论著

文章编号:1000-5404(2012)22-2264-05

基于颜色判定的环介导恒温扩增技术快速检测铜绿假单胞菌的研究

王 欢,黄 庆,史大川,揣征然,府伟灵 (400038 重庆,第三军医大学西南医院检验科)

[摘要] **目的** 建立了一种基于颜色判定的,能够快速准确地检测铜绿假单胞菌的LAMP方法。**方法** 针对铜绿假单胞菌OprL基因设计3对LAMP引物,通过引物特异性识别OprL的8个独立区域来快速检测铜绿假单胞菌。如果在反应前添加荧光染料羟基萘酚蓝(HNB)或钙黄绿素(Calcein),其结果可以通过肉眼观察反应前后颜色变化来判定并经琼脂糖凝胶电泳验证。对该技术进行特异性、灵敏度分析,利用LAMP和PCR同时检测临床标本。**结果** 设计出针对铜绿假单胞菌OprL基因的恒温扩增检测方法。本恒温扩增检测法只扩增铜绿假单胞菌DNA,对其他菌不扩增,显示出良好的特异性。其最低检测限为17.414 pg/μl,PCR方法最低检出限为174.414 pg/ μl,LAMP方法检测灵敏度是PCR方法检测灵敏度的10倍,灵敏度高。LAMP法对临床阳性标本检出率与PCR法相当(27/27)。**结论** LAMP方法用于快速检测铜绿假单胞菌具有检测过程简单、实验装置简便、反应结果肉眼可辨别、灵敏度高和特异性强的特点,适合用于现场和基层检疫及医疗单位的快速诊断。

[关键词] 铜绿假单胞菌;环介导恒温扩增;OprL基因;快速检验
[中图法分类号] R378.991;R446.5 [文献标志码] A

Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* by color loop-mediated isothermal amplification

Wang Huan, Huang Qing, Shi Dachuan, Chuai Zhenran, Fu Weiling (Department of Medical Laboratory, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Objective To establish a rapid and sensitive method of color loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detecting *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Methods LAMP method with hydroxy naphthol blue (HNB) and calcein was designed to amplify and identify the OprL gene of *P. aeruginosa*. Three pairs of LAMP primers (inner, outer and ring primers) were designed according to the eight zones of the OprL gene. A positive reaction was indicated by a color change before and after the reaction, and was verified by agarose gel electrophoresis. The reaction conditions and system were optimized. The sensitivity and specificity of the detection method were evaluated, and were compared with those of conventional PCR. Both LAMP and PCR were applied to detect clinical specimens. Results A LAMP method for detecting *P. aeruginosa* was successfully established. The LAMP method showed 100% specificity for *P. aeruginosa* without other bacteria amplification, and the sensitivity (with the minimum detection limit of 17.414 pg/μl) for the detection of *P. aeruginosa* was 10-fold higher than that of PCR (with the minimum detection limit of 174.14 pg/μl). The detection rates of LAMP and PCR in clinical specimens were the same (27/27). Conclusion LAMP method, in which the amplification can be completed within 60 min, is faster than PCR. The established LAMP method in this study enables rapid, sensitive and specific detection of *P. aeruginosa*, and can be applied for grass roots and small-scale laboratories as well as field surveillance.

[**Key words**] loop-mediated isothermal amplification; *Pseudomonas aeruginosa*; OprL gene; rapid detection

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China(863 Program, 2011AA02A121), the National Science and Technology Major Project(2012ZX10004801-003-006) and the Project of the "Twelfth Five-year Plan" for Medical Science Research of PLA (AWS11C001). Corresponding author: Fu Weiling, E-mail: weilingfu@yahoo.com.cn

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863计划,2011AA02A121);国家科技重大专项(2012ZX10004801-003-006);全军医学科研"十二五"课题(AWS11C001)
[通信作者] 府伟灵,E-mail:weilingfu@yahoo.com.cn

铜绿假单胞菌是医院感染最常见的病原菌之一[1],在感染过程中产生多种毒素和酶,如内毒素、外毒素、致死毒素、肠毒素、溶血素和胞外酶,可引起各部位的感染及败血症,被认为是临床各科医院感染的棘手问题。早期明确诊断,及时有效选用抗菌药物治疗是临床和实验室工作者探索的关键。

传统鉴定铜绿假单胞菌的方法是分离培养、镜检观察、生化鉴定等,这些检测手段不仅需要专业技术人员和复杂的设备仪器,同时鉴定过程耗时、操作复杂、灵敏度低。随着核酸相关的鉴定方法的发展,基于PCR的方法已经成功用于检测铜绿假单胞菌[2],虽然PCR法在特异性和敏感性上有较大的提高,但是检测时间仍然比较长(4~5 h),同时PCR方法依赖精密的温度循环装置。另外还有一些检测方法,例如反向斑点杂交法[3]、基因芯片法等,虽然其检测灵敏度比较高,但是检测过程复杂,成本高,不能满足快速检测的需求。

环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification,LAMP)技术是Notomi等[4]2000年发明的一种新颖的扩增技术,其特点是针对靶基因的6个区域设计4种特异引物,在DNA聚合酶(Bst -DNA polymerase)的作用下,恒温条件下进行核酸扩增,具有操作简单、特异性强特点。另外通过环引物的添加,大大加快了反应的速度,整个过程只需要1~2 h[4-7]。LAMP扩增反应可以形成肉眼可见的焦磷酸镁白色沉淀,通过实时浊度仪对样本DNA定量[7],也可以在反应管中添加染料,通过分光光度计或肉眼观察其颜色变化进行结果判断。但是因为LAMP特异性、灵敏性高等特点,揭盖容易污染。本研究采用在反应前添加荧光染料羟基萘酚蓝(HNB)和钙黄绿素(Calcein),针对铜绿假单胞菌OprL基因进行环介导等温扩增,通过颜色变化(若HNB组颜色由紫罗兰变为天蓝色[9]或Calcein组颜色由橙黄色变为草绿色[8]即为阳性结果)判断结果并经琼脂糖凝胶电泳验证。并对其特异性和灵敏性与PCR进行比较分析,建立了一种基于颜色判定的简单、快速的现场检测方法。

1 材料与方法

1.1 标本及标准菌株来源

铜绿假单胞菌标准菌株:由第三军医大学西南医院检验科提供。实验菌株:收集了2012年2月-5月由第三军医大西南医院检验科细菌室分离的铜绿假单胞菌27例,对照阴性株12例。菌株鉴定是依据临床检验操作规程,通过常规生化反应,采用全自动微生物分析仪分离鉴定。已分纯的菌株保存于-80 ℃低温冰箱。所用的实验菌株根据临床资料除去来源于同一患者的重复菌株。

1.2 仪器和试剂

恒温水浴箱、Vitek-32全自动细菌鉴定仪(法国生物梅里埃公司),PCR扩增仪,凝胶成像系统,Bst大片段DNA聚合酶购自New England Biolabs公司;dNTP、DNA Marker购自宝生物工程有限公司;甜菜碱、硫酸镁溶液、氯化锰溶液、HNB、Calcein购自Sigma公司;琼脂糖购自AMRESCO公司;引物合成由上海生工生物有限公司完成。

1.3 方法

1.3.1 细菌DNA模板的制备 水煮法提取细菌基因组DNA

将细菌接种于营养琼脂平板,37 ℃过夜培养。挑取单个菌落于100 μl的蒸馏水中,95 ℃水浴10 min,12 000 r/min离心5 min,吸取上清液备用。取上面80 μl作为LAMP扩增及PCR扩增反应的模板。

1.3.2 LAMP引物的设计和合成 基因随细菌种类不同而有很大差异,自GenBank数据库中收集铜绿假单胞菌OprL基因序列数据,选择其中1段区域设计LAMP引物,LAMP引物设计软件网址:http://primerexplorer.jp/e/.将待扩增的DNA分为6个独立的区域,根据这6个区域分别设计LAMP反应所需的3对引物,包括2条外引物F3、B3,内引物FIP、BIP,2条环状引物见表1。由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

表1 LAMP引物序列

引物名称	类型	长度(bp)	序列(5′→3′)
F3	外引物	18	GCGTTGCCGCCAACAATG
B3	外引物	17	CATGCGGGCAACCTCTC
FIP	内引物	35	GTTGTCACCCCACCTCCGGGCGGCAACGTTCCTCC
BIP	内引物	34	CTCCGTGCAGGGCGAACTGCAGGCGAGCCAACTC
LOOP1	环引物	17	ACCTGCCGTGCCATACC
LOOP2	环引物	19	GTTCATGCAGCTCCAGCAG

1.3.3 模板的LAMP扩增 配置LAMP反应体系为25 μl,包括:1.6 mmol/L FIP,1.6 mmol/L BIP,0.8 mmol/L LF,0.8 mmol/L LB,0.4 mmol/L F3,0.4 mmol/L B3,1.0 mmol/L dNTPs,0.8 mmol/L betaine,8 mmol/L $MgSO_4$,2.5 μl的10×Bst DNA聚合酶Buffer,8 U BstDNA聚合酶,1 μl DNA模板,分别加入荧光染料3 mmol/L HNB(或625 μmol/L calcein、12.5 mmol/L $MnCl_2$)混匀。将混合物置于60~65 ℃恒温反应60 min,80 ℃灭火2 min。以双蒸水为阴性对照,产物于2.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.4 特异性试验 用建立的LAMP方法扩增铜绿假单胞菌阳性菌株和从临床收集的其他阴性对照菌株(包括假单胞菌及非假单胞菌12例),电泳观察扩增产物,验证方法的特异性。

1.3.5 灵敏度试验 将铜绿假单胞菌株细菌纯培养后,按上述制得总DNA模板液,将其进行10倍梯度稀释,使得最终稀释浓度为17.414 ng/μl,1.741 4 ng/μl,174.14 pg/μl,

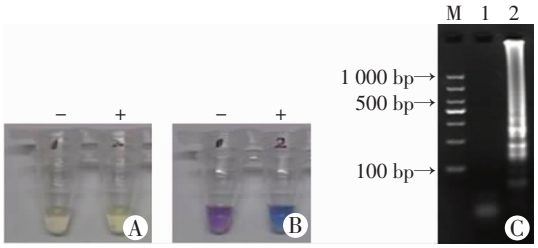
17.414 pg/μl, 1.741 4 pg/μl, 0.174 14 pg/μl,0.0174 14 pg/μl。用LAMP法和PCR法检测。PCR反应体系中包括0.2 mmol/L的dNTP、0.5 U *Taq*酶、0.2 μmol/L的正反向引物、2.0 μl的10×*Taq*酶Buffer和1 μl的DNA模板,最后补双蒸水至20 μl。反应条件为95 ℃ 5 min ,再按94 ℃ 20 s; 62 ℃ 20 s;72 ℃ 40 s 35个循环, 72 ℃ 5 min, 4 ℃保存。取2 μl扩增产物2%琼脂糖凝胶电泳

1.3.6 临床标本的检测 对标本进行传统方法检测(细菌培养及细菌鉴定仪检测)的同时,取按上述方法制得模板液进行LAMP法和PCR法检测。完成后将产物在含溴化乙啶的2%琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像系统观察结果。

2 结果

2.1 LAMP检测方法的建立

以本研究设计的特异性引物对铜绿假单胞菌OprL基因进行LAMP扩增,空白对照以无菌水作为模板, 并用其他细菌基因组作为阴性对照以检测特异性。当反应体系中存在OprL基因时,便发生LAMP扩增反应,产生大量的焦磷酸镁白色沉淀,反应液的浊度上升。当在反应前加入1.0 μl浓度为625 μmol/L Calcein,12.5 mmol/L的$MnCl_2$混合液时,颜色由橙黄色变为草绿色表示为阳性,见图1A;当在反应前加入1.0 μl浓度为3 mmol/L的HNB时, 颜色由紫罗兰变为天蓝色表示为阳性,见图1B;经电泳得图1C。电泳结果与颜色结果相一致。



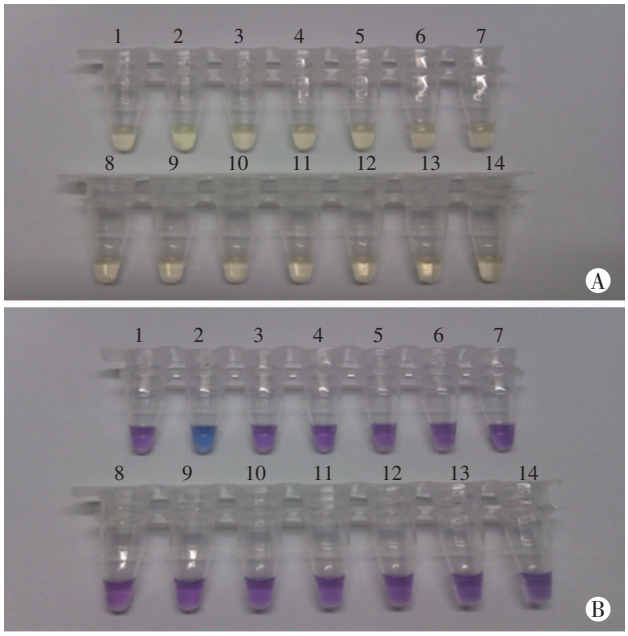
−:空白对照; +:阳性标本

A:Calcein染料组颜色反应结果;B:HNB染料组颜色反应结果;C:电泳结果 M:1 000 bp标准;1:不含DNA空白对照;2:阳性标本

图1 设计引物的检测结果鉴定

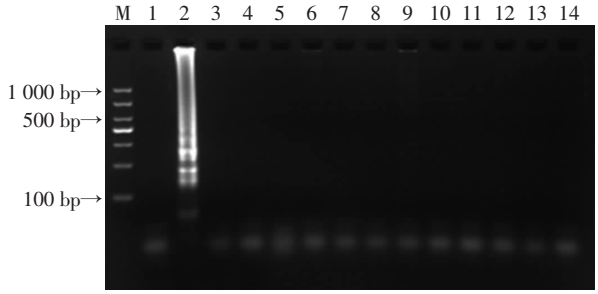
2.2 LAMP方法的特异性分析

当在反应前加入1.0 μl浓度为625 μmol/L calcein与12.5 mmol/L的$MnCl_2$混合液时, 从图2A显示检测结果的颜色变化,草绿色表示检测阳性。检测结果表明只有铜绿假单胞菌样本反应管内变成草绿。当在反应前加入1.0 μl浓度为3 mmol/L的HNB时, 从图2B中可以看出只有铜绿假单胞阳性的反应管的颜色变成了天蓝色表示为阳性,其他的均为紫色表示为阴性, 说明设计的引物具有良好的特异性。图3为检测结果的电泳照片,检测结果表明只有铜绿假单胞菌样本泳道中出现特异性扩增产物,而对照组的其他细菌检测均呈阴性,说明我们建立的LAMP检测方法具有很高的特异性。由此看出扩增反应的琼脂糖凝胶电泳观察结果与扩增产物反应管的颜色转变相一致。



A:calcein染料;B:HNB染料 1:空白对照;2:铜绿假单胞菌;3:鲍曼不动杆菌;4:琼氏不动杆菌;5:睾丸酮丛毛单胞菌;6:非发酵摩梭菌;7:非脱梭类杆菌;8:嗜麦芽单胞菌;9:肺炎克雷伯杆菌;10:肺炎链球菌;11:弗劳地柠檬酸杆菌;12:金黄色葡萄球菌;13:粪肠球菌;14:大肠杆菌

图2 2种染料颜色判定LAMP检测铜绿假单胞菌的特异性显色分析

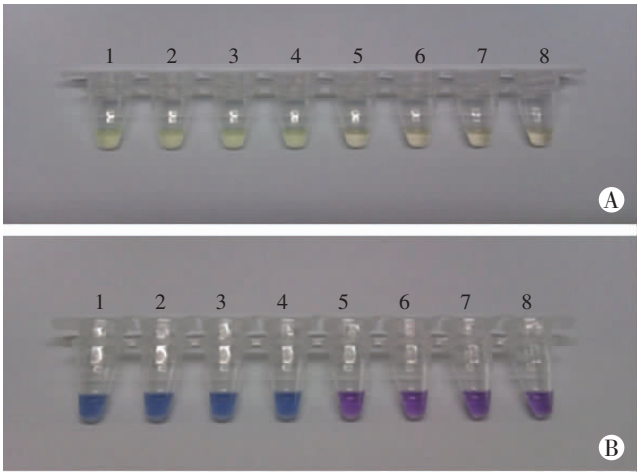


M:标准;1:空白对照;2:铜绿假单胞菌;3:鲍曼不动杆菌;4:琼氏不动杆菌;5:睾丸酮丛毛单胞菌;6:非发酵摩梭菌;7:非脱梭类杆菌;8:嗜麦芽单胞菌;9:肺炎克雷伯杆菌;10:肺炎链球菌;11:弗劳地柠檬酸杆菌;12:金黄色葡萄球菌;13:粪肠球菌;14:大肠杆菌

图3 LAMP检测铜绿假单胞菌的特异性琼脂糖凝胶电泳结果

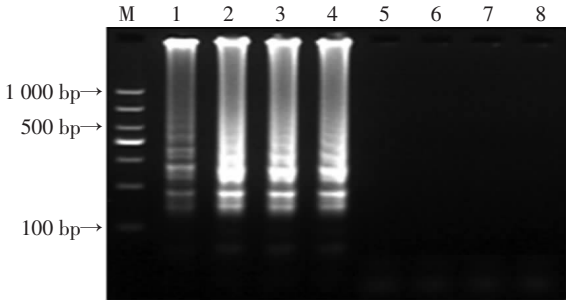
2.3 LAMP方法与PCR方法用于检测铜绿假单胞菌的灵敏度比较

将10倍梯度稀释的铜绿假单胞菌总DNA分别用于LAMP反应和PCR反应,图4显示了LAMP灵敏度的检测结果颜色图。如图4所示, Calcein组和HNB组检测得到的结果相同, LAMP最低检测浓度为17.414 pg/μl。图5显示了LAMP灵敏度检测结果。电泳结果显示LAMP灵敏度可达17.414 pg/μl,与颜色观察结果一致。图6显示PCR灵敏度检测结果。实验结果显示PCR反应产物是500 bp大小的扩增条带, PCR最低检测浓度为174.14 pg/μl, LAMP法灵敏度是PCR灵敏度的10倍。



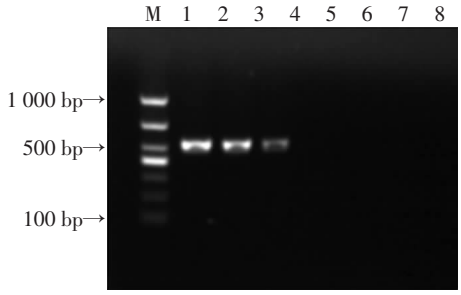
A:Calcein染料;B:HNB 染料 1:17.414 ng/μl;2:1.7414 ng/μl;3:174.14 pg/μl;4:17.414 pg/μl;5:1.7414 pg/μl;6:174.14 fg/μl;7:17.414 fg/μl;8:空白对照

图 4 2 种染料颜色判定 LAMP 检测铜绿假单胞菌灵敏度的显色分析



1:17.414 ng/μl;2:1.7414 ng/μl;3:174.14 pg/μl;4:17.414 pg/μl;5:1.7414 pg/μl;6:174.14 fg/μl;7:17.414 fg/μl;8:空白对照

图 5 LAMP 检测铜绿假单胞均的灵敏度电泳结果



1:17.414 ng/μl;2:1.7414 ng/μl;3:174.14 pg/μl;4:17.414 pg/μl;5:1.7414 pg/μl;6:174.14 fg/μl;7:17.414 fg/μl;8:空白对照

图 6 PCR 检测铜绿假单胞菌的灵敏度电泳结果

2.4 LAMP 和 PCR 检测临床标本的结果对比

从本院微生物室分离提纯的 27 份铜绿假单胞菌标本,12 例阴性对照株标本提取 DNA,平行进行 LAMP 和 PCR 检测。LAMP 方法特异性好,对 12 例其他细菌无交叉反应。对 27 例阳性标本,LAMP 的检出率(27/27)与 PCR 的检出率(27/27)相当。

3 讨论

LAMP 技术在诊断和检测方面获得了很多成就,主要包括临床疾病的诊断[10-12]、流行性细菌或病毒的定性定量检测[13-16]以及动物胚胎性别鉴定[17]等方面。本研究通过利用环介导恒温核酸扩增方法针对铜绿假单胞菌特异基因 OprL 基因设计 LAMP 引物,并用该引物灵敏、快速地检测到铜绿假单胞菌。Kaneko 等[18]研究发现,LAMP 反应过程比 PCR 更不易受到临床样本中各种不同组分的影响,并不需要从样本中纯化 DNA 出来。但 PCR 反应却会因外源 DNA 或者样品中的抑制剂的存在而抑制其反应。所以 LAMP 方法比 PCR 方法更适于临床样本现场快速检测。LAMP 法也存在自身局限性:对引物的设计要求高,需设计多对引物;要求扩增的靶序列长度在 300 bp 以上;电泳阳性反应呈现梯度条带,一旦产生非特异性扩增,不易鉴别;由于该法十分灵敏,因此容易污染,需要注意操作[19]。本研究基于 LAMP 反应不需要纯化 DNA 的特点,采用水煮法粗提基因组 DNA,整个处理时间短,操作简单,只需要一台水浴箱和离心机即可完成。与 DNA 提取试剂盒相比节约了大量时间和成本。

LAMP 扩增反应只有在 6 条引物与靶序列中 8 个结合区完全匹配的情况下才能顺利进行,反应特异性显著高于常规 PCR(2 条引物与靶序列 2 个结合区匹配),有效地降低了扩增反应的本底;实验操作简单,整个反应在等温环境中进行 1 ~ 1.5 h,是一种特异性,灵敏性优于常规 PCR 方法[20]的快速检测技术。LAMP 扩增反应的结果判定有电泳、浊度分析和染料比色分析等方式,其中观察颜色的变化最为方便。常见染料有 SYBR green[21]、Picogreen[22]、碘化丙啶(Propidium iodide)[23]、HNB[9] 和 Calcein[8] 等,其中 HNB 和 calcein 是反应前加入,判断结果无需打开反应管,进一步减少了交叉污染的机会,所以本研究采用了 HNB 和 calcein 作为染料。

本研究成功应用 HNB 和 Calcein 两种染料的颜色变化判定 LAMP 技术检测铜绿假单胞菌 OprL 基因,并从特异性,灵敏性方面与 PCR 结果相比较。从实验结果可得出:①2 种染料组 LAMP 法和 PCR 法都只对铜绿假单胞菌的 OprL 基因发生扩增反应,没有交叉反应,特异性好;②2 种染料组 LAMP 扩增灵敏度相同,都可以成功地检测到浓度为 17.414 pg/μl 的总 DNA,而 PCR 法的最低检测浓度为 174.14 pg/μl。同时采

用PCR和LAMP平行检测27份铜绿假单胞菌标本，结果表明LAMP(27/27)和PCR(27/27)检出相当。LAMP方法虽然扩增原理复杂，但是操作简便、用时少、灵敏度高、特异性强，在65 ℃恒温反应1～1.5 h，反应结束后检测结果可用肉眼观察反应管内颜色变化和管底的白色沉淀生成与否来判定，无需电泳检测。所以适用于检验检疫部门和卫生医疗单位对铜绿假单胞菌的检测，并有望成为简易的常规检测手段，尤其适用于基层单位。

据文献[11]报道，HNB组LAMP灵敏度比Calcein组高10倍，而本实验发现在一步法LAMP中HNB组与Calcein组灵敏度相同。下一步研究我们将通过改变各种反应参数，优化整个反应体系，进一步提高该方法的灵敏度，并用更多的临床样品验证检测结果，实现该方法在基层广泛应用。

参考文献：

[1] Bergogne-Berezin E. Guidelines on antimicrobial chemotherapy for prevention and treatment of infections in the intensive care unit[J]. J Chemother, 2001, 13(1): 134－149.

[2] 盛吉芳，汤灵玲，马亦林，等. 铜绿假单胞菌的基因诊断[J]. 中华传染病杂志，2001，19(4)：229－231.

[3] 樊慧珍，黄文杰，梁昆，等. 铜绿假单胞菌OprI基因的反向斑点杂交检测法[J]. 第一军医大学学报，2004，24(3)：303－305.

[4] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al*. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): E63.

[5] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers[J]. Mol Cell Probes, 2002, 16(3): 223－229.

[6] Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, *et al*. loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template[J]. Clin Chem, 2001, 47(9): 1742－1743.

[7] Mori Y, Kitao M, Tomita N, *et al*. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA[J]. J Biochem Biophys Methods, 2004, 59(2): 145－157.

[8] 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.

[9] 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.

[10] Endo S, Komori T, Ricci G, *et al*. Detection of gp43 of Paracoccidioides brasiliensis by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP)method[J]. FEMS Microbiol Lett, 2004, 234(1): 93－97.

[11] 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.

[12] Okafuji T, Yoshida N, Fujino M, *et al*. Rapid diagnostic method for detection of mumps virus genome by loop-mediated isothermal amplification[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(4): 1625－1631.

[13] Poon L L, Leung C S, Tashiro M, *et al*. Rapid detection of the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a loop-mediated isothermal amplification assay[J]. Clin Chem, 2004, 50(6): 1050－1052.

[14] Imai M, Ninomiya A, Minekawa H, *et al*. Development of H5-RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection[J]. Vaccine, 2006, 24(44/46): 6679－6682.

[15] Hara-Kudo Y, Yoshino M, Kojima T, *et al*. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of Salmonella[J]. FEMS Microbiol Lett, 2005, 253(1): 155－161.

[16] Ohtsuka K, Yanagawa K, Takatori K, *et al*. Detection of Salmonella enterica in naturally contaminated liquid eggs by loop-mediated isothermal amplification, and characterization of Salmonella isolates[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(11): 6730－6735.

[17] Hirayama H, Kageyama S, Takahashi Y, *et al*. Rapid sexing of water buffalo (Bubalus bubalis) embryos using loop-mediated isothermal amplification[J]. Theriogenology, 2006, 66(5): 1249－1256.

[18] Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, *et al*. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances[J]. J Biochem Biophys Methods, 2007, 70(3): 499－501.

[19] 肖斌，朱永红，邹全明. 简便敏感的环介导等温扩增基因诊断新技术[J]. 中华检验医学杂志，2005，28(7)：761－763.

[20] Hong T C, Mai Q L, Cuong D V, *et al*. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(5): 1956－1961.

[21] Parida M, Horioke K, Ishida H, *et al*. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(6): 2895－2903.

[22] Curtis K A, Rudolph D L, Owen S M. Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) [J]. J Virol Methods, 2008, 151(2): 264－270.

[23] Hill J, Beriwal S, Chandra I, *et al*. Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of common strains of Escherichia coli [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(8): 2800－2804.

（收稿：2012-07-04；修回：2012-09-17）

（编辑　邓强庭）