

基于重组酶介导等温扩增技术-规律间隔成簇短回文重复序列/相关蛋白系统检测肺炎克雷伯菌方法的建立及评价

曹亚玲¹ 房忠军² 徐玲¹ 姜彬彬³ 张向颖¹ 黄晶⁴ 任锋¹

【摘要】目的 建立基于重组酶介导等温扩增技术(RAA)-规律间隔成簇短回文重复序列/相关蛋白(CRISPR-Cas13a)系统检测肺炎克雷伯菌(KP)的方法。**方法** 设计筛选检测KP特异的CRISPR RNA(crRNA)和RAA引物对,建立基于RAA-CRISPR-Cas13a技术快速准确检测KP的方法。RAA-CRISPR系统和荧光定量PCR(RT-qPCR)方法比较使用合成的KP质粒。从铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、大肠埃希菌和肺炎链球菌临床菌株中提取基因组DNA,进行RAA-CRISPR检测,评估该方法的特异性。收集2023年4月至2024年3月中国医学科学院北京协和医院50份临床样本(包含30份细菌培养KP阳性样本和20份KP阴性样本),分别使用RAA-CRISPR和RT-qPCR方法进行KP检测,比较两种方法的灵敏度、阳性符合率和阴性符合率。结果数据应用方差分析和配对 t 检验方法进行分析。**结果** 使用KP阳性质粒筛选出检测KP效果最佳的crRNA和RAA引物,建立了CRISPR-Cas13a检测KP的方法。CRISPR-Cas13a检测KP质粒的灵敏度可达1拷贝/ μ l,高于RT-qPCR(10拷贝/ μ l);特异性评价结果显示,未与非靶标菌株产生交叉反应,提示CRISPR-Cas13a系统特异性较好。样本检测以细菌培养为金标准,RAA-CRISPR和RT-qPCR两种方法的灵敏度分别为100%(30/30)和83.3%(25/30);两种检测方法的阳性符合率分别为100%(30/30)和83.3%(25/30),阴性符合率均为100%。**结论** 本研究将RAA扩增技术与CRISPR-Cas13a技术相结合,建立了准确检测KP的方法,该方法可精准检测KP,有助于临床诊断KP感染以进行及时有效地治疗。

【关键词】 肺炎克雷伯菌;重组酶介导等温扩增技术;规律间隔成簇短回文重复序列/相关蛋白;分子诊断

Establishment and evaluation of a recombinase aided amplification-clustered regularly interspaced short palindromic repeats/associated protein system for detecting *Klebsiella pneumoniae* Cao Yaling¹, Fang Zhongjun², Xu Ling¹, Jiang Binbin³, Zhang Xiangying¹, Huang Jing⁴, Ren Feng¹. ¹Beijing Institute of Hepatology/Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China; ²Department of Clinical Laboratory, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China; ³Department of Clinical Laboratory, Beijing Daxing District Huangcun Hospital, Beijing 102600, China; ⁴Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Department of Infection Control, Beijing 100730, China

Corresponding author: Ren Feng, Email: renfeng7512@ccmu.edu.cn

【Abstract】Objective To establish a method for detection of *Klebsiella pneumoniae* (KP) based on recombinase aided amplification (RAA)-clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2025.02.002

基金项目: 国家自然科学基金(No. 82002243); 北京自然科学基金和北京市教委联合资助重点项目(No. KZ202010025035); 北京市自然科学基金-昌平创新联合基金(No. L234046); 北京市医院管理中心“青苗”计划专项(No. QML20201702); 北京市医管局“登峰”人才计划(No. DFL20221503); 高层次公共卫生技术人才建设项目(No. 学科带头人-02-13)

作者单位: 100069 北京, 首都医科大学附属北京佑安医院/北京肝病研究所¹; 100069 北京, 首都医科大学附属北京佑安医院检验科²; 102600 北京, 北京市大兴区黄村医院检验科³; 100730 北京, 中国医学科学院北京协和医院医院感染管理处⁴

通信作者: 任锋, Email: renfeng7512@ccmu.edu.cn

CRISPR-associated protein (CRISPR-Cas13a) system. **Methods** CrRNA and RAA primer pairs were designed and screened for the detection of KP gene, while a rapid and accurate method for the detection of KP gene was developed based on RAA-CRISPR-Cas13a technology. The RAA-CRISPR and real time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) methods were compared by the synthesized KP plasmid. Genomic DNA was extracted from clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Streptococcus pneumoniae* for RAA-CRISPR detection to evaluate the specificity of this method. Total of 50 clinical samples (including 30 KP culture-positive samples and 20 KP-negative samples) collected from Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, from April 2023 to March 2024 were detected for KP through both RAA-CRISPR and RT-qPCR. The sensitivity, positive agreement rate and negative agreement rate of both methods were compared, respectively. Statistical analysis of data was performed by ANOVA and paired *t*-tests. **Results** The optimal crRNA and RAA primers for KP detection were selected by KP-positive plasmids, and CRISPR-Cas13a-based KP detection method was established successfully. The detection sensitivity of CRISPR-Cas13a for KP plasmids reached 1 copy/μl, higher than that of RT-qPCR (10 copies/μl). The specific evaluation results showed that there was no cross-reactivity with non-target strains, indicating that CRISPR-Cas13a system was specific. Among the sample detection, the sensitivity of RAA-CRISPR and RT-qPCR were 100% (30/30) and 83.3% (25/30), respectively, using bacterial culture and mass spectrometry technology as the gold standard. The positive concordance rate of both detection were 100% (30/30) and 83.3% (25/30), and the negative concordance rate was 100%. **Conclusions** A method was established to accurately detect KP gene by RAA amplification technology and CRISPR-Cas13a system. This method can accurately detect KP gene, which can help diagnose KP infection for timely and effective treatment.

【Key words】 *Klebsiella pneumoniae*; Recombinase aid amplification; Clustered regularly interspaced short palindromic repeats sequences/relevant nucleases; Molecular diagnostic

肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*, KP) 是一种革兰阴性杆菌, 常引起急性呼吸道感染, 尤其是院内获得性感染^[1-2]。2009至2019年, 我国一项全国前瞻性监测显示, KP是急性呼吸道感染者的3种主要病原体 (即肺炎链球菌、肺炎支原体和KP) 之一^[3]。近年来, 随着多重耐药分离株和高毒力变异株的出现, KP已成为全球公共卫生的重大威胁^[4-6]。在一些国家和地区, KP种群高度多样化, 耐药菌株在几年内已蔓延到全国各地^[7-8]。然而, 现有的KP常规检测方法, 如生化鉴定和基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 需要分离培养KP, 耗时长、阳性检出率低, 不能满足临床诊疗的需求。因此, 建立一种快速、准确的KP检测方法用以早期诊断和治疗KP感染十分必要。

规律间隔成簇短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) /及相关蛋白 (CRISPR-associated protein, Cas) 组成的CRISPR-Cas系统作为一种新型核酸检测技术, 因其具有高灵敏度和高特异性的优势, 在过去十年中受到广泛关注并取得了很大进展。Cas13a效应蛋白是1种RNA引导的CRISPR效

应蛋白, 其具有“附带切割”特性, 一旦CRISPR RNA (crRNA) 识别并结合目标序列, 不仅可以切割目标核酸序列, 还能切割其他非目标核酸序列^[9]。利用这一特性, 多项研究应用“夏洛克”分子诊断技术平台 (SHERLOCK) 将CRISPR/Cas系统与重组酶聚合酶扩增 (recombinase polymerase amplification, RAA) 结合建立了精准快速检测登革热病毒和人乳头瘤病毒等多种病原体核酸的检测技术^[10-12]。RAA是一种恒温核酸快速扩增技术, 因其快速、便捷的优势, 为核酸即时检测 (point-of-care testing, POCT) 提供了新方法。该技术利用重组酶、单链结合蛋白 (single-stranded DNA-binding protein, SSBP) 和DNA聚合酶 (DNA-dependent DNA polymerase, DNA pol) 可在恒温条件下 (37 °C) 进行核酸扩增。本研究将RAA和CRISPR-Cas13a结合, 建立了高灵敏、高特异检测KP的方法, 现报道如下。

资料与方法

一、样本收集

收集2023年4月至2024年3月中国医学科学院北京协和医院50份临床样本, 包含30份细菌培养

KP阳性样本(10份痰液样本、18份血液样本和2份脑脊液样本)和20份KP阴性样本用于本研究检测方法的临床验证。痰液样本经过评估均为合格样本(质量评估标准为:涂片镜检中每个低倍视野下白细胞数量>25个,且上皮细胞数量<25个为合格样本)。收集其他常见细菌菌株:铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, AB)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)和肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, SP)提取细菌基因组,同时使用CRISPR-Cas13a方法检测KP,通过反应荧光强度评价CRISPR-Cas13a方法检测KP的特异性。

本研究通过中国医学科学院北京协和医院伦理委员会审批(审批号:K23C1032)。本研究属于非干预性研究,即研究过程中不与患者产生直接接触,不涉及患者个人隐私,因此豁免知情同意。

二、方法

1. 仪器与试剂:普通PCR扩增仪(美国Bio-Rad公司)、RAA核酸扩增试剂盒(中国众测生物科技有限公司)、ViiATM7 Real-Time PCR System荧光定量PCR仪(美国Applied Biosystems公司)、BIO-RAD QX200数字PCR仪(美国Bio-Rad公司)、磁珠法通用型基因组DNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)、细菌DNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)、NTP Mix(英国BBI公司)、T7 RNA聚合酶(美国NEB公司)荧光报告RNase Alert v2(美国Invitrogen™公司)。

2. RAA引物crRNA和探针的设计和筛选:应用KP溶血素(khe)基因作为靶基因鉴定KP,该基因较为特异,在以往研究中也常用来鉴定KP^[13-14]。

根据RAA引物设计原则,使用Primer 3(在线引物设计网站)设计4对RAA扩增引物对(长度约30 bp),3条特异的crRNA序列(在KP保守序列上下游引物的序列之间,挑选3个位点,作为检测KP DNA的crRNA靶位点,并设计相应的crRNA序列)。所设计的RAA引物序列如下(5'→3'):
KP-RAA-F1: aattctaatacgactcactataggggaaaaccacgctgtcgccgggtccagc; KP-RAA-F2: aattctaatacgactcactataggggtgtcgccgggtccagcttcagagatag; KP-RAA-R1: tatccacacgcggagagcgatgaggaagag; KP-RAA-R2: ggcggcgcacctcttatccacacgcggaga。所设计的crRNA对应的靶点序列如下: crRNA1: acttctggatagccctcagcacgtaga位于KP基因组第5 077

732~5 077 760位(GenBank ID: CP130264.1); crRNA2: tccacacttctggatagccctcagcac, (GenBank ID: CP130264.1第5 077 727~5 077 755位); crRNA3 cacttctggatagccctcagcacgtag, (GenBank ID: CP130264.1第5 077 731~5 077 759位)。RAA引物和crRNA筛选原理:观察CRISPR-Cas13a系统检测结束时(60 min时)的荧光信号值,荧光值越高提示扩增或检测效率越高。

所设计的荧光定量PCR引物和探针序列: RT-qPCR-F: 5'-CACCACCAGCAGACGAACCT-3'; RT-qPCR-R: 5'-TGCTACTTATCCCGACAGCC-3'; RT-qPCR-探针: 5'-GGATAAGAGGTGCGCCGCC-3'。RT-qPCR探针序列5'-端标记6-FAM, 3'-端标记BHQ1。本研究涉及所有序列均由上海生工生物技术有限公司合成。

3. KP质粒的构建:质粒所使用序列: 5'-agccgggattgagcggtaataaatgcggtgtacttctgttgccctcgcccaccacagcagacgaacttctgctcggtgtattgagaaaggtgtggcagatgcggtaccagcgggaaaaccacgctgtcgccgggtccagcttcagagatagccgtttatccacacttctggatagccctcagcacgtagatgaacttctctcatcgctctccgctgtggataagaggtgcgcccggcgccgagccgctgtggtggatccccagccggtgagacgtaaacctcgccccagcggcgccgcatgaaaaacgctccgggtgtcgggataagtagcatcgctgggccctt-3', 参考序列为GenBank ID: CP130264.1(第5 077 559~5 077 925位)使用载体pUC57合成质粒,由上海生工生物技术有限公司合成。

4. RT-qPCR检测:反应总体积为20 μl,其中10 mmol/L的上游引物(forward primer, F), 10 mmol/L的下游引物(reverse primer, R)和探针(10 mmol/L)均为0.5 μl, 2× Tap MIX为10 μl, 水为5.5 μl, DNA模板为1 μl。反应条件: 95 ℃、5 min热变性; 95 ℃、30 s, 55 ℃、30 s, 72 ℃、45 s, 共35个循环; 72 ℃自动延伸10 min。

5. CRISPR-Cas13a系统检测KP DNA方法的建立:菌株样本进行DNA提取后,使用RAA引物进行RAA扩增,双链DNA被转录为单链RNA,之后进行CRISPR-Cas13a系统检测。当体系存在目标序列并被特异性crRNA识别后, Cas13a蛋白的附属切割活性则被激活,从而通过剪切体系中加入的荧光报告RNA,发出荧光信号。

6. 菌株总DNA的提取:对临床收集的痰液、血液、脑脊液样本和临床菌株(评价CRISPR-Cas13a系统检测特异性所使用的菌株)进行DNA

提取。提取的DNA保存至 -80°C 冰箱备用。

7. RAA引物和crRNA的筛选: RAA引物对筛选: 以 10^4 拷贝/ μl 的KP阳性质粒作为模板, 分别使用4对RAA引物进行RAA扩增, 观察CRISPR-Cas13a系统检测结束时(60 min时)的荧光信号值强弱, 筛选出扩增效率最高的RAA引物对。检测crRNA的筛选: 以 10^3 拷贝/ μl 的阳性质粒作为模板, 分别使用crRNA1、crRNA2和crRNA3进行RAA-CRISPR-Cas13a系统检测, 观察反应30 min时的荧光强度, 筛选出检测效率最高的crRNA。本实验在不同时间重复3次。

8. RAA扩增和CRISPR-Cas13a系统检测: RAA核酸扩增试剂盒的反应总体积为50 μl , 体系包括RAA Buffer A液: 25 μl , DNA模板5 μl , F (10 mmol/L)、R (10 mmol/L) 各2 μl , MgCl_2 : 2.5 μl , 水为13.5 μl 。反应条件: 39°C , 30 min。CRISPR-Cas13a反应总体积为25 μl , 体系包括: 扩增产物5 μl , 荧光报告RNA Se Alert v2 2.5 μl , NTP Mix (2.5 mmol/L) 2 μl , RNA酶抑制剂1 μl , LwCas13a蛋白 (25 nmol/L) 1 μl , HEPES缓冲液 (20 mmol/L) 0.5 μl , T7 RNA聚合酶0.5 μl , MgCl_2 溶液 (10 mmol/L) 0.25 μl , crRNA (2 $\mu\text{mol/L}$) 1.5 μl , 无酶无菌水 (ddH_2O) 10.75 μl 。体系中crRNA序列为: GGGAUUUUAGACUACCCCAAAAACGAAGGGGACUAAAACA CGUGCUGGAGGGCUAUCCAGAAGUGUG, 反应条件: 37°C 、1 h, 阴性对照均为无酶无菌水 (NC)。

9. 灵敏度对比试验: 合成的KP阳性质粒, 计算浓度后进行倍比稀释(分别稀释为 1×10^4 拷贝/ μl 、 1×10^3 拷贝/ μl 、 1×10^2 拷贝/ μl 、10拷贝/ μl 和1拷贝/ μl)作为检测模板, 通过分析不同检测模板CRISPR-Cas13a反应30 min时与阴性对照的荧光强度差异, 对已建立的CRISPR-Cas13a系统检测和RT-qPCR方法进行灵敏度的评价。实验在不同时间重复3次, 每次2个重复(复孔)。

10. 特异性评价: 使用KP、PA、AB、*E. coli*和SP细菌总DNA作为模板同时进行检测, 评价CRISPR-Cas13a系统检测KP的特异性。该试验在不同时间点重复3次, 每次2个复孔。

11. 临床菌株样本检测: 对50份临床样本分别进行RAA-CRISPR系统检测和RT-qPCR方法, 比较两种方法的检出率, 实验重复3次。荧光信号阴性阈值为阴性对照重复10次荧光值的平均值+3倍标准差。

三、统计学处理

采用GraphPad prism 8.0软件对数据进行统计学分析。荧光强度值和CT值为正态分布计量资料, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组比较采用配对 t 检验, 多组间比较采用方差分析, 统计检验选用双侧, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、RAA引物筛选

在CRISPR-Cas13a系统检测结束时(60 min时), 4个RAA引物对荧光强度差异有统计学意义($F=310.6$ 、 $P < 0.001$)。RAA-2引物对的荧光强度($2\,252\,156 \pm 54\,668$)显著高于RAA-1引物对($595\,370 \pm 50\,560$) ($t=38.54$ 、 $P < 0.001$)、RAA-3引物对($435\,920 \pm 83\,319$) ($t=31.57$ 、 $P < 0.001$)和RAA-4引物对($1\,530\,521 \pm 172\,678$) ($t=6.90$ 、 $P < 0.001$), 差异均有统计学意义。RAA-1引物对为KP-RAA-F1和KP-RAA-R1组合; RAA-2引物对为KP-RAA-F1和KP-RAA-R2组合; RAA-3引物对为KP-RAA-F2和KP-RAA-R1组合; RAA-4引物对为KP-RAA-F2和KP-RAA-R2组合, 因此, 采用RAA-2引物建立CRISPR-Cas13a检测系统。见图1。

二、CRISPR-Cas13a检测系统KP crRNA的筛选

CRISPR-Cas13a系统检测结束时(60 min时), 不同KP crRNA荧光强度差异有统计学意义($F=224$ 、 $P < 0.001$), crRNA1的荧光强度($1\,470\,592.67 \pm 151\,314$)显著高于crRNA2($158\,142.47 \pm 8\,476$) ($t=15.00$ 、 $P < 0.001$)和crRNA3($165\,999 \pm 4\,402$) ($t=14.93$ 、 $P < 0.001$), 差异均有统计学意义。故本研究使用crRNA1建立CRISPR-Cas13a检测系统, 见图2。

三、KP阳性质粒的灵敏度对比试验

应用CRISPR-Cas13a检测系统和RT-qPCR方法分别检测梯度稀释的质粒, 见表1。CRISPR-Cas13a系统检测反应进行30 min时, 1拷贝/ μl 的检测荧光强度($1\,603\,755 \pm 124\,504$)与阴性对照($290\,058 \pm 7\,611$)差异有统计学意义($t=18.24$ 、 $P < 0.001$)。因此, 对于KP阳性质粒CRISPR-Cas13a系统的灵敏度为1拷贝/ μl 。RT-qPCR检测10拷贝/ μl 的循环阈值(39.20 ± 0.3)与阴性对照(41.01 ± 0.56)差异有统计学意义($t=4.72$ 、 $P=0.009$), 由此可得RT-qPCR灵敏度为10拷贝/ μl 。

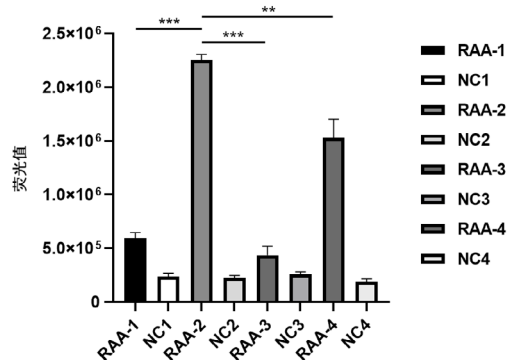
四、CRISPR-Cas13a系统检测的特异性

CRISPR-Cas13a系统检测反应60 min时, 含有目标DNA的样本荧光值($1\,779\,691 \pm 104\,478$)较阴性对照显著升高($138\,442 \pm 13\,751$) ($t = 26.98$ 、 $P < 0.001$), 其他非KP的菌株DNA (PA、AB、*E. coli*和SP) 未出现交叉反应, 荧光值分别为

($169\,575 \pm 13\,346$)、($157\,742 \pm 13\,870$)、($157\,665 \pm 10\,315$)和($151\,707 \pm 15\,136$), 两两比较差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。故本研究设计的RAA引物和crRNA具有特异性, 见图3。

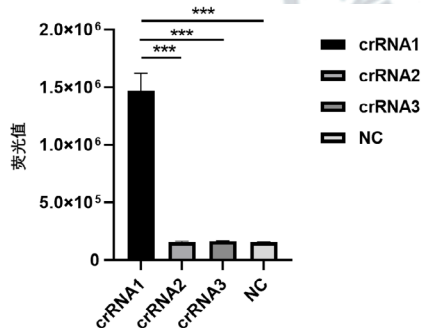
五、临床菌株样本检测

临床收集的50份样本中有30份KP阳性样本(10份痰液样本, 18份血液样本, 2份脑脊液样本)和20份KP阴性样本, CRISPR-Cas13a系统检测出30份KP阳性, 见图4。RT-qPCR方法检测出25份KP阳性。20株KP阴性样本两种方法均未检出KP。以细菌培养法作为金标准, CRISPR-Cas13a系统和RT-qPCR方法对于KP检测灵敏度分别为100% (95%CI: 0.859~1.000)和83.3% (95%CI: 0.645~0.937), 特异度均为100% (95%CI: 0.800~1.000)。两种方法的阳性符合率分别为100% (95%CI: 0.859~1.000)和83.3% (95%CI: 0.645~0.937), 见表2。



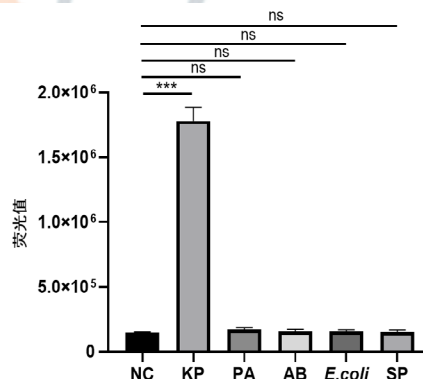
注: 在检测进行60 min时, RAA-2引物对的荧光值最高。每对引物进行3次重复, ** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$, NC为阴性对照(以水为模版进行RAA-CRISPR系统检测)

图1 RAA引物筛选



注: 在检测进行30 min时, crRNA1荧光值最高。每个crRNA检测进行3次重复, *** $P < 0.001$, NC: 阴性对照(以水为模版进行RAA-CRISPR检测)

图2 crRNA的筛选



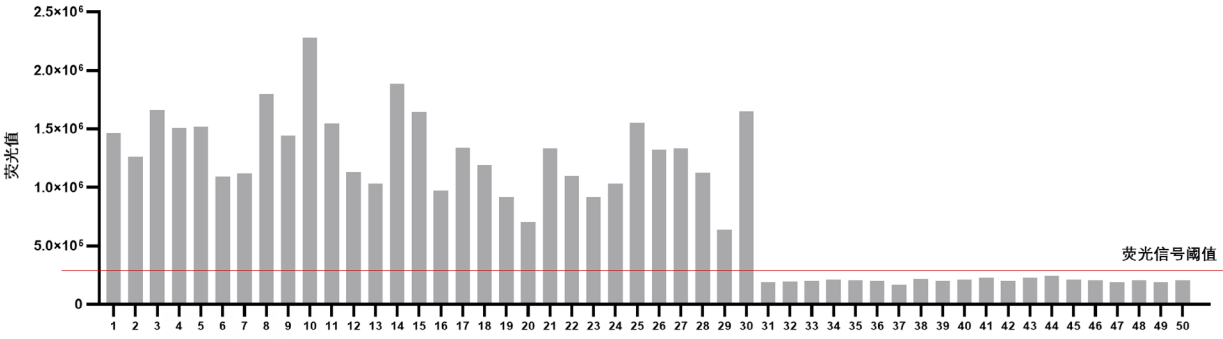
注: KP: 肺炎克雷伯菌; PA: 铜绿假单胞菌; AB: 鲍曼不动杆菌; *E. coli*: 大肠埃希菌; SP: 肺炎链球菌; NC: 阴性对照(以水为模版进行RAA-CRISPR检测)。*** $P < 0.001$; ns: $P > 0.05$, 差异无统计学意义

图3 RAA-CRISPR系统检测KP的特异性

表1 CRISPR-Cas13a 系统和 RT-qPCR 方法检测 KP 阳性质粒灵敏度 ($\bar{x} \pm s$)

KP质粒稀释浓度	CRISPR-KP DNA (RFU)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	RT-qPCR (CT)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
10^4 拷贝/ μ l	$2\,255\,541.13 \pm 175\,336.8$	19.40	< 0.001	24.62 ± 0.64	33.28	< 0.001
10^3 拷贝/ μ l	$2\,377\,344.21 \pm 206\,924.54$	17.46	< 0.001	28.88 ± 0.35	31.73	< 0.001
10^2 拷贝/ μ l	$2\,280\,285 \pm 225\,263.93$	15.29	< 0.001	32.89 ± 0.64	16.48	< 0.001
10拷贝/ μ l	$2\,329\,253.08 \pm 100\,727.42$	34.97	< 0.001	39.20 ± 0.36	4.72	0.0092
1拷贝/ μ l	$1\,603\,755.96 \pm 124\,504.98$	18.24	< 0.001	40.06 ± 0.38	2.44	0.0713
阴性对照	$290\,058.33 \pm 7\,611.01$	—	—	41.01 ± 0.56	—	—

注: *t* 值、*P* 值: 与阴性对照相比较; “—”: 无相关数据



注：1~30为KP阳性样本（1~10为痰液样本，11~28为血液样本，29~30为脑脊液样本），31~50为KP阴性菌株

图4 RAA-CRISPR系统对临床样本中的KP检测

表2 CRISPR-Cas13a 系统和 RT-qPCR 方法检测 50 份临床标本中 KP

检测方法	细菌培养（株）		灵敏度（95%CI）	特异性（95%CI）	阳性符合率（95%CI）
	阳性	阴性			
CRISPR-Cas13a			100%（0.859~1.000）	100%（0.800~1.000）	100%（0.859~1.000）
阳性	30	0			
阴性	0	20			
RT-qPCR			83.3%（0.645~0.937）	100%（0.800~1.000）	83.3%（0.645~0.937）
阳性	25	0			
阴性	5	20			

讨 论

KP可引起多种疾病，并容易对多种抗菌药物产生耐药。因此，早期准确诊断KP感染对于指导临床用药至关重要。然而现有的细菌培养检测方法耗时相对较长，Vitek-2与质谱方法可对复杂的菌落进行精准的菌种鉴定，但无法直接从样本中进行检测^[15-16]。分子诊断技术的发展大大提高了病原体检测效率，RT-qPCR因其良好的灵敏度和特异性常被用于检测病原体，但当被测样品浓度较低时则会出现漏检^[17]。数字PCR（digital droplet PCR，ddPCR）具有超灵敏特性，但设备昂贵^[18]。LAMP介导等温扩增技术灵敏度高，但易产生气溶胶污染^[19]。基于抗原抗体反应的胶体金试纸条检测方法虽然操作便捷，但存在假阳性^[20]。

近年来CRISPR技术因其“高特异性和高灵敏度”优势受到广泛关注，被《Nature》杂志评为2022年七大“颠覆性”技术之一^[21]。经过近几年的发展，CRISPR-Cas13a系统已被用于检测登革热病毒、埃博拉病毒、乙型肝炎病毒共价闭环状DNA（cccDNA）等多种病原体，且能够达到阿摩尔级的灵敏度^[22-24]。目前已有研究使用CRISPR-

Cas12a系统对KP进行检测，但尚未在大量临床样本中验证^[25]。Khe基因作为KP特异基因已在多个研究中被用来鉴定KP^[13-14]，因此，本研究以Khe作为靶基因，将RAA与CRISPR检测相结合建立了基于RAA-CRISPR的KP检测方法。与传统培养鉴定方法（Vitek-2和质谱法）相比，基于CRISPR的诊断可直接从样本中进行检测，操作更加简便。与经典分子检测方法RT-qPCR相比，本研究建立的检测方法对KP阳性质粒的检测灵敏度为1拷贝/μl，高于RT-qPCR（10拷贝/μl）。临床样本检测以细菌培养为金标准，RAA-CRISPR法对KP的检出率为100%（30/30），高于RT-qPCR检出率[83.3%（25/30）]。因此，本研究建立的RAA-CRISPR系统检测具有良好的灵敏度和特异性。

本研究建立的RAA-CRISPR系统检测可实现对KP的精准检测，但也存在一些局限性。首先，由于CRISPR检测过程中Cas蛋白切割功能的随机特性^[26]，该方法目前无法用于定量分析，这也是未来需要优化的方向。此外，该方法可直接检测临床样本，但DNA提取仍是关键步骤。未来拟进一步简化DNA提取流程，以提高提取效率并推动“一步法”的实现，从而提升检测系统的便捷性和时效性，已有相

关研究对此进行了探索^[27-28]。

综上,本研究建立的RAA-CRISPR系统检测方法能够实现对KP高灵敏度检测,在KP感染的快速精准诊断方面有广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Liu C, Dong N, Huang X, et al. Emergence of the clinical rdar morphotype carbapenem-resistant and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* with enhanced adaption to hospital environment[J]. Sci Total Environ, 2023, 889: 164302.
- [2] Yang X, Dong N, Chan EW, et al. Carbapenem resistance-encoding and virulence-encoding conjugative plasmids in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Trends Microbiol, 2021, 29(1): 65-83.
- [3] Li ZJ, Zhang HY, Ren LL, et al. Etiological and epidemiological features of acute respiratory infections in China[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 5026.
- [4] Karampatakis T, Tsergouli K, Behzadi P. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: virulence factors, molecular epidemiology and latest updates in treatment options[J]. Antibiotics (Basel), 2023, 12(2): 234.
- [5] Pu D, Zhao J, Lu B, et al. Within-host resistance evolution of a fatal ST11 hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. Int J Antimicrob Agents, 2023, 61(4): 106747.
- [6] Mukherjee S, Mitra S, Dutta S, et al. Neonatal sepsis: The impact of carbapenem-resistant and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. Front Med (Lausanne), 2021, 8: 634349.
- [7] Yang X, Sun Q, Li J, et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in China[J]. Emerg Microbes Infect, 2022, 11(1): 841-849.
- [8] Jin X, Chen Q, Shen F, et al. Resistance evolution of hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST11 during treatment with tigecycline and polymyxin[J]. Emerg Microbes Infect, 2021, 10(1): 1129-1136.
- [9] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2[J]. Science, 2017, 356(6336): 438-442.
- [10] Kellner MJ, Koob JG, Gootenberg JS, et al. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases[J]. Nat Protoc, 2019, 14(10): 2986-3012.
- [11] Kaminski MM, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, et al. CRISPR-based diagnostics[J]. Nat Biomed Eng, 2021, 5(7): 643-656.
- [12] Chen JS, Ma E, Harrington LB, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity[J]. Science, 2018, 360(6387): 436-439.
- [13] Dong D, Liu W, Li H, et al. Survey and rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* in clinical samples targeting the *rcaA* gene in Beijing, China[J]. Front Microbiol, 2015, 6: 519.
- [14] Hartman LJ, Selby EB, Whitehouse CA, et al. Rapid real-time PCR assays for detection of *Klebsiella pneumoniae* with the *rmpA* or *magA* genes associated with the hypermucoviscosity phenotype: screening of nonhuman primates[J]. J Mol Diagn, 2009, 11(5): 464-471.
- [15] Huang Y, Li J, Wang Q, et al. Rapid detection of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China based on MALDI-TOF MS[J]. J Microbiol Methods, 2022, 192: 106385.
- [16] Wang J, Xia C, Wu Y, et al. Rapid detection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* using machine learning and MALDI-TOF MS platform[J]. Infect Drug Resist, 2022, 15: 3703-3710.
- [17] Kurupati P, Chow C, Kumarasinghe G, et al. Rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* from blood culture bottles by real-time PCR[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(3): 1337-1340.
- [18] Feng J, Cui X, Du B, et al. Detection and quantification of *Klebsiella pneumoniae* in fecal samples using digital droplet PCR in comparison with real-time PCR[J]. Microbiol Spectr, 2023, 11(4): e0424922.
- [19] Qiu X, Liu X, Ma X, et al. One-pot isothermal LAMP-CRISPR-based assay for *Klebsiella pneumoniae* detection[J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(4): e0154522.
- [20] Tominaga T. Rapid detection of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Raoultella ornithinolytica* and other related bacteria in food by lateral-flow test strip immunoassays[J]. J Microbiol Methods, 2018, 147: 43-49.
- [21] Eisenstein M. Seven technologies to watch in 2022[J]. Nature, 2022, 601(7894): 658-661.
- [22] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, et al. C2c2 is a single component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector[J]. Science, 2016, 353(6299): f5573.
- [23] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6[J]. Science, 2018, 360(6387): 439-444.
- [24] 王俊文, 田原, 范子豪, 等. 基于规律成簇的间隔短回文重复序列及其相关蛋白技术检测乙型肝炎病毒共价闭合环状DNA方法的建立[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2022, 16(5): 320-327.
- [25] Tan M, Liang L, Liao C, et al. A rapid and ultra-sensitive dual readout platform for *Klebsiella pneumoniae* detection based on RPA-CRISPR/Cas12a[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2024, 14: 1362513.
- [26] Liu Y, Xu H, Liu C, et al. CRISPR-Cas13a nanomachine based simple technology for avian influenza A (H7N9) virus on-site detection[J]. J Biomed Nanotechnol, 2019, 15(4): 790-798.
- [27] Zou Y, Mason MG, Wang Y, et al. Nucleic acid purification from plants, animals, and microbes in under 30 seconds[J]. PLoS Biol, 2017, 15(11): e2003916.
- [28] Wang Y, Ke Y, Liu W, et al. A one-pot toolbox based on Cas12a/crRNA enables rapid foodborne pathogen detection at attomolar level[J]. ACS Sens, 2020, 5(5): 1427-1435.

(收稿日期: 2024-09-27)

(本文编辑: 孙荣华)

曹亚玲, 房忠军, 徐玲, 等. 基于重组酶介导等温扩增技术-规律间隔成簇短回文重复序列/相关蛋白系统检测肺炎克雷伯菌方法的建立及评价[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2025, 19(2): 70-76.