

临床检验诊断应用实践专题·论著

恒温扩增芯片法在下呼吸道感染病原体检测中的应用

王婷婷¹,刘怀燕^{1,2},黄家望¹,教科萍¹,王中浩¹,吴重阳¹,谢轶^{1△}

1. 四川大学华西医院实验医学科,四川成都 610041;2. 南充市中心医院检验科,四川南充 637000

摘要:**目的** 评价恒温扩增芯片法在下呼吸道感染病原体检测中的应用价值。**方法** 选取四川大学华西医院 2021 年 1—6 月下呼吸道疑似感染患者 1 432 例作为研究对象,采用恒温扩增芯片法检测感染病原体阳性率并与细菌传统培养法检测结果进行比较分析。**结果** 研究对象采用恒温扩增芯片法检测出阳性例数为 597 例(阳性率为 41.7%),采用细菌传统培养法检测出阳性例数为 530 例(阳性率为 37.0%)。两种方法对铜绿假单胞菌检测一致性高($Kappa\geq 0.75$),对流感嗜血杆菌、大肠埃希菌、肺炎链球菌及嗜麦芽窄食单胞菌检测一致性低($Kappa< 0.40$)。恒温扩增芯片法对鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌及金黄色葡萄球菌等病原体的混合阳性率高于细菌传统培养法,差异有统计学意义($P< 0.05$)。**结论** 恒温扩增芯片法检测下呼吸道感染病原体的阳性率高于细菌传统培养法检测的阳性率,有利于快速找到下呼吸道感染的真正病原体。

关键词:下呼吸道感染; 病原体; 恒温扩增芯片法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.08.005 **中图法分类号:**R446.5

文章编号:1673-4130(2022)08-0916-05 **文献标志码:**A

Application of constant temperature amplification chip method in pathogens
detection of lower respiratory tract infection

WANG Tingting¹,LIU Huaiyan^{1,2},HUANG Jiawang¹,AO Keping¹,
WANG Zhonghao¹,WU Chongyang¹,XIE Yi^{1△}

1. Department of Laboratory Medicine, West China Hospital, Sichuan University,
Chengdu, Sichuan 610041, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Nanchong Central
Hospital, Nanchong, Sichuan 637000, China

Abstract:**Objective** To evaluate the value of constant temperature amplification chip method in detecting pathogens of lower respiratory tract infection. **Methods** A total of 1 432 patients with suspected lower respiratory tract infection from January to June 2021 in West China Hospital, Sichuan University were selected as subjects. The positive rate of infection pathogens was detected by constant temperature amplification chip method and compared with the results of traditional bacterial culture method. **Results** 597 cases(positive rate 41.7%) were detected by constant temperature amplification chip method, 530 cases(positive rate 37.0%) were detected by traditional bacterial culture method. The two methods had high consistency for *Pseudomonas aeruginosa*($Kappa\geq 0.75$), but low consistency for *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae* and *Stenotrophomonas maltophilia*($Kappa< 0.40$). The mixed positive rate of *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* by constant temperature amplification chip method was higher than that by traditional bacterial culture method, and the difference was statistically significant($P< 0.05$). **Conclusion** The positive rate of pathogens in lower respiratory tract infection detected by constant temperature amplification chip method is higher than that detected by traditional bacterial culture method, which is beneficial to quickly find the real pathogens of lower respiratory tract infection.

Key words: lower respiratory tract infection; pathogens; constant temperature amplification chip method

作者简介:王婷婷,女,主管技师,主要从事感染性免疫研究。△ 通信作者,E-mail:xie_yi_77@163.com。
本文引用格式:王婷婷,刘怀燕,黄家望,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].国际检验医学杂志,2022,43(8):916-920.

环介导等温扩增法(LAMP)作为一种新型的检测技术,具有特异度高、效率高、操作简单等优点,因此在微生物鉴定诊断领域得到了广泛的应用,可用于感染早期或临床症状不明显的疾病检测^[1]。恒温扩增芯片法是利用 LAMP 结合微流控芯片检测下呼吸道常见病原体的一种新技术,该技术针对靶基因的 6 个区域设计 4 种特异引物,在链置换 DNA 聚合酶的作用下,60~65 ℃恒温扩增,由于其反应过程省略了变性和退火步骤,极大地缩短了检验周期,15~60 min 即可实现 10⁹~10¹⁰ 倍的核酸扩增^[2]。LAMP 已被广泛应用于基础医学研究、食物基质中病原体快速筛选、环境病原体检测及致病性病原体的即时检测^[3]。下呼吸道感染是临床常见的感染性疾病,可由多种病原体引起,包括常见细菌、真菌、衣原体、支原体及病毒等。细菌传统培养法是临床诊断下呼吸道感染的常用检测手段,但存在阳性率低、检测周期长、容易漏检等问题,并且无法覆盖不能常规培养的病原体,导致许多临床治疗依然需要经验性使用抗菌药物。准确的病原体检测可为临床合理、正确使用抗菌药物提供依据,减少耐药的发生。基于恒温扩增芯片技术的试剂盒可检测下呼吸道 13 种常见病原体,检测快速、操作简单,具有较高特异度和灵敏度,已广泛应用于临床对于下呼吸道感染的诊断^[4]。本研究旨在评价恒温扩增芯片法在下呼吸道感染病原体检测中的临床应用价值,并与其采用细菌传统培养法的检测结果进行比较。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取四川大学华西医院 2021 年 1—6 月下呼吸道疑似感染患者 1 432 例作为研究对象,采集研究对象合格下呼吸道样本,包括合格痰液 756 例、肺泡灌洗液 566 例及经气管插管收集的深部气管分泌液 110 例。研究对象中男性 934 例(65.2%),女性 498 例(34.8%),年龄 1~96 岁,中位年龄为 62 岁。

1.2 仪器与试剂 恒温扩增芯片法检测采用北京博奥生物集团有限公司的呼吸道病原菌核酸检测试剂盒。细菌传统培养法应用的血琼脂平板、巧克力平板及麦康凯平板为郑州安图生物工程有限公司产品。细菌鉴定采用生物梅里埃 VITEK2 COMPACT 全自动细菌鉴定系统及布鲁克科技有限公司基质辅助激光解析飞行时间质谱仪。质量控制菌株采用铜绿假单胞菌 ATCC27853、大肠埃希菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC25923 及粪肠球菌 ATCC29212。

1.3 方法 恒温扩增芯片法样本液化、核酸提取、加样及检测步骤参照试剂盒说明书操作,采用 Rti-soch-

ip-W 恒温扩增核酸分析仪检测,应用其相应软件进行结果判读。可以检测的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、肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌、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、结核分枝杆菌复合群、肺炎支原体和肺炎衣原体。细菌传统培养法标本接种、分离培养及菌种鉴定按《全国临床检验操作规程》第 4 版进行,采用全自动细菌鉴定系统及质谱仪进行菌种鉴定。

1.4 统计学处理 采用 SPSS24.0 统计软件进行数据分析,计数资料以例数或百分率表示,两两比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。一致性分析采用 Kappa 检验,Kappa ≥ 0.75 为一致性高,0.40 $\leq$ Kappa <0.75 为一致性一般,Kappa <0.40 为一致性差。

2 结果

2.1 研究对象总体检测情况比较 研究对象采用恒温扩增芯片法检测出阳性例数为 597 例(阳性率为 41.7%),采用细菌传统培养法检测出阳性例数为 530 例(阳性率为 37.0%),两种方法检测的阳性率比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。两种方法检测结果完全相同的病例共有 1 003 例,检测一致率为 70.0%,两种方法检测结果均为阳性,但阳性结果完全不同的病例共有 37 例(2.6%)。对结果进行进一步分析发现,756 例合格痰液样本采用恒温扩增芯片法检测的阳性率(43.5%)高于细菌传统培养法检测的阳性率(36.4%),差异有统计学意义($P<0.05$);肺泡灌洗液及深部气管分泌液样本采用两种方法检测的阳性率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 两种方法检测阳性率比较[n(%)]

细菌传统培养法	恒温扩增芯片法	
	阳性	阴性
阳性	436(30.44)	94(6.56)
阴性	161(11.24)	741(51.75)

2.2 不同种类病原体检测情况比较 两种方法对铜绿假单胞菌检测一致性高(Kappa ≥ 0.75),对流感嗜血杆菌、大肠埃希菌、肺炎链球菌及嗜麦芽窄食单胞菌检测一致性低(Kappa <0.40)。见表 2。恒温扩增芯片法对鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌、流感嗜血杆菌、大肠埃希菌、肺炎链球菌及结核分枝杆菌复合群检测阳性率比细菌传统培养法检测阳性率高($P<0.05$),细菌传统培养法检测嗜麦芽窄食单胞菌阳性率比恒温扩增芯片法检测阳性率高($P<0.05$),两种方法检测铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌的阳性率

比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。合格痰液样本的铜绿假单胞菌检测一致性高($Kappa>0.75$),而肺泡灌洗液样本的铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌的检测结果一致性均较高($Kappa>0.75$)。另外,因深部气管分泌液样本较少未纳入分析。见表 3。

2.3 混合阳性结果检出情况比较 恒温扩增芯片法检测出多种病原体组合的混合阳性率比细菌传统培养法检测的结果高,其中检出肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌和嗜麦芽窄食单胞菌等病原体时,其检测结

果较多是同时合并其他病原体的多种菌混合阳性的结果(混合阳性率 $>60\%$);流感嗜血杆菌更多为单一阳性结果。细菌传统培养法与恒温扩增芯片法检测情况不同,肺炎链球菌和嗜麦芽窄食单胞菌培养阳性通常出现在与其他病原体的混合阳性结果中,其他细菌则更多检出为单一阳性结果。恒温扩增芯片法对鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌及金黄色葡萄球菌等病原体的混合阳性率高于细菌传统培养法,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 4。

表 2 两种方法对不同种类病原体的检测情况比较

病原体	恒温扩增芯片法(+)	恒温扩增芯片法(+)	恒温扩增芯片法(−)	恒温扩增芯片法(−)	χ^2	Kappa	P
	细菌传统培养法(+)	细菌传统培养法(−)	细菌传统培养法(+)	细菌传统培养法(−)			
鲍曼不动杆菌	191	95	32	1 114	31.252	0.698	<0.001
肺炎克雷伯菌	92	69	38	1 233	8.981	0.591	0.004
铜绿假单胞菌	80	20	19	1 313	0.000	0.789	1.000
流感嗜血杆菌	12	66	7	1 347	47.685	0.231	<0.001
大肠埃希菌	11	32	6	1 383	16.447	0.356	<0.001
金黄色葡萄球菌	26	29	23	1 354	0.692	0.481	0.488
肺炎链球菌	4	28	1	1 399	23.310	0.211	<0.001
嗜麦芽窄食单胞菌	12	23	40	1 357	4.587	0.254	0.043
结核分枝杆菌复合群	9	15	4	1 404	5.263	0.480	0.019

表 3 合格痰液、肺泡灌洗液样本病原体检测情况比较

病原体	合格痰液				肺泡灌洗液			
	恒温扩增芯片法	细菌传统培养法	Kappa	P	恒温扩增芯片法	细菌传统培养法	Kappa	P
	阳性率(%)	阳性率(%)			阳性率(%)	阳性率(%)		
鲍曼不动杆菌	16.27	13.23	0.669	0.005	21.73	16.96	0.746	<0.001
肺炎克雷伯菌	11.24	7.94	0.612	0.001	11.31	8.48	0.605	0.017
铜绿假单胞菌	7.67	6.88	0.765	0.307	5.48	5.83	0.801	0.774
流感嗜血杆菌	8.47	1.59	0.216	<0.001	1.06	0.53	0.217	0.453
大肠埃希菌	3.97	1.59	0.464	<0.001	2.12	0.88	0.345	0.065
金黄色葡萄球菌	5.29	3.84	0.560	0.061	1.24	1.94	0.323	0.388
肺炎链球菌	2.38	0.53	0.266	0.001	1.59	0.35	—	—
嗜麦芽窄食单胞菌	3.97	2.51	0.389	0.061	1.59	3.36	0.124	0.064

注:—表示肺泡灌洗液样本检测出肺炎链球菌阳性数太少,不满足统计分析要求。

表 4 两种方法检测不同病原体的混合阳性率比较

病原体	恒温扩增芯片法		细菌传统培养法		P
	阳性例数(n)	混合阳性率[$n(\%)$]	阳性例数(n)	混合阳性率[$n(\%)$]	
鲍曼不动杆菌	286	121(42.31)	223	57(25.56)	<0.001
肺炎克雷伯菌	161	100(62.11)	130	50(38.46)	<0.001
铜绿假单胞菌	100	49(49.00)	99	31(31.31)	0.011
流感嗜血杆菌	78	24(30.77)	19	10(52.63)	0.073
大肠埃希菌	43	25(58.14)	17	7(41.18)	0.086

续表 4 两种方法检测不同病原体的混合阳性率比较

病原体	恒温扩增芯片法		细菌传统培养法		P
	阳性例数(n)	混合阳性率[n(%)]	阳性例数(n)	混合阳性率[n(%)]	
金黄色葡萄球菌	55	35(63.64)	49	18(36.73)	0.006
肺炎链球菌	32	15(46.88)	5	4(80.00)	0.370
嗜麦芽芽孢杆菌	35	24(68.57)	52	35(67.31)	0.902

2.4 恒温扩增芯片法检测病原体分布特点 采用恒温扩增芯片法检出的病原体前 5 位依次为鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、流感嗜血杆菌和金黄色葡萄球菌。对于培养周期长的结核分枝杆菌及无法进行常规培养的几类下呼吸道常见病原体:肺炎支原体、肺炎衣原体、嗜肺军团菌,恒温扩增芯片法检出结核分枝杆菌阳性共 24 例,肺炎支原体、肺炎衣原体、嗜肺军团菌各 1 例。

3 讨论

本研究纳入 1 432 例疑似下呼吸道感染患者,采用恒温扩增芯片法检测的阳性率高于细菌传统培养法,差异有统计学意义($P<0.05$),说明恒温扩增芯片法检测灵敏度更高,这与其他研究报道结果一致^[5-7]。细菌传统培养法可能存在假阴性结果,造成假阴性的原因可能是部分患者在检测前接受了抗菌药物治疗,对病原体培养产生抑制作用。尤其在流感嗜血杆菌和肺炎链球菌等检测中,由于其培养要求高、培养过程影响因素多,可导致细菌传统培养法阳性率降低。

除了阳性率差异,两种方法在不同菌种中检测的一致性表现也有差异。有研究报道,恒温扩增芯片法和细菌传统培养法对于铜绿假单胞菌的检测阳性率一致性高,对于肺炎链球菌和流感嗜血杆菌的检测阳性率一致性较低^[8],与本研究结果一致。由于本研究纳入合格痰液、肺泡灌洗液和深部气管分泌液样本,为明确痰液中口腔正常菌群对病原菌的检出是否有影响,研究进一步做了区分样本类型的检测一致性比较,由于深部气管分泌液样本少未纳入分析,结果表明,肺泡灌洗液样本铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌检测阳性率一致性相比合格痰液有了进一步提高,这与文献^[9]研究结果一致。

另外,由于规避了多种病原体共培养的生长竞争问题,恒温扩增芯片法对于鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌及金黄色葡萄球菌等多种病原体混合阳性率较细菌传统培养法更高($P<0.05$),有利于为其感染的可能致病菌提供更为全面的微生物学证据。左丽娜等^[10]也报道了相同的结果。此外,有研究报道,恒温扩增芯片法准确度高、灵敏度高、特异度强、反应省时,可以作为肺炎克雷伯菌的快速检测

方法^[11]。

本研究的病原体包括培养阳性率低、周期长的结核分枝杆菌,无法常规培养的肺炎支原体、肺炎衣原体及嗜肺军团菌,对于这类病原体,恒温扩增芯片法可显著提高检测灵敏度。国内外已开展了应用 LAMP 技术在结核分枝杆菌快速诊断中临床价值的研究,结果显示,其检测特异度、灵敏度均较高,分别为 96% 和 80%^[12-13]。本研究恒温扩增芯片法检出结核分枝杆菌共 24 例,采用恒温扩增芯片法检测结核分枝杆菌的阳性率高于细菌传统培养法阳性率,差异有统计学意义($P<0.05$)。李辉腾等^[14]研究显示,恒温扩增芯片法可快速、准确检测嗜肺军团菌。有研究发现,恒温扩增芯片法对于检测肺炎支原体感染优势明显^[15]。本研究检出肺炎支原体、肺炎衣原体及嗜肺军团菌各 1 例,为临床感染的诊断治疗提供了较明确的微生物学证据,此类病原体无法常规进行培养,需通过血清学或宏基因组测序(mNGS)等方法进行检测,缺乏金标准,恒温扩增芯片法检测快速、灵敏,是一种可靠的病原学筛查方法。

综上所述,恒温扩增芯片法与细菌传统培养法相比,具有快速、灵敏、高效的特点,可一次性同时检测 13 种常见呼吸道病原体,检测周期仅需 2~4 h,对多种呼吸道病原体检测的阳性率高于细菌传统培养法,恒温扩增芯片法有利于快速诊断下呼吸道感染的真正病原菌,尤其是苛养菌、慢生长菌和不可培养病原体的快速诊断。恒温扩增芯片法也具有自身的局限性,它所包含的 13 种呼吸道病原体并未完全覆盖呼吸道感染常见细菌,比如阴沟肠杆菌、卡他莫拉菌等,此类病原体的检测仍需依靠细菌传统培养法进行补充。因此,针对疑似下呼吸道感染的患者,建议临床联合应用两种检测方法,充分利用不同方法的优势,为临床诊疗的综合分析提供及时、可靠的依据。

参考文献

[1] LI Y M, FAN P H, ZHOU S S, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a novel rapid detection platform for pathogens[J]. Microb Pathog, 2017, 107(1): 54-61.

[2] 刘芮,沈秉正,刘煜,等. LAMP 十三联检在下呼吸道常见细菌感染检测中的价值[J]. 武汉大学学报(医学版), 2020,41(6):954-958.

[3] BABU U S, HARRISON L M, MAMMEL M K, et al. A loop-mediated isothermal amplification(LAMP) assay for the consensus detection of human pathogenic Campylobacter species[J]. J Microbiol Methods, 2020, 176(1): 1-6.

[4] 陶文学,陈来秀,李正国,等. 探讨晶芯呼吸道病原菌核酸检测恒温扩增技术对检测成人呼吸道感染病原菌的准确性[J]. 中国社区医师, 2021, 37(26): 124-125.

[5] 王亮,沈永明,高伟,等. 下呼吸道感染儿童的病原菌检测及临床分析[J]. 中国城乡企业卫生, 2021, 36(2): 129-132.

[6] 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.

[7] 刘佳佳,孙静娜,张征,等. 恒温扩增芯片法在 ICU 肺部感染患者下呼吸道感染病原体检测中的应用价值[J]. 临床和实验医学杂志, 2021, 20(15): 1672-1676.

[8] 徐晓娜,孙昕,王莉莉,等. LAMP 法和传统培养法检测下呼吸道感染常见病原体的比较研究[J]. 安徽医学, 2021, 42(7): 802-805.

[9] WANG Z Q, ZANG Y, GAO Y J, et al. Evaluation of bronchoalveolar lavage fluid combined with the loop-mediated isothermal amplification assay in lower respiratory tract infections[J]. Am J Transl Res, 2020, 12(7): 4009-4016.

[10] 左丽娜,陈碧,陈玉玲,等. 利用核酸恒温扩增技术检测下呼吸道感染病原菌的分布特征[J]. 中国校医, 2021, 35(2): 93-96.

[11] 司玉莹,赵望,叶蓓,等. 环介导等温扩增技术检测呼吸道样本中肺炎克雷伯菌[J]. 临床检验杂志, 2020, 38(1): 56-59.

[12] 郝志华. 环介导恒温扩增法快速诊断肺结核的临床评价[J]. 山西职工医学院报, 2017, 27(5): 836-827.

[13] YUAN L Y, LI Y, WANG M, et al. Rapid and effective diagnosis of pulmonary tuberculosis with novel and sensitive loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay in clinical samples: a meta-analysis[J]. Infect Chemother, 2014, 20(2): 86-92.

[14] 李辉腾,郭旭光. 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): 3677-3678.

[15] 顾锦,郭会,周围,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]. 临床检验杂志, 2021, 39(1): 12-16.

(收稿日期:2021-10-28 修回日期:2022-03-01)

(上接第 915 页)

[5] HUANG L B, GUAN X Q, ZHANG Y C, et al. Current status of diagnosis and prognosis of infant acute leukemia in China[J]. Pediatr Blood Cancer, 2009, 53(6): 973-977.

[6] 余鹏,魏欣. 临床实验室骨髓细胞形态学检验的质量要求及实践思考[J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(6): 157-160.

[7] 高帆,克晓燕,王晶,等. 骨髓穿刺物的检测对非霍奇金淋巴瘤患者骨髓受累的诊断和患者预后评估的价值[J]. 中国实验血液学杂志, 2020, 28(2): 488-494.

[8] 张华,李远波. 骨髓细胞形态学检查在疑似白血病患者辅助诊断中的价值[J]. 贵州医药, 2020, 44(5): 728-729.

[9] 王霞,张斌. 混合表型急性白血病患者骨髓细胞形态学与流式免疫表型特点[J]. 检验医学, 2019, 34(3): 235-239.

[10] 吴祖常,肖平,林蔚,等. 流式细胞术对急性白血病免疫分型判断的意义[J]. 深圳中西医结合杂志, 2021, 31(9): 107-108.

[11] 陈竺,陈赛娟. 威廉姆斯血液学[M]. 9 版. 北京:人民卫生出版社, 2018.

[12] 罗爽,花京剩. 骨髓细胞免疫表型与形态学检测对急性白血病中患者诊断及监测价值分析[J]. 中国药物与临床, 2020, 20(6): 926-928.

[13] WOOD B L. Acute myeloid leukemia minimal residual disease detection: the difference from normal approach [J]. Curr Protoc Cytom, 2020, 93(1): 73-76.

[14] 林萍,谢若腾,张雅兰,等. 细胞形态学在急性白血病中的诊断价值分析[J]. 中国实验血液学杂志, 2019, 27(6): 1806-1811.

[15] 赵浩宇,杜兴国,张琼. 骨髓细胞形态学和免疫学分型在急性白血病诊断中的应用价值[J]. 临床医学研究与实践, 2021, 6(19): 59-61.

(收稿日期:2021-11-01 修回日期:2022-03-12)