



报告验真

报告编号: J20245001262602668

# 科技查新报告

项目名称: 实时互动的环境病原体城市智慧检测系统

委托人: 深圳市第二人民医院 (深圳市转化医学研究院)

委托日期: 2024 年 6 月 12 日

查新机构 (盖章): 科学技术部西南信息中心查新中心  
(一级科技查新咨询单位)

查新完成日期: 2024 年 6 月 13 日

查新项目 名 称	中文：实时互动的环境病原体城市智慧检测系统				
	英文：The city-wide full-scale interactive application of sewage surveillance programme for assisting real-time pandemic control				
查新机构	名 称	科学技术部西南信息中心查新中心			
	通信地址	重庆市渝北区黄山大道中段 67 号信达国际 B 栋 10 楼（邮编：401121）			
	负 责 人	刘彦雄	电 话	023-67038724、023-63500388	
	联 系 人	任 静	电 话	023-63502719、023-63521543	
	网 址	www.chaxin.org.cn		电子邮箱	chaxin@vip.sina.com
<b>一、查新目的与范围</b> 新技术应用 国内外查新					
<b>二、查新项目的科学技术要点</b> <p>           本项目采用废水流行病学方法，旨在探究社区大流行病毒的发生情况，并建立验证新的基于探针的非流感病毒靶标 RT-PCR 检测方法。同时，采用多种 PCR 扩增方法通过靶向扩增子测序来检测和鉴定研究的不同病毒，开发污水流行病学数据及趋势预测模型。最终在废水处理设施、海关口岸等人口流动聚集地，推行度身订造的污水监察计划，搭建一个有效率和组织完善的污水处理观测系统，反映区域的多种病毒实际情况。项目旨在研发一个集污水采集、污水检测、数据与模型分析和结果显示为一体的小型化、智能化一体机，实现检测高效、快速、准确的病原体环境高精度自动化污水检测。截至目前，已经采集检测深圳市 2000 余份样本，经中泰认证结果失误差率仅有 0.21%，深圳海关认证机器检测线低至 1copies/ml，使用的预测模型能够预测出未来 14 天平均新增患者。本项目所研发的一体机将取代当下成本高、风险大的核酸等检测方式，并且使检测结果可视化。         </p>					

### 三、查新点与查新要求

采用废水流行病学方法，探究社区大流行病毒的发生情况，并建立验证基于探针的非流感病毒靶标 RT-PCR 检测方法；同时，采用多种 PCR 扩增方法通过靶向扩增子测序来检测和鉴定研究的不同病毒，开发污水流行病学数据及趋势预测模型；最后搭建一种环境病原体检测系统，反映区域的多种病毒实际情况；系统包括 DNA 全能酶的合成和提纯功能，以及优化基于全能 DNA 聚合酶核酸检测的退火程序、退火温度及温度保护剂的用量控制；实现探针法的多重 RT-PCR，开发新冠病毒核酸检测的引物、探针及反应  $Mg^{2+}$  浓度等最佳反应条件。

### 四、文献检索范围及检索策略

- |  |           |
|--|-----------|
| 1. 中文科技期刊数据库（维普资讯）   | 1989—2024 |
| 2. 中国学术期刊数据库（万方数据）   | 1998—2024 |
| 3. 中国学位论文全文数据库（万方数据）   | 1980—2024 |
| 4. 中国学术会议文献数据库（万方数据）   | 1982—2024 |
| 5. 中国科技成果数据库（万方数据）   | 1978—2024 |
| 6. 中外科技报告数据库（万方数据）   | 1958—2024 |
| 7. 中外标准数据库（万方数据）   | 1919—2024 |
| 8. 中国学术期刊（网络版）（中国知网）   | 1915—2024 |
| 9. 中国学术辑刊全文数据库（中国知网）   | 1979—2024 |
| 10. 中国博士学位论文全文数据库（中国知网）  | 1984—2024 |
| 11. 中国优秀硕士学位论文全文数据库（中国知网）  | 1984—2024 |
| 12. 中国重要会议论文全文数据库（中国知网）  | 1953—2024 |
| 13. 国际会议论文全文数据库（中国知网）  | 1981—2024 |
| 14. 中国科技项目创新成果鉴定意见数据库（中国知网）                                      | 1978—2024 |
| 15. 中国重要报纸全文数据库（中国知网）  | 2000—2024 |
| 16. 中国国家知识产权局专利检索及分析系统   | 1985—2024 |
| 17. 国家科技成果网.   |           |
| 18. SciSearch®（科学引文索引）   | 1974—2024 |
| 19. Inspec®（英国科学文摘）  | 1898—2024 |
| 20. NTIS:National Technical Information Service（美国政府报告文摘题录数据库）   | 1964—2024 |
| 21. Abstracts in New Technology & Engineering（CSA）（新技术与新工程文摘）    | 1981—2024 |
| 22. Ei Compendex®（工程索引）  | 1884—2024 |
| 23. MEDLINE®（美国医学文摘）   | 1946—2024 |
| 24. Health & Safety Science Abstracts（健康与安全科学文摘）                 | 1981—2024 |
| 25. Embase®（荷兰医学文摘）  | 1947—2024 |
| 26. Global Health（公共健康研究数据库）                                     | 1910—2024 |
| 27. ESPICOM Pharmaceutical & Medical Device News（药物和医学设备新闻）      | 2000—2024 |
| 28. 百度 <a href="https://www.baidu.com">https://www.baidu.com</a> |           |
| 29. 必应 <a href="https://cn.bing.com">https://cn.bing.com</a>     |           |

检索词：

环境、病原体、检测系统、废水流行病学、非流感病毒靶标、RT-PCR 检测、PCR 扩增、靶向扩增子测序、数据、趋势预测模型、DNA 全能酶、合成、提纯、全能 DNA 聚合酶核酸检测、退火程序、退火温度、温度保护剂、用量控制、新冠病毒核酸检测、引物、探针、反应  $Mg^{2+}$  浓度、最佳反应条件

Environment、pathogen、detection system、wastewater epidemiology、non-influenza virus target、RT-PCR detection、PCR amplification、targeted Amplifier sequencing、data、trend prediction model DNA omnipotent enzyme、synthesis、purification、omnipotent DNA polymerase nucleic acid detection、annealing procedure、annealing temperature、temperature protector、dosage control、novel coronavirus nucleic acid detection、primer、probe、reaction  $Mg^{2+}$  concentration、optimal reaction conditions

检索策略:

环境\*病原体\*检测系统\* (废水流行病学+非流感病毒靶标+RT-PCR 检测+PCR 扩增+靶向扩增子测序+数据+趋势预测模型+DNA 全能酶+合成+提纯+全能 DNA 聚合酶核酸检测+退火程序+退火温度+温度保护剂+用量控制+新冠病毒核酸检测+引物+探针+反应  $Mg^{2+}$  浓度+最佳反应条件)

Environmental \* pathogen \* detection system \* (wastewater epidemiology + non-influenza virus target + RT-PCR detection + PCR amplification + targeted Amplifier sequencing + data + trend prediction model + DNA omnipotent enzyme + synthesis + purification + omnipotent DNA polymerase nucleic acid detection + annealing program + annealing temperature + temperature protector + dosage control + novel coronavirus nucleic acid detection + primer + probe + reaction  $Mg^{2+}$  concentration + optimal reaction conditions)

## 五、检索结果

依据查新项目委托人提供的研究内容和查新要求,在上述文献检索范围内采用检索策略查阅该查新项目的文献情况,经反复筛选,列出相关文献简介如下:

[1]张崇淼,刘永军,王晓昌,等

逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术同时检测水中多种肠道病毒[J]

环境科学研究, 2007, 20(3):137-141

作者单位:西安建筑科技大学

摘要:建立了一种利用通用引物 RT-PCR 技术检测水中肠道病毒的方法.利用脊髓灰质炎病毒 1~3 型,柯萨奇病毒 B3 型作为参考病毒株,根据肠道病毒 RNA5'非编码区中具有高度同源性的序列来设计通用引物.比较了 M-MLV 酶和 AMV 酶的逆转录效果,AMV 酶能够成功地从地表水和生活污水中逆转录病毒 RNA,更适于实际应用.对比研究了 PCR 过程中的退火温度,  $c(Mg^{2+})$  等因素对 RT-PCR 检测结果的影响,选择退火温度 55 °C,  $c(Mg^{2+})$  为 2 mmol/L 的反应条件,优化了 RT-PCR 检测方法.通过检测水样中接种的连续稀释的病毒,确定了该检测方法的灵敏度为 38 CCID<sub>50</sub>.考察人工污染的地表水、污水、二级处理出水样品发现,检测灵敏度基本一致.该方法可应用在实际环境的肠道病毒检测中.

[2]刘蓬勃,庄贵华

通过废水监测新冠疫情——基于废水的流行病学方法介绍[J]

西安交通大学学报(医学版), 2023, 44(5):659-667

作者单位:西安交通大学

摘要:自 2019 年新冠肺炎在全球暴发以来,通过收集废水观察人群新冠肺炎病毒感染状况和发展趋势,被称为基于废水的流行病学方法,受到多个国家和地区的广泛关注.该方法包括 5 个步骤:废水标本收集、病毒浓缩、病毒核酸提取、定量 RT-PCR 检测、监测结果分享.该方法可用于人群新冠暴发疫情的早期预警、观察疫情的分布和发展趋势、估计人群新冠肺炎感染率、了解新冠肺炎病毒在人群中的变异规律及同时监测多种疾病的人群感染状况.废水监测可以和新冠临床监测方法同时使用,是临床新冠监测的很好补充.

[3]深圳联合医学科技有限公司

病原体靶向检测系统的构建方法、引物组、电子设备及应用

中国专利, CN202211255707.8[P].2023-04-07.

摘要:本公开描述了一种病原体靶向检测系统的构建方法,其包括:确定待检测的多种病原体;基于多种病原体构建得到病原数据库,病原数据库包括多种病原体中的每种病原体的所有株的基因组序列;对多种病原体设计得到第一候选引物组集合;将第一候选引物组集合与病原数据库进行比对,得到每个引物组的包容性,将第一候选引物组集合与 NT 库进行比对,得到每个引物组的特异性;得到目标引物组集合;基于目标引物组集合获得多种病原体的靶标区域的序列,基于靶标区域的序列设计得到人工质粒集合.根据本公开,能够提供一种能够提高引物质量、且能够对病原体进行定量的病原体靶向检测系统的构建方法.

[4]常州苏测环境检测有限公司

一种医疗废水中病原体活性检测系统

中国专利, CN202220227357.3[P].2022-07-19.

摘要:本实用新型公开了一种医疗废水中病原体活性检测系统,包括废水处理罐,所述废水处理罐内部固定有水样抽取管道固定隔板和水泵固定隔板,所述水样抽取管道固定隔板底部连通有五个水样抽取管道,所述水样抽取管道固定隔板和所述水泵固定隔板之间连接有聚合管道,所述水泵固定隔板上表面固定有水泵,所述水泵上连接有出水管道,所述出水管道底部连接有废水取样罐,所述废水取样罐上连通有取样罐出水管,所述取样罐出水管上连接有接种棒,所述接种棒上连接有接种环。废水取样罐上自带接种棒和接种环,在无菌条件下将废水取样罐中的废水样本挤出,并通过接种环将废水涂抹在固体中培养,通过观察培养基中微生物繁殖的菌落数确定医疗废水中病原体活性。

[5]潘井宇,朱欣潮,朱灿灿,等

基于 LabVIEW 的芯片 PCR 扩增荧光检测系统[J]

传感器与微系统, 2020, 39(2):65-68

作者单位:安徽师范大学

摘要:针对传统的传染病病原体检测需要依靠实验室内昂贵的仪器和专业的技术人员,无法实现现场快速检测的问题,设计了一种基于 LabVIEW 的集芯片聚合酶链式反应(PCR)扩增和荧光检测于一体的低成本便携式装置.该装置硬件由计算机、U SB 相机、微流控芯片、温控单元、荧光检测单元等组成.实验时,首先使用 LabVIEW 编写的上位机程序控制温控单元,实现微流控芯片的 PCR;然后在每个 PCR 循环中的延伸阶段利用 USB 相机采集一幅荧光图像;最后使用 IMAQ Vision 软件包对采集的荧光图像进行图像处理分析.通过对寨卡病毒的保守区核酸片段的分析,证明该系统能够满足核酸扩增荧光检测的要求,可以在现场实现核酸扩增检测,提高核酸检测的便携性.

[6]武汉肤尔医用科技有限公司

基于微流控芯片的环境病原体快速检测与预警系统及方法

中国专利, CN202010458008.8[P].2020-09-15.

摘要:本发明公开了一种基于微流控芯片的环境病原体快速检测与预警系统及方法,系统包括富集组件:用于通过结构件将空气中的病原体截留到滤膜上,再通过无核酸缓冲液溶解,形成富集液;微反应组件:用于抽吸富集液至微反应室进行 LAMP 扩增,使富集液分别与加入染料反应体系、未加入染料反应体系进行反应,形成定性结果;通信组件:用于接收反应定量检测结果和预警指令;远程服务器根据电信号计算沉淀浊度值和病毒浓度输出反应定量检测结果和预警指令;预警组件:用于发出声音和/或灯光报警信号。本发明利用高效扩增技术快速检测空气中的致病病毒,并进行定性、定量检测,输出检测结果和报警信号,实现室内空气中的病毒预警。

[7]周进宏

肠道病原体在污水处理和回用中的分布及衰变过程研究[D]



陕西:西安建筑科技大学, 2015

学位授予单位:西安建筑科技大学

摘要:水环境的病原性污染是全世界危害最严重的问题之一,研究水体的病原性污染对人类健康和环境安全保障具有重要意义。现有标准或规范中涉及的指示细菌并不足以反映水环境中病原体的真实存在情况,正确评价水质的安全性需关注病原体的污染情况。肠道病原体作为水环境中的病原体重要部分,主要来源于人畜粪便等排泄物污染的生活污水,在各种环境水体中普遍存在,且可存活较长时间,对人类健康造成很大的威胁。因此,建立肠道病原体快速、高效的检测方法,研究环境水体的肠道病原体污染迫在眉睫。随着分子生物技术的不断发展,定量 PCR 方法以快速、准确和灵敏度高等特点为病原体的检测提供了技术手段。因此,利用分子生物学手段,研究环境水体的病原体污染及病原体在污水处理过程中的迁移和衰减对病原体污染的预防和控制具有重要意义。本论文是国家自然科学基金重点项目的部分研究内容。本论文以沙门菌、志贺菌、肠道病毒、人类星状病毒、轮状病毒和诺如病毒为目标病原体,建立了肠道病原体的定量 PCR 检测方法,并评价了方法的可靠性和实用性。应用建立的肠道病原体检测方法,监测了生活污水中几种肠病毒的浓度并分析了肠病毒的污染特性。此外,本文结合某实际污水再生与循环利用系统,研究了肠道病原体在不同来源污水中的分布特性,分析了 A2/O-MBR 系统各处理单元对指示细菌、致病菌和病毒的去除特性,研究了再生水循环利用过程中病原体的二次污染问题。论文的主要工作和成果如下:(1)通过比较不同的病毒浓缩方法,确定了对生活污水、二级出水、黑水、灰水、厨房废水、A2/O 出水等水样采用 PEG 沉淀法进行病毒浓缩,并确定了各类水样的病毒回收率;对景观湖水和 MBR 出水采用 0.22 $\mu\text{m}$  滤膜的膜吸附-洗脱法和 PEG 沉淀法进行两次浓缩,并确定了病毒回收率。通过比较不同滤膜孔径对细菌的浓缩,确定了对生活污水、黑水、灰水、厨房废水等水样采用 0.45 $\mu\text{m}$  的膜吸附-洗脱法浓缩,并确定各类水样中细菌的回收率;采用 0.22 $\mu\text{m}$  的滤膜浓缩二级出水、A2/O 出水、景观湖水和 MBR 出水等水样中的细菌,并确定各水样的回收率。

(2)将巢式 PCR 的高灵敏性与定量 PCR 的精确性有效结合,建立了三种主要 HFMD 病毒(EV71、CVA16 和 CVA10)的半巢式 PCR 和实时定量 PCR 方法。该方法灵敏度高,重现性好,可对环境水体中 EV71、CVA16 和 CVA10 病毒进行准确检测。同时,还确立了沙门菌、志贺菌、人类星状病毒、诺如病毒的 SYBR Green 荧光染料实时定量 PCR 方法和肠道病毒和轮状病毒的 TaqMan 探针实时定量 PCR 方法检测方法。(3)对三个污水处理厂的进水和二级出水进行为期一年的监测,研究结果表明肠道病毒、轮状病毒和诺如病毒在进水中主要分布在 102~104copies/mL,人类星状病毒浓度略高,分布在 103~104copies/mL;二级出水中除人类星状病毒分布在 103 copies/mL,其他病毒浓度约为 102 copies/mL。生活污水中的病毒呈现明显的季节分布:肠道病毒浓度在秋季最高,三种 HFMD 病病毒的最高检出率均在春季,人类星状病毒和轮状病毒浓度在冬季最高,诺如病毒在春季和夏季的浓度较高。肠病毒在不同的季节分布规律不同:春季人类星状病毒浓度最高,夏季人类星状病毒和诺如病毒浓度较高,秋季肠道病毒浓度最高,冬季人类星状病毒和轮状病毒浓度较高。研究结果揭示了病毒的分布特性与研究地区的临床流行病学特性相似,统计学分析验证了肠病毒的浓度分布服从对数正态分布特性。(4)研究了三种不同来源污水中(黑水、灰水和厨房废水)指示细菌、致病菌和病毒的分布情况。黑水中粪大肠菌群浓度为 104 copies/mL, E.coli 浓度为 103 copies/mL,病原菌浓度约 101 copies/mL,病毒约为 103 copies/mL。不同来源污水中病原体浓度差异较大,黑水中病原体浓度比灰水和厨房废水中高约 2 个数量级。与污水处理厂混合

污水比较,发现黑水污水中病原体的主要来源,且病原体在收集和运输过程中出现了再生繁殖。

(5)研究了指示细菌(粪大肠菌群和 E.coli)、致病菌和病毒在 A2/O-MBR 处理系统的迁移衰变特性。细格栅处理对微生物的去除作用微弱,去除率仅为 0.2-log~0.4-log。传统活性污泥工艺对指示细菌、致病毒和病毒的去除效率接近,约为 1.4-log~1.7-log; A2/O-MBR 工艺对指示菌和病原体的去除效果明显,浓度和检出率大幅度降低。粪大肠菌群、E.coli、致病菌和病毒呈现不同的去除率,粪大肠菌群去除率约为 6-log 左右, E.coli 去除率 4-log 左右,致病菌和病毒去除率在 2-log~3-log 范围内。MBR 出水经氯消毒后未检出病原体, 0.7mg/L 的余氯保障了消毒后处理水的微生物安全性。(6)通过对景观湖中病原体的检测,揭示了再生水调节与景观利用过程中景观湖水受到了肠道病原体的二次污染。除粪大肠菌群未检出,景观水体中 E.coli 和病原体均可检出,且 E.coli、沙门氏菌和肠道病毒检出率较高,肠道病毒浓度略高,其他病原菌和病毒浓度相当,各微生物浓度均服从对数正态分布。猜测景观水体中的病原体可能来自于非粪便的面源污染,如气溶胶、降雨、湖底淤泥释放等,而高温和日光照射等自然环境条件对病原体有一定的净化作用。

[8]孙涛

基于基因编辑技术的病原体核酸检测体系[D]

江苏:南京邮电大学, 2022.

学位授予单位:南京邮电大学

摘要:病原体的现场即时检测对于病原的发现和及时诊断起着至关重要的作用。聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)作为目前最常使用的检测技术,具有灵敏、产率高、重复性好、易自动化等突出优点,但由于依赖大型实验室设备和专业的操作人员,极大地限制了其在现场即使检测中的应用。因此,亟需发展高灵敏度、高特异性、操作简单且便携的生物诊断方法。近年来,成簇规则间隔短回文重复序列(CRISPR)已成为一种强大的检测工具,被开发运用至多种核酸及蛋白质靶标的生物传感系统中。与 PCR 核酸检测技术不同的是,基于 CRISPR 技术的检测系统可在恒定温度下进行,适用于病原体的现场即时检测。针对现有技术存在核酸检测中检测流程长、操作复杂、结果不易读出的等问题,本研究工作提出了两种基于基因编辑的核酸可视化检测方法。主要内容如下: 1. 基于聚腺嘌呤嵌段(polyA)介导的 DNA-纳米金探针,构建了由 DNA 介导的纳米金网格结构,结合等温扩增技术和基因编辑技术,实现了非洲猪瘟病毒的快速、现场、即时可视化检测。与传统纳米金可视化检测技术相比,基于纳米金网格结构的传感策略可有效提高检测灵敏度。此外, CRISPR/Cas12a 精准识别核酸靶标,在一定程度上避免了假阳性信号的产生。经优化后,该平台对非洲猪瘟病毒核酸的检测的灵敏度达 1 copy/ $\mu$ L,在检测样本时表现出良好的准确性和特异性。整个检测流程可在一小时内完成,不需要专业的实验室操作人员和精密的实验室仪器,为现场即时快速检测提供了新工具,对病原体的早期诊断和预防控制具有重要意义。 2. 基于杂交链反应(Hybridization Chain Reaction, HCR)和基因编辑技术,提出了一种新型比色传感策略,应用于非洲猪瘟病毒核酸的快速可视化检测。在目标核酸存在下, CRISPR/Cas12a 精准识别目标核酸并形成三元复合物,对引发链进行充分的切割,阻止引发链通过 HCR 生成大量 G-四链体 DNA 纳米线。G-四链体与血红素(hemin)结合后可形成 hemin/G-四链体 DNA 酶。在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的作用下, hemin/G-四链体 DNA 酶能够催化 ABTS (2, 2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐),生成肉眼可观察的绿色产物。相较于现有可视化传感策略,本方法通过级联反应放大比色



信号,有效实现了对目标核酸的现场即时可视化检测。此外,本方法灵敏度高、选择性好,对非洲猪瘟病毒核酸的检测限达到了 1copy/ $\mu$ L,检测流程可在一小时内完成。相比于传统的 PCR 介导的诊断策略,本方法操作简单、成本低廉,为现场即时检测提供了新的思路,具有潜在的应用价值。

[9]申业壮,刘冉,尹晓尧,等

基于多重 PCR 的呼吸道病毒纳米孔测序快速检测的方法学研究[J]

军事医学,2023,47(11):823-828

作者单位:国家生物医学分析中心

摘要:目的 通过对多重 PCR 扩增条件的优化和纳米孔测序中病原微生物检测特异性及灵敏度的评价,建立一种由多重 PCR 和纳米孔测序技术相结合的检测技术体系,满足对呼吸道病毒现场快速检测鉴定的需求.方法 首先针对呼吸道病毒设计特异性引物,其次优化 PCR 扩增条件,建立快速测序体系,最后对不同浓度的病原体进行扩增与测序鉴定,评价检测体系的灵敏度.结果 优化后的多重 PCR 检测体系在退火温度为 55℃、引物添加浓度为 0.1  $\mu$ mol/L 时,可同时检出 25 种呼吸道病毒,检测灵敏度可达  $1\times 10^4$  拷贝/ml,整体检测时间在 4h 以内.结论 该方法简单快捷,能够实时获取扩增片段的序列信息,特异性强,灵敏度较高,有望为呼吸道病原体的快速筛选和现场检测鉴定提供有力技术支撑.

[10]江灵礼

两种传染病病原体复合探针荧光 PCR 检测方法的建立[D]

河南中医药大学,2016.

学位授予单位:河南中医药大学

摘要:目的:感染性疾病是人类进入 21 世纪以来,对人类健康安全危害极大的疾患。它具有传播速度快、感染性强、危害大的特点。经呼吸道传播和蚊虫叮咬传播是两种主要的传播途径。如曾引起世界范围内关注的传染性非典型肺炎(SARS)、人禽流感、甲型 H1N1 流感以及黄热病等。因此,对传染性致病病毒进行快速准确的诊断是保障公众健康和防控疫情的关键之一。然而,现在大部分临床卫生医疗机构使用的传统微生物检验法涉及培养、分离等步骤,操作繁琐、检测周期长。本研究的目的是建立一种检测经呼吸道传播和蚊虫叮咬传播两种病毒的快速、特异的诊断方法(PCR 荧光探针法)。避免一般 PCR 易出现假阳性、交叉污染等问题,从而能对两种病毒进行快速又准确的检测,进而更好地指导临床治疗。方法:首先,阅读有关人类副流感病毒和寨卡病毒的相关文献,确定本研究要检测的特异基因,以此为依据设计引物和复合探针,然后以临床样本为模板制备质粒参考品。其次,通过优化 PCR 反应体系和反应条件来确定引物探针的最佳浓度和比例。最后,评价该检测方法的灵敏性、重复性和特异性;选择样本核酸提取效率最高的试剂;模板的最佳用量;不同 PCR 仪器对检测结果的影响以及临床样本的检测。结果:查阅文献后确定人类副流感病毒的特异基因为 HN 基因。确定了 PCR 反应的最佳反应体系和反应条件,其中 HPIV1 和 HPIV3 的上、下游引物在体系中的终浓度为 0.4 $\mu$ mol/L,探针在体系中的终浓度为 0.2 $\mu$ mol/L; HPIV2 和内标的上、下游引物在体系中的终浓度为 0.15 $\mu$ mol/L,探针的终浓度为 0.06 $\mu$ mol/L;其 HPIV1、HPIV2 和 HPIV3 探针的荧光探针与淬灭探针的比例为 F:Q=1:2。退

火温度为 58℃, 退火时间为 30s。最终该试剂盒的各项性能指标显示该试剂盒最低可检出不低于  $5 \times 10^2$  copies/ $\mu$ l 浓度的样本, 重复检测 10 次结果表明其 CV 值小于 5%, 对 10 个种属相近的病原体检测并没有扩增, 说明该试剂盒特异性良好。且两种样本核酸提取试剂效果相当, 样本用量选取为 3 $\mu$ l。三种不同机型检测结果表明不同机型对实验结果影响不大。临床样本检测结果符合率为 100%。确定寨卡病毒的特异基因为 NS5 基因。引物探针性能评价结果表明其符合引物探针设计原则。检测灵敏度可达到  $5 \times 10^2$  copies/ $\mu$ l, 重复检测 10 次结果表明其 CV 值小于 10%。建立的检测方法与其他种属无交叉。说明本试剂盒具有良好的灵敏性、精密性和特异性。结论: 本研究成功建立了一种可同时检测人类副流感病毒 3 个亚型和寨卡病毒的诊断方法 (PCR 荧光探针法)。该方法灵敏度高、重复性好、特异性良好。为人类副流感病毒和寨卡病毒提供了一种特异、安全、快速、准确的检测方法, 可以用于疾病的早期诊断, 以指导及时、准确地采取防护和治疗措施。

[11]王明星

水中病原体 FCM-qPCR 检测方法的建立及其应用研究[D]

陕西:西安建筑科技大学, 2016

学位授予单位:西安建筑科技大学

摘要:饮用水污染是导致肠道疾病的主要原因, 肠道疾病的发生主要是由水中的病原体所导致。在水样传统检测方法中, 以粪源菌检测为主, 而忽视其他原虫、病毒类病原体的检测。这种单纯检测某一种属病原体的方式, 使得病原体检测范围很有限, 且检测结果不具有代表性。为克服之前检测方法中存在的不足, 选择腺病毒、军团菌、大肠杆菌、贾第虫和隐孢子虫等典型病原体作为研究对象, 即分别以病毒、细菌和原虫三类病原体作为研究对象, 使得检测范围相对更加广泛、更加具有代表性。以流式细胞术和定量 PCR 技术作为基本检测技术, 提出了针对细菌、病毒和原虫三类病原体中几种典型病原体检测的方法, 以更好的评价水中的病原体污染水平。然后, 将建立的 FCM-qPCR 检测方法应用到六座污水处理厂进出水和受纳河道中水样的检测中。通过研究得到以下结论: (1) 通过优化预处理手段和调节稀释比, 确定水样不过滤和相对较高的稀释比时, 有助于细菌和病毒的计数; 在 25℃和 80℃条件下进行染色对比, 确定 80℃染色不利于细菌计数。在所得结论的基础上, 建立 FCM 检测水中细菌和病毒的方法。(2) 通过对退火温度做温度梯度, 优化大肠杆菌、细菌、军团菌、腺病毒、贾第虫和隐孢子虫基因片段的 PCR 扩增条件, 确定几种基因片段的最优退火温度分别为 58℃、61℃、60℃、55℃、58℃和 63℃。根据优化结果, 建立定量 PCR 检测水中几种典型病原体的检测方法。(3) FCM-qPCR 检测方法对水中病原体的检测具有较高的特异性、较高的准确性以及较低的检测限。(4) 将建立的 FCM-qPCR 检测方法应用到污水处理厂的进、出水以及对应的受纳河道上和下游水样的病原体检测中。分析发现: 不同水样之间, 同种病原体浓度水平有较大的差异; 相同水样, 不同病原体之间存在较大的浓度差异; 不同污水处理厂进水和不同污水处理厂受纳河流水样, 其细菌浓度和病毒浓度变化范围均相对较小。

[12]美国控股实验室公司

检测病原体的方法和系统

中国专利, CN202180040014.4[P].2023-03-14.

摘要:本发明公开了检测样品中病原体是否存在的方法、组合物和系统。该方法可包括从受试

者获得样品和用热处理样品以灭活样品中存在的任何病原体的步骤。该方法还可包括处理样品以浓缩样品中存在的任何病原体的步骤。同样，该方法可包括从热灭活的样品中分离病原体特异性核酸和检测分离的病原体特异性核酸是否存在。在某些实施方案中，方法和/或系统可用于检测 SARS-CoV-2。该方法可利用实时 RT-PCR 在约 3 小时或更短的时间内提供结果。

[13]深圳市博德致远生物技术有限公司

一种实时荧光定量 PCR 的荧光通道检测系统

中国专利，CN202210925005.X[P].2022-09-06.

摘要:本发明涉及检测系统的技术领域，公开了一种实时荧光定量 PCR 的荧光通道检测系统，包括：温控模组、反应池模组、通路模组、荧光检测模组、传动模组；本发明的通路模组中的通路光纤的一端与待检测样品光路连通，另一端分别与发射光纤和采集光纤连接设置，即荧光检测模组通过发射光纤和通路光纤向待检测样品发射激发光，激发光令目标病原体产生荧光，荧光将通过通路光纤和采集光纤进入荧光采集模组，从而实现对待检测样品中目标病原体的检测，发射光纤和采集光纤均与通路光纤连接设置，节省了放置光纤的空间，能够设置更多的光纤，能够同时与更多的待检测样品实现光路连通，即同时对更多的待检测样品进行检测，解决了现有技术中检测效率低的问题。

[14]加州大学评议会

检测和分析病原体的方法和设备

中国专利，CN200380110066.6[P].2006-06-21.

摘要:本发明提供了用于实现微流控分析装置的方法和设备。与集成的充气集管相伴随的整体弹性膜件可以设置有和驱动多种流控结构的密集阵列，例如用于隔离、选路、混合、分流和存储流体量的结构。该流控结构可用于实施病原体的监测和分析系统，包括集成式免疫亲和性捕获和分析，例如聚合酶链式反应(PCR)和毛细管电泳(CE)分析。将分析物溶液引入并且泵压通过微细加工腔室中的一系列免疫亲和性捕获基质，其中具有靶向各类微生物有机体的抗体，例如细菌、病毒和细菌芽孢的抗体。该免疫亲和性腔室能够捕获、纯化和富集目标物以便进行进一步的分析步骤。

[15]施碧胜，张小楠，顾士民，等

随机聚合酶链反应检测未知病毒方法学的建立[J]

微生物与感染，2008，3(3):134-137，146

作者单位:复旦大学

摘要:目的 探索并建立一种用于快速检测未知病毒的分子生物学方法.方法 分别以乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)为假定的未知 DNA、RNA 病毒，验证随机聚合酶链反应(PCR)检测未知病毒的可行性.分离 HBV、HCV 的阳性血清，去除宿主 DNA 后，提取病毒核酸.锚定随机引物经 Klenow 酶处理(模板为 DNA)或反转录酶作用(模板为 RNA)退火至模板，随后用锚定特异引物对模板进行非特异性扩增.扩增产物经纯化后克隆、测序，最后与 BLAST 进行比对.结果 经 BLAST 比对证实，插入序列中有 HBV 和 HCV 的基因组片段，在病毒为  $1 \times 10^6$  拷贝/ml 时，被检

测克隆的阳性率约为 15%.目前我们利用本法能达到的检测低限大致为  $1 \times 10^4$  拷贝/ml.结论 成功建立了一种基于随机 PCR 的未知病毒检测方法,其优点在于不依赖病毒的细胞培养及其核酸序列信息.这种方法的建立为快速检测不明原因疾病和新发传染病病原体提供了新的思路.

[16]Huan Yang,Xiaoming Zhang,Yating Li,Jing Deng,Zhongming Liu,Qiyue Chen,Haiyan Zhang  
Design and application of a point-of-care testing system for triple detection of SARS-CoV-2 ,  
influenza A, and influenza B[J]

Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2024, 12

Abstract:To mitigate the continued impact of SARS-CoV-2, influenza A, and influenza B viruses on human health , a smartphone-based point-of-care testing (POCT) system was designed to detect respiratory pathogens through a nucleic acid test. This compact , light-weight , highly automated , and universal system enables the differential diagnosis of SARS-CoV-2 , influenza A , and influenza B in approximately 30 min in a single-tube reaction. Numerous hospitals and disease control and prevention center assessed the triple POCT system's detection threshold, sensitivity, specificity, and stability, and have concluded that all the assessments were comparable to those of fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR)-based testing. The triple POCT system is suitable as an onsite rapid-diagnosis device, as well as for pathogen screening at airports and customs.

[17]Wu Yanqi, Bai Liping, Ye Chengfu, Yuhong Guan, Kunming Yan, Chen Hui, Jiang Zhihong  
Novel miniaturized fluorescence loop-mediated isothermal amplification detection system for rapid  
on-site virus detection[J]

Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10

Abstract:New pathogen outbreaks have progressed rapidly and are highly infectious in recent years, increasing the urgency of rapid and accurate detection of pathogenic microorganisms. Based on the point-of-care testing (POCT) requirements, in this study, a real-time fluorescent loop-mediated isothermal amplification (LAMP) detection system was developed and applied to pathogen detection. The system is compact and portable, with good uniformity and reproducibility, and it can detect pathogens rapidly and effectively. For norovirus detection, the linear range was  $10^0$ – $10^6$  copies/ $\mu$ L. The system can achieve the theoretical sensitivity of LAMP detection, conclusions could be obtained within 35 min, and quantitative detection was possible. The test results of 45 clinical samples were consistent with quantitative PCR (qPCR) and clinical results , and the accuracy could reach 100%. This system has the characteristics of portability , speed , and POCT accuracy , and the cost is much lower than that of commercial qPCR. Therefore, it is suitable for remote areas or places with relatively poor conditions and environments requiring on-site conditions. It can also be widely used to detect various epidemics and unexpected diseases.

[18]Liu Li, Duan JinJing, Wei XingYi, Hu Huan, Wang YuanBo, Jia PanPan, Pei DeSheng  
Generation and application of a novel high-throughput detection based on RPA-CRISPR technique

to sensitively monitor pathogenic microorganisms in the environment.[J]

The Science of the total environment, 2022, 838(P2):

Abstract: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is an important opportunistic human and animal pathogen that can cause a wide diversity of infections. Due to its environmental health risks, it is crucial to establish a time-saving, high-throughput, and highly sensitive technique for water quality surveillance. In this study, we developed a novel method to detect *S. aureus* in the water environment based on recombinase polymerase amplification (RPA) and CRISPR/Cas12a. This method utilizes isothermal amplification of nucleic acids and the trans-cleavage activity of the CRISPR/Cas12a system to generate fluorescence signals with a single-stranded DNA-fluorophore-quencher (ssDNA-FQ) reporter and a naked-eye detected lateral flow assay (LFA). Our RPA-CRISPR/Cas12a detection system can reduce the detection time to 35 min and enhance the high-throughput detection threshold to  $\geq 5$  copies of pathogen DNA, which is more sensitive than that of reported. Moreover, in the lower reaches of the Jialing River in Chongqing, China, 10 water samples from the mainstream and 7 ones from tributaries were successfully monitored *S. aureus* for less than 35 min using RPA-CRISPR/Cas12a detection system. Taken together, a novel high-throughput RPA-CRISPR detection was established and firstly applied for sensitively monitoring *S. aureus* in the natural water environment.

[19]Tzong-Yuan Wu, Yi-Yu Su, Wei-Hsien Shu, Augustus T. Mercado, Shi-Kwun Wang, Ling-Yi Hsu, Yow-Fu Tsai, Chung-Yung Chen

A novel sensitive pathogen detection system based on Microbead Quantum Dot System[J]

Biosensors and Bioelectronics, 2016, 78

Abstract: A fast and accurate detection system for pathogens can provide immediate measurements for the identification of infectious agents. Therefore, the Microbead Quantum-dots Detection System (MQDS) was developed to identify and measure target DNAs of pathogenic microorganisms and eliminated the need of PCR amplifications. This nanomaterial-based technique can detect different microorganisms by flow cytometry measurements. In MQDS, pathogen specific DNA probes were designed to form a hairpin structure and conjugated on microbeads. In the presence of the complementary target DNA sequence, the probes will compete for binding with the reporter probes but will not interfere with the binding between the probe and internal control DNA. To monitor the binding process by flow cytometry, both the reporter probes and internal control probes were conjugated with Quantum dots that fluoresce at different emission wavelengths using the click reaction. When MQDS was used to detect the pathogens in environmental samples, a high correlation coefficient ( $R = 0.994$ ) for *Legionella* spp., with a detection limit of 0.1 cfu/sp = "0.25"/ng of the extracted DNAs and 10 cfu/sp = "0.25"/CFU/test, can be achieved. Thus, this newly developed technique can also be applied to detect other pathogens, particularly viruses and other genetic diseases.

[20]Regan John F, Makarewicz Anthony J, Hindson Benjamin J, Metz Thomas R, Gutierrez Dora M, Corzett Todd H, Hadley Dean R, Mahnke Ryan C, Henderer Bruce D, Breneman John W, Weisgraber



Todd H, Dzenitis John M

Environmental monitoring for biological threat agents using the autonomous pathogen detection system with multiplexed polymerase chain reaction.[J]

Analytical chemistry, 2008, 80(19):

Abstract: We have developed and field-tested a now operational civilian biodefense capability that continuously monitors the air in high-risk locations for biological threat agents. This stand-alone instrument, called the Autonomous Pathogen Detection System (APDS), collects and selectively concentrates particles from the air into liquid samples and analyzes the samples using multiplexed PCR amplification coupled with microsphere array detection. During laboratory testing, we evaluated the APDS instrument's response to *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis* by spiking the liquid sample stream with viable spores and cells, bead-beaten lysates, and purified DNA extracts. APDS results were also compared to a manual real-time PCR method. Field data acquired during 74 days of continuous operation at a mass-transit subway station are presented to demonstrate the specificity and reliability of the APDS. The U.S. Department of Homeland Security recently selected the APDS reported herein as the first autonomous detector component of their BioWatch antiterrorism program. This sophisticated field-deployed surveillance capability now generates actionable data in one-tenth the time of manual filter collection and analysis.

## 六、查新结论

### 1.文献对比分析

在所检索文献范围内，涉及委托项目的相关文献有：

西安建筑科技大学的张崇淼报道了逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术同时检测水中多种肠道病毒（见文献[1]）。西安交通大学的刘蓬勃报道了通过废水监测新冠疫情——基于废水的流行病学方法介绍（见文献[2]）。深圳联合医学科技有限公司公开了病原体靶向检测系统的构建方法、引物组、电子设备及应用（见文献[3]）。常州苏测环境检测有限公司公开了一种医疗废水中病原体活性检测系统（见文献[4]）。安徽师范大学的潘井宇报道了基于 LabVIEW 的芯片 PCR 扩增荧光检测系统（见文献[5]）。武汉肤尔医用科技有限公司公开了基于微流控芯片的环境病原体快速检测与预警系统及方法（见文献[6]）。西安建筑科技大学的周进宏报道了肠道病原体在污水处理和回用中的分布及衰变过程研究（见文献[7]）。南京邮电大学的孙涛报道了基于基因编辑技术的病原体核酸检测体系（见文献[8]）。国家生物医学分析中心的申业壮报道了基于多重 PCR 的呼吸道病毒纳米孔测序快速检测的方法学研究（见文献[9]）。河南中医药大学的江灵礼报道了两种传染病病原体复合探针荧光 PCR 检测方法的建立（见文献[10]）。西安建筑科技大学的王明星报道了水中病原体 FCM-qPCR 检测方法的建立及其应用研究（见文献[11]）。美国控股实验室公司公开了检测病原体的方法和系统（见文献[12]）。深圳市博德致远生物技术有限公司公开了一种实时荧光定量 PCR 的荧光通道检测系统（见文献[13]）。加州大学评议会公开了检测和分析病原体的方法和设备（见文献[14]）。复旦大学的施碧胜报道了随机聚合酶链反应检测未知病毒方法学的建立（见文献[15]）。Huan Yang 报道了 SARS-CoV-2、甲型流感、乙型流感三联检测系统的设计与应用（见文献[16]）。Wu Yanqi 报道了用于现场病毒快速检测的新型小型化荧光环路等温扩增检测系统（见文献[17]）。Liu Li 报道了一种基于 RPA-CRISPR 技术的新型高通量检测技术的建立和应用，以灵敏地监测环境中的病原微生物（见文献[18]）。Tzong-Yuan Wu 报道了一种新型的基于微珠量子点系统的敏感病原体检测系统（见文献[19]）。Regan John F 报道了利用多重聚合酶链式反应自主病原体检测系统对生物威胁物质进行环境监测（见文献[20]）。

### 2.结论

综合分析检索到的相关文献，并与委托项目的查新点进行对比分析，可以得出如下结论：

检出文献中，见有病原体检测系统设计的报道；但本项目所述实时互动的环境病原体城市智慧检测系统：采用废水流行病学方法，探究社区大流行病毒的发生情况，并建立验证基于探针的非流感病毒靶标 RT-PCR 检测方法；同时，采用多种 PCR 扩增方法通过靶向扩增子测序来检测和鉴定研究的不同病毒，开发污水流行病学数据及趋势预测模型；最后搭建一种环境病原体检测系统，反映区域的多种病毒实际情况。系统包括 DNA 全能酶的合成和提纯功能，以及优化基于全能

DNA 聚合酶核酸检测的退火程序、退火温度及温度保护剂的用量控制 实现探针法的多重 RT-PCR, 开发新冠病毒核酸检测的引物、探针及反应  $Mg^{2+}$  浓度等最佳反应条件。在所检文献以及时限范围内, 国内外未见相同文献报道。

查新员 (签字):

查新员职称: 高级工程师

审核员 (签字):

审核员职称: 高级工程师

(科技查新专用章)

2024 年 6 月 13 日

## 七、查新员、审核员声明

- (1) 报告中陈述的事实是真实和准确的。
- (2) 我们按照科技查新规范进行查新、文献分析和审核，并作出上述查新结论。
- (3) 我们获取的报酬与本报告中的分析、意见和结论无关，也与本报告的使用无关。

查新员（签字）：

审核员（签字）：

2024 年 6 月 13 日

2024 年 6 月 13 日

## 八、附件清单

无

## 九、备注

1. 科学技术部西南信息中心查新中心是一级科技查新咨询单位。
2. 本查新报告无“报告专用章”和骑缝章无效。
3. 本查新报告涂改、部分复印无效。
4. 本查新报告检索结论仅供参考。