

• 论 著 •

海洋创伤弧菌 LAMP 快速诊断方法的建立与评价*

张丽娜¹, 王明义², 杨小蕾³, 曹 源⁴, 张萍萍¹, 胡成进^{4△}

(1. 辽宁医学院, 辽宁锦州 121001; 2. 威海市立医院, 山东威海 264200; 3. 济南博科生物科技有限公司, 山东济南 250100; 4. 济南军区总医院, 山东济南 250031)

摘要:目的 利用环介导等温扩增(LAMP)技术,建立海洋创伤弧菌快速、简便、特异且敏感的检测方法,并对该方法的特异性和灵敏度进行评价。方法 选取海洋创伤弧菌溶细胞素(vvhA)基因作为靶基因,根据 GenBank 公布的序列设计 4 条 LAMP 引物;对 47 株细菌(包括 20 株弧菌属细菌)进行 LAMP 和聚合酶链式反应(PCR)扩增,并做特异性比较;对创伤弧菌 M06 株增菌液 10 倍比稀释,提取 DNA 后进行灵敏度的检测,并与常规 PCR 作比较;构建含 vvhA 基因片段的重组质粒,作为 LAMP 反应体系的标准阳性对照。结果 常规 PCR 实验出现假阳性结果,而 LAMP 实验只有海洋创伤弧菌出现阳性扩增,其他样品均为阴性,无假阳性和假阴性结果,表明引物的特异性较好,加入钙黄绿素和电泳结果相一致;针对 vvhA 基因建立的 LAMP 技术其最低检测下限为每个反应 4×10 CFU,是常规 PCR(每个反应 4×10^2 CFU)的 10 倍,呈现较好的灵敏度。重复实验过程两遍,PCR 和 LAMP 技术检测结果稳定。结论 建立了一种用于检测海洋创伤弧菌的 LAMP 检测方法,该方法特异性强,灵敏度高,方便快捷,特别适合用于现场和床旁的快速检测。

关键词:海洋; 创伤弧菌; 环介导等温扩增; 快速诊断; 聚合酶链式反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.05.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)05-0577-04

Establishment and evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay for detecting marine *Vibrio vulnificus**Zhang Lina¹, Wang Mingyi², Yang Xiaolei³, Cao Yuan⁴, Zhang Pingping¹, Hu Chengjin^{4△}

(1. Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China; 2. Weihai Municipal Hospital, Weihai, Shandong 264200, China; 3. Ji'nan Biobase Biotech Co., Ltd, Ji'nan, Shandong 250100, China; 4. General Hospital of Ji'nan Military Region of PLA, Ji'nan, Shandong 250031, China)

Abstract: **Objective** To develop a rapid, convenient, sensitive and specific method for the detection of marine *Vibrio vulnificus* by using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique, and evaluate the specificity and sensitivity of this method. **Methods** According to marine *Vibrio vulnificus* cytolysin (vvhA) gene sequence published by GenBank, a set of LAMP primers were designed. LAMP and polymerase chain reaction (PCR) amplification were carried out in 47 strains of bacteria (including 20 strains of *Vibrio*) and specificities of LAMP and PCR were compared. Serial ten-fold dilutions of an overnight *Vibrio vulnificus* M06 culture were prepared in sterile saline solution, and compared the sensitivity of LAMP with that of PCR after extracting DNA templates. A recombinant plasmid containing fragment of vvhA gene was constructed and set as a standard positive control of LAMP assay. **Results** False-positive results occurred in the conventional PCR, while in the LAMP assay positive amplifications were only seen in strains of *Vibrio vulnificus* and no false-positive or false-negative results were generated among 47 strains of bacteria, which indicated that primers had high specificity. Additionally, the results of electrophoresis were consistent with those after adding the calcein. The detection limit of LAMP was 4×10 CFU each reaction for detecting vvhA gene in pure culture, which was 10-fold more sensitive than that of conventional PCR (4×10^2 CFU each reaction). It indicated that LAMP assay had good sensitivity. Repeated the test twice, the detection results of LAMP and PCR were both stable. **Conclusion** An LAMP detection method for marine *Vibrio vulnificus* has been developed, which is highly specific, sensitive, convenient and suitable for rapid field detection and point-of-care testing.

Key words: marine; *Vibrio vulnificus*; loop-mediated isothermal amplification; rapid diagnosis; polymerase chain reaction

海洋创伤弧菌是一种分布于亚热带浅海水域及海产品中的革兰阴性弧菌,该菌的生长繁殖环境不同于陆地菌种,具有高盐、高钠、低温、乏氧、寡营养的特点,人主要通过生食生蚝等海产品感染,从而导致胃肠炎等消化系统疾病^[1],或者经海水浸泡感染伤口致蜂窝性组织炎或菌血症等,此类感染进展迅速,病死率高达 50%^[2],尤其对肝功能低下的患者易感。海洋创伤弧菌因其生长繁殖的特殊性,未引起实验室的足够重视,且缺乏专业培养基对其进行鉴定,使得感染后存在鉴定困难。

传统的鉴定方法主要是分离培养和生化鉴定,这类方法繁琐、费时、费力,并且存在易受人为和试剂的影响或需要昂贵的微生物鉴定系统的缺陷^[3]。随着分子生物学技术的发展,以聚合酶链式反应(PCR)为代表的病原菌核酸快速检测技术得到了广泛应用,但它们都需要昂贵的特殊仪器、试剂和专业技术人员,检测成本较高,不适合基层及现场的快速检测^[4]。2000 年日本学者 Notomi 等^[5]发明了一种新型的基因诊断技术,即环介导等温扩增(LAMP)技术。该技术是在链置换型 DNA 聚合

* 基金项目:全军“十二五”科研重点项目(BWS12J014)。 作者简介:张丽娜,女,检验技师,主要从事分子生物学研究。 △ 通讯作者, E-mail:hcj6289@163.com。

酶的作用下,利用特别设计的 4 段引物来识别靶基因的 6 个区域,恒温条件下(60~65℃)1 h 内就可以对目的基因进行高效、特异的复制^[6-9]。此外,该技术无需购置昂贵的 PCR 分析仪,操作简单,可用于现场的快速检测,近年来已得到广泛应用。本研究针对海洋创伤弧菌溶细胞素(vvhA)基因设计了 4 条引物,建立快速诊断海洋创伤弧菌的 LAMP 技术,可视化判断结果,并对该方法进行了应用评价。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 本实验所用的菌株共 47 株,其中海洋创伤弧菌(M06)为韩国首尔大学食品生物技术与毒理营养研究所 Sang Ho Choi 惠赠,其余弧菌属细菌来源于中国海洋微生物菌种保藏管理中心(青岛),其他菌株均为济南军区总医院临床分离保存菌株。

1.2 仪器与试剂 恒温金属浴(济南博科生物科技有限公司),低温高速离心机 Centrifuge 5430R(德国 Eppendorf 公司),荧光凝胶成像分析系统(美国 UVP 公司),TC-XR 型基因扩增仪(日本 BIOER 公司)。Bst DNA 聚合酶(8 U/ μ L)购于 New England Biolabs 公司,三磷酸脱氧核苷酸(dNTP,10 mol/L)和 DNA 标记物均购于大连宝生物工程有限公司,钙黄绿素购于北京蓝谱科技有限公司,所有试剂均在有效期内使用。

1.3 方法

1.3.1 细菌培养及 DNA 模板的制备 按常规操作规程采用三区划线法取弧菌属细菌接种于 2216E 平板,培养温度为 28℃。非弧菌属细菌接种于血平板,培养温度为 37℃,置于培养箱中培养过夜。采用煮沸法提取细菌 DNA:取 50 μ L 双蒸水(ddH₂O)于 1.5 mL EP 管中,调菌液至 1~2 个浊度,震荡 15 s,煮沸 10 min 后立即冰浴 3 min,13 000 r/min 离心 5 min,取上清作为 DNA 模板,-20℃保存备用。革兰阳性菌则需要加入溶菌酶后煮沸提取。

1.3.2 LAMP 引物的设计与合成 根据 GenBank 数据库中收集的 vvhA 基因序列进行 LAMP 引物设计(<http://primer-explorer.jp/e/>),筛选出一套最佳引物(2 对),其中两条外引物为 F3、B3,内引物为 FIP、BIP(引物序列见专利申请内容),设计好的引物交由 Invitrogen 公司合成。

1.3.3 LAMP 反应体系 总体积 25 μ L,具体组分包括:10×缓冲液、dNTP、引物、甜菜碱、硫酸镁(MgSO₄)、Bst 酶、钙黄绿素、DNA 模板等(专利申请内容),轻微混匀瞬时离心后加入 20 μ L 灭菌液体石蜡密封,置于恒温金属浴中,反应条件设置为 63℃,1 h;85℃,5 min 终止反应。

1.3.4 vvhA 基因的克隆和阳性对照的建立 用 LAMP 实验的两条外引物 F3/B3 进行 PCR 扩增,反应体系(25 μ L):模板 2 μ L, Premix Taq 12.5 μ L, F3/B3(5 μ mol/L)各 1 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。反应条件:94℃ 8 min, 94℃ 40 s, 62℃ 40 s, 72℃ 40 s, 72℃ 8 min;共 30 个循环。扩增产物于 2%的琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察结果,将 217 bp 的扩增目的片段切胶回收后,与 PMD18-T 载体连接,16℃ 2 h 后 4℃ 冰箱过夜。将连接产物转入大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞,涂布于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中,37℃ 培养过夜后挑取单克隆菌落摇菌后经 PCR 验证送测序,测序成功后提取质粒作为标准阳性对照。

1.3.5 LAMP 反应产物的判断 (1)肉眼判读结果:反应结束后肉眼观察结果,反应液由橙色变为绿色则判为阳性,保持橙色则判为阴性。(2)琼脂糖凝胶电泳:6 μ L 扩增产物与 1 μ L 上样缓冲液混匀点样于含 0.1 μ L/mL Goldview I 型核酸染料

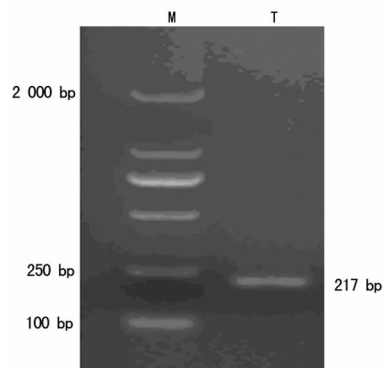
的 2%琼脂糖凝胶中,100 V 电泳 25 min,电泳显示 LAMP 特征性梯状条带则判为阳性,否则判为阴性。

1.3.6 PCR 和 LAMP 法检测创伤弧菌的特异性分析 将 4 株海洋创伤弧菌、3 株副溶血弧菌、3 株哈维弧菌、3 株美人鱼弧菌、3 株查格斯弧菌、2 株海洋溶藻弧菌、1 株费氏弧菌、1 株弗氏弧菌,临床分离的大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌、铜绿假单胞菌、不动杆菌、嗜麦芽假单胞菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、肠球菌各 3 株用上述反应体系进行 LAMP 和常规 PCR 检测。

1.3.7 PCR 和 LAMP 法检测海洋创伤弧菌的灵敏度 将海洋创伤弧菌 M06 株菌液培养过夜后,进行 10 倍系列倍比稀释,从 10¹~10⁹ 稀释液中各吸取 20 μ L 至无菌平皿中,倾注冷却的 2216E 液体培养基后混匀,每个稀释度做两个平行,37℃ 培养 48 h 计数菌落数。吸取各浓度稀释液 1 mL,提取 DNA 后用上述扩增条件同时进行 LAMP 和 PCR 检测。

2 结果

2.1 vvhA 基因的克隆和阳性对照的建立 用 F3/B3 作为引物,普通 PCR 扩增,电泳显示条带与目的条带大小一致(217 bp),见图 1。将此条带切胶回收成功与 PMD18-T 载体连接,并转入大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞,涂布于含氨苄青霉素的 LB 培养基中,过夜培养 PCR 验证后测序结果显示已成功构建含 vvhA 目的片段的重组质粒,可以作为 LAMP 实验的标准阳性对照。



M:DNA 分子量标记物 DL2000;T:vvhA 基因片断阳性扩增。

图 1 PCR vvhA 电泳结果

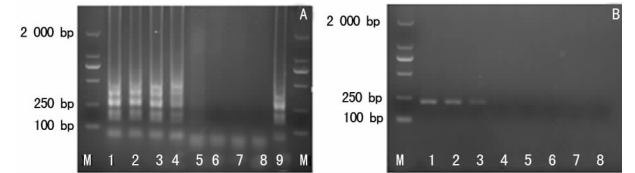
2.2 PCR 和 LAMP 法检测海洋创伤弧菌的特异性分析 以 vvhA 基因重组质粒为标准阳性对照,ddH₂O 为阴性对照,PCR 和 LAMP 技术检测上述菌株。结果显示,常规 PCR 除 4 株海洋创伤弧菌出现阳性外,1 株副溶血弧菌、1 株海洋溶藻弧菌也出现阳性;而 LAMP 实验只有海洋创伤弧菌出现阳性扩增,其他样品均为阴性,无假阳性和假阴性结果,表明引物的特异性较好,加入钙黄绿素和电泳结果相一致。见表 1。

2.3 PCR 和 LAMP 法检测海洋创伤弧菌的灵敏度分析 海洋创伤弧菌 MO6 培养物进行倾注平板计数,已测定的初始菌液浓度为 2×10⁸ CFU/mL,10 倍倍比稀释的菌液浓度分别为 2×10⁷、2×10⁶、2×10⁵、2×10⁴、2×10³、2×10²、2×10¹ CFU/mL。所对应反应体系中的浓度为每个反应 4×10⁴、4×10³、4×10²、4×10¹、4×10⁰、4×10⁻¹、4×10⁻² CFU。对不同稀释度的模板 DNA 进行常规 PCR(F3/B3 作引物)和 LAMP 实验,发现针对 vvhA 基因设计的引物最低检测下限为每个反应 4×10 CFU,是常规 PCR(每个反应 4×10² CFU)的 10 倍,呈现较好的灵敏度。两种实验方法检测海洋创伤弧菌的灵敏度分析结果见图 2,LAMP 检测海洋创伤弧菌灵敏度显色分析见图 3

(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。重复实验过程两遍,PCR 和 LAMP 法检测结果稳定。

表 1 LAMP 法和常规 PCR 检测创伤弧菌的特异性分析(n)

菌株名称	总菌株数	阳性菌株数	
		LAMP 实验	常规 PCR
海洋创伤弧菌	4	4	4
副溶血弧菌	3	0	1
哈维弧菌	3	0	0
美人鱼弧菌	3	0	0
查格斯弧菌	3	0	0
海洋溶藻弧菌	2	0	1
费氏弧菌	1	0	0
弗氏弧菌	1	0	0
大肠埃希菌	3	0	0
肺炎克雷伯菌	3	0	0
阴沟肠杆菌	3	0	0
铜绿假单胞菌	3	0	0
不动杆菌	3	0	0
嗜麦芽假单胞菌	3	0	0
金黄色葡萄球菌	3	0	0
表皮葡萄球菌	3	0	0
肠球菌	3	0	0



A:LAMP 实验;B:常规 PCR;M:DNA 分子量标记物 DL2000;1:浓度为每个反应 4×10^4 CFU;2:浓度为每个反应 4×10^3 CFU;3:浓度为每个反应 4×10^2 CFU;4:浓度为每个反应 4×10 CFU;5:浓度为每个反应 4×10^0 CFU;6:浓度为每个反应 4×10^{-1} CFU;7:浓度为每个反应 4×10^{-2} CFU;8:阴性对照;9:阳性对照。

图 2 两种实验方法检测创伤弧菌的灵敏度分析

3 讨 论

随着海洋作业活动的日益频繁,海洋致病菌感染性疾病的发生逐年增加,但是由于海洋致病菌自身生长特点使其在临床实验室常规培养条件下难以生长,导致不能正确检出而漏诊,对此应引起医学实验室的高度重视。在海洋致病菌中创伤弧菌致病力最强,感染后常导致菌血症及器官衰竭^[10-12]。本研究采用 LAMP 技术建立了一种快速检测海洋创伤弧菌感染的方法。构建了重组质粒作为检测体系的阳性对照,并对此方法进行了特异性和灵敏度的评价。

本研究的核心技术在于引物的设计,需要考虑以下几个方面。(1)熔解温度(Tm)值: F1c/B1c 引物区的 Tm 值控制在 64~66 ℃,F2/B2、F3/B3 则控制在 59~61 ℃,LF/LB 引物的 Tm 值约为 60 ℃。(2)引物末端的稳定性:引物作为 DNA 合成的起点,其末端必须要有一定的稳定性,ΔG 为吉布斯自由能变,该值越小,引物越容易与模板退火结合。设计原则为 F3/B3、F2/B2、LF/LB 的 3'端 ΔG 值小于或等于-4 kcal/mol,F1c/B1c 的 5'端 ΔG 值小于或等于-4 kcal/mol。(3)GC 百分含量:引物的 GC 百分含量在 40%~65%。(4)引物之间的距离:F2 与 B2 之间的距离(LAMP 的扩增区域)为 0~60 bp,F2 与 F3 之间的距离为 0~60 bp,而 F2 的 5'端与 F1 的 5'

端的距离(环引物的区域)为 40~60 bp^[13]。

常规 PCR 需要配套控温精密的仪器和复杂的实验程序,检测成本高^[14]。而本研究所用的 LAMP 技术无需 PCR 仪,仅使用一台恒温金属浴即可,操作简单,并且本实验使用 47 株细菌检测该方法的特异性,结果显示只有海洋创伤弧菌出现阳性扩增,其他样品均为阴性,无假阳性和假阴性结果,且该方法特异性明显高于常规 PCR。另外,LAMP 检测海洋创伤弧菌的最低检测限度达到每个反应 40 CFU,灵敏度是常规 PCR 的 10 倍。

LAMP 检测结果判读有浊度分析、电泳分析、染料比色分析等多种方式^[15]。但是观察浊度具有主观性及灵敏度低等缺点,而通过电泳分析或者在反应完成后添加 SYBR Green I 荧光染料来判断反应结果都使反应产物暴露于空气中,极易造成假阳性,而反应扩增之前加入 SYBR Green I 会抑制 LAMP 反应的进行^[16]。本研究使用的钙黄绿素检测,将整个反应和检测融合为一个过程,而且反应完成后不开盖,很好地杜绝了污染,有效防止了假阳性^[17]。

综上所述,LAMP 技术快速检测海洋创伤弧菌用时少、操作简单、特异性强、灵敏度高,且结果判读简单。在 63 ℃条件下扩增 1 h,便可根据颜色变化用肉眼来判定是否存在海洋创伤弧菌。近年来有报道显示,聚乙二醇可以加速 LAMP 反应的进行^[18],相信采用 LAMP 技术检测海洋创伤弧菌的方法将会逐渐完善并应用于临床。笔者下一步研究将着重优化反应体系,提高引物纯度,进一步提高反应的灵敏度,缩短反应时间,为该方法在临床的推广应用奠定基础。

参考文献

[1] Tsai YH, Hsu RW, Huang KC, et al. Systemic vibrio infection presenting as necrotizing fasciitis and sepsis; a series of thirteen cases[J]. J Bone Joint Surg Am, 2004, 86(11): 2497-2502.

[2] Horseman MA, Surani S. A comprehensive review of Vibrio vulnificus; an important cause of severe sepsis and skin and soft-tissue infection[J]. Int J Infect Dis, 2011, 15(3): 157-166.

[3] Kim DG, Ahn SH, Kim LH, et al. Application of the rpoS gene for species-specific detection of Vibrio vulnificus by real-time PCR [J]. J Microbiol Biotechnol, 2008, 18(11): 1841-1847.

[4] Han FF, Wang F, Ge BL. Detecting potentially virulent vibrio vulnificus strains in raw oysters by quantitative Loop-Mediated i-sothermal amplification [J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77 (8): 2589-2595.

[5] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated iso-thermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28 (12): e63.

[6] Notomi T, Mori Y, Tomita N, et al. Loop-mediated isothermal am-plification (LAMP): principle, features, and future prospects[J]. J Microbiol, 2015, 53(1): 1-5.

[7] Tanner NA, Evans TJ. Loop-mediated isothermal amplification for de-tection of nucleic acids[J]. Curr Protoc Mol Biol, 2014, 105(15): 14.

[8] Niessen L, Luo J, Denschlag C, et al. The application of loop-medi-ated isothermal amplification (LAMP) in food testing for bacterial pathogens and fungal contaminants[J]. Food Microbiol, 2013, 36 (2): 191-206.

[9] Zhang X, Lowe SB, Gooding JJ. Brief review of monitoring meth-ods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [J]. Bio-sens Bioelectron, 2014, 61(20): 491-499.

[10] Narracci M, Acquaviva M, Cavallo RA. Mar piccolo(下转第 582 页)

方法检测阴性,说明结核分枝杆菌抗体 IgM 与 IgG 联合检测对 T-SPOT. TB、结核分枝杆菌快速培养和痰液或肺泡灌洗液涂片检测结核分枝杆菌感染阴性患者的诊断具有重要意义。因此,结核分枝杆菌抗体 IgM 与 IgG 联合检测可以减少漏诊,做到早发现、早治疗。

综上所述,肺结核实验室快速诊断技术已经取得了较大进展,其中近几年研发的 T-SPOT. TB 诊断肺结核的阳性率、灵敏度均较高,可见 T-SPOT. TB 在检测结核分枝杆菌感染、辅助结核病诊断方面具有很高的应用价值,值得临床推广。如今随着医疗设施的不断改进,单一的检测方法已不能满足辅助临床诊断肺结核的需要。因此,采用快速、简便、灵敏度高的检测方法对结核病的辅助诊断尤为重要,并且同时联合运用 T-SPOT. TB、结核分枝杆菌快速培养试验、结核分枝杆菌抗体 IgM 与 IgG 联合检测和痰液或肺泡灌洗液涂片可大大提高诊断率,并满足不同临床需要,为结核病的临床诊断与防治提供科学依据。

参考文献

[1] 沈玉祯. 结核病实验室诊断技术[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2013, 34(4): 563-565.

[2] 江渊,王曲直,张阳奕,等. 快速检测技术在奶牛结核病检测中的应用研究[J]. 中国防痨杂志, 2014, 36(6): 447-452.

[3] Su WT. Recent advances in the molecular diagnosis of tuberculosis [J]. J Microbiol Immunol Infect, 2002, 35(4): 209-214.

[4] 杨洪毅,石洁,刘国栋,等. 荧光定量 PCR 技术在痰结核菌检测中的应用[J]. 现代预防医学, 2013, 40(8): 1483-1484.

[5] 吴文旺,王峻. 结核病实验室快速诊断[J]. 旅行医学科学, 2005, 11(2): 40-42.

[6] 吴第梅,阳萍. 结核病检查方法的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(1): 106-107.

[7] Lalvani A, Pareek M. Interferon gamma release assays: principles and practice[J]. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2010, 28(4): 245-252.

[8] Lalvani A. Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century: new tools to tackle all old enemy[J]. Chest, 2007, 131(6): 1898-1906.

[9] 朱国勇. 结核感染 T 细胞斑点试验诊断肺结核临床价值探讨[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(14): 1822-1825.

[10] Dominguez J, Ruiz-Manzano J, De Souza-Galvão M, et al. Compar-

ison of two commercially available gamma interferon blood tests for immunodiagnosis of tuberculosis[J]. Clin Vaccine Immunol, 2008, 15(1): 168-171.

[11] Detjen AK, Keil T, Roll S, et al. Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis[J]. Clin Infect Dis, 2007, 45(3): 322-328.

[12] Dosanjh DP, Hinks TS, Innes JA, et al. Improved diagnostic evaluation of suspected tuberculosis[J]. Ann Intern Med, 2008, 148(5): 325-336.

[13] 谢希,陈进伟,高洁生,等. 结核感染 T 细胞斑点试验在结核诊断中的应用[J]. 临床内科杂志, 2010, 27(6): 396-399.

[14] 郭小微. 3 种方法检测结核分枝杆菌的比较[J]. 重庆医学, 2005, 34(10): 1506-1507.

[15] 廖传玉,蒋克珉,高万. 痰分枝杆菌快速培养和药敏试验的评价[J]. 临床肺科杂志, 2005, 10(1): 115.

[16] 杨松,张耀亭,林素梅,等. 抗酸染色对肺结核的诊断价值[J]. 临床肺科杂志, 2007, 12(4): 328-329.

[17] 张培元,康丽君. BACTEC-460-TB 临床标本检测分析[J]. 中国防痨杂志, 1993, 15(4): 164-165.

[18] Anargyros P, Astill DS, Lim IS. Comparison of improved BACTEC and Lowenstein-Jensen media for culture of mycobacteria from clinical specimens[J]. J Clin Microbiol, 1990, 28(6): 1288-1291.

[19] 马俊,王自立. 结核分枝杆菌快速培养的研究进展及其临床意义[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2007, 17(5): 388-390.

[20] 王馨. 结核菌快速培养法 γ -干扰素释放试验在结核病诊断中的应用价值[J]. 安徽医学, 2015, 36(5): 607-609.

[21] Vinton P, Mhrshahi SP, Jenkin G, et al. Comparison of QuantiFERON-TB Gold In-Tube test and tuberculin skin test for identification of latent Mycobacterium tuberculosis infection in health-care staff and association between positive test results and known risk factors for infection [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2009, 30(3): 215-221.

[22] 陈献雄,杨倩婷,徐六妹,等. 采用干扰素释放反应试验和 PPD 皮试对深圳市高校学生结核分枝杆菌潜伏感染筛查的研究[J]. 临床肺科杂志, 2009, 14(6): 737-738.

[23] 古翠姣,白广红. 结核抗体 IgG 与 IgM 联合检测在结核病诊断中的应用价值[J]. 吉林医学, 2013, 34(29): 6004-6005.

(收稿日期: 2015-12-14)

(上接第 579 页)

of taranto: vibrio biodiversity in ecotoxicology approach[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2014, 21(3): 2378-2385.

[11] Ma C, Deng XL, Ke CW, et al. Epidemiology and etiology characteristics of foodborne outbreaks caused by vibrio parahaemolyticus during 2008-2010 in Guangdong province, China[J]. Foodborne Pathog Dis, 2014, 11(1): 21-29.

[12] Haenen OL, van Zanten E, Jansen R, et al. Vibriovulnificus outbreaks in Dutch eel farms since 1996: strain diversity and impact [J]. Dis Aquat Organ, 2014, 108(3): 201-209.

[13] Torres C, Vitalis EA, Baker BR, et al. LAVA: an open-source approach to designing LAMP(loop-mediated isothermal amplification) DNA signatures[J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12(2): 1-7.

[14] Dhama K, Karthik K, Chakraborty S, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP): a new diagnostic tool lights the world of diagnosis of animal and human pathogens: a review[J]. Pak J Biol Sci, 2014, 17(2): 151-166.

[15] Goto M, Honda E, Ogura A, et al. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxynaph-

thol blue[J]. Biotechniques, 2009, 46(3): 167-172.

[16] Zong XJ, Wang WW, Wei HR, et al. Rapid detection of Prunus necrotic ringspot virus using magnetic nanoparticle-assisted reverse transcription loop-mediated isothermal amplification[J]. J Virol Methods, 2014(208): 85-89.

[17] Fischbach J, Xander NC, Frohme MA. Shining a light on LAMP assays-A comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine[J]. Biotechniques, 2015, 58(4): 189-194.

[18] Nose K, Nagamine K, Tokuda J, et al. Polyethylene glycol accelerates loop-mediated isothermal amplification(LAMP) reaction[J]. Yakugaku Zasshi, 2013, 133(10): 1121-1126.

(收稿日期: 2015-11-26)

