

恒温扩增芯片法在下呼吸道病原体检测的临床价值*

康蓓佩,周 磊,付晓蕊,杨佩红,周 柯,徐修礼[△]

(空军军医大学西京医院检验科,陕西西安 710000)

摘要:目的 探讨恒温扩增芯片法对下呼吸道标本细菌检测中的临床应用价值。**方法** 选取该院 2016 年 5 月至 2017 年 2 月收集的 51 例下呼吸道感染患者标本进行检测,采用恒温扩增芯片法检测患者下呼吸道标本(痰和肺泡灌洗液),以普通快速培养方法作为“金标准”,与恒温扩增芯片法比较,判断其在临床应用中的价值。**结果** 恒温扩增芯片法共检测了 51 例下呼吸道标本,与普通培养相比,两者结果基本符合,2 种方法检测结果的一致性为 76.47%,且肺炎克雷伯菌和铜绿假单胞菌的检出率具有较高的一致性($Kappa>0.7$)。总体恒温扩增芯片法的阳性检出率(47.05%),高于病原分离培养的检出率(31.37%)。**结论** 恒温扩增芯片法可以快速、准确地检测常见病原体,不仅明显缩短了临床微生物检验临床实验室标准周转时间(TAT),而且更好地服务于感染性疾病的诊断与抗菌药物的合理使用,可对临床提供快速可靠的实验室诊断依据。

关键词:恒温扩增芯片法; 下呼吸道病原体检测; 检验临床实验室标准周转时间

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.22.012

中图法分类号:R373.1

文章编号:1673-4130(2018)22-2767-04

文献标识码:A

Clinical value of isothermal amplification chip method in the detection of pathogens of lower respiratory tract infection*

KANG Beipei, ZHOU Lei, FU Xiaorui, YANG Peihong, ZHOU Ke, XU Xiuli[△]

(Department of Clinical Laboratory, Xijing Hospital of Air Force Military Medical University, Shaanxi, Xi'an 710000, China)

Abstract: Objective To explore the clinical application value of isothermal amplification chip method for the detection of lower respiratory tract bacteria. **Methods** 51 cases were selected from patient with lower respiratory infection admitted in the hospital from May 2016 to February 2017. The specimens of lower respiratory tract (sputum and alveolar lavage fluid) were detected by isothermal amplification chip method. Culture method was used as a gold standard to determine the value of isothermal amplification chip method in clinical application. **Results** 51 cases of lower respiratory tract specimens were detected by isothermal amplification chip method. Compared with the routine culture method, the results had a relatively good consistency. The consistency of the two methods was 76.47%, and the detection rates of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* by two different methods were consistent ($Kappa>0.7$). The detection rate of isothermal amplification chip method (47.05%) was higher than the microbial isolation and culture (31.37%). **Conclusion** Isothermal amplification chip method can quickly and accurately detect common pathogens, not only shorten the TAT of clinical microbiological examination, but also better serve the diagnosis of infectious diseases and the rational use of antimicrobial agents, which may be a quick and reliable laboratory diagnosis method.

Key words: isothermal amplification chip method; lower respiratory tract pathogen detection; turn-around time

社区获得性肺炎(CAP)是最常见的感染性疾病之一。在美国,它是感染性疾病里导致死亡的首要原因。虽然经济不断发展,医疗技术不断进步,但是 CAP 仍然保持着很高的病死率。我国目前有 CAP 年龄构成比的研究,却鲜有成人 CAP 发病率数据。2008 年我国肺炎 2 周的患病率为 0.11%,较 2003 年

(0.09%)有所上升。2012 年我国肺炎的病死率平均为 17.46/100 000, <1 岁病死率为 32.07/100 000, 25~39 岁人群病死率为 <1/100 000, 65~69 岁人群病死率为 23.55/100 000, >85 岁人群病死率为 864.17/100 000。肺炎支原体和肺炎链球菌是我国成人 CAP 重要病原体,其他常见病原体包括流感嗜血

* 基金项目:国家自然科学基金青年项目(81601816,81400459);陕西省自然基础研究计划资助项目(S2016YFJQ1066)。

作者简介:康蓓佩,女,技师,主要从事临床微生物方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: xxlxxl@fmmu.edu.cn。

本文引用格式:康蓓佩,周磊,付晓蕊,等.恒温扩增芯片法在下呼吸道病原体检测的临床价值[J].国际检验医学杂志,2018,39(22):2767-

杆菌、卡他莫拉菌、肺炎衣原体、肺炎克雷伯菌及金黄色葡萄球菌,而铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌少见。因此如何快速准确诊断下呼吸道病原体以及如何缩短检验临床实验室标准周转时间(TAT),对临床诊断具有重要意义。本研究以恒温扩增芯片法检测下呼吸道 13 种常见病原体,包括肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林葡萄球菌(由 mecA 基因指示)、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、嗜麦芽窄食单胞菌、流感嗜血杆菌、嗜肺军团菌、肺炎支原体、肺炎衣原体、结核分枝杆菌复合群,以期探讨恒温扩增芯片法与常规普通细菌培养鉴定之间的一致性以及对临床缩短 TAT 时间的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取该院 2016 年 5 月至 2017 年 2 月收集的 51 例下呼吸道患者的标本进行研究,主要收集有呼吸道感染症状的 ICU 住院患者进行检测,年龄 17~76 岁,采集深部痰液和肺泡灌洗液标本作为研究对象,用恒温扩增芯片法检测 13 种常见下呼吸道病原菌,样本量不少于 0.6 mL,置于相应的无菌样本收集管内,按试剂盒要求收集、转运、处理及提取基因组 DNA。同时常规普通培养进行鉴定。通过比较 2 种方法的差异和一致性,来探讨恒温扩增芯片法对下呼吸道细菌检测的临床应用价值。本研究采取患者自愿原则,获得患者知情同意。

1.2 试剂和仪器 恒温扩增芯片法测定采用博奥生物集团有限公司生产的呼吸道病原菌核酸检测试剂盒,检测采用博奥生物集团有限公司生产的 RTisochipTM-A 恒温扩增芯片 UML-301 核酸分析仪。低速离心机(可离心恒温扩增芯片)、微量移液器(规格:10~100 μ L)、离心管(规格:200 μ L)、各种规格离心架均由博奥生物集团有限公司提供。呼吸道病原体培养试剂及材料、VITEK2-Compact 全自动微生物鉴定仪购自法国梅里埃生物公司。

1.3 检测方法 (1)恒温扩增芯片技术:本试剂盒采

用恒温扩增法,利用具有链置换功能的聚合酶在恒温(65 $^{\circ}$ C)条件下进行反应,使用荧光染料掺入法进行实时荧光检测。扩增阳性的样品会产生类似实时荧光的“S”形扩增曲线,进一步完成对靶基因的扩增和检测。该方法与微流体芯片技术相结合,可同时对多种核酸靶基因进行高通量并行检测。本试剂盒的每张芯片内均设有 1 个阳性质控和 9 个阴性质控。根据结果判读标准,阳性质控检测结果应为阳性,同时 9 个阴性质控结果均为阴性。质控结果:实验正常(阳性正常,阴性正常),表明本次检验结果有效。若任一结果错误,则判定本次样品检测结果无效,需要进行复查。(2)常规普通培养技术:用无菌拭子挑取适量脓性或无血部位的痰、肺泡灌洗液标本,分别接种血平板、巧克力平板、麦康凯或中国蓝平板,分区划线后继续培养。接种的血平板、巧克力平板放 CO₂ 培养箱,麦康凯或中国蓝平板放置普通培养箱,35~37 $^{\circ}$ C 条件下培养 24~48 h,血平板、巧克力平板培养 72 h。随后观察细菌菌落并进行鉴定。

1.4 统计学处理 一致性:筛检实验检测结果与金标准结果的一致程度。采用 SPSS 统计软件分析数据,检验结果的一致性分析采用 Kappa 分析, Kappa>0.4 为具有一致性。

2 结果

2.1 痰标本恒温扩增芯片法与普通培养结果比较 针对 24 份痰标本,2 种方法结果基本保持一致,恒温扩增芯片法的灵敏度较高,阳性检出率高于普通细菌培养,如其对苛养菌流感嗜血杆菌的检出率高于普通培养。恒温扩增芯片法可在很短时间内(2.5 h)检测出非典型病原体,如一些特殊病原体肺炎支原体、肺炎衣原体和结核杆菌复合物。结果显示,在 24 份标本中,13 份标本 2 种方法的检验结果完全一致,4 份标本结果基本一致,3 份标本结果基本不符合,还有 4 份标本结果其中有 1 种方法未能检出所有菌,见表 1。

表 1 恒温扩增芯片法与普通培养结果比较(痰标本)

标本数量	芯片法	普通培养	一致性
8	阴性	正常菌群生长	完全一致
1	铜绿假单胞菌	铜绿假单胞菌	完全一致
1	嗜麦芽窄食单胞菌	嗜麦芽窄食单胞菌	完全一致
1	肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌	肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌	完全一致
1	金黄色葡萄球菌	金黄色葡萄球菌	完全一致
1	耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌	耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌	完全一致
1	肺炎克雷伯菌、流感嗜血杆菌	肺炎克雷伯菌	基本符合
1	肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、嗜麦芽窄食单胞菌	肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌	基本符合
1	大肠埃希菌、流感嗜血杆菌	大肠埃希菌	基本符合
1	鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌	鲍曼不动杆菌	基本符合
1	铜绿假单胞菌	产酸克雷伯杆菌	不符合
1	阴性	金黄色葡萄球菌	不符合
1	金黄色葡萄球菌、结核杆菌复合物	正常菌群生长	不符合
1	阴性	热带假丝酵母菌	未涉及
2	阴性	阴沟肠杆菌	未涉及
1	肺炎支原体	正常菌群生长	未涉及

表 2 恒温扩增芯片法与普通培养结果比较(肺泡灌洗液标本)

标本数量	芯片法	普通培养	一致性
15	阴性	无细菌生长	完全一致
1	流感嗜血杆菌	流感嗜血杆菌	完全一致
1	铜绿假单胞菌	铜绿假单胞菌	完全一致
1	耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌	耐甲氧西林表皮葡萄球菌	完全一致
1	鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌	鲍曼不动杆菌	基本符合
1	肺炎克雷伯菌	肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌	基本符合
1	金黄色葡萄球菌、嗜麦芽窄食单胞菌	无细菌生长	不符合
2	金黄色葡萄球菌	无细菌生长	不符合
1	阴性	铜绿假单胞菌	不符合
1	阴性	尿肠球菌	未涉及
2	结核杆菌复合群	无细菌生长	未涉及

2.2 肺泡灌洗液标本恒温扩增芯片法与普通培养结果比较 27 份肺泡灌洗液标本中,18 份标本结果是完全一致的,2 份标本结果是基本保持一致,4 份标本结果不符合,3 份标本结果其中 1 种方法未涉及一些菌的检出。但恒温扩增芯片法可以很快检测出结核杆菌复合群,大大提高了结核杆菌检出的时间,见表 2。

2.3 恒温扩增芯片法与普通培养法对各病原体检测的符合率比较 同时进行恒温扩增芯片法与微生物病原体分离培养的 51 例样本中,恒温扩增芯片法检出病原体阳性标本 24 例,阳性率为 47.05%(24/51);微生物病原体分离培养检出阳性标本 16 例,阳性率为 31.37%(16/51)。2 种方法检测结果的一致性为 76.47%(39/51),其中 2 种方法检出肺炎克雷伯菌的一致性较高(Kappa=1.000)。见表 3。

表 3 恒温扩增芯片法与普通培养法对各病原体检测的符合率比较

病原体	芯片(+)培养(+)	芯片(+)培养(-)	芯片(-)培养(+)	芯片(-)培养(-)	Kappa
铜绿假单胞菌	4	1	1	23	0.758
嗜麦芽窄食单胞菌	1	2	0	23	0.469
肺炎克雷伯菌	5	0	0	23	1.000
金黄色葡萄球菌	1	5	1	23	0.167
耐甲氧西林金黄色葡萄球菌	1	0	0	23	1.000
流感嗜血杆菌	1	2	0	23	0.469
大肠埃希菌	1	0	0	23	1.000
鲍曼不动杆菌	2	0	1	23	0.780

2.4 恒温扩增芯片法与普通培养 TAT 时间比较 恒温扩增芯片法检测肺泡灌洗液标本只需 2 h,痰标本需要 2.5 h,而常规普通细菌培养需要 24~36 h 左右,因此恒温扩增芯片法大幅度缩短了 TAT 时间。

3 讨 论

CAP 指在非医院环境中受致病微生物侵袭所发

生的急性肺部炎症,以及住院 48 h 内所发生的肺部感染。发达国家的统计资料显示,CAP 的发病率每年为 2.6‰~13.4‰,22%~51% 的 CAP 患者需要住院治疗,每年有(0.1~0.7)/1 000 患者死于 CAP。CAP 的病原谱在不同国家、不同地区变化非常大。综合各国研究,目前导致 CAP 最常见致病菌为肺炎链球菌,占 20%~30%,其次为肺炎支原体和流感嗜血杆菌^[1]。肺炎支原体是临床最常见的非典型病原体感染,因此准确和快速诊断病原体对医生指导患者临床用药提供重要的价值^[2]。

恒温扩增芯片法的特点是针对靶基因的 6 个区域设计 4 对特异性引物,利用链置换 DNA 聚合酶(Bst DNA 聚合酶)在恒温条件下(65 ℃左右)经过非循环起始阶段、环扩增阶段、循环延伸阶段,最终形成一系列有多个靶 DNA 反向重复序列串联的不同大小的产物,不需要模板的热变性、温度循环、电泳及紫外观察等步骤,整个过程 15~60 min 即可完成^[3-5]。该方法具有特异性和敏感性更高、检测方法简单快速、不易污染、自动化程度高、试剂耗量低、病原体覆盖面广等优势,具备了对呼吸道感染性疾病的快速诊断能力^[6-9]。本研究主要是针对 51 份下呼吸道标本,检测结果表明,恒温扩增芯片法的检出率明显高于普通细菌培养,对 7 种传统可培养细菌(金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、嗜麦芽窄食单胞菌、流感嗜血杆菌),前者灵敏度稍高于后者。恒温扩增芯片法检测结果中,流感嗜血杆菌的阳性检出率大于细菌培养,主要是因为流感嗜血杆菌培养条件要求较高,导致细菌培养检测法检出率偏低;流感嗜血杆菌易受药物影响也可能导致其难以培养或阳性率偏低。本研究结果也显示,2 种方法对肺炎克雷伯菌和铜绿假单胞菌检出的符合率较高,考虑与 2 种病原体容易培养鉴定,且大部分为呼吸科老年患者、长期基础性疾病病史及其严重程度等高发因素及医院内感染有关。在肺泡灌洗液标本中,有 2 份标本芯片结果检测是金黄色葡萄球菌,而培养结果

是阴性,一方面是芯片技术的敏感性比较高,可能会造成一些交叉污染;另一方面可能是致病菌的量比较少及使用药物的影响,导致细菌培养的检出率低,而恒温扩增芯片技术的灵敏度比较高,增加了致病菌的检出率。恒温芯片扩增法检测也存在一些局限,它只是针对 13 种病原体的检测,往往会遗漏一些少见致病性病原体的检出,比如在 2 份痰标本中培养结果是阴沟肠杆菌,而恒温扩增芯片技术没有涉及阴沟肠杆菌,因此结果是阴性。恒温扩增芯片法结果也往往遗漏真菌的检出。

肺炎支原体病,累及各年龄组儿童不同的组织器官,以呼吸道感染最常见,我国北方以冬季多发,南方则以夏秋季较多^[10]。肺炎支原体培养困难、阳性率较低,临床诊断多用抗体滴度测定。肺炎衣原体感染,主要引起成人及青少年的非典型肺炎,亦可引起支气管炎、咽炎及扁桃体炎等急性呼吸道感染^[11-13],在引起肺炎的病因中是继肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、肺炎支原体之后引起 CAP 的主要病原体^[2]。恒温扩增芯片法也可以检测非典型肺炎:肺炎支原体、肺炎衣原体、嗜肺军团菌。本实验在 1 例痰标本中用恒温扩增芯片检出肺炎支原体感染,肺炎支原体抗原实验也是阳性,用大环内酯类药物患者有了明显的好转。虽然细菌培养是诊断肺炎支原体感染的“金标准”,该方法特异性高,但灵敏度低,肺炎支原体培养条件极为苛刻,限制了其临床应用,因此恒温扩增芯片法对临床诊断肺炎支原体以及合理用药提供了新的诊断方法。

我国也是肺结核感染大国,但结核杆菌培养时间长。恒温扩增芯片法包括了结核杆菌检测,本实验中 3 名患者结核杆菌呈阳性结果,笔者进一步进行了结核及耐药快速诊断,结果显示结核杆菌核酸检测阳性。对结核分枝杆菌的检测,恒温扩增芯片法显著优于 γ 干扰素释放试验和涂片抗酸染色,极大提高了肺结核杆菌诊断率^[7,14-15]。

4 结 论

恒温扩增芯片法较细菌培养法,可快速诊断感染病原菌,并提高阳性率;并可检测支原体、军团菌、衣原体等病原体^[16]。恒温扩增芯片法为下呼吸道感染的诊断提供了更为快速、简便、敏感的方法。与普通细菌培养结合起来,大大提高了下呼吸道病原菌的检出率。

参考文献

[1] 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(10): 651-655.
- [2] 殷勇. 肺炎支原体感染的流行病学[J]. 中华儿科杂志, 2016, 54(2): 196-197.
- [3] FANG X, JIAN L, CHEN Q. One new method of nucleic acid amplification-loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Virol Sin, 2008, 23(3): 167-172.
- [4] 陈炫颖, 陈愉生. 环介导等温扩增技术在呼吸系统疾病中的应用[J]. 临床肺科杂志, 2011, 16(3): 410-412.
- [5] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): 52-63.
- [6] 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.
- [7] 刘志远. 恒温扩增芯片法在下呼吸道感染病原体检测中的应用[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(8): 1052-1053.
- [8] YAN L, ZHOU J, ZHENG Y, et al. Isothermal amplified detection of DNA and RNA[J]. Mol Biosyst, 2014, 10(5): 970-982.
- [9] YU A C, VATCHER G, YUE X, et al. Nucleic acid-based diagnostics for infectious diseases in public health affairs[J]. Front Med, 2012, 6(2): 173-186.
- [10] 邓伟吾. 社区获得性肺炎诊断和治疗指南[C]. 中华医学会第七次全国感染病学术会议论文汇编. 北京: 复旦大学附属华山医院, 2001: 28-30.
- [11] HAO O, WANG X, LIU J, et al. Etiology of community-acquired pneumonia in 1500 hospitalized children[J]. J Med Virol, 2017, 90(3): 421-428.
- [12] SUZUKI Y, SHIMOTAI Y, ITAGAKI T, et al. Development of macrolide resistance-associated mutations after macrolide treatment in children infected with *Mycoplasma pneumoniae*[J]. J Med Microbiol, 2017, 66(11): 1531-1538.
- [13] 陈杭薇, 童春堂, 尤兰花, 等. 成人呼吸道病毒及非典型病原体快速检测的临床研究[J]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2013, 6(4): 12-16.
- [14] 柴娟. 快速检测方法在呼吸道感染病原体检测的临床价值[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(2): 179-181.
- [15] 李新, 岳兴华. 肺炎支原体的快速液体培养与血清法的联合应用探讨[J]. 吉林医学, 2015, 36(18): 4036-4037.
- [16] KAKUYA F, KINEBUCHI T, FUJIYASU H, et al. Genetic point of care diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection using LAMP assay[J]. Pediatr Int, 2014, 56(4): 547-552.

(收稿日期: 2018-06-11 修回日期: 2018-08-08)