(9):1018 – 1026.
[9] Yang XY, Li YP, Mei YW, et all. Time and spatial distribution of multidrug-resistant tuberculosis among Chinese people, 1981 – 2006: a systematic review[J]. Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis, 2010, 14(10): 828 – 837.
[10] Bhatia S, Dranyi T, Rowley D. Tuberculosis among Tibetan refugees in India[J]. Soc Sci Med, 2002, 54(3): 423 – 432.
[11] Truong DH, Hedemark LL, Mickman JK, et al. Tuberculosis among Tibetan immigrants from India and Nepal in Minnesota, 1992 – 1995[J]. JAMA, 1997, 277(9): 735 – 738.
[12] Marras TK, Wilson J, Wang EE, et al. Tuberculosis among Tibetan refugee claimants in Toronto: 1998 to 2000[J]. Chest, 2003, 124(3): 915 – 921.
[13] 李斌, 潘启英. 西藏结核病控制项目工作 13 年效果评价[J]. 中国公共卫生管理, 2009, 25(6): 632 – 634.
[14] 唐金芳, 石健. 现阶段我国麻疹流行特点及应对策略[J]. 疾病监测与控制, 2014, 5(5): 301 – 303.
[15] Zhao SM, Li HC, Lou H, et al. High prevalence of HBV in Tibet, China[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2001, 2(4): 299 – 304.
[16] Shrestha SM, Takeda N, Tsuda F, et al. High prevalence of hepatitis B virus infection amongst Tibetans in Nepal[J]. Trop Gastroenterol Off J Dig Dis Found, 2002, 23(2): 63 – 65.
[17] 韩超群, 郭开瑜. 我国西藏地区乙肝感染者中丁型肝炎感染率调查[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1992, 6(4): 344 – 346.
[18] 骆抗先, 苏振家. 汉藏傣瑶维蒙黎族人群乙型肝炎病毒感染调查[J]. 中华流行病学杂志, 1993, 14(5): 266 – 270.

收稿日期: 2016-01-27　（郭薇编辑　郑新校对）

· 调查报告与分析 ·

贝氏柯克斯体可视化等温扩增法建立*

张琪, 徐睿瑶, 胡梦佳, 李俊, 韩一芳, 吕恒, 秦瑶, 操敏, 张锦海, 王长军

摘　要: 目的　建立针对贝氏柯克斯体的快速可视化环介导等温扩增(LAMP)方法。**方法**　体外合成贝氏柯克斯体的 *IS1111a* 基因, 构建重组质粒。利用在线引物设计软件设计 3 组 LAMP 引物, 用实时浊度仪筛选出最佳引物, 同时对羟基萘酚蓝浓度进行优化, 建立可视化 LAMP 反应体系, 并评价其敏感性和特异性。**结果**　建立的可视化 LAMP 反应可准确检测出贝氏柯克斯体的重组质粒和新桥株, 不与其他立克次体产生交叉反应, 最低可检测到 3.6×10^2 拷贝/反应, 较普通聚合酶链反应(PCR)法的灵敏度提高了一个数量级, 等同于实时浊度法和实时荧光定量 PCR 方法的检测灵敏度。**结论**　建立的可视化 LAMP 方法可敏感、特异地检测出贝氏柯克斯体感染, 操作简单快捷, 适用于基层卫生防疫和疫情现场的病原筛查。

关键词: 贝氏柯克斯体; 环介导等温扩增; 可视化
中图分类号: R 115　**文献标志码**: A　**文章编号**: 1001-0580(2017)08-1219-05　DOI: 10.11847/zgggws2017-33-08-16

A loop-mediated isothermal amplification for visual detection of *Coxiella burnetti*

ZHANG Qi, XU Rui-yao, HU Meng-jia, et al (*Department of Disease Prevention and Control, Research Institute for Medicine, Nanjing Command of People's Liberation Army, Nanjing, Jiangsu Province* 210002, China)

Abstract: Objective　To develop a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid and visual detection of *Coxiella burnetti*. **Methods**　The recombinant plasmid containing *IS1111a* gene of *Coxiella burnetti* was constructed using *in vitro* gene synthesis. Three sets of LAMP primers targeting *IS1111a* gene were designed with Primer Explorer software 4.0. The most effective primer set was selected and the concentration of hydroxynaphthol blue (HNB) was optimized using real-time turbidimetry. Color change of the reaction tube was used to indicate the result. The detection limit of the optimized visual LAMP assay was evaluated using serially diluted recombinant plasmids of *Coxiella burnetti*. The specificity of the LAMP assay was tested using recombinant plasmid and XinQiao strain of *Coxiella burnetti*, together with other five members of genus *Rickettsia*. **Results**　The optimized final concentration of HNB in the visual LAMP was 150 μM. The visual LAMP could specifically detect the recombinant plasmid and XinQiao strain of *Coxiella burnetti*, with no cross reactions with *O. tsutsugamushi*, *Rickettsia rickettsii*, spotted fever group *Rickettsia*, *Rickettsia prowazekii*, and *Rickettsia* Canada. The detection limit of this method was 3.6×10^2 copies/reaction, which was 10-fold higher than that of the conventional polymerase chain reaction (PCR), but was identical to that of real-time turbidimetry and quantitative real-time PCR (qPCR). The amplification time of the visual LAMP assay ranges from 20 to 40 minutes, much shorter than the 75 min for qPCR and 3 hours for conventional PCR. **Conclusion**　The visual LAMP assay could

* **基金项目**: 国家重大传染病防治专项(2013ZX10004103; 2013ZX10004218); 江苏省科技支撑计划(社会发展)项目(BE2013603); 军队重点项目(BWS14J025)
作者单位: 南京军区军事医学研究所疾病预防控制所, 江苏 南京 210002
作者简介: 张琪(1986 –), 女, 江苏宜兴人, 主治医师, 博士, 研究方向: 传染病预防与控制。
通讯作者: 王长军, E-mail: science2008@hotmail.com; 张锦海, E-mail: ahoi@163.com
数字出版日期: 2016 – 7 – 19 9: 21
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20160719.0921.012.html

detect *Coxiella burnetti* sensitively and specifically with less labor and time. It might be applicable for the routine surveillance of *Coxiella burnetti* in grassroots disease control and prevention institutes or in field test.

Key words: *Coxiella burnetti*; loop-mediated isothermal amplification; visual detection

贝氏柯克斯体(*Coxiella burnetti*, *C. burnetti*)是一种高度多形的专性细胞内寄生革兰阴性菌,对外界物理和化学因素抵抗力强,可通过污染的土壤、灰尘或动物排泄物气溶胶进行传播,传染性极强,目前已被世界反恐组织列为生物战剂之一[1-2]。贝氏柯克斯体可引起人和牛羊等家畜发生急慢性寇热(Q fever),该病是在世界范围内分布最为广泛的一种人畜共患自然疫源性疾病[3-4]。Q 热在临床上因缺乏特异的症状常被误诊为其他疾病。本研究建立针对贝氏柯克斯体的快速可视化环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)方法,为实现 Q 热的早期诊断打下基础。

1 材料与方法

1.1 *主要仪器与试剂* Loopamp LA-320C 实时浊度仪、LAMP 法 DNA 扩增试剂盒(北京蓝谱公司),羟基萘酚蓝(hydroxynaphthol blue, HNB)(美国 Sigma 公司),ABI 7500 Fast 实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)仪(美国 Applied Biosystems 公司),pGEM-T 载体(美国 Promega 公司),SanPrep 柱式质粒小量抽提试剂盒(上海生工公司),Premix Ex Taq™、Takara Taq™、dNTP mixture(2.5 μM)、DL 1 000 DNA Marker(大连宝生物公司)。

1.2 *样品* 贝氏柯克斯体新桥株、立氏立克次体 R 株、斑点热立克次体、普氏立克次体 E 株和加拿大立克次体的基因组 DNA 由军事医学科学院五所馈赠。恙虫病 Ot 地方株由南京军区军事医学研究所实验室感染小白鼠传代保存。

1.3 *方法*

1.3.1 *重组质粒的构建与扩增* 根据 NCBI 公布的贝氏柯克斯体特有的 htpAB 基因相关重复序列(*IS1111a*)(GenBank: M80806.1, CDS: 89 - 1108, 1020 bp),由上海生工公司进行体外基因合成,将目的片段连接 pGEM-T 载体,并通过双酶切和测序验证构建质粒的准确性。将重组质粒转化 DH 5α 感受态细胞,并在溶菌肉汤(lysogeny broth, LB)液体培养基中进行扩增,12 h 后抽提菌液质粒,测定其浓度和纯度,并计算拷贝数,计算公式为:拷贝数 = 质粒浓度(g/μL) × 加样体积 × 阿氏常数/(质粒总长度 ×1 个 bp 的平均分子量)。

1.3.2 *LAMP 引物设计与合成(表 1)* 针对上述合成的 *IS1111a* 基因保守序列,采用在线引物设计软件 Primer Explorer software 4.0 (http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html) 设计 3 套 LAMP 引物,每套引物包括 2 条外引物(F3、B3)、2 条内引物(FIP、BIP)及 1 条/2 条环引物(LF、LB),由上海生工公司进行合成和纯化。

表 1 贝氏柯克斯体的 LAMP 引物序列

编号	引物	长度(bp)	序列(5′~3′)
第 1 套	F3-1	18	GAC GGG TTA AGC GTG CTC
	B3-1	19	CTG CGC ATC GTT ACG ATC A
	FIP-1	41	GCT CCT CCA CAC GCT TCC ATC-ATG TAT CCA CCG TAG CCA GT
	BIP-1	42	ATC GGA CGT TTA TGG GGA TGG G-ACA TAC GGT TTG ACG TGC TG
	LF-1	17	ACC ACG CAG CCC ACC TT
	LB-1	21	TCC CAA CGC AGT TGA TCA GTC
第 2 套	F3-2	19	GTG GCA AAA GCC AAT GAG G
	B3-2	20	CCG CGT TTA CTA ATC CCC AA
	FIP-2	41	GCA TAA ACC GAG AGC GCC GTT-ATT GTC AAC GGG TAC AGA GC
	BIP-2	41	TCA TCG TTC CCG GCA GTT GTC-CAC CTC CTT ATT CCC ACT CG
	LB-2	18	TGG GTT GGT CCC TCG ACA
第 3 套	F3-3	20	CGT AGC CAG TCT TAA GGT GG
	B3-3	19	GCG CTT GAA CGT CTT GTT G
	FIP-3	40	GGA CTG ATC AAC TGC GTT GGG A-GTG TGG AGG AGC GAA CCA
	BIP-3	38	ATC GTA ACG ATG CGC AGG CG-TTA CCC TGC ACA AAC CGC
	LF-3	22	CCC CAT AAA CGT CCG ATA CCA A
	LB-3	19	ATA GCT GAA GCG GCT TCC C

1.3.3 *LAMP 最佳引物筛选* 以抽提的贝氏柯克斯体重组质粒为模板,将合成的 3 套 LAMP 引物分别用 LAMP 法 DNA 扩增试剂盒进行扩增,反应体系为:2 × 反应缓冲液 12.5 μL,引物混合液(FIP、BIP 各 16 μmol/L, F3、B3 各 2 μmol/L, LF、LB 各 8 μmol/L) 2.5 μL, Bst DNA 聚合酶 1 μL,模板 2 μL,加超纯水至 25 μL。使用 Loopamp LA-320C 实时浊度仪进行孵育,反应条件为 63 ℃ 60 min, 80 ℃ 5 min。每次反应均设超纯水为阴性对照。通过浊度仪实时观察扩增曲线,选择浊度最高、扩增速率最快的一组引物为最佳引物进行后续反应。

1.3.4 *HNB 指示剂浓度的优化* 在上述反应体系中加入 HNB 颜色指示剂,使其终浓度分别为 120、150 和 200 μmol/L,每个浓度分别设 1 个阳性反应管和 1 个阴性对照管,反应结束后比较两管颜色的变化,选择差异最明显的一组为最佳 HNB 浓度,建立可视化 LAMP 反应体系。

1.3.5 *LAMP 特异性检测* 将贝氏柯克斯体重组

质粒和贝氏柯克斯体新桥株、恙虫病 Ot 地方株、立氏立克次体 R 株、斑点热立克次体、普氏立克次体 E 株、加拿大立克次体的基因组 DNA 分别作为模板，同时设超纯水为阴性对照，按照上述建立的可视化 LAMP 反应体系在浊度仪中进行扩增，反应结束后肉眼观察反应管内颜色变化，并与浊度仪结果进行对比，检测 LAMP 方法的特异性。

1.3.6　LAMP 敏感性检测　将贝氏柯克斯体重组质粒进行 10 倍梯度的倍比稀释，分别作为模板在浊度仪中进行 LAMP 扩增，同时设超纯水为阴性对照，反应结束后观察各管颜色变化，并与浊度仪结果对比，检测 LAMP 方法的敏感性。

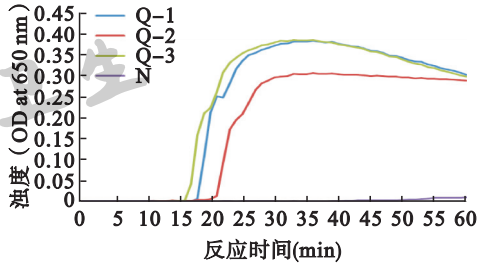
1.3.7　普通聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）　检测 针对 *IS1111a* 基因序列，用 Primer Premier 5.0 软件设计普通 PCR 引物，由上海生工公司进行合成，引物序列为：上游引物 5′-GGG TTA AGC GTG CTC AGT ATG TAT C-3′，下游引物 5′-CCA TCG TGA GTC CGT ATT CTT GC-3′（360 bp）。将贝氏柯克斯体重组质粒的 10 倍梯度倍比稀释液分别作为模板进行 PCR 扩增，反应体系为：上游引物和下游引物（10 μmol）各 0.5 μL，10 × Buffer 2.5 μL，dNTP Mixture（2.5 μmol/L）2 μL，Takara Taq 酶 0.3 μL，模板 2 μL，加超纯水至25 μL。反应条件：95 ℃ 3 min；94 ℃ 50 s，60 ℃ 55 s，72 ℃ 1 min，35 个循环；72 ℃ 10 min，4 ℃保存。将 PCR 产物进行凝胶电泳成像，确定普通 PCR 检测的敏感性。

1.3.8　实时荧光定量 PCR 检测　采用文献报道的针对 *IS1111a* 基因的实时荧光定量 PCR 引物及探针序列[5]，由上海生工公司进行合成。将贝氏柯克斯体重组质粒的 10 倍梯度倍比稀释液分别作为模板在 ABI 7500 Fast 实时荧光定量 PCR 仪中进行 qPCR 扩增，反应体系为：Premix Ex Taq™ 10 μL，上游引物和下游引物（10 μM）各 0.4 μL，荧光探针（10 μmol/L）0.8 μL，ROX 0.4 μL，模板 2 μL，加超纯水至 20 μL。反应条件：95 ℃ 10 s；95 ℃ 5 s，60 ℃ 35 s，40 个循环。观察 qPCR 检测的敏感性。

2　结　果

2.1　重组质粒鉴定　将体外合成的重组质粒用 SalI/ApaI 内切酶进行双酶切，酶切产物凝胶电泳显示在 1 080 bp 和 3 000 bp 处各有一条清晰条带，与目的片段和 pGEM-T 载体长度相符，将目的片段进行切胶回收后送测序，结果与送交合成的片段完全吻合，证明贝氏柯克斯体重组质粒构建成功。将重组质粒转化 DH 5α 感受态细胞，并在 LB 液体培养基中进行扩增，12 h 后抽提质粒 DNA，测得 OD 260/OD 280 为 1.73，浓度为 160 ng/μL，代入拷贝数计算公式得到贝氏柯克斯体重组质粒的拷贝数为 3.6×10^{10} 拷贝/μL。

2.2　LAMP 最佳引物筛选（图 1）　用合成的 3 套 LAMP 引物分别在浊度仪中进行 LAMP 扩增，反应结束后观察实时扩增曲线，结果显示 3 套引物均可成功诱发特异性 LAMP 扩增，其中第 2 套引物的浊度值最低，为 0.3，且扩增速率最慢，在 20 min 开始有扩增产物出现，在 28 min 接近峰值，而第 1 套引物和第 3 套引物的浊度值均为 0.38，第 3 套引物在 16 min 开始有扩增产物，在 24 min 接近峰值，第 1 套引物在 18 min 开始有扩增产物，在 26 min 接近峰值，故选取第 3 套引物进行后续反应。



注：Q-1：第 1 套引物；Q-2：第 2 套引物；Q-3：第 3 套引物；N：阴性对照。

图 1　3 套 LAMP 引物实时扩增曲线

2.3　HNB 指示剂浓度优化（图 2）　在 LAMP 反应体系中加入 HNB 颜色指示剂，使其终浓度分别为 120、150 和 200 μmol/L，反应前颜色均为紫罗兰色，反应结束后比较颜色变化，加入重组质粒的 3 个反应管颜色均变为天蓝色，而阴性对照管仍为紫罗兰色，其中 HNB 浓度为 150 μmol/L 的一组阳性反应管和阴性反应管颜色对比最为明显，故选取 150 μmol/L进行后续可视化 LAMP 反应。

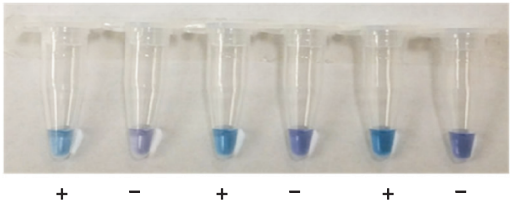
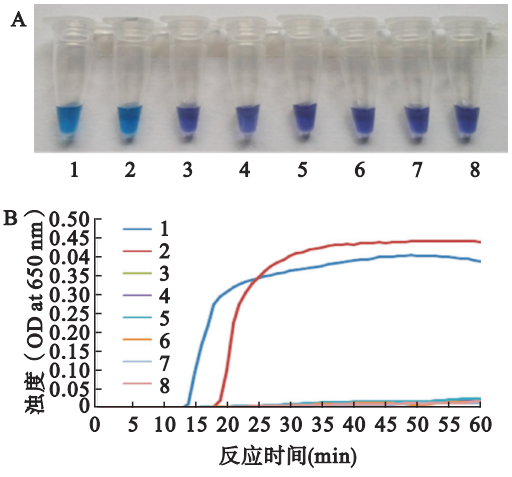


图 2　HNB 最佳浓度筛选

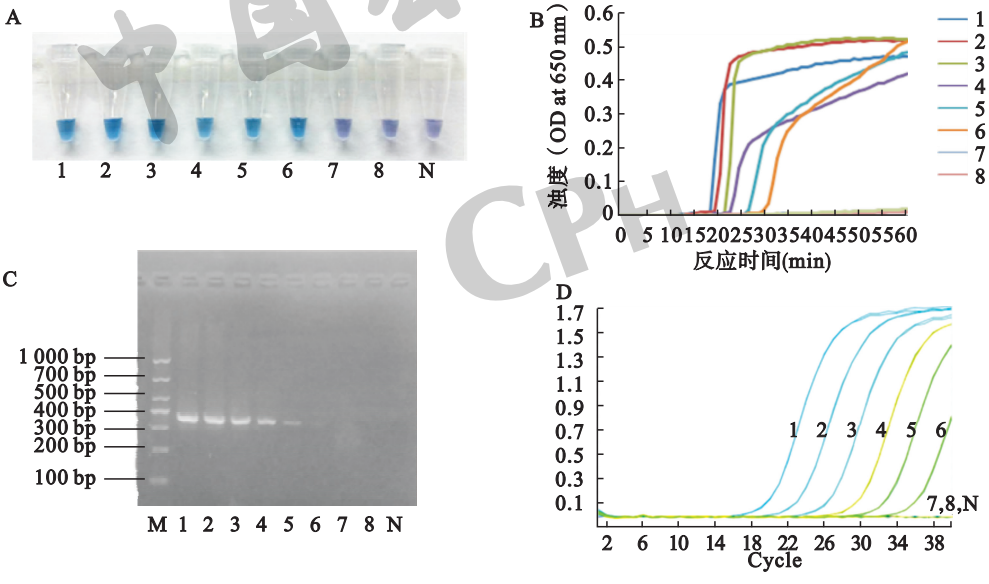
2.4　LAMP 特异性检测（图 3）　将贝氏柯克斯体重组质粒和贝氏柯克斯体新桥株、恙虫病 Ot 地方株、立氏立克次体 R 株、斑点热立克次体、普氏立克次体 E 株、加拿大立克次体的基因组 DNA 分别作为模板进行可视化 LAMP 反应。除贝氏柯克斯体重组质粒和贝氏柯克斯体新桥株反应管颜色变为天蓝色（图 3A），实时浊度图显示有扩增曲线外（图 3B），其余 5 种病原体均呈阴性反应，证明该可视化 LAMP 方法检测贝氏柯克斯体的特异性为 100%。



注：A：HNB 显色；B：实时浊度图；1：贝氏柯克斯体重组质粒；2：贝氏柯克斯体新桥株；3：恙虫病 Ot 地方株；4：立氏立克次体 R 株；5：斑点热立克次体；6：普氏立克次体 E 株；7：加拿大立克次体；8：阴性对照。

图 3　LAMP 特异性检测

2.5　敏感性检测（图 4）　将贝氏柯克斯体的重组质粒进行 10 倍梯度的倍比稀释，共 10 管，取浓度为 3.6×10^{7} 拷贝/μL 至 3.6×10^{0} 拷贝/μL 的八管分别作为模板进行 HNB 可视化 LAMP 扩增，结果发现 3.6×10^{7} 拷贝/μL 至 3.6×10^{2} 拷贝/μL 的反应管变为天蓝色，其余仍为紫罗兰色，说明 LAMP 扩增的最低检测限为 3.6×10^{2} 拷贝/反应（图 4A）。浊度仪实时扩增曲线结果（图 4B）和 HNB 显色结果一致，各浓度梯度质粒的出峰时间介于 20 ~ 40 min。将同样的质粒模板分别进行普通 PCR 扩增及 qPCR 扩增，结果发现两者检测贝氏柯克斯体的最低限分别为 3.6×10^{3} 拷贝/反应和 3.6×10^{2} 拷贝/反应（图 4C、4D）。因此，可视化 LAMP 扩增法的敏感度等同于 qPCR 扩增，均高于普通 PCR 扩增。



注：A：HNB 显色；B：实时浊度图；C：普通 PCR；D：实时荧光定量 PCR；1：3.6×10^{7} 拷贝/μL；2：3.6×10^{6} 拷贝/μL；3：3.6×10^{5} 拷贝/μL；4：3.6×10^{4} 拷贝/μL；5：3.6×10^{3} 拷贝/μL；6：3.6×10^{2} 拷贝/μL；7：3.6×10^{1} 拷贝/μL；8：3.6×10^{0} 拷贝/μL；N：阴性对照；M：DL 1000 DNA marker。

图 4　敏感性检测

3　讨　论

自 1962 年中国分离到首例贝氏柯克斯体毒株后，中国已在 15 个省市的 23 个地区先后发现了 Q 热病例。在一项回顾性调查中，研究者发现来自 12 所医院的 500 例社区获得性肺炎患者中有 44 例呈贝氏柯克斯体抗体阳性[6]，这些病例在初次诊断中均被误诊为普通肺炎，说明中国目前对 Q 热的诊断尚未引起足够的重视，而缺乏敏感、准确的早期诊断方法也是导致 Q 热被误诊的重要原因之一。由于 Q 热大多发生在有牛、羊等家畜生活的农村偏远地区，而这些地区往往缺乏先进的诊疗设备，因此，建立一种简单快捷、敏感特异的贝氏柯克斯体检测方法对于提高中国 Q 热检出率、加强疾病防控具有重大的现实意义。LAMP 是由 Notomi 等[7]在 2000 年建立起来的一种核酸检测方法，该法针对目标序列设计了 4 条或 6 条引物，可在 60 ~ 65 ℃的等温条件下 1 h 内实现靶基因 10^{9} 倍的扩增。LAMP 方法操作简单，仅需一个简单的恒温装置即可完成，具有极高的灵敏度和特异性，结合钙黄绿素或 HNB 等颜色指示剂可肉眼判断反应结果，非常适合于野外快速诊断[8-9]。目前该方法已应用于多种病原微生物的检测[10-11]。

本研究以贝氏柯克斯体特有的 htpAB 转座酶

基因上的一个重复性插入序列 *IS1111a* 为检测靶标，该序列在各个贝氏柯克斯体毒株中均较为保守，且在基因组上拷贝数高，因此针对该序列设计引物检测灵敏度较高，大多数基于 PCR 扩增的 Q 热检测法也均以该基因为靶标[5,12-13]。利用构建的重组质粒，建立贝氏柯克斯体的 HNB 可视化 LAMP 检测方法，该方法可成功检出 1964 年由俞树荣等[14]从重庆铃头血蜱中分离到的贝氏柯克斯体新桥株，同时可区分恙虫病、斑点热等其他立克次体感染，具有高度特异性。此外，通过条件优化，本研究建立的 HNB 可视化 LAMP 方法最低可检测到 3.6×10^2 拷贝/反应，敏感性和 qPCR 相当，较普通 PCR 检测提高了一个数量级。同时，该 HNB-LAMP 法的检测时间为 20～40 min，要大大小于 qPCR 法的 75 min 和普通 PCR 法的 3 h，且脱离了对精密温控仪器的依赖，更适合于基层单位和疫情现场开展病原检测。然而，本研究报道的灵敏度要略低于其他研究者采用电泳法检测 LAMP 产物的灵敏度，如 Pan 和 Chen 针对 *IS1111a* 基因建立的 LAMP 检测方法的灵敏度分别为 1 拷贝/反应和 25 拷贝/反应[15-16]。但电泳法需在反应结束后开盖进行操作，高浓度的 LAMP 产物可能产生气溶胶，造成环境污染，导致后续实验易出现假阳性，且电泳法操作繁琐耗时，不适合在疫情现场展开。

因此，本研究建立的 LAMP 方法可敏感和特异地检测贝氏柯克斯体，只需简单的恒温装置即可完成，反应结束后直接肉眼判断结果，操作方便快捷，20～40 min 内可判定是否存在贝氏柯克斯体感染，非常适用于基层单位开展日常监测和疫情暴发现场的病原快速诊断。但后续还需要收集更多的临床样本来进一步评估其实际诊断价值。

参考文献

[1] Angelakis E, Raoult D. Q fever[J]. Vet Microbiol, 2010, 140(3-4): 297-309.

[2] Dorko E, Rimarova K, Pilipcinec E. Influence of the environment and occupational exposure on the occurrence of Q fever[J]. Cent Eur J Public Health, 2012, 20(3): 208-214.

[3] EI-Mahallawy H, Lu G, Kelly P, et al. Q fever in China: a systematic review, 1989-2013[J]. Epidemiol Infect, 2015, 143(4): 673-681.

[4] Cong W, Meng QF, Shan XF, et al. *Coxiella burnetii* (Q fever) infection in farmed ruminants in three northeastern provinces and Inner Mongolia Autonomous Region, China[J]. Vector Borne Zoonotic Dis, 2015, 15(8): 512-514.

[5] Schneeberger PM, Hermans MH, van Hannen EJ, et al. Real-time PCR with serum samples is indispensable for early diagnosis of acute Q fever[J]. Clin Vaccine Immunol, 2010, 17(2): 286-290.

[6] 程仕虎，刘又宁，李朝霞，等. 44 例被误诊为普通性肺炎的 Q 热柯克斯体肺炎病人的回顾性分析[J]. 科学技术与工程，2007，7(10)：2335-2339.

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

[8] Zhang J, Zhu J, Ren H, et al. Rapid visual detection of highly pathogenic *Streptococcus suis* serotype 2 isolates by use of loop-mediated isothermal amplification[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(10): 3250-3256.

[9] Zhang J, Feng Y, Hu D, et al. Rapid and sensitive detection of H7N9 avian influenza virus by use of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(11): 3760-3764.

[10] 姚文山，吴家林，沙丹，等. 霍乱弧菌毒力基因 LAMP 方法快速检测[J]. 中国公共卫生，2015，31(1)：67-69.

[11] 易海华，赵金伟，房超，等. 志贺菌环介导等温扩增检测方法建立[J]. 中国公共卫生，2011，27(3)：380-382.

[12] Boden K, Wagner-Wiening C, Seidel T, et al. Diagnosis of acute Q fever with emphasis on enzyme-linked immunosorbent assay and nested polymerase chain reaction regarding the time of serum collection[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2010, 68(2): 110-116.

[13] Panning M, Kilwinski J, Greiner-Fischer S, et al. High throughput detection of *Coxiella burnetii* by real-time PCR with internal control system and automated DNA preparation[J]. BMC Microbiol, 2008, 8: 77.

[14] Wen BH, Yu SR, Yu GQ, et al. Analysis of proteins and lipopolysaccharides from Chinese isolates of *Coxiella burnetii* with monoclonal antibodies[J]. Acta Virol, 1991, 35(6): 538-544.

[15] Pan L, Zhang L, Fan D, et al. Rapid, simple and sensitive detection of Q fever by loop-mediated isothermal amplification of the htpAB gene[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2013, 7(5): e2231.

[16] Chen HW, Ching WM. Development of loop-mediated isothermal amplification assays for rapid and easy detection of *Coxiella Burnetii*[J]. J Microbiol Methods, 2014, 107: 176-181.

收稿日期：2016-01-20　（吴少慧编辑　郑新校对）