

文章编号: 1673-758X(2011)01-0001-04 中图分类号: R521.04 文献标识码: A

## LAMP 技术检测结核分枝杆菌试验性研究

黄曙海<sup>1</sup>, 谭慧媚<sup>2</sup>, 戴广明<sup>3</sup>, 蓝兰<sup>1</sup>, 刘毅<sup>4</sup>, 包维华<sup>5</sup>  
周昌明<sup>1</sup>, 蓝如束<sup>1</sup>, 杜正平<sup>2</sup>, 陈洵<sup>2</sup>, 柯佳佳<sup>2</sup>

1 广西壮族自治区疾病预防控制中心(南宁 530028) 2 广州华峰生物科技有限公司(510663)

3 北京市结核病胸部肿瘤研究所(101149) 4 广西北海市结核病防治院(536000)

5 广西壮族自治区职业病防治研究院(南宁 530021)

**[摘要]** 目的 建立并评价环介导等温扩增技术检测结核分枝杆菌方法。方法 选择临床痰标本培养的结核分枝杆菌分离物 14 份, 非结核分枝杆菌阳性分离物 14 种 31 份, 痰标本 11 份, 以 H37Rv、BCG 为阳性对照, 提取 DNA 后, 用自主研发的环介导等温扩增检测技术进行检测, 统计该技术对结核分枝杆菌检测的灵敏性和特异性。结果 该技术对结核分枝杆菌分离物检测结果灵敏性为 100% (14/14), 对非结核分枝杆菌分离物检测结果特异性为 100% (31/31), 对人结核分枝杆菌标准菌株 H37Rv、BCG 检测结果均为阳性; 方法的检出限为 12cfu。对临床痰标本中的结核分枝杆菌检测结果与罗氏培养基培养结果一致。结论 环介导等温扩增检测结核分枝杆菌技术灵敏性和特异性高, 具有简便易行、快速准确的特点, 适合于基层结核病诊断实验室推广应用。

**[关键词]** 结核分枝杆菌; 环介导等温扩增; 快速检测

**Assessment of laboratory performance of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for detection of Mycobacterium tuberculosis** HUANG Shu-hai, TAN Hui-mei, DAI Guang-ming, et al. Guangxi Center for Disease Prevention and Control, Nanning 530028, China.

**[Abstract]** **Objective** To set up a protocol and evaluate feasibility of LAMP for detection of Mycobacterium tuberculosis. **Methods** DNA were extracted from 14 Mycobacterium tuberculosis (MTB) samples and 31 non-Mycobacterium tuberculosis (NTM) samples consisted of 14 species from culture isolates grown in L-J medium, 11 sputum specimens, as well as two H37Rv species and one BCG. Species-specific primers were designed by targeting the gyrB gene and a prototype LAMP assay was evaluated for accuracy and feasibility on DNA extractions. **Results** The sensitivity of LAMP in MTB samples was 100% (14/14), The specificity in NTM samples was 100% (31/31). Both H37Rv and BCG samples were LAMP positive. Results of LAMP assay for 11 sputum specimens were accordant with L-J culture. The assay had a detection limit of  $1 \times 10^{-4}$  mg/mL for either H37Rv culture isolates or BCG. **Conclusions** LAMP technique might provide a simple, rapid, sensitive and cost-effective platform for the molecular detection of pulmonary TB, especially in the testing centers at the grass-roots level

**[Key words]** Mycobacterium tuberculosis; Loop-Mediated Isothermal Amplification; Rapid detection

我国结核病疫情严重, 患者人数居全球 22 个结核病高负担国家的第二。目前结核病诊断方法主要是形态学检验方法, 如痰涂片染色镜检和分枝杆菌培养。痰涂片染色显微镜查找抗酸杆菌是国际上广泛应用的快速方法, 简单易行, 但检出率低, 只能识别抗酸杆菌而不能鉴别是否结核分枝杆菌。分枝杆菌培养技术不仅敏感性比痰涂片镜检要高, 而且具

有高度特异性, 是目前结核分枝杆菌检验的金标准, 但缺点是耗时, 通常需要 4 至 8 周, 不利于及时、早期对患者进行抗痨治疗。近年来, 为了寻找快速灵敏的结核病感染诊断方法, 多种核酸扩增方法已经被建立, 如罗氏公司的 Amplicor 检测系统<sup>[1]</sup>, Gen-Probe 公司的 rRNA 扩增结核分枝杆菌直接反应 (AMTD)<sup>[2]</sup>, 连接酶链式反应<sup>[3]</sup>, Q-β 复制酶扩增法<sup>[4]</sup>, 链置换扩增法<sup>[5]</sup>等。但以上基因学检验方法都需要昂贵的仪器设备以及价格不菲的实验室条件, 限制了这些方法的广泛应用。在发展中国家, 更需

基金项目: 广西自然科学基金项目(合同编号: 桂科自 0991193)

作者简介: 黄曙海(1956-), 男, 广东广州市人, 主任医师, 主要从事结核病防制与研究工作。

要敏感、准确、快速和低成本诊断方法。环介导等温扩增(LAMP)检测结核分枝杆菌复合群<sup>[6]</sup>是一种新型核酸扩增方法,具有方法简单、不需昂贵设备和严格的实验室环境条件等优点,目前国内已出现了一些有益的探索。为研发建立适合我国实际的LAMP检测体系,采用来自本地患者的结核或非结核分枝杆菌阳性培养物、部分疑似结核患者痰标本等对自主研发的LAMP检测体系进行实验研究,为今后开展大规模临床应用性试验建立可行的检验程序。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株和卡介苗 用于检测方法灵敏性和特异性的菌株有以下几种:本实验室收集的痰标本培养的结核分枝杆菌阳性分离物14份(经菌种鉴别为结核分枝杆菌),本室痰标本培养分离并经复旦大学鉴定为非结核分枝杆菌(NTM)分离物31份,其中:5株 *M. avium complex*, 5株 *M. fortuitum*, 4株 *M. goodii*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. kansasii*, *M. kyorinense*, *M. scrofulaceum*, *M. sherrisii* 各2株, *M. marinum*, *M. parascrofulaceum*, *M. simiae*, *M. sp.* JLS, *M. terrae* 各1株;人结核分枝杆菌标准菌株 H37Rv 2株(国家结核病参比实验室提供);卡介苗(成都生物制品研究所产品)。

1.1.2 结核病疑似患者痰标本 随机收集11份结核病疑似患者痰标本,用于建立适合临床标本直接检测的方法。

### 1.2 方法

1.2.1 结核病疑似患者痰标本镜检、培养 将收集到的痰标本做常规涂片镜检;痰标本经4% NaOH溶液去污液化处理20min,取0.1mL接种于酸性罗氏培养基(BASO公司产品)斜面上,每份接种2支,置37℃培养箱培养4~8周,记录培养结果。

1.2.2 DNA提取 菌株DNA提取:取1.5mL离心管,加入100μL Tris-EDTA液(pH=7.6,生工生物工程(上海)有限公司产品),在生物安全柜内用接种环取适量菌落(或菌液)加入离心管中,漩涡振荡混悬,沸水浴10min,13 000 rpm短暂离心后上清为DNA模板。痰标本DNA提取:取1.0mL痰标本液化处理液加入到离心管中,12 000 rpm离心5min,弃上清,磷酸盐缓冲液(pH=6.8)洗涤2次,沉淀80℃水浴灭活30min,加入100μL Tris-EDTA液提取液,漩涡振荡混悬,沸水浴10min,13 000 rpm短暂离心后上清为

DNA模板。

1.2.2 LAMP扩增 扩增体系主要包含:以结核分枝杆菌复合群(*M. TB*)为对象设计的能特异性识别结核分枝杆菌中 *gyrB* 基因的6个特殊区域的LAMP引物,其中一对内引物、一对外引物、反应复合物、*Bst* DNA多聚酶,将以上物质混合后加入反应管内,反应管内上侧贴附着盛有SYBR Green I染液的小室,用保护液封闭。扩增时将2.5μL DNA提取液加入反应管中的反应体系混合液内,置干热恒温仪内65℃反应60min。反应结束后将反应管上下甩动数次,使反应液中的扩增产物与预先包被在试管内壁的SYBR Green I染料混合,肉眼直接观察判读结果。

1.2.3 方法灵敏度检测 用接种环取新鲜生长在罗氏培养基中的H37Rv标准菌株,磨菌后用磷酸盐缓冲液稀释,比浊法定容至1mg/mL。依次用提取液以1:10稀释得 $1 \times 10^{-1}$  mg/mL、 $1 \times 10^{-2}$  mg/mL、 $1 \times 10^{-3}$  mg/mL、 $1 \times 10^{-4}$  mg/mL、 $1 \times 10^{-5}$  mg/mL,每管取0.1mL提取DNA用于LAMP扩增检测,同时每管取0.1mL接种到罗氏培养基上,每个稀释度接种2支,常规培养观察菌落生长结果,判断方法的灵敏度。

1.2.4 痰标本LAMP检测结果比较 为评价方法对临床痰标本检测结果的可行性,将痰标本LAMP扩增结果与罗氏培养基培养结果进行比较。此外,取痰标本LAMP扩增阳性和阴性产物做琼脂凝胶电泳,以H37Rv扩增产物为对照,比较两者电泳条带的一致性,判断LAMP方法检测结果的准确性。

## 2 结果

2.1 LAMP扩增检测结果判断 LAMP扩增检测结果判断不需要任何附加设备,可直接通过肉眼观察,准确判定。如果有特异性扩增产物产生,扩增的基因产物与SYBR Green I染料结合发出肉眼可见的绿色荧光,使反应管呈绿色,则扩增结果为阳性,如果没有特异性扩增产物产生,反应液保持染料原有的橙色,扩增结果为阴性。部分标本LAMP扩增的肉眼直观结果见图1(封二)。

2.2 结核分枝杆菌/非结核分枝杆菌分离物LAMP检测结果 对14份不同病人来源的结核分枝杆菌阳性培养物DNA提取液进行LAMP扩增,结果全部阳性;14种31份非结核分枝杆菌培养物DNA提取液扩增结果全部阴性;H37Rv培养物和BCG疫苗的DNA提取液扩增结果均为阳性。见表1。

表 1 各种分枝杆菌阳性培养物 LAMP 检测结果

标本名称	标本数量	LAMP 扩增结果	
		阳性	阴性
结核分枝杆菌培养物	14	14	0
非结核分枝杆菌培养物:			
<i>M. avium complex</i>	5	0	5
<i>M. fortuitum</i>	5	0	5
<i>M. goodii</i>	4	0	4
<i>M. abscessus</i>	2	0	2
<i>M. chelonae</i>	2	0	2
<i>M. kansasii</i>	2	0	2
<i>M. kyorinense</i>	2	0	2
<i>M. scrofulaceum</i>	2	0	2
<i>M. sherrisii</i>	2	0	2
<i>M. marinum</i>	1	0	1
<i>M. parascrofulaceum</i>	1	0	1
<i>M. simiae</i>	1	0	1
<i>M. sp. JLS</i>	1	0	1
<i>M. terrae</i>	1	0	1
H37Rv 标准菌株	2	2	0
BCG 疫苗	1	1	0

2.3 方法检出限 对 H37Rv 菌株系列稀释度的 DNA 提取物进行 LAMP 扩增, 结果  $1 \times 10^{-4}$  mg/ mL 稀释度以上标本均为阳性, 该稀释度培养生长菌落数为 12 个, 即该方法检出限为 12cfu。

2.4 结核病可疑症状者痰标本的检测 为建立临床痰标本 LAMP 检测程序, 随机选择了试验期间收集到的 11 份痰标本, 经涂片抗酸染色镜检, 4 份抗酸杆菌染色阳性。痰标本用 4% NaOH 溶液处理 15min, 取 0.1mL 接种到罗氏培养基, 37℃培养 8 周, 结果 5 份标本阳性, 其中 4 份涂(+) 培(+), 1 份涂(-) 培(+). 另取 4% NaOH 前处理液 1.0mL, 离心弃上清, 加入 DNA 提取液提取 DNA, LAMP 扩增, 以 H37Rv 提取物做阳性对照, 结果 5 份标本和阳性对照呈阳性, 与罗氏培养基培养结果一致。为进一步确认 LAMP 扩增结果的准确性, 将扩增后的产物进行电泳, 结果 5 份阳性标本电泳条带均与 H37Rv 完全一致, 见图 2(封二)。

### 3 讨论

目前, 痰培养仍然是肺结核病诊断的金标准。但痰培养存在耗时长、易污染、阳性率较低、后期需配合菌种鉴定方能做出诊断等缺点。因此寻找快速、准确、简便易行的结核分枝杆菌诊断方法, 一直是国

内外结核病控制领域追求的目标。近年来, 世界卫生组织以及其他国际组织在全球结核病控制策略中明显加大了对结核病诊断新方法、新化疗药物以及新疫苗研发的投入力度。据世界卫生组织结核病控制 2009 年报告<sup>[7]</sup>, 在遏制结核伙伴计划等项目的支持下, 目前已有 11 个国家完成并提交了结核病新诊断方法的实践报告, 部分新诊断方法业已进入临床试验阶段。LAMP 方法的原理是在 Bst DNA 多聚酶作用下 DNA 大片段自动循环合成而达到扩增目的<sup>[8]</sup>, 具有以下特点: (1) 反应在等温条件下进行, 不需昂贵设备, 应用一种酶就可以进行扩增反应; (2) 同时应用两条内引物和两条外引物, 扩增反应的特异性极高; (3) 由于热循环没有浪费时间, 因此反应所需时间比 PCR 反应短得多; (4) 反应生成大量产物, 使得直接通过肉眼观察反应产物的浊度或者荧光就可以判断结果; (5) 如果在此基础上再加入两条环引物, 6 条引物可辨认靶 DNA 中的 8 个特征区, 反应时间会减少一半, 特异性更高<sup>[8-9]</sup>。早在 2003 年, 日本神户健康所就开始将 LAMP 技术应用到结核分枝杆菌复合群的检测研发中<sup>[6]</sup>。2007 年, 受盖茨基金支持的非盈利的国际创新新诊断技术基金会 (FIND) 分别在秘鲁、孟加拉、坦赞尼亚等国家的基层结核病镜检中心开展 LAMP 诊断肺结核技术评估。结果证明该技术灵敏度高, 特异性高, 平均手工操作时间短, 检验人员间可变量小; 尽管没有生物安全柜, 所有检验过程均在同一间房子内进行, 但没有观察到 DNA 污染, 结果终点稳定, 检验失败率低; 没有分子生物学基础的检验人员在经过 1 周培训后就能掌握该技术<sup>[10]</sup>。近年来, 出现了不少 LAMP 检测结核分枝杆菌技术的改进与创新, 如将 rimM(16S rRNA 蛋白) 作为靶目标设计 LAMP 引物, 方法的敏感性达到 1pg 基因 DNA<sup>[11]</sup>; 将 LAMP 技术与其它技术结合在一起的如逆转录环介导等温扩增结合免疫吸附杂交 (RT-LAMP + ELISA- hybridization) 方法快速检测结核分枝杆菌标本的 16S rRNA, 该方法可以重复检测单一拷贝<sup>[12]</sup>; Ustar 生物技术有限公司通过固定在塑料合内的条带侧向流动检测 LAMP 扩增产物, 有效防止了扩增产物的泄漏<sup>[13]</sup>。

本研究结合当地结核病和 HIV/ TB 双感流行的特点, 利用日常患者标本中分离的结核分枝杆菌 (MTB) 阳性分离物和非结核分枝杆菌 (NTM) 阳性分离物对自主研发的 LAMP 结核分枝杆菌检测技术开展实验研究, 结果该检测技术对以上分离物检测的

敏感性为 100% (14/14), 特异性为 100% (31/31), 对 H37Rv 人结核分枝杆菌标准菌株和牛结核分枝杆菌 (BCG) 的检测结果为阳性。结果提示该技术能特异性地扩增结核分枝杆菌复合群中的人结核分枝杆菌和牛结核分枝杆菌的 DNA 模板, 而对 HIV/ TB 疑似感染者的 14 种 31 份非结核分枝杆菌 DNA 模板扩增均没有出现假阳性, 说明该技术适用于鉴别 MTB 和 NTM。该方法对 H37Rv 标准菌株的检测限为 12cfu。对部分临床痰标本的试验性检测结果提示, 该方法适用于临床痰标本的检测。

研究显示, LAMP 检测结核分枝杆菌技术具有灵敏度高、特异性高、方法简便易行、对检验条件要求低等特点, 能快速地培养物或痰标本是否含有结核分枝杆菌复合群做出准确鉴别, 适合于条件简陋的基层实验室应用。由于 AIDS 患者肺部感染非结核分枝杆菌的感染率高, 但常被误诊为结核, 如能准确快速对非结核分枝杆菌感染做出诊断, 将为患者获得准确治疗赢得时间, 因此, 这一能快速鉴别结核/非结核分枝杆菌感染的技术尤其适合于 HIV/ TB 双重感染流行的地区应用。

#### [参考文献]

- [ 1 ] Carpentier EB, Drouillard M, Dailloux D, et al. Diagnosis of tuberculosis by Amplicor Mycobacterium tuberculosis test: a multicenter study[ J]. J. Clin. Microbiol, 1995, 33: 3106-3110.
- [ 2 ] Vlasplolder F, Singer P, Roggeveen C. Diagnostic value of an amplification method (Gen-Probe) compared with that of culture for diagnosis of tuberculosis [J]. J Clin Microbiol, 1995, 33: 2699- 2703.
- [ 3 ] Moore DF, Curry JL. Detection and identification of Mycobacterium tuberculosis directly from sputum sediments by ligase chain reaction[ J]. J Clin Microbiol, 1998, 36: 1028- 1031.
- [ 4 ] Smith JH, Radcliffe G, Rigby S, et al. Performance of an automated Q-beta replicase amplification assay for Mycobacterium tuberculosis in a clinical trial[ J]. J Clin Microbiol, 1997, 35: 1484- 1491.
- [ 5 ] Pfyffer GE, Funke- Kissling P, Runderl E, et al. Performance characteristics of the BD Probe Tec system for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory specimens[ J]. J Clin Microbiol, 1999, 37: 137- 140.
- [ 6 ] Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. Loop-Mediated Isothermal Amplification for direct detection of mycobacterium tuberculosis complex, M. avium, and M. intracellulare in sputum samples[ J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41: 2616- 2622.
- [ 7 ] WHO. Global Tuberculosis Control: epidemiology, strategy, financing: WHO report[ R]. 2009. 59.
- [ 8 ] Mori Y, Nagamine K, Tomita N, et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation[ J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 289: 150- 154.
- [ 9 ] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers [ J]. Mol Cell Probes, 2002, 16: 223- 229.
- [ 10 ] Catharina CB, Nabeta P, Henostroza G, et al. Operational feasibility of Using Loop-Mediated Isothermal Amplification for diagnosis of pulmonary tuberculosis in microscopy centers of developing countries[ J]. Journal of Clinical Microbiology, 2007, 45: 1936- 1940.
- [ 11 ] Zhu RY, Zhang KX, Zhao MQ, et al. Use of visual loop-mediated isothermal amplification of nimM sequence for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis[ J]. J Microbiol Methods, 2009, 78: 339- 43.
- [ 12 ] Lee MF, Chen YH, Peng CF. Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification in conjunction with ELISA-hybridization assay for molecular detection of Mycobacterium tuberculosis[ J]. J Microbiol Methods, 2009, 76: 174- 80.
- [ 13 ] Fang RD, Li X, Hu L, et al. Cross-priming amplification for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in Sputum Specimens[ J]. Journal of Clinical Microbiology, 2009, 47: 845- 847.

收稿回执: 2010- 11- 25

## 欢迎投稿

## 欢迎订阅

# LAMP 技术检测结核分枝杆菌试验性研究

(正文见 1 页)

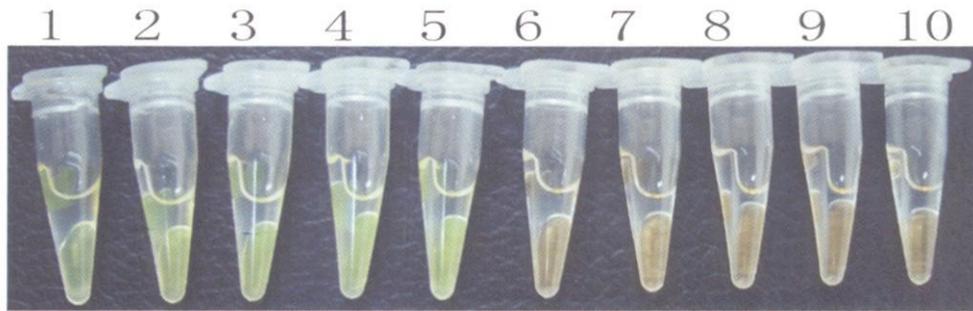


图 1 部分标本 LAMP 扩增结果肉眼观

1- 试剂盒阳性对照, 2- H37Rv, 3- 结核分枝杆菌阳性分离物(1), 4- 结核分枝杆菌阳性分离物(2), 5- 结核分枝杆菌阳性分离物(3), 6- 试剂盒阴性对照, 7- 脓肿分枝杆菌, 8- 鸟分枝杆菌, 9- 戈登分枝杆菌, 10- 偶发分枝杆菌

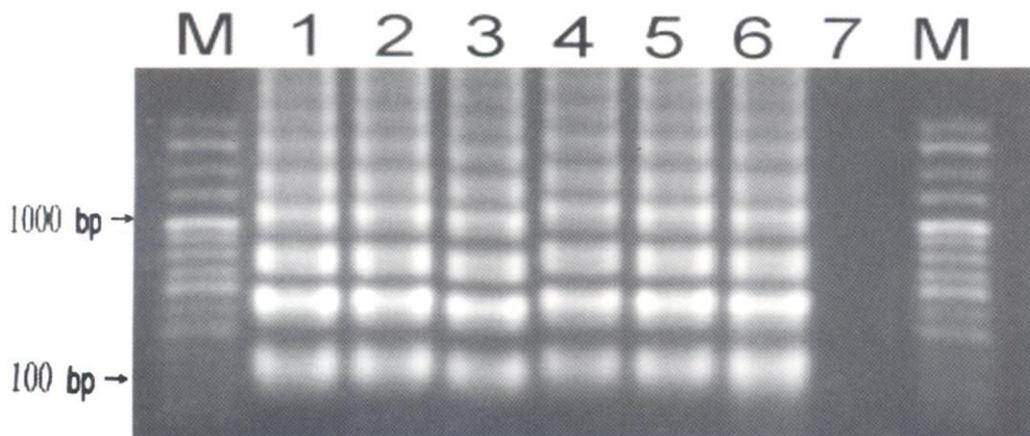


图 2 LAMP 扩增产物电泳图

M- DNA marker, 1- H37Rv, 2- 痰标本(1), 3- 痰标本(2), 4- 痰标本(3), 5- 痰标本(4), 6- 痰标本(5), 7- LAMP 扩增阴性痰标本