环介导恒温核酸扩增法在病原微生物快速检测领域的应用

李琳[1]，周蓉[1]，李冰[1]，赵喜红[2,3]，卞华伟[4]

（1. 华南理工大学轻工与食品学院，广东广州 510640）（2. 武汉工程大学化工与制药学院，湖北武汉 430073）

（3. 国立台湾大学工学院，台湾台北 10671）（4. 中山大学附属第三医院营养科，广东广州 510640）

摘要：环介导恒温核酸扩增法（loop-mediated isothermal amplification of DNA，简称 LAMP）是一种新型的核酸扩增方法，可以针对靶基因的目标区域形成多种片段的扩增产物。目前对于 LAMP 产物的检测主要有沉淀法，荧光法和电泳法。与 PCR 相比，LAMP 不需要模板的热变性、长时间的温度循环、繁琐的电泳等，其扩增与检测过程可以实现一步完成。因此 LAMP 技术具有快速、简单、高特异性、高灵敏度和成本低廉的优点。随着 LAMP 技术的不断完善，在可预见的将来，其将在核酸扩增领域逐渐取代 PCR 反应，推动检测技术向更快捷简便、更精确廉价的方向发展。目前 LAMP 技术已应用于致病微生物和胚胎性别鉴定等检测，其中致病微生物包括致病细菌、真菌、病毒及寄生虫等。该检测技术在食品安全、临床医疗及水产等主要领域也受到广泛应用。本文主要介绍 LAMP 反应的特点及其在细菌、病毒、寄生虫和水产动物病原微生物快速检测领域中的应用。

关键词：环介导恒温核酸扩增法；核酸扩增；快速检测

文章篇号：1673-9078(2014)6-301-307

Application of Loop-mediated Isothermal Amplification on Pathogens Rapid Detection

LI Lin[1], ZHOU Rong[1], LI Bing[1], ZHAO Xi-hong[2,3], BIAN Hua-wei[4]

(1.School of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2.School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430073, China)

(3.College of Engineering, National Taiwan University, Taibei 10671, China)

(4.The Third Hospital Attached to Sun Yat-sen University, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a novel nucleic acid amplification method with many fragment amplification products according to specific region of target genes. Currently, precipitation, electrophoresis and fluorescence are the main methods to detect amplification products. Compared with PCR, amplification and detection process can be achieved in one step without template thermal denaturation, long time cycle and complex electrophoresis. Therefore, LAMP has been reported and applied in the field of bacteriological detection with advantages of rapid, easy operating, low-cost, highly sensitive and specific detection. In future, it is convinced that LAMP will replace PCR assays, contributing to more rapid, simple, specific and accurate detection method. Nowadays, LAMP has been applied on detection of various pathogenic microbes and embryo sexing, and the microbes include pathogenic bacterial, fungi, virus and parasites. This detection has been employed in different fields, such as food safety, clinical medicine and fishery. This paper described the features of LAMP and its application on rapid detection of bacterial, viruses, parasites and aquatic animal pathogens.

Key words: loop-mediated isothermal amplification; nucleic acid amplification; rapid detection

收稿日期：2014-01-07

基金项目：国家“973”计划项目（2012CB720800）；国家自然科学基金青年基金项目（31201362）

作者简介：李琳（1963-），男，教授，博士生导师，主要研究方向为食品与生物化工，糖类药物制备及天然产物分离纯化等

通讯作者：李冰（1972-），女，教授，博士生导师，主要研究方向为食源性微生物耐药性与毒性的快速检测与鉴定等；卞华伟（1972-），女，副主任医师，主要研究方向是病原微生物的快速检测与鉴定

核酸扩增是生命科学领域最具价值的工具之一，在临床微生物检测、传染性疾病以及基因诊断方面具有独特的应用价值。传统的检测方法如常规培养、血清学和免疫学方法等，均存在一定的局限性，如耗时较长、需要配套的仪器设备、无法解析基因层面的疾病。因此基于核酸扩增的检测方法具有广阔的应用前景，主要方法包括核酸序列扩增法（Nucleic Acid Sequence-Based Amplification，NASBA）、自列复制（Self-sustained Sequence Replication，3SR）、链置换扩增法（Strand Displacement Amplification，SDA）、聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction，PCR）以及荧光定量 PCR 等。其中 PCR 方法在近年来已广泛应用于病原微生物及其毒性、耐药性与基因指纹图谱的分析，是目前应用最广泛的核酸扩增技术[1~4]。但是上述的各种核酸扩增方法均在简易性、灵敏度、特异性、快速性等方面存在或多或少的缺陷。因此，开发一种简易快捷，特异灵敏的核酸扩增检测方法成为当务之急。

2000 年，Notomi 等开发出一种新型核酸扩增方法-环介导恒温核酸扩增法（Loop-mediated Isothermal Amplification of DNA，简称 LAMP）[5]。该方法针对靶基因的目标区域设计 4/6 条特异性引物，利用具有链置换活性的 *Bst* DNA 聚合酶，在恒温条件下完成扩增反应。扩增结果只有 2 种：是与否。LAMP 技术的主要流程为：选择靶基因作为检测对象—合适的保守扩增区域—设计引物及筛选-LAMP 反应的建立及优化-LAMP 反应的实际应用。

LAMP 技术具有快速、高效、特异性强、灵敏度高和产物易检测等优点。随着 LAMP 技术的不断完善，相比 PCR，在简便、快速、灵敏度和特异性方面均具有优势，已被广泛应用于生物安全、疾病诊断、食品分析及环境监测等领域。目前 LAMP 已经实现细菌、病毒、寄生虫和水产方面的快速检测，尤其在病毒病的快速检测方面发展迅速，可对多种病毒进行检测和鉴定，成为最有发展前景的快速诊断手段。

1 LAMP 技术的特点

LAMP 技术是一种新型的核酸扩增技术。与传统的核酸扩增技术相比，LAMP 的主要特点是：

特异性强：LAMP 利用 2 对引物与靶序列（300 bp 以内）上的 6 个特异性部位准确结合发生扩增反应，6 个区域中任何区域与引物不匹配均不能进行核酸扩增。LAMP 扩增结果只是是与否，与 PCR 相比具有更高的特异性。

检测速度快：LAMP 是恒温扩增反应，不需要预先的双链 DNA 热变性，省去了 PCR 反应中的退火、复性过程，避免了温度循环而造成的时间损失，满足临床样本快速检测的需要。基本反应可在 60~90 min 内可完成并检测到扩增产物，当加入环引物加速反应后，则能在 30~45 min 内完成反应。

扩增效率高：LAMP 反应是通过链取代并形成不同环结构进行大量扩增，能使靶基因序列在反应时间内不停地进行指数级扩增，其扩增产物拷贝数可达到 10^9~10^{10} 个，浓度可达 0.5 mg/mL，比常规 PCR 高 10^3~10^4 倍

灵敏度高：约 10~100 fg 的 DNA 模板就能进行 LAMP 反应，其检出限仅为几个拷贝。灵敏度是常规 PCR 的 10~100 倍。

设备简单：由于 LAMP 反应是恒温的扩增过程，因此只需要一个简单的恒温设备，如水浴锅或恒温仪，不需要购置昂贵的 PCR 仪，易于在基层单位推广应用。

操作简便：LAMP 的操作步骤较为简便，其加样过程与 PCR 基本相同，唯一的区别在于 *Bst* DNA 聚合酶的加样顺序，因为 *Bst* DNA 聚合酶是一种不耐热的 DNA 聚合酶，因此必须在模板预变性以后再加样；但由于反应温度恒定，反应后通过判断颜色变化而无需电泳，因此比 PCR 简便。

产物易检测：根据 LAMP 反应的特性，可对其产物进行简便的分析与判断。检测方法有沉淀法、荧光法和沉淀法，其中最主要的方法是荧光法。

沉淀法：由于 LAMP 反应过程中产生大量的焦磷酸镁沉淀，可根据反应体系中是否形成白色沉淀来定性判断 LAMP 结果，但是沉淀结果并不明显，此种方法并不考虑采用。

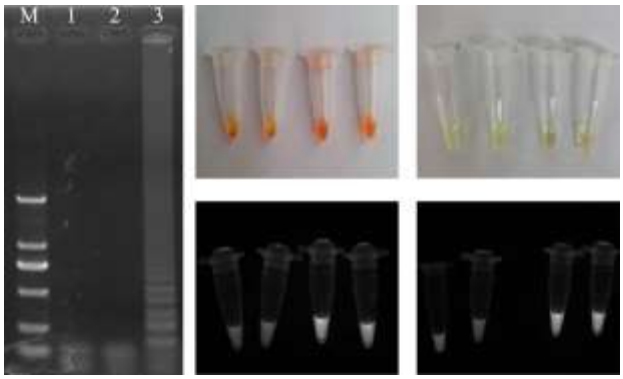

图 1 扩增产物电泳和染色后呈色结果

Fig.1 Results of amplification products electrophoresis and dyeing

荧光法：通过荧光染料的颜色变化来定性判断靶序列扩增与否。常用的荧光染料为 SYBR Green Ⅰ和 Calcein。SYBR Green Ⅰ、Calcein 染色后阳性结果为

绿色，阴性结果为橙色；在紫外灯下阳性结果产生荧光，阴性则无荧光。见图 1。

电泳法：LAMP 反应过程中产生多种片段的扩增产物，其在电泳中会形成特异性的梯状条带，这是与 PCR 的不同，见图 1。但是由于扩增产物量很大，易形成气溶胶造成污染形成假阳性结果，所以一般不建议采用电泳方法判断扩增与否。

可对反应定量：通过实时浊度计对 LAMP 反应过程中由焦磷酸镁沉淀产生的浊度进行检测，根据浊度的变化实现定量检测。

2 LAMP 技术在快速检测领域中的应用

2.1 在细菌快速检测中的应用

致病细菌的快速检测一直是食品安全与临床公共卫生领域中的研究热点。王敏雅等在用 LAMP 检测沙门菌 *invA* 基因中发现，28 种不同血清型的沙门菌 LAMP 检测结果都呈阳性，血清模拟试验与菌株直接 DNA 提取 LAMP 检测结果一致[6]。Hara-Kudo 等建立了沙门氏菌的 LAMP 检测体系，检测灵敏度达到了 2.2 CFU/管，对鸡蛋中沙门氏菌的模拟实际检测灵敏度达到了 2.8 CFU/管[7]。Zhao 等通过快速模板处理过程，加入环引物进行加速以及简化结果判断过程等对 LAMP 检测沙门氏菌的方法进行改进，使整个过程（从模板提取至结果判断）的耗时缩短为约 60 min，但灵敏度仍能达到 1 pg DNA/管及 100 CFU/反应；而该方法在对 214 株食源性沙门氏菌的应用检测中，灵敏度达 97.7%（209/214），而 PCR 则仅为 91.6%（196/214）[8]。Seki 等建立了肺炎链球菌（*Streptococcus pneumoniae*）的 LAMP 检测体系，其灵敏度比常规 PCR 方法高 1000 倍[9]。Minami 等应用 LAMP 技术对幽门螺旋杆菌（*Helicobacter pylori*）进行了检测，不仅克服了胃黏膜活组织检测假阴性率高和活组织检测后大量出血的问题，而且大大提高了检测的效率[10]。新生婴儿百日咳是一种婴儿期早发症，Nakamura 等建立了百日咳博德特氏菌(*Bordetella pertussis*)的 LAMP 检测体系，可将其用于新生婴儿百日咳的快速诊断，为疾病的确诊提供了一种可靠手段[11]。刘全英等采用 LAMP 反应扩增 *E.Coli* O157 特异性基因，并与 PCR 方法进行比较，*E.Coli* O157 的 DNA 经 10^1~10^8 倍梯度稀释，PCR 法难以检测 10^5 倍稀释以上的产物，而 LAMP 法可较好地稀释倍数达 10^8 的产物，表明建立的 LAMP 方法比 PCR 方法要灵敏很多[12]。Zhao 等设计针对大肠埃希菌 *E.Coli O157:H7* 特异性基因 *rfbE* 及毒素基因 *stx1* 和 *stx2* 的特异性引物，同时对 *E.Coli O157:H7* 携带的毒素因子进行快速检测。整个过程（从模板提取至结果判断）耗时约 60 min，相比其他核酸扩增方法，耗时大为缩短，但灵敏度仍能达到 10~100 fg DNA/管；而该方法在对 417 株食源性 *E.Coli* O157 的应用检测中，灵敏度可以达到 100%，95.3%和 96.3%，体现了较强的稳定性及实用性[13]。Maruyama 等将 LAMP 和原位杂交结合，用于检测携带 *stx2* 基因的 *E.Coli* O157:H7，克服了原位 PCR 由于高浓度背景造成的扩增产物泄露从而结果容易得到假阳性和假阴性的缺点，而原位 LAMP 能在相对较低的温度下进行恒温反应，可减少对细胞的破坏，有利于应用荧光抗体进行同步细胞鉴定，并且其产物结构的特殊性防止了产物泄露到细胞外[14]。Zhao 等对铜绿假单胞菌种特异基因 *oprI* 设计引物并建立 LAMP 快速检测体系，整个过程耗时约 60 min，但灵敏度仍能达到 100 fg DNA/管及 10 CFU/反应；而该方法在对 426 个临床样品的应用检测中，灵敏度达 97.6%（246/252），而 PCR 则仅为 90.5%（228/252）[15]。Han 等用 LAMP 技术进行牡蛎弧菌病原体的快速检测，针对弧菌溶血素基因（*vvhA*），设计 4 条特异性引物进行 LAMP 扩增，优化反应最佳反应时间为 60 min，反应温度为 63 ℃。对包括多种弧菌属和其他细菌属的 50 株菌进行 LAMP 扩增，均无假阳性或假阴性结果发现。检测结果比常规的 PCR 敏感 10 倍[16]。徐芊等发现采用 LAMP 检测副溶血弧菌的最佳反应温度是 60 ℃，反应时间是 60 min，在特异性试验中有 14 株副溶血弧菌出现 LAMP 特有的条带，其他 14 株没有出现阶梯状条带，说明 LAMP 检测反映的特异性强[17]。副溶血弧菌基因组 DNA 和纯培养物的检测灵敏度分别约为 90 fg DNA/管和 24 CFU/mL。Zhao 等以 *tlh*，*tdh* 和 *trh* 为靶点分别设计特异性引物对副溶血弧菌及其毒素基因进行快速检测，整个过程（从模板提取至结果判断）耗时约 60 min，但灵敏度仍能达到 100 fg~1 pg DNA/管；而该方法在对 368 株食源性的副溶血弧菌的应用检测中，灵敏度分别为 100%、95.6%和 96.4%[18]。

2.2 在病毒快速检测检测中的应用

目前，检测和诊断病毒性疾病的传统方法有病毒中和试验、酶联免疫吸附试验、免疫荧光抗体试验、免疫荧光电子显微镜技术及PCR方法等，这些方法曾在病原体的检测和疾病的诊断及研究中发挥了巨大作用，但普遍存在的问题是需时长、操作复杂、不利于现场检测等。LAMP技术在病毒的快速检测方面发展迅速，可对多种病毒进行检测和鉴定，已经发展成为最有发展前景的快速诊断手段。

在对DNA病毒的检测中，Iwata等用LAMP检测人Epstein-Barr病毒（EBV），敏感性为86.4%，特异性为100%；而实时PCR法的敏感性和特异性分别为84.1%和98.4%[19]。Suzuki等建立了LAMP检测巨细胞病毒（CMV）DNA的方法，当每管DNA拷贝数为500时，其敏感性、特异性、阳性率、阴性率分别为80.0%、98.9%、66.7%和99.4%[20]。在对RNA病毒的检测方面，应用反转录PCR（RT-PCR）诊断RNA病毒已经被广泛的应用，然而RT-PCR检测成本较高，由于每一个样本都要经过反转录，反应时间较长，反应效率较低。在国际上，随着LAMP技术的发展，反转录LAMP（RT-LAMP）已经被用来检测一些RNA病毒。狂犬病病毒（CDV）是一种RNA弹状病毒，狂犬病的临床症状和呼吸、肠道疾病很类似，临床诊断狂犬病很困难。Cho等采用RT-LAMP方法检测狗血液标本中CDV RNA的NP基因,CDV RT-LAMP的灵敏度是RT-PCR的100倍，最低可检测到浓度为10^{-1}TCID/50 mL的样本，可迅速判断是否患病[21]。Hosaka针对人类免疫缺陷综合症病毒-1（HIV-1）的pol-integrase基因建立了RT-LAMP检测方法，整个反应可在35min内即可完成，检测灵敏度达到了120 copies/mL[22]。Hong等用LAMP方法检测严重急性呼吸综合征（SARS）病毒，与传统RT-PCR方法相比，敏感性高100倍，能检测出0.01 PFU的病毒，其敏感性和特异性分别是RT-PCR法的100%和87%，可在60 min内获得结果，最短为11 min[23]。Poon等建立了禽流感病毒（AIV）H1-H3的LAMP检测方法，结果显示该方法灵敏度比常规PCR高，可以通过肉眼观察反应所生成的白色沉淀物来快速鉴定结果[24]。Imai等利用RT-LAMP技术建立了针对H5亚型的高致病性AIV检测方法，可以在15个血凝素亚型HA中检测出H5亚型，具有很高的特异性，且敏感性比RT-PCR高100倍，对高致病性禽流感的病原监测具有很高的实用价值[25]。Fukuta等建立了检测感染菊花的番茄点状枯萎病毒的RT-LAMP方法，并对其建立的方法进行评价，结果显示RT-LAMP的敏感性比RT-PCR高100倍[26]。Shiro等用免疫捕获RT-PCR对番茄斑点枯萎病进行检测，得到了与Fukuta同样的结果，可以通过观察反应管的浊度直接判定结果，大大简化了结果的判定程序[26~27]。

2.3 在寄生虫快速检测中的应用

Iseki等用LAMP技术针对牛巴贝虫和双芽巴贝虫的棒状体蛋白21基因设计了两套引物，并设计了酶切位点，两条引物完成了各自的扩增，并且通过后来的酶切予以区分，从而建立了多重LAMP检测方法，其敏感性分别为传统方法的10^3和10^5倍[28]。Sotiriadou等[29]根据*B1*和*TgOWP*基因建立了检测水中弓形虫的LAMP方法；用LAMP与巢式PCR同时检测26个水样，LAMP的检出率为100%而巢式PCR为53.8%。另用52个来自不同地区的自然水样来比较LAMP、PCR和免疫荧光试验3种检测方法，结果弓形虫检出率结果分别为48%、13.5%、全阴性。实验结果表明，LAMP能够快速、特异且敏感地检测水样中弓形虫的污染。杨秋林等[30]用LAMP技术检测弓形虫，将弓形虫速殖子经倍比稀释为（2~3）×10^6个/mL至（2~3）×10^{-1}个/mL等8个浓度后进行LAMP反应，结果显示，弓形虫的LAMP产物经电泳后呈LAMP特征性梯状条带，对照组均无扩增产物，且可检测到的弓形虫速殖子最低浓度为2~3个/mL，LAMP技术在弓形虫检测中显示出较好的特异性与敏感性，被用于检测恶性疟原虫。随后将原虫血症为1.5%的恶性疟原虫血样用正常人血按1:10倍比稀释为1.5×10^{-3}、1.5×10^{-4}、1.5×10^{-5}、1.5×10^{-6}、1.5×10^{-7}、1.5×10^{-8} 6个浓度后进行LAMP反应，检测其敏感性，恶性疟原虫LAMP产物经电泳后呈LAMP特征性梯状条带，对照组均无扩增产物，其敏感度为1.5个疟原虫/10^7 RBC，建立了检测恶性疟原虫特异、敏感和简便的LAMP方法[31]。之后该课题组以LAMP检测日本血吸虫尾蚴，结果尾蚴LAMP产物电泳后呈LAMP特征性梯状条带，对照组无扩增产物，LAMP可检测到尾蚴的最低数量为1条[32]。杨帆等建立了骆驼伊氏锥虫的LAMP检测方法，与血液涂片检测法对比，发现检出阳性率分别为35.71%和14.29%。LAMP明显敏感于血液涂片检测法[33]。

2.4 在水产动物病原微生物快速检测中的应用

水产动物病原细菌以及病毒的快速检测一般采用酶联免疫吸附试验（ELISA）、PCR技术、单克隆抗体技术、核酸杂交技术等。目前已有用LAMP法检测水产动物和水产养殖环境中病原菌的报道。

对于水产品病原细菌的检测上，Maruyama 等在2003 年首次采用 LAMP 方法快速检测海岸环境中的大肠杆菌，取得了理想的结果[34]。Savan 等在 2004 年首次用 LAMP 法检测水产动物病原菌中的迟钝爱德华氏菌（*Edwardsiella tarda*），根据迟钝爱德华氏菌的溶血素（haemolysin）基因序列设计四条引物，扩增出迟钝爱德华氏菌的种属特异性基因，并在应用中成功地从日本鳗鲡（*Anguilla japonica*）等 4 种水产动物和养殖水体中检测出分离的 5 株迟钝爱德华氏菌，而该方法对非迟钝爱德华氏菌病原菌则没有产生特异性扩增，从而证明 LAMP 法检测迟钝爱德华氏菌具有很强的特异性[35]。由爱德华菌引起的鲶鱼肠败血病是阻碍鲶鱼养殖业发展的主要致病菌，多种分子生物学方法

都用来检测过这些病原菌，比如巢式-PCR，虽然特异性和敏感性比较高，但是用时至少在 4~8 h。Yeh 等针对爱德华菌的特异性基因 *eip18* 进行 LAMP 反应，65 ℃反应 60 min 即完成扩增过程，检测水平为 20 CFU/反应[36]。Kono 等用 LAMP 方法检测污染虾类的白斑综合征病毒，并且与巢式-PCR 检测方法进行比较；结果表明，LAMP 方法的检测极限是 1 fg DNA/管，而巢式-PCR 的检测极限是 10 fg DNA/管。另外由于不相干的 DNA 存在不会影响 LAMP 反应，所以同时从受感染的小虾的头部、心脏、脑部、淋巴组织提取 DNA 进行靶基因扩增，对于检测存在于不同组织中且轻微感染的白斑综合征病毒非常有效[37]。

对于水产品病原DNA病毒的检测上，Sun等采用LAMP法检测了南美蓝对虾（*Penaeus stylirostris*）传染性皮下及造血组织坏死病毒（Infectious Hypodermal And Hematopoietic Necrosis Virus，IHHNV），反应条件为64 ℃反应60 min。反应产物可以通过琼脂糖电泳检测，也可以根据反应产物的浊度SYBR Green Ⅰ染色后肉眼观察，LAMP法检测结果的灵敏度比PCR法高100倍[38]。Mekata等采用RT-LAMP法检测了黄头病毒（Yellow Head Virus，YHV），反应条件优化为65 ℃反应 60 min，可以从被感染的斑节对虾（*Penaeus monodon*）的鳃和心脏中快速灵敏的检测出黄头病毒，并且同时检测健康的虾、桃拉综合征病毒（Taura Syndrome Virus，TSV）、白斑综合征病毒（WSSV），均没有产生特异性扩增，证明了此法检测YHV具有很强的特异性[39]。Pillaid等采用RT-LAMP方法检测了引起罗氏沼虾（Macrobrachium rosenbergii）白尾病的诺达病毒（Macrobrachium rosenbergii Nodavirus, MrNV）和小病毒颗粒（Extra Small Virus，XSV），比较了RT-LAMP，增加了环引物的RT-LAMP和RT-PCR检测的灵敏度，结果发现RT-LAMP比PCR灵敏10倍，而增加了环引物的RT-LAMP比RT-PCR灵敏10000倍[40]。

3 结语

PCR、多重 PCR 以及荧光定量 PCR 等方法仍然广泛应用于临床、食品等领域各种微生物及其特性的检测和分析[41~43]；相比较，LAMP 的特异性和灵敏度更高，同时简便快捷且成本低廉。本实验室曾用常规 PCR、多重 PCR 与 LAMP 对金黄色葡萄球菌及其耐药性进行检测，结果显示 LAMP 方法在特异性、灵敏度、简便性等方面均具有显著优势[44~46]。但是，由于 LAMP 反应扩增量极大，能达到 109~1010 拷贝，极易形成气溶胶，造成假阳性污染。目前解决该问题的方法只要为不开盖或者假如封闭剂，因此亟需一种从根本上解决该问题的方法。自 LAMP 建立以来，在食品安全、公共卫生等领域中对常见食源性中毒细菌、流行性病毒、基因诊断等多个方面得到广泛应用，在可预见的将来，LAMP 技术将在核酸扩增领域逐渐取代 PCR 反应，推动检测技术向更快捷简便，更精确廉价的方向发展。

参考文献

[1] XU Z, SHI L, ZHANG C, et al. Nosocomial infection caused by class 1 integron-carrying *Staphylococcus* aureus in a hospital in South China [J]. Clin. Microbiol. Infect., 2007, 13: 980-984

[2] XU Z, SHI L, Alam M, et al. Integron-bearing methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in South China, 2001-2004 [J]. FEMS Microbiol. Lett., 2008, 278: 223-230

[3] XU Z, LI L, Alam M, et al. First confirmation of integron-bearing methicillin-resistant Staphylococcus aureus [J]. Curr. Microbiol., 2008, 57: 264-268

[4] XU Z, LI L, Shirtliff M, et al. Occurrence and characteristics of class 1 and 2 integrons in *Pseudomonas* aeruginosa isolates from patients in Southern China. J Clin Microbiol, 2009, 47: 230-234

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

[6] 王敏雅,徐明汉,潘宏伟,等.沙门菌 invA 基因 LAMP 快速检测法的建立和初步应用[J].中国卫生检验杂志,2008, 18(10):1791-1793
WANG Min-ya, XU Ming-han, PAN Hong-wei, et al. Establishment and preliminary application of LAMP invA gene assay for rapid detection of Salmonella [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2008, 18(10): 1791-1793

[7] Hara-Kudo Y, Yoshino M, Kojima T, Et Al. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of Salmonella [J]. FEMS Microbiol Letter, 2005, 253(1): 155-161

[8] ZHAO X, WANG L, CHU J, et al. Development and application of a rapid and simple loop-mediated isothermal amplification method for food-borne Salmonella detection [J]. F. Sci. Biotechnol., 2010, 19(6): 1655-1659

[9] Seki M, Yamashita Y, Torigoe H, et al. Loop-mediated isothermal amplification method targeting the lytA gene

for detection of Streptococcus pneumoniae [J]. J. Clin. Microbiol., 2005, 43(4): 1581-1586

[10] Minami M, Ohta M, Ohkura T, et al. Use of a combination of brushing technique and the loop-mediated isothermal amplification method as a novel, rapid, and safe system for detection of Helicobacter pylori [J]. J. Clin. Microbiol., 2006, 44(11): 4032-4037

[11] Nakamura A, Sakano T, Nakayama T, et al. Neonatal pertussis presenting as acute bronchiolitis: direct detection of the Bordetella pertussis genome using loop-mediated isothermal amplification [J]. E. J. Pediat., 2009, 168(3): 347-349

[12] 刘全英,李延武,高霞.环介导恒温扩增技术快速检测大肠杆菌 O157 特异基因的建立[J]. World Health Digest, 2007,4(7):59-61
LIU Quan-ying, LI Yan-wei, GAO Xia. The establishment of Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the detection of specific gene from Bacterium coli [J]. World Health Digest, 2007, 4(7): 59-61

[13] ZHAO X, LI Y, WANG L, et al. Development and application of a loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection *Escherichia coli O157* strains from food samples [J]. Mol. Biol. Rep., 2010, 37: 2183-2188

[14] Maruyama F, Kenzaka T, Yamaguchi N, et al. Detection of bacteria carrying the stx2 gene by in situ loop-mediated isothermal amplification [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2003, 69(8): 5023-5028

[15] ZHAO X, WANG L, LI Y, et al. Development and application of a loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection of *Pseudomonas* aeruginosa strains [J]. World J. Microbiol. Biotechnol., 2012, 27(1): 181-184

[16] HAN F, GE B. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for detecting Vibrio vulnificus in raw oysters [J]. F. Path. Dis., 2008, 5(3): 311-320

[17] 徐芊,孙晓红,赵勇,等.副溶血弧菌 LAMP 检测方法的建立[J].中国生物工程杂志,2007,27(12):66-72
XU Qian, SUN Xiao-hong, ZHAO Yong, et al. The establishment of Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the detection of Vibrioparahaem olyticus [J]. China Biotechnology, 2007, 27(12): 66-72

[18] ZHAO X, LI Y, CHU J, et al. Development and application of a rapid and simple loop-mediated isothermal amplification method for food-borne Salmonella detection [J]. F. Sci. Biotechnol., 2010, 19(5): 1191-1197

[19] Iwata S, Shibata J, Kawada S, et al. Rapid detection of *Epstein-Barr* virus DNA by loop-mediated isothermal amplification method [J]. J. Clin. Virol., 2006, 37: 128-133

[20] Suzuki R, Yoshikawa T, Ihira M, et al. Development of the loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of cytomegalovirus DNA [J]. J. Virol. Methods, 2006, 132: 216-221

[21] Cho H, Park N. Detection of canine distemper virus in blood samples by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification [J]. J. Vet. Med. B. Infect Dis. Vet. Public Health, 2005, 52(9): 410-413

[22] Hosaka N, Ndembi N, Ishizaki A, et al. Rapid detection of human immunodeficiency virus type Ⅰ group M by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay [J]. J. Virol. Met., 2009, 157(2): 195-199

[23] HONG T, MAI Q, CUONG D, et a1. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus [J]. Clin. Mierobiol., 2004, 4: 1956-1961

[24] Poon L, Leung C, Chan K, et al. Detection of human influenza A viruses by loop-mediated isothermal amplification [J]. J. Clin. Microbiol., 2005, 43(1): 427-430

[25] 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): 6679-6682

[26] Fukuta S, Ohishi K, Yoshida K, et al. Development of immune capture reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of tomato spored wilt virus from chrysanthemum [J]. J. Virol Methods, 2004, 21: 49-55

[27] Shiro F, Kazushi O, Keiko Y, et al. Development of immunocapture reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of tomato spotted wilt virus from chrysanthemum [J]. J. Virol Methods, 2004, 121: 49-55

[28] Iseki H, Alhassanl A, Ohta N, et al. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of

bovine Babesia parasites [J]. J. Microbiol. Methods, 2007, 71(3): 281-287

[29] Sotiriadou I, Karanis P. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for detection of Toxoplasma gondii in water samples and comparative findings by polymerase chain reaction and immunofluorescence test (IFT) [J]. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 2008, 62(4): 357-365

[30] 杨秋林,张如胜,伍和平,等.应用环介导等温扩增技术检测弓形虫[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2008,26(4): 304-306
YANG Qiu-lin, ZHANG Ru-sheng, WU He-ping, et al. Detection of toxoplasma gondii DNA by loop-mediated isothermal amplification [J]. Chin. J. Parasitol Parasit Dis., 2008, 26(4): 304-306

[31] 杨秋林,许丽芳,沈元琼,等.环介导等温扩增技术检测恶性疟原虫的研究[J].中国人兽共患病学报,2008,24(11): 1045-1046
YANG Qiu-lin, XU Li-fang, SHEN Yuan-qiong, et al. Detection of plasmodium falciparum DNA by loop-mediated isothermal amplification [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2008, 24(11): 1045-1046

[32] 杨秋林,许丽芳,张愉快,等.环介导等温扩增技术检测日本血吸虫尾蚴的实验研究[J].中国血吸虫病防治杂志,2008,20(3):209-211
YANG Qiu-lin, XU Li-fang, ZHANG Yu-kuai, et al. Detection of schistosoma japonicum cercaria DNA by loop-mediated isothermal amplification [J].Chin. J. Schisto. Control, 2008, 20(3): 209-211

[33] 杨帆,王振宝,王常汉,等.骆驼伊氏锥虫病 LAMP 实验诊断初报[J].中国兽医寄生虫病,2008,16(3):23-25
YANG Fan, WANG Zhen-bao, WANG Chang-han, et al. Lamp for detection of trypanosoma evansi in the camels [J]. Chinese Journal of Veterinary Parasitology, 2008, 16(3): 23-25

[34] Maruyama F, Kenzaka T, Yamaguchi N, et al. Detection of bacteria carrying the stx2 gene by in situ loop-mediated isothermal amplification [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2003, 69(8): 5023-5028

[35] Savan R, Igarashi A, Matsuoka S, et al. Sensitive and rapid detection of Edward siellosis in fish by a loop-mediated isothermal amplification method [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2004, 70(1): 621-624

[36] Yeh H, Shoemaker C, Klesiusl P, et al. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of channel catfish Ictalurus punctatus important bacterial pathogen Edwardsiella ictaluri [J]. J. Microbiol. Methods, 2005, 63: 36-44

[37] Kono T, Savan R, Sakai M, et al.Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification [J]. J. Virol. Methods, 2004, 115: 59-65

[38] SUN Z, HU C, REN C, et al. Sensitive and rap id detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in shrimps by loop-mediated isothermal amplification [J]. J. Virol. Methods, 2006, 131(1): 41-46

[39] Mekata T, Kona T, Savan R, et al. Detection of yellow head virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [J]. J. Virol. Methods, 2006, 135(2): 151-156

[40] Pilla I, Bonam I, Widada J. Rapid detection of Macrobrachium rosenbergii nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV), the pathogenic agents of white tail disease of Macrobrachium rosenbergii (De Man)by loop-mediated isothermal amplification [J]. Journal of Fish Diseases, 2006, 29(5): 275-283

[41] XU Z, LI L, SHIRTLIFF M, et al. First report of class 2 integron in clinical *Enterococcus* faecalis and class 1 integron in Enterococcus faecium in South China [J]. Diag. Microbiol. Infect Dis., 2010, 68: 315-317

[42] XU Z, LI L, SHIRTLIFF M, et al. Resistance class 1 integron in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus* aureus strains in Southern China, 2001-2006 [J]. Clin. Microbiol. Infect, 2011, 17: 714-717

[43] XU Z, LI L, SHI L, et al. Class 1 integron in staphylococci [J]. Mol Biol Rep, 2011, 38: 5261-5279

[44] YOU R, GUI Z, XU Z, et al. Methicillin-resistance *staphylococcus* aureus detection by an improved rapid PCR assay [J]. Afr. J. Microbiol. Res., 2012, 6: 7131-7133

[45] XU Z, LI L, Zhao X, et al. Development and application of a novel multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for rapid detection of various types of staphylococci strains [J]. Afr. J. Microbiol. Res., 2011, 5: 1869-1873

[46] XU Z, LI L, CHU J, et al. Development and application of loop-mediated isothermal amplification assays on rapid detection of various types of staphylococci strains [J]. Food Res. Int., 2012, 47: 166-173