

环介导等温扩增技术在下呼吸道感染常见病原体检测中的应用

陈愉生 王大璇 李鸿茹 陈焯颖 张祥娥 邵慧 许能奎
林明 王璨 闫胜龙 胡辛兰 高占成

【摘要】 目的 应用环介导等温扩增(LAMP)技术对下呼吸道感染患者痰标本中常见致病菌进行核酸检测,调查病原菌的分布,研究 LAMP 技术对下呼吸道感染病原体检测的临床意义。方法 收集福建省立医院呼吸科下呼吸道感染患者 289 例的合格痰标本 289 份,LAMP 技术检测病原体,分析下呼吸道感染病原菌的分布,并与传统的培养法进行比较。将细菌浓度 $> 1 \times 10^3$ 拷贝/ml 的病例分为初治已覆盖病原体组和初治未覆盖病原体组,比较两组患者年龄、有无基础疾病、抗感染治疗时间、总住院时间、初治有效率及治愈率。结果 289 例患者中培养法阳性 44 例(15.2%)。LAMP 技术检测以细菌浓度 $> 1 \times 10^3$ 拷贝/ml 为界值,判定为阳性结果的有 124 例(43.0%)。下呼吸道分离的病原菌中细菌 144 株(77.8%),非典型病原菌 41 株(22.2%);革兰阴性杆菌为主要致病菌,依次为铜绿假单胞菌、流感嗜血杆菌、肺炎克雷伯菌及肺炎链球菌。初治已覆盖病原体组(95 例)和初治未覆盖病原体组(29 例)的总住院时间分别为 (13.9 ± 9.1) 和 (16.3 ± 11.2) d,差异有统计学意义($t = -2.083, P = 0.039$);初治有效率两组分别为 31.0% (29/95) 和 93.1% (27/29),差异有统计学意义($\chi^2 = 31.0, P < 0.01$);两组的抗感染治疗时间 [(13.9 ± 9.1) 和 (16.3 ± 11.2) d] 比较,差异无统计学意义($t = -1.073, P = 0.285$);两组的治愈率分别为 84.2% (80/95) 和 95.7% (28/29),差异无统计学意义($\chi^2 = 0.6, P = 0.4$)。结论 LAMP 技术简便,可快速扩增肺部感染患者痰液中常见致病菌核酸,检出率明显高于传统的痰培养法。LAMP 技术有利于治疗前明确致病菌并进行针对性治疗,缩短患者的住院时间,提高初始治疗的有效率。

【关键词】 呼吸道感染; 细菌; 环介导等温扩增技术

The application of loop-mediated isothermal amplification for detection of common pathogenic bacteria in lower respiratory tract infections Chen Yusheng*, Wang Daxuan, Li Hongru, Chen Wenyong, Zhang Xiang'e, Shao Hui, Xu Nengluan, Lin Ming, Wang Can, Yan Shenglong, Hu Xinlan, Gao Zhancheng. *The Department of Respiratory Medicine, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, China Corresponding author: Chen yusheng, Email: slyyywb@126.com; Gao Zhancheng, Email: gaozhancheng5446@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the spectrum of common pathogenic bacteria of low respiratory tract infection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of nucleic acid test and to prove the clinical significance of this method. **Methods** A total of 289 qualified sputum samples from patients with lower respiratory tract infections in Fujian Province were detected by LAMP technique, and then the distribution of pathogenic bacteria was analyzed. The positive cases (the patients whose specific bacterial copies in their sputum samples $> 1 \times 10^3$ copies/ml) were divided into 2 groups according to whether their treatment had covered this pathogen or not. The underlying diseases, duration of anti-bacterial treatment, the hospital days, and the effectiveness of initial treatment and cure rate were compared. **Results** The culture method in the 289 patients showed that 44 (15.2%) were positive. Tests by the LAMP method with a bacteria concentration $> 1 \times 10^3$ copies/ml as cutoff value, showed positive results in 124 patients

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2014.04.010

基金项目:福建省科技计划项目(2009Y0010,2012Y0016);国家“863 计划”课题(2006AA02Z4A9)

作者单位:350001 福州,福建医科大学省立临床医学院福建省立医院呼吸科(陈愉生、李鸿茹、张祥娥、许能奎、林明),临床医学院(王大璇),急诊内科(陈焯颖),高干科(邵慧),检验科(胡辛兰);北京博奥生物有限公司(王璨、闫胜龙);北京大学人民医院呼吸与危重医学科(高占成)

通信作者:陈愉生,Email:slyyywb@126.com;高占成,Email:gaozhancheng5446@163.com

(43.0%)。The lower respiratory tract pathogens included 144 strains of bacteria (77.8%), and 41 strains of atypical pathogens (22.2%)。Gram-negative bacteria were the predominant pathogens, such as *Pseudomonas aeruginosa*, *H. influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Streptococcus pneumoniae*。In 95 cases the initial therapy had covered the pathogens, while in 29 cases the initial therapy had not. The effectiveness of the initial treatment ($\chi^2 = 31.0$, $P < 0.01$) and the total days of hospital stay ($t = -2.083$, $P = 0.039$) in the group whose antibiotics had covered the pathogens were significantly higher than those of the other group. However, there were no significant difference in duration of anti-bacterial treatment ($t = -1.073$, $P = 0.285$) and cure rates ($\chi^2 = 0.6$, $P = 0.4$) between the 2 groups. **Conclusions** LAMP method can detect the nuclear acid of the bacteria in the sputum much more rapidly and sensitively than the routine culture method. LAMP technique may be helpful to know the pathogenic bacteria before treatment, and therefore may improve the choice of initial antibiotic therapy.

【Key words】 Respiratory tract infections; Bacteria; Loop mediated isothermal amplification

下呼吸道感染居各类感染之首,其病死率居高不下。主要的原因是没有及时获得正确的诊断和治疗。传统的细菌学检验与鉴定需要进行细菌培养或免疫学检测,费时费力,对于部分培养周期长的细菌或需要特殊培养条件的细菌往往不能及时为临床提供准确的鉴定结果,因而延误病情的治疗。因此只有根据病原体检测结果合理使用抗生素,才能使大部分下呼吸道感染患者得到及时有效的治疗。2000 年 Notomi 等^[1]首先发布了环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术,以其特异度高、敏感度高、快速准确和操作简单、技术水平要求相对较低及所需试验器材简单等优点被广泛应用于生物学的各个领域,可被推广用于感染性疾病的诊断和病原体的检测。

对象与方法

1. 对象:收集 2009 年 1 月至 2010 年 12 月福建省立医院呼吸科住院肺炎患者 289 例,男 198 例,女 91 例,年龄 22 ~ 89 岁,平均 (64.3 ± 17.0) 岁。其中社区获得性肺炎 174 例,慢性阻塞性肺疾病急性加重 60 例,支气管扩张伴感染 43 例,慢性支气管炎急性发作 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^[2]和医院获得性肺炎诊断标准^[3]。289 例共收集合格痰标本 289 份。将 LAMP 技术检测阳性的 124 例,分为初治已覆盖病原体组(95 例,男 62 例,女 33 例)和初治未覆盖病原体组(29 例,男 22 例,女 7 例)。

2. 研究方法:痰液收集及处理、痰样品细菌核酸提取流程及痰样品核酸 LAMP 反应流程详见文献[4]。传统的细菌培养及鉴定方法是下呼吸道分泌物标本 2 h 内分别接种于血平板、巧克力平板和中国蓝平板上,置于 35 °C 恒温培养箱中孵育 24 h,挑取优势菌落进行细菌鉴定。应用法国生物梅里埃公司的 VITEK2. compact 全自动细菌分析仪

进行细菌鉴定。LAMP 技术检测阳性的 124 例均在入院当天即给予抗生素治疗,并对初治已覆盖病原体组和初治未覆盖病原体组进行比较。

3. 结果分析:根据所检测的 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。根据痰标本的出峰时间,利用标准曲线推算出模板浓度。痰标本大致细菌浓度的推算:痰标本中的细菌浓度(拷贝/ml) = 模板浓度(拷贝/μl) × 100/0.6。以细菌浓度 > 1 × 10³ 拷贝/ml 判定为阳性结果^[5]。

4. 统计学处理: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 < 1 时采用 Fisher 精确检验,双侧检验进行统计学推断。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. LAMP 法检测结果:应用实时荧光定量方法检测,测定出的痰标本中细菌浓度分别以 1 × 10³ 拷贝/ml 和 1 × 10⁵ 拷贝/ml 为界值,计算每个界值范围内阳性结果的例数,具体数据见表 1。

289 份标本中细菌浓度 > 1 × 10³ 拷贝/ml 为界值的判定为阳性结果,共有 124 例(43.0%),共检测出病原菌 185 株,其中细菌 144 株,非典型病原菌 41 株;革兰阴性杆菌 122 株,革兰阳性球菌 22 株。革兰阴性杆菌中致病菌依次为铜绿假单胞菌 40 株(21.6%),流感嗜血杆菌 34 株(18.4%),肺炎克雷伯菌 20 株(10.8%),嗜麦芽窄食单胞菌 12 株(6.5%),鲍曼不动杆菌 11 株(5.9%),大肠埃希菌 5 株(2.7%)。非典型病原菌中肺炎支原体 39 株(21.1%),肺炎衣原体 2 株(1.1%),军团菌未检出。革兰阳性菌中肺炎链球菌 20 株(10.8%),金黄色葡萄球菌 2 株(1.1%)。124 例阳性患者中,80 例(64.5%)为单一致病菌感染,44 例为复合病

表 1 不同界值范围内细菌阳性结果比较(株数)

界值(拷贝/ml)	Spn	sau	cpn	Mpn	hin	sma	aba	pae	kpn	eco	合计
<10 ³	12	10	0	18	24	0	12	0	40	18	134
10 ³ ~10 ⁵	8	1	0	9	12	3	5	21	16	2	77
>10 ⁵	12	1	2	30	22	9	6	19	4	3	108

注:Spn:肺炎链球菌;sau:金黄色葡萄球菌;cpn:肺炎衣原体;Mpn:肺炎支原体;hin:流感嗜血杆菌;sma:嗜麦芽窄食单胞菌;aba:鲍曼不动杆菌;pae:铜绿假单胞菌;kpn:肺炎克雷伯菌;eco:大肠杆菌

原菌感染(35.5%),其中2种病原体混合感染36例(29.0%),3种病原体混合感染6例(4.8%),4种病原体混合感染1例(0.8%),5种病原体混合感染1例(0.8%)。

2. LAMP技术和培养法对各种病原菌检出率的比较:LAMP技术检测的肺炎链球菌、铜绿假单胞菌、流感嗜血杆菌,嗜麦芽窄食单胞菌的阳性率高于培养法,两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$),但LAMP技术仅检出肺炎支原体39株,肺炎衣原体2株,因样本量少未进行比较。故只能对其他8种常见细菌进行比较,具体结果见表2。

表 2 环介导等温扩增技术和培养法对各种病原菌菌株检出率的比较(298例)

病原体	痰培养阳性(株)	LAMP技术阳性(株)	χ^2 值	P值
肺炎链球菌	3	20	15.05	<0.05
金黄色葡萄球菌	2	2	0.5	>0.05
大肠埃希菌	1	5	2.25	>0.05
肺炎克雷伯菌	12	20	2.72	>0.05
铜绿假单胞菌	14	40	24.12	<0.05
鲍曼不动杆菌	10	11	0	>0.05
嗜麦芽窄食单胞	4	12	4.08	<0.05
流感嗜血杆菌	4	34	24.73	<0.05
合计	50	144	76.54	<0.05

3. 不同基础疾病患者病原菌的构成:289例中,社区获得性肺炎患者174例,慢性阻塞性肺疾病急性加重患者60例,支气管扩张伴感染患者43例,慢性支气管炎急性发作患者8例,医院获得性肺炎患者4例,其病原菌构成见表3。

4. LAMP技术检测结果:LAMP技术检测的124例,其中男83例,女性41例,年龄17~89岁,平均(60±15)岁。住院天数为3~56d,平均(14±9)d,均在入院当天给予抗生素治疗,选择频率较高的药物主要有喹诺酮单用或联合大环内酯类、三代头孢菌素、β-内酰胺类/β-内酰胺酶抑制剂。初治未覆盖病原体组和初治已覆盖病原体组年龄、是否有基础疾病、抗感染治疗时间、总住院时间、初治有效率以及治愈率见表4。死亡患者6例,均为老年合

并基础疾病患者。

表 3 不同基础疾病患者的病原菌构成(株数)

病原菌	社区获得性肺炎(174例)	慢性阻塞性肺疾病急性加重(60例)	支气管扩张伴感染(43例)
肺炎链球菌	12	3	4
金黄色葡萄球菌	1	1	0
大肠埃希菌	3	2	0
肺炎克雷伯菌	11	6	3
铜绿假单胞菌	21	6	13
鲍曼不动杆菌	5	5	1
嗜麦芽窄食单胞	6	3	2
流感嗜血杆菌	20	7	6
肺炎支原体	30	5	4
肺炎衣原体	2	0	0
合计	111	38	33

表 4 环介导等温扩增技术检测阳性患者的一般情况、初始治疗有效率和治愈率

临床资料	初治未覆盖病原体组(29例)	初治已覆盖病原体组(95例)	t/χ^2 值	P值
年龄(岁) ^a	59±18	63±8	-1.793	>0.05
合并基础疾病(例)	23	77	0.043	>0.05
抗感染治疗时间(d) ^a	14±9	16±11	-1.073	>0.05
住院时间(d) ^a	14±8	18±10	-2.083	<0.05
初始治疗有效率(%)	31.0	84.2	31.0	<0.05
治愈率(%)	93.1	95.7	0.6	>0.05

注:^a $\bar{x} \pm s$

LAMP技术检测的病原学结果显示,初始治疗未覆盖病原体组的病原菌谱前3位依次为铜绿假单胞菌(31%)、肺炎克雷伯菌(27.6%)和肺炎支原体(20.6%);初始治疗覆盖病原体组的病原菌谱依次为流感嗜血杆菌(27.4%)、肺炎支原体(25.3%)及铜绿假单胞菌(16.8%),见表5。

讨论

本课题组前期研究使用环介导等温扩增技术检测呼吸道病原体的敏感度明显高于普通细菌培养法,有望在临床得到使用^[4]。本研究进一步分析利用该技术检测124例致病菌阳性患者致病菌的构成状况,其中革兰阴性杆菌122株,占185株菌株中

表 5 两组患者病原学分布情况(例)

病原菌	初治已覆盖病原体组(95 例)	初治未覆盖病原体组(29 例)
肺炎链球菌	12(12.6)	5(17.2)
大肠杆菌	1(1.1)	2(6.9)
肺炎克雷伯菌	12(12.6)	8(27.6)
铜绿假单胞菌	16(16.8)	9(31.0)
鲍曼不动杆菌	3(3.1)	5(17.2)
嗜麦芽窄食单胞菌	4(4.2)	2(6.9)
流感嗜血杆菌	26(27.4)	4(13.7)
嗜肺军团菌	0(0.0)	0(0.0)
金黄色葡萄球菌	1(1.1)	3(3.4)
肺炎支原体	24(25.3)	6(20.6)
肺炎衣原体	2(2.1)	0

注:括号内为百分比(%)

的 65.9%,与蒋丽莉等^[6]报道的结果一致,表明目前呼吸科病房下呼吸道感染的病原菌以革兰阴性杆菌为主。本研究结果显示,革兰阴性菌依次为铜绿假单胞菌、流感嗜血杆菌及肺炎克雷伯菌,其原因可能与呼吸科住院患者的年龄偏大、多数患者合并基础疾病、病情严重且多数患者入院前曾自服抗生素或者有院外诊治史有关。本研究中慢性阻塞性肺疾病急性加重患者 60 例,同时少数患者由于长期气道疾病导致气道结构改变而存在铜绿假单胞菌的定植,因此可能是本研究中铜绿假单胞菌检出率高的原因,与王望东等^[7]的结果类似。在本研究中社区获得性肺炎患者占病例总数的 60.2%,而流感嗜血杆菌的检出率高达 18.5%,表明目前流感嗜血杆菌仍为社区获得性肺炎的主要致病菌^[8]。本研究中肺炎支原体(20.7%)与肺炎链球菌(18.5%)的检出率与刘又宁等^[9]的结果相近。另外,本研究中以 2 种病原体混合感染者居多,提示临床医生在使用抗生素时要考虑联合应用,有效覆盖致病菌。

本研究结果显示,社区获得性肺炎病原菌检出阳性率达 63.8%,其中前 4 位依次为肺炎支原体、铜绿假单胞菌、流感嗜血杆菌和肺炎链球菌,与刘又宁等^[9]的结果相似,但铜绿假单胞菌检出率高考虑为所入选患者大部分为老年患者,多有长期的基础疾病史,且入院时大部分患者已使用过抗生素。文献报道 50%~80% 的慢性阻塞性肺疾病急性加重是由于呼吸道感染所致,其中细菌感染占 40%~50%^[10-12],本研究中 60 例慢性阻塞性肺疾病急性加重患者中 37 例检测出病原菌,前 4 位依次为流感嗜血杆菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌。张金松等^[13]发现,慢性阻塞性肺疾病急性加重患者痰标本中分离确认的 82 株病原菌依次为铜绿

假单胞菌、肺炎克雷伯菌和不动杆菌属,与本研究结果相似。文献报道,支气管扩张稳定期患者中 50% 以上呼吸道存在潜在致病菌定植^[14],最常见的为铜绿假单胞菌,而罗志扬等^[15]发现,支气管扩张感染加重期患者呼吸道分泌物的培养结果依次为铜绿假单胞菌、大肠杆菌、鲍曼不动杆菌和肺炎克雷伯菌。本研究中 43 例支气管扩张伴感染中 33 例检测出细菌,其中以铜绿假单胞菌为多(13 株),其余菌种检出量偏少,可能与样本量偏少有关,有待扩大样本量进一步研究。

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: 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]. *中华结核和呼吸杂志*, 1999, 22: 201.
- [4] 陈愉生,王大璇,陈焱颖,等. 环介导等温扩增技术在呼吸下呼吸道感染病原体检测中的应用 [J]. *海峡预防医学杂志*, 2011, 17: 13.
- [5] Kang Y, Deng R, Wang C, et al. Etiologic diagnosis of lower respiratory tract bacterial infections using sputum samples and quantitative loop-mediated isothermal amplification [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e38743.
- [6] 蒋丽莉,何燕,龚敏,等. 214 株下呼吸道感染主要病原菌分布与耐药性分析 [J]. *重庆医学*, 2011, 40: 40-42.
- [7] 王望东,王丽,李顺清. 慢性阻塞性肺疾病急性加重期下呼吸道感染病原学检测及耐药分析 [J]. *检验医学与临床*, 2011, 8: 1485-1486.
- [8] 黄海辉,张婴元,黄绍光,等. 上海地区社区获得性肺炎的病原学调查 [J]. *中国抗感染化疗杂志*, 2003, 3: 321-324.
- [9] 刘又宁,赵铁梅,姚婉贞,等. 北京地区成人社区获得性肺炎非典型病原体流行病学调查 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2004, 27: 27-30.
- [10] Groenewegen KH, Wouters EF. Bacterial infections in patients requiring admission for an acute exacerbation of COPD: a 1-year prospective study [J]. *Respir Med*, 2003, 97: 770-777.
- [11] Papi A, Bellettato CM, Braccioni F, et al. Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 173: 1114-1121.
- [12] Monso E, Garcia-Aymerich J, Soler N, et al. Bacterial infection in exacerbated COPD with changes in sputum characteristics [J]. *Epidemiol Infect*, 2003, 131: 799-804.
- [13] 张金松,茅敏华,姜觉如. AECOPD 病原菌分布及耐药性分析 [J]. *临床肺科杂志*, 2011, 16: 695-696.
- [14] Yang S, Lin S, Khali A, et al. Quantitative PCR assay using sputum samples for rapid diagnosis of pneumococcal pneumonia in adult emergency department patients [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43: 3221-3226.
- [15] 罗志扬,甄国粹,张培芳,等. 支气管扩张患者感染加重期的病原菌分布及耐药性 [J]. *中国综合临床*, 2005, 21: 404-405.

(收稿日期:2013-08-02)

(本文编辑:李文慧)