

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.05.017

逆转录-聚合酶螺旋反应检测结核分枝杆菌的应用*

于昌萍¹ 于彬² 蔡为为¹ 刘佰成¹ 于森¹ 王东亮^{1Δ}

(1 中国人民解放军北部战区总医院呼吸科 辽宁 沈阳 110003; 2 辽宁省人民医院骨科 辽宁 沈阳 110015)

摘要 目的:建立并应用逆转录-聚合酶螺旋反应(RT-PSR)快速检测结核分枝杆菌(MTB)。**方法:**针对结核分枝杆菌 16S rRNA 基因设计特异性引物,通过反应条件的优化初步建立结核分枝杆菌的 RT-PSR 扩增方法;随后,用 2 株结核分枝杆菌和 11 株其他致病菌进行 RT-PSR、RT-LAMP 和荧光定量 PCR 法的特异性与敏感性试验;利用 RT-PSR 法、罗氏培养法、RT-LAMP 法和荧光定量 PCR 法对 83 名结核患者的痰液标本进行诊断对比。**结果:**成功建立并优化了 MTB 的 RT-PSR 检测方法,与 RT-LAMP 法相比,两者特异性均为 100%;RT-PSR 法的检测灵敏度为 1 CFU/mL,为荧光定量 PCR 法的 10 倍,且检测下限可达 0.1 pg/μL;临床患者痰液样本检测结果表明,与罗氏培养法相比,RT-PSR 法和 RT-LAMP 法的阳性率分别为 98.80% ($P<0.05$) 和 96.39% ($P<0.05$),差异均具有统计学意义。**结论:**与传统检测方法相比,RT-PSR 法对于诊断临床样本中的 MTB 具有良好的特异性和敏感性,适合基层医疗单位防治 MTB 的推广和应用。

关键词:结核分枝杆菌;聚合酶螺旋反应;临床样本;快速检测

中图分类号:R378.911;R521;R563 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2020)05-879-06

Application of Reverse Transcription-Polymerase Spiral Reaction for Detection of Mycobacterium Tuberculosis*

YU Chang-ping¹, YU Bin², CAI Wei-wei¹, LIU Bai-cheng¹, YU Miao¹, WANG Dong-liang^{1Δ}

(1 Department of Respiration, General Hospital of Northern War Zone of the People's Liberation Army, Shenyang, Liaoning, 110003, China; 2 Department of Orthopaedics, Liaoning People's Hospital, Shenyang, Liaoning, 110015, China)

ABSTRACT Objective: Establishment and application of reverse transcription-polymerase spiral reaction (RT-PSR) for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). **Method(s):** The RT-PSR specific primers were designed by the 16S rRNA gene of *M. tuberculosis* and preliminary establishment of MTB amplification technology by optimizing the reaction conditions. Subsequently, the specificity and sensitivity of RT-PSR, RT-LAMP and real-time PCR method were tested with 2 strains of MTB and 11 other pathogenic bacteria. The diagnostic comparison of sputum samples from 83 tuberculosis patients by RT-PSR, Lowenstein-Jensen culture, RT-LAMP and real-time PCR method. **Result (s):** The RT-PSR method for MTB detection was successfully established and optimized. Compared with RT-LAMP method, the specificity of both methods was 100%. The sensitivity of RT-PSR was 1 CFU/mL, which was 10 times higher than that of real-time PCR and the detection limit was 0.1 pg/μL. The results of clinical samples showed that the positive rates of RT-PSR and RT-LAMP method were 98.80% ($P<0.05$) and 96.39% ($P<0.05$), and the difference was statistically significant when compared with Lowenstein-Jensen culture method. **Conclusion (s):** Compared with the traditional detection method, the RT-PSR method show good specificity and sensitivity for the diagnosis of MTB in clinical samples, which is suitable for the promotion and application of MTB prevention and treatment in primary medical units.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; Polymerase spiral reaction; Clinical samples; Rapid detection

Chinese Library Classification(CLC): R378.911; R521; R563 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2020)05-879-06

前言

结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)作为引起肺结核病的主要病原菌,可通过飞沫经呼吸道在人群中进行传播,因结核病治疗周期长,药物副作用大且易传播,常给 MTB 的治疗和预防带来一定难度^[1,2]。据世界卫生组织(WHO)

2017 年的调查报道,全球每年仍以 1060 万新增结核病例的速度持续增长,其中,不发达国家和发展中国家人群中 MTB 携带率高达 70%,约每 3 个人中就有一人感染了 MTB^[3,4]。我国是世界上 MTB 潜伏感染负担最重的国家之一,约有三分之一的人群接触并感染结核分枝杆菌,少部分人群(5%~10%)在感染 MTB 后转为无明显临床症状的潜伏感染人群,该部分人群作

* 基金项目:辽宁省自然科学基金项目(201510274-301);辽宁省科学事业公益基金项目(2015001021)

作者简介:于昌萍(1984-),女,硕士,主治医师,主要研究方向:呼吸内科相关研究,E-mail: yubin8207@163.com

Δ 通讯作者:王东亮(1964-),男,博士,主任医师,主要研究方向:呼吸科常见疾病的基础与临床研究,

E-mail: wangdongliang123@163.com,电话:18740071363

(收稿日期:2019-08-28 接受日期:2019-09-23)

为 MTB 庞大的移动储存库持续不断地向外界传播疫情,造成更多的新发感染^[5,6];近年来抗生素的不合理使用,致使耐药及多重耐药菌株频繁出现,给临床上预防和治疗 MTB 带来很大困难^[7]。因此,建立准确、快速且有效地检测手段对结核病的防治具有重要的临床意义。

目前,临床上对于 MTB 的诊断主要包括病原学诊断法(如痰液涂片抗酸染色法和培养法)、MGIT 960 液体快速培养法、聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)法及等温扩增技术(Isothermal amplification technology, IATs)等^[8,9]。其中,涂片法和培养法作为 MTB 检测的“金标准”,虽然简单易行,但检测灵敏性差、检测耗时间且检出率低,不适用于 MTB 和非结核分枝杆菌(Non-tuberculous mycobacteria, NTM)的鉴别诊断;PCR 法或液体快速培养法是 WHO 推荐的高效诊断方法,但对实验操作人员的技术要求较高,且需要购买价格较为昂贵的仪器设备,限制了在临床上的推广与使用^[10,11]。等温扩增技术因操作简便、可实现在短时间内获取结果且无需昂贵设备等优势已被广泛应用于许多疾病的诊断中,聚合酶螺旋反应(Polymerase spiral reaction, PSR)作为一种新型的等温扩增技术^[12],自问世以来便受到广泛关注,该方法可在恒温条件下利用 2~4 条特异性扩增引物在 Bst-DNA 聚合酶的作用下实现对靶基因的快速扩增,与环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)法相比,PSR 法的引物设计更为简单,且兼备扩增效率高、不需昂贵设备等优点^[13,14]。

本研究以结核分枝杆菌 16S rRNA 基因为靶序列设计逆转录-聚合酶螺旋反应(RT-PSR)的特异性引物,并与痰涂片法、RT-LAMP 法、荧光定量 PCR 法进行特异性和敏感性比较,以期为临床上 MTB 的诊断提供一种简单、快速、高效且结果易读取的快速诊断方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂与仪器 DNA Marker、dNTPs、MgCl₂、细菌

DNA 基因提取纯化试剂盒、RNA 提取试剂盒、MMLV 反转录酶购自宝生物工程(大连)有限公司;甜菜碱购自 Sigma-Aldrich 上海贸易有限公司;SYBR Green I 购自厦门白维信有限公司;Bst-DNA 聚合酶购自 NEB(北京)有限公司;TaqMan™ 荧光定量试剂盒购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;罗氏培养基、营养琼脂培养基购自珠海贝索生物科技有限公司;荧光定量 PCR 仪(Tanon 2500R)购自上海天能科技有限公司;电热恒温水浴锅(HH-W420)购自山东博科科学仪器有限公司生产;荧光定量 PCR 仪(Mx3000P)购自美国安捷伦公司。

1.1.2 菌株来源 标准株:结核分枝杆菌 H37Rv(*M. tuberculosis*, ATCC 27294)、胞内分枝杆菌(*Mycobacterium intracellulare*, C68230)、堪萨斯分枝杆菌(*Mycobacterium kansas*, ATCC 43224)、海内分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*, ATCC 25039)、偶发分枝杆菌(*Mycobacterium fortuitum*, ATCC 35855)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, ATCC 70603)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 27853)、沙门氏菌(*Salmonella*, ATCC 13076)、李斯特杆菌(*Listeria*, ATCC 19115)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, ATCC 25923)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*, ATCC 25922)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, ATCC 6305)均来自北纳生物科技有限公司;结核分枝杆菌 H37Ra 株为解放军北部战区总医院菌种室保存。本研究于 2018 年 4 月至 12 月间共收集来自北部战区医院、辽宁省人民医院确诊结核病患者痰液样本 83 份,以上样本均在患者知情并签订《知情同意书》后收集。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 为保证本研究所用引物的特异性和敏感性,分别在 GeneBank 数据库中下载并比对结核分枝杆菌 H37Rv 标准株(GeneBank 登录号:NR_102810.1)和其他非结核杆菌的 16S rRNA 全序列,经多序列比对后发现可变区位于 10 bp~210 bp 之间,故选择该区间作为引物设计的靶序列,使用 Primer Premier 5 软件设计 RT-PSR 的特异性引物(见表 1)。

表 1 RT-PSR 扩增引物

Table 1 Primers used in RT-PSR assay

Primers Name	Primers Sequence (5'-3')	Size(bp)
Ft	gtcaaaagcgatccgccttac-CGAACGCTGGCGGCGTGCTTAAC	44
Bt	cattccgcctagcgaaactg-AGACCCAGTTTCCCAGGCTTAT	43
IF	TGTTTGAGAGTTTGATCCTGG	22
IB	AGCGCTTCCACCACAAGACATG	23

1.2.2 样品 DNA 的制备 将结核分枝杆菌标准株 H37Rv 接种于罗氏固体培养基上,37 ℃ 培养 24~48 h。然后挑取单个菌落接种于罗氏液体培养基中进行扩大培养。取一定量的菌液,按照 RNA 提取试剂盒操作说明书所述提取 RNA 模板,备用。

1.2.3 RT-PSR 反应体系的建立与优化 首先对 RT-PSR 的特异性引物进行验证,配制总体积为 25 μL 体系:2.0 mmol/L dNTPs 2 μL,2 mmol/L MgCl₂ 2.5 μL,10 × Thermo-Pol Buffer 2.5 μL,Ft 和 Bt 引物各 1.6 μL,IF 和 IB 各 0.8 μL,0.8 mol/L Betaine 2 μL,Bst DNA 聚合酶 1 μL(8 U/管),DNA 模板 1 μL,

重组核糖核酸酶抑制剂 50 U,MMLV 反转录酶 100 U,灭菌去离子水补齐至 25 μL。将上述体系于 60 ℃ 条件下孵育 60 min,反应结束后用 2.0%琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行分析,随后滴加 1 μL SYBR Green I(× 2000)染料混匀,分别在自然光和紫外光下观察。分别对 RT-PSR 反应体系的温度、Bst DNA 酶浓度、甜菜碱浓度、Mg²⁺ 浓度、dNTPs 浓度和孵育时间进行优化,实时浊度仪连续监测优化反应并用 2.0%琼脂糖凝胶电泳验证扩增结果。

1.2.4 RT-PSR 的特异性 用 RNA 提取试剂盒提取上述 13 株

实验菌(2株结核分枝杆菌和11株其它致病菌)的RNA为模板,分别进行RT-PSR法和RT-LAMP法进行检测,以灭菌去离子水为阴性对照。RT-LAMP反应体系参考文献^[15],反应结束后,向反应管内加入1 μL SYBR Green I($\times 2000$)混匀并分别于自然光和紫外光下观察,同时将扩增产物于琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.5 RT-PSR 的敏感性 取适量罗氏固体培养基上生长状况良好的结核分枝杆菌 H37Rv 标准株菌落,经研磨后用磷酸盐缓冲液稀释,用比浊仪对菌液浓度进行测定并调整细菌浓度至 1×10^5 CFU/mL,随后分别进行10倍倍比稀释至1 CFU/mL。分别吸取2 mL各稀释度菌液提取RNA和DNA,随后进行RT-PSR法和荧光定量PCR法的敏感性试验。

1.2.6 RT-PSR 的检测极限 为进一步明确RT-PSR法的检测极限,提取结核分枝杆菌 H37Rv 总RNA后使用核酸蛋白分析仪对其含量进行测定,灭菌去离子水调整至10 ng/ μL ,分别用灭菌去离子水进行10倍倍比稀释:1 ng/ μL 、100 pg/ μL 、10 pg/ μL 、1 pg/ μL 、0.1 pg/ μL 、0.01 pg/ μL 、0.001 pg/ μL 。以灭菌去离子水为阴性对照,分别吸取2 μL 各稀释度浓度菌液进行RT-PSR法检测。

1.2.7 临床样本检测 对收集的83份临床疑似结核病患者痰液样本进行抗酸染色涂片和罗氏培养基培养,作为临床检测评价的“金标准”。随后提取样本中RNA和DNA并分别进行RT-PSR法、RT-LAMP法和荧光定量PCR法进行扩增,设定灭菌去离子水为阴性对照,H37Rv为阳性对照,计算几种方法检测的符合率。使用SPSS 16.0软件进行统计学分析,采用卡方检验, $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 RT-PSR 的建立与条件优化

以提取的 H37Rv 标准株 RNA 为模板进行 RT-PSR 扩增,琼脂糖电泳结果显示,阳性产物呈阶梯状分布,而阴性对照无条带。反应结束后,向反应管内滴加 SYBR Green I 染料,自然光下阳性结果呈绿色,阴性为淡橙色;紫外光下观察,阳性结果呈绿色荧光,而阴性管颜色无变化。见图1。

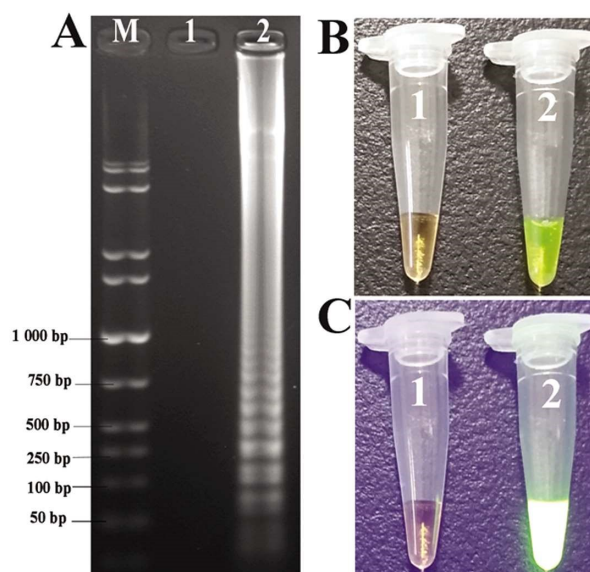


图1 RT-PSR 的扩增结果

Fig.1 The results of RT-PSR amplification

A-C. Observation of agarose gel electrophoresis, natural light and UV light for RT-PSR, respectively. M: standard DNA Molecular Weight; 1. negative control; 2. H37Rv

分别对 RT-PSR 的反应条件进行优化,实时浊度仪监测结果显示,PSR 反应温度为 61°C 、 MgSO_4 浓度为 3 mM、dNTPs 浓度为 1.2 mM、甜菜碱浓度为 0.8 mM、Bst 酶浓度为 8 U、扩增时间为 45 min。具体见表2。

表2 RT-PSR 反应条件的优化

Table 2 Optimization of RT-PSR amplified condition.

Conditions	Reaction interval	Difference	Good yield	Final selected
Temperature	60-69 $^\circ\text{C}$	1 $^\circ\text{C}$	61-65 $^\circ\text{C}$	61 $^\circ\text{C}$
MgSO_4	2.0-8.0 mM	1 mM	3.0-5.0 mM	3 mM
dNTPs	0.8-2.4 mM	0.2 mM	1.2-1.6 mM	1.2 mM
Betaine	0.5-2.0 mM	0.1 M	0.8-1.3 mM	0.8 mM
Bst DNA polymerase	6-12 U	2 U	8-12 U	8 U
Time	0-120 min	15 min	30-60 min	45 min

2.2 RT-PSR 特异性试验

以灭菌后的去离子水做模板为阴性对照,选择13株不同菌株分别进行RT-PSR和RT-LAMP的特异性试验。琼脂糖凝胶电泳结果显示,两种方法均可特异性的扩增2株阳性MTB,扩增产物呈典型梯形条带,而阴性对照和其它11株致病菌无扩增;将SYBR Green I染料与反应产物混合,自然光下阳性扩增呈绿色,阴性为淡橙色;紫外光下阳性扩增呈绿色荧光,阴性管内无变化。以上结果表明RT-PSR和RT-LAMP方法对MTB

的特异性均为100%(见图2)。

2.3 RT-PSR 敏感性试验

将初始菌液浓度为 1×10^5 CFU/mL 的结核分枝杆菌 H37Rv 标准株菌液进行10倍稀释后分别进行RT-PSR和real-time PCR敏感性试验。结果如图3所示,RT-PSR方法的检测灵敏度为 1×10^0 CFU/mL,而real-time PCR方法的检测灵敏度为 1×10^1 CFU/mL,表明RT-PSR方法具有较高的敏感性,比real-time PCR法高出1个数量级。

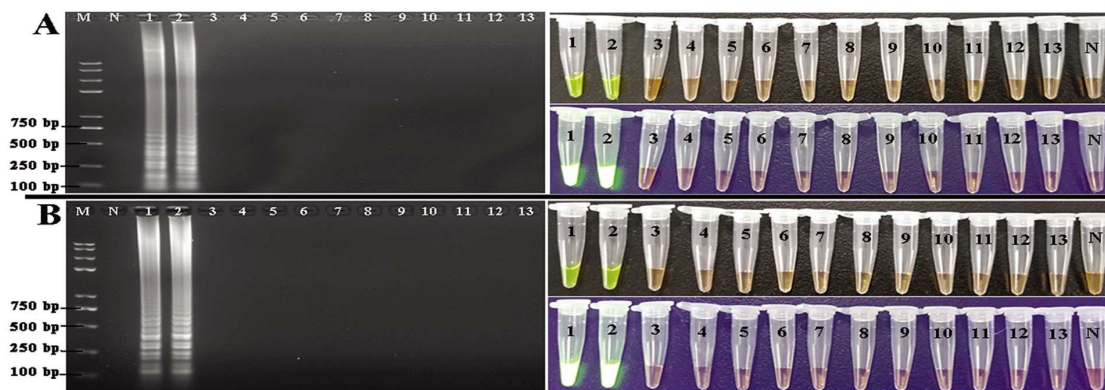


图 2 RT-PSR 与 RT-LAMP 的特异性扩增结果

Fig.2 The specificity of RT-PSR and RT-LAMP amplification

A-B: Observation of the products from RT-PSR, RT-LAMP under agarose gel electrophoresis, natural light and UV light, respectively. M, standard DNA Molecular Weight; N, negative control; 1, H37Rv; 2, H37Ra; 3, *M. intracellulare*; 4, *M. kansasii*; 5, *M. marinum*; 6, *M. chelonae*; 7, *K. pneumoniae*; 8, *P. aeruginosa*; 9, *S. Enteritidis*; 10, *L. monocytogenes*; 11, *S. aureus*; 12, *E. coli*; 13, *S. pneumoniae*.

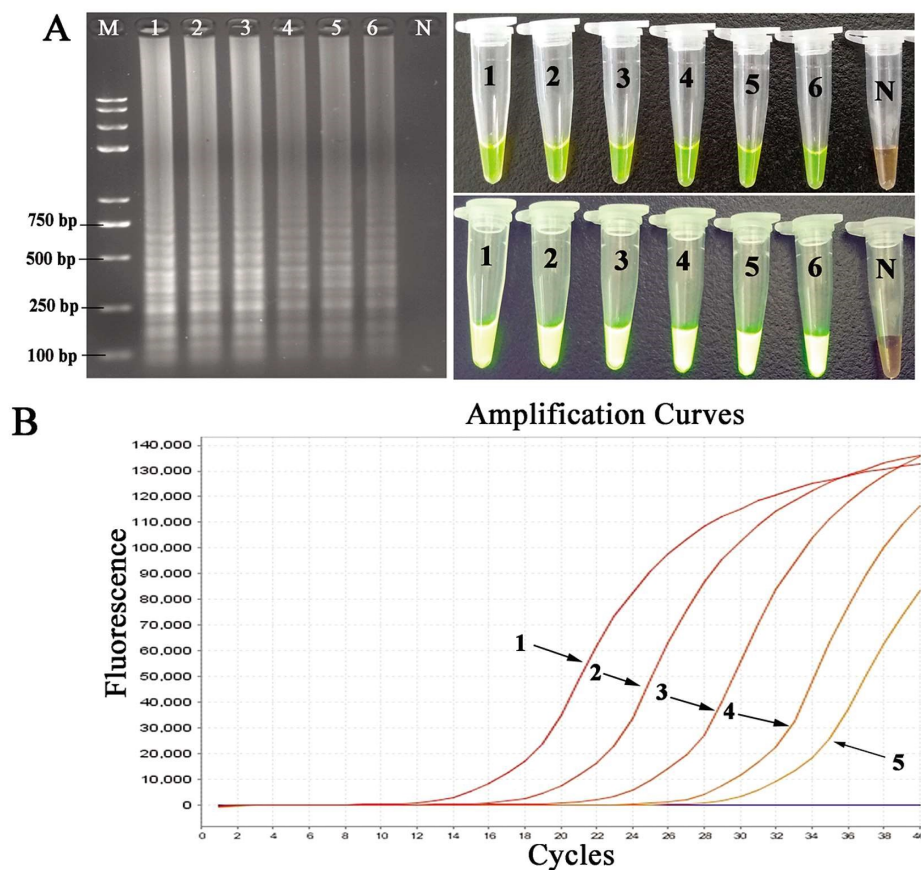


图 3 RT-PSR 与 real-time PCR 的敏感性结果

Fig.3 The sensitivity results of RT-PSR and real-time PCR assay

A, Observation of the amplification productions from RT-PSR by agarose gel electrophoresis, natural light and UV light, respectively. B: Amplification results of real-time PCR. M, standard DNA Molecular Weight; N, negative control. 1-5: 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 CFU/mL, respectively.

2.4 RT-PSR 的检测极限

通过测定结核分枝杆菌 H37Rv 标准株 RNA 的含量后将初始浓度调整至 $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 经一系列的 10 倍梯度稀释, 多次重复试验所得到的 RT-PSR 检测极限均为 $0.1 \text{ pg}/\mu\text{L}$, 可见 RT-PSR 能够完成对痕量结核分枝杆菌的检出。见图 4。

2.5 临床样本检测

本研究以 "金标准" 法 - 罗氏培养法对采集的 83 份痰液

临床样本中 MTB 的检测结果为参照, 分别使用 RT-PSR 法和 RT-LAMP 对痰液样本中的 RNA 进行检测, 同时以 real-time PCR 法对痰液 DNA 样本进行检测。试验结果见表 3, 与罗氏培养法相比, RT-PSR 法与 RT-LAMP 法的检出率分别为 98.80% ($82/83$, $P < 0.05$) 和 96.39% ($80/83$, $P < 0.05$), 以上两种方法与传统检测法差异有统计学意义, 表明建立的 RT-PSR 法在临床检测应用中具有一定的潜力。

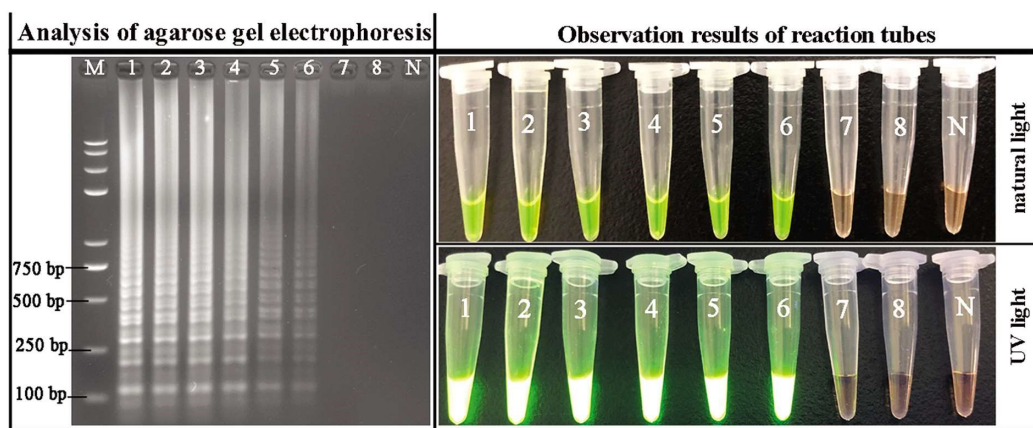


图 4 RT-PCR 的检测极限

Fig.4 The detection limit of RT-PCR assay

M, standard DNA Molecular Weight; N, negative control. 1-8: 10 ng/μL, 1 ng/μL, 100 pg/μL, 10 pg/μL, 1 pg/μL, 0.1 pg/μL, 0.01 pg/μL, 0.001 pg/μL, respectively.

表 3 临床样本检测

Table 3 Detection results of clinical samples (n=83)

Detection methods	Detection	MTBb	Pc	Detection rate(%)
L-Ja	+	69	—	83.13
	—	14		
RT-PCR	+	82	$P<0.05$	98.80
	—	1		
RT-LAMP	+	80	$P<0.05$	96.39
	—	3		
real-time PCR	+	73	$P>0.05$	87.95
	—	10		

Note: a L-J= Lowenstein-Jensen culture medium; b MTB patients, n=83; c The sensitivity of RT-PCR, RT-LAMP and real-time PCR compared to L-J, respectively.

3 讨论

目前,由结核分枝杆菌引起的肺结核疾病在我国经济不发达地区仍呈现高发态势,给我国的卫生健康事业和经济发展带来严重负担,建立快速、灵敏的 MTB 检测诊断方法至关重要^[16]。"金标准"法虽然能够完成 MTB 的鉴定任务,但耗时长、检出率低且操作复杂,本研究对于 83 例肺结核患者痰液标本进行罗氏培养基法检测,其结果也佐证了以上观点。随着分子生物学检测方法的不断发展,越来越多恒温扩增方法先后被建立并应用在结核病的诊断当中,如 LAMP 法、交叉引物等温扩增法等^[17]。而 PSR 作为一种新型、快速、高效地检测手段,可摆脱复杂的仪器设备的限制且能够在短时间内获得目的基因大量扩增,已被广泛用于食品安全、农业微生物和医疗卫生等现场快速检测^[18,19]。

本研究建立的 RT-PCR 技术以结核分枝杆菌 16S rRNA 为靶基因序列,因其具有半衰期短、拷贝量高、不易污染且仅存于具有繁殖能力的活菌中,从而避免了死菌基因组造成的假阳性干扰,但该基因在分枝杆菌属内普遍存在且保守性较高^[20],对特异性引物的设计带来一定难度。通过对特异性引物验证结果

可见,本文建立的 RT-PCR 法在添加逆转录酶和 RNA 酶抑制剂后能够在短时间内完成对 16S rRNA 基因的大量扩增,经扩增条件优化后的反应体系,不仅降低了试剂耗材和能源等费用成本,并且缩短了检测时间。关于结核分枝杆菌检测的等温扩增技术最早可以追溯到 2003 年,近年来越来越多的基于 MTB 检测的 LAMP 法不断改进与创新。其中,逆转录-环介导等温扩增结合免疫吸附杂交法可以快速检测 MTB 样本中单一拷贝的 16S rRNA,且重复性良好,显示了 LAMP 法适用于基层医疗单位的诸多优势^[15,21]。本研究建立的 RT-PCR 法引物设计更加简单方便,同样可以利用加速引物提升反应效率,实现在短时间内完成对靶基因的大量扩增。特异性和敏感性试验结果表明,RT-PCR 法与之前建立的 RT-LAMP 方法相比,两者具有相同的通用性和特异性,均可特异性地检测携带 MTB 的阳性菌株,而其他 11 株致病菌无扩增;与 real-time PCR 的敏感性相比,RT-PCR 的敏感性较高,为 real-time PCR 法的 10 倍,且检测下限可达 0.1 pg/μL,可承担对更低拷贝数量的检测任务。分别应用"金标准"法、RT-PCR 法、RT-LAMP 法和 real-time PCR 法对临床样本进行检测,其结果表明,RT-PCR 法和 RT-LAMP 法的检出率均高于罗氏培养基法,且差异性显著,证实

了 RT-PSR 法作为新型、快速检测手段可以承担临床上对 MTB 现场检测。

在恒温扩增过程中往往需使用琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行分析,制胶过程中需要用溴化乙锭(EB)染色,该试剂被潜在的认定具有较强致癌性和致畸性,应尽量减少使用。为达到检测可视化的目的,本研究选择 SYBR Green I 荧光染料作为指示剂,反应结束后向管内滴加少量的染料即可判定反应结果,可以提高检测效率,但在反应过程中管内会生成大量气溶胶,打开反应管后气溶胶的扩散会对周围环境造成污染,易对后续的扩增造成假阳性结果。据报道,已有学者设计出一种恒温反应管^[22],可于反应前向管内添加荧光染料,反应后可直接读取反应结果而降低气溶胶污染的风险,但由于专利保护限制了该反应管在基层部门的普及和应用。综上所述,本研究所建立的 RT-PSR 法,不仅具有快速、低成本、高特异性和高灵敏性等特点,且不需要依赖昂贵仪器与专业操作技能,适用于各基层医疗单位对于结核分枝杆菌的快速诊断。

参考文献(References)

- [1] Ogari CO, Nyamache AK, Nonoh J, et al. Prevalence and detection of drug resistant mutations in *Mycobacterium tuberculosis* among drug naive patients in Nairobi, Kenya [J]. BMC Infect Dis, 2019, 19(4): 279-284
- [2] Amezani R, Forouzandeh Moghadam M, Rasaei MJ. Development of Sensitive and Rapid RNA Transcription-based Isothermal Amplification Method for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. J Med Biotechnol, 2019, 11(4): 169-175
- [3] WHO. Global tuberculosis report 2017 [EB/OL].[http:// www.who.int/tb/publications/global_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/), 2017-12-01/2018-02-08
- [4] Shaikh A, Sriraman K, Vaswani S, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* RNA in bioaerosols from pulmonary tuberculosis patients[J]. Int J Infect Dis, 2019, 13(86): 5-11
- [5] Zhao P, Yu Q, Zhang Y. Evaluation of a manual identification system for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a primary tuberculosis laboratory in China[J]. J Int Med Res, 2019, 47(6): 2666-2673
- [6] Jiao WW, Liu ZG, Han R, et al. Prevalence of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* among children in China Tuberculosis[J]. Tuberculosis, 2015, 95(3): 315-20
- [7] Chauhan DS, Sharma R, Parashar D, et al. Rapid detection of ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by real-time polymerase chain reaction hybridisation probe method [J]. Indian J Med Microbi, 2018, 36(2): 211-216
- [8] 金法祥, 王华钧, 许文芳, 等. 4 种新方法快速检测结核分枝杆菌的临床研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(21): 3638-3639
- [9] Kamariza M, Shieh P, Ealand CS, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum with a solvatochromic trehalose probe[J]. Sci Transl Med, 2018, 10(430): pii: eaam6310
- [10] 杜伟勤, 薛婷, 王桂琴. 环介导等温扩增法检测结核分枝杆菌的应用[J]. 中国当代医药, 2018(15): 123-126
- [11] Rocchetti TT, Silbert S, Gostnell A, et al. Validation of a multiplex real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium* spp. *Mycobacterium tuberculosis* complex, and *Mycobacterium avium* complex directly from clinical samples by use of the BD max open system[J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(6): 1644-1647
- [12] Liu W, Dong D, Yang Z, et al. Polymerase Spiral Reaction (PSR): A novel isothermal nucleic acid amplification method[J]. Sci Rep, 2015, 5: 12723
- [13] Malla J A, Chakravarti S, Gupta V, et al. Novel Polymerase Spiral Reaction (PSR) for rapid visual detection of Bovine Herpesvirus 1 genomic DNA from aborted bovine fetus and semen [J]. Gene, 2018, 644: 107-112
- [14] Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development [J]. J Infect Chemother, 2013, 19(3): 404-411
- [15] 吴丹丹, 李保胜, 亢继文, 等. RT-LAMP 与 LAMP 法检测结核分枝杆菌的效果比较[J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(3): 248-254
- [16] 陈伊, 黄文焰, 邓君丽. LAMP 技术检测结核分枝杆菌的临床时效性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(13): 1622-1624
- [17] Qu Xi-chao, Song Yuan-yuan, Zhao Bing, et al. A multicenter study of Cross-Priming Amplification for tuberculosis diagnosis at peripheral level in China[J]. Tuberculosis, 2014, 94: 428-433
- [18] Gupta V, Chakravarti S, Chander V, et al. Polymerase spiral reaction (PSR): a novel, visual isothermal amplification method for detection of canine parvovirus 2 genomic DNA [J]. Arch Virol, 2017, 162(7): 1995-2001
- [19] Jiang X, Dong D, Bian L, et al. Rapid Detection of *Candida albicans* by Polymerase Spiral Reaction Assay in Clinical Blood Samples[J]. Front Microbiol, 2016, 7: 916
- [20] Choi Y, Hong S R, Jeon B Y, et al. Conventional and real-time PCR targeting 16S ribosomal RNA for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex[J]. Int J Tuberc Lung D, 2015, 19(9): 1102-1108
- [21] 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 Meth, 2009, 76: 174-80
- [22] Liu W, Yuan C, Zhang L, et al. Development of isothermal amplification methods for rapid and sensitive detection of heat-labile enterotoxin producing *Escherichia coli* [J]. J Microbiol Meth, 2019, 161: 47-55