

基于多重荧光编码技术对 TORCH 感染的高通量检测

doi:10.3969/j.issn.1674-7100.2023.01.005

崔婷^{1,2} 钱纯亘²
吴力强² 黄天逊²
汤建新¹

1. 湖南工业大学
生命科学与化学学院
湖南 株洲 412007
2. 深圳市亚辉龙生物科技
股份有限公司
平台预研部
广东 深圳 518100

摘要: TORCH 感染的早期快速诊断在疾病管理中至关重要, 有助于提高诊疗效果, 降低医疗风险。利用多重荧光编码技术, 建立了一种可同时检测弓形虫、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒特异性抗体 IgG 的免疫分析法。通过对偶联缓冲液 pH 值及 Goat anti-Human IgG- PE 浓度的优化得到最佳检测条件, 并对该实验方法的精密度、特异性、剂量-反应曲线及检出限进行性能验证。结果表明, 各项指标的相对标准偏差 (RSD) 均小于 10%, 与多种常见的病原体抗体均无交叉反应, 在 40 min 内能同时完成 5 个项目的批量检测, 且与 CLIA 方法测试的结果具有良好的相关性。此方法可缩短检验周期、节约检测成本, 为临床上快速、灵敏、高通量的 TORCH 感染筛查提供一种新的途径。

关键词: 多重荧光编码技术; 编码微球; TORCH 感染; 高通量检测

中图分类号: R446.6

文献标志码: A

文章编号: 1674-7100(2023)01-0036-10

引文格式: 崔婷, 钱纯亘, 吴力强, 等. 基于多重荧光编码技术对 TORCH 感染的高通量检测 [J]. 包装学报, 2023, 15(1): 36-45.

1 研究背景

TORCH 是弓形虫 (toxoplasmosis, TOXO)、风疹病毒 (rubella virus, RV)、巨细胞病毒 (cytomegalovirus, CMV)、单纯疱疹病毒 I 型 (herpes simplex virus-1, HSV1)、单纯疱疹病毒 II 型 (herpes simplex virus-2, HSV2) 5 种能导致新生儿先天性疾病或者畸形的病原体的简称, 是由 A. Nahmias 等学者于 1971 年首次提出^[1]。这 5 种病原体所引起的感染称之为 TORCH 感染, 是最常见的围产期感染, 可导致围产儿先天性畸形及早产等^[2-4]。妊娠早期的妇

女由于自身免疫力下降, 对病原体的易感性增加, 可能使本来潜伏在体内的病原体再活化, 容易发生 TORCH 感染, 从而导致不良妊娠^[5-7]。对胎儿而言, 孕妇感染后, 病原体能够穿透胎盘屏障或通过产道引起宫内感染, 可致胎儿先天畸形、早产、自然流产、智力发育异常等。有些感染儿虽出生时未发现异常, 但在儿童期会出现先天性耳聋、脉络膜视网膜炎、视力下降、先天性心脏病、智力低下等症状^[8-13]。据世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 估计, 每年有超过 10 万名婴儿出生时患有先天性风疹综合症 (congenital rubella syndrome, CRS)^[14]。

收稿日期: 2022-11-15

作者简介: 崔婷 (1997-), 女, 湖南常德人, 湖南工业大学硕士生, 主要研究方向为体外诊断技术,
E-mail: 1433909198@qq.com

通信作者: 汤建新 (1965-), 男, 湖南宁乡人, 湖南工业大学教授, 博士, 博士生导师, 主要从事功能纳米材料、环境生物技术、生物芯片与传感器等研究, E-mail: jxtang0733@163.com

因此,有必要针对 TORCH 感染进行快速准确的检测,预防出生缺陷。这对提高人口素质和降低家庭社会负担具有非常重要的意义^[15-17]。

目前 TORCH 感染临床上常用检测方法主要包括酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)和化学发光免疫分析法(chemiluminescence immunoassay, CLIA)。尽管这两种方法灵敏度高,备受关注,但传统 ELISA 和 CLIA 往往需要多种专业仪器及专业人士,且实验过程较为复杂,使其应用条件受限,难以实现自动化;与此同时,CLIA 还存在信号分子发光时间短等缺点^[18-21]。此外,目前两种检测方法一次只能检测一项生物指标,存在检测效率低及样本用量大等缺点,给患儿的检测带来了不便,限制了其在大规模筛查中的应用。因此,如何提高 TORCH 感染筛查的效率是本领域技术人员亟需解决的问题。

近年来,发展迅速的多重荧光编码检测技术可实现同一样本多项指标的同时检测,该技术集成了荧光编码微球技术、流式细胞术、激光分析技术和高速数字信号处理技术,具备各技术的众多优点^[22-25]。多重荧光编码检测技术是将两种光谱差异大的荧光染料按精确比例混合,对微球进行染色,从而使多重分析中每个或每种微球能够与其他微球区分开;此时,均一粒径的编码微球可长久悬浮于液体中,表面大量的活化羧基基团可分别共价交联不同特异性抗体或核酸探针,与样本中待检组分发生类均相的抗原抗体或杂交反应,并可通过荧光报告基团的信号强度进行区分。在同一体系中,不同编码微球各自反应、互不干扰,从而实现一次检测获得多项结果的高通量联合检测。

多重荧光编码技术因具有高通量、速度快、操作简便、试剂用量少、特异性好、适用性广等特点,已广泛应用于疾病诊断、食品安全及生物安全等领域^[26-30]。C. Dobaño 等^[31]基于 xMAP Luminex 平台的定量悬浮阵列技术建立了一种快速检测 SARS-CoV-2 抗原(包括刺突蛋白(S),核蛋白(N)和膜蛋白(M)的 IgM、IgA 和 IgG)的方法,克服了快速诊断试验和 ELISA 法的局限性。该方法在准确检测低水平抗体反应方面具有更高的效率、广度和通用性,有助于快速深入了解流行病的疫苗开发所需的抗体与免疫的相关性。

基于上述研究背景,本研究利用多重荧光编码

技术来实现对 TORCH 感染的高通量检测。通过优化检测条件(偶联缓冲液 pH 值及 Goat anti-Human IgG-PE 浓度)以达到最佳反应性能,并将此检测方法的性能与临床上使用的化学发光免疫分析法进行方法学与临床应用评价,以期为临床上早期快速诊断 TORCH 感染提供参考。

2 实验部分

2.1 实验材料、仪器与设备

1) 实验材料

Magplex Beads(浓度为 1.25×10^7 个微球/mL),购于美国 Luminex 公司; Goat anti-Human IgG-PE,购于美国 Thermo Fisher 科技公司;弓形虫抗原(质量浓度为 2.27 mg/mL,下同)、风疹病毒抗原(0.51 mg/mL)、巨细胞病毒抗原(3.4 mg/mL)、单纯疱疹病毒抗原(其中含有 HSV1 4.5 mg/mL、HSV2 3.79 mg/mL),均购于深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司;1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS),购于美国 Sigma-Aldrich 公司;2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)、氯化钾、磷酸氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠、吐温 20,均为分析纯,购于上海国药集团化学试剂有限公司。

PBS-BN 封闭缓冲液:PBS、1%(体积分数,下同)BSA、0.05%叠氮化钠,过滤,4℃保存。

PBS-TBN 保存缓冲液/检测缓冲液:PBS、0.1%BSA、0.05%叠氮化钠、0.02%吐温 20,过滤,4℃保存。

2) 实验仪器与设备

多功能液相芯片分析仪, Luminex200 型,美国 Luminex 公司;粒度仪, ZS-1 型,英国 Malvern 仪器有限公司;化学发光免疫分析仪, iFlash3000 型,深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司;涡旋混合仪, VX-200 型,美国 Labnet 公司;荧光显微镜, Leica DM1000 型,德国徕卡公司;超声波清洗机, 040S 型,深圳市洁盟清洗设备有限公司;磁力分离器, 洛阳惠尔纳米科技有限公司;滚轴混匀仪, 江苏其林贝尔仪器制造有限公司。

2.2 编码微球偶联抗原

将羧化微球悬浮液(1.0×10^6 个微球)移至微量离心管中,加入 80 μ L pH=5.0 的 MES(50 mmol/L)活化。在微球悬浮液中加入 10 μ L Sulfo-NHS(50 mg/mL)、10 μ L EDC(50 mg/mL),旋涡温和混

合孵育 20 min。反应完成后,用 200 μL 偶联缓冲液 (0.1 mol/L MES) 离心洗涤两次后,将被活化的微球分散于 100 μL 偶联缓冲液中,超声处理 20 s 后加入 10 μg 抗原,涡流混匀。将该混匀液置于混匀仪上室温孵育 2 h,抗原成功偶联至微球。随后,用 200 μL PBS-BN 封闭缓冲液洗涤微球,继续将偶联微球分散于 200 μL PBS-BN 封闭缓冲液中并反应 1 h,以封闭微球表面的非特异性反应位点。最后,用 200 mL PBS-TBN 保存缓冲液洗涤两次微球。将偶联成功的微球重悬于 100 μL PBS-TBN 保存缓冲液中,并置于 2~8 $^{\circ}\text{C}$,避光保存。

2.3 TORCH 特异性抗体 IgG 检测方法的建立

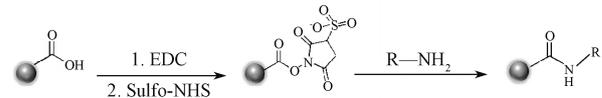
选择合适抗原偶联的微球阵列,涡旋振荡和超声混匀 20 s,以得到分散微球溶液。用检测缓冲液将偶联的微球稀释到终浓度为 25 个微球/ μL ,得到配制的微球工作液。将微球工作液分装至圆底反应板 (50 μL /孔),并分别加入 30 μL 稀释样本至相应分析孔中,用排枪轻轻吹打混合液数次,以保证样本与微球工作液混合均匀,于室温静置反应 15 min。反应完成后,加 200 μL 检测缓冲液至各反应孔中重复清洗两次,以除去未反应的待测抗体;加入 50 μL 稀释后的 PE 标记的羊抗人 IgG 抗体到各孔中 (用检测缓冲液稀释至 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$),用排枪轻轻吹打数次,混合均匀,于室温静置反应 15 min 后,加 200 μL 检测缓冲液至各反应孔中重复清洗两次,以除去未反应的检测抗体;每孔加入 80 μL 检测缓冲液分散微球,轻轻吹打数次,混合均匀,于 Luminex 分析仪中检测。

3 结果与讨论

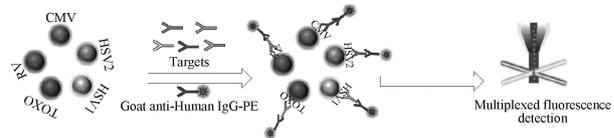
3.1 检测原理

基于多重荧光编码技术对 TORCH 感染的高通量检测原理如图 1 所示。首先,通过 EDC/Sulfo-NHS 法将抗原包被于微球的表面 (示意图见图 1a),然后与样本孵育捕获样本中的待测抗体,再加入藻红蛋白 (phycoerythrin, PE) 标记的羊抗人 IgG 抗体 (Goat anti-Human IgG) 孵育,形成抗原-待测抗体-标记抗体复合结构。检测时 (示意图见图 1b),样本探针从 96 孔板中吸取包含微球的反应体系,在流体动力学驱动下聚焦成一束快速流动的样本流。当样本本流通过成像室时,每个微球都会受到两种激光 (识别通道为 633 nm 的激发光;检测通道为 525 nm 的激发光) 的照射,其内部包被的两种荧光分子和微球表面标

记的荧光分子分别受到激发并发射荧光,荧光经过一系列滤光片后会被对应通道的光电倍增管所收集,光信号经过放大后转换为电信号并被系统记录,通过软件将荧光编码区分,从而获得对应的样本信息。



a) 编码微球偶联抗原原理示意图



b) TORCH 特异性抗体 IgG 检测流程示意图

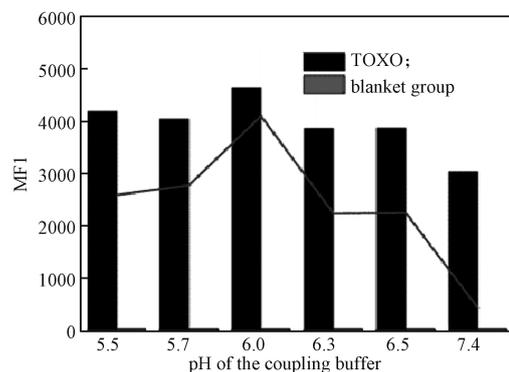
图 1 基于多重荧光编码技术对 TORCH 感染的高通量检测原理

Fig. 1 Mechanism of high-throughput detection of TORCH infection based on multiplex fluorescence coding technology

3.2 偶联缓冲液 pH 值优化

偶联缓冲液 pH 值是影响抗原成功偶联至微球的关键因素,在蛋白质等电点附近的 pH 环境中,蛋白质上带的电荷最少,从而疏水性最强,可以抵消微球表面略微偏酸的环境,也会增强免疫球蛋白分子的 Fc 端与固相进行结合的倾向性,从而获得较好的包被效果。

本研究通过考察等电点及附近 pH 的偶联效果,即设定 pH 值在 5.5~7.4 的范围进行优化实验,以确定最佳反应的 pH。不同 pH 值偶联缓冲液对抗原的偶联效果如图 2 所示。由图 2 可知,TOXO、RV、CMV、HSV1、HSV2 最佳反应 pH 值分别为 6.0, 6.5, 7.4, 5.5, 6.0, 以此作为后续实验过程中编码微球偶联抗原的反应 pH。



a) TOXO

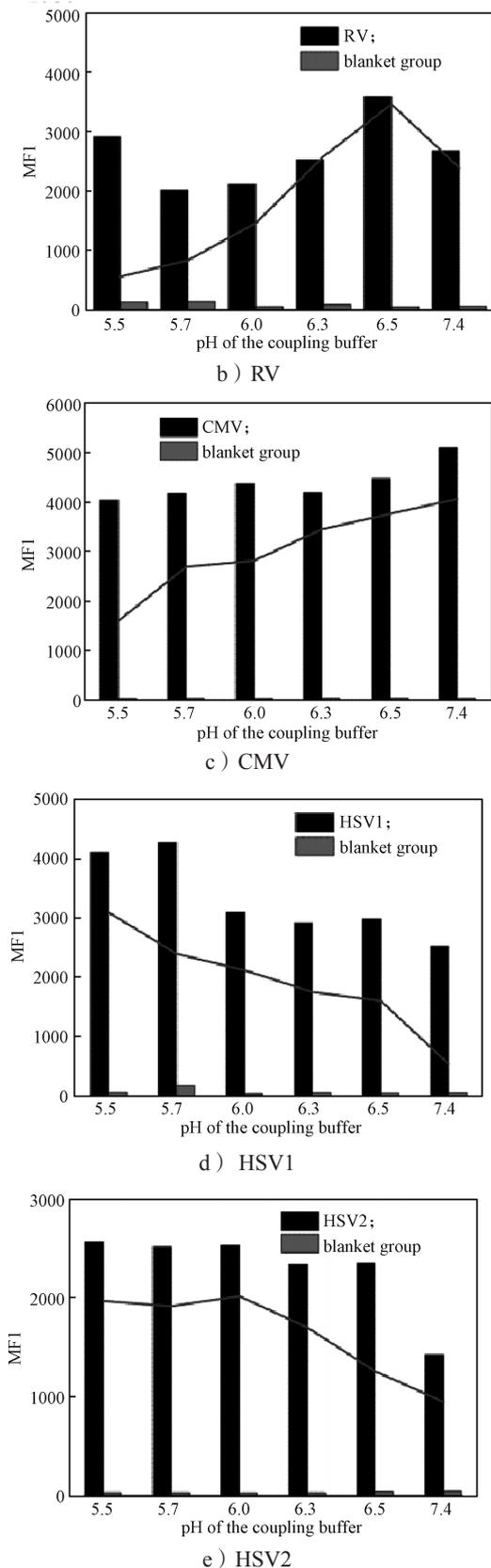


图 2 偶联缓冲液 pH 值优化

Fig. 2 The pH optimization of coupling buffer

3.3 Goat anti-Human IgG- PE 浓度优化

本研究通过间接免疫分析方法实现对 TORCH 感染样本的检测, 即通过羊抗人 IgG 抗体上标记的荧光基团信号 (Goat anti-Human IgG- PE) 来实现对样本中待测抗体的最终检测。因此, Goat anti-Human IgG- PE 的加入量会直接影响到最终检测信号的强弱, 若 Goat anti-Human IgG- PE 浓度过低, 会因检测信号太低而导致部分低浓度样本无法检出; 而 Goat anti-Human IgG- PE 浓度过高, 不仅使检测的成本提高, 还会引起部分高浓度样本的检测信号饱和而导致假阳性信号多。因此, 需对 Goat anti-Human IgG- PE 的浓度进行优化, 在保证检测信号强度的同时又要保证成本可控。

首先, 加入相同体积 (50 μL) 不同质量浓度的 Goat anti-Human IgG- PE (0, 2, 4, 6, 8, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 然后根据荧光信号强度来判断是否足够用于样本的检测, 检测结果如图 3 所示。

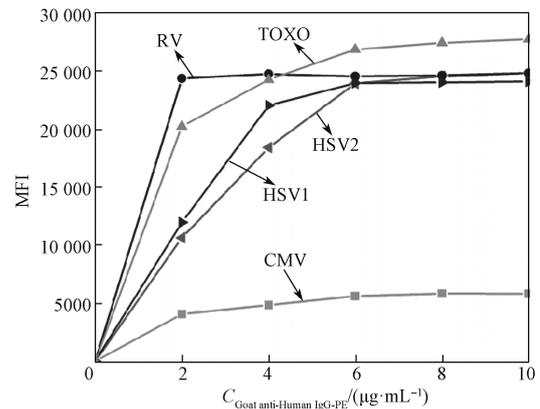


图 3 Goat anti-Human IgG- PE 浓度优化

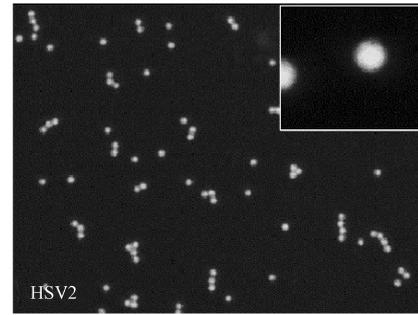
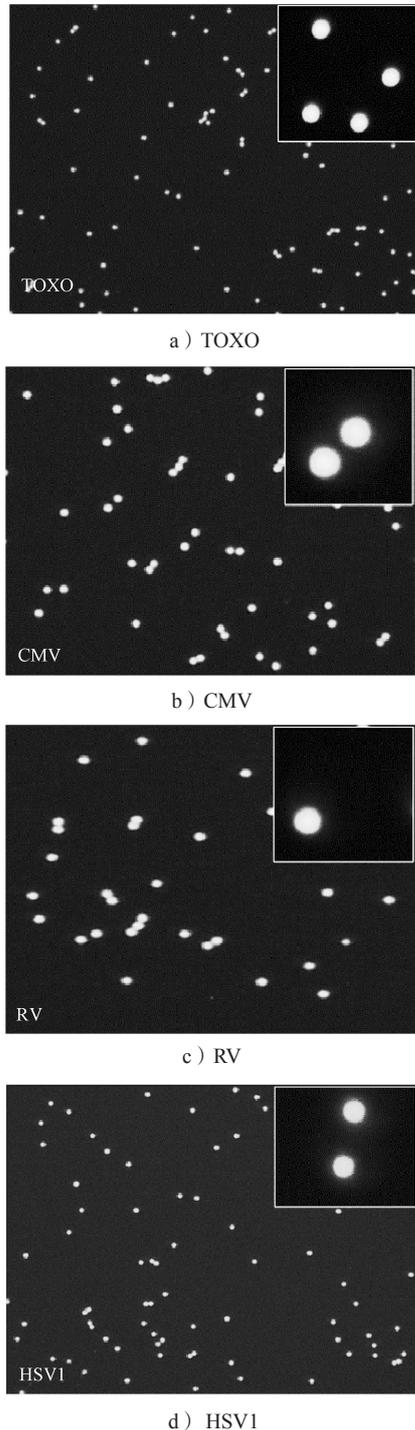
Fig. 3 The concentration optimization of Goat anti-Human IgG- PE

由图 3 可知, 随着 Goat anti-Human IgG- PE 浓度的升高, 检测到的荧光信号强度也在升高, 当 Goat anti-Human IgG- PE 的质量浓度从 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 增加到 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 荧光信号强度增长的趋势逐渐趋于平缓, 此时检测信号已经达到比较理想的状态。综合考虑检测信号强度及成本, 后续实验选择 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为 Goat anti-Human IgG- PE 的最佳反应浓度。

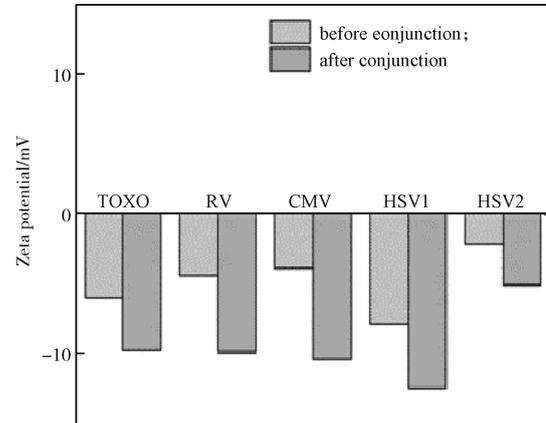
3.4 编码微球的形貌表征及 Zeta 电位

为验证各项目抗原是否成功偶联上编码微球, 通过荧光显微镜验证了编码微球的状态, 并对其偶联前后的 Zeta 电位进行了表征, 结果如图 4 所示。

由图 4 a~e 可知, 各编码微球状态良好且无团聚现象发生(图的右上角为各编码微球的局部放大图), 不会对荧光信号采集造成影响。图 4f 中 Zeta 电位结果显示各编码微球均成功偶联上对应抗原, 这是由于编码微球表面有羧基存在, 偶联前带负电, 而抗原蛋白也带负电, 偶联后 Zeta 电位向更负的方向移动, 表明偶联成功。



e) HSV2



f) Zeta 电位

图 4 编码微球形貌及 Zeta 电位表征

Fig. 4 Morphology and zeta potential characterization of encoded microspheres

3.5 检测范围及检出限

参考品配制方法: 通过将高浓度样本与低浓度样本进行倍比稀释得到不同浓度水平的样本, 每个样本使用化学发光免疫分析仪测定 3 次, 检出的浓度取平均值作为样本的真实浓度。各项目均配制 7 个浓度的系列参考品: TOXO (0, 12, 90.8, 180, 236, 301, 392 IU/mL)、RV (0, 12, 70, 142, 210, 300, 340 IU/mL)、CMV (0, 14.1, 55, 91, 123, 148, 172 U/mL), 于 4 °C 保存备用。

以自制试剂参考品浓度为横坐标, 以荧光强度中位值为纵坐标, 采用 OriginPro 2018 软件进行四参数非线性拟合, 得到剂量-反应曲线, 结果如图 5 所示。平行测定 20 次零浓度标准品的荧光强度中位值, 计算平均值 (AV) 及标准差 (SD), 以均值 ($AV+2SD$) 的反应量代入标准曲线方程, 所对应的浓度则为本方法的检出限。各项目的拟合方程、检测范围及检出限如表 1 所示, 各项目的相关系数 (R^2) 均大于 0.99, 表明线性良好。

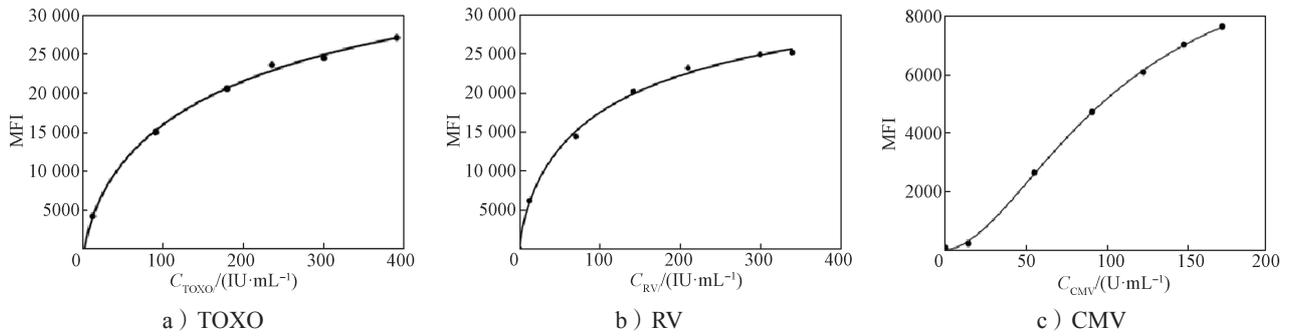


图 5 不同项目剂量 - 反应曲线图

Fig. 5 Dose-response curves of different items

表 1 各项目的剂量 - 反应曲线和检出限

Table 1 Dose-response curves and detection limits for each item

项目	拟合方程	R^2	检测范围	检出限
TOXO	$Y=(71.413-47\ 600.971)/[1+(x/252.284)^{0.655}]+47\ 600.971$	0.9990	0.4~392.0 IU/mL	0.4 IU/mL
RV	$Y=(109.534-37\ 942.795)/[1+(x/125.375)^{0.727}]+37\ 942.795$	0.9958	0.5~340.0 IU/mL	0.5 IU/mL
CMV	$Y=(-7.165-10\ 876.173)/[1+(x/105.793)^{1.777}]+10\ 876.173$	0.9997	5.2~172.0 U/mL	5.2 U/mL

3.6 Cut off 值

Cut off 值的确定方法：以经过化学发光免疫分析仪测试的临床样本（阴阳性判断）作为参考，对本方法测试结果使用 OriginPro 2018 软件进行受试者工作特征曲线（receiver operating characteristic curve, ROC curve）分析，确定本方法的 cut off 值。在 ROC 曲线上，靠近坐标图左上方的点为敏感性和特异性均

较高的临界点，ROC 曲线越靠近左上角，实验准确性越高。在进行其他样本测定时，高于 cut off 值定义为阳性，低于 cut off 值定义为阴性。曲线下面积（area under curve, AUC）越大，诊断准确性越高。各项目的 ROC 曲线如图 6 所示。由图可知，各项目的 AUC 均大于 0.9，说明此方法具有良好的诊断效果。各项目所对应的 cut off 值、AUC 及参考样本数如表 2 所示。

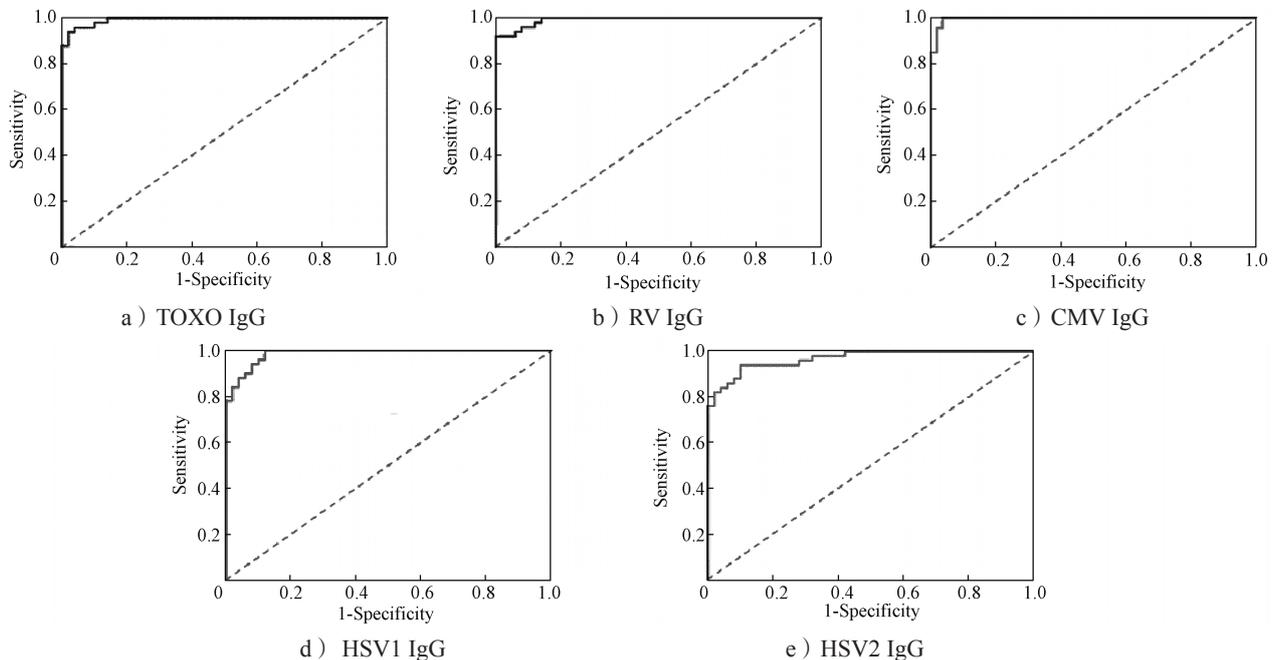
图 6 TOXO IgG、RV IgG、CMV IgG、HSV1 IgG 及 HSV2 IgG 的 ROC 曲线 ($n=100$)Fig. 6 ROC curves of TOXO IgG, RV IgG, CMV IgG, HSV1 IgG and HSV2 IgG ($n=100$)

表2 ROC 曲线下 cut off 值、AUC 及参考样本数

Table 2 Cut off values, AUC and number of reference samples under the ROC curve

项目	参考样本数 / 个		cut off 值	AUC
	阴性	阳性		
TOXO	50	50	8.3 IU/mL	0.99 306
RV	50	50	11.4 IU/mL	0.99 200
CMV	50	50	14.1 U/mL	0.99 658
HSV1	50	50	1 COI	0.98 600
HSV2	50	50	1 COI	0.96 880

注：定义 COI= 样本荧光强度中位值 /cut off 荧光强度中位值，其中 HSV1 cut off 荧光强度中位值为 1336，HSV2 cut off 荧光强度中位值为 1493。

3.7 检测特异性与重复性

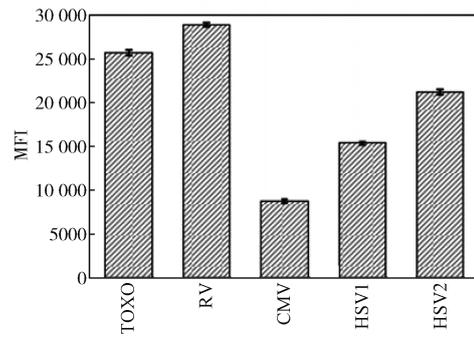
采用 5 批荧光编码微球检测相同的样本，以测试荧光编码微球的重复性，并利用其他 4 种病原体作为干扰物，用荧光编码微球进行交叉反应检测，分析荧光编码微球的特异性，结果如图 7 所示。

由图 7a 可知，TOXO、RV、CMV、HSV1、HSV2 相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 分别为 1.2%、2.0%、3.6%、2.1% 和 5.9%，均不到 10%，说明荧光编码微球检测结果的重复性较好。由图 7b 可知，除与自身相同项目的阳性血清样本测试为阳性外，其余 4 种病原体抗体阳性血清样本的荧光编码微球测试反应均为阴性，表明不同检测项目之间无相互干扰，特异性良好。

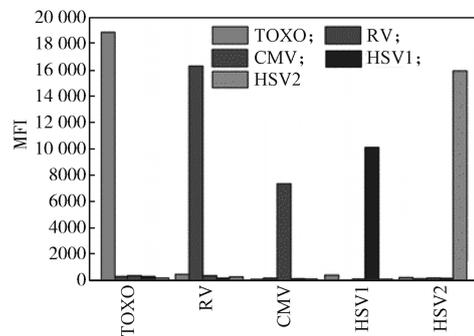
3.8 与化学发光法的方法学对比

分别收集 50 例 TOXO IgG、RV IgG、CMV IgG、HSV1 IgG 及 HSV2 IgG 经 YHLO 化学发光试剂盒验证为阳性 / 阴性的临床样本。用本研究所建立的多重荧光编码方法进行检测，以本方法测得的浓度值为横坐标 (X)，以 CLIA 法测得的浓度值为纵坐标 (Y)，分析两种方法检测结果的相关性。

TOXO、RV、CMV 的线性回归方程分别为



a) 重复性



b) 特异性

图7 多重荧光编码技术检测的重复性与特异性

Fig. 7 Reproducibility and specificity of multiplex fluorescence coding technique assays

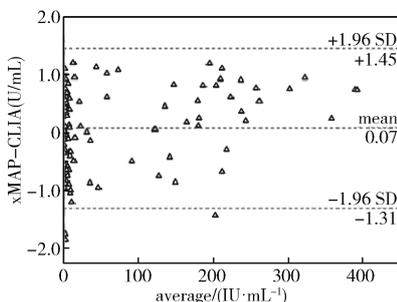
$$Y = -0.2859 + 0.9994X \quad (R^2 = 0.9998),$$

$$Y = 0.426 + 0.100X \quad (R^2 = 0.9997),$$

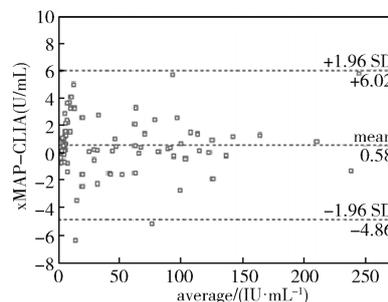
$$Y = 0.332 + 0.996X \quad (R^2 = 0.9995).$$

R^2 均大于 0.95，表明两种方法检测结果相关性良好。

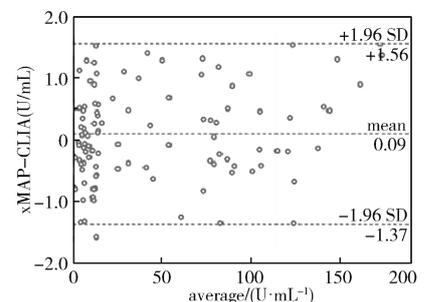
本研究以 TOXO、RV、CMV 三种病原体为对象，采用 OriginPro 2018 软件制作 Bland-Altman 图，对多重荧光编码方法与 CLIA 方法临床测试结果进行一致性分析，结果如图 8 所示。由图可知，多重荧光编码方法与 CLIA 法测试结果具有较好的一致性。



a) TOXO 绝对偏差



b) RV 绝对偏差



c) CMV 绝对偏差

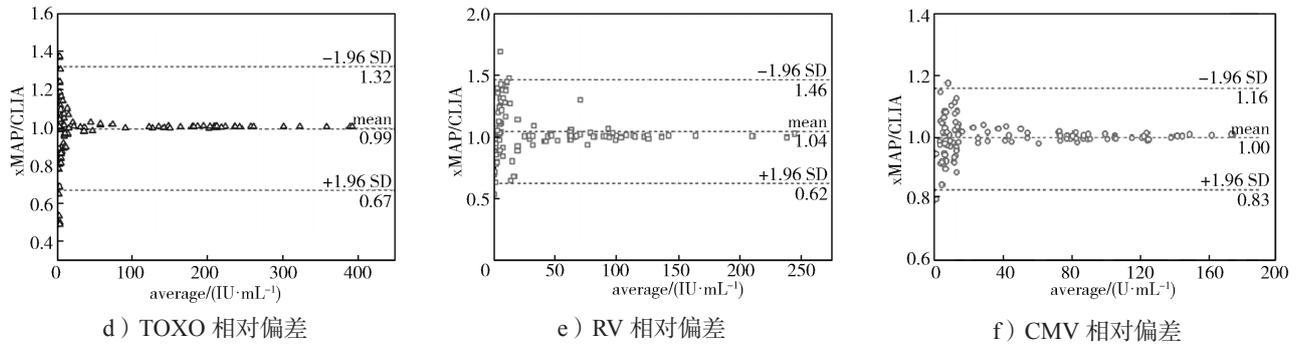


图 8 各项目的 Bland-Altman 绝对偏差和相对偏差统计图

Fig. 8 Bland-Altman absolute deviation and relative deviation statistical plots for each item

本研究对多重荧光编码方法与 CLIA 方法的临床检测结果进行了 Kappa 检验, 结果如表 3 所示。由表可知, 两种方法阴阳性符合率均大于 85%, 各 Kappa 值均在 0.8~0.9 之间, 各 P 值均小于 0.05, 可认为两种方法的检测结果一致性较好。

表 3 各项目方法学比对及 Kappa 值

Table 3 Comparison of methodologies and Kappa values for each item

项目	检测结果符合率		Kappa 值
	阳性	阴性	
TOXO	46/50 (92%)	48/50 (96%)	0.880
RV	47/50 (94%)	45/50 (90%)	0.840
CMV	46/50 (92%)	47/50 (94%)	0.860
HSV1	49/50 (98%)	43/50 (86%)	0.840
HSV2	49/50 (98%)	46/50 (92%)	0.900

4 结论

本研究利用多重荧光编码技术同时检测多个靶标分子, 实现了对 TORCH 感染的高通量检测, 有效解决了临床上常用的 TORCH 抗体检测方法耗时长、试剂消耗大和效率低等问题。通过精密度、特异性、剂量-反应曲线及检出限测试, 进行性能验证, 随后与化学发光免疫分析法检测的临床样本对比, 进行了方法学与临床应用评价。结果显示, 该方法对不同 TORCH 抗体检测结果的相对标准偏差均小于 10%, 无交叉反应, 阴阳性符合率均在 85% 以上。此方法仅需 30 μL 样本量即可在 40 min 内快速完成 5 个项目的批量检测, 且与临床上使用 CLIA 方法测试的结果具有良好的相关性。因编码微球表面大量的活化羧基基团可共价交联任意特异性抗体或核酸探针, 并与样本中待检组分发生类均相的抗原抗体或杂交反应, 故一次检测获得多项结果的高通量联合检测得以实

现。基于多重荧光编码技术的检测方法不仅可用于 TORCH IgG 特异性抗体的检测, 还可用于其他疾病如自身免疫性疾病的诊断。

参考文献:

- [1] NAHMIAS A J, WALLS K W, STEWART, et al. The TORCH Complex-Perinatal Infections Associated with Toxoplasma and Rubella, Cytomegal-and Herpes Simplex Viruses[J]. Pediatric Research, 1971, 5(8): 405-406.
- [2] QI Y, ZHU S, LI C, et al. Seroepidemiology of TORCH Antibodies in the Reproductive-Aged Women in China[J]. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2020, 254: 114-118.
- [3] NEU N, DUCHON J, ZACHARIAH P. TORCH Infections[J]. Clinics in Perinatology, 2015, 42(1): 77-103.
- [4] ARORA N, SADOVSKY Y, DERMODY T S, et al. Microbial Vertical Transmission During Human Pregnancy[J]. Cell Host & Microbe, 2017, 21(5): 561-567.
- [5] SRININGSIH R, SUBHAN M, LONGGOM NASUTION M. Analysis of Torch Deployment Models[J]. Journal of Physics: Conference Series, 2019, 1317(1): 012013.
- [6] TOIZUMI M, VO H M, DANG D A, et al. Clinical Manifestations of Congenital Rubella Syndrome:A Review of our Experience in Vietnam[J]. Vaccine, 2019, 37(1): 202-209.
- [7] BATRA P, BATRA M, SINGH S. Epidemiology of TORCH Infections and Understanding the Serology in Their Diagnosis[J]. Journal of Fetal Medicine, 2020, 7(1): 25-29.
- [8] AHMED M, SOOD A, GUPTA J. Toxoplasmosis in Pregnancy[J]. European Journal of Obstetrics &

- Gynecology and Reproductive Biology, 2020, 255: 44–50.
- [9] SOPER D E. Congenital Cytomegalovirus Infection: An Obstetrician's Point of View[J]. Clinical Infectious Diseases, 2013, 57(S4): 171–173.
- [10] NAGANO N, MORIOKA I. Congenital Cytomegalovirus Infection: Epidemiology, Prediction, Diagnosis, and Emerging Treatment Options for Symptomatic Infants[J]. Expert Opinion on Orphan Drugs, 2020, 8(1): 1–9.
- [11] ESPINO A, EL COSTA H, TABIASCO J, et al. Innate Immune Response to Viral Infections at the Maternal-Fetal Interface in Human Pregnancy[J]. Frontiers in Medicine, 2021, 8: 674645.
- [12] FITZPATRICK D, HOLMES N E, HUI L. A Systematic Review of Maternal TORCH Serology as a Screen for Suspected Fetal Infection[J]. Prenatal Diagnosis, 2022, 42(1): 87–96.
- [13] 钱雅琴, 李晓雯, 任绪义. 浙江省各地市孕妇 TORCH 感染情况调查报告 [J]. 浙江临床医学, 2008(1): 110–111.
QIAN Yaqin, LI Xiaowen, REN Xuyi. Investigation Report on TORCH Infection among Pregnant Women in Various Cities of Zhejiang Province[J]. Zhejiang Clinical Medical Journal, 2008(1): 110–111.
- [14] SANTIS M D, Cavaliere A F, Straface G, et al. Rubella Infection in Pregnancy[J]. Reproductive Toxicology, 2006, 21(4): 390–398.
- [15] 朱宇宁, 尚世强, 陈英虎, 等. TORCH 实验室规范化检测与临床应用专家共识 [J]. 中华检验医学杂志, 2020(5): 553–561.
ZHU Yuning, SHANG Shiqiang, CHEN Yinghu, et al. Expert Consensus on Standardized TORCH Laboratory Detection and Clinical Application[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2020(5): 553–561.
- [16] HWANG J S, FRIEDLANDER S, REHAN V K, et al. Diagnosis of Congenital/Perinatal Infections by Neonatologists: A National Survey[J]. Journal of Perinatology, 2019, 39(5): 690–696.
- [17] WANG Y Y, LI S P, MA N N, et al. The Association of TORCH Infection and Congenital Malformations: A Prospective Study in China[J]. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2019, 240: 336–340.
- [18] QIU X B, ZHANG J H, LI Y C, et al. A Bead-Based Microfluidic System for Joint Detection in TORCH Screening at Point-of-Care Testing[J]. Microsystems Technologies, 2018, 24(4): 2007–2015.
- [19] NIKOLIC D, KOHN D, YEN-LIEBERMAN B, et al. Detection of Herpes Simplex Virus and Varicella-Zoster Virus by Traditional and Multiplex Molecular Methods[J]. American Journal of Clinical Pathology, 2018, 151(1): 122–126.
- [20] BRENNER N, MENTZER A J, BUTT J, et al. Validation of Multiplex Serology Detecting Human Herpesviruses 1-5[J]. PLoS One, 2018, 13(12): e0209379.
- [21] GARDNER T J, BOLOVAN-FRITTS C, TENG M W, et al. Development of a High-Throughput Assay to Measure the Neutralization Capability of Anti-Cytomegalovirus Antibodies[J]. Clinical and Vaccine Immunology: CVI, 2013, 20(4): 540–550.
- [22] CABORÉ R N, PIÉRARD D, HUYGEN K. A Belgian Serosurveillance/Seroprevalence Study of Diphtheria, Tetanus and Pertussis Using a Luminex xMAP Technology-Based Pentaplex[J]. Vaccines, 2016, 4(2): 16.
- [23] ASHBY M, RAJKO-NENOW P, BATTEN C, et al. Simultaneous Detection of Bluetongue Virus Serotypes Using xMAP Technology[J]. Microorganisms, 2020, 8(10): 1564.
- [24] MOTESHAREIE H, HASSEN W M, DIRIEH Y, et al. Rapid, Sensitive, and Selective Quantification of *Bacillus Cereus* Spores Using xMAP Technology[J]. Microorganisms, 2022, 10(7): 1408.
- [25] NOWATZKE W L, OLIVER K G, CHO C Y, et al. Single-Laboratory Validation of the Multiplex xMAP Food Allergen Detection Assay with Incurred Food Samples[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(1): 484–498.
- [26] IVENS K O, CHO C Y, GARBER E A E. Cross-Reactivity of Chili Peppers (*Capsicum* Sp.) with the xMAP Food Allergen Detection Assay[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(45): 13331–13338.
- [27] SIMONOVA M A, VALYAKINA T I, PETROVA E E, et al. Development of xMAP Assay for Detection of Six Protein Toxins[J]. Analytical Chemistry, 2012, 84(15): 6326–6330.
- [28] HANSEN E O, DIAS N S, BURGOS I C B, et al. Millipore xMap® Luminex (HATMAG-68K): An Accurate and Cost-Effective Method for Evaluating Alzheimer's Biomarkers in Cerebrospinal Fluid[J]. Frontiers in Psychiatry, 2021, 12: 716686.
- [29] HRDY J, VASICKOVA P, NESVADBOVA M, et al. MOL-PCR and xMAP Technology[J]. The Journal of Molecular Diagnostics, 2021, 23(6): 765–776.

- [30] RESLOVA N, MICHNA V, KASNY M, et al. xMAP Technology: Applications in Detection of Pathogens[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 55.
- [31] DOBAÑO C, VIDAL M, SANTANO R, et al. Highly Sensitive and Specific Multiplex Antibody Assays to Quantify Immunoglobulins M, A, and G Against SARS-

CoV-2 Antigens[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2021, 59(2). DOI: 10.1128/JCM.01731-20.

(责任编辑: 李玉华)

High Throughput Detection of TORCH Infection Based on Multiplex Fluorescence Coding Technique

CUI Ting^{1,2}, QIAN Chungeng², WU Liqiang², HUANG Tianxun², TANG Jianxin¹

(1. College of Life Science and Chemistry, Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412007, China;
2. Department of Pre-Research Platform, Shenzhen YHLO Biotech Co., Ltd., Shenzhen Guangdong 518100, China)

Abstract: Rapid early diagnosis of TORCH infection is crucial in disease control and helps to improve the effectiveness of diagnosis and treatment, and reduce medical risks. An immunoassay for simultaneous detection of IgG specific antibodies against *Toxoplasma gondii*, rubella virus, cytomegalovirus and herpes simplex virus was established using multiplex fluorescence coding technique. The optimal assay conditions were achieved by optimizing the pH of the coupling buffer and the concentration of Goat anti-Human IgG-PE. The performance of the modified experimental method was verified in terms of precision, specificity, dose-response curve and detection limit. The results showed that the relative standard deviation (RSD) of each item was less than 10%, and there was no cross-reactivity with antibodies to a variety of common pathogens. The batch testing of five items could be completed simultaneously within 40 minutes, and the results were well correlated with those tested by CLIA method. This method can shorten the test cycle and reduce testing cost, providing a new option for rapid, sensitive and high-throughput TORCH infection screening in the clinic.

Keywords: multiple fluorescence coding technology; encoded microspheres; TORCH infection; high-throughput detection