

论著 · 临床研究

LAMP 技术检测结核分枝杆菌的临床时效性分析*

陈 伊, 黄文焰, 邓君丽

(深圳市宝安区慢性病防治院检验科, 广东深圳 518102)

摘要:目的 探讨环介导等温扩增法(LAMP)检测结核分枝杆菌在基层诊疗机构中的临床应用价值。方法 采用 LAMP 法及抗酸染色涂片法对 140 例临床诊断为肺结核的患者的痰标本进行检测。统计分析采用 McNemar 检验和 Kappa 检验。结果 140 例痰标本中, 抗酸染色涂片法及 LAMP 法的阳性检出率分别为 29.3%(41/140)和 45.0%(63/140)。与抗酸染色涂片法比较, LAMP 法的灵敏度为 97.6%(40/41)、特异度为 76.8%(76/99), 总体一致率 82.9%(116/140)。两种方法一致性相比, 差异有统计学意义 (Kappa=0.642, $P<0.05$), 两者一致性良好。在检测时间上, 与涂片法相比, 大批量标本检测中 LAMP 法所用时间较短。结论 痰标本检测中, LAMP 法阳性检出率优于抗酸染色涂片法, 批量检测性好, 具有较好的临床应用前景。

关键词: 结核分枝杆菌; 环介导等温扩增; 结核; 诊断
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.13.023 **中图法分类号:**R446.5
文章编号:1673-4130(2018)13-1622-04 **文献标识码:**A

Clinical efficiency analysis of Mycobacterium tuberculosis detected by LAMP technique*

CHEN Yi, HUANG Wenyan, DENG Junli

(Department of Clinical Laboratory, Baoan District Chronic Disease Control Institute, Shenzhen, Guangdong 518102, China)

Abstract: **Objective** To explore the clinical value of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of Mycobacterium tuberculosis in the application of primary medical institutions. **Methods** The sputum samples from 140 patients with clinically diagnosed pulmonary tuberculosis detected by LAMP and anti-acid staining method. McNemar test and Kappa test were used for statistical analysis. **Results** In 140 cases of sputum, the positive detection rate of anti-acid staining and LAMP method was 29.3%(41/140) and 45.0%(63/140). Compared with the smear method, the sensitivity of LAMP method was 97.6%(40/41), the specificity was 76.8%(76/99). The overall consensus rate was 82.9%(116/140). Compared with the two methods, the consistency between the two is moderate and statistically significant (Kappa=0.642, $P<0.05$). Compared with the smear method, the LAMP method used in large-scale specimen examination takes shorter time. **Conclusion** In sputum sample detection, positive detection rate of LAMP method is better than antacid staining smear method. It has good batch detection ability and good clinical application prospect.

Key words: Mycobacterium tuberculosis; loop-mediated isothermal amplification; tuberculosis; diagnosis

结核病是由结核分枝杆菌感染引起的慢性传染病, 具有治疗周期长, 药物疗效一般等特点, 在全世界范围内已成为严重危害公众健康的公共卫生问题。在我国 2010 年全国第 5 次结核病流行病学调查结果显示, 结核病负担严重, 如何高效的防治结核病成为急需解决的重要问题之一^[1]。目前结核病的诊断技术对于日益提高的临床需求来说, 具有相对的落后性, 开发更加适于临床需要的结核病诊断技术及产品

是急需解决的问题, 也是结核病防治的重要环节及迫切需要。环介导等温扩增技术(LAMP)是一种新型核酸检测技术, 与传统的核酸扩增技术相比, 其只需恒定温度就能进行扩增反应。日本学者 NOTOMI 等^[2]在 2000 年创建了这一技术, 这一技术自创建以来, 就得到了广泛的关注, 很多研究学者将其应用于多个领域^[3-6], 并取得了一定的应用研究价值。

由于基层结核病诊疗机构的设施环境及人员素

* 基金项目: 深圳市宝安区医疗卫生科研立项项目(2016CX223)。
作者简介: 陈伊, 女, 主管技师, 主要从事结核病检验诊断研究。
本文引用格式: 陈伊, 黄文焰, 邓君丽. LAMP 技术检测结核分枝杆菌的临床时效性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(13): 1622-1624.

质数量等与大型医疗机构相比,无论在资源还是技术水平上都相对欠缺,加之基层诊疗机构的结核病患者就诊量大,集中等特点,本课题将具有操作简单且快速特点的 LAMP 技术应用于肺结核病患者中,检测其结核分枝杆菌,并通过与目前常规诊断方法抗酸染色涂片法进行对比,以此来分析 LAMP 技术在检测结核分枝杆菌的时效性,评估该技术是否适于结核病诊断的常规临床应用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院 2016—2017 年临床诊断为肺结核的患者作为本次研究对象,共 140 例。

1.2 仪器与试剂 LAMP 法试剂盒及恒温扩增仪(广州迪澳生物科技有限公司),显微镜(日本奥林巴斯株式会社),抗酸染色液(珠海贝索生物技术有限公司),阴性质控菌株:结核分枝杆菌 H37Rv(ATCC 27294)与大肠埃希菌(ATCC25922)来自深圳市慢性病防治中心。

1.3 方法 采集 140 例本院 2016—2017 年临床诊断为肺结核患者送检的合格痰标本,进行抗酸染色涂片及 LAMP 法检测。

1.3.1 抗酸染色涂片镜检法 采用萋尼染色法对痰标本进行染色,具体步骤严格按照《中国结核病防治规划痰涂片镜检标准化操作及质量保证手册》要求进行操作。镜检报告标准:抗酸杆菌阴性(-):连续观察 300 个视野,未发现抗酸杆菌;报告抗酸杆菌菌数:1~8 条抗酸杆菌/300 视野;抗酸杆菌阳性(+):3~9 条抗酸杆菌/100 视野;抗酸杆菌阳性(++):1~9 条抗酸杆菌/10 视野;抗酸杆菌阳性(+++):1~9 条抗酸杆菌/每视野;抗酸杆菌阳性(++++) :≥10 条抗酸杆菌/每视野。

1.3.2 LAMP 技术

1.3.2.1 DNA 制备 在待检样本痰中加入相同体积的 4%氢氧化钠,涡旋振荡 15 s,室温放置 15 min,吸取 1 mL 加入带旋盖离心管中,离心 5 min(12 000 r/min),弃上清,加入 1 mL 生理盐水混匀,再离心 5 min(12 000 r/min),弃上清,加入 DNA 提取液 100 μL,涡旋混匀 15 s,恒温 100 ℃加热 10 min,离心 2 min(12 000 r/min),取上清液备用,上清液即模板。

1.3.2.2 核酸扩增 将 2 μL 上清液加入反应管中,每支反应管中分别含 22 μL 反应液、1 μL Bst 聚合酶、20 μL 密封液,离心 5 s(10 000 r/min),63 ℃恒温扩增仪扩增 45 min。

1.3.2.3 结果判定 显示“S”型扩增曲线,则判断为阳性,表明含有结核分枝杆菌,否则判断为阴性,不含有结核分枝杆菌。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 进行统计分析,方法间配对计数资料的比较采用 McNemar 检验和

Kappa 一致性检验。对计量资料采用百分比描述。方法间率的比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 检测效能分析 140 例临床诊断为肺结核患者的痰标本进行抗酸染色涂片法及 LAMP 法检测,其中抗酸染色涂片法检测出阳性 41 例,阴性 99 例,LAMP 法检测出阳性 63 例,阴性 77 例。抗酸染色涂片法及 LAMP 法的阳性检出率分别为 29.3%(41/140)和 45.0%(63/140)。LAMP 法的阳性检出率比抗酸染色涂片法的阳性检出率高约 15.0%。与抗酸染色涂片法比较,LAMP 法的灵敏度为 97.6%(40/41)、特异度为 76.8%(76/99),两方法的总体一致率 82.9%(116/140)。将抗酸染色涂片法及 LAMP 法进行一致性分析,Kappa 统计量判断标准: $Kappa\leq 0.4$,一致性程度弱; $0.4<Kappa\leq 0.6$,一致性程度适中; $0.6<Kappa\leq 0.8$,一致性程度良好; $0.8<Kappa\leq 1.0$,一致性程度最佳。检测结果统计分析显示:两方法的一致性分析中, $Kappa=0.642$,介于 $0.6<Kappa\leq 0.8$,两者一致性良好。McNemar 检验分析,两方法阳性检出率比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 LAMP 法与抗酸染色涂片法的效能分析(n)

项目	涂片阳性	涂片阴性	合计
LAMP 阳性	40	23	63
LAMP 阴性	1	76	77
合计	41	99	140

2.2 抗酸染色涂片法分级 抗酸染色涂片法的分级按照《中国结核病防治规划痰涂片镜检标准化操作及质量保证手册》中的镜检报告标准进行。将 LAMP 法检测结果与抗酸染色涂片法的分级结果进行比较,在涂片阴性的标本中 LAMP 法阳性检出率约 23%(23/99),在涂片结果 1~8 条/300 视野、“++”及以上的痰标本中,LAMP 法阳性检为 100%(27/27),只有在“+”及阴性的痰标本中存在差异,其中痰涂阴标本中相差最大。见表 2。

表 2 LAMP 法与抗酸染色涂片法分级结果比较(n)

涂片分级	总例数	LAMP 阳性
阴性	99	23
1~8 条/300 视野	1	1
+	14	13
++	13	13
+++	7	7
++++	6	6

3 讨 论

目前我国结核病发病形势严峻,其中乡村活动性发病率高于城镇发病率,各地区活动性发病率不同^[1],提高结核病的诊断及治疗能力,对结核病的防治工作具有重要意义。结核病患者治疗周期长,通常需要 6 个月的治疗时间,早期准确的诊断结核病,能够使患者得到及时有效规律的治疗,减少耐药发生的风险,提高治愈率。

现有的结核病诊断技术包含有细菌学诊断、免疫学诊断及临床影像学诊断等,免疫血清学检测虽具有快速、操作简单等优点,但目前未发现具有确诊效能的标志物^[7],因此结核病的实验室检查主要依赖于细菌学诊断。本研究应用的抗酸染色痰涂片法具有快速、便宜等优点,是目前基层结核病诊疗机构常规的结核病检测项目。在对于 140 例临床诊断为肺结核患者的痰标本进行抗酸染色痰涂片法,结果显示阳性检出率为 29.3%(41/140),阳性检出率并不高,其中痰液样本的性状(干酪样、黏液、血痰、唾液),样本量,送检的次数、咳痰方式、镜检视野数、检验人员的专业度等都对该方法的阳性检出率有一定的影响。李源等^[8]的研究显示痰的不同性状对于痰涂片阳性率存在影响,且痰涂片法的阳性率低。实际上本研究在痰标本收集时,往往因为患者咳痰方法错误,留痰次数及时间不对等多种原因,造成痰标本不合格而需要重新收集。有些患者往往无痰或只有极少量痰,这些都给临床检验诊断造成了不便,延误诊治时间。

LAMP 技术是一种快速诊断技术,其以核酸扩增技术为基础,在 60~65℃ 等温条件下使用高效的 DNA 聚合酶进行反应,全过程(包括样本的处理)约 2 h^[2]。该技术与传统的 PCR 技术相比,其无需专用的 PCR 实验室场地,无需昂贵的核酸扩增仪和检测设备,其要求的基础投入少,相较于基层结核病诊疗机构相对落后的设施环境以及较少的医疗投入而言,该方法更为适用于基层诊疗机构的临床应用。在应用 LAMP 技术对结核分枝杆菌进行诊断方面,国内外研究显示该技术具有很好的临床应用价值^[9-16]。本研究结果显示,LAMP 法的阳性检出率比抗酸染色涂片法高约 15.0%,灵敏度为 97.6%,特异度为 76.8%,这与国内研究者的研究结果相似^[9-10,16]。REDDY 等^[12]在应用 LAMP 技术对南非结核患者的研究同样表明 LAMP 技术敏感性明显高于涂片法。在两种方法的一致性分析中,本研究结果显示 Kappa=0.642,一致性良好,这与国内研究报道相符^[9]。LAMP 法阳性率高的原因可能是由于方法学上的不同,使得其对结核杆菌在痰液中的检出量要求更低造成的,且专业人员的专业水平也对其有一定影响。

在本研究中,单个标本急诊检测时,LAMP 法所

用时间约 2 h,比抗酸染色涂片法平均 1.5 h 所用时间长,时间方面不具有优势,但抗酸染色涂片法需要人工镜检,人员要求高。实际上在基层诊疗机构,日均就诊量大,专业人员紧缺。以本院疑似结核的就诊患者为例,日均 20~30 人,高峰期 50 多人,每人留痰 3 盒,行 3 张涂片镜检,即每天至少要镜检 60 多张痰片,最多时 100 多张,两人操作,至少 1 d 时间,检测压力大,而使用 LAMP 技术只需一人约 4 h 既能完成。在综合成本以及效能上,LAMP 技术对于大批量标本的检测比抗酸涂片法具有较大优势,其大大降低了诊断延误的时间和概率。综合临床实际检测需要,LAMP 技术能适用与大批量标本检测,且对人员设备要求较低。在生物安全方面由于 LAMP 法的整个反应始终在密闭的反应管中进行,从而降低了实验人员的感染风险,与抗酸染色涂片法相比,其更为安全。

4 结 论

LAMP 法与涂片法相比,其能区分结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌,由于结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌感染的治疗的差异,这有助于临床制定正确的治疗方案。但是 LAMP 法不能区分死菌及活菌,这不利于临床判断是否为活动性肺结核,在一定程度上影响了其临床效能。在成本方面,LAMP 法检测费用 200~300 元,而涂片法只需几十元且由于政府补助,大部分就诊者可以免费检测,涂片法优于 LAMP 法。大部分的结核患者家庭年收入水平低于全国平均水平,生活贫困,难以承担高额的医疗费用,LAMP 法检测如能降低成本,接近或略高于涂片法的话,将具有更好的临床应用前景。综上所述,在痰标本检测结核分枝杆菌中,LAMP 法时效性高,在一定程度上适于医疗机构的临床应用。

参考文献

- [1] 全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组,全国第五次结核病流行病学抽样调查办公室. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志, 2012,34(8):485-508.
- [2] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H A, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000,28(12):63.
- [3] 疏义林,张雪峰,万琴,等.高通量 LAMP 检测常见肠道病原体的可行性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2016,37(10):1385-1386.
- [4] 张阳,周冲,孙涛,等.乙型脑炎和登革热病毒的环介导等温扩增基因定量检测技术研究[J]. 国际检验医学杂志, 2017,38(14):1931-1934.
- [5] 李辉腾,郭旭光,陈瑞娟,等.荧光环介导恒温扩增技术检测嗜肺军团菌方法的建立[J]. 国际检验医学杂志, 2017,38(22):3136-3138.

(下转第 1628 页)

大的参考价值。

参考文献

[1] FARHAN S, CLARE R M, JARAI R, et al. Fasting glucose, NT-proBNP, treatment with eptifibatide, and outcomes in non-ST-segment elevation acute coronary syndromes; An analysis from EARLY ACS[J]. *Int J Cardiol*, 2017, 232(1):264-270.

[2] 王国敏. ACS 患者入院早期血 NT-proBNP、hs-CRP、UA 水平与其再发心血管事件的关系[J]. *山东医药*, 2014, 22(16):39-41.

[3] 钟静敏, 许庆波, 叶海鹏, 等. NT-proBNP、Hcy 诊断急性冠脉综合症的临床研究[J]. *中国心血管病研究*, 2013, 11(8):604-607.

[4] 赵月霞, 王萌, 唐志毅, 等. 心肌和炎性标志物联合检测在老年急性冠状动脉综合征患者诊断中的应用[J]. *中华老年医学杂志*, 2012, 31(9):747-752.

[5] 刘英华. NT-proBNP 和 hs-CRP 水平与急性冠脉综合征严重程度及近期预后的相关性研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2013, 22(2):120-122.

[6] 赵思义, 杨松, 薛红新, 等. 血清 N-末端脑钠肽前体及超敏 C 反应蛋白水平在老年急性冠脉综合征患者中的临床研究[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2012, 20(11):1776-1777.

[7] ROE Y L, ESTERMAN A, MCDERMOTT R, et al. Management of indigenous patients presenting with non ST-segment elevation acute coronary syndrome in South Australia; a retrospective cohort study [J]. *Intern Med J*, 2016, 46(2):202-213.

[8] BEKLER A, TENEKECIOLU E, ERBA G, et al. Rela-

tionship between red cell distribution width and long-term mortality in patients with non-ST elevation acute coronary syndrome[J]. *Amer J Cardiol*, 2015, 15(8):634-639.

[9] 刘丽平, 李秀昕, 李建宏. 急性冠脉综合征患者血清同型半胱氨酸和氨基末端脑钠肽前体水平的临床分析[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2013, 21(2):24-26.

[10] 尹春琳, 郭丽娟, 谭静, 等. 急性冠状动脉综合征患者同型半胱氨酸和炎性标记物与基因多态性及肾功能的相关分析[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2013, 15(8):813-816.

[11] 李云桥, 汪金峰, 葛晶. 通过 ROC 曲线评估联合检测 TnI、hs-CRP 和 NT-proBNP 对老年急性冠状动脉综合征的诊断价值[J]. *临床心血管病杂志*, 2012, 11(9):667-670.

[12] KIM H J, KIM K I, CHO Y S, et al. The effect of admission at weekends on clinical outcomes in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome and its contributing factors[J]. *J Korean Med Sci*, 2015, 30(4):414-425.

[13] 陈丰运, 肖骅. NT-proBNP、hs-CRP 和超声心动图与急性冠状动脉综合征病变程度的相关性研究[J]. *重庆医学*, 2015, 17(31):4338-4342.

[14] LI P Y, SHI L, HAN Y L, et al. Prognostic value of plasma intermedin level in patients with Non-ST-Segment elevation acute coronary syndrome [J]. *Medicine*, 2016, 95(16):3422.

[15] 陈思, 徐革. NT-proBNP、Hcy 及 hs-CRP 水平变化与急性冠状动脉综合征的相关性[J]. *海南医学院学报*, 2016, 22(8):740-743.

(收稿日期:2017-11-20 修回日期:2018-02-16)

(上接第 1624 页)

[6] 张丽娜, 王明义, 杨小蕾, 等. 海洋创伤弧菌 LAMP 快速诊断方法的建立与评价[J]. *国际检验医学杂志*, 2016, 37(5):577-579.

[7] WALZL G, RONACHER K, HANEKOM W. Immunological bio-markers of tuberculosis[J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(5):343-354.

[8] 李源, 高风华. 淄博市 2008—2013 年肺结核痰涂片镜检结果分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 22(10):1649-1651.

[9] 陈涛, 周琳, 周杰, 等. 环介导等温扩增法快速检测结核分枝杆菌的临床应用评估[J]. *中国防痨杂志*, 2012, 34(7):413-418.

[10] 李金莉, 王峰, 彭毅, 等. 环介导等温扩增技术检测痰样结核分枝杆菌临床价值评价[J]. *中国防痨杂志*, 2015, 37(2):134-139.

[11] 林世平, 杨应周, 谭卫国, 等. 环介导等温扩增法快速检测结核分枝杆菌的初步观察[J]. *中国防痨杂志*, 2010, 32(8):577-579.

[12] REDDY S, NTOYANTO S, SAKADAVAN Y, et al. Detecting *Mycobacterium tuberculosis* using the loop-mediated isothermal amplification test in South Africa[J]. *Inter J Tuber Lung Dis*, 2017, 21(10):1154-1160.

[13] KAKU T, MINAMOTO F, D' MEZA R, et al. Assessment of accuracy of LAMP-TB method for diagnosing tuberculosis in haiti[J]. *Japan J Infect Dis*, 2016, 69(6):488-492.

[14] 张伟阳, 钟建平, 杨国彪, 等. LAMP 和 Xpert Mtb/RIF 早期诊断肺结核传染源的价值比较[J]. *温州医科大学学报*, 2017, 47(1):61-63.

[15] 于霞, 马异峰, 付育红, 等. 环介导等温扩增法检测临床标本中结核分枝杆菌的系统评价[J]. *中国防痨杂志*, 2014, 36(4):260-266.

[16] 王静, 张艳, 胡钰卿, 等. 环介导等温扩增技术在检测痰标本结核分枝杆菌中的应用[J]. *浙江医学*, 2013, 22(13):1251-1253.

(收稿日期:2017-11-20 修回日期:2018-02-21)