

· 论 著 ·

环介导等温扩增技术在呼吸道感染病原体检测中的应用

陈愉生,王大璇,陈炫颖,李鸿茹

福建医科大学省立临床医学院,福建省立医院呼吸内科,福州 350001

摘要: 目的 应用环介导等温扩增法(LAMP)对肺炎患者下呼吸道分泌物进行 11 种常见致病菌的核酸检测,探讨其临床应用价值。方法 收集福建省立医院 2009—2010 年呼吸科诊断为下呼吸道感染患者的合格痰标本 289 例,行 LAMP 方法检测,与痰培养结果比较,分析其灵敏性和特异性。结果 LAMP 检测时间仅需 2~3 h,明显短于痰培养;以细菌浓度 $>1 \times 10^3$ 为阳性阈值,敏感性 74.0%,特异性 95.3%,敏感性明显高于痰培养;其阳性率为 42.9% (124/289)。结论 LAMP 法可方便、快速检测肺部感染的常见病原菌,敏感性高于痰培养法。

关键词: 病原检测; 常见病原菌; 环介导等温扩增方法; 下呼吸道感染; 临床应用

中图分类号: R 446.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-2705(2011)06-0001-03

Application of loop-mediated isothermal amplification for pathogens in respiratory tract

CHEN Yu-sheng, WANG Da-xuan, CHEN Wen-ying, et al.

Fujian Medical University, Fujian Provincial Hospital; The Department of Respiratory Medicine of Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, China

Abstract: **Objective** To detect nucleic acids of 11 common pathogenic bacteria in lower respiratory tract from pneumonia patients by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and evaluate its clinical application. **Methods** Qualified sputum samples from 289 patients with lower respiratory infections were collected during 2009-2010 in Fujian provincial hospital and were detected by LAMP method. Comparing with routine sputum culture, the sensitivity and specificity of LAMP method were analyzed. **Results** It took 2~3 hours only for one LAMP assay, significantly shorter than that for sputum culture method. With $>1 \times 10^3$ copies of bacteria as a positive threshold, the sensitivity was 74.0% and specificity 95.3%. The sensitivity for LAMP was significantly higher than sputum culture. The positive rate was 42.9% (124/289). **Conclusion** LAMP method is a convenient and rapid assay for detecting common pathogens of lower respiratory tract infections. The sensitivity of LAMP were higher than that of conventional culture method for clinical diagnosis.

Key Words: Pathogen test; Common Pathogens; Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP); Lower Respiratory Tract Infection; Clinical Application

目前,抗生素在临床上的使用十分普遍,但呼吸道感染发生率和死亡率仍居高不下,缺乏敏感、快速检测的方法以指导临床早期针对性用药是重要原因之一。传统细菌培养周期长,阳性率低,对特殊病原菌如肺炎支原体等的检测能力弱,难以满足临床需求。环介导等温扩增技术(Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP)^[1]具有特异性强、灵敏度高、快速准确和操作简单等优点,被广泛应用于生物学各个领域。本研究采用 LAMP 法检测下呼吸道感染的 11 种常见病原菌,探讨其临床应用价值。

基金项目:福建省科技厅科技计划项目(No. 2009Y0010),福建省卫生厅医学创新课题(No. 2009CXB-2)。

第一作者简介:陈愉生(1957—),女,主任医师。专业:肺部感染与肺部肿瘤。E-mail: slyyywb@yahoo.com.cn。

1 对象与方法

1.1 研究对象 2009 年 1 月至 2010 年 12 月福建省立医院呼吸科住院的肺炎患者 289 例,其中男性 198 例,女性 91 例,平均年龄(64.3±17.0)岁。其中社区获得性肺炎患者 285 例(基础疾病为慢性阻塞性肺炎 69 例,支气管扩张 43 例,支气管哮喘 8 例),医院获得性肺炎 4 例。入选患者均符合中华医学会呼吸病学分会制定的社区获得性肺炎和医院获得性肺炎诊断标准^[2,3]。

1.2 研究方法

1.2.1 痰液收集及处理 痰样品细菌核酸提取流程、痰样品核酸 LAMP 反应流程参见文献^[4]。

1.2.2 结果分析 根据所检测 11 种病原菌中每种

细菌4管标准品的理论拷贝数和出峰时间,确定标准曲线。根据痰样品的出峰时间,利用标准曲线推算出模板浓度。痰样品细菌浓度推算:痰样品细菌浓度(copies/mL) = 模板浓度(copies/ μ L) \times 100/0.6。

1.3 数据处理 结果数据均采用 SPSS 17.0 统计软件分析。配对的计数资料之间两两比较采用 McNemar χ^2 检验,若有1格理论频数小于1采用 Fisher's 精确检验,双侧检验进行统计学推断。 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LAMP 法的阳性检出率 289 例患者痰样品

表1 痰培养方法和 LAMP 法对常见病原体检出结果的比较(%)

Table 1 Compare with sputum culture and LAMP assay of the different pathogens detection results(%)

痰培养结果		10^3			10^4			10^5		
		阳性	阴性	Se(Sp)	阳性	阴性	Se(Sp)	阳性	阴性	Se(Sp)
肺炎链球菌	阳性	3	0	100.0(94.1)	3	0	100.0(95.1)	3	0	100.0(96.2)
	阴性	17	269		14	272		11	275	
金黄色葡萄球菌	阳性	1	1	50.0(99.7)	1	1	50.0(100.0)	0	2	0(100.0)
	阴性	1	286		0	287		0	287	
大肠埃希菌	阳性	1	0	100.0(98.6)	1	3	100.0(99.0)	1	0	100.0(99.7)
	阴性	4	284		0	285		1	287	
肺炎克雷伯杆菌	阳性	7	5	58.3(95.3)	6	6	50.0(97.5)	4	8	33.3(98.6)
	阴性	13	264		7	270		4	273	
铜绿假单胞菌	阳性	13	1	92.9(90.2)	13	1	92.9(91.6)	11	3	78.6(95.6)
	阴性	27	248		23	252		12	263	
鲍曼不动杆菌	阳性	8	2	80.0(98.9)	7	3	70.0(99.6)	5	5	50.0(99.6)
	阴性	3	276		1	278		1	278	
嗜麦芽窄食单胞	阳性	2	2	50.0(96.5)	2	2	50.0(96.8)	1	3	25.0(98.2)
	阴性	10	275		9	276		5	280	
流感嗜血杆菌	阳性	2	2	50.0(88.8)	1	3	25.0(89.8)	1	3	25.0(92.3)
	阴性	32	253		29	256		22	263	
合计	阳性	37	13	74.0(95.3)	34	16	68.0(96.2)	26	24	52.0(97.5)
	阴性	107	2155		86	2176		56	2206	

2.2.2 LAMP 法检测出的其他病原菌 ① 对 289 份标本中 23 份疑似肺炎支原体标本进行肺炎支原体血清学抗体检测,阳性 13 例;LAMP 法对 289 份样品进行肺炎支原体检测,肺炎支原体浓度 $> 10^3$ 有 39 例,其中 $> 10^4$ 有 35 例, $> 10^5$ 有 31 例,根据文献所示,以细菌浓度 $> 1 \times 10^5$ 以上为确诊标准^[2],阳性率 10.7%。② 所有标本痰培养和 LAMP 方法均未检出军团菌。③ 痰培养方法未检出肺炎衣原体, LAMP 方法检出 2 例。

3 讨论

目前传统细菌培养已难满足临床有效治疗肺部

中,细菌浓度拷贝数 $> 1 \times 10^3$ 、 $> 1 \times 10^4$ 、 $> 1 \times 10^5$ 为阳性界值的检出率依次为 42.9%(124 例)、38.8%(112 例)和 33.2%(96 例)。(含混合感染)

2.2 LAMP 法与痰培养法比较

2.2.1 对常见病原菌检测结果比较 289 份痰样品中,痰培养法 8 种常见菌有 44 人份阳性,阳性率 15.2%;LAMP 法以细菌浓度 $> 1 \times 10^3$ 为阳性阈值,其阳性率为 42.9%,LAMP 技术明显高于痰培养($\chi^2 = 80.98, P < 0.01$),敏感性(Se)74.0%,特异性(Sp)95.3%,且仅需 2~3 h(痰培养法需 16~18 h),见表 1。从表可见,“ 10^3 ”为界值的敏感性(74.0%)高于“ 10^4 ”(68.0%)与“ 10^5 ”(52.0%)界值。

感染的要求。本研究采用 LAMP 技术对常见的肺炎 11 种病原体进行检测,全过程从痰液标本处理到结果判定仅需 2~3 h,与传统痰培养法(16~18 h)相比,整个检测过程耗时短,除嗜肺军团菌外,其余 10 种病原体扩增结果均见阳性反应。分别比较细菌浓度 $> 1 \times 10^3$ 、 $> 1 \times 10^4$ 及 $> 1 \times 10^5$ 时的阳性率,LAMP 技术的检测总敏感性均显著高于痰培养,界值越低,其敏感性越高,但特异性较低;界值越高,敏感性越低,但特异性升高。比较检出病原体在 $> 1 \times 10^3$ 、 $> 1 \times 10^4$ 及 $> 1 \times 10^5$ 时的敏感性,发现肺炎链球菌和大肠埃希菌在 3 个界值的敏感性均最高;流感嗜血杆菌、肺炎链球菌、

(下转第 17 页)

环境下生存与传播^[2], 我市报告呈现明显季节性, 2008年5月发病高峰与手足口病纳入丙类法定传染病报告管理有关; 2009—2010年出现的4~5月和9月双高峰, 与梁秀芳等^[3]报道的5~7月为高发季节有差异, 考虑与我市4~5月正值春夏交替阴雨季节, 温湿度适宜 EV71型等肠道病毒生存与传播有关; 9月出现的第2次高峰可能与我市秋季气温仍较高有关。

城区发病率高于农村, 与有关报道一致^[4]。可能与城区人口密集易于传播、居民对手足口病的关注度更高、城区内幼托机构多、相当部分民办幼托机构设施条件较差、空气流通不畅、儿童洗手消毒和共用玩具消毒等预防措施不严有关。

病例构成以5岁以下散居儿童为主。我市5岁以下儿童病例占95.5%, 散居儿童占75.0%, 可能因其抗体水平较低^[5]、近年来本市加强托幼机构手足口病防控工作、以及低年龄组儿童入托比例较低有关。提示在做好托幼机构防控措施的同时, 要加强对散居儿童家长的防控知识宣教, 提高防控意识和自我保护能力。

我市手足口病主要由EV71型和CoxA16型引起, 其中EV71型占80%, 死亡确诊病例均由EV71

型引起, 目前尚无安全有效的疫苗^[6]。为此, 应采取各种方式积极开展防治知识宣传, 使5岁以下儿童家长及托幼机构工作人员等了解此病临床症状, 掌握最基本的预防措施, 强调保持良好的个人卫生习惯及环境卫生措施, 主动参与防控工作, 形成群防群控。切实做好以散居儿童为重点人群和以托幼机构、医疗机构为重点场所的预防控制工作^[2]。

参考文献

- [1] 欧剑鸣, 洪荣涛, 蔡少健, 等. 2008年福建省手足口病疫情分析[J]. 海峡预防医学杂志, 2009, 15(3): 8-10.
- [2] 卫生部. 手足口病预防控制指南 2009年版[EB/OL]. [2009-6-4]. <http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/mohbgt/s3582/200906/41047.htm>.
- [3] 梁秀芳, 黄惠敏, 谢梦, 等. 上海市杨浦区2005-2008年手足口病流行病学分析[J]. 中华疾病控制杂志, 2010, 14(6): 512-515.
- [4] 陈少军, 常心乐, 周荣光. 句容市2009年手足口病流行病学特征分析[J]. 江苏卫生保健, 2010, 12(5): 18-19.
- [5] 周世力, 李琳琳, 何雅青. 深圳市肠道病毒71型血清流行病学初步调查[J]. 热带医学杂志, 2007, 7(1): 66-67.
- [6] 田玲, 汪楠, 张宏梁, 等. 手足口病(EV71)防治[J]. 首都医科大学学报, 2008, 29(3): 253-256.

收稿日期: 2011-06-17; 修回日期: 2011-07-25

责任编辑: 黄春燕; 英文编辑: 范新宇

(上接第2页)

嗜麦芽窄食单胞菌和铜绿假单胞菌 LAMP 法检出率明显高于痰培养; 鲍曼不动杆菌检出率低于痰培养, 原因可能与该致病菌生活条件要求低, 极易培养, 而 LAMP 技术由于同时加入多条引物可出现引物互补扩增出现非特异性的条带, 出现假阳性有关^[5], 故结果判读必须选择合适的标准。标准过低, 特异性降低, 假阳性结果可能影响临床诊断, 导致抗生素过度应用; 标准过高, 可导致漏诊。本研究表明, 大多病原菌在拷贝数 $> 1 \times 10^3$ 时有 74.0% 的敏感性及 95.3% 的特异性。此敏感性高于传统方法。本研究对象痰培养的敏感性仅为 15.2% (44/289)。LAMP 技术结合临床表现可达到诊断要求。

肺炎链球菌、流感嗜血杆菌由于生活条件较苛刻, 在普通培养基中难以生存, 故痰培养阳性率低, 但在 LAMP 检测均有明显的阳性检出, 与 Seki M^[6] 的研究吻合, 可作为一个可靠且敏感的检测手段。支原体临床上难以培养和检测, 但 LAMP 检测以拷贝数 $> 1 \times 10^5$ 共检出 31 例 (10.7%), 该结果与血清学 IgM 抗体检测阳性率 11.49% 相仿^[7], 遗憾的是本研究未对其血清急性期和恢复期抗体进行相应的检测, 故难以评估其特异性、敏感性。

综上所述, LAMP 方法可快速、高效、特异地检测肺部的感染常见病原体, 敏感性、特异性高, 可用于临床检测。使用该检测方法指导临床用药, 有望提高初始治疗有效率, 缩短住院时间, 可望替代细菌培养, 成为快速诊断的病原诊断方法。

参考文献

- [1] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): E63.
- [2] 中华医学会呼吸病学分会. 社区获得性肺炎诊断和治疗指南 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2006, 29: 651-655.
- [3] 中华医学会呼吸病学分会. 医院获得性肺炎诊断和治疗指南 (草案) [J]. 现代实用医学, 2002, 14: 160-161.
- [4] 戴然然, 刘嘉琳, 万欢英. 环介导等温扩增技术在检测细菌性肺炎常见致病菌中的应用 [J]. 国际呼吸杂志, 2011, 31(8): 576-580.
- [5] 杨锡光. 环介导等温扩增技术在下呼吸道感染病原菌诊断上的应用. 南昌: 南昌大学, 2008.
- [6] Seki M, Yamashita Y, Torigoe H, et al. Loop-mediated isothermal amplification method targeting the *lyt A* gene for detection of streptococcus pneumoniae [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(4): 1581-1586.
- [7] 潘明安, 张天托, 朱家馨, 等. 社区获得性呼吸道感染肺炎支原体检测方法比较 [J]. 中国医药导报, 2010, 9(25): 5-6.

收稿日期: 2011-09-29 责任编辑: 方林; 英文编辑: 范新宇