较 培养法和多重 PCR 法检测的阳性率比较,差异无统计学意义($P>$

0.05),见表 1。

表 1 培养法和多重 PCR 法检测结果的比较(n)

培养法	多重 PCR 法		合计
	阳性	阴性	
阳性	102	3	105
阴性	8	37	45
合计	110	40	150

2.4 两种方法检出病原菌的检出率和构成比 培养法和多重 PCR 法检测出的菌株种类构成情况和检出率见表 2。

2.5 两种方法对 5 种病原菌检测结果的比较 选取临床常见苛养菌及多重 PCR 法检出率前三的细菌,对其两种方法的检出率进行对比,见表 3。多重 PCR 法对肺炎链球菌的检出率[16.0%(24/150)]高于培养法[6.0%(9/150)],差异有统计学意义($P<0.05$);两种方法对流感嗜血杆菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、尿肠球菌四种病原菌的检出率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.6 多重 PCR 法的检测效能评价 以培养法为参考标准,多重 PCR 法检测效能的评价指标见表 4。以培养法为参考标准,对 150 例临床标本的检测中,多重 PCR 法的符合率为 79.3%;对血液标本检测的符合率最高,为 100.0%,其次为体液标本,符合率为 84.6%,痰液标本符合率为 48.8%。

表 2 病原菌检出率与构成比[n (%)]

病原菌	培养法		多重 PCR 法	
	检出率($n=150$)	构成比($n=105$)	检出率($n=150$)	构成比($n=138$)
肺炎链球菌	9(6.0)	9(8.6)	24(16.0)	24(17.4)
金黄色葡萄球菌	6(4.0)	6(5.7)	8(5.3)	8(5.8)
肺炎克雷伯菌	10(6.7)	10(9.5)	10(6.7)	10(7.2)
大肠埃希菌	34(22.7)	34(32.4)	35(23.3)	35(20.8)
流感嗜血杆菌	12(8.0)	12(11.4)	16(10.7)	16(8.9)
奇异变形杆菌	8(5.3)	8(7.6)	8(5.3)	8(5.8)
粪肠球菌	6(4.0)	6(5.7)	8(5.3)	8(5.8)
尿肠球菌	6(4.0)	6(5.7)	9(6.0)	9(6.5)
铜绿假单胞菌	2(1.3)	2(1.9)	2(1.3)	2(1.4)
表皮葡萄球菌	4(2.7)	4(3.8)	5(3.3)	5(3.6)
无乳链球菌	2(1.3)	2(1.9)	2(1.3)	2(1.4)
嗜麦芽窄食单胞菌	2(1.3)	2(1.9)	2(1.3)	2(1.4)
鲍曼不动杆菌	3(2.0)	3(2.9)	6(4.0)	6(4.3)
产气肠杆菌	1(0.7)	1(1.0)	2(1.3)	2(1.4)
醋酸钙不动杆菌	0(0.0)	0(0.0)	1(0.7)	1(0.7)
合计	105(70.0)	100(100.0)	138(92.0)	100(100.0)

表 3 两种方法对 5 种致病菌检测结果的对比 (n)

多重 PCR 法	肺炎链球菌		流感嗜血杆菌		大肠埃希菌		肺炎克雷伯菌		屎肠球菌	
	培养法阳性	培养法阴性	培养法阳性	培养法阴性	培养法阳性	培养法阴性	培养法阳性	培养法阴性	培养法阳性	培养法阴性
阳性	9	15	12	4	33	2	9	1	6	3
阴性	0	126	0	134	1	114	1	139	0	141

表 4 多重 PCR 法检测效能的评价 (%)					
评价指标	肺炎链球菌	流感嗜血杆菌	大肠埃希菌	肺炎克雷伯菌	屎肠球菌
灵敏度	100.0	100.0	97.1	90.0	100.0
特异度	89.4	97.1	98.3	99.3	97.9
符合率	90.0	97.3	98.0	98.7	98.0

2.7 多重 PCR 对混合菌标本的检出情况 多重 PCR 法共检出 23 例混合菌标本,其中痰标本有 16 例,尿液标本有 7 例,多重 PCR 对混合菌标本的检出率为 15.3%,培养法未检出混合菌标本。见表 5。

表 5 多重 PCR 对混合菌标本检出情况 (n=150)		
标本类型	检出混合菌的标本 (n)	检出率 (%)
痰	16	10.7
尿	7	4.6
合计	23	15.3

2.8 检测时效性 培养法需将样品接种在平板培养纯化后,再通过微生物鉴定仪进行鉴定。检测时间需要 2~4 d;多重 PCR 法检测时间为 3~6 h。可见用多重 PCR 法进行细菌鉴定,可明显缩短检测周期。

3 讨 论

目前,各医疗机构微生物室细菌鉴定采用的方法大多为培养法,其优点是成本较低,适合基层医院开展,缺点是耗时长,从标本接种、分纯、鉴定结果报告一般需要 2~4 d 甚至更长时间,难以实现临床细菌鉴定结果的快速报告^[17],而且实验室的培养条件、采集标本前患者是否使用抗菌药物、技术人员操作因素等都会影响培养结果。虽然近几年基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱 (MALDI-TOF) 技术已经逐步在三甲医院中应用,可在一定程度上缩短鉴定时间,但该方法目前还不能直接检测临床标本,在鉴定前仍需进行细菌培养和分纯,因此耗时一般也在 24 h 以上。近年来国内外基于多重 PCR 技术对病原体鉴定的相关研究取得了一定进展,多重 PCR 具有高灵敏度、高通量、快速高效等优势,有利于临床快速鉴定感染病原体,及时诊断并启动靶向治疗,从而缩短有效治疗的时间^[18-21]。

本研究建立的多重 PCR 法和培养法的结果对比显示,多重 PCR 对肺炎链球菌检出率为 16.0%,培养法为 6.0%,两者之间比较,差异有统计学意义 ($P <$

0.05)。本研究中,多重 PCR 对儿童社区获得性肺炎首要病原菌肺炎链球菌检测的灵敏度达到 100.0%,检出率是培养法的 2.7 倍,优于培养法,且检测时间仅为 3~6 h,比传统细菌培养快很多,对临床早期使用抗菌药物具有重要的指导意义。由于抗菌药物滥用等原因,老人和儿童等免疫力低下患者更容易发生混合菌感染,因多重 PCR 技术在单次反应中可以同时检测多个病原菌,能快速检测出潜在的混合菌感染,对临床及时诊断和治疗混合感染具有重要意义^[4],本研究结果显示,在 150 例标本中,多重 PCR 对混合菌标本的检出率达到 15.3%,而传统培养法未检出,也显示多重 PCR 相比培养法对混合菌标本具有更高的检出率,但检出的混合菌是致病菌还是定植菌,还需要进一步加强临床符合率的调查。

以培养法为参考标准,多重 PCR 法检测符合率为 79.3%。其差异可能是因为培养法必须先通过培养进行菌落提取和纯化,而实验室的培养条件、细菌本身的结构特性以及技术人员操作因素等都会影响培养的结果,尤其是对混合感染检测结果的影响较大。多重 PCR 法因为对肺炎链球菌和混合菌检测具有较高的灵敏度,也可能导致与培养法结果不一致的情况,对于不一致的结果,还需要进一步加强临床符合率调查。本研究对不同类型临床标本的检测数量还不够充足,在后续的研究中,会进行更大规模的测试,筛选出不同标本类型的常见菌谱,设计并建立针对不同类型标本的多重 PCR 检测体系,评价其检测性能,以进一步评估和优化本方法。

参考文献

[1] VLEK A L M, BONTEN M J M, BOEL C H E, et al. Direct matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry improves appropriateness of antibiotic treatment of bacteremia[J]. PLoS One, 2012, 7 (3):e32589.

[2] 胡翀. 多重 PCR 方法快速检测临床常见病原菌方法的建立与应用[D]. 张家口:河北北方学院, 2019.

[3] PAYNE M, CHAMPAGNE S, LOWE C, et al. Evaluation of the filmarray blood culture identification panel compared to direct MALDI-TOF MS identification for rapid identification of pathogens[J]. J Med Microbiol, 2018, 67 (9):1253-1256.

[4] ALMUHAYAWI M S, WONG A, KYNNING M, et al. Identification of microorganisms directly from blood culture bottles with polymicrobial growth: comparison of fil-

- marray and direct MALDI-TOF MS[J]. APMIS, 2020, 129:178-185.
 - [5] 王胜,李仁杰,朱敏,等. 恒温核酸扩增芯片法在下呼吸道病原体检测中的应用[J/CD]. 世界最新医学信息文摘(电子版), 2019, 19(95):202-204.
 - [6] FIORI B, D'INZEO T, GIAQUINTO A, et al. Optimized use of the MALDI biotyper system and the filmarray BCID panel for direct identification of microbial pathogens from positive blood cultures[J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(3):576-584.
 - [7] ENA J, AFONSO-CARRILLO R G, BOU-COLLADO M, et al. Evaluation of FilmArray ME panel for the rapid diagnosis of meningitis-encephalitis in emergency departments[J]. Intern Emerg Med, 2021, 5(9):1259-1289.
 - [8] HUANG H S, TSAI C L, CHANG J, et al. Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection: systematic review and meta-analysis[J]. Clin Microbiol Infect, 2018, 24(10):1055-1063.
 - [9] VINCENT J J, ZANDOTTI C, BARON S, et al. Point-of-care multiplexed diagnosis of meningitis using the FilmArray ME panel technology[J]. Europ J Clin Microbiol Infect Dis, 2020, 39(8):1573-1580.
 - [10] AHN J S, SEO S I, KIM J, et al. Efficacy of stool multiplex polymerase chain reaction assay in adult patients with acute infectious diarrhea[J]. World J Clinl Cases, 2020, 8(17):93-102.
 - [11] 中华医学会呼吸病学分会. 中国成人社区获得性肺炎诊断和治疗指南(2016 年版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2016, 39(4):253-279.
 - [12] 中华医学会呼吸病学分会感染学组. 中国成人医院获得性肺炎与呼吸机相关性肺炎诊断和治疗指南(2018 年版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2018, 41(4):255-280.
 - [13] 巴特利特, 奥威特. ABX 指南: 感染性疾病的诊断与治疗[M]. 马小军, 符英春, 刘正印, 译. 北京: 科学技术文献出版社, 2012.
 - [14] 全国细菌耐药监测网. 全国细菌耐药监测网 2014—2019 年细菌耐药性监测报告[J]. 中国感染控制杂志, 2021, 20(1):15-31.
 - [15] 齐文凯, 李轶, 朱应杰, 等. 2019 年河南省 56 所三级医院细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2021, 21(5):7.
 - [16] 王涛, 马晓波, 李珣, 等. 厦门某三级综合医院近 3 年血培养病原菌构成及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(24):3527-3529.
 - [17] 郑凯文, 黄晓园, 陈渡波, 等. 基于多重 PCR 和第二代高通量测序技术快速检测下呼吸道感染病原微生物方法的建立和应用[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(17):2066-2070.
 - [18] RADER T S, STEVENS M P, BEARMAN G. Syndromic multiplex polymerase chain reaction (mPCR) testing and antimicrobial stewardship: current practice and future directions[J]. Curr Infect Dis Rep, 2021, 23(4):5-10.
 - [19] JI Y, WANG P, XU T, et al. Development of a one-step multiplex PCR assay for differential detection of four species[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11:677089.
 - [20] YANG J, LI D, WANG J, et al. Design, optimization, and application of multiplex rRT-PCR in the detection of respiratory viruses[J]. Crit Rev Clin Laborat Sci, 2022, 59(8):555-572.
 - [21] MONTASSER K, OSMAN H A, ABOZAID H, et al. Multiplex PCR: aid to more-timely and directed therapeutic intervention for patients with infectious gastroenteritis[J]. Medicine, 2022, 101(41):e31022.
- (收稿日期:2023-08-26 修回日期:2023-12-25)
-
- (上接第 528 页)
- [13] LEKOUBOU A, BISHU K G, OVBIAGELE B. The direct cost of epilepsy in children: evidence from the medical expenditure panel survey, 2003—2014[J]. Epilepsy Behav, 2018, 83(6):103-107.
 - [14] LIU Y, YU G, DING Y Y, ZHANG Y X. Expression of miR-155 in serum exosomes in children with epilepsy and its diagnostic value[J]. Dis Markers, 2022, 2022:7979500.
 - [15] TERRONE G, BALOSSO S, PAULETTI A, et al. Inflammation and reactive oxygen species as disease modifiers in epilepsy[J]. Neuropharmacology, 2020, 167:107742.
 - [16] PARK J T, FERNANDEZ-BACA VACA G. Epileptic seizure semiology in infants and children[J]. Seizure, 2020, 77:3-6.
 - [17] BINDER D K, STEINHAUSER C. Astrocytes and epilepsy[J]. Neurochem Res, 2021, 46(10):2687-2695.
 - [18] 展巧稚, 阎文军. Ghrelin 对围术期神经认知障碍小鼠术后海马氧化应激及炎症反应的影响[J]. 中国临床新医学, 2022, 15(12):1158-1163.
 - [19] YE Y, ZENG Z, JIN T, et al. The Role of high mobility group box 1 in ischemic stroke[J]. Front Cell Neurosci, 2019, 13:127.
 - [20] REN C, YAO R Q, WANG L X, et al. Antagonism of cerebral high mobility group box 1 ameliorates dendritic cell dysfunction in sepsis[J]. Front Pharmacol, 2021, 12:665579.
 - [21] NISHIBORI M, WANG D, OUSAKA D, et al. High mobility group box-1 and blood-brain barrier disruption[J]. Cells, 2020, 9(12):2650.
 - [22] ZHANG S, CHEN F, ZHAI F, et al. Role of HMGB1/TLR4 and IL-1 β /IL-1R1 signaling pathways in epilepsy[J]. Front Neurol, 2022, 13:904225.
- (收稿日期:2023-08-25 修回日期:2023-12-21)