

· 基础研究 ·

重组酶聚合酶扩增结合侧向流动试纸条技术快速可视化检测嗜麦芽窄食单胞菌方法的建立与应用

季 拓^{1,2},高玉芝^{1,2},王 彦^{1,2},高绪柱^{1,2*}¹江苏大学附属连云港市第二人民医院中心实验室,江苏 连云港 222000;²南京医科大学康达学院附属连云港市第二人民医院中心实验室,江苏 连云港 222000

[摘要] 目的:建立一种基于重组酶聚合酶扩增(recombinant polymerase amplification, RPA)和侧向流动试纸条(lateral flow strips, LFS)的嗜麦芽窄食单胞菌快速可视化检测方法。方法:以嗜麦芽窄食单胞菌特异性序列(NC_010943.1)为模板,设计RPA引物。通过基础型RPA反应和琼脂糖凝胶电泳,根据候选引物对的扩增性能及引物二聚体的形成情况筛选最佳引物对。根据最佳引物对,设计探针和修饰引物。在引物和探针中引入碱基错配以消除假阳性信号,建立RPA-LFS反应体系。根据检测线的显色情况,优化RPA-LFS的最佳反应条件。使用临床常见的12种致病菌和12个临床来源的嗜麦芽窄食单胞菌检测该方法的特异性。以10倍梯度稀释的嗜麦芽窄食单胞菌基因组为模板,检测该方法的灵敏度。收集108例临床样本,将该方法与qPCR检测法和生化培养法对比,对RPA-LFS检测法进行kappa一致性检验及临床应用评价。结果:RPA-LFS检测法在37℃恒温条件下8 min即可完成扩增反应,1 min内可在LFS上观察到结果。该方法灵敏度高,最低检出限为1.107 CFU,并且与其他病原菌无交叉反应,特异性强。应用于临床样本检测时,该方法与qPCR相比,检测结果准确性一致。与生化培养方法的符合率为99.07%,kappa指数值为0.972,具有良好的一致性。结论:本研究建立了一种不依赖于精密仪器和专业技术人员的RPA-LFS检测方法,能够短时间内精准鉴定嗜麦芽窄食单胞菌。该方法的建立可为及时制定合理的抗菌治疗方案提供信息,具有较大的临床应用潜力。

[关键词] 嗜麦芽窄食单胞菌;重组酶聚合酶扩增;侧向流动试纸条**[中图分类号]** R446.5**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2024)01-024-08**doi:** 10.7655/NYDXBNSN230558

Establishment and application of a rapid and visual detection method of *Stenotrophomonas maltophilia* by recombinant polymerase amplification combined with lateral flow strip

JI Tuo^{1,2},GAO Yuzhi^{1,2},WANG Yan^{1,2},GAO Xuzhu^{1,2*}¹Department of Central Laboratory, Lianyungang Hospital Affiliated to Jiangsu University, Lianyungang 222000;²Department of Central Laboratory, Lianyungang Hospital Affiliated to Kangda College of Nanjing Medical University, Lianyungang 222000, China

[Abstract] **Objective:** To develop a rapid and visual detection method of *Stenotrophomonas maltophilia* (*S. maltophilia*) by recombinant polymerase amplification (RPA) combined with lateral flow strip (LFS). **Methods:** RPA primers were designed based on specific sequences (NC_010943.1) of *S. maltophilia*. Through basic RPA reaction and agarose gel electrophoresis, the best primer pair was selected according to the amplification performance and the formation of cross dimers. According to the best primer pair, the probe and modified-primer were designed. Base mismatches were introduced into the primer and probe to eliminate false positive signals, and then the RPA-LFS reaction system was established. The optimal reaction conditions of RPA-LFS were optimized based on the color of the test line. The specificity of the method was identified by detecting 12 common clinically pathogens and 12 *S. maltophilia* of clinical origin. The sensitivity of this method was tested by diluting the genome template. Kappa analysis and clinical application evaluation of

[基金项目] 连云港市卫生科技项目(202217);连云港市第六期“521工程”科研资助立项项目(LYG06521202157);连云港市科技局重点研发计划(社会发展)(SF2224)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: alexgwan@163.com

RPA-LFS were performed by detecting 108 clinical samples, comparing with qPCR and culture-biochemical method. **Results:** The RPA-LFS detection method can complete the amplification process by reacting for 8 min under 37 °C, and the results can be observed on the LFS within 1 min. This method had high sensitivity and the limit of detection was 1.107 CFU/reaction. In addition, the RPA-LFS method had high specificity and no cross-reaction with other pathogens. Compared with qPCR, the RPA-LFS method showed the same accuracy. The results of RPA-LFS exhibited a high degree of consistency with the culture-biochemical method, with a kappa index of 0.972. **Conclusion:** This study has established a rapid and accurate RPA-LFS detection method for identifying *S. maltophilia*, which is independent of the precision instruments and the professional technician. The implementation of this method can provide valuable information for timely formulation of appropriate reasonable antibacterial treatment plans, and shows promise in clinical application.

[Key words] *Stenotrophomonas maltophilia*; recombinase polymerase amplification; lateral flow strip

[J Nanjing Med Univ, 2024, 44(01):024-031]

嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*, *S. maltophilia*, SMA)是一种革兰阴性条件致病菌,广泛存在于自然和医院环境中,是医院获得性感染的重要病原菌之一,位于临床分离的非发酵菌第三位^[1],环境或临床分离株表现出多种抗生素和抗逆性表型^[2]。SMA危及免疫功能低下人群的生命安全^[3],最常见的临床表现是肺炎、菌血症、伤口感染和尿路感染^[4]。目前,临床采用常规的生化培养法鉴定SMA耗时较长,易耽误治疗^[1]。选择性培养基可以根据SMA的分泌物产生颜色反应,以达到从混合菌株中鉴定SMA的目的^[5],但该方法需要建立严格无菌的环境且周期较长。聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术已被用于检测急性白血病或骨髓增生异常综合征化疗患者血液

样本中的SMA^[6],该方法虽然检测时间短、精度高,但受限于精密仪器和专业技术人员,难以打破实验室的壁垒,无法实现现场即时检测(point of care testing, POCT)。因此,建立一种便捷、灵敏的检测方法,对于快速诊断SMA至关重要。

重组聚合酶等温扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA)是一种不依赖于精密仪器、可在37 °C恒温、短时间内扩增目的基因的核酸扩增技术^[7-8]。侧向流动试纸条(lateral flow strips, LFS)是以纳米胶体金颗粒(Au nanoparticle, AuNP)作为信号标签的纸基即时检测装置^[9]。将LFS与RPA技术联合使用,可突破仪器和专业技术人员的限制,在较短时间内对扩增产物进行目视检测^[10-11]。RPA-LFS反应原理如图1所示。

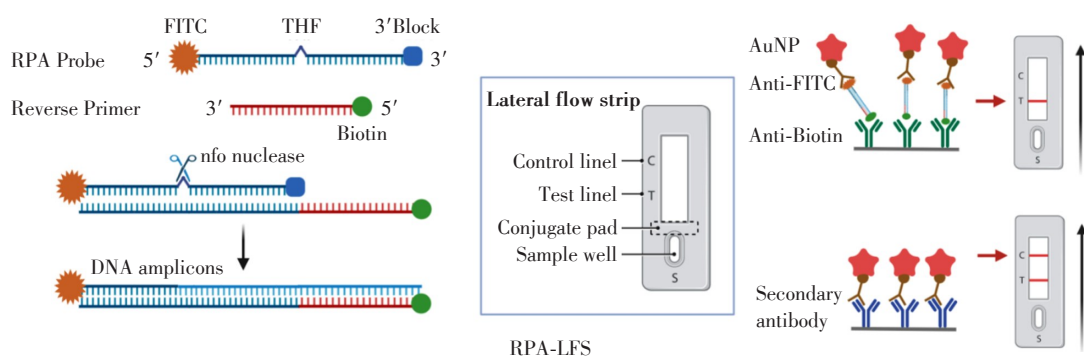


图1 RPA-LFS反应原理

Figure 1 The principle of RPA-LFS

目前,RPA-LFS已经被成功用于肺炎链球菌^[12]、肺炎克雷伯菌^[13]、白色念珠菌^[14]等病原菌的分子诊断^[15]。而对于SMA,RPA-LFS的检测方法还没有建立。本研究旨在建立一种改良的RPA-LFS技术,实现对SMA的快速检测。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

本研究所用的标准菌株列于表1,均由连云港

市第二人民医院提供。所有标准菌株保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱,使用前于 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 微生物培养箱活化。为验证 RPA-LFS 技术对临床标本的适用性,于2022年1—12月收集108例临床检验样本,其中57例来自痰液,30例来自尿液,21例来自血液。

表1 本研究所用标准菌株

Strains	ID Number
SMA	ATCC 17666
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	ATCC 29970
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 43300
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 700221
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 49247
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15692
<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	ATCC 00603
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Vibrio Parahaemolyticus</i>	ATCC 17802

1.1.2 主要仪器和试剂

微生物培养箱(上海BluePard公司),震荡培养箱(上海旻泉公司),超微量分光光度计(Quawell公司,美国),电热恒温水浴锅(上海精宏公司),电泳仪(Bio-Rad公司,美国),全自动凝胶成像分析系统(上海培清公司),细菌基因组提取试剂盒(北京天根公司),基础型RPA试剂盒、nfo型RPA试剂盒、侧向流动试纸条(常州安普未来公司)。

1.2 方法

1.2.1 微生物基因组提取

将冻存的SMA接种于哥伦比亚血琼脂平板,置于 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 微生物培养箱培养24 h。挑取培养皿上的单菌落,置于5 mL Luria-Bertani培养基中,在 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 振荡培养箱中震荡培养12 h。根据细菌基因组提取试剂盒说明书提取SMA基因组DNA,保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。基因组DNA浓度使用超微量分光光度计定量。其他标准菌株和临床分离的SMA使用加热煮沸法提取DNA。菌株培养后,挑取菌苔置于 $100\text{ }\mu\text{L}$ Tris-EDTA中, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热煮沸10 min,释放基因组DNA。基因组提取液冷却后, $12\text{ }000\text{ r/min}$ 离心5 min,取上清转移至无菌EP管,保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。用于RPA-LFS检测的临床样本,使用加热煮沸法粗提基因组。 $12\text{ }000\text{ r/min}$ 离心5 min,沉淀溶于

$100\text{ }\mu\text{L}$ Tris-EDTA中, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热煮沸10 min,释放基因组DNA。

1.2.2 引物设计及RPA反应

在美国国家生物技术信息中心网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)检索SMA特异性序列NC_010943.1。使用Primer premier 5软件设计引物对,由通用生物有限公司(中国)合成。引物设计原则如下:引物长度30~35 bp;GC含量30%~70%;扩增子长度100~500 bp;最大单核苷酸重复长度为5。使用基础型RPA试剂盒筛选最佳引物对。RPA反应体系共 $50\text{ }\mu\text{L}$,向含有酶组分的反应管中加入 $29.4\text{ }\mu\text{L}$ 反应缓冲液、 $2.4\text{ }\mu\text{L}$ $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 上游引物(F)、 $2.4\text{ }\mu\text{L}$ $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 下游引物(R)、 $13.3\text{ }\mu\text{L}$ 基因组模板和 $2.5\text{ }\mu\text{L}$ 280 nmol/L 醋酸镁溶液。上下颠倒充分混匀反应管内溶液,瞬时离心。将反应管置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅孵育30 min。RPA反应完成后,使用等体积的苯酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)混合液抽提RPA扩增产物。 $12\text{ }000\text{ r/min}$ 离心5 min,取上清,加入适量DNA上样缓冲液,通过2%琼脂糖凝胶电泳分离(90 V,30 min),在紫外灯下观察RPA反应产物。

1.2.3 探针设计及RPA-LFS反应

根据RPA反应筛选出最佳引物对后,将上游引物向3'端方向延长16 bp即为探针序列。探针的5'端使用FITC标记,3'端使用C3-间臂基团(3'-Block)修饰,探针中部的一个碱基使用四氢呋喃(tetrahydrofuran, THF)取代,其中至少30 bp位于THF位点的5'端,至少15 bp位于其3'端。下游引物的5'端使用生物素(Biotin)标记。RPA-LFS反应体系共 $50\text{ }\mu\text{L}$,向含有酶组分的反应管中加入 $29.4\text{ }\mu\text{L}$ 反应液、 $2.1\text{ }\mu\text{L}$ $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 上游引物、 $2.1\text{ }\mu\text{L}$ $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 下游引物、 $0.6\text{ }\mu\text{L}$ $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 探针、 $13.3\text{ }\mu\text{L}$ 基因组模板溶液和 $2.5\text{ }\mu\text{L}$ $280\text{ }\mu\text{mol/L}$ 醋酸镁溶液。上下颠倒充分混匀反应管内溶液,瞬时离心。将反应管置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅孵育12 min。使用双蒸水将反应产物稀释20倍,取 $50\text{ }\mu\text{L}$ 稀释液滴加入试纸条的加样孔中,等待显色。

1.2.4 特异度检验

为检测RPA-LFS体系的特异度,使用该方法检测了其他12种临床常见标准菌株和12株临床来源的SMA,检测方法如前文所述。

1.2.5 灵敏度检验

使用双蒸水梯度稀释SMA基因组DNA(1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 10 CFU/mL)用于检测RPA-LFS体系的灵敏度。取 $1\text{ }\mu\text{L}$ 基因组DNA稀

释液加入 RPA-LFS 反应管中,补双蒸水至 13.3 μL ,使得每个反应分别含有 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、10、1、 1×10^{-1} 、 1×10^{-2} CFU SMA 的基因组,其余步骤如前文所述。每组浓度进行 10 次独立实验,通过对 10 个独立实验的概率回归分析,确定该方法的最低检测限(limit of detection, LOD),即 95% 的概率检测出阳性产物的最低浓度。

1.2.6 临床标本检测

通过与生化培养法和 qPCR 检测法进行比较来评估 RPA-LFS 法在临床标本检测中的实际应用价值。用于生化培养法和 qPCR 检测法检测的临床样本使用选择培养基进行培养,置于 35 $^{\circ}\text{C}$ 微生物培养箱培养 18~48 h。VITEK 2 全自动微生物分析系统进行菌种鉴定。根据基因序列 NC_010943.1 设计 qPCR 引物^[16],按照操作流程对临床样本使用 qPCR 法进行检测。qPCR 法步骤如下:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min 后进入循环阶段,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s,共 40 个循环。根据公式:(共同阳性

样本个数+共同阴性样本个数) \div 样品总数 $\times 100\%$,计算 RPA-LFS 法与另外两种方法的符合率,通过 kappa 指数来评估该方法与其他方法的一致性。

1.3 统计学方法

实验结果用 SPSS 13.0 软件分析。对临床检测数据进行 kappa 一致性检验,kappa 值 > 0.8 表示一致性较强, $P < 0.05$ 表明 kappa 值可靠。

2 结果

2.1 引物和探针设计

根据 SMA 特异性基因序列 NC_010943.1 设计出 4 组引物对(表 2),对 4 组候选引物对进行基础型 RPA 反应(图 2A)。4 组引物对均产生了与预期大小一致的靶向条带,分别为 470、163、369、189 bp,但在无模板对照(no template control,NTC)中出现了少量小于 100 bp 的引物二聚体条带。相比之下,引物对 1 具有较亮的目标条带,并且无肉眼可见的引物二聚体。因此,选择引物对 1 用于探针的设计。

表 2 RPA 引物对序列

Table 2 RPA primer sequences

Primer pair	Name	Primer sequence(5'→3')	Primer length(bp)	Product length(bp)
Set 1	SMA-F1	TGAACGAAGGCAAGATCCACGGCTACATCTG	31	470
	SMA-R1	CTTGCCGTGTATTCCATCGCCAGTTCCTC	30	
Set 2	SMA-F2	CTACCCGAAGTTCACGTCAGCCTGATGAA	30	163
	SMA-R2	GCAGATGTAGCCGTGGATCTTGCCCTCGTT	30	
Set 3	SMA-F3	CACCTCTGGACCAAGCACGGCAAGTTGAAC	30	369
	SMA-R3	GATTGCAGTGACATGGCGTGTCTCTACAC	30	
Set 4	SMA-F4	GAGCGAACAGTCGTGGACGGTGATGAAGTT	30	189
	SMA-R4	ATGCAGTCTCTTCTGGAAGTCGACGATG	30	

F: Forward primer. R: Reverse primer.

根据引物对 1 的上游引物设计探针,修饰后的探针和引物见表 3,通过 RPA-LFS 检测引物探针组合 F1/R1/P1 的扩增性能及时确定是否存在假阳性的情况。结果如图 2B 所示,F1/R1/P1 引物-探针组合提供了正确的阳性信号(检测线和质控线上都有可见的红色条带),这表明 F1/R1/P1 引物-探针组合具有良好的扩增性能。然而,在无模板对照组中,检测线上也显示出一条可见的弱化红带,表明 F1/R1/P1 引物探针组合存在假阳性扩增。考虑到 RPA 反应环境下可能发生不利的引物相互作用,产生较低分子量的 DNA 副产物(< 100 bp),即“引物噪音”。为减少“引物噪音”的产生,本研究在引物中适当引入了碱基错配。错配原则如下:对具有 4 个以上连续配对碱基的区域进行碱基错配;靠近 3' 端

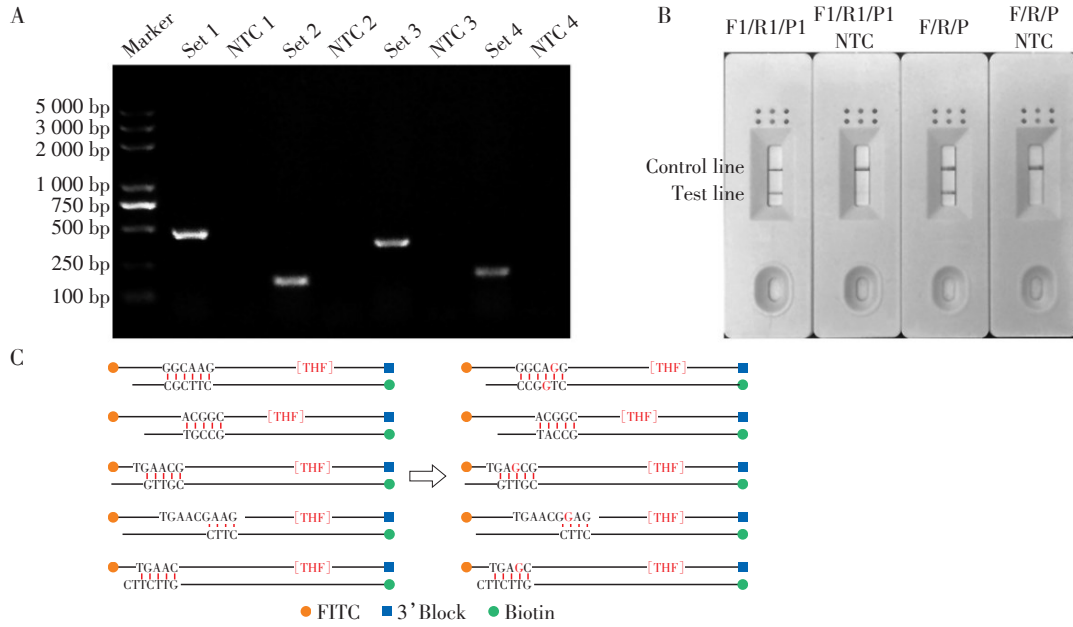
的 3 个碱基不能替换;每条引物上替换的碱基不超过 5 个;不能有连续的 2 个碱基替换;优先使用 A-G 互换、T-C 互换。F1/R1/P1 引物-探针组合可产生的引物二聚体和碱基错配如图 2C 所示。当引入适当碱基错配后,无模板对照组的假阳性信号消失(图 2B),后续实验使用 F/R/P 引物-探针组合。

2.2 RPA-LFS 反应条件的优化

为实现 RPA 反应条件的最优化,对其反应时间和温度进行了改良。控制反应温度为 37 $^{\circ}\text{C}$,将反应时间分别设置为 0、2、4、6、8、10、12 min(图 3A)。结果显示,反应 4 min 时检测线出现颜色较弱的条带,在 8 min 时检测线条带清晰明亮。8 min 后,随着反应时间的延长,检测线无明显变化。控制反应时间,分别在 22、27、32、37、42、47、52 $^{\circ}\text{C}$ 进行 RPA 扩增

(图3B)。在反应温度为22℃时,检测线无条带,27℃时检测线出现较浅的条带。反应温度在37℃~42℃,具有较为清晰的阳性条带。考虑到RPA-LFS反应体系所需的酶不耐高温,推测反应温度为52℃

时,无目的产物的扩增。与假设相符,当反应温度达到52℃时,检测线无条带。综合时间、经济成本,RPA-LFS法的最佳反应条件为37℃,反应8 min。后续实验将采用该条件进行。



A: The RPA results was visualized by agarose gel. B: RPA-LFS results before and after base mismatch. C: Schematic diagram of base mismatch sites.

图2 最佳引物对筛选及探针设计

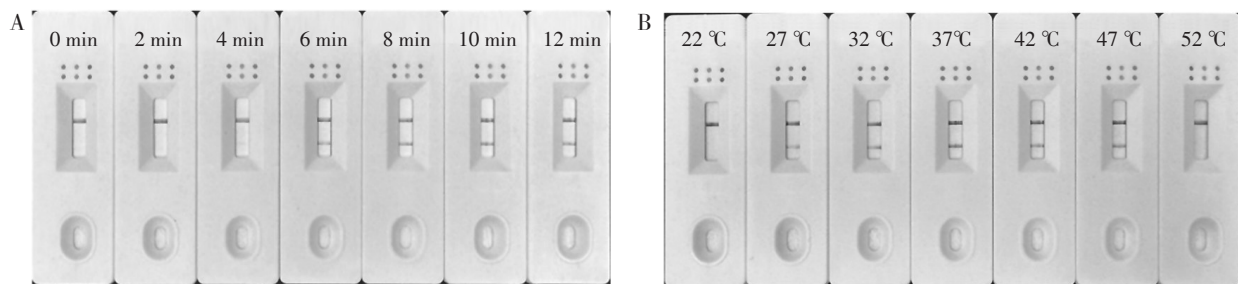
Figure 2 Optimal primers for screening and probe design

表3 RPA-LFS 探针序列

Table 3 RPA-LFS probe sequences

Name	Sequences(5'→3')	Length(bp)
F1	TGAACGAAGGCAAGATCCACGGCTACATCTG	31
R1	Biotin-CTTGCCGTTGTATTCCATCGCCAGTTCTTC	30
P1	FITC-TGAACGAAGGCAAGATCCACGGCTACATCT[THF] CAGGGCTTCAATCCGC-/C3-spacer/	47
F	TGAGCGGAGGCAGGATCCACGGCTACATCTG	31
R	Biotin-CTGCCATTCTATTCCATCGCCAGTTCTTC	30
P	FITC-TGAGCGGAGGCAGGATCCACGGCTACATCTG[THF] CAGGGCTTCAATCCGC-/C3-spacer/	47

F: Forward primer. R: Reverse primer. P: Probe. The underline represents the base mutation site. The red font represents a modification.



A: Optimization of the reaction time for RPA-LFS. B: Optimization of the reaction temperature for RPA-LFS.

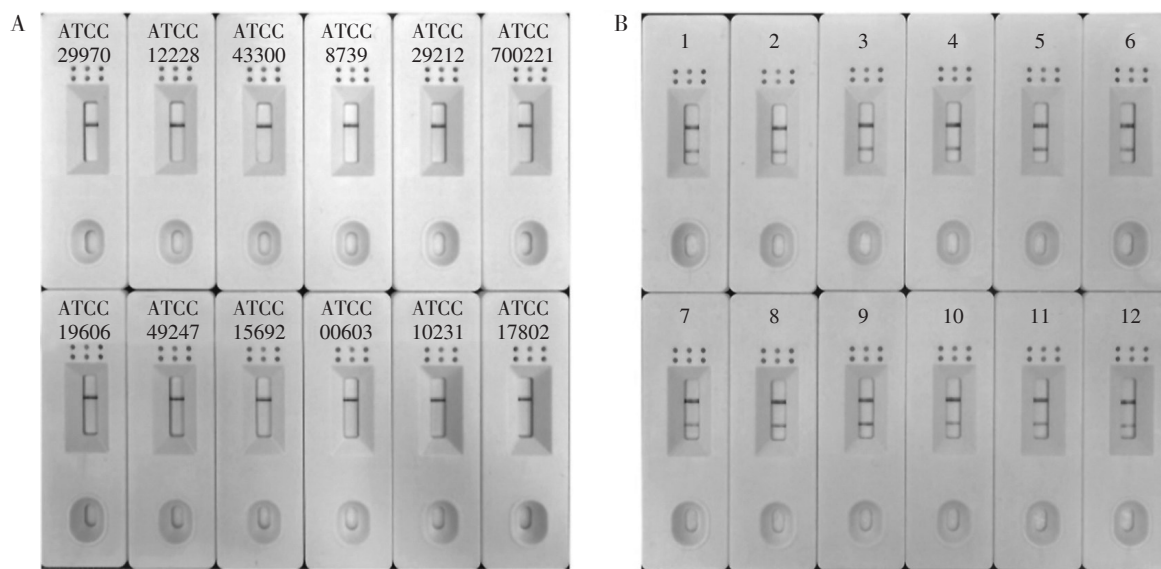
图3 RPA-LFS 反应时间和温度的优化

Figure 3 Optimization of RPA-LFS reaction conditions

2.3 RPA-LFS检测的特异性分析

为评价RPA-LFS检测法是否能特异性检测SMA,使用12种临床常见致病菌和12株SMA临床分离株进行RPA-LFS检测。如图4A所示,使用其他致病菌基因组作为RPA-LFS反应模板时,检测线

未出现阳性信号,当使用临床分离的SMA基因组DNA作为模板时,检测线上出现了明显的阳性信号(图4B)。结果表明,建立的RPA-LFS检测体系对SMA具有良好的特异性,与其他病原菌无交叉反应。



A: RPA-LFS method for detecting 12 common pathogens. B: RPA-LFS method was used to detect 12 clinical sources of SMA.

图4 RPA-LFS特异性检测

Figure 4 Specificity of the RPA-LFS assay

2.4 RPA-LFS检测的灵敏度分析

为评估RPA-LFS方法的最低检测限,以梯度稀释的SMA基因组DNA为反应模板。反应体系中含有 1×10^4 CFU基因组时,检测线上出现强的阳性信号,随着模板浓度的降低,阳性条带的颜色减弱。当浓度低至 1×10^{-1} CFU时,阳性信号完全消失(图5A)。此外,为了进一步确定RPA-LFS检测的准确LOD,对所有浓度进行10次独立的检测。结果显示,当反应体系中基因组含量为1 CFU时,有9次为阳性结果,基因组含量为 1×10^{-1} CFU时,有1次结果呈阳性。通过SPSS软件对10次检测的结果进行probit回归分析(图5B)。在95%的阳性概率下,RPA-LFS反应的最低检测限为1.107 CFU。为了测试该系统是否能抵抗其他物种基因组的干扰,除了在反应体系中加入SMA基因组外,额外加入10 ng的人类基因组DNA。结果显示,该方法检测灵敏度不受人类DNA的影响(图5C)。

2.5 RPA-LFS在临床标本检测中的应用

通过与qPCR法^[16]和传统生化培养法比较,评估RPA-LFS方法在临床中的实际应用价值(表4)。

对收集的108例临床标本进行检测,结果显示,RPA-LFS法和qPCR法检测108例标本中有23例样本呈现SMA阳性,而采用生化培养法只检测出22例样本为阳性。建立的RPA-LFS方法与qPCR法的符合率为100%。RPA-LFS与传统生化培养方法的阳性符合率为99.07%,kappa指数值为0.972, $P < 0.001$,说明RPA-LFS与传统生化培养方法一致性较好。

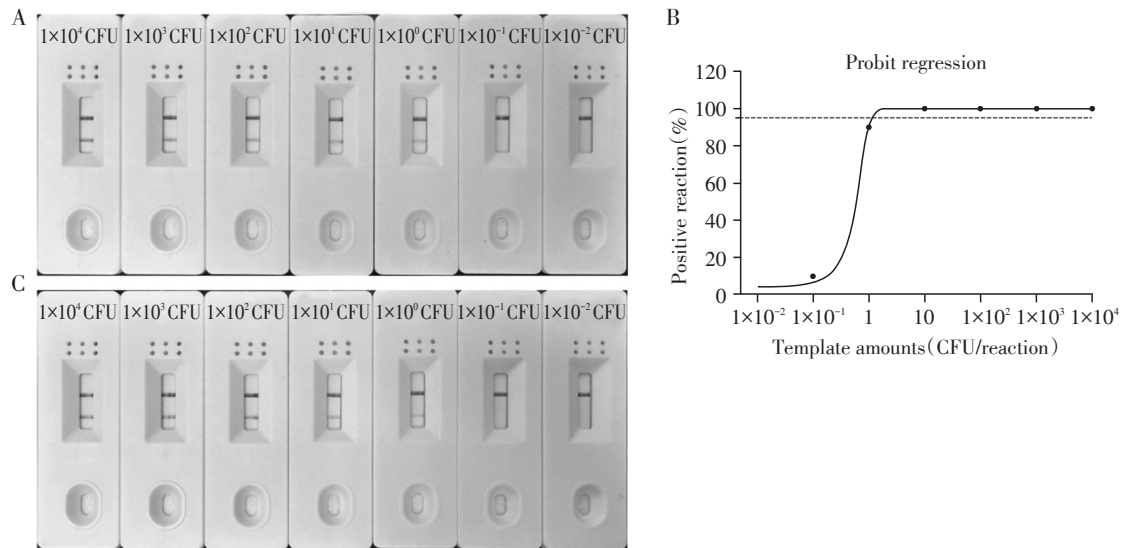
表4 RPA-LFS与qPCR法和传统生化培养法比较

Table 4 Comparison of RPA-LFS, qPCR, and traditional bacterial culture method

Methods	Positive samples	Negative samples	Total samples	Test time
RPA-LFS	23	85	108	< 20 min
qPCR	23	85	108	About 90 min
Bacterial culture	22	86	108	About 2 d

3 讨论

病原微生物的即时、精确诊断是临床检验不可忽视的难点之一。本研究开发了一种改良型的RPA-LFS方法,用于检测SMA,既实现了SMA的快



A: The sensitivity of RPA-LFS system was measured using different concentrations of SMA genomes. B: The LOD of the RPA-LFS was estimated with a probit regression model by SPSS, the horizontal dashed line represents 95% detection limit. C: Human genomic DNA was added in the RPA-LFS system to determine anti-interference capacity of the RPA-LFS assay.

图5 RPA-LFS检测的灵敏度分析

Figure 5 The sensitivity of the RPA-LFS assay

速检测,也拓宽了RPA-LFS的应用范围。

SMA常与金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌等混合生长^[1],传统的微生物分离培养技术对于鉴定SMA具有一定挑战性。PCR技术快速准确、灵敏度高,但该方法需要复杂的反应仪器且用时较长,不适用于病原微生物的快速检测^[17]。相比其他分子扩增技术,RPA可在较低的温度中进行,不依赖于仪器的精准温控,有利于POCT的发展^[8]。将RPA技术与LFS检测方法联合使用,可在短时间内实现对靶基因的快速可视化检测。在RPA-LFS反应过程中,DNA聚合酶从上游引物的3'端开始移位以产生较小的扩增子,从断裂探针的3'端开始移位产生双标记扩增子(主要扩增子),用于下游试纸条的“三明治”检测^[18]。

本研究根据SMA特异性序列(NC_010943.1)设计引物和探针。该基因序列由Fraser等^[16]于2019年首次鉴定为SMA的保守序列,可用于SMA的鉴定。在设计探针过程中,发现下游引物和探针产生的引物二聚体会导致假阳性信号的发生,因此本研究引入碱基错配以避免假阳性信号。文献报道,RPA反应可允许少许错配碱基的引入^[19],但要避免在3'端引入错配。在引入错配碱基后,本研究建立了适用于特异性检验SMA的引物-探针序列F/R/P。值得注意的是,扩增效率及扩增产物检测效能理论上逊色于错配前的引物探针组合,但考虑

到检测的特异性,这种错配不可避免。通过优化反应时间和温度,确定了RPA-LFS体系的最佳反应条件为37℃,扩增时间为8min。根据probit回归分析,确定该体系检测SMA的最低检出限为1.107CFU,且灵敏度不受其他物种基因组干预。通过对108例临床来源的微生物样本进行检测以验证临床适用性,我们建立的RPA-LFS方法与qPCR检测结果相符,具有一致性。但由于反应时间的缩短、检测设备的简易,以及碱基错配位点的引入,RPA-LFS体系的灵敏度略低于qPCR检测法^[16]。与传统的“金标准”生化培养法相比,RPA-LFS较为灵敏且不需要经过纯化步骤,大大缩短检测时间,两种检测方法的阳性符合率为99.07%,kappa指数值为0.9718,对比差异无统计学意义,说明两种方法具有良好的一致性。22例均被定义为SMA阳性的样本,其患者临床诊断为SMA感染,经抗菌药物治疗后康复。其中不一致的1例样本被全自动微生物鉴定仪定义为鲍曼不动杆菌,来源于痰液,其误差原因可能为技术人员在分离纯化时操作失误。由于非无菌部位标本常常有多种细菌生长,即使看似较纯的菌落,下面也有可能掩盖不易觉察的小菌落。该患者在治疗过程中,重新采取痰液并分离纯化,经全自动微生物鉴定仪检测,确诊感染SMA。因此,实验人员不能过分依赖仪器,动手操作时也要刻画入微,避免误差。

本研究开发了一种敏感且特异、适用于SMA的RPA-LFS检测方法,该方法打破了昂贵仪器的桎梏,可以在条件有限的环境使用。尽管已经完成了改进和临床适用性评估,但这种方法还具有一些局限性:①开发和测试只在本地实验室中进行,缺乏大规模样本量分析检测,无法实现真正意义上的POCT;②与传统“金标准”检测方法的比较仍需要大量样本的验证;③RPA-LFS技术尚未能实现高通量检测,只能通过多次RPA反应来鉴定菌株和耐药基因。未来需要致力于高通量RPA-LFS技术的建立,以及一体化核酸提取-RPA反应-检测仪器的开发,以便医疗资源的合理利用和POCT的发展。现有的RPA技术可作为PCR检测技术的重要补充,缩短检测时间,便于治疗的及时性^[20]。目前,RPA-LFS正处于向临床应用过渡的阶段^[8]。尽管如此,我们建立的RPA-LFS方法对于检测SMA感染仍具有广阔的应用前景。

[参考文献]

- [1] 周 华,李光辉,卓 超,等.中国嗜麦芽窄食单胞菌感染诊治和防控专家共识[J].中华医学杂志,2013,93(16):1203-1213
- [2] AN S Q, BERG G. *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. Trends Microbiol, 2018, 26(7): 637-638
- [3] LOONEY W J, NARITA M, MÜHLEMANN K. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen[J]. Lancet Infect Dis, 2009, 9(5): 312-323
- [4] ADEGOKE A A, STENSTRÖM T A, OKOH A I. *Stenotrophomonas maltophilia* as an emerging ubiquitous pathogen: looking beyond contemporary antibiotic therapy [J]. Front Microbiol, 2017, 8: 2276
- [5] ADJIDÉ C C, DE MEYER A, WEYER M, et al. A sensitive, specific and predictive isolation medium developed for *Stenotrophomonas maltophilia* study in healthcare settings[J]. Pathologie-biologie, 2010, 58(1): 11-17
- [6] NAKAMURA A, SUGIMOTO Y, OHISHI K, et al. Diagnostic value of PCR analysis of bacteria and fungi from blood in empiric-therapy-resistant febrile neutropenia[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(6): 2030-2036
- [7] PIEPENBURG O, WILLIAMS C H, STEMPLE D L, et al. DNA detection using recombination proteins[J]. PLoS Biol, 2006, 4(7): e204
- [8] LI J, MACDONALD J, VON STETTEN F. Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification [J]. Anal, 2018, 144(1): 31-67
- [9] WANG Z, ZHAO J, XU X, et al. An overview for the nanoparticles-based quantitative lateral flow assay [J]. Small Methods, 2022, 6(1): e2101143
- [10] HIGGINS M, RAVENHALL M, WARD D, et al. Primed RPA: primer design for recombinase polymerase amplification assays[J]. Bioinform Oxf Engl, 2019, 35(4): 682-684
- [11] ZHENG C J, WANG K, ZHENG W, et al. Rapid developments in lateral flow immunoassay for nucleic acid detection[J]. Anal, 2021, 146(5): 1514-1528
- [12] WANG F, WANG Y, LIU X, et al. Rapid, simple, and highly specific detection of streptococcus pneumoniae with visualized recombinase polymerase amplification [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 878881
- [13] LI N, WANG L, WANG F, et al. Rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* carrying virulence gene rmpa2 by recombinase polymerase amplification combined with lateral flow strips [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 877649
- [14] WANG F, GE D B, WANG L, et al. Rapid and sensitive recombinase polymerase amplification combined with lateral flow strips for detecting *Candida albicans* [J]. Anal Biochem, 2021, 633: 114428
- [15] 施 奕,徐昌平,余蓓蓓,等.重组酶聚合酶扩增技术研究进展[J].病毒学报,2020,36(3):522-532
- [16] FRASER T A, BELL M G, HARRIS P N A, et al. Quantitative real-time PCR assay for the rapid identification of the intrinsically multidrug-resistant bacterial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia* [J]. Microb Genom, 2019, 5(10): e000307
- [17] LUPPA P B, MÜLLER C, SCHLICHTIGER A, et al. Point-of-care testing (POCT): current techniques and future perspectives[J]. Trends Anal Chem, 2011, 30(6): 887-898
- [18] LOBATO I M, O'SULLIVAN C K. Recombinase polymerase amplification: basics, applications and recent advances[J]. Trends Anal Chem, 2018, 98: 19-35
- [19] DAHER R K, STEWART G, BOISSINOT M, et al. Influence of sequence mismatches on the specificity of recombinase polymerase amplification technology[J]. Mol Cell Probes, 2015, 29(2): 116-121
- [20] 尚美云,邓少丽,鲁卫平,等.重组酶聚合酶扩增技术原理及其在医学检验中的应用进展[J].中华检验医学杂志,2022,45(4):423-427

[收稿日期] 2023-06-02

(本文编辑:蒋 莉)