

• 论 著 •

恒温扩增芯片法在下呼吸道病原体检测中的应用^{*}刘志远, 潘 健, 张婷菊, 齐 杰, 王 蕾, 刘贵建
(中国中医科学院广安门医院检验科, 北京 100053)

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效果。方法 收集合格痰标本 94 例, 通过恒温扩增芯片法和细菌培养法检测病原体, 痰涂片抗酸染色、RNA 恒温扩增, 静脉血 γ 干扰素释放试验检测结核分枝杆菌。结果 42 例标本通过恒温扩增芯片法检测到病原体, 阳性率 44.7%。主要病原体为流感嗜血杆菌(13 株)、肺炎链球菌(10 株)、铜绿假单胞菌(9 株)、结核分枝杆菌(8 株)、金黄色葡萄球菌(6 株)、肺炎克雷伯菌(7 株)、大肠埃希菌(4 株)、嗜麦芽窄食单胞菌(4 株)、鲍曼不动杆菌(1 株)、衣原体(1 株), 未检测到肺炎支原体、嗜肺军团菌。结论 恒温扩增芯片法操作简便、快速, 可同时检测 12 种病原体并可筛选耐甲氧西林葡萄球菌的 *mecA* 基因。其对流感嗜血杆菌、肺炎链球菌检出率显著高于传统细菌培养法, 对结核分枝杆菌的检测显著优于 γ 干扰素释放试验和涂片抗酸染色。该技术有利于下呼吸道感染的快速诊断和及时地针对性治疗。

关键词: 恒温扩增; 下呼吸道感染; 病原体**DOI:** 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.08.003 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2017)08-1052-02Application of isothermal amplification chip method in lower respiratory tract pathogens detection^{*}LIU Zhiyuan, PAN Jian, ZHANG Tingju, QI Jie, WANG Lei, LIU Guijian
(Department of Clinical Laboratory, Guanganmen Hospital, China Academy of
Chinese Medical Science, Beijing 100053, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the effect of isothermal amplification chip method in lower respiratory tract pathogens detection. **Methods** A total of 94 qualified sputum samples were collected. The pathogens were detected by using the isothermal amplification chip method and bacterial culture method. Mycobacterium tuberculosis was tested by using the Ziehl-Neelsen staining, RNA isothermal amplification and interferon gamma releasing assay (IGRA). **Results** Pathogens were detected by using the isothermal amplification chip method in 42 specimens with the positive rate of 44.7%, which were mainly Haemophilus influenzae (13 strains), Streptococcus pneumoniae (10 strains), Pseudomonas aeruginosa (9 strains), Mycobacterium tuberculosis (8 strains), Staphylococcus aureus (6 strains), Klebsiella pneumoniae (7 strains), Escherichia coli (4 strains), Stenotrophomonas maltophilia (4 strains), Acinetobacter baumannii (1 strains), Chlamydia pneumoniae (1 strain). Mycoplasma pneumoniae, legionella pneumophila were not detected. **Conclusion** The isothermal amplification chip method is easy to operate and rapid, which can detect 12 kinds of pathogens, screen methicillin-resistant *mecA* gene in staphylococcus. Its detection rates for Haemophilus influenzae and Streptococcus pneumoniae are significantly higher than those of traditional bacterial culture. The detection of Mycobacterium tuberculosis is obviously superior to IGRA and Ziehl-Neelsen staining. This technique is conducive to the rapid diagnosis of low respiratory tract infection and timely targeted treatment.

Key words: isothermal amplification; low respiratory tract infection; pathogens

下呼吸道感染是常见的感染性疾病, 目前仍然是导致人类死亡的 4 大主要原因之一。传统的细菌培养法是诊断下呼吸道感染的重要手段, 但其耗时长、敏感性低。恒温扩增芯片法是利用环介导恒温扩增 (LAMP) 的原理, 可同时检测 12 种病原体。本研究对恒温扩增芯片法检测下呼吸道病原体的效果进行评价。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院 2015 年 12 月至 2016 年 5 月诊断为下呼吸道感染或肺炎的新入院患者的合格痰标本 94 例, 痰合格标准: 多形核白细胞 >25 /低倍镜视野 (LP), 鳞状上皮细胞 <10 /LP。

1.2 仪器与试剂 采用晶芯® 呼吸道病原菌核酸检测 (恒温扩增芯片法) 试剂盒、RTisochip™-A 恒温扩增微流控芯片核酸分析仪 (博奥生物集团有限公司); 采用 VITEK II-Compact 细菌鉴定仪、血平板、麦康凯培养基 (法国生物—梅里埃公司)。革兰染色试剂、抗酸染色试剂购于珠海贝索生物技术有限公司; RNA 恒温扩增结核分枝杆菌核酸试剂盒 (SAT-TB) 购于

上海仁度生物科技有限公司; 结核分枝杆菌特异性细胞免疫反应检测 (A. TB) 试剂盒购于海口维提瑗生物研究院。

1.3 方法

1.3.1 合格痰标本初筛 无菌接种钩调取送检痰液黏液、脓性部分, 压湿片或革兰染色后镜检, 低倍镜下多形核白细胞 >25 /LP, 鳞状上皮细胞 <10 /LP 的痰标本纳入研究。

1.3.2 痰培养 合格痰标本接种血平板、加万古霉素巧克力平板、麦康凯平板, 35°C 、5% 二氧化碳环境培养 24 或 48 h 观察培养基, 筛选可能致病菌鉴定。

1.3.3 恒温扩增芯片法病原检测 参照试剂盒说明书提取核酸、加样、检测及结果判读。

1.3.4 SAT-TB 检测 参照 SAT-TB 说明书操作。

1.3.5 结核分枝杆菌 γ 干扰素释放试验 (IGRA) 参照 A. TB 说明操作。

2 结 果

2.1 恒温扩增芯片法病原检测结果 共检测 94 例标本, 42 例标本呈阳性, 阳性率 44.7%。其中 1 种病原体 30 例, 2 种病

^{*} 基金项目: 国家中医临床研究示范基地科研专项暨所级科研基金课题项目 (2011S242)。

作者简介: 刘志远, 男, 主管技师, 主要从事感染性疾病诊断及中药抗感染方面的研究。

原体 6 例,3 种病原体 4 例,4 种病原体 1 例,5 种病原体 1 例。病原菌如下:肺炎链球菌 10 株,金黄色葡萄球菌 6 株,大肠埃希菌 4 株,肺炎克雷伯菌 7 株,铜绿假单胞菌 9 株,鲍曼不动杆菌 1 株,嗜麦芽窄食单胞菌 4 株,流感嗜血杆菌 13 株,结核分枝杆菌 8 株,衣原体 1 株,未检测到肺炎支原体、嗜肺军团菌。

2.2 细菌培养法结果 10 例标本培养阳性,阳性率 10.6%。其中肺炎链球菌 1 株,大肠埃希菌 1 株,铜绿假单胞菌 4 株,鲍曼不动杆菌 1 株,流感嗜血杆菌 3 株。

2.3 结核分枝杆菌恒温扩增芯片法、SAT-TB、IGRA、抗酸染色等 4 种方法的比较 恒温扩增芯片法检出 8 例结核分枝杆菌阳性;SAT-TB 检测其中 5 例标本,4 例呈阳性;A. TB 检测检测 7 例,3 例阳性;抗酸染色检测 7 例,3 例呈阳性。见表 1。

表 1 不同检测方法对结核分枝杆菌的诊断效果比较					
标本编号	标本接收时间	恒温扩 增芯片法	SAT-TB	A. TB	抗酸染色
9	2015 年 12 月 23 日	阳性	阴性	阳性	阳性
10	2015 年 12 月 31 日	阳性	—	—	—
22	2016 年 01 月 19 日	阳性	阳性	阴性	阴性
38	2016 年 02 月 05 日	阳性	—	阴性	阴性
54	2016 年 03 月 23 日	阳性	阳性	阳性	阴性
73	2016 年 04 月 21 日	阳性	阳性	阴性	阴性
74	2016 年 04 月 21 日	阳性	—	阴性	阳性
80	2016 年 05 月 23 日	阳性	阳性	阳性	阳性

注:—表示未检测该项目。

3 讨 论

传统细菌培养法在检测敏感性、检测周期等方面难以满足肺部感染治疗的要求。本研究采用恒温扩增芯片法基于 LAMP 原理,对常见的肺炎病原体进行检测,该芯片可同时检测 12 种病原体(肺炎链球菌、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、嗜肺军团菌、结核分枝杆菌、肺炎支原体、衣原体)并可筛选耐甲氧西林葡萄球菌的 mecA 基因。从痰液标本处理到报告结果全过程仅需 2 h,与传统痰培养法比较,大幅缩短了检验周期。

94 例痰标本同时进行了恒温扩增芯片法检测和细菌培养法,对 8 种传统可培养细菌(肺炎链球菌、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),恒温扩增芯片法检出 63 株病原体,培养法检出 10 株病原体,前者敏感性显著高于后者。恒温扩增芯片法检出的病原菌分布也与细菌培养法有较大差异,恒温扩增芯片法检测结果中流感嗜血杆菌(13 株)是主要下呼吸道致病菌,其次为肺炎链球菌(10 株)和铜绿假单胞菌(9 株);细菌培养法检测出铜绿假单胞菌 4 株、流感嗜血杆菌 3 株,肺炎链球菌仅培养出 1 株。陈愉生等^[1]研究结果显示,采用恒温扩增芯片法,检测出铜绿假单胞菌(21 株)、流感嗜血杆菌(20 株)、肺炎克雷伯菌(20 株)、肺炎链球菌(12 株),是肺炎主要的致病菌;而采用细菌培养法,检测出铜绿假单胞菌(14 株)、肺炎克雷伯菌(12 株)、鲍曼不动杆菌(10 株)是主要致病菌,而流感嗜血杆菌仅检出 4 株。国内其他通过细菌培养法研究下呼吸道感染的结论也多以铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌等为主要致病菌^[2-4],流感嗜血杆菌、肺炎链球菌检出率较低。恒温扩增芯片法和细菌培养法的病原分布存在差异,可能原因是痰标本被口腔污染或实验室检测条件限制,没

有检测到真正病原体。恒温扩增芯片法较细菌培养法病原菌检出率更高,更能反映下呼吸道感染的真实病原。

恒温扩增芯片法另外包括结核分枝杆菌检测,本研究中 8 例患者结核分枝杆菌呈阳性结果;其中 5 例通过 SAT-TB 检测结核分枝杆菌,4 例阳性;7 例采用 IGRA,仅有 3 例为阳性结果;7 例采用痰特殊细菌涂片及染色,仅有 3 例为阳性。恒温扩增芯片法和 SAT-TB 两者的检测能力相近,SAT-TB 虽然有 1 例漏检,但限于标本量有限、标本的不均一性等原因,不足以提示两者有差异。IGRA 仅检出 3 例阳性,可能是由于 IGRA 主要检测淋巴细胞产生干扰素能力,当淋巴细胞不足或活性降低时会导致假阴性结果,本研究中的 4 例 IGRA 检测阴性患者,其淋巴细胞数量、比例均低于正常证实了此假设。在进行 IGRA 检测前应监测淋巴细胞情况,如淋巴细胞比例和(或)绝对值偏低时,暂时不要进行此项检测,待其淋巴细胞恢复正常后再检测,以获得可靠结果。7 例标本行抗酸染色,仅 3 例阳性,抗酸染色由于其成本低廉、操作简易,而成为普遍开展的结核筛查项目,但其阳性率显著偏低,特异性不高^[5-7],已不能满足临床需求。

恒温扩增芯片法还可检测 3 种非常规培养的病原体:军团菌、肺炎支原体、衣原体,以往这些不能常规培养的病原体主要依靠血清学方法进行检测,但要到病程 1~2 周以后,血清中才能出现相应抗体,对临床的实际诊治价值有限。将 3 种病原体整合到芯片中,可达到快速诊断的目的。本研究中未检出支原体、军团菌,检出 1 例衣原体,临床应用效果有待增加样本量后进一步评价。

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;较涂片抗酸染色、IGRA 等检测可大幅提高结核检测阳性率,并可检测支原体、军团菌、衣原体等病原体。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。

参考文献

[1] 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.

[2] 李磊,王艳景,赵敏,等. 社区获得性下呼吸道感染患者病原菌及其耐药性变迁分析[J]. 中华医院感染学杂志,2016,26(13):2960-2965.

[3] 邢艳利,谭智,李鸣,等. 呼吸内科住院患者下呼吸道感染病原菌分布及耐药情况分析[J]. 现代预防医学,2016,43(5):951-953.

[4] 李政,王玉春,蒋冬香,等. 医院下呼吸道感染的病原菌分布及耐药性分析[J]. 实用预防医学,2012,19(9):1373-1375.

[5] 赵晶,葛存兴,王宏志,等. 荧光定量基因扩增法与萋-尼抗酸染色法检测结核分枝杆菌的比较[J]. 中国实用医药,2015,10(3):74-75.

[6] 曹玲. 荧光定量 PCR 法与涂片抗酸染色对胸水结核杆菌灵敏度及特异度的比较[J]. 中华全科医学,2015,13(8):1315-1316.

[7] 南征,吕治,许淑珍. 荧光定量 PCR 技术与涂片抗酸染色法在结核分枝杆菌检测中的应用及分析[J]. 北京医学,2011,33(3):231.