

# 环介导等温扩增法快速检测痰液标本中的结核分枝杆菌

陈秀琼<sup>1</sup>, 黄裕春<sup>1</sup>, 周志梅<sup>1</sup>, 鲁 曦<sup>1</sup>, 石 磊<sup>2</sup> (1. 广东省东莞市慢性病防治院 523008;  
2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广州 510640)

**【摘要】 目的** 由于结核病检测技术目前存在灵敏度低, 检测周期长的问题, 给结核病防治工作带来了诸多不便。多种基因检测技术的出现为结核病的诊断, 提供了有利工具。本文通过过使用新型基因扩增法, LAMP 法对痰标本中的结核分枝杆菌进行检测。**方法** 采集 54 份肺结核疑似患者的临床痰标本, 对每份样本使用 LAMP 法进行检测, 并使用痰培养结果作为金标准。**结果** 在直接检测痰标本的试验中 LAMP 的灵敏度为 96%, 特异性为 100%。**结论** 通过这项研究发现, 使用 LAMP 技术用于痰标本中结核分枝杆菌的检测, 可大大缩短检测周期, 简化操作步骤, 具有成本低、灵敏度高、特异性强的优点, 有利于进行结合病的筛查和诊断。

**【关键词】** 结核分枝杆菌; 环介导等温扩增法; 痰培养

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.13.029 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)13-1595-03

**Application of Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum samples** CHEN Xiu-qiong<sup>1</sup>, HUANG Yu-chun<sup>1</sup>, ZHOU Zhi-mei<sup>1</sup>, LU Xi<sup>2</sup>, SHI Lei<sup>2</sup> (1. Dongguan Hospital for Chronic Disease, Dongguan, Guangdong 523008, China; 2. College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510640, China)

**【Abstract】 Objective** In the present, the problem of low sensitivity and time consuming is the biggest problem of TB diagnosis. In the past decade some nucleic acid application methods were employed in TB detection, the sensitivity and speed were improved. In this study, Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) and conventional culture method were used in TB diagnosis. **Methods** LAMP and conventional culture method were employed in TB detection. A total of 54 clinical sputum specimens were collected from suspected TB patients, and were detected by LAMP and culture method. **Results** The sensitivity rate of LAMP in all specimens was 96%, and specificity rate was 100%. **Conclusion** According to this study, we find that the LAMP method used in TB detection could reduce the inspection period, and simplify the operation steps with high specificity, sensitivity and low cost, which is beneficial to the screening and diagnosis of tuberculosis

**【Key words】** mycobacterium tuberculosis; LAMP; sputum culture

世界卫生组织 (WHO) 估计, 全球约有 1/3 的人口感染了结核分枝杆菌。结核病是继艾滋病之后的第二大传染疾病。由目前的趋势预计, 到 2020 年结核病仍将是全球是重大传染病之一<sup>[1]</sup>。因此建立检测快速、灵敏度高、特异性强的诊断方法, 对于结核病防治工作具有重要意义<sup>[2]</sup>。

在过去 10 年间, 对于结核分枝杆菌的检测技术经历了以下过程: 从传统的结核分枝杆菌培养和抗酸染色 (AFB), 到核酸扩增技术 (NAA), 直至今日的 DNA 测序技术和基因芯片<sup>[3]</sup>。这些方法使得结核分枝杆菌的检测准确性不断提高, 也使得检测周期大大的缩短。尽管随着科技的发展, 诞生了大量新型检测手段, 但是结核菌的培养, 尽管检测周期长达数月之久, 但仍然是结核病诊断的“金标准”, 在临床诊断中被广泛使用。

将核酸扩增技术用于结核分枝杆菌的诊断, 使得检测的灵敏度和检测周期都得到了提高, 目前在临床上被用于痰涂片阳性患者的进一步确认<sup>[4]</sup>, 使用 Real-time 聚合酶链反应 (PCR) 技术用于结核菌的检测中, 许多数据表明<sup>[2,5-6]</sup>, 它是一种能够区分结核分枝杆菌与非结核分枝杆菌的有效手段, 而且检测周期可以缩短至半天以内, 然而其灵敏度差异较大, 从研究报道可以看出由 11%~81% 不等<sup>[7]</sup>。LAMP 技术的发明, 为临床工作者提供了一种强大的分子诊断工具<sup>[8]</sup>, 近十年来逐渐显现出了 LAMP 的应用潜力。使用 LAMP 技术用于病原微生物

的诊断, 由于使用了高效的 DNA 聚合酶, 使得检测周期可以缩短至 2 h 以内, 由于 LAMP 反应时在恒温条件下 (60~65℃) 进行, 无需昂贵的核酸扩增仪, 因此成本大大降低<sup>[9]</sup>。LAMP 技术作为一种相对新型的方法, 除了具有上述优点之外, 由于使用到了 2 对引物, 能够识别靶基因的 6 个不同区域, 这大大提高了反应的特异性。

## 1 材料与方 法

**1.1 检测方法的特异性及灵敏度实验** LAMP 方法的特异性检测选取结核分枝杆菌 H37Rv, 结核分枝杆菌 CM-CC93009, 鸟分枝杆菌 95001, 胞内分枝杆菌 95002, 蟾蜍分枝杆菌 95003, 土地分枝杆菌 95005, 不产色分枝杆菌 95007, 堪萨斯分枝杆菌 95013, 亚洲分枝杆菌 95016, 瘰疬分枝杆菌 95017, 龟分枝杆菌脓肿亚种 95021, 偶发分枝杆菌 95022, 耻垢分枝杆菌 95023, 草分枝杆菌 95024, 抗热分枝杆菌 95025, 巴西诺卡 CGMCC 41128, 北京棒杆菌 CGMCC 1727, 嗜肺军团菌 ATCC 33153, 肺炎链球菌 MCCC 31001 共 19 株菌株。LAMP 方法的灵敏度检测选取 10<sup>5</sup>~10<sup>1</sup> cfu/mL 共 5 个浓度的结核分枝杆菌 H37Rv。菌株基因组 DNA 提取使用商业试剂盒 (Genomic DNA Purification Kit, 美国 Promega)。全部菌株及提取实验于广东省结核病防治研究所完成。

**1.2 痰标本收集、培养及前处理** 本实验中使用到的 54 份痰标本, 从 2009 年 3 月至 2009 年 5 月, 收集自广东省东莞市慢

性病防治院结核病疑似患者。获得样本立刻进行液化,采用标准的 N-乙酰-L-半胱氨酸,氢氧化钠 (NALC-NaOH) 液化法进行<sup>[10]</sup>,采用与痰标本等体积的 2% 的 NALC-NaOH 溶液室温下处理 20 min,若痰液非常黏稠可将液化温度提高至 37℃。随后液化的标本被分为 2 份,其中一份用于结核分枝杆菌培养鉴定,另一份用于 LAMP 法检测。

每份液化样本,取出 0.1 mL 涂布在 2 支罗氏培养基上,37℃ 培养。8 周后通过菌落形态进行鉴定。另外用于 LAMP 检测的样本,取出 1 mL 首先经过 12 000 r/min 在室温下离心 10 min,小心弃去上清液,将沉淀用生理盐水洗涤后离心,小心弃去上清液避免后续反应系统受到 NaOH 的干扰。痰标本中 DNA 粗提取过程如下:首先将 200 μL 的裂解液(20 mM pH 8.0 Tris-HCl, 2 mM EDTA, and 0.6% Triton-X 100)加入到上述沉淀中,充分混合尽量使沉淀悬浮,随后置于金属浴中煮沸 20 min 后立即放在碎冰上冷却 10 min。最后将上述裂解液在 12 000 r/min 离心 10 min,将上清液作为 LAMP 反应的 DNA 模板进行扩增。样本的收集和前处理工作须在 1 d 内完成,并将处理后的粗提 DNA 保存在 -20℃ 冰箱中。

**1.3 LAMP 反应** IS6110 区域已经被成功的用于结核分枝杆菌的检测,该区域为结核分枝杆菌种特异基因<sup>[3,7,9]</sup>。IS6110 序列从 GenBank (ACCESSION BX842583) 上下载。LAMP 反应的引物由 PrimerExplorer V4 软件 (Eiken Chemical; <http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>) 进行在线设计。引物由一对外引物:F3 和 B3;和一对内引物 F1P 和 B1P

组成。引物序列及详细信息参见表 1,并由大连宝生物公司进行合成。LAMP 反应使用广州迪澳生物科技有限公司 DNA 恒温扩增试剂盒。25 μL 反应体系,其中包括:每条内引物 1.6 μM,每条外引物 0.2 μM,1.6 mM 脱氧核苷三磷酸(dNTP),6 mM MgSO<sub>4</sub>,1 M 甜菜碱,1 μL(8U) of Bst DNA 聚合酶,1× 聚合酶配套缓冲溶液以及不同量的 LAMP 模板(样本 DNA 和菌株 DNA),再加入 1 μL 的 SYBR Green I 染料,阴性对照模板为无菌 H<sub>2</sub>O,阳性对照模板为含有 IS6110 PCR 片段的 pMD18-T 克隆质粒。将反应管置于恒温扩增实时荧光检测仪(Qiagen 公司,德国)上,反应在 63℃ 下反应 20 min。每轮反应均进行阳性及阴性对照反应。通过扩增曲线判断阴阳性。反应扩增机制请参考文献[8]。

**2 结果**

**2.1 方法的特异性及灵敏度试验结果** 特异性试验结果为 2 株结核分枝杆菌 H37Rv 和 CMCC93009 显示阳性;其余 17 株非结核分枝杆菌显示阴性。部分实验结果如图 1 所示。灵敏度试验结果见图 2。从图中可以得出,最低检测限可以达到 10<sup>1</sup> CFU/mL。

**2.2 患者痰标本的痰培养结果** 由于本实验的目的是进行传统痰培养技术和核酸扩增基因诊断技术的比较,而痰培养技术一直作为结核病诊断的“金标准”,因此本实验以痰培养阳性标本,作为最终阳性结果的参照。在 54 份痰样本中,有 24 份为痰培养阳性标本,另外 30 份痰标本为培养阴性。

表 1 LAMP 法检测结核分枝杆菌的引物序列

引物名称	引物类型	长度(nt)	序列 (5'→3')
F1P	内引物 1	39	ATCCTCGATGGACCGCCAGAACGGCCTATACAAGACCGA
B1P	内引物 2	36	CGCTGGGTCGACTGGTTCAAGGCAGCCTCGAGTTCCG
F3	外引物 1	18	GCACTAGCCGAGACGATC
B3	外引物 2	17	GGTCTCTGGCGTTGAGC

表 2 LAMP 法检测痰标本中结核分枝杆菌结果

检测结果	数量(n=54)	LAMP	
		+	-
痰培养阴性	30	1	29
痰培养阳性	24	24	0
灵敏度		96%	
特异性		100%	

注:灵敏度 = 24 / (24 + 1) × 100% = 24 / 25 = 96%; 特异性 = 29 / (0 + 29) × 100% = 29 / 29 = 100%; + 阳性, - 阴性。

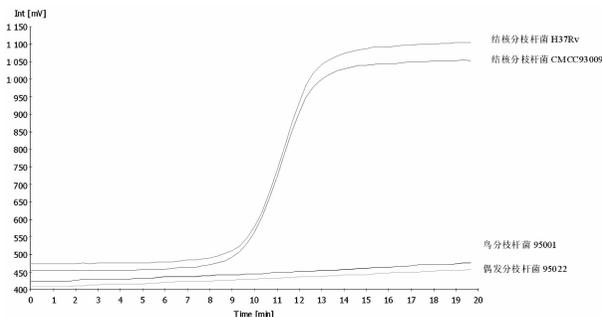


图 1 荧光 LAMP 方法特异性实验结果图(部分)

**2.3 痰标本中结核分枝杆菌的 LAMP 检测结果** 使用 LAMP 技术对 54 份痰样本进行了检测,其中 25 份痰样本为 LAMP 阳性,在这 25 份 LAMP 阳性样本中,有 24 份为痰培养阳性样本,1 份痰培养阴性样本。LAMP 方法检测痰标本中结核分枝杆菌 IS6110 基因的灵敏度为 96%,特异性为 100%,详细结果参见表 2。

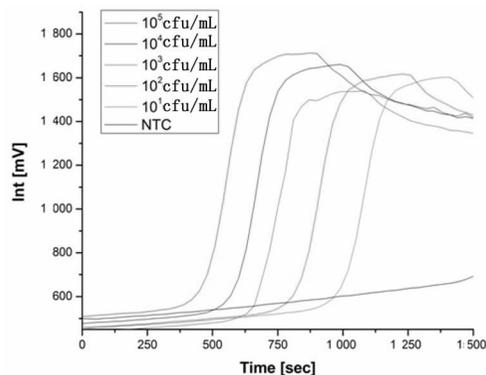


图 2 荧光 LAMP 方法灵敏度实验结果

**2.4 综合分析** 尽管痰培养十分耗时,而且灵敏度不高,但是仍然是结核病诊断的金标准,而且痰培养检测,可以和药敏试

验同时进行,因此仍然广泛使用。痰培养方法的灵敏度为 80%~85%,特异性为 98%<sup>[1]</sup>。在本实验当中,将痰培养结果作为最终的参比结果。使用 LAMP 技术检测结核分枝杆菌,具有一些显著的优点,首先检测周期大大缩短,而且由于避免使用昂贵的仪器设备,使得检测成本降低。恒温扩增实时荧光检测仪可以提供更多的信息,可以进行定量,通过测定溶解曲线了解扩增的特异性,使 LAMP 技术得到了更好应用。

### 3 讨 论

全世界约有 1/3 的人口感染了结核分枝杆菌<sup>[11]</sup>,严重的威胁着人类健康。目前,全球有超过 50% 的患者集中在亚洲的发展中国家,因此建立成本低、检测周期短、便于操作的结核分枝杆菌检测技术,对于控制全球结核病的蔓延,促进结核病防治工作具有十分重要的意义,早在 1993 年,WHO 宣布全球进入结核病紧急状态。许多在不同国家进行的结核病调查报告显示,发展中国家的结核病感染风险比发达国家更是高出 50~100 倍。

根据目前的技术水平,尽管痰培养方法进行结核分枝杆菌的检测具有许多缺点,但仍有必要做。这主要是由于以下原因:(1)痰培养方法在培养结核分枝杆菌后可以药敏试验<sup>[5]</sup>;(2)可以对经过培养的结核分枝杆菌利用基因分型进行流行病学研究<sup>[12]</sup>。一些学者认为,分子检测手段,例如核酸扩增技术,可以作为抗酸染色阳性结果进行快速确认<sup>[13]</sup>,主要是因为核酸扩增技术,例如一些商业的 Real-time PCR 试剂盒成本较高,而且需要配备昂贵的实时荧光定量 PCR 仪。在过去的十多年中,出现了许多检测结核分枝杆菌的核酸扩增技术,使得诊断的灵敏度和检测周期得到了改善,然而这些技术当中,绝大部分不仅需要昂贵的仪器设备,而且对人员的操作水平要求较高,同时需要配备对扩增结果的观察检测设备,这些因素是造成核酸扩增技术在发展中国家尚未得到普及的主要原因。然而在发展中国家,尤其是结核病发病率较高的中国、印度、巴基斯坦等国<sup>[14]</sup>,迫切需要一种不仅快速灵敏,准确率高,而且成本低廉的检测手段。LAMP 技术的发明为基因诊断提供了一套强大工具。LAMP 扩增结果可肉眼直接观测或使用荧光染料方法检测、反应速度快、操作简便,是 LAMP 技术的主要优点。LAMP 技术不仅可以用于设备齐全、精良的医院或实验室,也可以用于小规模医院或县级诊所。

### 参考文献

[1] Haldar S, Chakravorty S, Bhalla M, et al. Simplified detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum using smear microscopy and PCR with molecular beacons[J]. J Med Microbiol, 2007, 56(10): 1356-1362.

[2] Broccolo F, Scarpellini P, Locatelli G, et al. Rapid diagnosis of mycobacterial infections and quantitation of Mycobacterium tuberculosis load by two real-time calibrated PCR assays[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(10): 4565-4572.

[3] Hale Y, Pfyffer G, Salfinger M, et al. Laboratory diagno-

sis of mycobacterial infections: new tools and lessons learned[J]. Clin Infect Dis, 2001, 33(6): 834-846.

[4] 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.

[5] 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(2): 302-306.

[6] Shrestha NK, Tuohy MJ, Hall GS, et al. Detection and Differentiation of Mycobacterium tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Isolates by Real-Time PCR[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(11): 5121-5126.

[7] Moon J, Chang Y, Kim S, et al. The Clinical Utility of Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of Pleural Tuberculosis[J]. Clin Infect Dis, 2005, 41(5): 660-666.

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

[9] 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]. J Clin Microbiol, 2003, 41(6): 2616-2622.

[10] Scarparo C, Piccoli P, Rigon A, et al. Comparison of enhanced Mycobacterium tuberculosis amplified direct test with COBAS AMPLICOR Mycobacterium tuberculosis assay for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory and extrapulmonary specimens[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(4): 1559-1562.

[11] Christopher D, Suzanne S, Paul D, et al. Global burden of tuberculosis[J]. Am Med Assoc, 1999, 282(7): 686.

[12] Ichiyama S, Iinuma Y, Tawada Y, et al. Evaluation of Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test and Roche PCR-microwell plate hybridization method (AMPLICOR MYCOBACTERIUM) for direct detection of mycobacteria[J]. J Clin Microbiol, 1996, 34(1): 130-133.

[13] Alavi-Naini R, Sharifi-Mood B, Metanat T, et al. Rapid diagnostic tests for tuberculosis: Zahedan[J]. J Res Med Sci, 2011, 13(7): 1-7

[14] Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, et al. Molecular Epidemiology of Tuberculosis: Current Insights[J]. Clin Microbiol Rev, 2006, 19(4): 658-685.