

LAMP 法在肺结核患者痰标本中的应用评价*

刘权贤, 向敏, 陈玲[△], 张建勇

(遵义医学院附属医院呼吸二科, 贵州遵义 563000)

摘要:目的 评价环介导等温扩增技术(LAMP)在肺结核患者痰标本中的应用。方法 收集该院 2016 年 12 月至 2017 年 4 月门诊及住院诊断为肺结核且抗结核治疗涂片阳性的患者痰标本 75 份、涂片阴性患者痰标本 72 份,每份痰标本同时进行 LAMP 法结核分枝杆菌复合群核酸快速检测、罗氏固体(L-J)培养,分别计算 LAMP 法及 L-J 培养的阳性率。结果 75 份痰涂片抗酸染色阳性标本中,LAMP 法检测阳性 75 份,L-J 培养阳性 64 份,LAMP 法阳性检出率 $[(100\%)75/75]$ 显著高于 L-J 培养阳性检出率 $[(85.3\%)64/75]$,且差异具有统计学意义($\chi^2=9.09, P<0.05$)。72 份痰涂片抗酸染色阴性标本中,LAMP 法检测阳性 23 例,L-J 培养阳性 12 例;与痰涂片阴性标本比较,LAMP 阳性检出率 $[31.9\%(23/72)]$ 显著高于 L-J 培养阳性检出率 $[16.7\%(12/72)]$,且差异具有统计学意义($\chi^2=6.67, P<0.05$)。结论 LAMP 法具有较高的灵敏度及特异度,对结核分枝杆菌的阳性检出率高于痰涂片和 L-J 培养,且 LAMP 法具有快速、简便、准确的特点,可用于临床上早期发现结核病患者。

关键词:环介导等温扩增技术; 抗酸染色; 培养; 结核病

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.07.007

中图法分类号:R521

文章编号:1673-4130(2018)07-0792-04

文献标识码:A

Evaluation of LAMP method on detecting sputum specimens from patients with tuberculosis

LIU Quanxian, XIANG Ming, CHEN Ling[△], ZHANG Jianyong

(Department of Second Respiratory, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China)

Abstract: Objective To evaluate Loop-mediated isothermal amplification(LAMP) method on detecting sputum specimens from patients with tuberculosis. **Methods** 75 smear-positive sputum specimens and 72 smear-negative sputum samples from patients with tuberculosis were collected from the hospital during December 2016 to April 2017. Each sputum sample was detected by sputum smear microscopy, Roche solid culture(L-J) and LAMP simultaneously. The positive rate of smear-positive, smear-negative, LAMP and L-J culture were calculated and statistically analyzed. **Results** In the 75 samples of sputum smear positive samples, LAMP method detected all the samples for positive, L-J culture tested 64 for positive. The positive rate of LAMP was 100.0%(75/75), L-J culture was 85.3%(64/75), and showed significant differences between the L-J solid culture and LAMP assay($\chi^2=9.09, P<0.05$). Among the 72 smear-negative sputum samples, the positive rate of LAMP was significantly higher than that of negative sputum smear $[31.9\%(23/72)]$, which was significantly higher than that of L-J culture $[16.7\%(12/72)]$, and the difference was statistically significant($\chi^2=6.67, P<0.05$). **Conclusion** The LAMP method has higher sensitivity and specificity for detection of Mtb than the methods of sputum smear microscopy and L-J culture with the characteristics of rapid, simple and accurate, therefore, it could be used for clinical early detection of TB patients.

Key words: LAMP; sputum smear; culture; tuberculosis

结核病是由结核分枝杆菌引起的一种慢性传染性疾病,是人类三大传染病之一。2016 年全球结核病报告显示,2015 年全球范围内估计有 1 049 万新发结核病例,有 140 万人死于结核病。在中国,结核病发

病率为 67/100 000,病死率为 38/100 000^[1]。早期发现活动性结核病是控制结核病传播的关键,然而时至今日,没有一种特别理想的结核病检测方法。传统的涂片抗酸染色法灵敏度及特异度低^[2],不能区分结核

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81760003)。

作者简介:刘权贤,男,主治医师,主要从事肺部感染和肺结核基础与临床研究。△ 通信作者, E-mail: lingjuncd@163.com。

本文引用格式:刘权贤,向敏,陈玲,等. LAMP 法在肺结核患者痰标本中的应用评价[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(7): 792-794.

分枝杆菌及非结核分枝杆菌;作为结核病诊断金标准的结核杆菌培养法,其灵敏度、特异度虽较涂片抗酸染色法高,但其耗时长,需 1~2 个月方能出结果^[3];结核病免疫学检测,如结核抗体(TBAb)、结核分枝杆菌纯蛋白衍生物(PPD)、 γ -干扰素释放试验(IGRA)等,假阴性及假阳性均高,不能区分结核潜伏感染与活动性结核病^[4];结核相关的分子生物诊断学技术,如荧光定量聚合酶链反应(PCR)、DNA 探针技术、基因芯片技术、利福平耐药实时荧光定量核酸扩增技术(GeneXpert MTB/RIF)等,有的操作复杂,有的价格昂贵,还有的需要依赖精密仪器。因此,面对全球及我国严峻的结核病疫情,急需一种简便、快速、价廉、灵敏度高、特异度高的结核病检查方法,以便早期发现结核病患者,达到早期治愈结核病、控制传染源的目的。环介导等温扩增技术(LAMP)是 1998 年由日本荣研化学株式会社独自开发出的一种简便、快速、价廉、灵敏度及特异度高的基因扩增技术^[5]。本研究分别通过对肺结核患者痰涂片阳性标本及涂片阴性标本进行 LAMP 法及罗氏固体(L-J)培养检测,评估 LAMP 法诊断肺结核的临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院 2016 年 12 月至 2017 年 4 月门诊及住院诊断肺结核并抗结核治疗痰涂片阳性患者痰标本 75 份,涂片阴性患者痰标本 72 份。其中男 96 例,女 51 例,年龄 15~86 岁,平均年龄 47.9 岁。

1.2 仪器与试剂 PURE-LAMP 前处理(货号 VMP802,生产厂商:日本荣研株式会社)、TB-LAMP 扩增试剂盒(货号 VMP521,生产厂商:日本荣研株式会社)、Loopamp[®] 恒温荧光核酸扩增仪(型号 LF-160,生产厂商:日本荣研株式会社)。

1.3 方法

1.3.1 痰结核分枝杆菌涂片及镜检 痰标本采用直接涂片抗酸染色显微镜检查,具体参照《中国结核病防治规划·痰涂片镜检标准化操作及质量保证》收集痰标本及涂片镜检,每人送检 1 份合格痰标本。

1.3.2 L-J 结核分枝杆菌培养 取 4 倍体积的 4% NaOH 溶于涂片镜检及 LAMP 法检测余下的合格痰标本中,震荡摇匀,并静置 15 min,使痰标本充分液化;用一次性无菌吸管分别取 2~3 滴均匀分布于 2 管酸性培养基斜面的上、中、下部,盖紧盖子,将接种标本的培养基管斜放入 37℃ 培养箱中,于接种 4 周后每周观察 1 次,并记录相关结果。

1.3.3 LAMP 法检测结核分枝杆菌复合群 (1)样本前处理:①将 40~60 μ L 痰液和阴性对照分别转移至样本处理试管中;②翻转样本处理试管 3~5 次,并将其放入恒温荧光核酸扩增仪加热模块内,90℃ 加热 5 min;③加热结束后,立即取出样本处理试管,在室温放置 2 min 后,颠倒混合 3~5 次;④取下吸附剂试管的盖子,立刻拧入样本处理试管;⑤将吸附管垂直

用力振动 10 次,水平用力甩动 10 次,充分混合后液体为乳白或浅黄色;⑥将吸附管的帽环套在注射帽上面,倒置吸附管,将注射帽推入吸附管,旋紧固定。(2)样本及试剂溶液的混合:①将注射帽顶端帽环放置在加热管架上面,排管架放置于与眼睛水平方向,将纯化装置的尖端垂直放入反应管内,开始加样;②持续挤压纯化装置的吸附管,滴加反应液至两刻度线之间,盖上反应管盖子并标记;③在所有样本均加入反应管后,打开阳性对照管,取出一根毛细管,捏紧上端后插入阳性对照,缓慢放松吸取液体至刻度线(30 μ L),将其挤入到 LAMP 反应管内,然后丢弃毛细管并盖好阳性对照管和反应管的盖子;④握紧反应管底端,将全部反应液体甩到盖子上,倒置 2 min,使干燥的 LAMP 试剂与反应液充分混合。(3) LAMP 扩增反应:①待试剂及反应液充分混合后,将反应管上下翻转 5 次,用力将反应液甩到反应管底部,并将反应管放置到恒温荧光核酸扩增仪前端的反应模块中,盖好盖子;②当反应模块温度达到 67℃ 后,按下右侧计时开关,开始 LAMP 反应,反应时间为 40 min。(4)荧光目视检测:LAMP 扩增反应结束后,取出反应管并放入恒温荧光核酸扩增仪荧光检测模块,打开荧光开关,如果阳性对照和阴性对照正常,则观察各样品是否有荧光显示,若有荧光显示,判为 LAMP 试验阳性;反之,若样品未发出荧光,则为阴性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS12.0 软件进行数据分析,检出率的比较采用配对资料 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LAMP 法检测结果 同时做 10~14 份样本的 LAMP 法检测耗时约 1 h,部分痰标本检测阳性结果如图 1 所示。在含有靶序列 DNA 的管中有大量的 LAMP 扩增产物产生,与适合 LAMP 反应的核酸染料——螯合了锰离子的钙黄绿素结合后变为绿色,而没有靶序列 DNA 的则为橙色。因此,可以通过肉眼简单判定试验结果。



注:1 表示试剂盒阳性对照;2 表示试剂盒阴性对照;3~16 表示 LAMP 法阳性检测结果

图 1 痰标本 LAMP 检测阳性结果

2.2 痰涂阳标本中 LAMP 法和 L-J 培养分枝杆菌检出结果比较 75 份痰涂片阳性标本中,LAMP 法阳性 75 份,L-J 培养阳性 64 份。与痰涂片阳性标本比较,LAMP 法阳性检出率[100.0%(75/75)]显著高于 L-J 培养阳性检出率[85.3%(64/75)],且差异有统计学意义($\chi^2 = 9.09, P < 0.05$)。见表 1。

2.3 痰涂阴标本中 LAMP 法与 L-J 培养阳性检出率

比较 72 份痰涂片抗酸染色镜检阴性标本中, LAMP 法阳性 23 例, L-J 培养阳性 12 例, LAMP 检测阳性而 L-J 培养检测阴性 13 例, LAMP 检测阴性而 L-J 培养检测阳性 2 例。与痰涂片阴性标本比较, LAMP 阳性检出率为 31. 9% (23/72), L-J 培养阳性检出率为 16. 7% (12/72), 涂阴标本的阳性检出率显著高于 L-J 培养, 且差异有统计学意义 ($\chi^2 = 6. 67, P < 0. 05$)。见表 2。

表 1 痰涂片与 LAMP 和 L-J 培养 3 种方法检测分枝杆菌结果比较[%(n/n)]					
涂片法	n	LAMP		L-J 培养	
		阳性率	阴性率	阳性率	阴性率
涂阳	75	100. 0(75/75)	0. 0(0/75)	85. 3(64/75)	14. 7(11/75)
涂阴	72	31. 9(23/72)	68. 1(49/72)	16. 7(12/72)	83. 3(60/72)

表 2 72 份痰涂阴标本中 LAMP 法与 L-J 培养阳性检出率比较(n)			
L-J 培养	LAMP 法		合计
	阳性	阴性	
阳性	10	2	12
阴性	13	47	60
合计	23	49	72

3 讨 论

快速诊断结核病, 是有效控制结核病的关键^[6]。目前, 结核病的诊断主要依赖于涂片抗酸染色及结核杆菌培养。但是, 结核杆菌涂片抗酸染色检出率低, 通常为 30%~40%, 不能及时发现更多的结核病患者。结核杆菌培养耗时长, 一般耗时 12. 9~27. 0 d^[7], 难以满足临床早期快速诊断结核病的要求。LAMP 是一种快速检测结核分枝杆菌的分子诊断技术, 不需要复杂、昂贵的设备, 可在 1 h 内检测标本中有无结核分枝杆菌^[8-10]。其针对结核分枝杆菌 DNA 上的 6 个区段设计 4 个不同的引物^[11], 利用链置换反应, 对目标 DNA 进行大量扩增, 具有极高的扩增效率, 可将靶序列扩增至 10⁹~10¹⁰ 倍。由于反应液中加入了适合 LAMP 反应的核酸染料——螯合了锰离子的钙黄绿素^[12], 如为阳性反应, 溶液中会产生大量的焦磷酸根, 使溶液中的镁离子取代锰离子和钙黄绿素螯合, 从而在 LED 灯或日光下通过肉眼即可对结果进行判定, 如果含有扩增产物, 反应混合物变绿; 反之, 则保持钙黄绿素的橙色不变^[13]。

本研究分别检测 75 份涂阳肺结核痰标本及 72 份涂阴肺结核痰标本, 对 2 种不同检测方法的检测结果进行统计学分析。与痰涂片阳性标本比较, LAMP 法阳性率为 100. 0%, L-J 培养阳性检出率为 85. 3%。与痰涂片阴性标本比较, LAMP 阳性检出率为 31. 9%, L-J 培养阳性检出率为 16. 7%, 且差异均有

统计学意义 ($P < 0. 05$)。提示 LAMP 法阳性检出率高于 L-J 培养, 而且具有良好的灵敏度、特异度, 与国外相关研究结果相似^[14-16]。可早期发现结核病患者、满足临床早诊断早治疗的需求。

本研究中 LAMP 与 L-J 培养结果不一致: 涂阳标本中, LAMP 检测阳性而 L-J 培养检测阴性 11 例; 涂阴标本中, LAMP 检测阳性而 L-J 培养检测阴性 13 例, LAMP 检测阴性而 L-J 培养检测阳性 2 例。原因可能与各自检测方法学特点有关, 并受标本性状、LAMP 操作者采样部位及采样量等的影响^[14, 17], 上述因素均可能导致 L-J 培养阳性而 LAMP 法检测结果阴性; 而 L-J 培养时标本需经 4% NaOH 前处理, 在一定程度上将影响结核分枝杆菌活性或导致结核分枝杆菌死亡^[11, 15], 导致 L-J 培养阴性而 LAMP 法检测结果阳性。

综上所述, LAMP 法对肺结核患者痰标本阳性检出率高于 L-J 培养, 具有相对较高的灵敏度及特异度, 具有快速、简便、准确的特点, 可用于临床上早期发现结核病患者。

参考文献

[1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2016 [R/OL]. http://www. who. int/tb/publications/global_report/en/.

[2] MOON S H, KIM E J, TOMONO J, et al. Detection of Mycobacterium tuberculosis complex in sputum specimens using a loop-mediated isothermal amplification assay in Korea[J]. J Med Microbiol, 2015, 64 (11): 1335-1340.

[3] GELAW B, SHIFERAW Y, ALEMAYEHU M, et al. Comparison of loop-mediated isothermal amplification assay and smear microscopy with culture for the diagnostic accuracy of tuberculosis[J]. B Infect Dis, 2017, 17 (1): 79.

[4] ZHANG L, CHENG X, BIAN S, et al. Utility of Th1-cell immune responses for distinguishing active tuberculosis from non-active tuberculosis: a case-control study [J]. PLoS One, 2017, 12 (5): e0177850.

[5] HUI Z, ZHEN W, CAO X, et al. Loop-mediated isothermal amplification assay targeting the mpb70, gene for rapid differential detection of Mycobacterium bovis[J]. Arch Microbiol, 2016, 198 (9): 1-7.

[6] 王霄, 文强, 岳健博, 等. GeneXpertMtb/RIF、抗酸染色及培养在浅表淋巴结核诊断中的比较研究[J]. 遵义医学院学报, 2016, 39 (3): 275-278.

[7] 吴敏, 张丽霞. 结核菌实验室诊断研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37 (4): 519-521.

[8] 王森, 张文宏. 结核病诊断技术新进展[J]. 微生物与感染, 2016, 11 (3): 188-192.

[9] 刘毅, 黄曙海, 谭慧娟, 等. 环介导等温扩增技术检测肺结核患者痰标本中结核分枝杆菌[J]. 临床检验杂志, 2012, 30 (1): 24-26.

(下转第 797 页)

化合并糖尿病组肝脏弹性和脂肪衰减高于肝硬化未合并糖尿病组,说明肝硬化合并糖尿病患者肝组织硬度明显高于未合并糖尿病患者。肝脏是脂肪代谢的一个重要器官,通常肝细胞内含 5%脂肪,以及进出肝细胞的脂肪处于动态平衡状态,故而胞浆内见不到脂滴,若出现胞浆内脂肪增多,并且发生脂滴,则为肝细胞脂肪变性。同时,严重的肝细胞脂肪变性可造成肝细胞坏死,从而造成肝功能衰竭。研究报道显示,肝硬化患者随着肝硬度的增加肝脂肪变性程度加重^[15]。本研究结果表明,肝硬化合并脂肪变性组肝脏弹性和脂肪衰减高于肝硬化未合并脂肪变性组,说明肝硬化合并脂肪变性存在明显肝脏硬度异常。

综上所述,肝硬化合并糖尿病和脂肪变性存在明显的肝脏硬度异常,具有重要临床研究意义。但本研究还存在一些不足之处,观察患者相对较少,故而后续还需增加样本量,为临床提供可靠的参考价值。

参考文献

- [1] 刘玉平. 肝硬化合并糖尿病患者临床特点及治疗分析[J]. 糖尿病新世界, 2016, 19(22): 76-77.
- [2] 赵崇山, 何文艳, 王宁方, 等. 健康体检成人 FibroScan 检测肝脏硬度值与年龄、性别的相关性[J]. 临床肝胆病杂志, 2016, 32(4): 724-727.
- [3] 欧晓娟, 王晓明, 吴晓宁, 等. FibroTouch 与 FibroScan 在慢性乙型肝炎患者肝纤维化评估中的比较[J]. 中华肝脏病杂志, 2015, 23(2): 103-106.
- [4] BOURSIER J, DE LEDINGHEN V, STURM N A, et al. Precise evaluation of liver histology by computerized morphometry shows that steatosis influences liver stiffness measured by transient elastography in chronic hepatitis C[J]. J Gastroenterol, 2014, 49(3): 527-537.
- [5] 元民. 研究分析肝脏硬度测定仪 FibroTouch 与 FibroScan

与肝脏病理分期的相关性[J]. 中国医药科学, 2016, 6(21): 218-220.

- [6] 袁利超, 邵金华, 郝美娜, 等. 肝脏硬度测定仪 FibroTouch 与 FibroScan 和肝脏病理分期的相关性[J]. 中华肝脏病杂志, 2014, 22(6): 425-429.
- [7] 刘晓彦, 马丽娜, 雒夏, 等. 肝硬度联合血清超敏 C 反应蛋白检测在诊断乙肝肝硬化并发原发性肝癌中的价值[J]. 中华肿瘤杂志, 2015, 25(2): 119-122.
- [8] 田莉娜, 宁娜, 武芳. 肝硬化并发糖尿病患者的饮食指导[J]. 实用临床医药杂志, 2017, 21(2): 134-135.
- [9] 陈高峰, 平键, 顾宏图, 等. 慢性乙型肝炎患者 FibroTouch 和 FibroScan 检测肝脏硬度与肝组织学 Ishak 纤维化评分的相关性分析[J]. 中华肝脏病杂志, 2017, 25(2): 145-150.
- [10] 卢敏, 陈新杰, 黄纯炽, 等. Fibrotouch 检测慢性乙型肝炎患者肝脏硬度指标的影响因素分析[J]. 实用医学杂志, 2014, 30(8): 1245-1248.
- [11] 曾静, 孙婉璐, 陈光榆, 等. FibroTouch 与 FibroScan 肝脏硬度和脂肪定量检测效能的比较[J]. 中华肝脏病杂志, 2016, 24(9): 652-658.
- [12] 夏长虹, 王文欢, 王伟芳, 等. Fibrotouch 与 Fibroscan 检测肝脏硬度的临床效能比较[J]. 北京医学, 2014, 36(3): 202-205.
- [13] 周林妍, 李岩. FibroTouch 检测肝脏硬度与血清肝纤维化指标的相关性分析[J]. 中国医科大学学报, 2017, 46(1): 82-84.
- [14] 王静, 何方平, 娜丽玛, 等. 2 型糖尿病发生肝纤维化的相关危险因素分析[J]. 中华糖尿病杂志, 2015, 13(3): 156-160.
- [15] 刘柯慧, 谢敬东, 阮隽, 等. FibroScan 在合并肝细胞脂肪变性的慢性乙型肝炎患者肝纤维化诊断中的作用[J]. 临床肝胆病杂志, 2014, 30(2): 153-157.

(收稿日期: 2017-09-24 修回日期: 2017-11-10)

(上接第 794 页)

- [10] 赵娜, 孙殿兴, 刘金霞. 环介导等温扩增技术可视化检测结核分枝杆菌[J]. 生物医学工程学杂志, 2017, 34(1): 72-77.
- [11] GELAW B, SHIFERAW Y, ALEMAYEHU M, et al. Comparison of loop-mediated isothermal amplification assay and smear microscopy with culture for the diagnostic accuracy of tuberculosis[J]. BMC Infect Dis, 2017, 17(1): 79.
- [12] BALNE P K, BASU S, RATH S, et al. Loop mediated isothermal amplification assay using hydroxy naphthol blue, conventional polymerase chain reaction and real-time PCR in the diagnosis of intraocular tuberculosis[J]. Indian J Med Microbiol, 2015, 33(4): 568-571.
- [13] WHO. The use of loop-mediated isothermal amplification (TB-LAMP) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: policy guidance[M]. Geneva: World Health Organization, 2016.

- [14] 丁卫忠, 陈巍, 石莲, 等. 环介导等温扩增法对痰标本中结核分枝杆菌检测效果的评估[J]. 中国防痨杂志, 2016, 38(10): 818-822.
- [15] SUN W W, SUN Q, YAN L P, et al. The application of IS6110-based loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in the early diagnosis of tuberculous meningitis[J]. Oncotarget, 2017, 8(34): 57537-57542.
- [16] SETHI S, DHALIWAL L, DEY P, et al. Loop-mediated isothermal amplification assay for detection of Mycobacterium tuberculosis complex in infertile women[J]. Indian J Med Microbiol, 2016, 34(3): 322.
- [17] NAGAI K, HORITA N, YAMAMOTO M, et al. Diagnostic test accuracy of loop-mediated isothermal amplification assay for Mycobacterium tuberculosis: systematic review and meta-analysis[J]. Sci Rep, 2016(6): 39090.

(收稿日期: 2017-09-18 修回日期: 2017-11-08)