

环介导等温扩增检测在下呼吸道感染病原菌检查中应用价值

杨雪飞, 彭攀, 焦长锁, 刘爱玲, 田培

濮阳市疾病预防控制中心, 河南 濮阳 457000

摘要: **目的** 探讨环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)法检测下呼吸道感染病原菌的临床应用价值。 **方法** 选取濮阳市疾病预防控制中心 2016 年 1 月–2017 年 10 月收集的 180 份符合要求的下呼吸道感染患者的痰标本,分别采用痰培养、LAMP 法进行检测,比较痰培养与 LAMP 法对各种致病菌的检出率,并分析抗感染的治疗情况。 **结果** 痰培养革兰阴性菌检出率 18.89% 低于 LAMP 法的 43.33% ($P<0.05$);痰培养革兰阳性菌检出率 6.11% 低于 LAMP 法的 13.33% ($P<0.05$);LAMP 法对下呼吸道感染患者痰液中铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌的检出率分别为 21.11%、7.22%,均高于痰培养的 7.22%、2.78%,差异有统计学意义 ($P<0.05$);LAMP 法病原菌检出率 56.67% 显著的高于痰培养法的 25.00% ($\chi^2=37.356, P<0.001$);180 例下呼吸道感染患者于入院当天即给予抗生素进行治疗,其中 35 例患者初始治疗未覆盖病原体、145 例患者初始治疗覆盖病原体;初始治疗覆盖病原体组患者的抗感染治疗时间 (14.3 ± 2.9)d、住院时间 (14.5 ± 3.2)d 均显著的低于初始治疗未覆盖病原体组的 (16.0 ± 3.2)d、(18.4 ± 3.8)d,差异有统计学意义 ($P<0.05$),初始治疗覆盖病原体组患者的初始治疗有效率 86.21% 高于初始治疗未覆盖病原体组的 40.00% ($P<0.05$)。 **结论** LAMP 检测在下呼吸道感染病原菌的效果较痰培养更好,对于临床治疗具有重要的指导意义。

关键词: 环介导等温扩增;下呼吸道感染;病原菌

中图分类号:R563.1 **文献标识码:**B **文章编号:**1006-3110(2019)06-0759-03 **DOI:**10.3969/j.issn.1006-3110.2019.06.036

流行病学研究表明,近年来下呼吸道感染发生率呈明显的上升趋势,下呼吸道感染的发生率可达 372~482/1 万人左右^[1],特别是在季节交替或者高危流行病区,下呼吸道感染的发生率可进一步的上升^[2]。下呼吸道感染的早期诊断以及病原体的鉴别,能够在疾病的早期指导临床用药。环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是新型的恒温扩增 PCR 检测技术,其能够通过对于病毒、细菌等病原体的遗传基因的检测,进而提高早期不同病原体的分布检测水平。有研究者报道了 LAMP 在上呼吸道感染或者泌尿生殖道感染过程中的作用,认为 LAMP 能够显著提高早期病原体感染的诊断效能^[4]。本研究以下呼吸道感染病原菌为主,选取了濮阳市疾病预防控制中心 2016 年 1 月–2017 年 10 月收集的 180 份符合要求的患者标本,通过痰培养和 LAMP 的结果对比,探讨 LAMP 在早期诊断病原体感染中的作用,并分析不同早期病原体治疗覆盖情况对于治疗结局的影响,现将结果报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取本中心 2016 年 1 月–2017 年 10

作者简介:杨雪飞(1970–),男,河南滑县人,本科学历,副主任技师,研究方向:微生物检验。

月收集的 180 例下呼吸道感染患者,年龄 45~79 岁,平均为 (64.8 ± 13.0) 岁,男 110 例、女 70 例。基础疾病:其中社区获得性肺炎 147 例,支气管扩张 25 例,支气管哮喘 8 例;吸烟 76 例,合并疾病:高血压 82 例、糖尿病 30 例、高血脂 42 例。纳入标准:①下呼吸道感染的诊断标准参考中华医学会呼吸病学分会制定的社区获得性肺炎、医院获得性肺炎的诊断标准;②采集标本前应用冷开水漱口、用力咳出呼吸道深部痰液,痰液量 >1 ml,痰液呈脓性、黄色、黏液脓性痰、血性;③所有患者均在本中心接受抗感染治疗;④研究获得医学伦理委员会的批准。排除标准:①获得性免疫缺陷综合征;②肝肾功能疾病;③恶性肿瘤患者;④长期使用糖皮质激素类药物。

1.2 痰培养方法 采用诱导痰的方法采集患者的下呼吸道标本,将患者的下呼吸道标本在 2 h 内接种于血平板、巧克力平板及其它选择性培养基上,在 35 ℃ 的温箱孵育 24 h,选出优势的菌落进一步分纯后进行生化血清学的鉴定。

1.3 LAMP 检测方法 采用咽拭子采集患者的下呼吸道分泌物标本,2 ℃~8 ℃ 冷冻离心机中离心 ($12\ 000$ g/min, 15 min),洗涤提取 DNA,配置反应体系、引物混合液、2 倍浓度反应液,在 60 ℃ 水浴锅中放置 1 h,内切酶对 LAMP 进行酶切和电泳分析,具体的

操作步骤按照李丹等^[3]文献报道。Applied Biosystems 仪器购自德国赛默飞公司。

1.4 治疗方法 所有患者入院后均常规给予完善相关检查,根据患者的血常规、胸片等检查评估细菌感染的风险,采用经验性抗感染治疗,在痰培养或 LAMP 结果出来后,根据结果选择针对性的抗生素,并根据下呼吸道感染的患者治疗效果及时调整药物剂量。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计。计量数据表述采用($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 t 检验;计数资料组间比较采用 χ^2 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 痰培养与 LAMP 法细菌检出率比较 对 180 例下呼吸道感染患者痰液采用痰培养与 LAMP 法检测细菌,LAMP 法革兰阴性菌检出率为 43.33%,高于痰培养法的 18.89% ($P<0.05$);痰培养革兰阳性菌检出率为 6.11%,低于 LAMP 法的 13.33% ($P<0.05$);LAMP 法对下呼吸道感染患者痰液中铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌的检出率分别为 21.11%、7.22%,均高于痰培养的 7.22%、2.78%,差异有统计学意义 ($P<0.05$);LAMP 法病原菌检出率 56.67% 显著的高于痰培养法的 25.00% ($\chi^2=37.356, P<0.001$),见表 1。

表 1 痰培养与 LAMP 法对 180 例下呼吸道感染患者痰液细菌检出率比较($n=180$)

病原菌	痰培养		LAMP 法		χ^2 值	P 值
	检出株数	检出率(%)	检出株数	检出率(%)		
革兰阴性菌	34	18.89	78	43.33	22.119	0.000
铜绿假单胞菌	13	7.22	38	21.11	14.278	0.000
肺炎克雷伯菌	6	3.33	12	6.67	2.105	0.147
鲍曼不动杆菌	5	2.78	6	3.33	0.094	0.759
流感嗜血杆菌	3	1.67	5	2.78	0.511	0.475
阴沟肠杆菌	2	1.11	5	2.78	1.311	0.252
大肠埃希菌	3	1.67	6	3.33	1.026	0.311
奇异变形杆菌	1	0.56	3	1.67	1.011	0.315
嗜麦芽窄食单胞菌	1	0.56	3	1.67	1.011	0.315
革兰阳性菌	11	6.11	24	13.33	5.349	0.021
肺炎链球菌	3	1.67	6	3.33	1.026	0.311
金黄色葡萄球菌	5	2.78	13	7.22	3.743	0.053
溶血性葡萄球菌	3	1.67	5	2.78	0.511	0.475

2.2 LAMP 法检测下呼吸道感染病原菌的临床应用价值 180 例下呼吸道感染患者于入院当天即给予抗生素进行治疗,其中 35 例患者初始治疗未覆盖病原

体、145 例患者初始治疗覆盖病原体;结果显示:初始治疗覆盖病原体组患者的抗感染治疗时间、住院时间均显著的低于初始治疗未覆盖病原体组 ($P<0.05$),初始治疗覆盖病原体组患者的初始治疗有效率高于初始治疗未覆盖病原体组 ($P<0.05$),两组患者的治愈率差异无统计学意义 ($P>0.05$),见表 2。

表 2 180 例下呼吸道感染患者治疗情况分析

组别	例数	抗感染治疗时间 ($\bar{d}, \bar{x}\pm s$)	住院时间 ($\bar{d}, \bar{x}\pm s$)	初始治疗有效例数 (率, %)	治愈例数 (率, %)
初治未覆盖病原体组	35	16.0 \pm 3.2	18.4 \pm 3.8	14(40.00)	32(91.43)
初治已覆盖病原体组	145	14.3 \pm 2.9	14.5 \pm 3.2	125(86.21)	142(97.93)
χ^2 值		3.050	6.232	34.223	3.700
P 值		0.003	<0.001	<0.001	0.054

3 讨论

下呼吸道感染的发生主要考虑与局部粘液阻塞、T 淋巴细胞功能障碍有关,特别是在合并有基础性代谢疾病或者糖尿病的患者中,下呼吸道感染的发生率具有进一步的上升趋势。下呼吸道感染的持续进展,能够导致患者重症肺炎或者脓毒血症的发生,增加了患者的不良心肺结局的风险^[5]。临床上早期抗生素的治疗能够在改善疾病整体预后过程中发挥重要作用,但由于不同的病人其感染病原不尽相同,故经验性的抗感染治疗的效果较为局限,如能提高下呼吸道感染的早期病原的检测水平,进而针对性的使用敏感抗生素是影响患者治疗进程与结局的重要因素。常规的病原体检测方式如痰培养,虽然能够提高常见呼吸道感染病原体的检测水平,但其灵敏度较低,检测耗时较长,误诊率较高^[6-7]。例如一项囊括了 162 例样本量的下呼吸道感染痰培养分析可见,单纯痰培养针对病原体感染的灵敏度不足 35%,误诊率可超过 20% 以上^[8],同时由于标本污染、采集过程不规范等因素,进而导致痰培养的可靠性明显不足。

核酸扩增的检测能够在病毒、细菌感染诊断的过程中发挥重要作用,其能够通过对于特定病原体的相应序列进行扩增,进而提高病原体诊断的灵敏度。常规的核酸扩增诊断方式如自主序列复制、聚合酶链式反应等,虽然能够在病原体诊断过程中起到效果,但其检测的便捷性较差,对于温度和仪器具有较高的要求。而 LAMP 能够识辨靶序列上的特异性引物,或者结合链置换性的 DNA 聚合酶,能够在较低的条件要求下实现对于病原体的扩增和检测^[9-10]。部分研究者报道了 LAMP 在诊断上呼吸道感染过程中的价值,认为

LAMP 能够早期指导临床上抗生素的选择,但在下呼吸道感染中的研究不足。

本次研究中通过不同方式的 LAMP 检测分析研究发现,相比于普通的痰培养检测,LAMP 检测病原体感染的灵敏度明显的上升,其中革兰阴性菌、革兰阳性菌或者铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌的检出率均明显的上升,高于痰培养组,差异较为明显,提示了 LAMP 在辅助诊断下呼吸道病原体感染过程中的价值。通过汇集不同的相关文献,笔者认为这主要考虑与 LAMP 的下列几个方面的特点有关^[11-13]:(1) LAMP 对于病原体遗传序列的结合特性较强,其对于病原体序列上的 6 个靶序列均有显著的结合作用,从而提高了 LAMP 诊断的灵敏度;(2) LAMP 能够在常温下进行病原体的检测,不会受到温度的影响而出现显著的检测灵敏度的波动。李文桂等^[14]研究者也认为,LAMP 诊断呼吸道感染的灵敏度明显超过了痰培养,特别是对于铜绿假单胞菌或者葡萄球菌感染的诊断,具有更高的特异性和诊断一致性。但需要注意的是,部分研究者在探讨呼吸道病原体诊断的过程中,并不认为 LAMP 能够提高铜绿假单胞菌或者金黄色葡萄球菌的检出水平^[15],认为铜绿假单胞菌或者金黄色葡萄球菌主要聚集于下呼吸道,特别是细支气管的分叉部位,标本难以采集,标本中的病原体数量较低,LAMP 难以检测。但本次研究中发现了 LAMP 对于两种相关病原体的诊断效果较为明显,存在不同的结论,考虑与 LAMP 标本采集的误差,或者部分患者入院后已经给予了抗生素治疗而影响到了检测结果。初始治疗覆盖病原体组患者的治疗时间明显的缩短,而治疗后的临床总体有效率水平明显的上升,提示了临床上根据呼吸道感染患者的病原体检测结果进行抗感染治疗的重要性。LAMP 对于多数的呼吸道感染病原体能够有效检出,提高了抗生素治疗的覆盖率和针对性。

本次研究的创新性在于探讨了 LAMP 诊断不同病原体的效能。综上所述,LAMP 检测在下呼吸道感染病原菌感染的检测中比痰培养更值得推荐,其快速灵敏的结果对于临床治疗更具有指导意义,值得进一

步推广。

参考文献

- [1] 林华杰,周世娟,周文娟. 2013-2015 年惠东地区儿童呼吸道感染嗜血杆菌感染流行病学特征及耐药性分析[J]. 实用预防医学, 2017,24(7):831-833.
- [2] Jobran S, Kattan R, Shamaa J, et al. Adenovirus respiratory tract infections in infants: a retrospective chart-review study[J]. Lancet, 2018, 391(Suppl 2):S43.
- [3] 李丹,李静宜,董艳青,等. 利用环介导等温扩增技术检测儿童咽拭子标本中肺炎支原体[J]. 山东大学学报(医学版), 2014,52(10):55-60.
- [4] Korten I, Ramsey K, Mika M, et al. Nasal microbiota and respiratory tract infections: the role of viral detection[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2018,34(2):90-92.
- [5] Kumar S. *Mycoplasma pneumoniae*: a significant but underrated pathogen in paediatric community-acquired lower respiratory tract infections[J]. Indian J Med Res, 2018,147(1):23-25.
- [6] 张艳,王红梅,蒋元琴,等. 儿童下呼吸道感染痰涂片与痰培养结果一致性研究[J]. 中国感染控制杂志, 2015,14(9):614-618.
- [7] 杨理理,韩明锋,腾小宝,等. 阜阳地区 120 例发热呼吸道症候群住院患者的细菌病原谱分析[J]. 中华全科医学, 2016,14(7):1111-1113.
- [8] 陈嘉利. 降钙素原联合病原体检测在下呼吸道感染诊断中的应用观察[J]. 中国医药科学, 2015,23(5):126-128.
- [9] 王大璇. 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[D]. 福州:福建医科大学, 2012.
- [10] 唐睿珠,罗正琼,徐秋月,等. 呼吸道病原体核酸恒温扩增芯片十三联检在下呼吸道感染常见病原体基因中的检测[J]. 昆明医科大学学报, 2017,38(1):8-12.
- [11] 曲艳平,温华,苑波,等. 551 例呼吸道感染患者病原学调查与细菌耐药性分析[J]. 中国实验诊断学, 2016,20(7):1134-1135.
- [12] Takei H, Ishiwada N, Takeuchi N, et al. Isolation rate of *Neisseria meningitidis* in Japanese children with respiratory tract infections[J]. Jpn J Infect Dis, 2018,71(3):244-246.
- [13] Kumar S, Mehra B, Sethi G, et al. Rapid detection of respiratory syncytial virus in community-acquired lower respiratory tract infections in children by chromatographic assay[J]. Indian J Pathol Microbiol, 2018, 61(2):236-260.
- [14] 李文桂,陈雅棠. 环介导等温扩增技术用于消化道和呼吸道病毒检测的研究进展[J]. 重庆医学, 2014,43(20):2662-2665.
- [15] 姜峻,邱卫强,张智敏. 1 558 株新生儿下呼吸道痰培养的病原菌分布和耐药性分析[J]. 中国妇幼保健, 2015,30(8):1194-1196.

收稿日期:2018-06-26