

• 论 著 •

LAMP 芯片十三联法检测重症监护患者 下呼吸道感染病原菌的应用价值*

李 晓, 杨永泉, 孙朝晖, 张卫云[△]

中国人民解放军南部战区总医院检验科, 广东广州 510010

摘 要:目的 探讨环介导等温扩增检测(LAMP)芯片法用于快速检测重症监护患者下呼吸道感染病原菌的价值。方法 收集该院重症监护病房下呼吸道感染患者的深部痰液或肺泡灌洗液样本 67 例, 分别采用 LAMP 芯片法和痰培养法检测, 对比 2 种方法检测得到的病原菌菌种分布、阳性率及阳性符合率, 应用 SPSS 软件及 Kappa 检验进行数据分析。结果 LAMP 芯片法检测病原菌的阳性率为 77.61%(52/67); 痰培养法检测病原菌的阳性率为 65.67%(44/67); LAMP 芯片法检测病原菌的阳性率明显高于培养法, 差异有统计学意义($\chi^2=20.589, P<0.05$), LAMP 芯片法与痰培养法检测病原菌总体阳性符合率一致(Kappa=0.567)。2 种方法检出的致病菌中以革兰阴性杆菌为主, 其中鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、嗜麦芽窄食单胞菌、结核分枝杆菌阳性符合率较一致。结论 LAMP 芯片法能快速检出重症监护患者下呼吸道感染致病菌, 阳性率高于痰培养法, 可广泛应用于临床下呼吸道感染的快速诊断。

关键词:环介导等温扩增芯片法; 痰培养; 重症监护患者; 下呼吸道感染

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.17.001

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2021)17-2049-04

文献标志码:A

Application value of LAMP chip with thirteen combined detection for pathogens in intensive care patients with lower respiratory tract infection*

LI Xiao, YANG Yongquan, SUN Zhaohui, ZHANG Weiyun[△]

Department of Laboratory Medicine, General Hospital of Southern Theatre

Command of PLA, Guangzhou, Guangdong 510010, China

Abstract: **Objective** To investigate the application value of loop-mediated amplification (LAMP) chip in the rapid detection of pathogens of lower respiratory tract infection for intensive care patients. **Methods** A total of 67 cases of deep sputum or alveolar lavage fluid samples from patients with lower respiratory tract infection in intensive care unit of the hospital were collected, and were detected by LAMP and sputum culture. The distribution of pathogens, positive rate and positive coincidence rate were compared between the two methods, SPSS software and Kappa test were used for data analysis. **Results** The positive rate of pathogenic bacteria detected by LAMP method was 77.61%(52/67); the positive rate of pathogenic bacteria detected by sputum culture method was 65.67%(44/67); the positive rate of pathogenic bacteria detected by LAMP method was significantly higher than that of culture method, and the difference was statistically significant ($\chi^2=20.589, P<0.05$), the overall positive coincidence rate of pathogenic bacteria detected by LAMP method and sputum culture method was consistent (Kappa=0.567). The pathogenic bacteria detected by the two methods were mainly gram-negative bacilli, among which the positive coincidence rate of *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptomonas maltophilia*, and *Mycobacterium tuberculosis* were relatively consistent. **Conclusion** The LAMP method can rapidly detect the pathogens of lower respiratory tract infection of patients in intensive care unit. The positive rate was higher than that of traditional method. It can be widely used in the rapid diagnosis of lower respiratory tract infection.

Key words: loop-mediated amplification; sputum culture; intensive care; lower respiratory tract infection

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(31901035); 军队后勤科研项目(CLB19J033); 广州市科技计划项目(202002030078)。

作者简介: 李晓, 女, 主管技师, 主要从事病原微生物分子诊断研究。 [△] 通信作者, E-mail: 12613498253@qq.com。

本文引用格式: 李晓, 杨永泉, 孙朝晖, 等. LAMP 芯片十三联法检测重症监护患者下呼吸道感染病原菌的应用价值[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(17): 2049-2052.

下呼吸道感染在世界十大死亡病因中排名第四，在发展水平较低的国家中，下呼吸道感染疾病在死亡原因中排名更靠前^[1]，在我国也是最常见的疾病之一。肺炎作为全球感染性疾病最主要的死因之一，若发生在重症监护患者中，尤其需要引起重视。下呼吸道感染绝大多数以革兰阴性(G⁻)杆菌为主要致病菌，因此明确引起感染的病原菌，选择合理的抗菌药物治疗是临床迫切需要的^[2]。目前临床鉴定病原菌的方法主要依靠细菌培养法，但烦琐又费时，而环介导等温扩增检测(LAMP)芯片法可在 1~2 h 内定性检测下呼吸道分泌物中的 13 种病原菌(包括肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林葡萄球菌、鲍曼不动杆菌、大肠埃希菌、流感嗜血杆菌、肺炎克雷伯菌、嗜麦芽窄食单胞菌、铜绿假单胞菌、嗜肺军团菌、肺炎支原体、肺炎衣原体、结核分枝杆菌)，该技术可应用于细菌、病毒、真菌等一系列病原微生物的检测^[3-4]，大大提高了呼吸道感染的病原学诊断水平，可及时指导医师合理使用抗菌药物^[5-6]。LAMP 芯片法与痰培养法比较，前者具有特异度和灵敏度较高的优势，对于培养周期长或者难培养的病原菌可进行快速鉴定，对指导临床治疗具有较高价值^[7-8]。本研究拟采用 LAMP 芯片法检测重症监护患者下呼吸道感染病原菌，并与痰培养法进行比较，探讨 2 种方法检测的一致性和临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2019 年 6 月至 2019 年 12 月本院重症监护病房疑似下呼吸道感染患者 67 例，其中男 49 例、女 18 例，平均年龄(68.3±22.1)岁，采集深部痰液和肺泡灌洗液标本。应用 LAMP 芯片法检测上述患者的 13 种常见下呼吸道病原菌，对同一患者还同时进行痰培养检查，比较 2 种方法的差异，对检测结果的一致性进行分析。

1.2 仪器与试剂 LAMP 芯片法仪器和试剂均为北京博奥生物集团有限公司生产，包括核酸分析仪、呼吸道病原菌核酸检测试剂盒和恒温扩增芯片。用于液化痰液的 10%NaOH 溶液由本科室自行配制。痰培养病原菌鉴定采用法国生物梅里埃公司生产的 API 微生物分析系统及配套试剂。

1.3 方法

1.3.1 样本收集 采用经气管内吸痰取深部痰液或者肺泡灌洗液，样本量不少于 0.6 mL 置于无菌容器内于 2 h 内送检，在所有患者暂未使用抗菌药物治疗时进行。

1.3.2 样本检测 LAMP 芯片法：痰液或肺泡灌洗液标本中按 1：1 加入 10%NaOH 溶液，静置 30 min 左右，待标本完全液化后取 1 mL 液体按试剂盒说明书操作步骤提取核酸，提取好的核酸加入恒温扩增芯片中，上机检测^[9-10]。痰培养法：痰液或肺泡灌洗液在平板上接种后置于 37℃二氧化碳温箱中培养，将生

长的优势菌确定为致病菌，然后采用全自动微生物鉴定仪进行鉴定。

1.4 结果判断 LAMP 芯片法可同时完成 13 种下呼吸道常见病原菌的靶基因扩增和检测，扩增芯片内设有 1 个阳性内参和 9 个阴性质控及 1 个人基因组 DNA 用于检测质控，结果判读时阳性质控应为阳性，阴性质控结果均为阴性，且阳性标本呈典型的 S 形扩增曲线可判断结果为阳性。根据《全国临床检验操作规程》第 3 版规定，痰培养采用密集划线法进行计数培养，以菌落数≥10⁴ CFU/mL 为阳性，<10⁴ CFU/mL 为污染^[11]。

1.5 统计学处理 采用 SPSS21.0 软件分析数据，列表方法分析菌株分布，痰培养法与 LAMP 芯片法阳性率比较采用 χ^2 检验；采用 Kappa 检验进行一致性分析，Kappa>0.40 为具有一致性，P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LAMP 芯片法检测菌株分布 67 例重症监护病房下呼吸道感染患者，LAMP 芯片法检出病原菌阳性 52 例，阳性率 77.61%(52/67)。检出菌株 114 株，包含 9 种病原菌，其中革兰阳性(G⁺)菌占 24.56%(28/114)，G⁻菌 74.56%(85/114)。未检出肺炎支原体、肺炎衣原体、嗜肺军团菌及肺炎链球菌，见表 1。检出单菌株 21 例、混合菌株 31 例，其中 2 种菌株 14 例，3 种菌株 9 例，4 种菌株 5 例，5 种、6 种及 7 种混合菌株各 1 例，见表 2。

表 1 LAMP 芯片法检测病原菌菌株分布[n(%)]

细菌类型	n	构成比(%)
G ⁺ 菌	28	24.56
金黄色葡萄球菌	8	7.02
耐甲氧西林葡萄球菌	20	17.54
G ⁻ 菌	85	74.56
鲍曼不动杆菌	23	20.18
大肠埃希菌	9	7.89
流感嗜血杆菌	3	2.63
肺炎克雷伯菌	22	19.30
嗜麦芽窄食单胞菌	15	13.16
铜绿假单胞菌	13	11.40
其他*	1	0.88

注：* 表示结核分枝杆菌。

表 2 LAMP 芯片法检测出的单菌株/混合菌情况

单菌株/混合菌检出情况	标本例数(n)	构成比(%)
1 种菌	21	40.5
2 种混合菌	14	26.9
3 种混合菌	9	17.3
4 种混合菌	5	9.6
5 种混合菌	1	1.9
6 种混合菌	1	1.9
7 种混合菌	1	1.9
合计	52	100.0

2.2 痰培养法检测菌株分布 重症监护病房下呼吸道感染患者标本 67 例,其痰液标本培养以检出优势菌株判定为阳性,共检出阳性 44 例,阳性率 65.67%(44/67)。检出菌株 44 株,包含 7 种病原菌,其中 G⁺菌占 4.54%(2/44),G⁻菌占 93.19%(41/44)。未检出大肠埃希菌、流感嗜血杆菌、肺炎支原体、肺炎衣原体、嗜肺军团菌及肺炎链球菌病原菌,见表 3。

表 3 痰培养法检测病原菌菌株分布

细菌类型	n	构成比(%)
G ⁺ 菌	2	4.54
金黄色葡萄球菌	1	2.27
耐甲氧西林葡萄球菌	1	2.27
G ⁻ 菌	41	93.19
鲍曼不动杆菌	12	27.27
肺炎克雷伯菌	10	22.73
嗜麦芽窄食单胞菌	9	20.46
铜绿假单胞菌	10	22.73
其他*	1	2.27

注:*表示结核分枝杆菌。

2.3 LAMP 芯片法与痰培养法阳性率比较 LAMP 芯片法检出下呼吸道感染病原菌阳性率高于痰培养法(77.61% vs. 65.67%),差异有统计学意义($\chi^2=20.589, P<0.05$)。2 种方法检出病原菌的阳性符合率较一致(Kappa=0.567),见表 4。分析 2 种方法检测各菌种的一致性,LAMP 芯片法与痰培养法对鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、嗜麦芽窄食单胞菌、结核分枝杆菌检测具有一致性(Kappa>0.40),而对耐甲氧西林葡萄球菌、金黄色葡萄球菌的检测不具有-致性(Kappa<0.40),见表 5。

表 4 LAMP 芯片法与痰培养法检测病原菌的一致性分析(n)

LAMP 芯片法	痰培养		合计	Kappa
	阳性	阴性		
阳性	42	10	52	0.567
阴性	2	13	15	
合计	44	23	67	

表 5 LAMP 芯片法与痰培养法检测各病原菌结果的一致性分析(n)

细菌名称	LAMP(+)痰培养(+)	LAMP(+)痰培养(-)	LAMP(-)痰培养(+)	LAMP(-)痰培养(-)	Kappa
鲍曼不动杆菌	11	12	1	43	0.514
铜绿假单胞菌	8	5	0	54	0.721
肺炎克雷伯菌	5	8	1	53	0.460
嗜麦芽窄食单胞菌	6	7	3	51	0.460
金黄色葡萄球菌	1	7	0	59	0.201
耐甲氧西林葡萄球菌	1	19	0	47	0.069
结核分枝杆菌	1	1	0	65	0.660

注:(+)表示阳性;(-)表示阴性。

3 讨论

下呼吸道感染是重症监护病房患者最常见的疾病之一,严重影响患者康复,不容忽视。细菌是下呼吸道感染病原菌的重要组成部分,痰培养法在检测下呼吸道病原菌的灵敏度和检测时间上难以满足临床患者的要求。本研究采用的 LAMP 芯片法同时检测 13 种下呼吸道病原菌,具有时间短、操作简单、特异度和敏感度高等优势,该方法具备了对呼吸道感染性疾病的快速诊断能力^[12-13]。

本研究显示,LAMP 芯片法检测下呼吸道感染病原菌的阳性率高于痰培养法(77.61% vs. 65.67%),差异有统计学意义($P<0.05$),因此 LAMP 芯片法能快速确定感染病原体,医生可根据检测结果正确选择抗菌药物,使患者得到及时有效治疗,大大缩短患者感染急性期及住院时间,减少细菌耐药性的产生。2 种方法检测病原菌具有一致性,对鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、嗜麦芽窄食单胞菌、结核分枝杆菌检测的检测具有一致性,而对耐甲氧西林葡萄球菌和金黄色葡萄球菌的检测不具有-致性,与以往文献^[14]报道基本一致,分析原因可能是 LAMP

芯片法检测病原菌的灵敏度更高,而痰培养法检测耐甲氧西林葡萄球菌和金黄色葡萄球菌容易受标本污染或实验室检测条件的限制,漏检部分病原菌,因此 LAMP 芯片法检测的病原菌更能真实地反映下呼吸道感染疾病。研究发现 LAMP 芯片法对嗜麦芽窄食单胞菌检出率较高,分析原因可能是该方法学检测的灵敏度更高,能从微量核酸中扩增出所需的-目的基因^[15]。同时,本研究的研究对象是重症监护患者,或与患者合并肺部感染、不规范使用抗菌药物、长期使用糖皮质激素、使用免疫抑制剂和机械通气时间 ≥ 7 d 等原因有关^[16]。

本院重症监护病房患者下呼吸道感染病原菌检出的致病菌以 G⁻菌为主(74.56%),其中阳性率最高的是鲍曼不动杆菌(20.18%),其次是肺炎克雷伯菌和铜绿假单胞菌(19.30%和 13.16%),均为重要的医院致病菌,这与以往检测结果一致^[17-21]。分析原因可能是重症监护病房环境特殊,患者本身基础疾病多,常有生理功能紊乱,免疫功能下降,有创诊疗率高于普通病房,大量广谱抗菌药物及免疫抑制剂的应用等。鲍曼不动杆菌检出率居首位,该菌是医院感染的

重要病原菌。免疫力较差的住院患者和严重的呼吸道疾病患者易发生多重耐药鲍曼不动杆菌感染^[17-19], 严重威胁患者生命。铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯菌检出率仅次于鲍曼不动杆菌, 可能是因为重症监护病房患者免疫力低、基础疾病多以及长期使用抗菌药物, 导致感染铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯菌风险较高^[20-21]。G⁺菌检出率最高的是耐甲氧西林葡萄球菌, 该菌具有多重耐药性, 是获得性肺炎的重要致病菌^[22-23]。

综上所述, 痰培养法虽然价格低廉, 可区分定植菌和致病菌, 能分辨优势菌株, 并且能有针对性地进行药敏试验, 但检测周期长, 阳性率较低, 难以培养非典型病原菌。而 LAMP 芯片法检测下呼吸道感染病原菌虽然缺乏药物敏感性的检测结果, 但检测周期短、灵敏度高, 而且可检测非典型病原菌如嗜肺军团菌、结核分枝杆菌, 是诊断下呼吸道感染更为快速、简便、灵敏的方法, LAMP 芯片法作为新技术, 更有利于感染的早期干预, 其检测结果可用于指导临床用药。

参考文献

- [1] World Health Organization. Global Health Estimates: Life expectancy and leading causes of death and disability [EB/OL]. [2020-11-29]. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates>.
- [2] 戴以顺, 齐兴江, 江周书. 下呼吸道感染病原菌分布及药敏分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(11): 2619-2620.
- [3] 林群冯, 洁仪, 黄金华. 应用环介导等温扩增技术对分离自呼吸系统感染铜绿假单胞菌的快速检测[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(16): 2676-2677.
- [4] RATLIFF A E, DUFFY L B, WAITES K B. Comparison of the illumigene Mycoplasma DNA amplification assay and culture for detection of Mycoplasma pneumoniae[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(4): 1060-1063.
- [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(6): e38743.
- [6] 李松, 何晓光, 马可泽. 环介导恒温扩增芯片法在机械通气新生儿下呼吸道感染病原菌检测中应用[J]. 广东医科大学学报, 2018, 36(2): 169-172.
- [7] 鄢春花. 环介导恒温扩增技术研究进展[J]. 临床检验杂志, 2013, 31(7): 520-522.
- [8] 唐睿珠, 罗正琼, 徐秋月. 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.

- [9] HUANG G, WANG C, MA L, et al. Sensitive sequence-specific molecular identification system comprising an aluminum micro-nanofluidic chip and associated real-time confocal detector[J]. Anal Chim Acta, 2011, 695(1/2): 1-10.
- [10] 李振庆, 吴到检, 张大伟. 基于毛细管电泳的环介导恒温扩增技术检测方法研究[J]. 分析测试学报, 2016, 35(6): 758-761.
- [11] 王羽. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006.
- [12] 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.
- [13] KINOSHITA Y, NIWA H, KATAYAMA Y, et al. Use of loop-mediated isothermal amplification to detect six groups of pathogens causing secondary lower respiratory bacterial infections in horses[J]. Microbiol Immunol, 2015, 59(6): 365-370.
- [14] 刘志远, 潘健, 张婷菊, 等. 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.
- [15] 陈愉生, 王大璇, 李鸿茹, 等. 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[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2014, 37(4): 270-273.
- [16] 孙敏. 重症监护室下呼吸道嗜麦芽窄食单胞菌感染的临床研究[J]. 临床医药文献杂志, 2018, 5(82): 53-56.
- [17] 陈迎晓, 黄瑜, 王晓东, 等. 医院与社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染的临床特点和耐药性的对比分析[J]. 中国全科医学, 2013, 16(1): 93-94.
- [18] 刘莲凤, 叶瑞梅, 刘旗明. 老年无多重耐药危险医院获得性肺炎患者病原菌分布及耐药性分析[J]. 中国老年学, 2015, 35(2): 331-333.
- [19] 李晓红, 郭宁辉, 杨婧, 等. 某医院 ICU 住院患者鲍曼不动杆菌流行特征与耐药性分析[J]. 中国消毒学杂志, 2016, 33(4): 338-340.
- [20] 林丽容. 铜绿假单胞菌分布及耐药情况分析[J]. 临床合理用药, 2018, 11(12): 112-114.
- [21] 王璐, 纪莉, 钱东华. 下呼吸道感染的 3 999 株肺炎克雷伯杆菌分布及耐药性分析[J]. 中国实验诊断学, 2019, 23(1): 49-51.
- [22] GHAJAVAND H, ESFAHANI B N, HAVAEI S A, et al. Molecular identification of Acinetobacter baumannii isolated from intensive care units and their antimicrobial resistance patterns[J]. Adv Biomed Res, 2015, 4: 110.
- [23] 吴宝刚, 万小旭, 刘丹, 等. 重症监护病房老年患者鲍曼不动杆菌感染的临床特点及药敏分析[J]. 中国医科大学学报, 2016, 45(5): 406-408.

(收稿日期: 2020-11-29 修回日期: 2021-04-11)