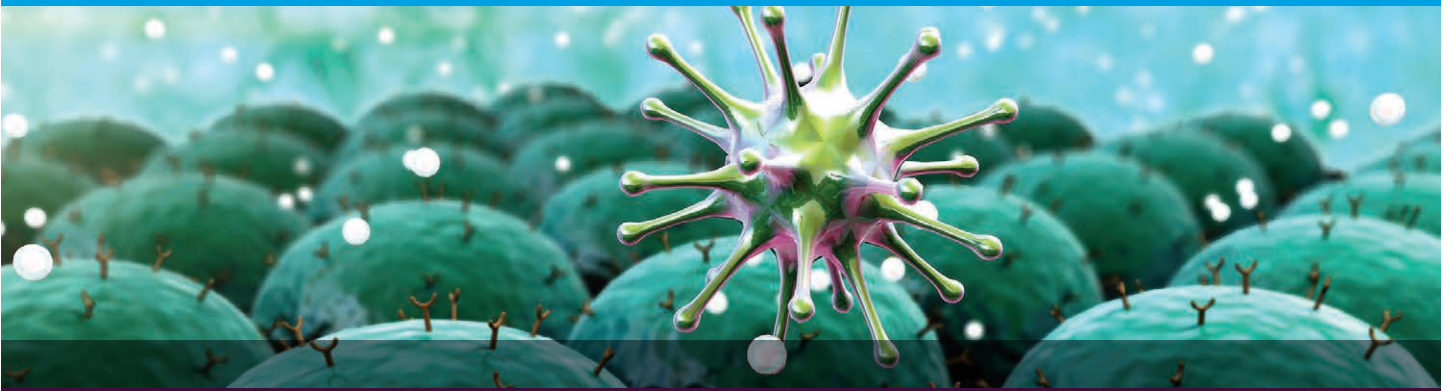


传染病应用

Agilent xCELLigence RTCA 手册



目录

概述	3
传染性疾病的实时检测	3
xCELLigence RTCA 仪器	4
细胞阻抗	5
E-Plate	5
实时阻抗曲线说明	6
xCELLigence RTCA 的广泛应用	6
细菌：分泌毒素的检测和定量	7
参考文献 — RTCA 在细菌毒素研究中的应用（未详尽列出）	10
参考文献 — 常规	10
细菌：宿主细胞相互作用	11
参考文献 — 常规	14
参考文献 — RTCA 在细菌-宿主相互作用研究中的应用（未详尽列出）	14
细菌：生物被膜	14
参考文献 — RTCA 在生物被膜研究中的应用	17
病毒：滴度测定	17
参考文献 — RTCA 在病毒滴度测定中的应用	20
病毒：中和抗体	20
参考文献 — RTCA 在中和抗体研究中的应用	22
病毒：药物筛选	23
参考文献 — RTCA 在抗病毒药物筛选中的应用	25
寄生虫	25
参考文献 — RTCA 在寄生虫研究中的应用	28

概述

传染性疾病的实时检测


宿主-病原体相互作用的体外监测在临床研究和机制研究中的应用已有很长的历史。在这两种背景下，宿主-病原体相互作用可在细胞或分子水平进行分析。细胞水平上，病原体诱导的宿主细胞变化可通过不同类型的显微镜或比色分析进行监测。这方面的一个典型示例是病毒诱导的细胞病变效应，其中感染的宿主细胞表现出变圆/肿胀、与底物脱落、裂解及其他明确特征。另一个示例是，显微镜下可见包涵体形成（如衣原体细菌在成纤维细胞胞内感染过程中出现的包涵体）。或者，可通过 MTT 等试剂的比色分析对存活/死亡状态的病原体感染细胞进行评估。

分子水平上，可通过监测宿主 DNA 或 mRNA 合成的抑制、宿主蛋白重定向到不同的细胞内结构、染色质结构的修饰或磷酸化模式的改变等多种现象来研究宿主-病原体的相互作用。用于这些分子分析的技术繁多，包括 qPCR、流式细胞术、DNA 测序、蛋白质印迹等。

在临床或研究实验室中用于鉴定、定量和追踪传染病的绝大多数传统的细胞和分子分析法的一个主要缺点是，它们为终点检测，而这类分析仅可提供感染过程中某个瞬时的信息。因此，进行动力学信息推导时难度极大，因为通常需要使用有限数量的数据点进行外推或内推。此外，多数的传统分析法还需要进行标记，该过程会降低分析的生理相关性，且存在通量低和耗费人力的弊端。这意味着需要多个可能带来变异性的样品处理步骤。因此，无标记分析兼顾信息丰富的实时动力学与简单的工作流程、高重现性和高通量能力，可显著改善传染病的体外研究。本手册介绍 xCELLigence 实时细胞分析 (RTCA) 系统如何在活细胞分析的背景下展现上述优势。手册中将通过多种细菌、病毒和寄生虫应用的示例数据重点介绍 RTCA 在传染病研究应用中的出色表现。

xCELLigence RTCA 仪器

安捷伦科技公司生产的九款不同的 xCELLigence RTCA 系统均使用无损伤生物传感器监测细胞阻抗（详情见下一节），以无标记和实时的方式监测细胞增殖、形态变化、细胞间粘附（即屏障功能）和细胞-基质粘附强度。最适合传染病研究的四款 xCELLigence 仪器如下表所示。不同仪器的孔板规格/通量存在差异，某些仪器具有专用功能，如监测细胞侵袭/迁移的能力。



	双重用途 (DP)	单板位 (SP)	多板位 (MP)	高通量 (HT)	eSight
规格	3 × 16 孔	1 × 96 孔	6 × 96 孔	1 × 384 孔	3 × 96 孔用于阻抗监测， 5 × 96 孔用于成像
最大通量	48 孔	96 孔	576 孔	最多 4 × 384 孔 (总计 1536 孔)	288 孔用于阻抗监测， 最多 480 孔用于成像

xCELLigence RTCA 仪器通常置于标准 CO₂ 细胞培养箱或低氧室内，并由位于培养箱外的计算机控制（图 1）。直观的软件可与仪器实时连接，包括数据显示和分析功能。



图 1. Agilent xCELLigence 仪器示意图。仪器置于标准培养箱中，与各种生物学相关温度、大气成分和湿度兼容。仪器由培养箱外放置的笔记本电脑控制

细胞阻抗

xCELLigence 阻抗分析的功能单元是一组嵌入微孔板底面的微金电极生物传感器 (图 2)。当浸入导电溶液 (如缓冲液或标准培养基) 中时, 在这些生物传感器上施加弱电压会使电流在它们之间流动。由于这种现象依赖于生物传感器与整体溶液的相互作用, 因此在生物传感器-溶液界面处贴壁细胞的存在会阻碍电流流动。阻抗的大小取决于细胞数量、细胞大小、细胞间粘附 (屏障功能) 和细胞-基质粘附强度。微金电极生物传感器表面和施加的电流对细胞健康状况或行为均无影响。

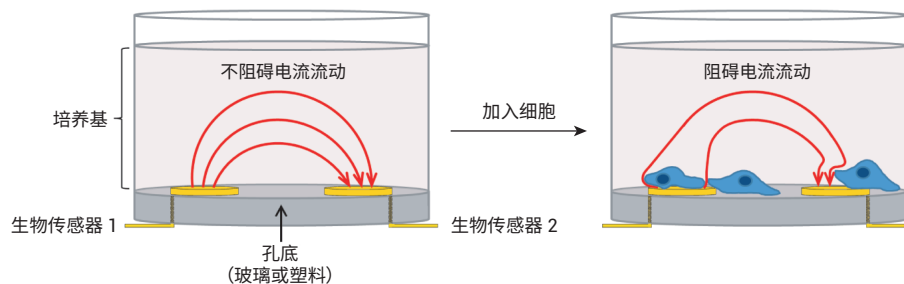


图 2. 细胞阻抗分析原理概览。加入细胞前后单孔的侧视图。生物传感器和细胞均未按比例绘制 (为了清楚起见, 对它们进行了放大处理)。不存在细胞的情况下, 电流自由流过培养基, 在生物传感器之间形成完整的电路。由于细胞在生物传感器上粘附并增殖, 电流的流动受到阻碍, 从而提供了多个参数的高灵敏度读数

E-Plate

安捷伦电子微孔板 (E-Plate) 每个孔中的微金电极生物传感器覆盖了约 75% 的底面积。图 2 给出了生物传感器的简化图示。图 3 中更详细的图示显示圆形生物传感器连接成链, 形成交错阵列。这一专利设计可同时监测大量细胞群, 并对细胞数量、大小和粘附强度的变化提供极佳的灵敏度。

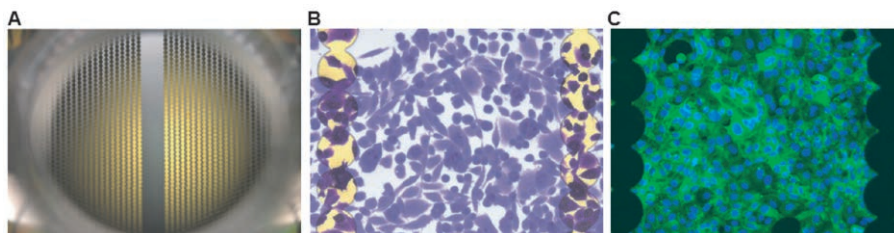


图 3. Agilent E-Plate 中的阻抗生物传感器。(A) E-Plate 中单个孔的照片。虽然在微金电极表面也可以看到细胞, 但孔中间无电极分布的区域更有利于显微镜成像。(B) 在光学显微镜下观察的微金电极生物传感器和结晶紫染色的人体细胞。(C) 微金电极生物传感器和细胞的免疫荧光显微照片

实时阻抗曲线说明

使用细胞指数 (Cell Index, CI) 这一无单位参数来表示贴壁细胞引起的电流阻抗，其中：

$$CI = \frac{(\text{时间点 } n \text{ 时的阻抗}) - (\text{无细胞的阻抗})}{(\text{阻抗常数})}$$

图 4 提供了细胞凋亡实验过程中实时阻抗曲线的通用示例。将细胞加入孔后的最初几个小时，细胞粘附和伸展使阻抗迅速增加。如细胞在初始粘附阶段后半融合，它们将开始增殖，继而引起 CI 逐渐而稳定的增加。当细胞达到汇合时，CI 值趋于平稳，表明细胞与电极的接触面积不再变化。此时加入细胞凋亡诱导剂 (如细菌毒素)，可使 CI 降至零。这是细胞变圆后从孔底脱落的结果。虽然该示例需在细胞汇合点加入凋亡诱导剂，但基于阻抗的分析极其灵活，可在整个细胞密度谱中反映出各种现象。

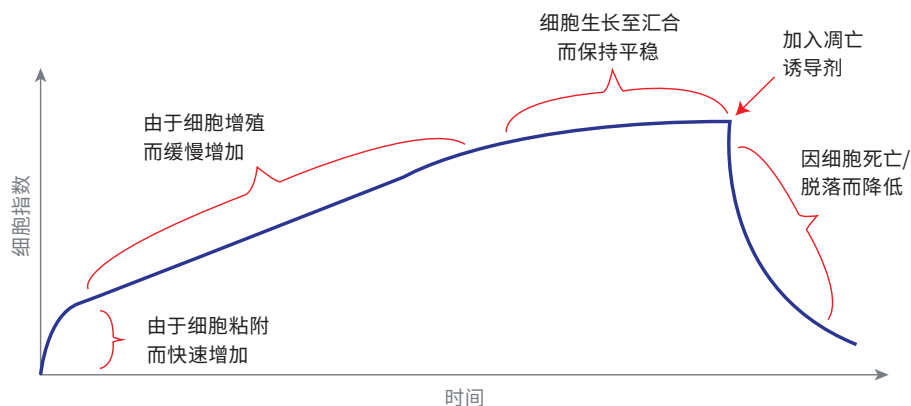


图 4. 用于细胞凋亡分析的通用实时阻抗曲线。阻抗曲线的各个阶段及其所引起的细胞行为都通过文字进行了说明

xCELLigence RTCA 的 广泛应用

科研院所、生物公司和相关研究机构的实验室中目前已安装了 2000 多台 xCELLigence 仪器。同行评审期刊中已发表了超过 1400 篇 xCELLigence 出版物 (图 5)。这些文献中，相当比例的文献重点探讨了其在传染病中的应用，这一比例还在不断增加。

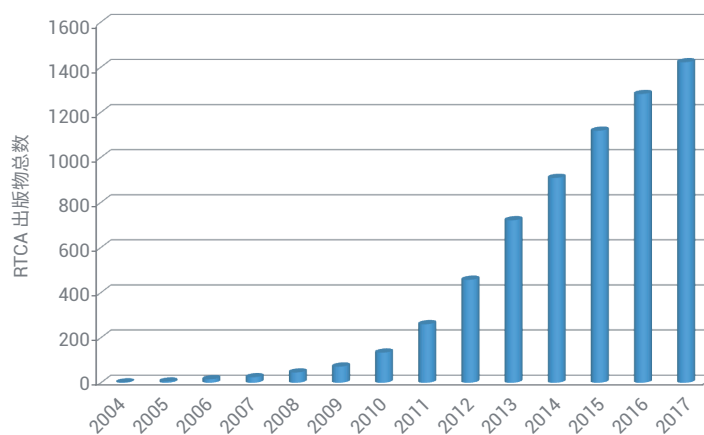


图 5. xCELLigence RTCA 出版物总数

细菌：分泌毒素的检测和定量

RTCA 擅长监测宿主细胞与细菌毒素相互作用时诱导的细胞数量、形态和粘附强度的动态变化。RTCA 已广泛用于监测霍乱弧菌毒素^[1]、肉毒杆菌毒素^[2] 和艰难梭菌毒素^[3,4] 的动态变化，如下所述。

艰难梭菌是公认的重大医院和社区获得性病原体，可导致住院或接受抗生素治疗后发生感染性腹泻。由于艰难梭菌蛋白毒素 A 和 B 是毒力的关键决定因素，因此确诊艰难梭菌感染 (CDI) 需要检测这些蛋白或编码蛋白质的基因。

过去，艰难梭菌诊断的金标准是细胞毒性分析，该分析将粪便样本在体外孵育，然后通过监测样本对所培养人细胞的影响来检测是否存在蛋白质毒素^[5]。尽管这种细胞毒性分析可提供大量信息，但由于其费力、主观和耗时，因此未在临床研究中被广泛应用。由食品药品监督管理局批准的几种酶免疫分析方法 (EIAs) 和基于 PCR 的毒素基因检测分析法作为替代方法，常用于临床实验室^[6]。但这些分析方法存在以下弊端：EIAs 灵敏度低，另外 PCR 毒素基因检测与发病的相关性是一个极富争议的问题。此外，灵敏度高的 PCR 分析方法可能导致 CDI 过度诊断和不必要的治疗，因为它们无法区分真正的艰难梭菌感染和单纯的艰难梭菌定植^[7]。综上所述，CDI 诊断显然仍存争议。采用简单工作流程的快速、客观分析极有必要。

多个工作组报告了使用 RTCA 定量检测艰难梭菌毒素^[4-6]。在其中一项研究中，将 Hs27 成纤维细胞暴露于不同浓度的纯化艰难梭菌毒素 B4。如图 6A 所示，在细胞生长至汇合点后（表现为阻抗信号趋于平稳），加入纯化毒素，并通过 CI 的时间和剂量依赖性降低（与毒素诱导的细胞死亡和脱落相关）监测毒素的作用。此分析在低至 0.05 ng/mL 的浓度下仍能轻松检出艰难梭菌毒素 B，且与其他肠毒素、非产毒素艰难梭菌或其他梭菌种属无交叉反应（数据未显示）。为建立可用于测定临床研究样本中艰难梭菌毒素 B 浓度的标准曲线，将归一化 CI 降至其初始值（毒素加入前的瞬时值）50% 所需的时间作为毒素浓度的函数绘图，生成图 6B 所示的曲线。

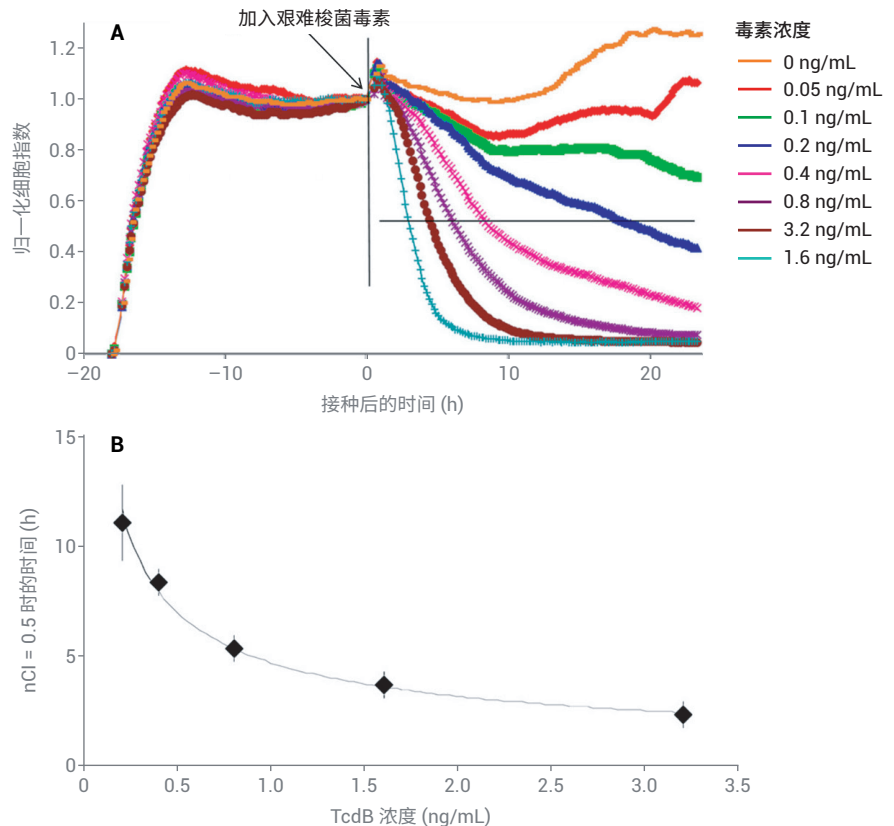


图 6. 使用 Agilent xCELLigence RTCA 仪器定量检测艰难梭菌毒素 B。(A) 在 Agilent E-Plate 孔中培养 Hs27 细胞（5000 个细胞/孔），并在加入不同浓度的纯化艰难梭菌毒素 B 前实时监测细胞粘附和伸展 17.5 小时。随后在接下来约 24 小时内连续监测细胞毒性作用。黑色垂直线表示毒素加入时间 ($t = 0$)。图中中间的粗水平线表示 CI 相对起始值（即加入毒素前的瞬间）降低 50%。这称为归一化 CI 50% 值，或 $nCI = 0.5$ 。与预期一致，达到 $nCI = 0.5$ 所需的时间取决于毒素的浓度。(B) 将 $nCI = 0.5$ 作为毒素浓度的函数绘图，创建标准曲线，可用于测定临床研究样本中毒素的浓度

图片摘自 *Journal of Clinical Microbiology*, volume 48, Ryder, A. B. et al. "Clostridium difficile Infections by Quantitative Detection of tcdB Toxin by Use of a Real-Time Cell Analysis System," pages 4129–4134. 版权所有 2010，经美国微生物学会授权。

使用 300 份疑似艰难梭菌感染的粪便标本对 RTCA 艰难梭菌毒素分析方法进行了验证。根据是否引起归一化 CI 的时间依赖性下降（可通过加入毒素特异性中和抗体进行中和），将样本评分为艰难梭菌毒素阳性或阴性（图 7）。这种基于 RTCA 的评分方法与使用免疫组织化学/显微镜检查的标准细胞毒性检测显示出高度的相关性（图 7）。

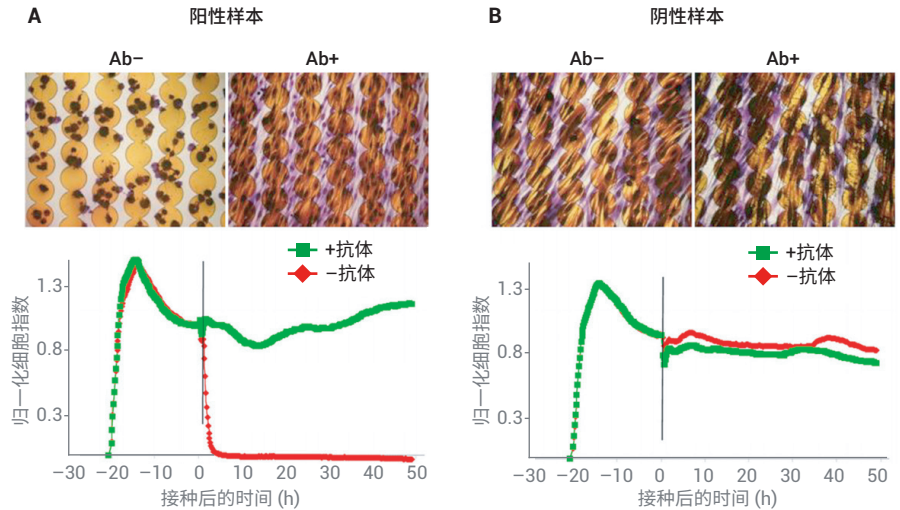


图 7. 检测感染和未感染受试者粪便样本中是否存在艰难梭菌毒素。正文中描述的 RTCA 分析与传统细胞毒性分析同时进行，其中细胞直接在 Agilent E-Plate 孔中染色并进行显微镜检查。当使用显微镜检查或 RTCA 分析时，在阳性样本中极易观察到细胞毒性作用。正如预期，加入中和抗体可消除阳性样本中存在的艰难梭菌毒素的细胞毒性作用，而对未感染受试者的阴性样本无影响

图片摘自 *Journal of Clinical Microbiology*, volume 48, Ryder, A. B. et al. "Clostridium difficile Infections by Quantitative Detection of tcdB Toxin by Use of a Real-Time Cell Analysis System," pages 4129–4134. 版权所有 2010, 经美国微生物学会授权。

以艰难梭菌毒素 B 为例，上述研究表明 RTCA 是可用于细菌毒素相关应用的有效工具。通过使用标准曲线和中和抗体，RTCA 可用于临床研究，以确认细菌毒素的存在、测定毒素的浓度，并监测治疗干预随时间变化的有效性。除临床外，RTCA 对细胞健康状况和行为动态变化的灵敏度可用于各种研究应用，如鉴定宿主细胞表面细菌毒素的结合靶标，以及比较抗毒素有效性。

参考文献 — RTCA 在细菌毒素
研究中的应用 (未详尽列出)

1. Jin, D. *et al.* Quantitative Detection of *Vibrio cholerae* Toxin by Real-Time And Dynamic Cytotoxicity Monitoring. *J. Clin. Microbiol.* **2013** Dec, 51(12), 3968–74
2. Real-Time Cell-Based Toxicology Testing Might Replace Animal Testing for Product Release and Drug Safety. *Biochemica* **2008**, 11–13
3. Ryder, A. B. *et al.* Assessment of *Clostridium difficile* Infections by Quantitative Detection of tcdB Toxin by Use of a Real-Time Cell Analysis System. *J. Clin. Microbiol.* **2010**, 48, 4129–4134
4. Huang, B. *et al.* Real-Time Cellular Analysis Coupled with a Specimen Enrichment Accurately Detects and Quantifies *Clostridium difficile* Toxins in Stool. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, 52, 1105–1111
5. Pollock, N. R. Ultrasensitive Detection and Quantification of Toxins for Optimized Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. *J. Clin. Microbiol.* **2016**, 54, 259–264
6. Planche, T. *et al.* Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection by Toxin Detection Kits: A Systematic Review. *Lancet Infect. Dis.* **2008**, 8, 777–784
7. Polage, C. R. *et al.* Overdiagnosis of *Clostridium difficile* Infection in the Molecular Test Era. *JAMA Intern. Med.* **2015**, 175, 1792–1801

参考文献 — 常规

细菌：宿主细胞相互作用

与上一节中描述的分泌蛋白毒素相反，某些细菌通过与宿主直接相互作用或入侵宿主细胞来传播疾病。这些相互作用通常可导致宿主细胞的变化，该变化可通过 RTCA 进行检测。

脑膜炎奈瑟菌是引起脑膜炎的革兰氏阴性菌，脑膜炎是一种可导致约 10% 感染儿童出现发育障碍或死亡的疾病。脑膜炎奈瑟菌一旦进入血流，即利用 IV 型菌毛结合脑内皮细胞的顶面。这种相互作用可诱导宿主细胞内信号转导通路的激活、总体形态学变化，以及与邻近细胞的细胞间连接的破坏。总而言之，这些变化可使细菌由脑毛细血管外渗并感染脑膜（中枢神经系统的保护层）^[1]。

Slanina 与同事开发了一种 xCELLigence 分析来实时研究脑膜炎奈瑟菌的关键毒力决定因素。分析中将人脑微血管内皮细胞 (HBMECs) 暴露于同基因型细菌菌株中^[2]。当添加 MC58 (脑膜炎奈瑟菌的感染性分离株) 后，阻抗信号显示短暂增加，随后迅速降至接近零的值 (图 8A)。阻抗信号的下降与以下因素相关：(1) HBMEC 膜被破坏，表现为基质金属蛋白酶 8 (MMP-8) 释放至培养基中 (图 8B)，以及 (2) HBMEC 从板底脱落 (图 8B 和图 8C)。为评估细菌荚膜对影响这一变化的重要性，将 MC58 与缺乏荚膜产生的 *siaD* 同基因型突变体进行了比较。还使用同基因型突变体评价了脑膜炎奈瑟菌脂多糖 (LPS) 和 OPC 膜蛋白的重要性。如图 8D–8F 所示，细菌荚膜和 LPS 可对动力学产生影响，但其影响程度与细菌的细胞病变效应不同。OPC 在这一特定分析中效应甚微。

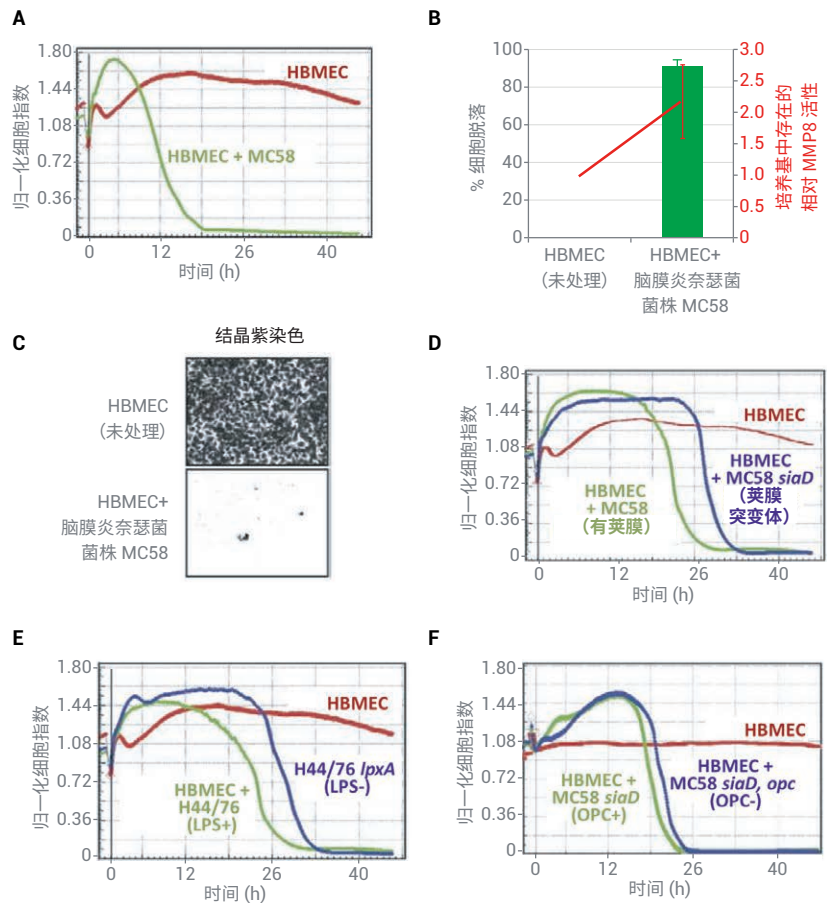


图 8. 鉴定脑膜炎奈瑟菌感染 HBMECs 过程中的关键毒力因子。(A) 采用脑膜炎奈瑟菌 MC58 菌株感染 HBMECs 引起 HBMEC 阻抗信号的快速降低, 该变化与细胞毒性作用一致。(B) 阻抗信号的下降与靶细胞脱落和膜破坏相关, 膜损伤后 MMP8 被释放到培养基中 (通过荧光底物的裂解检测 MMP8 活性)。(C) 结晶紫染色显示 MC58 处理后 HBMECs 的脱落。(D,E) 同基因型菌株的比较证明, 脑膜炎奈瑟菌或 LPS 的缺乏可减缓细胞病变效应, 但不影响 HBMEC 杀灭/裂解的总体程度。(F) 膜蛋白 OPC 的缺失对脑膜炎奈瑟菌的细胞致病性影响极小

转载自 *Journal of Microbiological Methods*, volume 84 (1), Slaninak, H. et al. "Real-Time Impedance Analysis of Host Cell Response to Meningococcal Infection," pages 101–8. 版权所有 2011, 经 Elsevier 授权。

xCELLigence RTCA 用于研究细菌-宿主相互作用的另一个引人注目的示例为鼠伤寒沙门氏菌 (伤寒的病原体)。当与人肠上皮细胞结合时, 鼠伤寒沙门氏菌向宿主细胞注射引起细胞骨架重排的细菌蛋白。这一过程最终可导致宿主细胞膜皱褶/向外突出, 并在内吞液泡内吞噬细菌。在液泡内, 鼠伤寒沙门氏菌通过与溶酶体融合抑制其正常降解, 并将液泡转变为细菌复制室。

当 Mou 与其同事用鼠伤寒沙门氏菌感染 HT-29 细胞时，宿主细胞导致的阻抗信号显示两个不同的峰值，随后稳定下降（图 9A）^[3]。利用免疫荧光显微镜检查，发现第一个细菌诱导的峰值（在图 9A 中标记为感染阶段“b”）与膜皱褶和肌动蛋白应激纤维在细菌进入宿主细胞的部位沉积相关（图 9B）。当 HT-29 细胞在感染鼠伤寒沙门氏菌前用肌动蛋白聚合抑制剂细胞松弛素 D 预处理 90 分钟，第一个阻抗峰消失（图 9C）。使用类似的方法，Mou 等人能够将不同的分子/细胞现象归属到鼠伤寒沙门氏菌感染期间阻抗曲线的不同阶段。

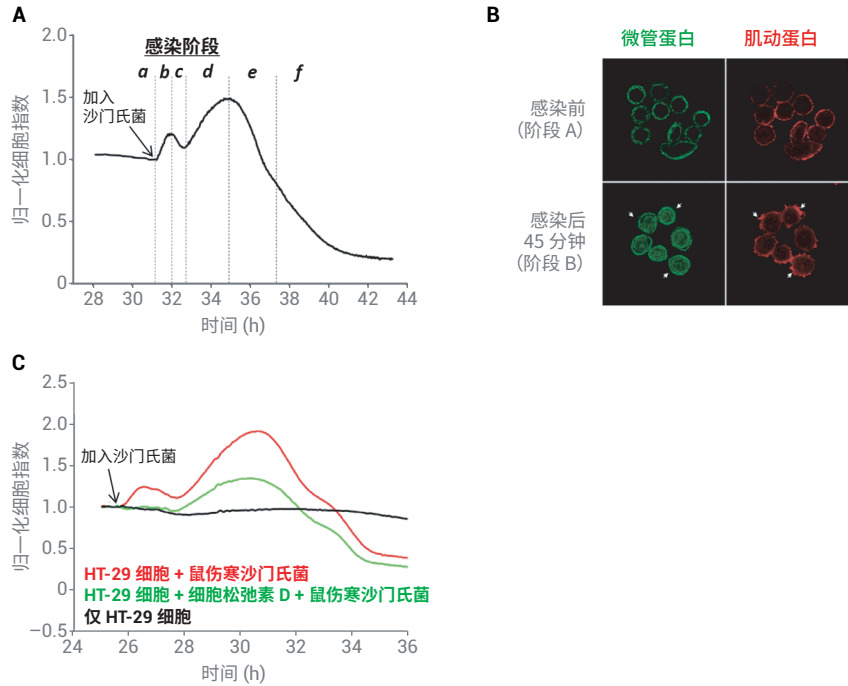


图 9. 鼠伤寒沙门氏菌感染人肠道 HT-29 细胞。(A) HT-29 细胞在遇到细菌后，其阻抗信号立即出现两个峰值，随后稳定下降。用字母标记该阻抗响应的不同阶段。(B) 感染鼠伤寒沙门氏菌 45 分钟后未感染和感染 HT-29 细胞的免疫荧光分析。细菌感染引起整个宿主细胞的微管蛋白重组，而肌动蛋白应激纤维聚集在细菌进入位点附近（用白色箭头表示）。(C) 在感染鼠伤寒沙门氏菌前用强效肌动蛋白聚合抑制剂细胞松弛素 D 处理 HT-29 细胞 90 分钟可消除第一个阻抗峰，有助于为该峰的出现原因提供分子学解释

图片摘自 *Public Library of Science One*, volume 6 (11), Mou, X. et al. "Phenotypic Pattern-Based Assay for Dynamically Monitoring Host Cellular Responses to Salmonella Infections." 2011. 此工作已根据知识共享署名 4.0 国际许可协议 (Creative Commons Attribution 4.0 International License) 获得许可。如需查看此许可协议的副本，请访问 <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> 或向知识共享组织 (Creative Commons) 寄送信件，地址为 PO Box 1866, Mountain View, CA 94042, USA。

图 9 中的研究突出显示了实时阻抗曲线中包含的丰富信息。它还证明了曲线的独特特征极易与特定的分子或细胞现象相关联。xCELLigence RTCA 能够以连续的方式研究这些现象，以揭示仅使用终点数据拼凑的情况下难以发现的微妙机制。这类信息可用于多种研究目的，如用于阐明特定基因或蛋白在感染的哪个阶段发挥作用，或用于筛选破坏感染过程不同步骤的药物。

参考文献 — 常规

参考文献 — RTCA 在细菌-宿主相互作用研究中的应用（未详尽列出）

1. Coureuil, M. *et al.* Mechanism of Meningeal Invasion by *Neisseria meningitidis*. *Virulence* **2012**, Mar-Apr, 3(2), 164–72
2. Slanina, H. *et al.* Real-Time Impedance Analysis of Host Cell Response to Meningococcal Infection. *J. Microbiol. Methods* **2011** Jan, 84(1), 101–8
3. Mou, X. *et al.* Phenotypic Pattern-Based Assay for Dynamically Monitoring Host Cellular Responses to *Salmonella* Infections. *PLoS One* **2011**, 6(11), e26544
4. Miranda-CasoLuengo, A. A. *et al.* A Real-Time Impedance Based Method to Assess *Rhodococcus equi* Virulence. *PLoS One* **2013**, 8(3), e60612
5. Hidalgo-Cantabrana, C. *et al.* Effect of Bacteria Used in Food Industry on the Proliferation and Cytokine Production of Epithelial Intestinal Cellular Lines. *J. Functional Foods* **2014**, 6, 348–355

细菌：生物被膜

除了在水环境中以自由浮动的浮游生物状态生活外，细菌还可以在液-固和气-固界面定植于生物和非生物表面。在这些微环境中，分泌的化学信号因子用于协调整个菌落的基因表达谱，从而促进生存。这些群落常见的适应方式是分泌胞外聚合物 (EPS)，用于包裹细菌并保护其免受环境的危害。形成这些生物被膜的能力是一种关键的毒力因子，因为 EPS 基质有助于细菌逃逸宿主免疫反应，还可以使细菌的抗生素抗性提高多达 1000 倍。

除了在人牙菌斑和龋齿、慢性感染、对人工植入体的排异反应，以及食物中毒等方面发挥关键作用外，细菌生物被膜还导致了大部分的牲畜疾病，并造成工业空气和水处理系统的污染，进一步扩大其对经济的影响。尽管开发治疗或预防生物被膜的药物至关重要，但传统上用于研究生物被膜的比色法效率或通量较低，与正交分析不兼容（样品在分析过程中被破坏），且仅提供终点数据。多个研究团队最近描述了 xCELLigence RTCA 仪器的阻抗监测如何克服这些限制，以使用无标记和完全自动化的分析对生物被膜进行定量和连续评估。

作为理解 xCELLigence RTCA 监测生物被膜能力的第一步，Alex Mira 与同事证明细菌和 EPS 均与阻抗信号有关（数据未显示）。在将金黄色葡萄球菌 240 接种至 E-Plate 孔时，他们通过在生长培养基中加入抗生素，来评估 RTCA 筛选生物被膜阻断剂（预防活性）的能力。细菌生长 20 小时后将实验组 CI 和未处理对照进行比较。

在图 10A 中，% 细胞指数定义为：

$$\frac{(\text{细胞指数})_{\text{用药组}}}{(\text{细胞指数})_{\text{未用药组}}} \times 100$$

将其绘制为 10 种不同药物的药物浓度函数。尽管测试的 10 种抗生素均表现出预防活性，但是有效性却各不相同。头孢噻肟在 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度下完全破坏了与生物被膜相关的信号，而利奈唑胺则需要高 128 倍的浓度才能达到这一效果（图 10A）。该实验表明 RTCA 可用作防止生物被膜形成药物的筛查工具。

在特定的浓度范围内，一些抗生素实际上可以促进生物被膜的生长。能够表征这种不良作用，对于防止医生无意间加剧他们正在努力治疗的感染至关重要。使用 RTCA 可以轻松检测并定量这种差异性行为。当浓度为 4–32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，万古霉素抑制表皮葡萄球菌 43040 生物被膜的生长；然而，当浓度为 62.5 ng/mL –2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，则会刺激生物被膜的生长（图 10B）。

通过建立表皮葡萄球菌 43040 的生物被膜，然后使用抗生素对其进行处理，探测对生物被膜的破坏能力。从图 10C 可以看出，在浓度为 0.125–8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，氯唑西林和利福平能够引起生物被膜的部分破坏，在最极端的情况下，CI 下降约 60%。测试的 10 种抗生素均不能完全破坏生物被膜，与已知生物被膜的抗生素抗性一致，证明了测试药物对生物被膜（而非浮游菌体）状态抑制的有效性非常重要，以及突显对更强力有效药物的需求。

这些实验证明了 xCELLigence RTCA 可用于研究细菌生物被膜。与传统的分析方法相比，该方法所涉及的工作量明显较少：仅需将细菌接种至 E-Plate 中，然后连续自动地进行数据采集即可。xCELLigence 数据的实时性可实现不同菌株和处理之间的定量比较，并可评估细菌及其 EPS。利用传统的终点分析法获得如此详细的生物被膜动力学信息需要耗费大量的员工工作时间，且无法实现相同水平的重复性。

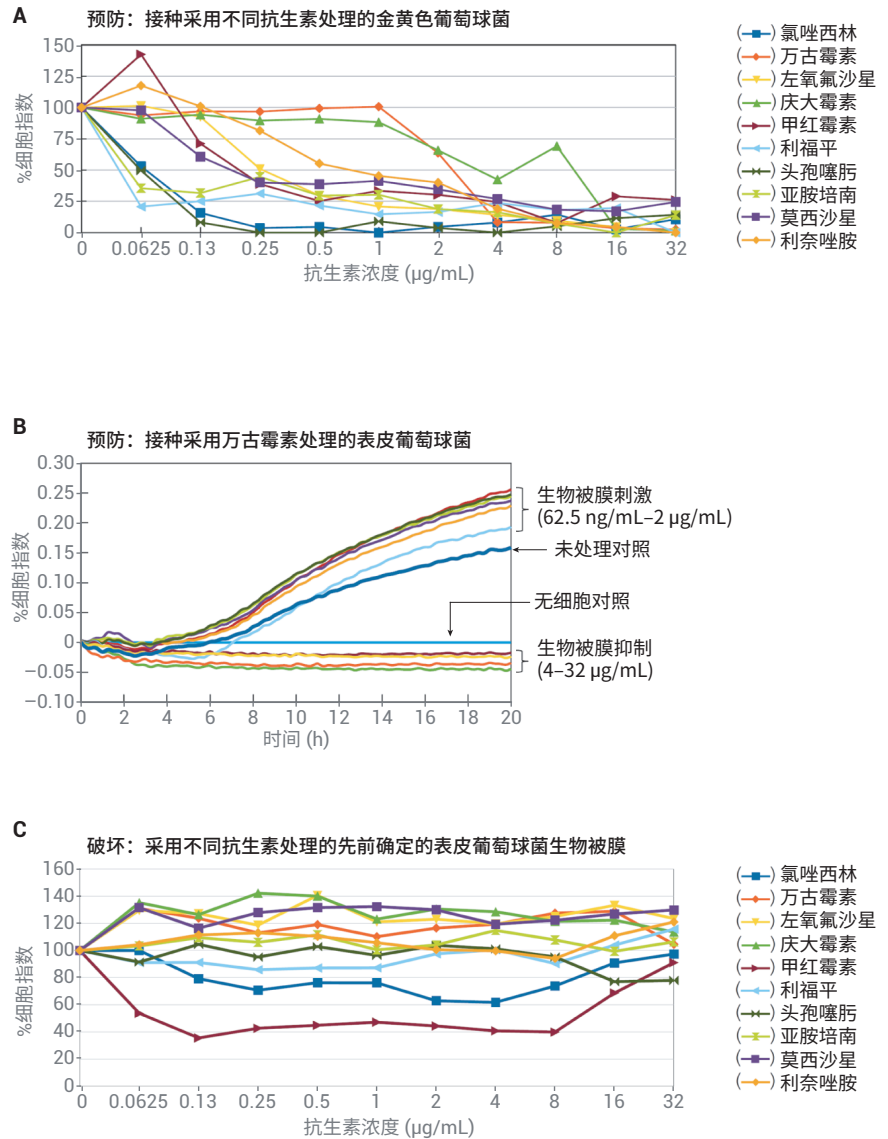


图 10. 使用 RTCA 筛查可以防止生物被膜形成或破坏已建立生物被膜的药物。(A) 对 10 种不同的抗生素 (每一种用不同颜色的线表示) 阻止金黄色葡萄球菌 240 形成生物被膜的能力进行了评估。从细菌接种至孔中的那一刻起, 抗生素就以不同的浓度存在。在接种后 20 小时, 检测 CI 并与未处理的对照进行比较。此处绘制的 % 细胞指数曲线计算方式如下

$$\frac{(\text{细胞指数})_{\text{用药组}}}{(\text{细胞指数})_{\text{未用药组}}} \times 100$$

(B) 预防能力测试。万古霉素对表皮葡萄球菌 43040 生物被膜生长的抑制作用或刺激作用取决于其浓度。(C) 生物被膜破坏能力测试。当浓度高于 0.13 μg/mL 时, 只有氯唑西林和利福平能够引起表皮葡萄球菌生物被膜的部分破坏。%CI 定义如上

版权所有 Dr. Alex Mira 2019. 转载经作者授权。

参考文献 — RTCA 在生物被膜研究中的应用

1. Junka, A. F. *et al.* Use of the Real Time xCelligence System for Purposes of Medical Microbiology. *Polish Journal of Microbiol.* **2012**, 61(3), 191–197
2. Cihalova, K. *et al.* *Staphylococcus aureus* and MRSA Growth and Biofilm Formation after Treatment with Antibiotics and SeNPs. *Int. J. Mol. Sci.* **2015** Oct 16, 16(10), 24656–72
3. Gutiérrez, D. *et al.* Monitoring in Real Time the Formation and Removal of Biofilms from Clinical Related Pathogens Using an Impedance-Based Technology. *PLoS One* **2016**, Oct 3, 11(10), e0163966
4. Ferrer, M. D. *et al.* Effect of Antibiotics on Biofilm Inhibition and Induction measured by Real-Time Cell Analysis. *J. Appl. Microbiol.* **2016** Dec 8
5. Wang, T.; Su, J. *Bacillus subtilis* from Soybean Food Shows Antimicrobial Activity for Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* by Affecting the *adeS* Gene. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2016** Dec 28, 26(12), 2043–2050
6. van Duuren, J. B. J. H. *et al.* Use of Single-Frequency Impedance Spectroscopy to Characterize the Growth Dynamics of Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.* **2017** Jul 12, 7(1), 5223
7. Gutiérrez, D. *et al.* Real-Time Assessment of *Staphylococcus aureus* Biofilm Disruption by Phage-Derived Proteins. *Front Microbiol.* **2017** Aug 24, 8, 1632

病毒：滴度测定

感染病毒后，宿主细胞通常会显示出显微镜下可见的变化，这些变化统称为细胞病变效应 (CPE)。CPEs 可能包括细胞皱缩或增大、退化、细胞融合以及包涵体形成。并非所有病毒都在其宿主细胞中引起 CPE，但如果引起 CPE，则可成为多种研究应用的有用工具。在典型的 CPE 检测中，用病毒标本接种单层细胞，然后监测数天（甚至数周），以追踪感染部位相应病灶出现的不同形态变化。由于 CPE 病灶识别和分级的主观性，这类分析费力且容易出现差异。作为一种更高效、客观、准确和高通量的替代方法，许多实验室已使用 xCELLigence RTCA 追踪病毒 CPEs，以用于滴度测定、中和抗体分析等。使用阻抗追踪病毒 CPEs 的原理如图 11 所示。

同一孔在两个不同时间点的侧视图

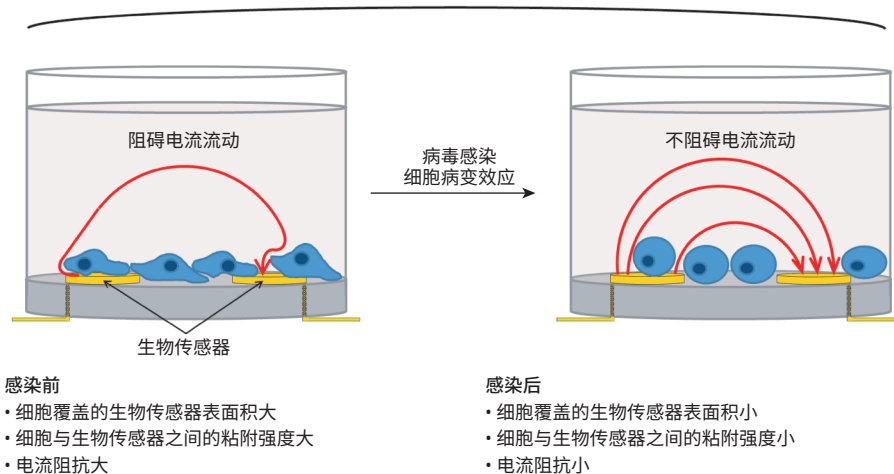


图 11. 使用 Agilent xCELLigence RTCA 追踪病毒 CPEs。在 Agilent E-Plate 内，可通过生物传感器间电流流动的难易程度变化来检测病毒诱导的宿主细胞形态和粘附强度的变化（细胞病变效应的标志）。此处，是在两个不同时间点（CPE 前和 CPE 后）。请注意，为了清楚起见，孔底仅显示了两个生物传感器，细胞和生物传感器均未按比例绘制

Reisen 与同事评价了 xCELLigence RTCA 测定西尼罗河病毒 (WNV) 和路易斯脑炎病毒 (SLEV) 滴度的有效性。将 Vero 细胞悬液与已知浓度的 WNV 或 SLEV 的稀释液在 37 °C 下孵育 30 分钟。随后立即将细胞/病毒悬液加入 E-Plate 孔中，然后在 xCELLigence 分析仪上监测阻抗。与未感染的对照细胞生长至汇合并维持稳定 CI 相比，感染病毒的细胞的 CI 随时间降低至零，表明细胞已完全裂解（图 12A 和 12B）。与已知的 WNV 和 SLEV 具有细胞杀伤活性一致，由 xCELLigence 监测时 WNV 更早表现出 CPE 并具有更快的 CPE 进展速度。

值得注意的是，对于 WNV 和 SLEV，发生细胞病变效应的时间与已知的病毒滴度高度相关。这一点可以通过绘制 CIT50（细胞指数降低 50% 所需时间）与病毒滴度的关系图来呈现（图 12A 和 12B 下图）。使用此类标准曲线可以测定未知浓度样品中的病毒滴度。除表征用于研究的病毒原液外，临床上还可采用该方法对样品中特定病毒的载量进行定量分析。

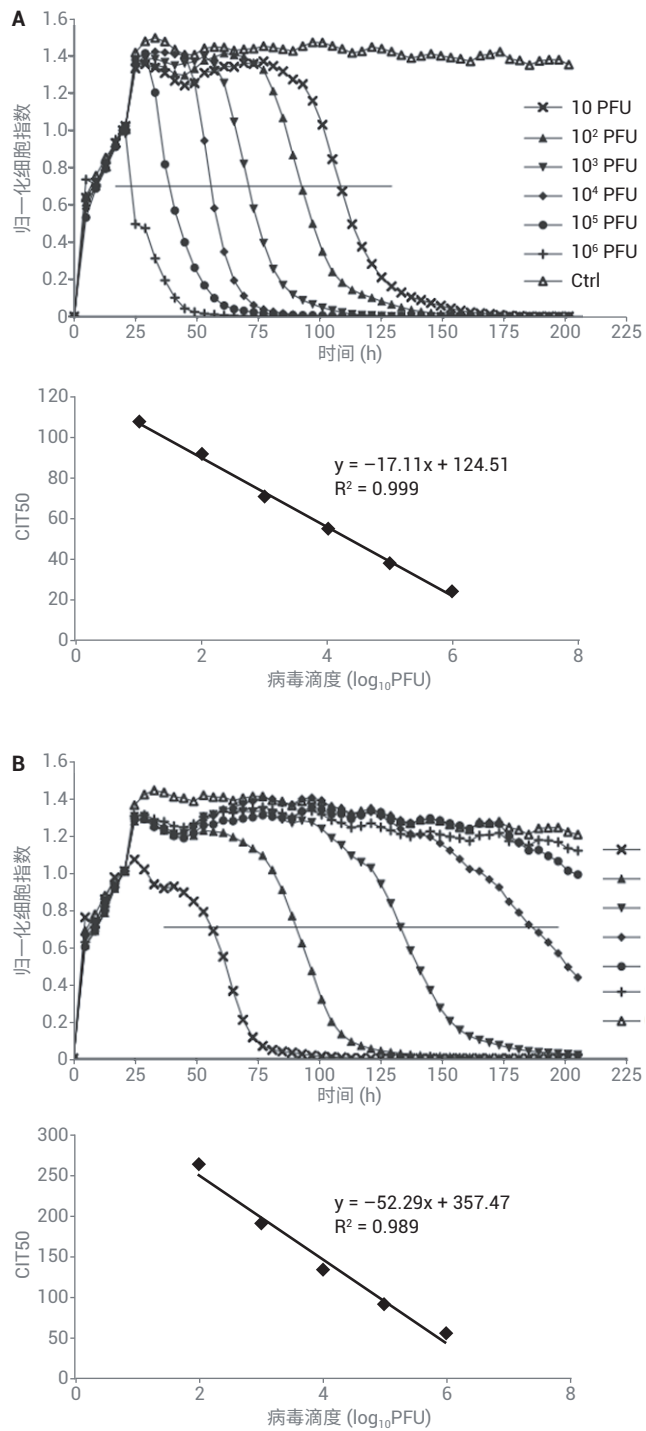


图 12. 使用 Agilent xCELLigence RTCA 仪器测定病毒滴度。(A) 上图：实时监测 Vero 细胞中 WNV 诱导的细胞病变效应。显示接种了阴性对照 (Ctrl) 或不同数量空斑形成单位 (PFU) WNV 的 E-Plate 孔的归一化 CI。每条曲线均为两个独立平行孔的平均值。水平线表示 CI 下降至其初始值 (加入病毒前) 50% 的点。达到这一点所需的时间称为 CIT50。下图：绘制 CIT50 与病毒滴度的关系图，得到标准曲线，可用于测定样品中的病毒浓度。(B) 实时监测 Vero 细胞中 SLEV 诱导的细胞病变效应。实验详细信息和数据处理与 A 部分相似

转载自 *Journal of Virological Methods*, volume 173 (2), Fang, Y. et al. "Real-time monitoring of flavivirus induced cytopathogenesis using cell electric impedance technology." 版权所有 2011, 经 Elsevier 授权。

参考文献 — RTCA 在病毒滴度测定中的应用

1. Fang, Y. *et al.* Real-Time Monitoring of Flavivirus Induced Cytopathogenesis Using Cell Electric Impedance Technology. *J. Virol. Methods*. **2011** May, 173(2), 251–8
2. Witkowski, P. T. *et al.* Cellular Impedance Measurement as a New Tool for Poxvirus Titration, Antibody Neutralization Testing and Evaluation of Antiviral Substances. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010** Oct 8, 401(1), 37–41
3. Charretier, C. *et al.* Robust Real-Time Cell Analysis Method for Determining Viral Infectious Titers During Development of a Viral Vaccine Production Process. *J. Virol. Methods* **2017** Nov 14, 252, 57–64
4. Charretier, C. *et al.* Robust Real-Time Cell Analysis Method for Determining Viral Infectious Titers During Development of a Viral Vaccine Production Process. *J. Virol. Methods* **2018** Feb, 252, 57–64 (republished)
5. Burmakina, G. *et al.* Real-Time Analysis of the Cytopathic Effect of African Swine Fever Virus. *J. Virol. Methods* **2018** Jul, 257, 58–61
6. Lebourgeois, S. *et al.* Development of a Real-Time Cell Analysis (RTCA) Method as a Fast and Accurate Method for Detecting Infectious Particles of the Adapted Strain of Hepatitis A Virus. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2018** Sep 25, 8, 335

病毒：中和抗体

使用 xCELLigence RTCA 监测病毒诱导细胞病变效应 (CPEs) 的基本原理在“病毒：滴度测定”章节中有详细描述。如下所述，该实时病毒 CPE 检测可用于多种应用，包括中和抗体的检测和定量分析。

当 Vero 细胞在 E-Plate 孔中生长至汇合后，Fang 和同事用 10^6 空斑形成单位的西尼罗河病毒 (WNV) 感染每个孔的细胞，这些病毒已经与已知浓度的中和抗体连续稀释液预孵育^[1]。如图 13A 所示，中和抗体延迟了 WNV 诱导的 CPE 的发生，并且与抗体浓度直接相关。通过绘制 CIT50 (CI 降低 50% 所需时间) 与抗体滴度的关系图获得标准曲线 (图 13B)，用于定量分析禽类样本中存在的中和抗体含量。使用这种标准曲线确定野外感染禽类中的抗体浓度，获得的数值与通过传统空斑减少中和试验得到的数值高度相关^[1]。

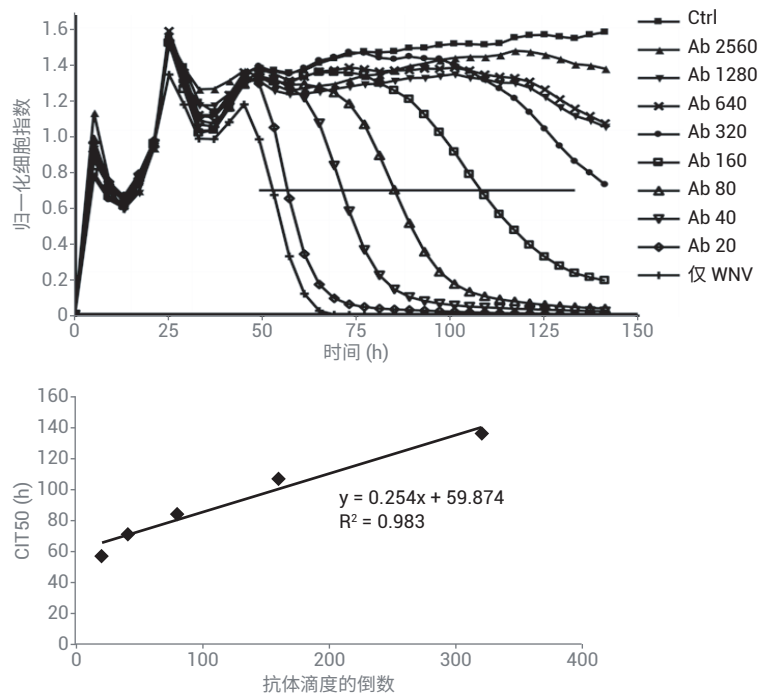


图 13. 使用 Agilent xCELLigence RTCA 仪器定量分析 WNV 中和抗体滴度。(A) 用不同稀释度的中和抗体稀释液对 WNV 病毒进行预孵育，然后用 10^6 空斑形成单位的 WNV 感染 Vero 细胞。Ctrl = 未感染病毒的 Vero 细胞；仅 WNV = 感染未经抗体预处理的病毒的 Vero 细胞。水平线表示细胞指数下降至其初始值（加入病毒前）50% 的点。达到这一点所需的时间称为 CIT50。(B) 绘制 CIT50 与抗体滴度倒数的关系图，得到标准曲线，可用于评估野生禽类血清中的抗体浓度

转载自 *Journal of Virological Methods*, volume 173 (2), 251–8, Fang, Y. et al. "Real-Time Monitoring of Flavivirus Induced Cytopathogenesis Using Cell Electric Impedance Technology." 版权所有 2011，经 Elsevier 授权。

与上述 WNV 的方法相似，RTCA 也可用于定量分析人血清中存在的甲型 H1N1 流感病毒的中和抗体含量。在 E-Plate 孔中，分别使用或不使用血清预处理的纯化 H1N1 病毒感染融合细胞（图 14）。在疫苗接种前、疫苗接种后 7 天或疫苗接种后 21 天采集的血清样本，可用于追踪 H1N1 特异性中和反应随时间的变化。正如预期，H1N1 中和抗体活性的稳健性在疫苗接种后的前 21 天逐渐增加，这可以通过细胞病变效应延迟发生或完全阻断加以证明。

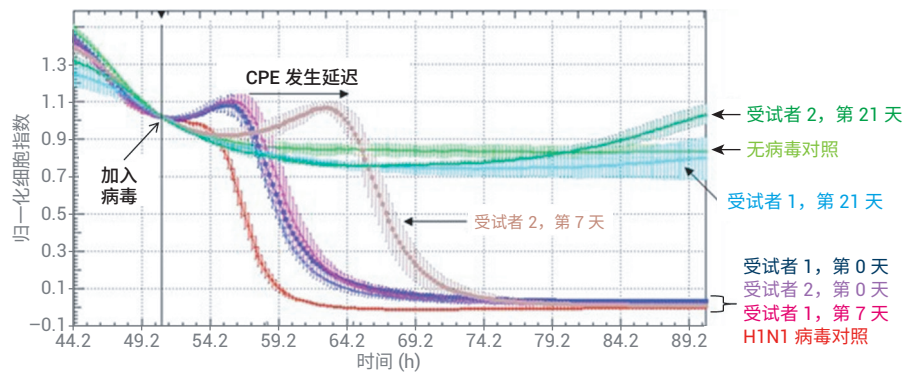


图 14. 用 RTCA 检测 H1N1 疫苗接种受试者的中和抗体活性，以追踪细胞病变效应的延迟发生。在接种疫苗前（第 0 天）以及接种疫苗后第 7 天和第 21 天，采集两名受试者的血清样品。将这些血清样本与纯化的 H1N1 病毒孵育，然后将病毒/血清混合物加入在 Agilent E-Plate 中生长的细胞中。对于两名受试者，第 0 天的血清没有提供任何保护作用，病毒对细胞的杀伤动力学极其类似于阳性对照。对于受试者 2，第 7 天的血清显示可以明显延迟 H1N1 诱导的 CPE 的发生，表明存在 H1N1 病毒的特异性中和抗体。相比之下，受试者 1 第 7 天的血清并未显示出预防作用，表明尚不具有 H1N1 中和抗体活性。然而，两名受试者接种疫苗后第 21 天的血清均显示出强大的 H1N1 中和抗体活性，使病毒完全无法诱导细胞病变效应。此测定法能够定量评估特定疫苗的效力以及病毒抗性出现的动力学

图片摘自 *Asia Pacific Biotech News*, volume 14(10), Lu, H. et al. "Label-free Real-time Cell Based Assay System for Evaluating H1N1 Vaccination Success," pages 31–32. 版权所有 2010, 经 Asia Pacific Biotech News 授权。

RTCA 凭借简单、自动化的工作流程以及客观的定量读数，在检测和定量中和抗体方面明显优于传统检测方法。此方法能够轻松监测疫苗接种的有效性，并阐明病毒抗性出现的动力学。

参考文献 — RTCA 在中和抗体研究中的应用

1. Fang, Y. et al. Real-time Monitoring of Flavivirus Induced Cytopathogenesis Using Cell Electric Impedance Technology. *J. Virol. Methods*. **2011** May, 173(2), 251–8
2. Lu, H.; Xu, X. Label-Free Real-Time Cell Based Assay System for Evaluating H1N1 Vaccination Success. *Asiabiochem*. **2010**, 14(10), 31–32
3. Teng, Z. et al. Real-Time Cell Analysis—A New Method For Dynamic, Quantitative Measurement of Infectious Viruses and Antiserum Neutralizing Activity. *J. Virol. Methods*. **2013** Nov, 193(2), 364–70
4. Burmakina, G. et al. Real-Time Analysis of the Cytopathic Effect of African Swine Fever Virus. *J. Virol. Methods* **2018** Jul, 257, 58–61
5. Tian, D. et al. Novel, Real-Time Cell Analysis for Measuring Viral Cytopathogenesis and the Efficacy of Neutralizing Antibodies to the 2009 Influenza A (H1N1) virus. *PLoS One* **2012**, 7(2), e31965

病毒：药物筛选

实时阻抗监测对病毒诱导的细胞病变效应敏感，使 xCELLigence 成为可抑制病毒生命周期任一方面药物的极佳鉴定与表征工具。

苏黎世分子生命科学研究所的 Urs Greber 与同事的目标是找到一种药物，可减轻腺病毒对已感染该病毒的受试者的影响。他们的筛选实验包括使 HeLa 细胞生长至汇合，然后在存在不同候选药物的情况下用人腺病毒进行感染。其中最有效的是夫拉平度 (Flavopiridol)，一种能抑制细胞周期依赖性激酶 Cdk9 的半合成黄酮类化合物。如图 15A 所示，在没有药物的情况下，腺病毒感染会诱导稳定的 CPE，阻抗信号降至零 (红色迹线)。但是，夫拉平度能够以剂量依赖性方式明显延迟 CPE 发生 (蓝色和橙色迹线)。通过显微镜分析 (图 15B) 可以证实上述基于阻抗的结果。

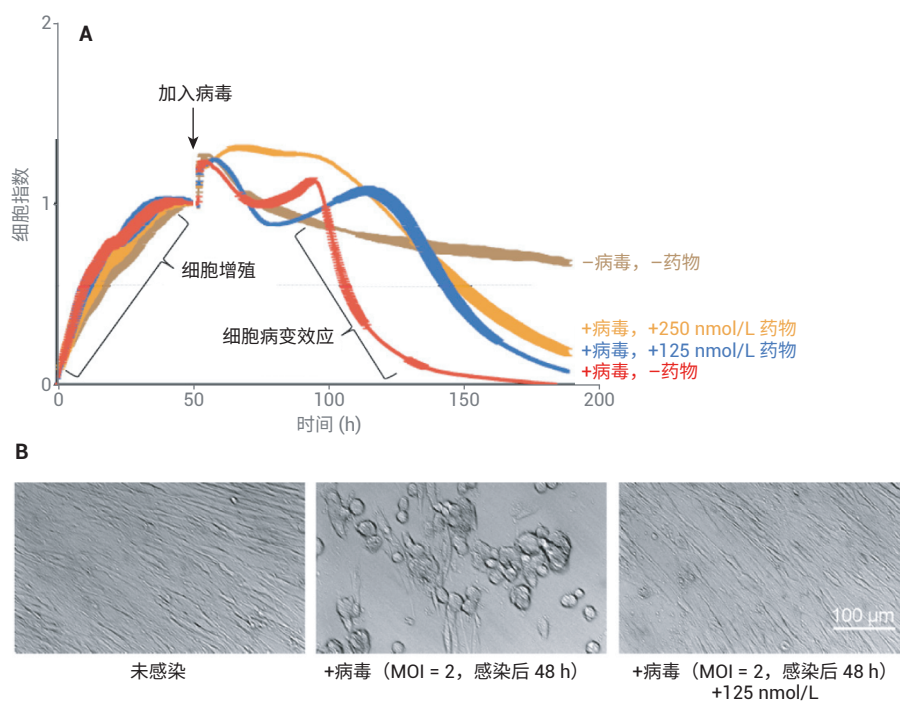


图 15. 监测夫拉平度的抗病毒活性。(A) HeLa 细胞在 Agilent E-Plate 中生长至汇合点。细胞接种约 50 小时后，在存在不同浓度夫拉平度的情况下，用 C5 人腺病毒株感染细胞。(B) 夫拉平度可以针对腺病毒提供广泛的保护能力。此处，用 D37 人腺病毒株感染 WI38 肺成纤维细胞，四个小时后，加入或不加入夫拉平度。感染 48 小时后，可以清楚地看到该药物阻止了细胞病变效应的发生

图片经授权摘自 *ACS Infectious Diseases Volume 3 (6)*, Prasad, V. et al. "Cell Cycle-Dependent Kinase Cdk9 Is a Postexposure Drug Target Against Human Adenoviruses," pages 398–405. 版权所有 2017, 美国化学学会

在第二个例子中，魁北克拉瓦尔大学的 Guy Boivin 和同事分析了野生型 (WT) 和突变型单纯疱疹病毒 1 (HSV-1) 对抗病毒药物阿昔洛韦的敏感性。Vero 细胞在 E-Plate 中生长至汇合后，将其用病毒感染 90 分钟，然后加入不同浓度的药物。尽管 WT 和突变型病毒诱导的 CPE 均可被阿昔洛韦阻断，但与 WT 病毒株相比，阻断突变型病毒株所需的药物浓度明显更高 (图 16)。通过绘制给定时间点的 CI 值与药物浓度的关系图，得到剂量反应曲线 (此处未展示)，突变型病毒和 WT 病毒的 EC₅₀ 值分别为 100 μmol/L 和 0.8 μmol/L。上述结果符合此特殊突变型病毒株的特点，即它的 DNA 聚合酶发生了突变，而这正是阿昔洛韦的靶点。

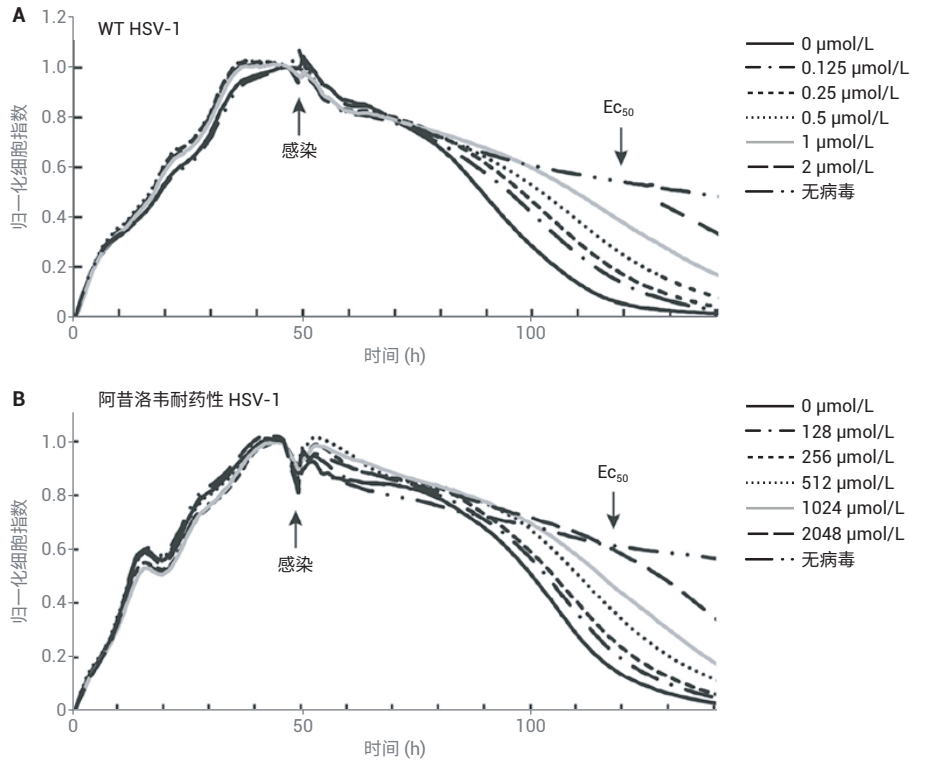


图 16. 比较野生型和突变型 HSV-1 对阿昔洛韦的敏感性。Vero 细胞在 Agilent E-Plate 中生长至汇合。细胞接种 48 小时后，将细胞用 WT 或突变型 HSV-1 感染 90 分钟。然后加入不同浓度的阿昔洛韦，每隔 30 分钟监测一次阻抗，持续 100 小时。可以注意到，突变型病毒株需要更高药物浓度来防止细胞病变效应

数据引自 *Journal of Clinical Microbiology*, volume 54 (8), Piret, J. et al. "Novel Method Based on Real-Time Cell Analysis for Drug Susceptibility Testing of Herpes Simplex Virus and Human Cytomegalovirus." 版权所有 2016，经美国微生物学会授权。

参考文献 — RTCA 在抗病毒药物筛选中的应用

1. Watterson, D. *et al.* A Generic Screening Platform for Inhibitors of Virus Induced Cell Fusion Using Cellular Electrical Impedance. *Sci. Rep.* **2016** Mar 15, 6, 22791
2. Zandi, K. A Real-Time Cell Analyzing Assay for Identification of Novel Antiviral Compounds against Chikungunya Virus. *Methods Mol. Biol.* **2016**, 1426, 255–62
3. Sharma, B. N. *et al.* Antiviral Effects of Artesunate on Polyomavirus BK Replication in Primary Human Kidney Cell. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, 58(1), 279–89
4. Witkowski, P. T. *et al.* Cellular Impedance Measurement as a New Tool for Poxvirus Titration, Antibody Neutralization Testing and Evaluation of Antiviral Substances. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010** Oct 8, 401(1), 37–41
5. Piret, J. *et al.* Novel Method Based on Real-Time Cell Analysis for Drug Susceptibility Testing of Herpes Simplex Virus and Human Cytomegalovirus. *J. Clin. Microbiol.* **2016** Aug, 54(8), 2120–7
6. Cymerys, J. *et al.* Primary Cultures of Murine Neurons for Studying Herpes Simplex Virus 1 Infection and Its Inhibition by Antivirals. *Acta Virol.* **2013**, 57(3), 339–45
7. Prasad, V. *et al.* Cell Cycle-Dependent Kinase Cdk9 Is a Postexposure Drug Target Against Human Adenoviruses. *ACS Infect. Dis.* **2017** Jun 9, 3(6), 398–405

寄生虫

寄生虫寄生于宿主的肠道或血管内，在全球范围内累及超过十亿人口，且每年可造成数十万人口死亡。寄生虫感染患病率高、治疗费用高昂，而且寄生虫特异性治疗药物仍然极其有限。这在一定程度上是因为过去缺乏适合这些寄生虫生命周期的客观高通量药物筛选方法。多年来，一直将显微镜下观察蠕虫移动/扭动速度的人工监测方式作为初筛工具。

为了开发高通量抗寄生虫药物筛选方法，Smout 与同事证实，采用 xCELLigence RTCA 进行实时阻抗监测可定量寄生虫的运动能力（作为生存能力的替代指标）^[1]。将寄生虫置于 E-Plate 孔内时，其运动改变了所接触的电极表面积（图 17A–17C），由此可造成阻抗信号波动（图 17D）。而 CI 在较宽范围内的快速波动表明蠕虫完全活跃，CI 在较窄范围内的缓慢波动则表明寄生虫嗜睡/生病/死亡（图 17D）。在这些类型的图中，为了使数据更清晰易读，在 Y 轴上展开每种条件下的阻抗曲线，以防止它们重叠。CI 的绝对值并不重要；在不同条件下比较的是 CI 波动的速率和幅度（图 17D）。

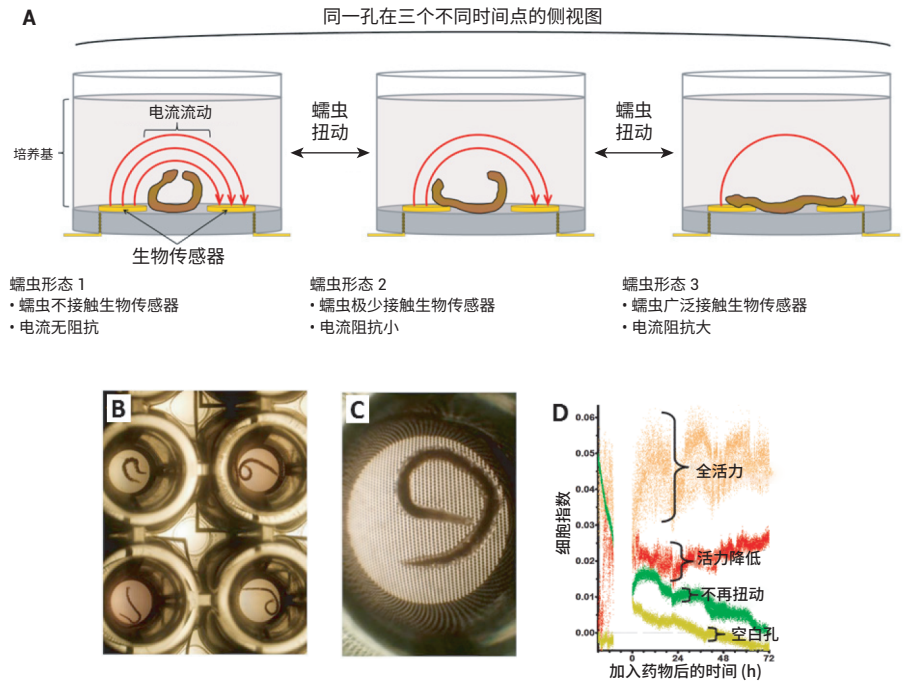


图 17. 利用 RTCA 筛选抗寄生虫药物。(A) 如蠕虫在 Agilent E-Plate 孔中扭动，蠕虫接触的总电极表面积不断变化，从而可引起阻抗信号波动。(B) E-Plate 孔内犬钩虫成虫的显微照片；雌性显示于顶部两个孔中，雄性显示于底部两个孔中。(C) 犬钩虫雌性成虫的放大视图位于孔中电极网格顶部。(D) 显示健康蠕虫与药物损伤蠕虫不同阻抗曲线的示例数据。注：细胞指数的数值与本分析无关。曲线已沿 Y 轴手动重新定位，以辅助数据清晰显示（即防止 4 条曲线相互重叠）。CI 的波动速率及其波动幅度是此处的关键参数。详见文字说明

图片摘自 *Public Library of Science Neglected Tropical Diseases*, volume 4 (11), Smout, M. J. et al. "Novel High Throughput Assay for Anthelmintic Drug Screening and Resistance Diagnosis by Real-Time Monitoring of Parasite Motility" 2010.

此工作已根据知识共享署名 4.0 国际许可协议 (Creative Commons Attribution 4.0 International License) 获得许可。如需查看此许可协议的副本，请访问 <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> 或向知识共享组织 (Creative Commons) 寄送信件，地址为 PO Box 1866, Mountain View, CA 94042, USA。

Smout 与同事基于阻抗监测筛选了药物对寄生虫生命周期三个不同阶段的有效性。图 18A 和 18B 突出显示了左旋咪唑和噻苯达唑分别对捻转血矛线虫 L3 幼虫期和卵孵化期的影响。在标准蠕虫运动试验中，L3 幼虫在左旋咪唑浓度为 $0.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时昏睡，而浓度升高至 $6 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时被杀灭 (图 18A)。为评价噻苯达唑对虫卵孵化的影响，将虫卵置于 E-Plate 生物传感器上方的筛网顶部。随着虫卵孵化的进行，幼虫爬过筛网时可与 E-Plate 生物传感器接触，并引起阻抗信号增加，增幅与孵化卵总数成正比。研究发现噻苯达唑以剂量依赖性方式抑制该卵孵化过程 (图 18B)。

这些发现尤为重要，因为它们证实了 RTCA 可对广泛的抗寄生虫药物进行筛选：因为寄生虫生命周期中的每个阶段均可能表现出不同的药效反应，如能监测其中三个阶段则可增加成功筛选的概率。

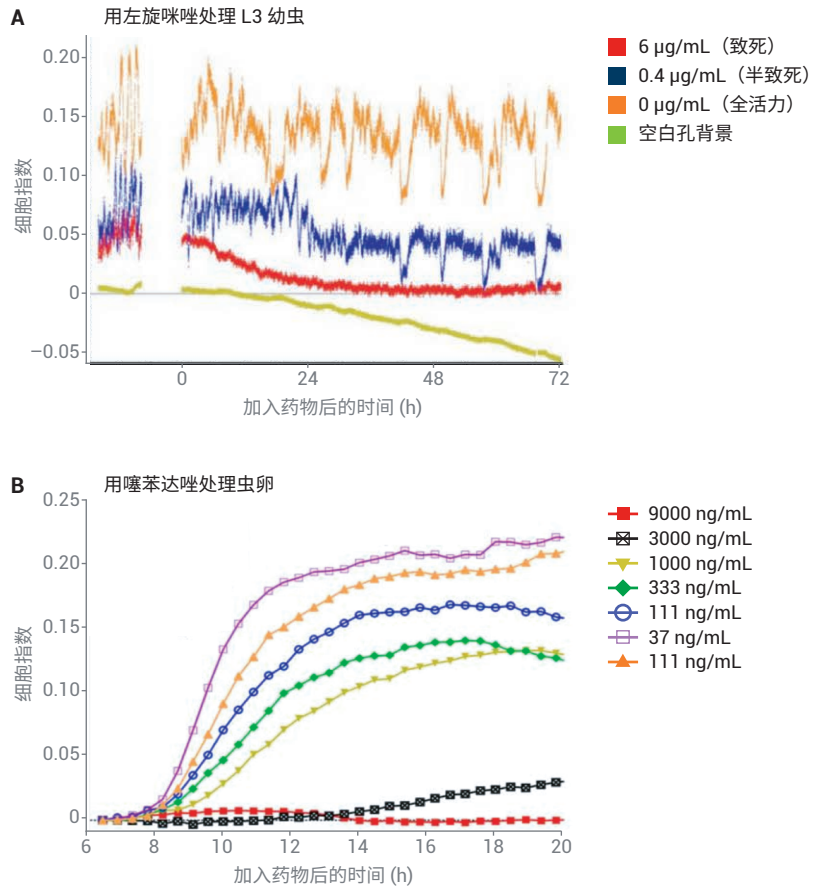


图 18. 确定对捻转血矛线虫生命周期不同阶段有效的药物。(A) 左旋咪唑对 L3 幼虫期有效。而浓度为 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时幼虫活力略有降低，浓度为 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时则具有致死性。注：细胞指数的数值与本分析无关；曲线已沿 Y 轴手动重新定位，以辅助数据清晰显示（即防止 4 条曲线相互重叠）。CI 的波动速率及其波动幅度是此处的关键参数。(B) 在噻苯达唑药物含量不同的情况下孵化虫卵。请注意，增加药物浓度会导致虫卵孵化减少及阻抗信号降低。详见文字说明

图片摘自 *Public Library of Science Neglected Tropical Diseases*, volume 4 (11), Smout, M. J. et al. "A Novel High Throughput Assay for Anthelmintic Drug Screening and Resistance Diagnosis by Real-Time Monitoring of Parasite Motility" 2010.

此工作已根据知识共享署名 4.0 国际许可协议 (Creative Commons Attribution 4.0 International License) 获得许可。如需查看此许可协议的副本，请访问 <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> 或向知识共享组织 (Creative Commons) 寄送信件，地址为 PO Box 1866, Mountain View, CA 94042, USA。

参考文献 — RTCA 在寄生虫研究中的应用

1. Smout, M. J. *et al.* A Novel High Throughput Assay for Anthelmintic Drug Screening and Resistance Diagnosis by Real-Time Monitoring of Parasite Motility. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2010** Nov 16, 4(11), e885
2. Rinaldi, G. *et al.* Viability of Developmental Stages of *Schistosoma mansoni* Quantified with xCELLigence Worm Real-Time Motility Assay (xWORM). *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2015** Aug 6, 5(3), 141–8
3. Zeraik, A. E. *et al.* Reversible Paralysis of *Schistosoma mansoni* by Forchlorfenuron, a Phenylurea Cytokinin that Affects Septins. *Int. J. Parasitol.* **2014** Jul, 44(8), 523–31
4. Hong, Y. *et al.* Transcriptional Responses of *In Vivo* Praziquantel Exposure in Schistosomes Identifies a Functional Role for Calcium Signaling Pathway Member CamKII. *PLoS Pathog.* **2013** Mar, 9(3), e1003254
5. Silbereisen, A. *et al.* Exploration of Novel *In Vitro* Assays to Study Drugs Against *Trichuris* spp. *J. Microbiol. Methods.* **2011** Nov, 87(2), 169–75
6. Tritten, L. *et al.* Comparison of Novel and Existing Tools for Studying Drug Sensitivity Against the Hookworm *Ancylostoma ceylanicum* *In Vitro*. *Parasitology* **2012** Mar, 139(3), 348–57

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2019
2019年11月1日，中国出版
5994-1084ZHCN
DE.5828587963

