

H7 亚型禽流感病毒实时荧光 RT-LAMP 检测方法的建立及应用*

任素玲^{1,2}, 李萌², 罗静², 王承民², 冯小宇³, 何宏轩^{2,**}

1. 安徽大学生命科学学院, 合肥 230601; 2. 中国科学院动物研究所 国家野生动物疾病研究中心, 北京 100101; 3. 北京市动物疫病预防控制中心, 北京 102600

摘要: 根据 H7 亚型禽流感病毒的血凝素基因中的保守区域设计特异的 LAMP 引物。10 倍倍比稀释试验表明了此方法的高灵敏性, 最低可检测到 100 fg 的 RNA。对 H1、H3、H4、H5、H6、H9 亚型 A 型流感病毒和 NDV 进行 H7-RT-LAMP 检测, 并无交叉反应, 说明了此方法的高特异性。利用 80 份临床样品对所建立的 H7-RT-LAMP 方法进行评价, 鉴定结果和病毒分离方法一致, 说明此方法的可行性。建立的 H7-RT-LAMP 方法简单、快速、灵敏、特异, 是 H7 亚型禽流感病毒的一种高效检测方法, 适合在基层进行 H7 亚型禽流感病毒的早期筛检。

关键词: H7 亚型禽流感病毒; 实时荧光检测; 逆转录环介导等温扩增; 可视化检测

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1000-5684(2014)05-0609-06

DOI: 10.13327/j.jlau.2014.2112

引文格式: 任素玲, 李萌, 罗静, 等. H7 亚型禽流感病毒实时荧光 RT-LAMP 检测方法的建立及应用[J]. 吉林农业大学学报 2014 36(5):609-614.

Real-time Fluorescence Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification for the Detection of H7 Subtype Avian Influenza Virus

REN Su-ling^{1,2}, LI Meng², LUO Jing², WANG Cheng-min², FENG Xiao-yu³, HE Hong-xuan²

1. College of Life Science, Anhui University, Hefei 230601, China; 2. National Research Center for Wildlife Borne Diseases, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 3. Beijing Center for Animal Disease Control and Prevention, Beijing 102600, China

Abstract: The RT-LAMP primers were designed to target the HA gene of H7 subtype of avian influenza viruses. Results of 10-fold dilution series assays showed that analysis of RT-LAMP products by the real-time fluorescence method was highly sensitive, and that the analytic sensitivities of this method was 100 fg. Using a pool of RNAs extracted from influenza viruses corresponding to H1, H3, H4, H5, H6 and H9 HA subtypes and NDV, the RT-LAMP system was confirmed to amplify only H7 AIV RNA. The performance characteristics of the RT-LAMP assay were evaluated with 80 clinical specimens collected from suspected poultry and wild birds, the results of which were consistent with virus isolation and demonstrated the feasibility of the method. Overall, the RT-LAMP assay established in this study is simple, rapid, sensitive and specific, which can be used as a reliable method for early diagnosis of the influenza A (H7N9) virus infection, especially in under-equipped laboratories.

Key words: H7 subtype avian influenza virus; real-time fluorescence detection; RT-LAMP; visual detection

* 基金项目: 北京市农业局试验示范项目(Y12A615104), 现代农业产业技术体系北京市家禽创新团队项目(Y1391391134)

作者简介: 任素玲, 女, 硕士, 研究方向: 禽流感病毒的分子检测。

收稿日期: 2014-04-16

** 通讯作者

禽流感(Avian influenza, AI)是由 A 型流感病毒(Avian influenza virus, AIV)引起的一种禽类传染病^[1-4]。根据表面糖蛋白血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)抗原性的不同,AIV 可被分为 18 个 HA 亚型和 11 个 NA 亚型^[5-6]。由于 AIV 的致病性强弱不同,禽流感病毒可被分为高致病性禽流感病毒、低致病性禽流感病毒和无致病性禽流感病毒,而高致病性禽流感以高发病率和死亡率为特征^[7-8]。其中,由 H7 亚型禽流感病毒引发的禽流感大流行频繁发生。1999—2000 年在意大利爆发的 H7N1 亚型禽流感导致了超过 1 300 万只鸡死亡,对意大利政府造成了巨大的经济损失^[9-10]。2003 年荷兰爆发的 H7N7 亚型禽流感不仅影响了本国禽业的发展,也导致了 89 人感染^[11-12]。而 2013 年 3 月中国出现了全球首例人感染 H7N9 亚型禽流感病毒的案例^[13],疫情随之在大部分省份蔓延。截止到 2014 年 3 月 11 日,已经报道有 375 人感染、超过 100 人死亡,这些充分说明了 H7 亚型禽流感病毒对全球公共健康和家禽业发展造成了极大的威胁。王承民等^[14]研究则发现,此次流行的 H7N9 亚型禽流感病毒和家禽活禽市场关系比较密切。因此快速地检测家禽中 H7 亚型禽流感病毒的存在是至关重要的,可最大化的降低对家禽养殖业和国家经济带来的损失。

截至目前,禽流感病毒的诊断方法主要有病毒学、血清学和分子生物学。病毒分离和血凝抑制试验是检测 AIV 和鉴定其亚型的标准方法,但费时费力,且检测成本较高^[15]。分子生物学方法有逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)、实时定量 PCR^[16],但是这些方法耗时长、操作繁琐,很难应用到众多基层实验室。环介导等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是 2000 年由 Notomi 等^[17]发明的一种核酸扩增技术,它利用了一种具有链置换活性和瀑布式核酸扩增功能的 Bst DNA 聚合酶,在等温条件下利用 2 对引物(外引物 F3、B3 和内引物 FIP、BIP)进行核酸的变性和自动循环的链置换核酸扩增反应,整个反应不需要特殊的仪器设备,仅在水浴中几十分钟就可完成。反应结束后可通过肉眼或在可见光或紫外线下直接观察反应液的颜色变化来判断实验结果^[18]。而在 LAMP 反应体系中加入反转

录酶,通过逆转录环介导等温扩增反应(RT-LAMP)就可以完成对 RNA 的检测。该技术具有简便、快速、灵敏、特异且结果便于观察等优势,十分适合应用在基层和现场,因此已被广泛应用于各种病原微生物的检测^[19-23]。

本研究在基础的逆转录环介导等温扩增方法上进行了优化改良,根据钙黄绿素的实时荧光强度进行反应体系和反应条件的优化,同时用肉眼直接观察反应液颜色变化和琼脂糖凝胶电泳进一步确认试验结果,最终建立了一种简便、快速、灵敏、特异的 H7 亚型禽流感病毒的 RT-LAMP 检测方法,特别适合于在基层进行 H7 亚型禽流感的早期监测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 毒株 H1、H3、H4、H5、H6、H7、H9 亚型 A 型流感病毒和新城疫病毒(NDV)由野生动物疫病研究组实验室分离鉴定并保存。

1.1.2 主要试剂及仪器 Bst DNA 聚合酶(大片段)、AMV 逆转录酶为 New England Biolabs 公司产品,MnCl₂、钙黄绿素(Calcein)、甜菜碱(Betaine)、MgSO₄ 购自 Sigma 公司,dNTP 为 Takara 公司产品,SPF 鸡胚购自北京梅里亚维通公司,高纯总 RNA 快速提取试剂盒为 BioTeke 公司产品,Access RT-PCR System 试剂盒购自 Promega 公司。NanoDrop 2000 超微量分光光度计为美国 Thermo 公司产品,7500 Fast Real-Time PCR System 仪器购自 Applied Biosystems 公司。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取 样品 RNA 抽提参照试剂盒说明书操作,然后测定其浓度,-80℃分装保存备用。

1.2.2 引物的设计与合成 参照 GISAID 数据库中的 H7 亚型禽流感病毒血凝素(HA)基因序列进行 Blast 比对分析,并运用 MEGA 生物学软件分析其保守区域,利用 PrimerExplorer V4 在线软件(<https://primerexplorer.jp>)设计 3 组特异性 LAMP 引物,1 组引物中包含 3 对引物,即外引物 F3、B3,内引物 FIP、BIP 和环引物 LF、LB。引物由北京华大基因合成。通过 3 次重复试验,确定特异性和敏感性最好的 1 组引物,引物序列见表 1。

表1 H7 亚型禽流感病毒 RT-LAMP 引物序列
Table 1. Sequences of H7-RT-LAMP primers

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Sequences 5'-3'
F3	CTATCATACTGGAGGGACAAT
B3	CCTTCCCATCCATTTTCAATG
FIP	TCCTTTGCTTAAACATATCTCGGACAAATAAGTAACTTGCCATTTTCAGA
BIP	GTCTGCTGTAGCAACAGGGAAACCCGCTATAGCACCA
LF	CCAACTGCCCTGCTATCTATGT
LB	AGAATGTTCTGAGATTCCAAAGGG

1.2.3 RT-LAMP 反应体系和反应条件的优化 反应扩增温度按 60、63、65 °C 依次递增,扩增时间设置梯度为 30、45、60 min,反应体系在一定范围内进行优化: MgSO₄ (6.0, 8.0, 10.0 mmol/L)、甜菜碱 (0.5, 0.8, 1.0 mol/L)、dNTPs (1.0, 1.4, 1.6 mmol/L)。多次重复试验后根据扩增效果(依据实时荧光强度高和 1.5% 琼脂糖凝胶电泳条带的亮度和厚度来判断扩增效果)确定最佳反应条件和反应体系。

1.2.4 RT-LAMP 的实时荧光 PCR 方法 用 Applied Biosystems 公司专用的 8 连排反应管试验,反应条件: 采集荧光通道为 cy3 通道,时间反应 30 s,时间信号采集 30 s,如此进行 60 个循环,然后 80 °C 保持 5 min 终止反应。

1.2.5 试验结果判定 反应结束后在实时荧光 PCR 仪器上观察荧光强度变化曲线以判定试验结果,也可在可见光或紫外光下肉眼直接观察反应液的颜色变化进行结果判定,或取 5 μL 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.2.6 RT-PCR 反应 引物序列为 H7-F: 5'-CCCAATGTGAYCAATTCCT-3', H7-R: 5'-GCTCATTGTTCTTATTC-3'。按照试剂盒操作步骤,以提取的 RNA 作为模板,反应程序: 45 °C 反转录 45 min; 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s; 53 °C 退火 1 min; 68 °C 延伸 2 min, 40 个循环; 68 °C 延伸 7 min。反应结束后取扩增产物 5 μL,进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.7 RT-LAMP 方法的特异性试验 利用优化后的 RT-LAMP 反应体系和反应条件,对不同 HA 亚型 AIV 以及 NDV 核酸样品进行检测,检验 RT-LAMP 方法的特异性。

1.2.8 RT-LAMP 方法的灵敏度试验 对制备的阳性 RNA 样品进行浓度测定并制备浓度为 1 ng/μL 的 RNA,然后进行 10 倍倍比稀释依次获得 100、10、1 pg、100、10、1 fg 含量的 RNA,用相同的模板 RNA 进行 RT-LAMP 和 RT-PCR 方法

扩增,RT-LAMP 反应产物直接可视化观察,RT-PCR 扩增产物 1% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.2.9 临床样品检测 应用建立的 H7-RT-LAMP 方法对采集到的 80 份家禽或野鸟的咽拭子或肛拭子进行检测,所有样品同时用经典的鸡胚病毒分离方法和 RT-PCR 方法进行检测,以检验 H7-RT-LAMP 方法的可靠性和实用性。

2 结果与分析

2.1 RT-LAMP 反应体系和反应条件的优化及结果观察

通过观察优化试验中的染料荧光强度和电泳条带亮度以及宽度,优化后的反应体系: MgSO₄ 6 mmol/L, Betaine 0.6 mol/L, Calcein 25 μmol/L, MnCl₂ 0.5 mmol/L, dNTPs 1.4 mmol/L, 10 倍 ThermoPol 缓冲液 2.5 μL, Bst 聚合酶 8 U, AMV 反转录酶 5 U, FIP/BIP 1.6 μmol/L, F3/B3 0.2 μmol/L, LF/LB 0.8 μmol/L, RNA 2 μL, 总体积 25 μL。最适反应温度为 65 °C,最佳反应时间为 60 min。反应结束后,不需打开反应盖,即可直接看见阳性反应颜色由反应前的橙色变为浅绿色(图 1-A),同时反应产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后,阳性产物可出现 LAMP 反应所特有的特征性条带(图 1-B)。

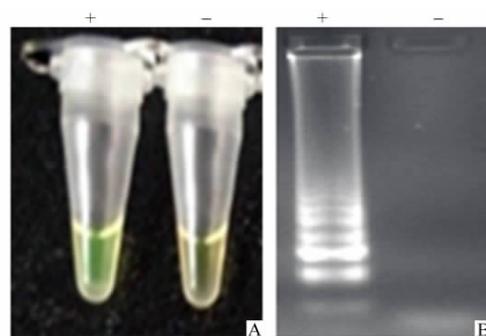


图1 RT-LAMP 反应阳性产物结果
Fig. 1. Positive products of RT-LAMP assay

2.2 特异性试验

由图2(图中 1. H7N9 禽流感病毒; 2~6. H1、H3、H4、H5、H9 亚型流感病毒; 7. 新城疫病毒; 8. 空白对照; A. 荧光染料钙黄绿素颜色变化; B. 实时荧光强度观察 RT-LAMP 反应结果)可见,建立的 H7-RT-LAMP 方法能特异性的检测 H7 亚型 AIV,而对其他亚型 AIV 以及 NDV 样品呈阴性反应。

2.3 灵敏度试验

由图3可见,所建立的 H7-RT-LAMP 方法对 H7N9 亚型禽流感病毒 RNA 的最小检测限为 100 fg,而 RT-PCR 方法最低只能检测到 10 pg,可见 RT-LAMP 的灵敏度是 RT-PCR 的 100 倍。

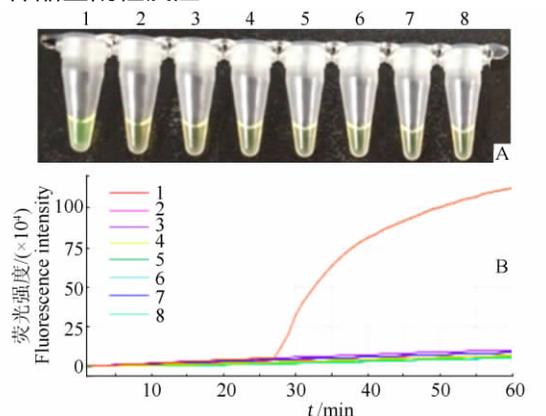
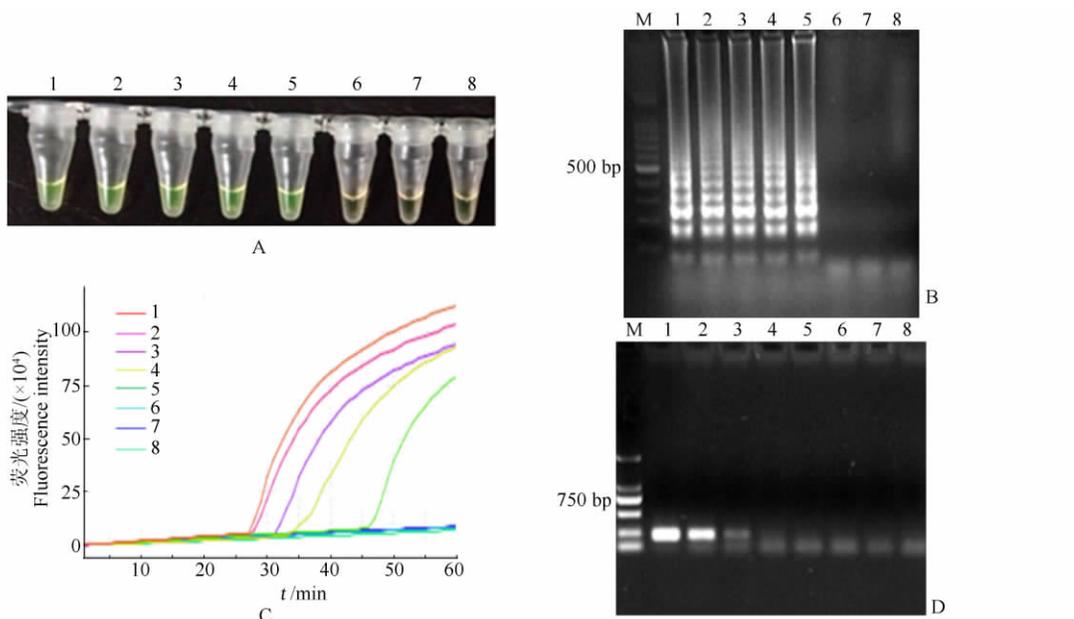


图2 RT-LAMP 特异性检测结果
Fig. 2. Specificity test results of RT-LAMP for H7N9 virus detection



A. RT-LAMP 荧光染料钙黄绿素颜色变化 Products of RT-LAMP assay confirmed by fluorescent metal indicator; B. RT-LAMP 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 Products of RT-LAMP assay confirmed by 1.5% agarose gel electrophoresis; C. RT-LAMP 实时荧光强度图 Products of RT-LAMP assay confirmed by real-time fluorescent intensity change; D. RT-PCR 1% 琼脂糖凝胶电泳 Products of RT-PCR assay confirmed by 1.0% agarose gel electrophoresis

图3 RT-LAMP 反应灵敏度试验结果
Fig. 3. Sensitivity test results of RT-LAMP

2.4 临床样品检测

80 份临床样品用 RT-LAMP 方法检测到 5 份 H7 亚型禽流感病毒, 结果与鸡胚病毒分离检测结果相符, 而常规 RT-PCR 方法则漏检了 1 份阳性样品。

3 讨论

近年来, 禽流感已给人类公共卫生健康和家禽生产造成严峻的挑战^[10 24], 而 2013 年中国发生的人感染 H7N9 禽流感病毒疫情则是近几年来来的典型代表, 已经对中国的公共卫生安全和国家经济造成了重大的损失。由于基因的可变性, 新型禽源 H7N9 病毒是否能引起大流行仍然存在很多不确定性因素, 需要发展一种新的方法来检测该病毒。LAMP 技术是一种新型的核酸扩增技术, 与传统的 PCR 和荧光定量 PCR 相比, 具有简便、快速、灵敏、特异等优点, 而且不需要昂贵的特殊试验设备, 反应结果可不需任何仪器即可直接肉眼观察, 非常适合在设备不完善的基层实验室及现场监测点使用。值得注意的是, LAMP 的特异性基于靶基因保守区域设计的 6 个特异区域的 4 条引物, 还可以加入 1 对环引物来提高反应的特异性和扩增效率^[25]。Alexander Postel 等^[26]研究了 2 种商业逆转录环介导等温扩增 H5 和 H7 亚型禽流感病毒试剂盒的效果, 结果发现反应时间过长虽能增加试验结果的敏感性, 同时却也能减少试验的特异性, 因此反应时间不宜过长, 最多不能超过 1 h。目前, 判断 LAMP 反应结果的方法有很多种, 有肉眼观察浑浊度、染料颜色变化, 还有利用浊度仪实时监控^[27]等。本研究建立的 H7 亚型禽流感病毒的 RT-LAMP 检测方法, 则利用了一种新的 LAMP 反应结果判断方法, 即利用实时荧光定量 PCR 仪进行钙黄绿素荧光强度变化的实时监控, 此方法可以最大化的降低判断阳性结果的错误率, 并结合目视观察反应溶液颜色变化和琼脂糖凝胶电泳的结果判定方法, 从而确保了试验结果的真实可靠性。

在本研究中, 笔者分析了从国内家禽和野鸟体内分离出来的包括 2013 年爆发的 H7N9 亚型禽流感病毒在内的 120 个 H7 亚型禽流感病毒的 HA 基因序列, 根据这些基因的高度保守序列设计了特异性的 H7-RT-LAMP 引物, 用此引物对 H1、H3、H4、H5、H6、H7、H9 亚型禽流感病毒和 NDV 病毒进行 RT-LAMP 检测, 只有 H7 亚型禽流感病毒的试验结果显示了阳性, 说明了本试验

建立的 H7-RT-LAMP 具有高度特异性。很多报道都说明了 RT-LAMP 方法和检测病原最敏感的分生物学方法在灵敏度上的一致性^[28-30], 几种因素可能导致这个事实。如 RT-LAMP 技术受反应体系中盐溶液的影响小, 对抑制剂敏感性低, 而且能够忍受大模板量的抑制影响^[31]。在本研究中, H7-RT-LAMP 试验的检测限为 0.1pg, 和病毒分离的参考标准比较, 其灵敏度、特异性、阳性准确率和阴性率均达到了 100%。

在监控禽流感疫情的措施中, 检测家禽和野鸟体内是否携带禽流感病毒是非常重要的^[32-33], 并且王承民等^[11]报道也证实了 H7N9 亚型禽流感病毒在家禽和野鸟体内是确实存在的, 因此在疫情爆发地点采集了 80 份家禽和野鸟的咽拭子或泄殖腔拭子, 利用它们对所建立的 H7-RT-LAMP 技术进行评价, 同时用病毒分离方法和 RT-PCR 进行 H7 亚型禽流感病毒的检测, 试验结果说明了 H7-RT-LAMP 的敏感性和病毒分离方法相当, 都高于 RT-PCR 方法, 但是其操作流程却比病毒分离方法要简单很多。因此, 本试验建立的 H7-RT-LAMP 技术能够成功地检测临床样品中的 H7 亚型禽流感病毒, 且由于其简便性、灵敏性和特异性, 使得它可以作为一种监测 H7 亚型禽流感疫情的有效工具。

本研究建立的实时荧光检测 H7 亚型 AIV 的 RT-LAMP 检测技术, 不仅可以直接肉眼观察试验结果, 还可以进行琼脂糖凝胶电泳判定, 更可以通过观察钙黄绿素染料荧光强度变化进行结果判定, 这样可以最大化地减少假阳性结果的干扰。通过灵敏度试验和特异性试验, 证明了本方法有很高的灵敏性和特异性, 为 H7 亚型禽流感的检测提供了更加快速高效的技术, 可在设备有限的基层兽医站和养殖场以及禽流感疫情监测点对 H7 亚型禽流感病毒进行快速地早期筛检。

参考文献:

- [1] 甘孟侯. 禽流感 [M]. 北京: 北京农业大学出版社, 2002: 74-78.
- [2] 刘太峰, 赵健乔, 姜吉良, 等. 禽流感疫苗的研究进展 [J]. 经济动物学报, 2014, 18(3): 168-171.
- [3] 赵健乔, 王军政, 胡桂学, 等. 禽流感病毒的分子致病机理及其跨种传播的分子机制研究进展 [J]. 经济动物学报, 2014, 18(3): 178-183.
- [4] 储结园, 王海军, 王春雨, 等. H5N1 亚型禽流感基质蛋白 M1 基因的原核表达和纯化 [J]. 经济动物学报, 2010, 14(1): 26-29.
- [5] Fouchier R A, Munster V, Wallensten A, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16)

- obtained from black headed gulls [J]. *J Virol* 2005 ,79: 2814-2822.
- [6] Webster R G ,Bean W J ,Gorman O T ,et al. Evolution and ecology of influenza A viruses [J]. *Microbiol Rev* ,1992 ,56: 152-179.
- [7] Alexander D J. A review of avian influenza in different bird species [J]. *Vet Microbiol* 2000 ,74(1/2) : 3-13.
- [8] Edwards S. OIE laboratory standards for avian influenza [J]. *Dev Bio* 2006 ,124: 159-162.
- [9] Capua I ,Marangon S ,Pozza M ,et al. Avian influenza in Italy 1997-2001 [J]. *Avian Dis* 2003 ,47: 839-843.
- [10] Capua I ,Alexander D J. Avian influenza: recent developments [J]. *Avian Pathol* ,2004 ,33: 393-404.
- [11] Fouchier R A ,Schneeberger P M ,Rozaendaal F W ,et al. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome [J]. *Proc Natl Acad Sci* 2004 ,101: 1356-1361.
- [12] Koopmans M ,Wilbrink B ,Conyn M G , et al. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands [J]. *Lancet* 2004 ,363: 587-593.
- [13] Gao R ,Cao B , Hu Y , et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus [J]. *N Engl J Med* , 2013 ,368: 1888-1897.
- [14] 王承民 ,王婧 ,罗静 ,等. H7 亚型禽流感病毒与禽类和人类的关系 [J]. *生物化学与生物物理进展* ,2013 ,40(5) : 416-424.
- [15] 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: 6679-6682.
- [16] Ellis J S ,Zambon M C. Molecular diagnosis of influenza [J]. *Rev Med Virol* 2002 ,12: 375-389.
- [17] Notomi T ,Okayama H ,Masubuchi H ,et al. Loop mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res* 2000 , 28(12) : 63-64.
- [18] 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.
- [19] 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 Meth* ,2008 ,151(2) : 264-270.
- [20] Pham H M ,Nakajima C ,Ohashi K ,et al. Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Newcastle disease virus [J]. *J Clin Microbiol* 2005 ,43(4) : 1646-1650.
- [21] Xu J T ,Zhang Z M ,Yin Y B ,et al. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of infectious bursal disease virus [J]. *J Virol Meth* , 2009 ,162: 267-271.
- [22] Hong T C ,Mai Q L ,Cuong D V. 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: 1956-1961.
- [23] Poon L L M ,Leung C S W ,Chan K H ,et al. Detection of human influenza A viruses by loop-mediated isothermal amplification [J]. *J Clin Microbiol* 2005 ,43(1) : 427-430.
- [24] Capua I ,Alexander D J. The challenge of avian influenza to the veterinary community [J]. *Avian Pathol* ,2006 ,35(3) : 189-205.
- [25] Nagamine K ,Hase T ,Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers [J]. *Mol Cell Probes* 2002 ,16: 223-229.
- [26] Alexander P ,Tobias L ,Sieghard F ,et al. Evaluation of two commercial loop-mediated isothermal amplification assays for detection of avian influenza H5 and H7 hemagglutinin genes [J]. *J Vet Diagn Invest* 2010 ,22: 61-66.
- [27] Uemura N ,Makimura K ,Onozaki M ,et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for diagnosing *Pneumocystis pneumonia* [J]. *J Med Microbiol* ,2008 ,57(1) : 50-57.
- [28] Dukes J P ,King D P ,Alexandersen S. Novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of foot-and-mouth disease virus [J]. *Arch Virol* ,2006 ,151: 1093-1106.
- [29] Osman H A ,Eltom K H ,Musa N O ,et al. Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay for detection of Crimean Congo hemorrhagic fever virus in Sudan [J]. *J Virol Methods* 2013 ,190: 4-10.
- [30] Wang C ,Shen X ,Lu J , et al. Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) system for rapid detection of HDV genotype 1 [J]. *Lett Appl Microbiol* 2013 ,56: 229-235.
- [31] 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: 499-501.
- [32] Olsen B ,Munster V J ,Wallensten A ,et al. Global patterns of influenza A virus in wild birds [J]. *Science* 2006 ,312: 384-388.
- [33] Webster R G ,Peiris M ,Chen H , et al. H5N1 outbreaks and enzootic influenza [J]. *Emerg Infect Dis* 2006 ,12: 3-8.

(责任编辑: 林海涛)