

分类号：
学 号：20222113036

密 级：公 开
单位代码：10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



结核分枝杆菌与副结核分枝杆菌分子鉴别 诊断技术的研究

学 位 申 请 人	魏铭清
指 导 教 师	张 辉 教 授
	王 震 副 教 授
	马全新 兽 医 师
申 请 学 位 类 别	兽 医 硕 士
专 业 名 称	兽 医
研 究 领 域	动 物 疫 病 防 控 与 检 疫
所 在 学 院	动 物 科 技 学 院

中国·新疆·石河子
2025 年 6 月

分类号：
学 号：20222113036

密 级：公 开
单位代码：10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



结核分枝杆菌与副结核分枝杆菌分子鉴别 诊断技术的研究

学 位 申 请 人	魏铭清
指 导 教 师	张 辉 教 授
	王 震 副 教 授
	马全新 兽医师
申 请 学 位 类 别	兽医硕士
专 业 名 称	兽医
研 究 领 域	动物疫病防控与检疫
所 在 学 院	动物科技学院

中国·新疆·石河子
2025 年 6 月

Research on Molecular Diagnostic Techniques for Differentiating
Mycobacterium tuberculosis and *Mycobacterium avium* subspecies.

paratuberculosis

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Veterinary Medicine

By

Wei Mingqing

(Animal Disease Prevention and Quarantine)

Dissertation Supervisor: Prof. Zhang Hui

Associate Prof. Wang Zhen

Veterinarian. Ma Quanxin

June, 2025

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明


学位论文独创性声明


本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：  时间： 2025 年 5 月 23 日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：  时间： 2025 年 5 月 23 日

导师签名：  时间： 2025 年 5 月 23 日

课题来源

兵团重点领域科技攻关计划

生鲜乳重要食源性微生物快速检测关键技术研发与集成示范

项目编号：2021AB01202

奶牛生产性能数智化应用与智慧诊疗关键技术创新与示范

课题编号：2024AB035

摘要

目的：本文旨在通过建立结核分枝杆菌与副结核分枝杆菌的双重 qPCR 和双重 RPA-LFD 检测方法研究，实现生鲜乳中两种病原菌的鉴别，为食源性产品中这两种病原体的快速检测提供辅助手段。

方法：（1）基于 qPCR 检测对结核分枝杆菌 *Rv3876* 基因和副结核分枝杆菌 *IS900* 基因设计特异性引物和 TaqMan 探针。构建相应的重组质粒作为 qPCR 定量标准品并绘制定量分析标准曲线；通过引物及探针的最佳浓度配比优化，建立单靶标 qPCR 检测方法；在此基础上构建可同步检测两种病原体的双重 qPCR 检测体系，并评价其特异性和灵敏性，经模拟临床污染乳试验明确其最低检出限。

（2）针对结核分枝杆菌 *Rv3876* 基因和副结核分枝杆菌 *IS900* 基因，设计并优化重组聚合酶扩增（RPA）引物及探针，构建相应的重组质粒作为检测标准品；确定最佳反应温度和反应时间，初步建立针对这两种病原体的 RPA 结合横向流动试纸条（LFD）快速检测技术，并对其特异性和灵敏性进行评估；经模拟临床样本试验探索其最低检测限，进一步优化并建立适用于牛乳中结核分枝杆菌与副结核分枝杆菌的双重 RPA-LFD 检测方法。

结果：（1）本研究设计了针对结核分枝杆菌 *Rv3876* 和副结核分枝杆菌 *IS900* 基因的 qPCR 特异性引物与 TaqMan 探针，并成功构建阳性质粒标准品，绘制得到标准曲线，线性关系良好；确定建立的 qPCR 引物最佳反应浓度均为 1 μM ，TaqMan 探针最佳反应浓度均为 250 nM。经与大肠杆菌、单核细胞增生李斯特菌、鼠伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌、停乳链球菌等其他乳源菌检测其特异性良好，结核分枝杆菌和副结核分枝杆菌的检测灵敏度分别为 1.35×10^3 copies/ μL 和 1.29×10^3 copies/ μL ，较常规 PCR 均提升 10 倍，双重荧光定量灵敏性与单靶标荧光定量一致。经模拟临床污染乳样评价其对结核分枝杆菌与副结核分枝杆菌的检测限分别为 2.05×10^3 CFU/mL 和 2.55×10^4 CFU/mL。

（2）本研究选择结核分枝杆菌 *Rv3876* 和副结核分枝杆菌 *IS900* 基因作为 RPA 检测靶标，引物组特异性良好，筛选到最佳反应条件分别为 37°C 20 min 和 37°C 25 min，重组质粒检测限分别为 2.10×10^1 copies/ μL 和 1.68×10^2 copies/ μL 。在此基础上构建双重 RPA-LFD 检测方法，最佳反应条件为 37°C 30 min，灵敏性较常规 PCR 提升 100 倍和 10 倍，与大肠杆菌、停乳链球菌、单核细胞增生李斯特菌、金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门菌、海氏肠球菌无交叉反应，其特异性良好。EDTA-TritonX-100 法模拟临床乳样中 DNA 提取的最佳方法，模拟临床乳样中其最低检出限分别为 2.87×10^4 CFU/mL 和 6.36×10^4 CFU/mL。

结论：本研究建立的 TaqMan qPCR 与 RPA-LFD 检测方法具有良好的特异性及灵敏度，可用于结核分枝杆菌与副结核分枝杆菌的鉴别诊断检测，为两种病原体引起疾病的早防早治提供可靠检测手段。

关键词：结核分枝杆菌；副结核分枝杆菌；qPCR；RPA-LFD；鉴别诊断

Abstract

Objective: This study aims to establish duplex qPCR and duplex RPA-LFD detection methods for *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* subspecies. *paratuberculosis*, enabling the differentiation of these two pathogens in raw milk, which provides an adjunct to the rapid detection of these two pathogens in edible products

Methods: (1) Design specific qPCR primers and TaqMan probes targeting the *Rv3876* gene of *Mycobacterium tuberculosis* and the *IS900* gene of *Mycobacterium avium* subspecies. *paratuberculosis*. Construct corresponding recombinant plasmids as quantitative standards for qPCR and establish standard curves for quantitative analysis; optimize the assay by determining the optimal concentration ratios of primers and probes; Design and validation of singleplex qPCR assays targeting *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* subspecies. *paratuberculosis*, respectively. Development and evaluation of a duplex qPCR assay for simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* subspecies. *paratuberculosis*: Specificity, Sensitivity, and Limit of Detection, and was verified by simulated clinical contaminated milk samples

(2) Based on the *Rv3876* gene of *Mycobacterium tuberculosis* and the *IS900* gene of *Mycobacterium avium* subspecies. *paratuberculosis*, a recombinant polymerase amplification (RPA) primer and probe were designed and optimized, and construct corresponding recombinant plasmids as detection standards; determine the optimal reaction temperature and incubation time; establish a preliminary rapid detection method for these two pathogens using recombinase polymerase amplification combined with lateral flow dipstick (LFD), and evaluate its specificity and sensitivity. Evaluation of the assay's limit of detection (LOD) using artificially spiked milk samples to mimic clinical conditions., and the dual RPA-LFD method for the detection of two pathogens in milk was further optimized and finally established.

Result:(1) In this study, qPCR-specific primers and TaqMan probes targeting *Mycobacterium tuberculosis Rv3876* and *Mycobacterium avium* subspecies. *paratuberculosis IS900* genes were designed, and successfully constructed positive plasmid standards. The calibration curve results demonstrated a good linear relationship. The optimal final concentrations for the qPCR primers and TaqMan probes were 1 μ M and 250 nM, respectively. Cross-reactivity testing confirmed high specificity, with no amplification observed in non-target milk-associated bacteria such as *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus dysgalactiae*. The detection sensitivity for *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* subspecies. *paratuberculosis* was 1.35×10^3 copies/ μ L and 1.29×10^3 copies/ μ L, respectively, representing a 10-fold improvement compared to standard PCR. The sensitivity of double fluorescence quantification is consistent with that of single target

fluorescence quantification. Using artificially contaminated milk samples to simulate clinical conditions, the method showed detection limits of 2.05×10^3 CFU/mL for *Mycobacterium tuberculosis* and 2.55×10^4 CFU/mL for *Mycobacterium avium* subspecies. *paratuberculosis*.

(2) In this study, *Mycobacterium tuberculosis* Rv3876 and *Mycobacterium avium* subspecies. *paratuberculosis* IS900 genes were selected as RPA detection targets, and the primer set specificity was good. The incubation conditions were 37°C for 20 min and 37°C for 25 min, respectively. The detection limits of recombinant plasmids were 2.10×10^1 copies/ μ L and 1.68×10^2 copies/ μ L, respectively. Based on the aforementioned findings, a multiplex RPA-LFD platform was successfully developed, with the most favorable reaction parameters identified as 30 minutes at 37°C, and the sensitivity is 100-fold and 10-fold greater compared to standard PCR assays, the detection method demonstrated excellent specificity with no cross-reactivity observed against *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium, and *Enterococcus hirae*. EDTA-TritonX-100 method was the best methods for DNA extraction from simulated clinical samples. The lowest limits of detection in simulated clinical milk samples were 2.87×10^4 CFU/mL and 6.36×10^4 CFU/mL, respectively. In this study, a dual RPA-LFD detection method for two pathogens in milk was initially established.

Conclusion: The TaqMan qPCR and RPA-LFD assay were established in this study demonstrated high specificity and sensitivity, enabling reliable differentiation between *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* subspecies. *paratuberculosis*. This method provides a robust diagnostic tool for early detection and intervention of diseases caused by these two pathogens.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; q-PCR; *Mycobacterium avium* subspecies. *paratuberculosis*; RPA-LFD

英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文名称
AGID	Agar gel diffusion test	琼脂扩散试验
BCG	Bacillus Calmette-Guerin	卡介苗
CFT	Complement Fixation Test	补体结合试验
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assays	酶联免疫吸附试验
IGRA	Interferon-gamma release assay	IFN- γ 释放试验
GICA	Colloidal Gold Immunochromatographic Assay	胶体金免疫层析法
LAMP	Loop-mediated Isothermal Amplification	环介导等温扩增
LFIA	Lateral flow immunochromatography assay	侧流免疫层析法
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	结核分枝杆菌
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies. <i>paratuberculosis</i>	副结核分枝杆菌
NAH	Nucleic acid hybridization	核酸杂交技术
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction	实时荧光定量聚合酶链式反应
RPA	Recombinase Polymerase Amplification	重组酶聚合酶等温扩增技术
SDTH	Skin Delayed-Type Hypersensitivity	皮肤迟发型超敏反应
TST	Tuberculin intradermal metamorphosis reverse	结核菌素皮内变态反应
ZN	Ziehl-Neelsen	萋-尼氏抗酸染色

目录

摘要.....	I
Abstract.....	II
英文缩略词表.....	IV
目录.....	V
第1章 绪论.....	1
1.1 研究目的及意义.....	1
1.2 结核分枝杆菌检测技术研究进展.....	1
1.2.1 分枝杆菌概述.....	1
1.2.2 牛结核病流行病学现状.....	2
1.2.3 牛结核病检测技术研究.....	2
1.3 副结核分枝杆菌检测技术进展.....	6
1.3.1 副结核分枝杆菌概述.....	6
1.3.2 牛副结核病流行病学现状.....	6
1.3.3 牛副结核病检测技术研究.....	7
1.4 研究内容与技术路线.....	10
第2章 结核分枝杆菌与副结核分枝杆菌双重 qPCR 检测方法的建立.....	12
2.1 材料.....	13
2.1.1 试验菌株.....	13
2.1.2 主要试剂.....	13
2.1.3 主要仪器.....	14
2.2 试验方法.....	14
2.2.1 结核分枝杆菌和副结核分枝杆菌 qPCR 检测方法的建立.....	14
2.2.2 结核分枝杆菌和副结核分枝杆菌双重 qPCR 检测方法的建立.....	18
2.3 结果.....	20
2.3.1 结核分枝杆菌 qPCR 检测方法的建立.....	20
2.3.2 副结核分枝杆菌 qPCR 检测方法的建立.....	26
2.3.3 结核分枝杆菌与副结核分枝杆菌双重 qPCR 检测方法的建立.....	33
2.4 讨论.....	36
2.5 小结.....	38
第3章 结核分枝杆菌与副结核分枝杆菌双重 RPA-LFD 检测方法的建立.....	40

3.1 材料.....	41
3.1.1 菌株.....	41
3.1.2 主要试剂.....	41
3.1.3 主要仪器.....	41
3.2 试验方法.....	41
3.2.1 结核分枝杆菌和副结核分枝杆菌 RPA 检测方法的建立.....	41
3.2.2 结核分枝杆菌和副结核分枝杆菌 RPA-LFD 反应体系的建立.....	42
3.2.3 结核分枝杆菌与副结核分枝杆菌双重 RPA-LFD 检测方法的建立.....	45
3.3 结果.....	47
3.3.1 结核分枝杆菌 RPA-LFD 方法的建立.....	47
3.3.2 副结核分枝杆菌 RPA-LFD 方法的建立.....	53
3.3.3 结核分枝杆菌与副结核分枝杆菌双重 RPA-LFD 检测方法的建立.....	60
3.4 讨论.....	65
3.5 小结.....	66
第4章 全文总结.....	66
第5章 论文创新点.....	68
参考文献.....	69
致谢.....	79
作者简介.....	80
石河子大学硕士研究生学位论文导师评阅表.....	81

第1章 绪论

1.1 研究目的及意义

近年来,随着畜牧业的快速发展,牛结核病呈现日益严重趋势,其病原体对高产奶牛、使役牛等具有极强的感染性。患病牛是该病的主要传染源,其牛奶、排泄物、分泌物以及被污染的周遭环境等,均可能成为病原体传播的媒介,由此引发的食源性疾病已成为世界范围内的公共卫生问题;人类可通过被污染的食用生牛奶、奶酪、酸奶等奶制品感染结核病,该病在发展中国家的患病率较高。随着畜牧业贸易往来日益频繁,各地区牛只的流动愈发活跃,这在无形中加剧了牛结核病的传播范围。自20世纪80年代以来,全球结核病疫情呈现回升趋势,引发了世界卫生组织的密切关注。尽管各国在结核病防治领域投入了大量资源,但截至目前,结核病依然是严重威胁人类生命健康的主要传染病之一,给全球公共卫生事业的推进带来了诸多阻碍^[1]。副结核病同样严重影响畜牧业发展,患病奶牛不但寿命大大降低,而且乳汁分泌明显减少、生殖功能受限,被世界动物卫生组织列入了“必需通报”的动物疾病,而我国对其也给予了足够的关注,以便于及时监测和控制疫情。鉴于结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)、副结核分枝杆菌(*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, MAP)以及其他环境分枝杆菌之间显著的基因同源性,牛结核病和副结核病的精准诊断面临诸多难题。因此,实现对两种病原菌的快速、准确鉴别,不仅对感染牛早期识别以及牛场净化至关重要,也可为生鲜乳质量安全控制提供技术支持。

1.2 结核分枝杆菌检测技术研究进展

1.2.1 分枝杆菌概述

分枝杆菌属为革兰氏阳性抗酸杆菌,包含超过190个物种,其中MTB致病性较强。该属细菌的细胞壁富含大量脂质,这一特性使其在革兰氏染色和抗酸染色中呈阳性,并且对大多数裂解方法表现出较强的抗性。引起人类及动物结核病的分枝杆菌群被称为结核分枝杆菌复合群^[2]。结核分枝杆菌复合体(MTBC)是指一组在遗传学上高度相似的分枝杆菌物种,其中,MTB感染了世界人口的三分之一以上,它还能够感染与人类接触的动物。牛分枝杆菌(*M. bovis*)的宿主感染范围最广,影响人类、家牛或野生牛和山羊。山羊分枝杆菌(*M. caprae*)仅从山羊中分离出来。田鼠分枝杆菌(*M. microti*)

是一种啮齿动物病原体，通常从田鼠相关属的啮齿动物中分离出来，田鼠也可在免疫功能低下的人类患者中引起疾病^[3, 4]。此外，由 Calmette 和 Guerin 二人分离出的牛型结核杆菌突变体称为卡介苗（*Bacillus Calmette-Guerin*, BCG），是儿童早期用于结核病预防的唯一疫苗^[5]。

1.2.2 牛结核病流行病学现状

牛结核病（*Bovine tuberculosis*, bTB）主要是由 MTBC 成员感染引起的一种人畜共患病。Gobena Ameni 等人^[6]的研究中证实牛和其他动物可以从人类那里获得结核分枝杆菌，这可能会对人类结核病的流行病学和控制产生影响。结核杆菌可以以双向方式在人和动物之间直接传播（即通过气溶胶吸入）或间接从动物传播给人类（即通过食用受生的污染乳制品和肉类）^[7, 8]。MTB 也被广泛从牛奶^[9]和不同动物物种的组织中分离出来^[10-13]。

根据 FAO（2013）的数据，全球有超过 60 亿人消费牛奶和乳制品。奶牛的牛奶约占全球牛奶总产量的 85%^[14]。奶牛结核病会导致产奶量低、体重减轻、不孕和死亡。据估计，全球畜牧业因牛结核病造成的损失预期范围约为每年 30 亿美元^[15]。在发展中国家，10%人类结核病病例由牛结核分枝杆菌引起，对全球人类健康构成重大威胁^[16]。在埃塞俄比亚不同地区的结核菌素皮肤试验中，小型奶牛养殖场的牛结核病患病率为 6.9%，传统管理的粗放型生产系统为 12.9%，集约化奶牛场的患病率为 24.6%^[17]。朱小洁等人^[18]对某屠宰场 171 头待宰淘汰成年奶牛检测，其中 134 份血液样本的血清阳性率为 20.9%(28/134)。鉴于不同地区的 bTB 患病率，检测方案也应相应调整。在感染和经济问题较严重的地区应采用灵敏性高、低成本的检测方法，快速隔离和清除受感染的动物，以最大限度地控制疫情。在患病率稳定的地区，应采用多种方法进行全面检测，有利于提高检测准确性，减少不必要屠宰的发生率^[19]。迄今为止，中国已经出台了一系列防控 bTB 控制措施，如建立监测预警、应急响应等制度、支持集约化养殖、引导农民统一防疫以及实施养殖场的疾病根除计划。

1.2.3 牛结核病检测技术研究

1.2.3.1 细菌学方法

细菌培养鉴定虽是牛结核病检测的标准，但其检测周期长，显著限制了对疾病的及时诊断和治疗。借鉴人结核病的细菌分离方法，无菌采集牛的分泌物，进行抗酸染色和细菌培养，该方法简单，诊断结果快，成本较低，但该方法主要局限在于无法区分死菌

与活菌^[20]。此外,传统的细菌分离技术尚不能有效鉴别结核分枝杆菌复合群与非结核分枝杆菌^[21]。

1.2.3.2 免疫学检测方法

(1) 结核菌素皮内变态反应 (TST)

TST 是国家用于 bTB 的检测标准^[20]。该测试探测皮内注射刺激抗原 (如结核菌素的纯化蛋白衍生物 (PPD)) 后细胞介导的免疫反应。TST 操作简便,成本较低,可以轻松应用于 MTB 感染的广泛筛查。但其结果判定具有较强的主观性。过去,许多高收入国家严格应用结核菌素检测和扑杀已显著降低甚至消除了养殖牛群的 bTB 感染^[22-24]。

(2) IFN- γ 释放试验 (IGRA)

Wood 等人^[25]于 1989 年首次建立了基于 γ -干扰素释放试验对 MTB 感染的检测。结核分枝杆菌中研究最广泛的抗原包括 CFP-10、ESAT-6、Ag85A、Ag85B、CFP-7 和 PPE18^[26, 27]。IFN- γ 释放试验通过检测采样淋巴细胞在 ESAT-6 和 CFP-10 抗原刺激后分泌 IFN- γ 来帮助诊断结核病。结果不受既往 BCG 疫苗接种和大多数由非结核分枝杆菌 (NTM) 引起的感染的影响,因此在检测 MTB 感染方面比 TST 具有更高的特异性^[28],且 IFN- γ 试验比皮试能在感染早期识别动物^[29]。

(3) 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

ELISA 作为一种基于抗原-抗体特异性反应的检测技术,在疾病初期,机体主要呈现细胞免疫反应,而随着病程进展,体液免疫逐渐占据主导地位。抗体检测通常适用于感染中后期,尽管其特异性较高,但对早期感染的敏感性不足,限制了其在疾病初期的诊断价值。基于单一抗原的抗体检测在结核病诊断中通常敏感性较低,MTBC 不同生长阶段产生的不同抗原的组合可以克服它^[30, 31],传统 ELISA 抗体检测的另一个限制在于二抗的物种特异性,该特异性因宿主物种而异,抗原夹心 ELISA 解决这一问题, Sun 等人^[32]用四种特异性 MTBC 蛋白制成的融合蛋白作为涂层抗原,HRP 标记的葡萄球菌蛋白 A 或链球菌融合蛋白 G (A/G-HRP) 作为二抗,可结合各种宿主物种的 Ig。该检测方法经过优化,可检测牛、羊、鹿科动物、猴子和人类的 MTBC 感染抗体。

ELISA 方法的主要局限性在于病原菌的抗原性较弱,且易受抗原决定簇的影响,致使诊断结果的有效性难以得到切实保障^[33]。Gilbride B 等人^[34]通过催化铁磁金纳米颗粒免疫测定法来鉴别 MTB 和 *M.bovis*,与传统 ELISA 相比,具有相当的灵敏度。Marassi C D 等人^[35]开发了以 *M.bovis* 特异性 MPB70 与 MPB83 作为捕获抗原的 ELISA,并对两组牛进行测试,其结果显示两组的血清反应性之间存在显著差异 ($p < 0.01$) 以区分牛结核病和副结核病感染。

(4) 胶体金免疫层析技术 (GICA)

胶体金免疫层析技术其核心优势在于其操作简便、结果直观易懂，极大地简化了复杂的检测流程，很大程度上降低了专业技能的门槛，为医疗卫生、兽医工作、动植物疾病预防以及农药残留监测等方面带来了极大的便利，不仅简化了样品处理过程，还提高了检测的灵敏度和特异性。传统检测方法在这些领域中往往面临着检测时间长、设备笨重、操作复杂以及对检测人员有较高专业要求等问题，胶体金免疫层析技术凭借其小巧便携的设备、检测速度迅捷以及易于操作的特性，有效地解决了传统方法的缺陷。

郭爱珍及其团队^[36]开发出用于检测牛体内的 MTB 抗体的胶体金试纸条技术。这一突破性的技术为 bTB 的诊断提供了更为简便、快速的方法，极大地提高了检测效率和准确性，从而对防止和控制疾病的传播具有重要意义。Alonso 等人^[37]使用金纳米颗粒与重组 G 蛋白的偶联物进行快速 bTB 检测，均未检测到假阳性，在不同环境条件下的长期稳定性、检测快速、低成本及高特异性是试纸条的独特优势。

1.2.3.3 分子诊断技术

(1) 聚合酶链式反应 (PCR)

PCR 技术是分子生物学领域最重要的技术发明之一，具有高灵敏度、且能快速进行核酸体外分析的特点，但是以该方法结合 PCR 技术用于现场检测，相对费时费力，且需要专业的仪器设备，具有局限性^[38]。

在国内外，*IS6110*、*32KD* 和 *MPT64* 基因常被用作靶标，用于检测结核分枝杆菌。Hance A 等人^[39]将聚合酶链式反应 (PCR) 技术引入分枝杆菌检测领域，该技术随后在 MTB 的临床诊断和流行病学调查中获得广泛应用。刘思国等人^[40]以 *pncA* 为靶标设计引物，对 10 份 *M.bovis* 进行检测，阳性率达到 90%。与传统的检测方法相比，PCR 检测具有操作简便、快速和灵敏的特点，该方法也存在易受污染的缺点，可能导致假阳性结果的出现。

(2) 实时荧光定量 PCR 技术 (qPCR)

实时荧光定量 PCR 技术能够在极为宽泛的动态范围内，对核酸含量进行特异性且精准的测定。近年来，该技术凭借这一优势，逐步成为检测各类 DNA 或 RNA 病原的核心技术^[41]。在具体应用中，实时荧光定量 PCR 主要包含荧光探针法和 SYBR GreenI 法这两种检测方式^[42]。TaqMan 探针利用荧光基团的特性，在反应过程中能使扩增产物特异性地发出荧光信号。孙天文等^[43]利用荧光定量 PCR 诊断肺结核效能与传统的涂片抗酸染色法相比，qPCR 的灵敏性 (93.90%) 和特异性 (87.50%) 均高于抗酸染色的灵敏性 (81.71%) 和特异性 (81.25%)，表明 qPCR 能够显著提高检测的灵敏度和特异度，从而有效降低漏诊和误诊的概率。同样，程振涛等^[44]也采用 qPCR 技术对牛结核分枝杆菌的定性和定量检测，其最低检出浓度为 80.24 ng/L，这为奶牛结核病的诊断、净化以及生鲜乳食品安全评估提供了重要的技术支持。

(3) 重组酶聚合酶扩增技术 (RPA)

目前, RPA 技术已在多个领域得到应用, 例如在医学诊断方面用于快速检测病原体 (如疟疾等) [45, 46], 在食品安全方面检测食源性病原体 (如沙门氏菌、大肠杆菌), 缩短传统 PCR 耗时 [47] 和转基因作物筛查 (如大豆、玉米的转基因成分), 实现田间快速检测 [48] 以及病毒研究 [49]。RPA 技术正在成为快速、灵敏且经济高效的检测技术, 其优势在于可以在现场场景中实施, 并且在恒温 (37-42°C) 下进行, 其特异性强、操作过程省时省力、可以脱离大型实验仪器及灵敏度好等优点被广大学者应用于人类感染病防控、动物防疫及食品安全等多个领域, 尤其在现场检测中发挥着重要的作用。

RPA 产物可通过琼脂糖凝胶电泳进行检测 [50], 也可利用 TwistAmp™ exo 探针 [51] 或 RPA 结合侧向层析试纸测定法 (RPA-LFD)。如 Boyle 等人 [52] 针对 MTBC 的两个特异性靶点 *IS6110* 和 *IS1081*, 进行 exo-RPA 检测可 20 min 内完成, 其检测限可达到 6.25×10^{-2} fg/ μ L (*IS6110*) 和 2×10^{-1} fg/ μ L (*IS1081*)。RPA 表现出优于间接荧光显微镜检查的准确性。Xu 等人 [53] 利用 exo-RPA 技术鉴定 MTB 的 Ag85B, 可在 39°C 下 20 min 内完成样品检测, 检测限可达到 4 copies/ μ L, 特异性强。

RPA 结合侧流层析试纸条 (RPA-LFD) 检测方法, 通过添加核酸内切酶 nfo 和 nfo 探针来提高检测的特异性, 将基础 RPA 技术与侧流层析试纸条相结合, 形成了一个高效且可靠的等温扩增检测方法。Ma 等人 [54] 建立了 RPA-LFD 对结核分枝杆菌进行检测, 其临床敏感性和特异性分别为 100% 和 97.92%。可简单、准确和快速地检测 MTBC 中的 DNA, 可用于 TB 的现场筛查。鉴于市场前景, RPA 与侧向层析试纸 (LFD) 相结合, 是在资源有限环境中进行即时检测的理想选择 [45]。

(4) 环介导等温扩增技术 (LAMP)

LAMP 反应可在等温条件 (60-65°C) 下进行, 产生大量 DNA [55]。恒温条件下即可完成, 其扩增产物可以利用琼脂糖凝胶电泳结果或可视化检测进行结果读取。WHO (WHO 2021) 已推荐以诊断试剂盒的形式用于 MTB 的 LAMP (TB-LAMP) 检测。只需不到一个小时即可完成检测, 并且可以在紫外光下观察结果 [56]。Wu 等人 [57] 通过 LAMP 和 RT-LAMP 添加 HNB 指示剂的方法对 MTB 进行可视化检测, 并且与标准培养方法 (SCM) 对比, SCM、环介导等温扩增 (LAMP) 和逆转录环介导等温扩增 (RT-LAMP) 方法对 MTB 的阳性检出率分别为 88%、92% 和 100%。其中, RT-LAMP 与 SCM 的检出率存在显著差异。但 RT-LAMP 和 LAMP 具有可比性 RT-LAMP 检测 MTB 的灵敏度比 LAMP 高 10 倍。与 LAMP 不同, RT-LAMP 可以识别活细菌, 并能够检测到单个拷贝。

(5) 生物传感器

用于对 MTB 检测的生物传感器通常被定义为一种稀有紧缺的分析设备, 根据所采用的生物识别元件, 已经开发了基于核酸和抗体的生物传感器。根据信号转导的方法, 可分为用于对 MTB 检测的电化学和光学生物传感器。Prabowo 等人 [58] 开发了采用有机