

· 论著 ·

交叉引物扩增法对初诊肺结核患者
检测效能的多中心研究

姜晓颖 尹韶华 黄海荣 戴广明 张治国 张立 张丽霞 杨永辉 毛秀君 王瑜玲
白广红 梁焯 黄玉平 邓云 赵延旭 朱敏 龚玉华 陈苏芳 朱帆 谭耀驹
任易 刘玉琴 纪滨英 谭雷 刘文 刘宇红 李亮

【摘要】 目的 评估交叉引物扩增法(cross priming amplification, CPA)对初诊疑似肺结核患者的检测效能及推广价值。方法 选取 2015 年 2—12 月于首都医科大学附属北京胸科医院、北京市昌平区结核病防治所、天津市海河医院等 21 家医疗机构门诊就诊的初诊疑似肺结核患者作为研究对象,共 1020 例。收集研究对象 3 份痰标本,由实验室人员按要求对痰标本进行痰涂片和痰培养[17 家单位使用罗氏固体培养检测 819 例患者,4 家单位只使用 BACTEC MGIT 960 培养(检测 151 例)或其他液体培养(检测 50 例)]和 CPA 检测,评估 CPA 检测效能,并于试验结束后对实验室操作人员进行 CPA 检测技术可接受度问卷调查。结果 现场共纳入肺结核可疑症状的初诊患者 1020 例,涂阳患者 334 例,涂阴患者 685 例,1 例无涂片结果。痰培养阳性率为 45.3%(462/1020),CPA 检测阳性率为 47.6%(485/1019)。以培养法作为参照,CPA 检测结核分枝杆菌的敏感度为 89.8%(415/462),特异度为 87.4%(487/557);在涂阳患者中,CPA 检测结核分枝杆菌的敏感度为 93.8%(289/308),特异度为 34.6%(9/26);在涂阴患者中,CPA 检测结核分枝杆菌的敏感度为 81.8%(126/154),特异度为 90.0%(478/531)。CPA 检测法与固体(液体)培养法一致性较好($Kappa=0.769$)。通过可接受度问卷调查,81.8%(18/22)的操作人员认为 CPA 检测操作比较容易和便捷;相比培养法,所有操作人员均认为 CPA 检测对实验室人员的感染风险较小。结论 CPA 检测方法具有较高的敏感度和特异度,并且与培养法一致性较好,有助于早期、快速发现结核病患者,在我国结核病诊断发现中具有推广应用的前景。

【关键词】 分枝杆菌,结核; 核酸扩增技术; 评价研究; 多中心研究

Multi-center study of cross priming amplification test for pulmonary tuberculosis diagnosis in China JIANG Xiao-ying*, YIN Shao-hua, HUANG Hai-rong, DAI Guang-ming, ZHANG Zhi-guo, ZHANG Li, ZHANG Li-xia, YANG Yong-hui, MAO Xiu-jun, WANG Yu-ling, BAI Guang-hong, LIANG Xuan, HUANG Yu-ping, DENG Yun, ZHAO Yan-xu, ZHU Min, GONG Yu-hua, CHEN Su-fang, ZHU Fan, TAN Yao-ju, REN Yi, LIU Yu-qin, JI Bin-ying, TAN Lei, LIU Wen, LIU Yu-hong, LI Liang. * Beijing Chest Hospital, Capital Medical University & Beijing Tuberculosis and Thoracic Tumor Research Institute & Clinical Center on TB, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 101149, China

Corresponding authors: LIU Yu-hong, Email: liuyuhong0516@126.com; LI Liang, Email: liliang69@hotmail.com

【Abstract】 **Objective** To evaluate the efficiency and reliability of the cross priming amplification (CPA) test for pulmonary tuberculosis (PTB) in China. **Methods** A total of 1020 patients with suspected PTB from Feb. to Dec. 2015 were continuously enrolled from the outpatient departments of 21 medical institutions, such as Beijing Chest Hospital affiliated to Capital Medical University, Changping Tuberculosis Dispensary and Tianjin Haihe Hospital. Three sputum samples were collected from each recruited patient. Detection of *Mycobacterium tuberculosis*

doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2017.07.015

作者单位:101149 首都医科大学附属北京胸科医院 北京市结核病胸部肿瘤研究所 中国疾病预防控制中心结核病防治临床中心(姜晓颖、黄海荣、戴广明、刘宇红、李亮);内蒙古医科大学(尹韶华);北京市昌平区结核病防治所(张治国);天津市海河医院(张立、张丽霞);河北省胸科医院(杨永辉);唐山市第四医院(毛秀君);石家庄市第五医院(王瑜玲);陕西省结核病防治院(白广红);沈阳市胸科医院(梁焯);开封市结核病防治所(黄玉平);山东省胸科医院(邓云);青岛市胸科医院(赵延旭);杭州市红十字会医院(朱敏);镇江市第三人民医院(龚玉华);苏州市第五人民医院(陈苏芳);成都市传染病医院(朱帆);广州市胸科医院(谭耀驹);武汉市肺科医院(任易);黑龙江省传染病防治院(刘玉琴);哈尔滨市胸科医院(纪滨英);四平市结核病医院(谭雷);枣庄市王开结核病防治院(刘文)

通信作者:刘宇红,Email:liuyuhong0516@126.com;李亮,Email:liliang69@hotmail.com

(MTB) by CPA was compared to a reference standard (roche solid culture method in 17 institutions for 819 patients; in the other 4 institutions, BACTEC MGIT 960 culture system for 151 cases and liquid culture system for 50 cases). Satisfaction survey of CPA Test was conducted after CPA test. **Results** Among the recruited 1020 PTB suspects, 334 were smear positive, whereas 685 were smear negative. Culture positive rate was 45.3% (462/1020), while CPA positive rate was 47.6% (485/1019). The results showed that the sensitivity and specificity of the CPA test based on spot sputum for MTB detection were 89.8% (415/462) and 87.4% (487/557). The sensitivity and specificity of the CPA test in smear positive patients were 93.8% (289/308) and 34.6% (9/26), while those in smear negative patients were 81.8% (126/154) and 90.0% (478/531), respectively. The CPA test showed high consistency with solid (liquid) culture method ($Kappa = 0.769$). According to the results of acceptability questionnaire survey, 81.8% (18/22) of the manipulators believed that CPA test was easier and more convenient to operate and had lower infection risk for laboratory staff, compared with culture method. **Conclusion** CPA test had high sensitivity and specificity and also had a good consistency with culture. It'll contribute to find out TB patients early and fast. CPA test has a good prospect for application in China.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Nucleic acid amplification techniques; Evaluation studies; Multicenter study

结核病实验室检查是结核病诊断、治疗方案制定和治疗效果评估的重要依据。目前,结核病实验室诊断国际上最常用的细菌学检查方法是涂片法,但其敏感度和特异度不高^[1]。固体培养是目前结核分枝杆菌检测的金标准,敏感度高,但获得结果需要 2~6 周的时间^[2],不利于及时发现和治疗患者。后来发展了以核酸扩增技术为基础的快速诊断方法,其中很多方法都显示了更高的敏感度和优于传统固体培养的一些优点^[3-4]。准确、快速的诊断方法对于临床管理和感染控制来说非常重要^[4],以基因检测为基础的诊断方法虽然快速、敏感,但仪器、设备和试剂都比较昂贵,一定程度上限制了其推广使用^[5]。发展中国家的结核病防治机构和患者都亟需快速、准确、操作方便、价格适宜、可及性强的结核病快速诊断方法。交叉引物扩增(cross priming amplification, CPA)是一种用于结核病和其他免疫性、传染性等疾病诊断的新型的恒温核酸扩增技术,本研究旨在对其检测效能进行评估。

对象和方法

一、研究对象

1. 样本量估算:假设 CPA 检测在初诊可疑肺结核症状者中敏感度为 80% (基于预实验的估计值),允许误差 5%,则在 $\alpha = 0.05$ 时,需要纳入患者数为: $1.96^2 \times 0.8 \times 0.2 / 0.05^2 \approx 246$ 例;按照各医院初诊患者培阳率为 25% 计算,需要可疑症状者 983 例。为避免污染等原因造成样本损失,增加 3% 的患者,因此,本研究需要至少 1013 例可疑肺结核症状者。

2. 对象选择:选取 2015 年 2—12 月于首都医科大学附属北京胸科医院、北京市昌平区结核病防治

所、天津市海河医院、河北省胸科医院、唐山市第四医院、石家庄市第五医院、陕西省结核病防治院、沈阳市胸科医院、开封市结核病防治所、山东省胸科医院、青岛市胸科医院、杭州市红十字会医院、镇江市第三人民医院、苏州市第五人民医院、成都市传染病医院、广州市胸科医院、武汉市肺科医院、黑龙江省传染病防治院、哈尔滨市胸科医院、四平市结核病医院、枣庄市王开结核病防治院等 21 家医疗机构门诊就诊的初诊疑似肺结核患者作为研究对象,共 1020 例。研究对象中包括男 704 例(69.02%),女 315 例(30.98%),1 例性别未记录;年龄(47.78±18.54)岁。

3. 纳入和排除标准:(1)纳入标准:①具有咳嗽、咯痰>2 周等呼吸道症状,疑似肺结核的初诊患者;②同意留取合格的痰标本并进行检测。(2)排除标准:①随访的结核病患者;②已经使用抗结核药物治疗>2 周的患者。

4. 标本收集及检测:由门诊医生按照项目要求连续纳入初诊可疑肺结核症状者,每例患者留取 3 份合格痰标本。由实验室人员按要求对收集到的痰标本进行痰涂片镜检、固体(液体)培养和 CPA 检测。试验结束后对实验室操作人员进行 CPA 检测技术满意度问卷调查。

二、研究方法

本研究共 21 家单位参与,其中 17 家单位使用罗氏固体培养检测 819 例患者,4 家单位只使用 BACTEC MGIT 960 培养(检测 151 例)或其他液体培养(检测 50 例)。

1. 实验试剂:EasyNAT™ TB 试剂盒(A 盒组分:脱氧核糖核酸提取液、恒温扩增玻璃化试剂管、复溶缓冲液、水、阳性对照、石蜡油;B 盒组分:一次性核酸检测装置、备用液泡),购自杭州优思达生物

技术有限公司。

2. 痰涂片和痰培养检测: (1)符合纳入标准的肺结核可疑患者提供 3 份合格痰液标本; (2)3 份痰标本均进行涂片检查,痰涂片采用直接涂片萋-尼抗酸染色显微镜检查法,或荧光染色应用荧光显微镜检查(包括传统荧光显微镜和 LED 显微镜)^[6]; (3)选取 2 份阳性或阳性级别高的标本,或是在涂片阴性时选取性状较好的痰标本进行罗氏培养。采用简单法罗氏培养基或液体快速培养法,培养阳性的菌株应用对硝基苯甲酸(PNB)培养基法进行结核分枝杆菌复合群和非结核分枝杆菌的鉴定。(4)将 2 份培养后剩余的液化痰液合并,进行 CPA 检测。

3. CPA 检测: (1)痰标本的处理: ①液化: 在痰液中加入 2~3 倍体积的 4% NaOH 溶液,充分混匀,常温下放置 20~30 min,使其充分液化; ②清洗: 冷却后 $>8000 \times g$ 离心 10 min,完全倒尽上清,剩余的少量液体用移液器吸净(不要碰触沉淀物); 用 1 ml 生理盐水悬浮沉淀。同上条件离心洗涤 2 次。(2)DNA 提取: 向含沉淀物的离心管中加入 40 μl 的 DNA 提取液,震荡混匀或移液器吹打混匀(提取液内含不溶于水的物质,需充分混匀后吸取),沸水浴(95~100 $^{\circ}\text{C}$) 10 min,然后冷却至室温; $>8000 \times g$ 离心 >5 min,上清液作为模板备用(应避免将 DNA 提取液中的颗粒物吸出)。(3)模板加样和恒温扩增: 依据样本数量取出玻璃化试剂管。建议每次检测均设置阳性对照和阴性对照; 每管加入 15 μl 复溶缓冲液(含有核酸扩增所需的引物、dNTP、 Mg^{2+} 等物质,同时还含有参与扩增的内参系统,包括人工合成的内参模板和引物),再滴加 20 μl 石蜡油,室温静置 2~3 min 使玻璃化试剂充分溶解; 在一管反应液中加 4 μl 的 ddH₂O 混匀,作为阴性对照; 在其余的反应液中加入模板液或阳性对照(阳性对照为携带结核分枝杆菌特征核酸片段的大肠杆菌质粒,每次检测设置至少 1 管阳性对照和 1 管阴性对照,每个待检样本使用 1 管玻璃化试剂)4 μl ,用移液器吹打充分混匀后盖紧; 将反应管以 $>1000 \times g$ 瞬时离心 3~5 s; 将反应管置恒温仪上,63 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 60 min。(4)快速检测: 将完成扩增的反应管取出,置入一次性防污染检测装置,扣紧,1~2 min 读取结果。(5)结果判定: 先观察检测线(T 线),如果 T 线出现红色,则判定为阳性,即当前样本中有结核分枝杆菌核酸检出; 如果 T 线没有出现红色,而质控线(C 线)出现红色,则判定为阴性,即没有从当前样本中检出结核分枝杆菌核酸; 如果 T 线和 C 线都没有出现红

色,说明检测失败。

4. 问卷评估: 所有评估点实验人员在 CPA 检测现场试验结束后,进行一次 CPA 技术操作体验的问卷调查,内容包括操作人员的基本信息、CPA 试验操作体会、对 CPA 检测的建议和设想。问卷用来评估该技术的易操作性、方便性、安全性、结果可靠性等。

5. 质量控制: 试验开展前对实验室人员进行项目实施和试验操作的培训; 现场实施期间对各评估点提供现场技术支持和培训。使用统一的实验室记录表格记录各种实验检测结果、患者登记号等信息。

6. 生物安全: 结核分枝杆菌痰涂片、培养均在符合生物安全二级的实验室进行。CPA 检测灭活活菌前的操作也在符合生物安全二级的实验室中进行。各项试验操作、实验室废弃物处理需按照有关标准化操作程序和规定进行^[7]。

三、统计学处理

以培养法作为金标准计算 CPA 检测效能。应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,按下列公式计算各方法诊断效能指标: 敏感度 = 真阳性例数 / (真阳性例数 + 假阴性例数) $\times 100\%$; 特异度 = 真阴性例数 / (真阴性例数 + 假阳性例数) $\times 100\%$; 阳性预测值 = 真阳性例数 / (真阳性例数 + 假阳性例数) $\times 100\%$; 阴性预测值 = 真阴性例数 / (真阴性例数 + 假阴性例数) $\times 100\%$ ^[8]。

采用 *Kappa* 分析评价两种检验方法和同一方法两次检测结果的一致性。*Kappa* 值的取值范围介于 -1~1 之间。如 *Kappa* 值 <0 ,说明由机遇所致一致率大于观察一致性; *Kappa* 值为 0,表示观察一致性完全由机遇所致; *Kappa* 值为 -1,说明两结果完全不一致。如 *Kappa* 值 >0 ,说明观察一致性大于因机遇所致一致的程度; *Kappa* 值为 1,说明两结果完全一致。一般认为 *Kappa* 值为在 0.4~0.75 为中、高度一致, *Kappa* 值 ≥ 0.75 为一致性较好, *Kappa* 值 ≤ 0.40 时为一致性较差。不同方法之间检测效能的比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、基本情况

现场实施期间共纳入肺结核可疑症状的初诊患者 1020 例,涂阳患者数 334 例,涂阴患者数 685 例,1 例无涂片结果。痰培养阳性率为 45.3%(462/1020); CPA 检测阳性率为 47.6%(485/1019,1 例标本缺失)。21 家医院实验室涂阳培阴率为 7.8%(26/334),

达到国家要求;培养污染率为 0,非结核分枝杆菌检出率为 5.0%(24/482;482 例做了分型,其余未做分型)。

二、CPA 检测效能评估

以培养法作为参照,对所有研究对象检测中,CPA 检测结核分枝杆菌的敏感度为 89.8%,特异度为 87.4%,阳性预测值为 85.6%,阴性预测值为 91.2%;在涂阳患者中,CPA 检测的敏感度为 93.8%,特异度为 34.6%,阳性预测值为 94.4%,阴性预测值为 32.1%;在涂阴患者中,CPA 检测的敏感度为 81.8%,特异度为 90.0%,阳性预测值为 70.4%,阴性预测值为 94.5%,见表 1。

在对所有研究对象检测中,CPA 检测的阳性率为 47.6%(485/1019),高于固体(液体)培养的阳性率[45.3%(462/1020)],差异有统计学意义($\chi^2 = 604.36, P < 0.05$);CPA 检测法与固体(液体)培养方法一致性检验, $Kappa = 0.769$,一致性较好。在涂阳患者中,CPA 检测的阳性率为 91.6%(306/334),固体(液体)培养阳性率为 92.2%(308/334),差异有统计学意义($\chi^2 = 21.69, P < 0.05$);在涂阴患者中,CPA 检测的阳性率为 26.1%(179/685),高于固体(液体)培养阳性率[22.5%(154/685)],差异有统计学意义($\chi^2 = 319.15, P < 0.05$)。

三、CPA 检测操作者满意度调查结果

共调查 22 个操作者,发放问卷 22 份,全部收回。68.2%(15/22)的操作者认为可以在 1 d 之内达到独立、熟练开展操作;45.5%(10/22)的操作者

认为对于一个完全没有分子生物学检测经验的技术人员,需要培训 1~2 d 就能够达到独立、熟练开展操作。81.8%(18/22)的操作者认为 CPA 技术与传统的细菌学检测(涂片和培养)相比操作更加容易、便捷;95.5%(21/22)的操作者认为其较普通的 PCR 检测方法操作容易和便捷。所有操作者均认为 CPA 技术与传统的细菌学检测比较,生物安全性更好,室内质控的可靠性和可操作性更强。关于 CPA 检测最大的优势,操作者认为在于检测过程时间短[86.4%(19/22)],操作简单[72.7%(16/22)],对操作人员安全[68.2%(15/22)]。

讨 论

早期诊断对于结核病预防控制至关重要。随着分子生物学的发展,出现了很多结核病快速诊断的方法。恒温扩增技术是继 PCR 技术后发展起来的一种新型的核酸扩增技术,目前主要的恒温扩增技术有滚环核酸扩增、环介导等温扩增等。其中的几种恒温扩增技术已经商业化,例如环介导等温扩增(LAMP)技术。LAMP 技术为目前较成熟的结核分枝杆菌分子诊断方法,在结核分枝杆菌检测方面也应用较多。有系统综述研究中表明,LAMP 技术的合并敏感度为 91%,合并特异度为 97%。但 LAMP 技术无论是仪器或是试剂盒都十分昂贵,不适合发展中国家的使用^[9]。本研究中的 CPA 检测的敏感度和特异度都接近了 LAMP 技术^[10],产品价格也相对低廉。

表 1 CPA 检测以培养结果为参照的检测效能

CPA 检测	培养结果(例)			敏感度 (%)	特异度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)
	阳性	阴性	合计				
全部研究对象				89.8	87.4	85.6	91.2
阳性	415	70	485				
阴性	47	487	534				
合计	462	557	1019				
涂阳患者				93.8	34.6	94.4	32.1
阳性	289	17	306				
阴性	19	9	28				
合计	308	26	334				
涂阴患者				81.8	90.0	70.4	94.5
阳性	126	53	179				
阴性	28	478	506				
合计	154	531	685				

CPA 技术是我国科研人员独立开发的一种新的恒温扩增技术,在反应系统和检测方法上都有了很大的改进和创新。主要原理是将痰液或支气管冲洗液等临床标本,经液化处理、离心法提取 DNA 模板,用交叉引物扩增技术在 63 °C 恒温下完成结核分枝杆菌 DNA 的扩增和杂交,然后在密闭的一次性核酸检测装置中用免疫层析乳胶标记试纸条定性检测扩增产物。CPA 试验只需要一台简单的加热器,不需要特殊的仪器,对设备要求非常低;结果判断只需借助肉眼进行,不需要操作者有很高的专业水平;且整个检测过程均在全封闭式核酸检测装置内进行,可避免因交叉污染造成的假阳性反应^[11]。CPA 技术曾应用在细菌和病毒的早期诊断研究中,例如诺如病毒、轮状病毒、肠道腺病毒、星状病毒^[12]、葡萄球菌、家禽腺病毒、转基因生物、大肠杆菌、疟疾、H₁N₁ 病毒^[13-18]的检测中,也曾应用在结核病诊断研究^[19-20]中,均取得了较好的评价结果。本研究应用 CPA 方法的二代产品 EasyNAT™ TB-CPA 不但在初诊涂阳肺结核患者中显示了较好的敏感度、特异度,以及阳性预测值和阴性预测值,同样在涂阴患者中显示了较好的检测效能,与既往文献报道一致^[19-20]。

CPA 方法检测从标本处理到获得检测结果整个操作可以在 4 h 内完成;固体培养试验从痰标本处理接种到结果报告所需平均时间为 40 d,与固体培养相比,CPA 检测明显缩短了结果报告时间。CPA 技术操作不需要昂贵的核酸扩增仪器,安全性好;能单个独立扩增;密闭空间可以减少试验间交叉污染及对实验者的传染;试纸条显示结果比较明确,结果判读简单。同样,目前的 CPA 检测也有其自身的缺点,即功能单一,不能做耐药检测;黏液性痰取样时比较困难;操作中需要反复洗涤离心,核酸提取比较繁琐、自动化程度低,前处理步骤过多且耗时;批量检测慢;结果保存不方便。

目前肺结核病原学诊断以罗氏固体培养和液体培养两种方法作为金标准。但因为结核分枝杆菌生长缓慢,诊断时间较长,目前肺结核的快速诊断在国际上都是一个难题。通过本研究我们可以看到,CPA 方法能够明显缩短患者的诊断时间,具有较高的敏感度、特异度及阳性预测值,有助于早期、快速发现结核病患者,在结核病诊断中具有推广应用的前景。

志谢 感谢为本研究进行实验室操作的所有工作人员!

参 考 文 献

- [1] 朱岩昆,王宇,靳晓伟,等. 交叉引物核酸恒温扩增技术在基层实验室诊断肺结核的应用价值. 中国防痨杂志, 2016, 38(10): 813-817.
- [2] Small PM, Pai M. Tuberculosis diagnosis-time for a game change. N Engl J Med, 2010, 363(11): 1070-1071.
- [3] Pai M, Kalantri S, Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis; part II. Active tuberculosis and drug resistance. Expert Rev Mol Diagn, 2006, 6(3): 423-432.
- [4] Roetzer A, Diel R, Kohl TA, et al. Whole genome sequencing versus traditional genotyping for investigation of a *Mycobacterium tuberculosis* outbreak; a longitudinal molecular epidemiological study. PLoS Med, 2013, 10(2): e1001387.
- [5] 黄曙海,谭慧媚,戴广明,等. LAMP 技术检测结核分枝杆菌试验性研究. 应用预防医学, 2011, 17(1): 1-4.
- [6] 赵雁林,姜广路. 痰涂片镜检标准化操作及质量保证手册. 北京:中国协和医科大学出版社, 2009.
- [7] 赵雁林,逢宇. 结核病实验室检验规程. 北京:人民卫生出版社, 2015.
- [8] 詹思延. 流行病学. 7 版. 北京:人民卫生出版社, 2012.
- [9] 杨睿,王孝友,赵献芝,等. 恒温扩增技术在动物疫病检测中的应用. 中国动物检疫, 2010, 27(2): 45-48.
- [10] 于霞,马异峰,付育红,等. 环介导等温扩增法检测临床标本中结核分枝杆菌的系统评价. 中国防痨杂志, 2014, 36(4): 260-266.
- [11] Xu G, Hu L, Zhong H, et al. Cross priming amplification: mechanism and optimization for isothermal DNA amplification. Sci Rep, 2012, 2: 246.
- [12] Bai Z, Xie H, You Q, et al. Isothermal cross-priming amplification implementation study. Lett Appl Microbiol, 2015, 60(3): 205-209.
- [13] Qiao B, Cui JY, Sun L, et al. Cross-priming amplification targeting the coagulase gene for rapid detection of coagulase-positive Staphylococci. J Appl Microbiol, 2015, 119(1): 188-195.
- [14] Niczyporuk JS, Woźniakowski G, Samorek-Salamonowicz E. Application of cross-priming amplification (CPA) for detection of fowl adenovirus (FAAdV) strains. Arch Virol, 2015, 160(4): 1005-1013.
- [15] Zhang F, Wang L, Fan K, et al. The detection of T-Nos, a genetic element present in GMOs, by cross-priming isothermal amplification with real-time fluorescence. Anal Bioanal Chem, 2014, 406(13): 3069-3078.
- [16] 祁军,詹曦菁,李智慧,等. 交叉引物等温扩增技术在肠出血性大肠杆菌 O157:H7 快速检测中的应用. 口岸卫生控制, 2016, 21(1): 11-16.
- [17] 祁军,于智睿,詹曦菁,等. 交叉引物等温扩增技术在恶性疟疾快速检测中的应用. 中国媒介生物学及控制杂志, 2013, 24(3): 204-207.
- [18] 白志军,胡林,李魁彪,等. 交叉引物恒温扩增法检测甲型 H1N1 流感病毒及临床应用. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(3): 208-211, 215.
- [19] Ou X, Song Y, Zhao B, et al. A multicenter study of cross-priming amplification for tuberculosis diagnosis at peripheral level in China. Tuberculosis (Edinb), 2014, 94(4): 428-433.
- [20] Fang R, Li X, Hu L, et al. Cross-priming amplification for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens. J Clin Microbiol, 2009, 47(3): 845-847.

(收稿日期:2016-12-13)

(本文编辑:李敬文)