

# 基于重组酶介导等温扩增技术建立人腺病毒 14 型快速检测方法及其初步应用评价

刘晴晴<sup>1,2</sup>, 王宁宁<sup>1,2</sup>, 成军<sup>2</sup>, 周华君<sup>2</sup>, 车飞虎<sup>2</sup>, 杨春利<sup>2</sup>, 孙青阳<sup>2</sup>, 王月<sup>2</sup>, 戴玉柱<sup>2</sup>, 张英杰<sup>1</sup> (1. 蚌埠医学院检验医学院, 安徽蚌埠 233000; 2. 中国人民解放军联勤保障部队第九〇三医院临床研究部, 杭州 310013)

**摘要:** **目的** 基于重组酶介导的等温扩增技术 (recombinase-aided amplification, RAA) 开发一种快速、准确的人腺病毒 14 型检测方法。**方法** 根据人腺病毒 14 型 (human adenovirus serotype 14, HAdV-14) 的 Hexon 基因序列, 使用 Primer 6.0 软件设计特异性引物及探针, 并构建阳性质粒标准品, 优化反应条件, 建立一种快速 RAA 检测方法, 并对该方法的灵敏度及特异度进行评价。收集 2017 ~ 2022 年中国人民解放军联勤保障部队第九〇三医院发热性呼吸综合征患者的咽拭子 50 份, 应用建立的实时荧光 RAA 测定法进行检测, 结果与实时荧光 PCR 检测结果进行比较。**结果** 最终确定了最佳引物探针组合为 HAdV14-F1-4, HAdV14-R1 和 HAdV14-P; 经反应条件优化, 40℃ 进行 RAA 扩增效果最佳; 该方法灵敏度为  $10^1$  copies/ $\mu$ l, 当质粒标准品浓度为  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  和  $10^1$  copies/ $\mu$ l 时, 批内变异系数均 <5%; 50 例临床样本中 HAdV-14 的检测方法与实时荧光 PCR 一致。**结论** 建立了一种基于 RAA 技术的 HAdV-14 快速检测方法, 可以在仅有简单恒温设备的条件下检测 HAdV-14。

**关键词:** 人腺病毒 14 型; 重组酶介导的等温扩增技术; 快速分子诊断

**中图分类号:** Q503; R373 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2023) 06-013-07

**doi:**10.3969/j.issn.1671-7414.2023.06.003

## Establishment of A Rapid Detection Method for Human Adenovirus Type 14 Based on Recombinase-aided Amplification Technology and Preliminary Application Evaluation

LIU Qingqing<sup>1,2</sup>, WANG Ningning<sup>1,2</sup>, CHENG Jun<sup>2</sup>, ZHOU Huajun<sup>2</sup>, CHE Feihu<sup>2</sup>, YANG Chunli<sup>2</sup>, SUN Qingyang<sup>2</sup>, WANG Yue<sup>2</sup>, DAI Yuzhu<sup>2</sup>, ZHANG Yingjie<sup>1</sup>

(1. School of Laboratory Medicine, Bengbu Medical College, Anhui Bengbu 233000, China; 2. Department of Clinical Research, the 903rd Hospital of the People's Liberation Army, Hangzhou 310013, China)

**Abstract: Objective** To develop a rapid and accurate detection method for human adenovirus serotype 14 (HAdV-14) based on recombinase-aided amplification (RAA) technology. **Methods** According to the Hexon gene sequence of HAdV-14, the specific primers and probes were designed by Primer 6.0 software, and the positive plasmid standard was constructed. The reaction conditions were optimized to establish a rapid RAA detection method, and the sensitivity and specificity of the method were evaluated. A total of 50 throat swabs were collected from patients with febrile respiratory syndrome in the 903rd Hospital of the People's Liberation Army from 2017 to 2022. The established real-time fluorescent RAA assay was used for detection, and the results were compared with the results of the real-time PCR. **Results** The optimal primer and probe combination was determined as HAdV14-F1-4, HAdV14-R1 and HAdV14-P. After optimizing reaction conditions, RAA amplification at 40℃ was the best. The sensitivity of the method was  $10^1$  copies/ $\mu$ l. When the concentration of the plasmid standard was  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  and  $10^1$  copies/ $\mu$ l, the intra-assay coefficient of variation was less than 5%. The results of HAdV-14 in 50 clinical samples were consistent with those of real-time PCR. **Conclusion** A rapid detection method for HAdV-14 based on RAA technology was established, which could detect HAdV-14 with only simple thermostatic equipment.

**Keywords:** human adenovirus serotype 14; recombinase-aided amplification; rapid molecular diagnosis

人腺病毒 (human adenovirus, HAdV) 是无包膜双链 DNA 病毒, 可引起各种临床疾病, 包括呼

**基金项目:** 浙江省自然科学基金 (批准号: LGF20H200009): 基于 RAA 技术在 ARID 病原快速检测中的应用研究; 浙江省医药卫生科技规划项目 (批准号: 2019331539): 军营内呼吸道感染 HAdV-55 型的流行病学特征及迁徙分析; 杭州市医药卫生科技规划项目 (批准号: 0020190415): 军营内呼吸道感染 HAdV-55 型的流行病学特征及迁徙分析。

**作者简介:** 刘晴晴 (1999-), 女, 初级检验师, 在读硕士, 研究方向: 分子诊断与技术, E-mail: 1669399941@qq.com。

**通讯作者:** 戴玉柱 (1985-), 男, 硕士, 硕士生导师, 副主任技师, 研究方向: 临床感染性疾病的分子诊断, E-mail: dyz5895@qq.com。

张英杰 (1979-), 男, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 肝纤维化分子机制的研究, E-mail: 8592386@qq.com。

呼吸道感染、肺炎、结膜炎等<sup>[1-3]</sup>。据报道,至少5%~10%的儿童和1%~7%的成人呼吸道感染是由HAdV导致的<sup>[4-6]</sup>。2005年起人腺病毒14型(human adenovirus serotypes 14, HAdV-14)病毒已在多国导致数次大规模急性呼吸道感染疫情,引起了病毒学、流行病学、传染病学等领域专家的广泛关注<sup>[7]</sup>。因此,开发快速、灵敏、特异的HAdV-14诊断方法,及时诊断HAdV-14,对于控制HAdV-14感染扩散和传播至关重要。随着分子诊断技术的发展,聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)、实时荧光PCR等分子诊断技术已经成为检测HAdV感染的常用工具<sup>[8-11]</sup>,但因其需要热循环难以在医疗资源相对有限的地区和医院实现。相比之下,重组酶介导的等温扩增技术(recombinase-aided amplification, RAA)是一种新型的等温核酸扩增技术,不需要高温变性或低温退火的过程,反应简捷、快速、高效<sup>[12-16]</sup>,已成功用于多种病原体的检测,如2019新型冠状病毒、呼吸道合胞病毒、肺炎克雷伯菌等<sup>[17-20]</sup>。因此,本研究针对HAdV-14的Hexon基因设计特异性引物和探针,将RAA与荧光探针相结合,拟建立一种快速实时荧光RAA测定法,为HAdV-14的临床诊断或现场评估提供新的方法。

## 1 材料和方法

1.1 研究对象 收集2017~2022年在中国人民解放军联勤保障部队第九〇三医院就诊的发热性呼吸综合征患者的50份咽拭子。纳入标准:①有发热或呼吸感染的其他症状的住院患者;②符合急性呼吸道感染诊断标准;③实验室检测指标和临床信

息完整;④进行咽拭子腺病毒核酸检测。经实时荧光PCR明确病原体,包括:5个HAdV-3阳性样本,1个HAdV-4阳性样本,5个HAdV-7阳性样本,1个HAdV-14阳性样本,1个HAdV-21阳性样本,5个HAdV-55阳性样本,10个甲型流感病毒阳性样本,10个2019新型冠状病毒阳性样本,10个呼吸道合胞病毒阳性样本,1个肺炎支原体阳性样本和1个肺炎链球菌阳性样本。样本均通过中国人民解放军联勤保障部队第九〇三医院医学伦理委员会审核[批准文号20230303/01/01/001]。

1.2 试剂与仪器 核酸提取或纯化试剂盒(圣湘生物科技股份有限公司),不同病原核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法,圣湘生物科技股份有限公司),RAA核酸扩增试剂盒(荧光法,江苏奇天基因生物科技有限公司),SYBR Green qPCR Mix荧光定量PCR试剂盒(Biosharp生物技术公司),ABI 7500荧光PCR仪(Applied Biosystems公司),Natch 96核酸提取仪(圣湘生物科技股份有限公司)。

## 1.3 方法

1.3.1 引物探针的设计与合成:在NCBI(<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>)的GenBank数据库检索并下载HAdV常见亚型的hexon基因序列,使用Jaview软件进行多序列比对,以HAdV-14亚型内保守亚型间特异的序列(GenBank: AY803294)为靶标,根据之前的研究中提到的RAA引物探针设计原则,使用Primer 6和Snap Gene设计引物和荧光探针<sup>[21-22]</sup>。本研究设计的引物和探针均由生工生物技术(上海)有限公司合成,引物探针序列见表1。

表1 用于检测HAdV-14的RAA引物和探针序列

引物及探针	序 列
HAdV14-F <sub>14</sub>	5'-GCCAACAGATAGTTACAAGGAGATTCAGTT-3'
HAdV14-R <sub>1</sub>	5'-GAGATACAGAGCCACATTGGAATAAAGGAA-3'
HAdV14-R <sub>2</sub>	5'-TGGGAGATACAGAGCCACATTGGAATAAAG-3'
HAdV14-R <sub>3</sub>	5'-ACAGAGCCACATTGGAATAAAGGAACTTC-3'
HAdV14-R <sub>4</sub>	5'-GGGAGATACAGAGCCACATTGGAATAAAGGA-3'
HAdV14-P	5'-GAGACCAAGCTTGGAAAGATGTAAATCCAAA[FAM-dT][THF]G[BHQ1-dT]ATCAGTGAACCTGTTAAG[C3spacer]-3'

注: HAdV14-F<sub>14</sub>: 上游引物; HAdV14-R<sub>1</sub>, HAdV14-R<sub>2</sub>, HAdV14-R<sub>3</sub>, HAdV14-R<sub>4</sub>: 下游引物; HAdV14-P: 荧光探针; HAdV14-F<sub>14</sub>分别与HAdV14-R<sub>1</sub>, HAdV14-R<sub>2</sub>, HAdV14-R<sub>3</sub>, HAdV14-R<sub>4</sub>组成4组引物对, 4组引物对再与1组探针组成不同组合供优化筛选用。

1.3.2 阳性质粒标准品的构建: 将筛选的HAdV-14(GenBank: AY803294)特异性保守序列片段连接到pUC 57载体上, 构建HAdV-14阳性质粒标准品, 该质粒由生工生物技术(上海)有限公司直接合成。使用Qubit 2.0荧光测定仪对上述质粒进行浓度测定, 拷贝数计算公式如下: 浓度(copies/ $\mu$ l)= $[6.02 \times 10^{23} \times \text{浓度}(\text{ng}/\mu\text{l}) \times 10^{-9}]/[\text{DNA长度}(\text{bp}) \times 660]$ 。将上述质粒从 $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,

$10^1$ copies/ $\mu$ l进行梯度稀释, 随后保存至-80℃冰箱备用。

1.3.3 样本核酸提取: 从收集的咽拭子及HAdV-14阳性质粒标准品(人上皮细胞和HAdV-14阳性质粒构成的混合悬液)中取300 $\mu$ l, 采用磁珠提取法提取核酸, 具体操作严格按照试剂说明书进行, 提取后的核酸-80℃保存, 用于进一步检测和分析。

1.3.4 实时荧光RAA法的建立: 构建RAA反应体

系 ( $50\mu\text{l}$ ), 在 RAA 含冻干粉的微型离心管中加入  $25\mu\text{l}$  缓冲液 VI,  $2.1\mu\text{l}$  正向引物 ( $10\mu\text{mol/L}$ ),  $2.1\mu\text{l}$  反向引物 ( $10\mu\text{mol/L}$ ),  $0.6\mu\text{l}$  ( $10\mu\text{mol/L}$ ) 探针,  $5\mu\text{l}$  的模板,  $12.7\mu\text{l}$  纯化水。为确保所有反应系统同时进行, 最后将  $2.5\mu\text{l}$  乙酸镁加到管盖中, 瞬时离心后启动扩增反应, 立即置于 ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 仪中进行荧光检测。荧光检测程序设置为:  $39^\circ\text{C}$  或  $40^\circ\text{C}$  或  $42^\circ\text{C}$  30s, 60 个循环。

1.3.5 引物探针的筛选: ①将设计的 4 组候选引物和 1 组探针进行组合, 在相同反应体系及扩增条件下使用 4 组不同的引物探针组合进行 RAA 扩增, 通过比较扩增曲线的阈值时间 (threshold time, TT) 来筛选最佳的引物探针组合。②熔解曲线分析: 将 SYBR Green qPCR Mix 荧光定量 PCR 试剂盒在室温下溶解并充分混匀, 短暂离心后置于冰上, 按照试剂盒说明书配制反应液, 并根据说明书推荐两步法 PCR 程序进行反应。将设计的 1 个上游引物和 4 个下游引物进行组合, 在相同反应体系及扩增条件下使用 4 组不同的引物组合进行熔解曲线分析。

1.3.6 反应条件的优化: 将相同反应体系在不同温度下 ( $39^\circ\text{C}$ ,  $40^\circ\text{C}$ ,  $42^\circ\text{C}$ ) 进行实时荧光 RAA 扩增, 每个温度重复 5 次, 比较不同温度之间扩增曲线的 TT, 确定最佳反应温度。

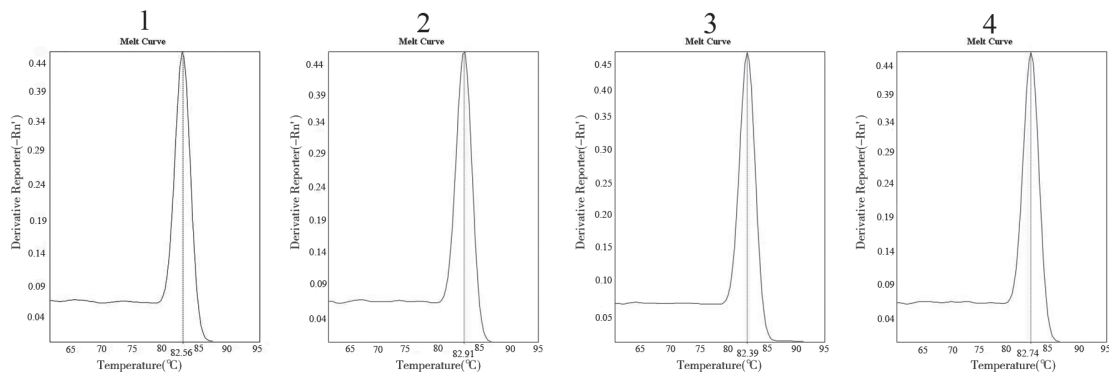
1.3.7 灵敏度分析: 将 HAdV-14 阳性质粒标准品梯度稀释至终浓度为  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  copies/ $\mu\text{l}$  的标准品溶液, 以无核酶水为阴性对照, 运用 HAdV-14 实时荧光 RAA 方法进行检测, 每个浓度重复 5 次, 以评估实时荧光 RAA 测定法的灵敏度, 并分析 5 次重复检测结果的 TT 值批内 CV。

1.3.8 特异度及临床样本分析: 使用建立的 HAdV-14 实时荧光 RAA 方法, 对在中国人民解放军联勤保障部队第九〇三医院收集的 50 份咽拭子进行检测, 具体操作严格按照操作说明进行, 并与实时荧光 PCR 检测结果进行比较, 评估 HAdV-14 实时荧光 RAA 测定法的特异度及其在临床样本中的检测性能。

1.4 统计学分析 采用 SPASS16.0 统计学分析软件处理, 其中 TT 值为计量资料, 两组间比较采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

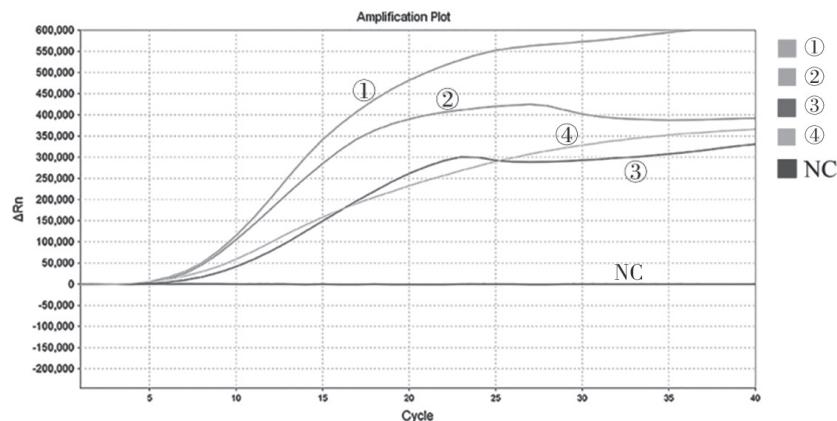
## 2 结果

2.1 引物和探针的筛选 熔解曲线分析结果见图 1。4 组引物的溶解曲线均呈单峰, 熔链温度在  $82^\circ\text{C}$  左右, 说明 4 组引物对的特异度良好。4 组引物探针组合均出现了特异性荧光曲线, 其中组合 1 (HAdV14-F<sub>1-4</sub>, HAdV14-R<sub>1</sub>, HAdV14-P) 的 TT 最早, 提示组合 1 为最佳引物探针组合, 见图 2。



注: 1: F<sub>1-4</sub>-R<sub>1</sub>; 2: F<sub>1-4</sub>-R<sub>2</sub>; 3: F<sub>1-4</sub>-R<sub>3</sub>; 4: F<sub>1-4</sub>-R<sub>4</sub>。

图 1 不同引物组合熔解曲线分析结果

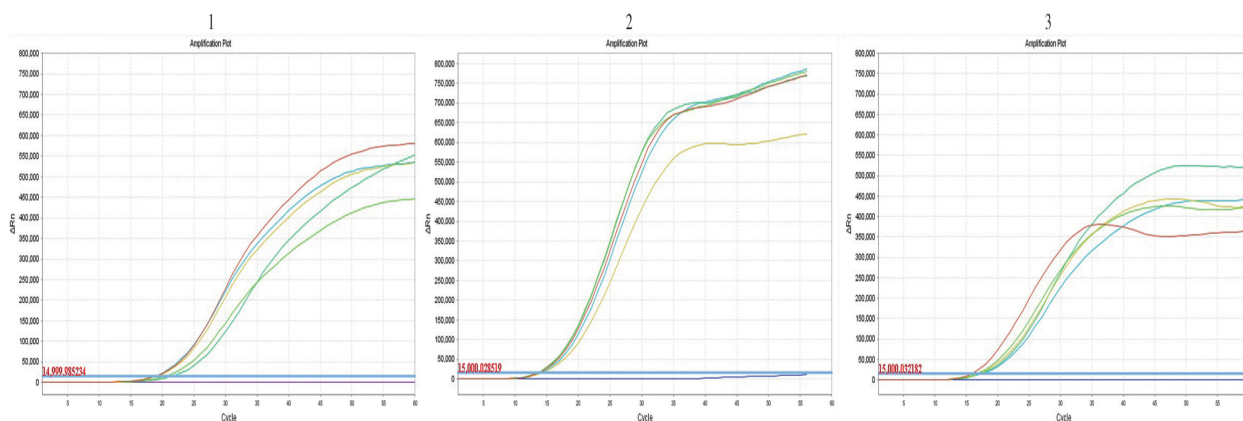


注: 1: F<sub>1-4</sub>-R<sub>1-P</sub>; 2: F<sub>1-4</sub>-R<sub>2-P</sub>; 3: F<sub>1-4</sub>-R<sub>3-P</sub>; 4: F<sub>1-4</sub>-R<sub>4-P</sub>; NC: 阴性对照。

图 2 不同引物探针组合实时荧光 RAA 扩增结果

2.2 不同温度下扩增效果比较 不同反应温度时扩增曲线的TT值不同见图3。在40℃条件下扩增时,特异性荧光曲线TT最早,且5次检测结果重复性

良好,表明40℃为HAdV-14实时荧光RAA检测的最适反应温度。

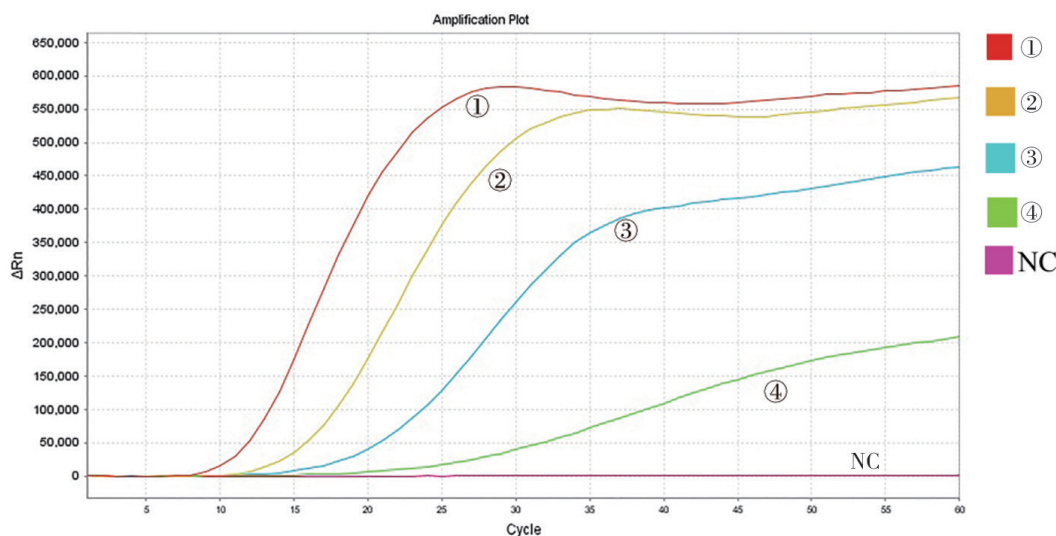


注: 1: 39℃; 2: 40℃; 3: 42℃。

图3 不同温度HAdV-14实时荧光RAA扩增结果

2.3 灵敏度评价 结果见图4。以HAdV-14阳性质粒标准品为模板,当浓度为 $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  copies/ $\mu$ l时均有特异性扩增曲线,所以

HAdV-14实时荧光RAA检测方法的灵敏度为 $10^1$  copies/ $\mu$ l。另外,5次重复检测结果的TT值批内CV<5%,结果见表2,表明该方法的重复性良好。



注: 1:  $10^4$  copies/ $\mu$ l; 2:  $10^3$  copies/ $\mu$ l; 3:  $10^2$  copies/ $\mu$ l; 4:  $10^1$  copies/ $\mu$ l; NC: 阴性对照。

图4 HAdV-14实时荧光RAA测定法的灵敏度分析  
不同模板浓度RAA检测的重复性

表2

模板浓度 (copies/ $\mu$ l)	五次重复检测 TT 值					均值	CV (%)
	1	2	3	4	5		
$10^4$	4.71	4.62	4.74	4.80	4.65	4.70	1.50
$10^3$	6.66	6.27	6.12	6.21	6.37	6.33	3.20
$10^2$	8.67	8.2	9.02	8.95	8.56	8.68	3.70
$10^1$	12.08	12.65	11.46	12.05	12.10	12.07	3.40

注: TT: 阈值时间, 即达荧光阈值的反应时间(根据阴性对照的基础荧光值将荧光阈值设定为10 000), 单位为min; RAA扩增程序设置为40℃ 30s, 60个循环, 所以TT值=达阈值时的循环数/2, 即扩增图中总循环数为60相当于总反应时间为30min。

2.4 特异性及临床样本分析 见图5。HAdV-14阳性样本的DNA为模板时出现特异性荧光信号, 但是当HAdV其他亚型(HAdV-3, HAdV-4, HAdV-7, HAdV-21, HAdV-55)与其它5种病原体核酸

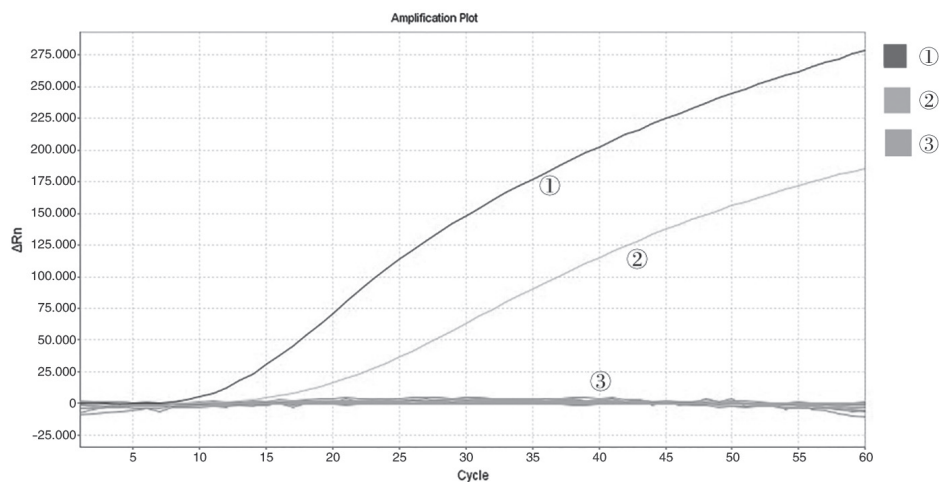
作为模板时, 无特异性荧光信号, 表明该检测方法的特异性良好, 可满足临床检测需求。

### 3 讨论

人腺病毒(HAdV)是一种具有高传染性的病

原体,能导致严重的呼吸道疾病。近年来,HAdV-14在全球范围内重新出现,引起一系列严重的呼吸道疾病的暴发和流行。由于人群普遍易感,其感染率较其它亚型高,可引起更严重的急性呼吸道疾病。因此,迫切需要开发快速、灵敏且特异的HAdV-14检测方法对这种病毒进行适当的监测,以预防HAdV-14感染的暴发和传播。传统的HAdV检测方法主要采用病毒分离、培养、免疫分析等技术,但这些技术存在费时费力等缺点,难以实现HAdV感染的快速诊断。目前,常用的分子诊断技术包括PCR和实时荧光PCR等,它们具有较高的灵敏度和特异度,已被广泛用于临床上HAdV感染的诊

断。但是因为变温扩增过程需要热循环仪和训练有素的操作人员,这些方法不适用于野外或资源有限地区进行HAdV的快速诊断。与常用分子诊断技术相比,等温核酸扩增方法简单、快速且具有成本效益。RAA是一种新的等温扩增方法,周转时间短、温度低、灵敏度高、特异性强,特别适用于HAdV-14的快速诊断或现场评估。鉴于现存HAdV-14病毒检测方法的不足以及HAdV-14病毒快速现场检测的需求,研究一种可在常温下快速检测HAdV-14病毒且能应用于基层医疗的RAA扩增方法非常有必要。



注: 1: 阳性对照; 2: HAdV-14 阳性样本; 3: HAdV 其他亚型 (HAdV-3, HAdV-4, HAdV-7, HAdV-21, HAdV-55) 阳性样本、甲型流感病毒阳性样本、2019 新型冠状病毒阳性样本、呼吸道合胞病毒阳性样本、肺炎支原体阳性样本、肺炎链球菌阳性样本。

图5 HAdV-14 实时荧光 RAA 测定法的临床样本分析

等温扩增技术可以在相对较低的恒温条件下进行扩增,使用便携式实时荧光扫描仪或者胶体金试纸条对结果进行可视化检测。与实时荧光定量PCR相比,该方法检测时间大大缩短,所需设备简单,是一种检测HAdV-14简便且快速的方法,适用于在资源有限地区进行HAdV-14的快速诊断。尽管本研究建立的实时荧光RAA检测方法具有检测时间短、操作简便、对仪器要求低等诸多优势,但是该方法仍然具有一些局限性:① HAdV-14 阳性样本较少,应该使用更多HAdV-14阳性的临床样本来评估该方法;②该方法没有加入内参作为对照,在实际应用中应加入内参以消除样品中潜在抑制剂的影响;③在撰写本文时,还没有专门的软件可用于设计RAA引物探针,如果将来开发专门的软件,可以进一步简化RAA的引物探针设计;④RAA技术目前在临床的应用多为定性试验,尚无绝对定量,即当高模板含量( $>10^7$ 拷贝)时,反应达阈值的时间很早,一般在一两分钟就可迅速扩增,这时反应曲线的阈值时间就很难准确检测,变异度大,

所以阈值时间与模板起始拷贝数对数之间难以呈现线性<sup>[23]</sup>。

虽然RAA的优势在于等温扩增,检测过程无需大型核酸扩增仪,但是该方法仍需要核酸提取纯化这一繁琐的步骤,因此需要开发能够与RAA方法兼容的快速核酸提取技术或核酸免提取技术,使其更加适用于资源匮乏地区的即时诊断。本课题组已成功研发了一种适用于PCR,实时荧光PCR及等温PCR的核酸免提取技术,该技术可能在常温下5~10 min内有效裂解呼吸道感染性疾病的病原体使其释放核酸(DNA和RNA),不需提取步骤即可直接进行核酸扩增。另外,随着2019新冠肺炎疫情的暴发,在户外及床旁检测SARS-CoV-2的需求日益增加,基于RAA技术的即时检验(point-of-care testing, POCT)应运而生<sup>[24-26]</sup>。截止目前,尚无关于HAdV-14的RAA检测试剂结合胶体金技术的报道。因此,课题组将在下一阶段开展核酸免提取、RAA与胶体金技术相结合的研究,有望得到用于HAdV-14的POCT检测试剂,并在军队、

疾控等单位实施推广。

综上所述,我们开发了一种快速灵敏的实时荧光 RAA 检测方法用于检测 HAdV-14。该方法在 40℃ 条件下 20min 内即可检测出 HAdV-14,灵敏度为  $10^1$  copies/ $\mu$ l, 不与 HAdV 其他亚型及其他常见呼吸道病原体发生交叉反应。与实时荧光 PCR 相比, RAA 检测更简便,耗时更少,它为临床快速诊断 HAdV-14 感染提供了新方法。

#### 参考文献:

- [1] WU Tao, WU Haizhen, ZHAO Kangchen, et al. Rapid detection of human mastadenovirus species B by recombinase polymerase amplification assay[J]. BMC Microbiology, 2019, 19(1): 8.
- [2] WANG Xinye, WANG Dawei, UMAR S, et al. Molecular typing of human adenoviruses among hospitalized patients with respiratory tract infections in a tertiary hospital in Guangzhou, China between 2017 and 2019[J]. BMC Infectious Diseases, 2021, 21(1): 748.
- [3] RADKE J R, COVERT H J, BAUER F, et al. Adenovirus 14p1 immunopathogenesis during lung infection in the syrian hamster[J]. Viruses, 2020, 12(6): 595.
- [4] 庞晓燕, 冀云鹏, 周雪原, 等. 2020 ~ 2021 年呼和浩特市儿童呼吸道腺病毒感染的流行病学和实验室检测及临床特征研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2023, 38(2): 129-135.  
PANG Xiaoyan, JI Yunpeng, ZHOU Xueyuan, et al. Epidemiological, laboratory detection and clinical characteristics of respiratory adenovirus infection in children in Hohhot from 2020 to 2021[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2023, 38(2): 129-135.
- [5] ZHAO Mengchuan, GUO Yinghui, QIU Fangzhou, et al. Molecular and clinical characterization of human adenovirus associated with acute respiratory tract infection in hospitalized children [J]. Journal of Clinical Virology, 2020, 123: 104254.
- [6] XU Deshun, CHEN Liping, WU Xiaofang, et al. Molecular typing and epidemiology profiles of human adenovirus infection among hospitalized patients with severe acute respiratory infection in Huzhou, China[J]. PLoS One, 2022, 17(4): e0265987.
- [7] ZHAO Shan, GUAN Wenyi, MA Kui, et al. Development and application of a fast method to acquire the accurate whole-genome sequences of human adenoviruses [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 661382.
- [8] STARR K, GRENINGER A L, MAKHSOUS N, et al. Comparison of three adenovirus quantitative PCR assays with ATCC reference strains and clinical samples[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2019, 57(11): e00735-19.
- [9] 宁明哲, 陶月, 陈雨欣, 等. 新型冠状病毒血清特异性抗体检测的假性问题分析和对策探讨 [J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(6): 129-131.  
NING Mingzhe, TAO Yue, CHEN Yuxin, et al. SARS-CoV-2 serological antibody testing: problems of false detections and the solutions[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(6): 129-131.
- [10] QIU Fangzhou, SHEN Xinxin, ZHAO Mengchuan, et al. A triplex quantitative real-time PCR assay for differential detection of human adenovirus serotypes 2, 3 and 7[J]. Virology Journal, 2018, 15(1): 81.
- [11] WONG S S Y, YIP C C Y, SRIDHAR S, et al. Comparative evaluation of a laboratory-developed real-time PCR assay and RealStar<sup>®</sup> adenovirus PCR kit for quantitative detection of human adenovirus[J]. Virology Journal, 2018, 15(1): 149.
- [12] WANG Ruihuan, ZHANG Hong, ZHANG Yi, et al. Development and evaluation of recombinase-aided amplification assays incorporating competitive internal controls for detection of human adenovirus serotypes 3 and 7[J]. Virology Journal, 2019, 16(1): 86.
- [13] 陈昌国, 陈秋圆, 侯兵兵, 等. 基于 LAMP 技术针对溶藻弧菌 *gyrB* 基因快速检测方法的建立 [J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(6): 6-9.  
CHEN Changguo, CHEN Qiuyuan, HOU Bingbing, et al. Establishment of the rapid detection method targeting to *GyrB* gene of *Vibrio parahaemolyticus* based on LAMP technology[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(6): 6-9.
- [14] HOU Laiwang, LI Darong, ZHANG Ni, et al. Development of an isothermal recombinase-aided amplification assay for the rapid and visualized detection of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2022, 102(9): 3879-3886.
- [15] WU Shangyi, DUAN Hong, ZHANG Yingchao, et al. A salmonella microfluidic chip combining non-contact eddy heater and 3D Fan-Shaped mixer with recombinase aided amplification[J]. Biosensors Biosensors(Basel), 2022, 12(9): 726.
- [16] WU Xiuhong, CHU Fengsheng, ZHANG Luxuan, et al. New rapid detection by using a constant temperature method for avian leukosis viruses [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 968559.
- [17] ZHENG Yuzhong, CHEN Jiangtao, LI Jian, et al. Reverse transcription recombinase-aided amplification assay with lateral flow dipstick assay for rapid detection of 2019 novel coronavirus [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2021, 11: 613304.
- [18] QI Juju, LI Xinna, ZHANG Yi, et al. Development of a duplex reverse transcription recombinase-aided amplification assay for respiratory syncytial virus incorporating an internal control[J]. Archives of Virology, 2019, 164(7): 1843-1850.
- [19] MU Dan, ZHOU Donggen, XIE Guoyang, et al. The fluorescent probe-based recombinase-aided amplification for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. Molecular and Cellular Probes, 2021, 60: 101777.
- [20] ZHANG Weiwei, FENG Yanling, ZHAO Hangqing, et al. A recombinase aided amplification assay for rapid detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase gene and its characteristics in *Klebsiella pneumoniae* [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2021, 11: 746325.

- and Treg cells in peripheral blood and lung function in patients with asthma-COPD overlap syndrome [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(2): 104-107.
- [19] 李沛军, 莫晨玲, 马秀珍. 肺结核患者外周血 Th17/Treg 的表达及其病理意义 [J]. 现代免疫学, 2020, 40(5): 408-411.
- LI Peijun, MO Chenling, MA Xiuzhen. Peripheral blood Th17/Treg ratio in patients with pulmonary tuberculosis and its pathological significance [J]. Current Immunology, 2020, 40 (5): 408-411.
- [20] 武忠长. 抗结核治疗对肺结核患者 Th17/Treg 的影响 [J]. 临床肺科杂志, 2016, 21(11): 2101-2104.
- WU Zhongchang. Effect of anti-tuberculosis therapy on the balance state of Th17 cells and regulatory T cells in patients with tuberculosis [J]. Journal of clinical Pulmonary Medicine, 2016, 21(11):2101-2104.
- [21] TURNER J, GONZALEZ-JUARRERO M, ELLIS D L, et al. In vivo IL-10 production reactivates chronic pulmonary tuberculosis in C57BL/6 mice [J]. Journal Immunology, 2022, 169(11): 6343-6351.
- [22] QUEIROZ M A F, LIMA S S, AMORAS E D S G, et al. Epidemiological and cytokine profile of patients with pulmonary and extrapulmonary tuberculosis in a population of the Brazilian Amazon [J]. Microorganisms, 2022, 10(10): 2075.
- [23] SHARMA A, MAURYA CK, ARHA D, et al. Nod1-mediated lipolysis promotes diacylglycerol accumulation and successive inflammation via PKC  $\delta$  - IRAK axis in adipocytes [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2019, 1865(1):136-146.
- [24] CHAN K L, TAM T H, BOROUMAND P, et al. Circulating NOD1 activators and hematopoietic NOD1 contribute to metabolic inflammation and insulin resistance [J]. Cell Reports, 2017, 18(10): 2415-2426.
- [25] WANG Qianqian, MATSUO Y, PRADIPTA A R, et al. Synthesis of characteristic Mycobacterium peptidoglycan (PGN) fragments utilizing with chemoenzymatic preparation of meso-diaminopimelic acid (DAP), and their modulation of innate immune responses [J]. Organic Biomolecular Chemistry, 2016, 14(3):1013-1023.
- [26] SUAREZ G, ROMERO-GALLO J, PIAZUELO M B, et al. Nod1 imprints inflammatory and carcinogenic responses toward the gastric pathogen *Helicobacter pylori* [J]. Cancer Research, 2019, 79(7):1600-1611.
- [27] DENG B, YE Z, LI L, et al. Higher expression of NOD1 and NOD2 is associated with vogt-koyanagi-harada (VKH) syndrome but not Behcet's Disease (BD) [J]. Current Molecular Medicine, 2016, 16(4):424-435.
- [28] BICKETT T E, MCLEAN J, CREISSEN E, et al. Characterizing the BCG induced macrophage and neutrophil mechanisms for defense against *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Frontiers Immunology, 2020, 11: 1202.
- [29] MA Xiaomin, QIU Yumin, ZHU Lihui, et al. NOD1 inhibits proliferation and enhances response to chemotherapy via suppressing SRC-MAPK pathway in hepatocellular carcinoma [J]. Journal of Molecular Medicine, 2020, 98(2):221-232.
- [30] TRINDADE B C, CHEN G Y. NOD1 and NOD2 in inflammatory and infectious diseases [J]. Immunological Reviews, 2020, 297(1): 139-161.
- [31] HUANG Shunmei, WU Jun, GAO Xiaoyan, et al. LSECs express functional NOD1 receptors: A role for NOD1 in LSEC maturation-induced T cell immunity in vitro [J]. Molecular Immunology, 2018, 101: 167-175.
- [32] SAINI C, KUMAR P, TARIQUE M, et al. Regulatory T cells antagonize proinflammatory response of IL-17 during cutaneous tuberculosis [J]. Journal of Inflammation Research, 2018, 11:377-388.
- 收稿日期: 2023-03-15  
修回日期: 2023-10-09

(上接第18页)

- [21] LI Jia, MACDONALD J, VON STETTEN F. Correction: review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification [J]. The Analyst, 2020, 145(5): 1950-1960.
- [22] FAN Xiaoxu, LI Lin, ZHAO Yonggang, et al. Clinical validation of two recombinase-based isothermal amplification assays (RPA/RAA) for the rapid detection of african swine fever virus [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1696.
- [23] PIEPENBURG O, WILLIAMS C H, STEMPLE D L, et al. DNA detection using recombination proteins [J]. PLoS Biology, 2006, 4(7): e204.
- [24] LIN Hongqing, LIANG Yuanhao, ZOU Lirong, et al. Combination of isothermal recombinase-aided amplification and CRISPR-Cas12a-mediated assay for rapid detection of major severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 variants of concern [J]. Frontiers Microbiology, 2022, 13: 945133.
- [25] CUI Huan, TU Fei, ZHANG Cheng, et al. Real-Time reverse transcription recombinase-aided amplification assay for rapid amplification of the N gene of SARS-CoV-2 [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(23): 15269.
- [26] GHOSH P, CHOWDHURY R, HOSSAIN M E, et al. Evaluation of recombinase-based isothermal amplification assays for point-of-need detection of SARS-CoV-2 in resource-limited settings [J]. International Journal of Infectious Diseases, 2022, 114: 105-111.
- 收稿日期: 2023-05-25  
修回日期: 2023-07-18