

# DNA 环介导恒温扩增试验检测结核分枝杆菌的研究

金法祥, 王华钧, 孙小军

(绍兴市第六人民医院检验科, 浙江 绍兴 312000)

**摘要:** 目的 探讨建立更快速、准确的痰结核分枝杆菌检测方法。方法 采用涂片抗酸染色法、罗氏培养法和 DNA 环介导恒温扩增(LAMP)试验对结核分枝杆菌进行检测, 并对其检出率进行比较。结果 LAMP 试验检出率最高, 罗氏培养法次之且检测时间长, 抗酸染色法的检出率最低。结论 LAMP 试验检测痰结核分枝杆菌具有快速、敏感、简便、特异等优点, 在肺结核患者的早期诊断中将发挥重要作用。

**关键词:** DNA 环介导恒温扩增; 结核分枝杆菌; 核酸扩增技术

中图分类号: R378 文献标识码: A 文章编号: 1005-4529(2011)12-2639-02

## Application of loop-mediated isothermal amplification in rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*

JIN Fa-xiang, WANG Hua-jun, SUN Xia-jun

(The Sixth People's Hospital of Shaoxing, Shaoxing, Zhejiang 312000, China)

**Abstract:** **OBJECTIVE** To develop method of a more rapid and accurate detection of *Mycobacterium tuberculosis*. **METHODS** Acid-fast strain in by smear, Lowenstein-Jensen culture and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) test for detection of *Mycobacterium tuberculosis*, and compared their detection rate. **RESULTS** LAMP test the highest detection rate of *Mycobacterium tuberculosis*, followed by TB culture and a long time, the lowest detection rate of acid fast staining method to detect. **CONCLUSION** The LAMP test is rapid, sensitive, simple and specific method for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. In the early diagnosis of tuberculosis will play an important role in.

**Key words:** Loop-mediated isothermal amplification; *Mycobacterium tuberculosis*; Nucleic acid amplification techniques

结核病是中国重点控制的重大传染病之一, 是当前我国面临的重要公共卫生问题, 耐药结核病是结核病控制工作难题之一, 实验室检测在国家结核病防治规划中发挥着不可缺少的作用。DNA 环介导恒温扩增(LAMP)试验技术反应 1 h 即可完成核酸扩增反应, 通过荧光染色直接目测比色就可以得到清晰的反应结果。由于该方法利用了核酸扩增, 因此极大的提高了灵敏度, 已开始应用疾病诊断、流行病学监测、食品安全检测等领域。本研究将 LAMP 试验技术快速检测结核分枝杆菌, 在实践中效果简单、快速、可提高结核患者阳性率。

### 1 材料与方法

**1.1 标本来源** 200 份痰液标本来自本院肺结核病房的肺结核患者。

**1.2 试剂与仪器** 萋-尼染色试剂(按文献[1]的方法自行配制), 酸罗氏培养基由杭州加伟生物公司提供, LAMP 试剂由广州华峰生物科技有限公司提供。显微镜(日本奥林巴斯)、低温高速离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、生物安全柜(美国 NUAIRE)、PCR 扩增仪(杭州创新科技有限公司)。

**1.3 方法** 采取每份合格痰标本, 同时进行萋-尼式染色镜检, 罗氏培养及 LAMP 试验。

**1.3.1 萋尼式染色显微镜检查** 涂片、染色、显微镜检查操作参照《中国结核病防治规划—痰涂片镜检查标准化操作及质量保证手册》进行。

**1.3.2 罗氏培养法** 取痰标本, 采用 3% NaOH 前处理法, 视标本性状, 加 2~3 倍体积的处理液于无菌痰杯中, 使痰液充分液化, 在 20 min 内接种两支酸罗氏培养基。

**1.3.3 LAMP 试验** 痰液样本 DNA 的制备: (1)

收稿日期: 2011-04-01; 修回日期: 2011-04-29

初步估计痰标本量,加入 4 倍体积 4%NaOH 溶液,充分混匀,室温静置液化 30 min。(2)吸取 1 ml 液化液加入无菌 1.5 ml 离心管中,15 000 r/min 离心 5 min,尽量吸弃上清。(3)沉淀用 1 ml 生理盐水重悬洗涤,15 000 r/min 离心 5 min,弃上清。(4)沉淀用 1 ml 生理盐水重悬洗涤,150 00 r/min 离心 5 min,弃上清,沉淀用于模板提取。(5)分别加入 100  $\mu$ l DNA 提取液 I 和 0.25  $\mu$ l ProteinaseK,56  $^{\circ}$ C 温浴 30 min,再沸水浴 10 min。(6)加入 12.5  $\mu$ l DNA 提取液 II,稍混匀,12 000 r/min 离心 5 min,上清即为 DNA 模板。核酸扩增:(7)取出 n 支 HF 管于室温(25  $^{\circ}$ C)解冻。(8)向上述 n 个反应管内按顺序分别加入阴性对照、待检模板和阳性对照各 2.5  $\mu$ l。(9)置 65 恒温反应 60 min。结果检测:反应结束,将 HF 管倒置甩动 2 次,再正置甩动 2 次,使工作液与显色液充分混合,冷却至室温后观察;结果判断:(1)待检样品反应管液体呈绿色,该样品结果为结核分枝杆菌阳性。(2)待检样品反应管液体呈可橙色,则可报告结核分枝杆菌检验结果为阴性。

## 2 结果

**2.1 3 种方法同时检测的结果** LAMP 试验法检测结核分枝杆菌的阳性率与萹尼染色法比较:两种方法差异有统计学意义( $\chi^2=19.9, P<0.01$ );同时与罗氏培养法比较,差异有统计学意义( $\chi^2=13.6, P<0.01$ )。见表 1。

表 1 3 种方法检测结核分枝杆菌检出阳性率(%)

检测方法	检测数	阳性数	阳性率
萹尼染色	200	95	47.5
罗氏培养	200	103	51.5
LAMP 试验	200	139	69.5

**2.2 LAMP 试验结果** 试验的结果是可以简单的通过肉眼来判断,没有靶序列 DNA 的则为橙色;含有靶序列 DNA 管中有大量的 LAMP 扩增产物产生,而显绿色。

## 3 讨论

目前在我国结核病实验室诊断中有以下几方面有待解决:(1)现有萹-尼氏涂片染色方法敏感性较低,涂阴患者的确诊在基层较难。(2)在疫情较重、可疑患者较多的地区,实验室人员负荷超出最佳的工作量,对于涂片镜检的质量可能产生影响,进而最终对诊断的准确性产生影响。(3)耐药患者的诊断依靠现有的固体罗氏培养和药敏,诊断滞后(6~12

周),患者的诊断治疗不能及时。虽然全球已经开发了多种新型的结核病实验室诊断方法,世界卫生组织对耐药结核病的实验室诊断建议使用液体培养、快速菌种鉴别和药敏试验来提高对结核病及其耐药性的诊断。但是在我国这样一个资源相对有限而结核病疫情较严重的国家,如何选择适合我国国情的实验室诊断方法显得尤为突出。通过本项目的实施,提高我国结核病实验室新技术应用进一步加强,从而更好地为我国结核病防治规划提供可靠、准确的实验室服务。

本资料显示,3 种方法比较,LAMP 试验检测的阳性率为 69.6%,明显高于涂片抗酸染色法和罗氏培养法,这与国外文献报道基本相似<sup>[2,3]</sup>。另外整个 LAMP 试验检测过程包括扩增样本的制备和检测报告,仅需要 3 h,大大缩短了结核分枝杆菌的检测时间,可作为肺结核患者早期诊断和鉴别诊断的重要依据,是一种简便、快速、特异的结核分枝杆菌检测方法。3 种方法的敏感性比较,LAMP 试验也明显高于罗氏培养和涂片抗酸染色法。根据前人的研究,在进行 LAMP 试验检测结核分枝杆菌,应同时进行罗氏培养,因为结核分枝杆菌培养可继续作菌型鉴定、药敏试验<sup>[4]</sup>,也可用于结核分枝杆菌基因分型进行流行病学研究。

总而言之,LAMP 试验是快速、方便、特异性强、灵敏度高的非常适用于结核分枝杆菌检测的新技术。由于其模板 DNA 提取简便,不需要复杂的仪器设备,且可以通过肉眼可视的方法迅速观察到试验结果,LAMP 试验不仅可以用于设备齐全、精良的医院或实验室,也可以用小型的医院或县级诊断。

## 参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部医政司. 全国临床检验操作规程 [M]. 第 3 版. 南京:东南大学出版社,2006:791-798.
- [2] Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in Sputum Samples [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(6): 2616-2666.
- [3] Pandey BD, Poudel A, Yoda T, et al. Development of an in-house Loop-mediated isothermal amplification (lamp) assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and evaluation in sputum samples of Nepalese patients [J]. *J Med Microbiol*, 2008, 57(4): 439-443.
- [4] Hillemann D, Warren R, Kubica T, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains by real-time PCR [J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(9): 302-306.