

• 论 著 •

基于环介导等温扩增技术快速检测金黄色葡萄球菌的方法建立与评价*

吴川¹, 马晓阳¹, 王益¹, 雷梓秋¹, 吴春莉¹, 余晓林^{1,2Δ}

1. 自贡市第四人民医院检验科/四川省医学检验临床医学研究中心, 四川自贡 643000;

2. 自贡市医学大数据与人工智能研究院, 四川自贡 643000

摘要:目的 构建基于环介导等温扩增(LAMP)技术的快速检测金黄色葡萄球菌的方法,并评估其对金黄色葡萄球菌的检测能力。方法 基于“种内保守”与“种间特异”的双准则,采用本地及在线基于局部比对算法的搜索工具,完成了金黄色葡萄球菌特异性基因筛选。使用 Primer Explorer V5 软件设计了 LAMP 引物。建立 LAMP 基础反应体系,并对扩增温度、Mg²⁺和 dNTP 的浓度及孵育时间进行优化。通过向 LAMP 反应体系中添加羟基萘酚蓝(HNB)以实现扩增结果的可视化检测。使用优化的 LAMP 反应体系对 16 株标准菌株进行交叉反应测试,以验证其特异性。提取 10 倍梯度稀释的金黄色葡萄球菌悬液(3×10⁰~3×10⁸ CFU/mL)基因组 DNA 用于 LAMP 扩增,以测定其检出限。使用 LAMP 方法检测了 180 株临床菌株,评价其诊断效能。结果 通过多源生物信息学分析,确定了一段金黄色葡萄球菌种属特异性基因(GenBank:CP049389.1;位置 434832-435198 bp),并依据该基因设计了 LAMP 引物并优化了反应条件。优化后的 LAMP 体系包含 1×等温扩增缓冲液,6.0 U Bst 2.0 DNA 聚合酶、6.0 mmol/L Mg²⁺、1.2 mmol/L dNTP、120 μmol/L HNB、0.2 μmol/L F3 与 B3、1.6 μmol/L FIP 与 BIP、0.8 mol/L 甜菜碱, DNA 模板和 ddH₂O,反应程序设置为 62 °C 孵育 60 min。在优化的反应体系中,LAMP 对金黄色葡萄球菌检测的特异度为 100.0%,检出限为 3×10¹ CFU/反应,准确度为 96.7%。结论 该研究所建立的 LAMP 技术简单可靠,可作为金黄色葡萄球菌感染的快速诊断工具。

关键词:环介导等温扩增; 金黄色葡萄球菌; 羟基萘酚蓝; 病原学诊断; 快速检测

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2026.06.008

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2026)06-0683-07

文献标志码:A

Establishment and evaluation of a rapid detection method for *Staphylococcus aureus* based on loop-mediated isothermal amplification technology*

WU Chuan¹, MA Xiaoyang¹, WANG Yi¹, LEI Ziqiu¹, WU Chunli¹, YU Xiaolin^{1,2Δ}

1. Department of Laboratory Medicine, Zigong Fourth People's Hospital/Sichuan Clinical Research Center for Clinical Laboratory, Zigong, Sichuan 643000, China; 2. Institute of Precision Medicine, Zigong Academy of Big Data and Artificial Intelligence in Medical Science, Zigong, Sichuan 643000, China

Abstract: Objective To establish a rapid detection method for *Staphylococcus aureus* based on Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) technology and to evaluate its detection capability for *Staphylococcus aureus*. **Methods** Based on the dual criteria of "intra-species conservation" and "inter-species specificity", the specific genes of *Staphylococcus aureus* were screened using local and online search tools based on local alignment algorithms. Primer Explorer V5 software was used to design LAMP primers. The LAMP basic reaction system was established, and the amplification temperature, Mg²⁺ and dNTP concentrations, and incubation time were optimized. The visualization detection of amplification results was achieved by adding hydroxy naphthol blue (HNB) to the LAMP reaction system. The optimized LAMP reaction system was used to test the cross-reaction of 16 standard strains to verify its specificity. Genomic DNA of *Staphylococcus aureus* diluted in 10-fold gradients (3×10⁰ to 3×10⁸ CFU/mL) was extracted for LAMP amplification to determine its detection limit. The LAMP method was used to detect 180 clinical strains to evaluate its diagnostic efficacy. **Results** Through multi-source bioinformatics analysis, a species-specific gene of *Staphylococcus aureus* (Gen-

* 基金项目:自贡市重点科技计划(自贡市医学大数据与人工智能研究院协同创新类)项目(2023-YGY-3-03);四川大学-自贡市校地科技合作专项(2022CDZG-27);自贡市卫生健康委员会科研课题(21zd007)。

作者简介:吴川,男,技师,主要从事分子生物学方面研究。Δ 通信作者, E-mail: yuxiaolinqc@hotmail.com。

Bank;CP049389.1; positions 434832-435198 bp) was identified. Based on this gene, LAMP primers were designed and reaction conditions were optimized. The optimized LAMP system includes $1 \times$ isothermal amplification buffer, 6.0 U Bst 2.0 DNA polymerase, 6.0 mmol/L Mg^{2+} , 1.2 mmol/L dNTP, 120 μ mol/L HNB, 0.2 μ mol/L F3 and B3, 1.6 μ mol/L FIP and BIP, 0.8 mol/L betaine, DNA template and ddH₂O. The reaction program was set at 62 °C incubation for 60 min. In the optimized reaction system, the specificity of LAMP for detecting *Staphylococcus aureus* was 100.0%, the detection limit is 3×10^1 CFU/reaction, and the accuracy was 96.7%. **Conclusion** The LAMP technology established in this study is simple and reliable, and can be used as a rapid diagnostic tool for *Staphylococcus aureus* infection.

Key words: loop-mediated isothermal amplification; *Staphylococcus aureus*; hydroxy naphthol blue; etiological diagnosis; rapid detection

金黄色葡萄球菌是一类临床常见的革兰阳性球菌,2023 年全国细菌耐药监测报告显示,金黄色葡萄球菌的检出量占整个革兰阳性菌的 32.9%。金黄色葡萄球菌可产生多种毒素和侵袭性酶,是引起人类皮肤感染、骨髓炎、心内膜炎、肺炎、中毒性休克综合征、烫伤皮肤综合征等多种严重疾病的原因^[1]。与此同时,金黄色葡萄球菌还是社区和医院获得性血流感染的常见原因,而感染性心内膜炎是其最严重的并发症之一^[2]。相关研究报告显示,血流感染是第七大最常见的死亡原因,也是感染导致死亡的主要原因^[3-4]。有研究显示,快速的诊断和早期的临床干预对于血流感染患者的预后至关重要,特别是在急诊科和重症监护病房(ICU)中,实施及时有效的抗感染治疗可显著降低血流感染的病死率^[5]。因此,快速诊断金黄色葡萄球菌感染有助于临床对疾病进行早期干预,从而降低病死率及节省医疗费用。

目前,金黄色葡萄球菌通常使用微生物培养法进行诊断,包括菌落形态学、革兰染色、生化鉴别试验(例如凝固酶、过氧化氢酶、DNA 酶等)、药敏试验。然而,传统培养法也存在明显的局限性,比如操作步骤复杂,检测时间长达 2~3 d 等^[6]。为此,患者可能错过治疗窗口期,延误最佳治疗时机。近年来,随着分子诊断的兴起,聚合酶链反应(PCR)常常被用于直接从环境和临床标本中鉴定金黄色葡萄球菌^[7-8]。与传统培养法相比,PCR 具有检测时效短,灵敏度高,重复性好等显著优势^[9]。然而,PCR 方法的应用也受到许多额外问题的限制,如需要价格昂贵 PCR 热循环仪与专业的技术人员、样品制备过程复杂、需要特定的操作空间等。鉴于此,开发更为高效,快速且成本低廉的精准检测方案已成为当务之急。

环介导等温扩增(LAMP)是由 NOTOMI 等^[10]于 2000 年开发并报道的一种等温扩增方法。LAMP 技术可在 1 h 内将几个拷贝的 DNA 扩增到 10^9 个拷贝,并且具有很高的检测灵敏度,已被开发用于快速检测各种病原体,是一种有用的快速诊断工具^[11-12]。目前,一些研究已实现了 LAMP 技术在金黄色葡萄球菌检测中的初步应用,但其产物判读环节仍受限于专用浊度检测设备或荧光信号采集系统,这严重制约了现场

快速检测的可行性^[13-14]。简化 LAMP 技术流程的核心在于实现扩增结果的简易判读。为此,研究者开发了一系列用于 LAMP 产物检测的可视化染料^[15-16]。本研究拟构建集核酸扩增与比色法检测于一体的便携式检测方案,用于金黄色葡萄球菌的快速诊断。通过向 LAMP 反应体系中添加金属指示剂羟基萘酚蓝(HNB),实现检测结果的可视化判读。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌种 本研究共使用了 16 种标准菌株用以分析 LAMP 技术的特异性,具体菌株如下:金黄色葡萄球菌(ATCC29213、ATCC25923)、大肠埃希菌(ATCC25922)、尿肠球菌(ATCC19434)、粪肠球菌(ATCC29212)、肺炎克雷伯菌(ATCC700603)、铜绿假单胞菌(ATCC27853)、肺炎链球菌(ATCC49619)、流感嗜血杆菌(ATCC49247)、阴沟肠杆菌(ATCC700323)、嗜麦芽窄食单胞菌(ATCC17666)、铅黄肠球菌(ATCC700327)、克柔念珠菌(ATCC6258)、白色念珠菌(ATCC90028)、近平滑念珠菌(ATCC22019)及表皮葡萄球菌(ATCC12228)。此外,研究纳入了 2024 年 3—9 月由自贡市第四人民医院微生物实验室所分离的 180 株临床菌株,用以评价 LAMP 方法的诊断效能。这些临床菌株使用梅里埃 VITEK 2 Compact 平台完成种属确认,其中金黄色葡萄球菌占 61.7%(111 株),非金黄色葡萄球菌占 38.3%(69 株)。非金黄色葡萄球菌的菌株信息如下:大肠埃希菌(17 株)、肺炎克雷伯菌(12 株)、粪肠球菌(8 株)、铜绿假单胞菌(8 株)、鲍曼不动杆菌(7 株)、尿肠球菌(5 株)、表皮葡萄球菌(5 株)、阴沟肠杆菌(3 株)、奇异变形杆菌(2 株),以及无乳链球菌、嗜麦芽窄食单胞菌各 1 株。

1.2 仪器与试剂 仪器:基因扩增仪(宏石医疗)、电泳仪(北京六一生物)、VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定系统(法国生物梅里埃)、凝胶成像系统(上海伯乐)、恒温培养箱(博科生物)、生物安全柜(博科生物)等。试剂: $MgSO_4$ 、Bst 2.0 DNA 聚合酶(北京 NEB);甜菜碱、dNTP(生工生物);HNB(阿拉丁生化科技);电泳缓冲液、DNA 标记物、PCR 扩增试剂、引物(擎科生物)、培养基(安图生物)等。

1.3 方法

1.3.1 特异性基因的筛选和引物设计 首先,本研究使用本地基于局部比对算法的搜索工具(BLAST)筛选金黄色葡萄球菌特异性基因。随后使用在线 BLAST 进一步鉴定靶基因。通过本地 BLAST 比对和在线 BLAST 数据库检索,最终确定了本研究所用

到的金黄色葡萄球菌靶基因序列(GenBank: CP049389.1;位置 434832-435198 bp)。随后,使用 Primer Explorer V5(<https://primerexplorer.eiken.co.jp/>)软件针对该序列设计了 4 条 LAMP 引物(表 1)。引物设计严格遵循引物设计手册(https://primerexplorer.jp/v5_manual/index.html)进行。

表 1 LAMP 引物序列

名称	引物序列(5'-3')	引物长度(bp)
F3	TGGAGTTAAAAATGAAGGACAA	22
B3	CTTTTTGAGTAACACATCTTGAG	23
FIP	TGAGGTATGTGTTATACCTTGAGT-ATTCATAAACATGGTAAGCGT	46
BIP	ATGCTTAGAATGCAATGGCACT-ATAAACACGACTCATCAACA	43

1.3.2 基因组 DNA 提取方法 本研究采用改良型 Hotshot 裂解法进行核酸抽提:菌液经 $2\ 074\times g$ 离心 3.5 min 获得菌体沉淀,重悬于 $8\ \mu\text{L}$ 碱裂解液(含 125 mmol/L NaOH、1 mmol/L EDTA 及 0.1% Tween 20), $65\ ^\circ\text{C}$ 金属浴热激 10 min 使细菌裂解。随后加入 $4\ \mu\text{L}$ 酸中和液(含 250 mmol/L HCl、10 mmol/L Tris-HCl),涡旋振荡 30 s 混匀,经瞬时离心($200\times g$, 10 s)后取上清液作为模板^[17]。

1.3.3 LAMP 反应体系构建 参照 Bst 2.0 DNA 聚合酶产品说明书,建立了 LAMP 基础体系(以下均为终浓度): $1\times$ 等温扩增缓冲液、6.0 U Bst 2.0 DNA 聚合酶、8.0 mmol/L Mg^{2+} 、1.0 mmol/L dNTP、0.2 $\mu\text{mol/L}$ F3 与 B3、1.6 $\mu\text{mol/L}$ FIP 与 BIP、0.8 mmol/L 甜菜碱、DNA 模板,以 ddH_2O 添至 $25\ \mu\text{L}$ 。反应程序设置为: $60\ ^\circ\text{C}$ 恒温扩增 40 min。产物检测方法:通过向反应体系加入 $120\ \mu\text{mol/L}$ HNB 用以指示扩增反应^[16]。体系发生有效扩增时,反应管的颜色由紫色变为天蓝色。同时,取 $5\ \mu\text{L}$ 扩增产物与电泳缓冲液充分混匀后,使用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳分析。LAMP 扩增阳性表现出典型的梯状条带,而扩增阴性则无条带产生。

1.3.4 LAMP 反应体系优化 提取金黄色葡萄球菌标准株(ATCC25923)基因组 DNA,以此为 LAMP 扩增模板进行反应优化。在保持其他反应条件不变的情况下,依次设置不同的扩增温度($60\sim 64\ ^\circ\text{C}$)、 Mg^{2+} 浓度(2.0~10.0 mmol/L)、dNTP 浓度(0.6~1.4 mmol/L)、孵育时间(20~60 min)。反应结果通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行判读,以此选择 LAMP 最优反应体系。

1.3.5 LAMP 特异性评价 使用 1.3.4 建立的最佳 LAMP 反应体系,分别检测 16 株标准菌株基因组 DNA,以此来评估 LAMP 检测的特异性。以 ddH_2O 代替基因组 DNA 加入反应体系作为空白对照。反应结果通过 HNB 染料颜色变化进行判断。并用 1.5%

琼脂糖凝胶电泳进行验证。

1.3.6 LAMP 检出限评价 金黄色葡萄球菌标准株(ATCC25923)经隔夜培养后,采用生理盐水进行 10 倍梯度稀释处理。原培养液中活菌数的测定则通过稀释平板计数法完成。同时,从各浓度梯度菌悬液($3\times 10^0\sim 3\times 10^8$ CFU/mL)中取 1 mL 用以基因组 DNA 提取。使用最佳 LAMP 反应体系分别对这些基因组 DNA 进行扩增。以 ddH_2O 代替基因组 DNA 加入反应体系作为空白对照。反应结果通过 HNB 染料颜色变化进行判断。并用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行验证。

1.3.7 LAMP 特异性与检出限比较 使用 LAMP、PCR 技术进行特异性和检出限评估,比较两种方法在特异性和检出限方面的优劣。扩增完成后经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。

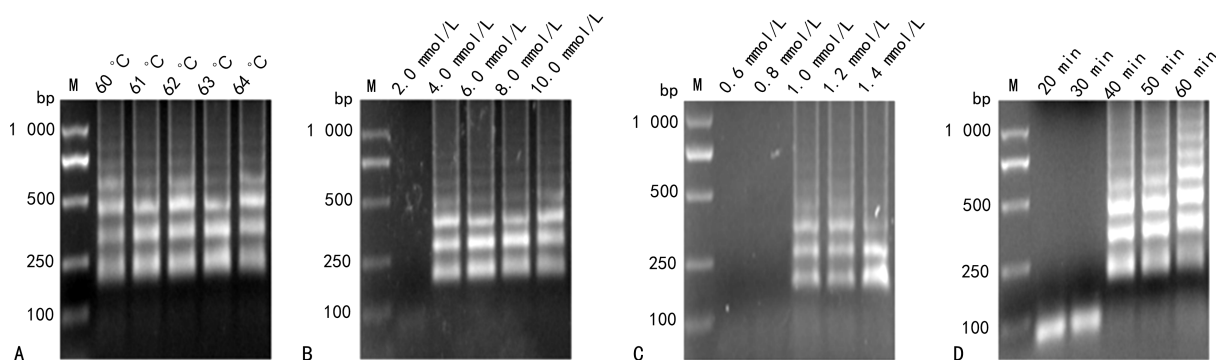
1.3.8 LAMP 在临床菌株检测中的应用 使用改良型 Hotshot 裂解法对 180 株临床分离菌株进行基因组 DNA 提取,并进行 LAMP 扩增实验。以 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定系统的检测结果为参考,分别计算 LAMP 方法的诊断效能。特异度 = $[\text{真阴性数}/(\text{真阴性数} + \text{假阳性数})]\times 100\%$;灵敏度 = $[\text{真阳性数}/(\text{真阳性数} + \text{假阴性数})]\times 100\%$;准确度 = $[(\text{真阳性数} + \text{真阴性数})/\text{总样本数}]\times 100\%$ 。

2 结果

2.1 LAMP 反应的优化 对 LAMP 反应的关键参数,包括扩增温度、 Mg^{2+} 和 dNTP 浓度及孵育时间进行了优化,以获得最佳的扩增效率。LAMP 反应在 $62\ ^\circ\text{C}$ 时表现出更为良好的扩增效率,其条带亮度较其他温度条件下更高(图 1A)。因此,选择 $62\ ^\circ\text{C}$ 作为后续实验的最佳反应扩增温度。对于 $62\ ^\circ\text{C}$ 下 Mg^{2+} 浓度的优化,在 6.0 mmol/L Mg^{2+} 与 8.0 mmol/L Mg^{2+} 浓度下,LAMP 的扩增效率较其他浓度更高(图 1B),考虑到过高 Mg^{2+} 浓度可能会导致非特异性扩增风险的增加^[18],因此,本研究选择的最适 Mg^{2+} 浓度

为 6.0 mmol/L。当 dNTP 浓度达到 1.0 mmol/L 开始出现扩增条带,而在 1.4 mmol/L dNTP 浓度下条带更亮(图 1C)。鉴于过高 dNTP 浓度亦可能导致非特异性扩增风险的增加^[18],因此,本研究选择 1.2 mmol/L 作为 dNTP 浓度。对于孵育时间的优化,当反应进行 40 min 时,首先检测到扩增产物,而在反应到达 60 min 时,检测到更多的产物量(图 1D)。为实

现最佳扩增,后续实验使用 60 min 的孵育时间作为 LAMP 反应参数。总的来说,本研究中最终使用的优化的 LAMP 体系(终浓度)包含 1× 等温扩增缓冲液,6.0 U Bst 2.0 DNA 聚合酶,6.0 mmol/L Mg²⁺、1.2 mmol/L dNTP、120 μmol/L HNB、0.2 μmol/L F3 与 B3、1.6 μmol/L FIP 与 BIP、0.8 mol/L 甜菜碱,DNA 模板和 ddH₂O。反应程序设置为 62 °C 孵育 60 min。

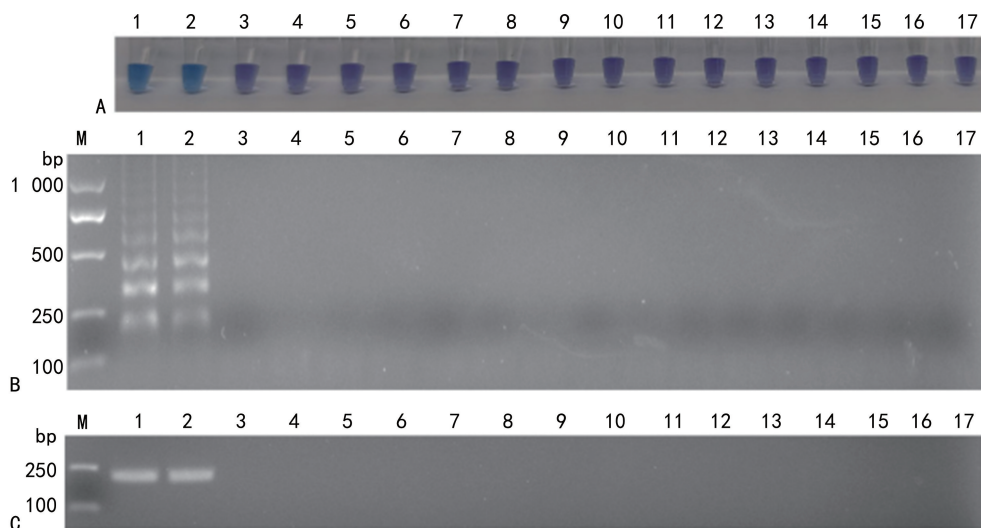


注:A 为扩增温度优化;B 为 Mg²⁺ 浓度优化;C 为 dNTP 浓度优化;D 为孵育时间优化;M 为 DNA 标记物。

图 1 LAMP 反应的优化

2.2 LAMP 特异性 在 LAMP 检测中,仅观察到两株金黄色葡萄球菌标准株的反应管颜色从紫色变为天蓝色,而 14 种非金黄色葡萄球菌菌株反应管仍保持其原始的紫色(图 2A)。琼脂糖凝胶电泳进一步证实,仅金黄色葡萄球菌菌株反应管显示典型的梯状条

带,而其他菌株反应管未显示任何条带(图 2B)。这些结果与使用引物 F3 和 B3 的 PCR 测定一致(图 2C)。这些结果表明,本研究开发的 LAMP 技术能特异性地检测金黄色葡萄球菌,并且与其他物种没有显著的交叉反应性。

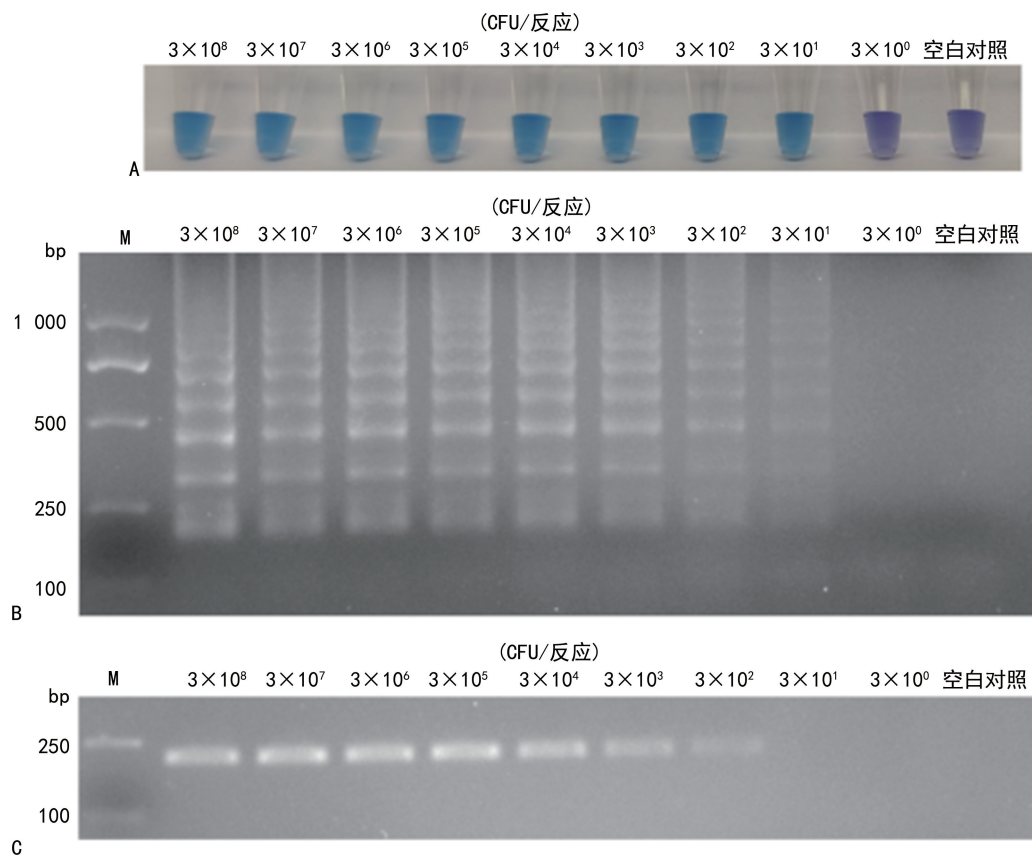


注:A 为 LAMP 可视化结果;B 为 LAMP 琼脂糖凝胶电泳结果;C 为 PCR 琼脂糖凝胶电泳结果;1、2 泳道为金黄色葡萄球菌;3 泳道为流感嗜血杆菌;4 泳道为嗜麦芽窄食单胞菌;5 泳道为粪肠球菌;6 泳道为克柔念珠菌;7 泳道为阴沟肠杆菌;8 泳道为肺炎链球菌;9 泳道为大肠埃希菌;10 泳道为近平滑念珠菌;11 泳道为屎肠球菌;12 泳道为铅黄肠球菌;13 泳道为肺炎克雷伯菌;14 泳道为白色念珠菌;15 泳道为铜绿假单胞菌;16 泳道为表皮葡萄球菌;17 泳道为空白对照;M 为 DNA 标记物。

图 2 LAMP 和 PCR 检测特异性

2.3 LAMP 检出限 本研究将金黄色葡萄球菌进行增菌培养,并通过稀释平板计数法得出原菌液浓度。将原菌液 10 倍梯度稀释得到 3×10⁸、3×10⁷、3×10⁶、3×10⁵、3×10⁴、3×10³、3×10²、3×10¹、3×10⁰ CFU/mL 的各个浓度梯度稀释液,提取基因组 DNA,

用于 LAMP 和 PCR 检测。结果表明,PCR 方法对金黄色葡萄球菌菌液的检出限为 3×10² CFU/反应(图 3C),LAMP 技术对金黄色葡萄球菌菌液的检出限可达 3×10¹ CFU/反应,见图 3。由此可见,LAMP 方法的检出限比 PCR 更低。

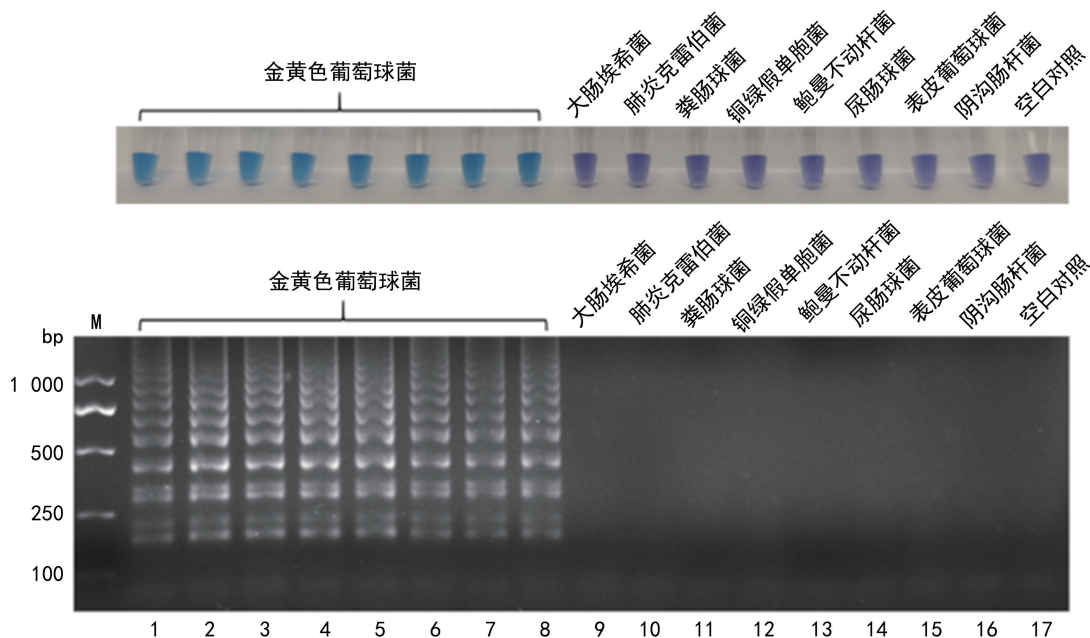


注:A为金黄色葡萄球菌的 LAMP 可视化结果;B为金黄色葡萄球菌的 LAMP 琼脂糖凝胶电泳结果;C为金黄色葡萄球菌的 PCR 琼脂糖凝胶电泳结果;M为 DNA 标记物。

图 3 LAMP 和 PCR 检出限

2.4 LAMP 对临床菌株的检测 LAMP 对临床分离株的部分检测结果见图 4。LAMP 技术平台在 69 株非目标菌中,均未检测到交叉反应性信号。而在 111 株经 VITEK 2 Compact 系统确认的金黄色葡萄

球菌中,共检出 105 例阳性及 6 例阴性。基于以上数据计算 LAMP 方法的诊断效能参数,灵敏度为 94.6%,特异度为 100.0%,准确度为 96.7%。



注:A为 LAMP 可视化结果;B为 LAMP 琼脂糖凝胶电泳结果;M为 DNA 标记物。

图 4 LAMP 检测临床分离株

3 讨 论

本研究基于“种内保守”与“种间特异”的双准则,通过本地 BLAST 及在线 BLAST 成功筛选了金黄色葡萄球菌特异性基因(GenBank:CP049389.1;位置434832-435198 bp)。针对该序列设计了4条LAMP引物,并建立了基础反应体系。随后进行了反应条件优化并获得了最佳LAMP反应体系。LAMP的扩增结果可以通过电泳,浊度变化或可视化显色来检测^[19]。然而,电泳与浊度检测均需依赖额外的检测仪器,这大大降低了实验的便携性。可视化显色仅需要通过肉眼观测反应前后试管颜色变化即可做出结果判断,因此,它是提高检测便捷性的良好选择。HNB是一种廉价、灵敏且稳定的金属指示剂。它通过对监测反应体系中游离镁离子消耗量来指示LAMP的扩增结果,是一种可靠有效的可视化显色方法^[16]。一项多观察者研究表明,HNB作为LAMP可视化指示剂优于其他方法的显色效果^[20]。可视化指示剂HNB的使用使得LAMP扩增结果的判断更容易,省去了繁琐的电泳操作,大大避免了气溶胶引起的交叉污染。因此,本研究选择HNB作为LAMP方法的最佳可视化染料。

完成LAMP反应体系优化后,本研究对LAMP方法的特异性和检出限进行了验证,同时将其与PCR方法做了横向对比,结果显示LAMP与PCR扩增均有良好的特异性,二者均能准确区分金黄色葡萄球菌与非金黄色葡萄球菌。值得一提的是,尽管LAMP技术使用4条引物,靶向6个区域进行扩增,其对模板具有高度选择性,但是LAMP引物浓度通常高于传统PCR方法,高浓度的引物可能会增加引物二聚体诱导的非特异性扩增的产生^[21]。而甜菜碱可以通过减少与靶DNA无关序列的扩增来提高靶DNA扩增的选择性,并能减少碱基堆积来提高总体反应速率^[10]。因此,本研究将甜菜碱加入LAMP反应体系,从而防止引物二聚体的形成,减少非特异性扩增,抑制假阳性结果^[22]。检出限评价实验结果显示LAMP技术的检出限比PCR法低10倍。在一些相关的研究中,LAMP技术的检出限亦要优于PCR技术^[23-24]。更重要的是,LAMP技术相较于PCR技术更加快捷、简便,以及节省成本^[25]。此外,有也研究报道,LAMP技术对于模板DNA的纯化程度要求更低。例如,将细菌菌落直接加入用于LAMP反应的反应混合物中,或离心沉淀样品在1% Triton X-100溶液中直接煮沸,释放的DNA可直接用于LAMP反应,无需纯化^[26-27]。

以VITEK 2 Compact 鉴定系统的检测结果为参考,本研究对临床分离的180株细菌进行了再鉴定。由于LAMP的扩增对靶基因具有高度选择性,因此,在对非金黄色葡萄球菌的检测中未产生非特异性扩增,检测的特异度为100%。同时,111株金黄色葡萄

球菌中有6株未检出,推测可能与菌株自身的基因突变有关,检测的灵敏度为94.6%。根据LIM等^[13]的研究,LAMP对金黄色葡萄球菌的检测灵敏度与特异度均达到了100%。同样,ABUSHERAIDA等^[28]建立了一种闭管式LAMP体系用于金黄色葡萄球菌检测,在对93份临床分离株的验证中,LAMP亦展示了良好的诊断效能(特异度100%,灵敏度97%)。本研究基于LAMP建立了一种金黄色葡萄球菌的快速可视化检测技术,实验结果显示,该技术具有良好的方法学性能与诊断效能,适用于临床金黄色葡萄球菌检测。然而,本研究仍存在改进空间。如果将LAMP技术与生物传感器或微流控平台相结合,有望实现真正意义上的金黄色葡萄球菌即时检验,这将显著提升检测效率并拓宽临床应用前景^[29-30]。

综上所述,本研究基于LAMP技术开发了一种金黄色葡萄球菌的快速检测方案。通过向反应体系添加HNB,扩增结果可在环境光下进行肉眼判读,这极大地简化了实验流程。将其应用于临床分离株的快速检测,准确度达到96.7%。因此,LAMP技术是一种快速、灵活、简单的金黄色葡萄球菌鉴定工具,由于其扩增无需特定仪器,因此该方法可用于各类微生物学实验室快速检测金黄色葡萄球菌。而对金黄色葡萄球菌感染的快速诊断不仅有助于临床医生尽早把握黄金治疗时机,更能及时构建有效的生物安全屏障,降低院内交叉感染风险。

参考文献

- [1] OLIVEIRA D, BORGES A, SIMÕES M. Staphylococcus aureus toxins and their molecular activity in infectious diseases[J]. *Toxins*, 2018, 10(6):252.
- [2] KIMMIG A, HAGEL S, WEIS S, et al. Management of Staphylococcus aureus bloodstream infections[J]. *Front Med*, 2021, 7:616524.
- [3] GOTO M, AL-HASAN M N. Overall burden of bloodstream infection and nosocomial bloodstream infection in North America and Europe[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2013, 19(6):501-509.
- [4] KERN W V, RIEG S. Burden of bacterial bloodstream infection—a brief update on epidemiology and significance of multidrug-resistant pathogens[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2020, 26(2):151-157.
- [5] JIN L, ZHAO C, LI H, et al. Clinical profile, prognostic factors, and outcome prediction in hospitalized patients with bloodstream infection: results from a 10-year prospective multicenter study [J]. *Front Med*, 2021, 8: 629671.
- [6] ALIASGHARIAN A, GILL P, AHANJAN M, et al. Fluorescent detection of methicillin resistant Staphylococcus aureus by loop-mediated isothermal amplification assisted with streptavidin-coated quantum dots[J]. *Avicenna J Med Biotechnol*, 2022, 14(1):79-88.

- [7] WANG H, HECHT S, KLINE D, et al. Staphylococcus aureus and methicillin resistance detection directly from pediatric samples using PCR assays with differential cycle threshold values for corroboration of methicillin resistance[J]. *J Microbiol Methods*, 2019, 159:167-173.
- [8] GHODOUSI A, NOMANPOUR B, DAVOUDI S, et al. Application of *fnbA* gene as new target for the species-specific and quantitative detection of Staphylococcus aureus directly from lower respiratory tract specimens by real time PCR[J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2012, 55(4):490-495.
- [9] DUAN R, WANG P. Rapid and simple approaches for diagnosis of Staphylococcus aureus in bloodstream infections[J]. *Pol J Microbiol*, 2022, 71(4):481-489.
- [10] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12):E63.
- [11] NOTOMI T, MORI Y, TOMITA N, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects[J]. *J Microbiol*, 2015, 53(1):1-5.
- [12] GILL P, GHAEMI A. Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review[J]. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2008, 27(3):224-243.
- [13] LIM K T, TEH C S J, THONG K L. Loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of Staphylococcus aureus[J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013:895816.
- [14] SHEET O H, GRABOWSKI N T, KLEIN G, et al. Development and validation of a loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of Staphylococcus aureus in bovine mastitis milk samples[J]. *Mol Cell Probes*, 2016, 30(5):320-325.
- [15] TOMITA N, MORI Y, KANDA H, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(5):877-882.
- [16] GOTO M, HONDA E, OGURA A, et al. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue[J]. *Biotechniques*, 2009, 46(3):167-172.
- [17] BREWSTER J D, PAOLI G C. DNA extraction protocol for rapid PCR detection of pathogenic bacteria[J]. *Anal Biochem*, 2013, 442(1):107-109.
- [18] KIM S H, LEE S Y, KIM U, et al. Diverse methods of reducing and confirming false-positive results of loop-mediated isothermal amplification assays: a review[J]. *Anal Chim Acta*, 2023, 1280:341693.
- [19] TANNER N A, ZHANG Y, EVANS T C Jr. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes[J]. *Biotechniques*, 2015, 58(2):59-68.
- [20] WASTLING S L, PICOZZI K, KAKEMBO A S L, et al. LAMP for human African trypanosomiasis: a comparative study of detection formats[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2010, 4(11):e865.
- [21] WANG D G, BREWSTER J D, PAUL M, et al. Two methods for increased specificity and sensitivity in loop-mediated isothermal amplification[J]. *Molecules*, 2015, 20(4):6048-6059.
- [22] MOON Y J, LEE S Y, OH S W. A review of isothermal amplification methods and food-origin inhibitors against detecting food-borne pathogens[J]. *Foods*, 2022, 11(3):322.
- [23] MAEDA H, KOKEGUCHI S, FUJIMOTO C, et al. Detection of periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis by loop-mediated isothermal amplification method[J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2005, 43(2):233-239.
- [24] CHOOPARA I, TEETHAISONG Y, ARUNRUT N, et al. Specific and sensitive, ready-to-use universal fungi detection by visual color using ITS1 loop-mediated isothermal amplification combined hydroxynaphthol blue[J]. *PeerJ*, 2021, 9:e11082.
- [25] KARACOP E, OZDEMIR R. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information website [J]. *J Electrocardiol*, 2020, 62:59-64.
- [26] SOWMYA N, THAKUR M S, MANONMANI H K. Rapid and simple DNA extraction method for the detection of enterotoxigenic Staphylococcus aureus directly from food samples: comparison of PCR and LAMP methods[J]. *J Appl Microbiol*, 2012, 113(1):106-113.
- [27] YAN M, LI W, ZHOU Z, et al. Direct detection of various pathogens by loop-mediated isothermal amplification assays on bacterial culture and bacterial colony[J]. *Microb Pathog*, 2017, 102:1-7.
- [28] ABUSHERAIDA N S A, ALBAKER A A H, ALJABRI A S A, et al. Rapid visual detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in human clinical samples via closed LAMP assay targeting *MecA* and *spa* genes[J]. *Microorganisms*, 2024, 12(1):157.
- [29] YANG N, ZHANG H, HAN X, et al. Advancements and applications of loop-mediated isothermal amplification technology: a comprehensive overview[J]. *Front Microbiol*, 2024, 15:1406632.
- [30] ZENG Y, WU C, HE Y. Loop-mediated isothermal amplification-based microfluidic platforms for the detection of viral infections[J]. *Curr Infect Dis Rep*, 2022, 24(12):205-215.