

治疗肝硬化胃底静脉曲张患者的临床研究[J]. 国际消化病杂志, 2015, 35(2): 150-152.

[9] 陈思如, 何夕昆, 李永仙, 等. 内镜下组织胶治疗胃静脉曲张进展的评述[J]. 现代消化及介入诊疗, 2014, 19(1): 33-36.

[10] 林海, 田峰, 徐建, 等. 胃镜下同时注射组织黏合剂与聚桂醇治疗胃底曲张静脉的疗效[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版), 2016, 10(18): 2803-2805.

[11] 胡华华, 许捷鸿, 易宏, 等. 经内镜注射国产组织黏合剂治疗胃底静脉曲张临床观察[J]. 右江医学, 2012, 40(3): 345-347.

[12] 刘志忠, 赵燕颖, 孙远杰, 等. 一次性注射硬化剂加组织黏合剂治疗胃底曲张静脉出血的疗效观察[J]. 中华消化杂志, 2014, 34(3): 183-184.

[13] 马超. 内镜下治疗食管胃底静脉曲张出血的疗效分析[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2014.

[14] SARIN S K, JAIN A K, JAIN M, et al. A randomized controlled trial of cyanoacrylate versus alcohol injection in patients with isolated fundic varices[J]. Am J Gastroenterol, 2002, 97(4): 1010-1015.

[15] LO G H, LAI K H, CHENG J S, et al. A prospective, randomized trial of butyl cyanoacrylate injection versus band ligation in the management of bleeding gastric varices[J]. Hepatology, 2001, 33(5): 1060-1064.

[16] KUO M J, YE H Z, CHEN G H, et al. Improvement of tissue-adhesive obliteration of bleeding gastric varices using adjuvant hypertonic glucose injection: a prospective randomized trial[J]. Endoscopy, 2007, 39(6): 487-491.

[17] 林海, 徐燕, 田峰, 等. 改良法注射聚桂醇与组织胶治疗 Lgf 型胃静脉曲张临床观察[J]. 世界华人消化杂志, 2016, 24(27): 3910-3914.

[18] 林海, 徐晓光, 薛方喜, 等. 改良三明治法同步与序贯联合套扎治疗食管胃底静脉曲张的疗效比较[J]. 中国内镜杂志, 2017, 23(2): 6-9.

[19] 丁一, 毛晓娟, 李书云, 等. 内镜套扎联合硬化剂“三明治”疗法治疗食管胃底静脉曲张的临床应用[J]. 中国继续医学教育, 2015(21): 131-132.

[20] 陆小丹, 赵迦旋, 任燕北, 等. 经内镜栓塞术联合套扎术治疗肝硬化食管胃底静脉曲张出血的疗效分析[J]. 医药论坛杂志, 2017, 38(6): 9-11.

[21] 毕小刚, 周文雄, 沈鹏臻, 等. 经内镜组织胶注射联合套扎术治疗食管胃底静脉曲张的疗效观察[J]. 黑龙江医学, 2017, 60(6): 493-494.

[22] 张志会, 李静玲. 内镜下聚桂醇联合组织黏合剂治疗胃底静脉曲张的疗效观察[J]. 心理医生, 2016, 22(12): 85-86.

[23] 陈庆法, 徐燕, 田峰, 等. 经内镜三明治法联合注射聚桂醇及组织胶治疗胃静脉曲张[J]. 山东医学高等专科学校学报, 2016, 38(6): 436-439.

[24] ZENG X Q, MA L L, TZENG Y J, et al. Endoscopic cyanoacrylate injection with or without lauromacrogol for gastric varices: a randomized pilot study[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2016, 32(3): 631-638.

[25] 边芬, 张国梁, 羊丹. 内镜下聚桂醇联合组织胶改良注射与传统注射治疗 2 型胃食管静脉曲张的疗效对比[J]. 天津医科大学学报, 2016, 22(2): 133-137.

[26] 边芬, 张国梁, 王凤梅, 等. 内镜下组织胶传统注射与联合聚桂醇改良三明治夹心法注射治疗胃静脉曲张的疗效比较[J]. 中华肝脏病杂志, 2016, 24(10): 786-789.

[27] 张磊. 止血汤联合内镜下组织胶注射治疗肝硬化并发胃底静脉曲张出血临床观察[J]. 湖北中医杂志, 2017, 39(11): 25-26.

[28] 庞红全, 杨帆, 余瑞金. 内镜下注射聚桂醇与组织胶治疗肝硬化食管胃底静脉曲张的近远期疗效比较[J]. 现代消化及介入诊疗, 2016, 21(4): 527-530.

[29] 侯运萌, 向慧玲, 王凤梅, 等. 组织胶联合聚桂醇治疗胃底静脉曲张的疗效[J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(17): 2449-2455.

[30] 李亚岭, 罗建平. 组织胶联合聚桂醇治疗胃底静脉曲张的临床疗效分析[J]. 中外医疗, 2016, 36(34): 148-150.

[31] 刘鹏. 硬化剂联合组织黏合剂治疗肝硬化胃底静脉曲张出血患者的临床研究[J]. 中国民康医学, 2017, 29(3): 29-30.

[32] 王品发. 内镜下聚桂醇联合组织胶治疗胃静脉曲张出血的临床分析[J]. 微创医学, 2012, 7(3): 296-297.

[33] 冯凯祥, 鲜于剑波, 杨培, 等. 凝血酶纤维蛋白聚硅醇序贯法治疗胃底静脉曲张出血临床观察[J]. 实用医院临床杂志, 2016, 13(1): 76-78.

(收稿日期: 2018-01-12 修回日期: 2018-04-02)

• 综述 • DOI: 10.3969/j. issn. 1672-9455. 2018. 21. 048

# 环介导恒温扩增技术在百日咳鲍特菌检测中应用研究进展

郝春花 综述, 吴红章 审校  
(天津市第二人民医院检验科, 天津 300192)

关键词: 百日咳鲍特菌; 恒温扩增; 即时检验; 灵敏度; 特异度  
中图分类号: R446.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2018)21-3310-03

核酸扩增技术是病原微生物检测的重要武器, 其中聚合酶链反应(PCR)技术已经在临床检验中广泛应用。与 PCR 相比, 环介导恒温扩增(LAMP)技术具有操作简便, 快速灵敏, 对仪器和样本质量要求低等优点, 尤其适合病原微生物的即时检验。本文主要综述了 LAMP 技术在百日咳即时检验中应用的研究

进展。

## 1 百日咳的流行病学

百日咳是由百日咳鲍特菌感染引起的一种严重急性呼吸道传染病,人群普遍易感,其中尤以婴幼儿多见,给婴幼儿身体健康造成严重威胁。其临床症状特征为阵发性痉挛性咳嗽,病程可迁延数月,常引起流行。家庭内成人患者和潜在感染者是儿童百日咳的主要传染源。人是百日咳鲍特菌的唯一宿主,由于疫苗产生的抗体滴度随着年龄的增长而降低,孕妇体内的抗体传送给胎儿很少,因此婴儿对百日咳鲍特菌的抵抗力弱,加上未达到疫苗接种年龄,导致小于 6 个月龄的婴儿百日咳的发病率明显较其他年龄组高。近年来,儿童百日咳发病率逐年升高,并出现一些新的流行特征,已经成为儿科临床医师广泛关注的传染性疾病。百白破联合疫苗的使用有效降低了百日咳的发病率及病死率。尽管疫苗接种率很高,近年来在许多发达国家和发展中国家百日咳的发病率呈持续上升趋势,在一些国家和地区甚至出现暴发流行,百日咳再现的现象引起了广泛关注<sup>[1]</sup>。百日咳再现的主要原因是疫苗接种对年长儿、青少年及成人覆盖率不足,成人百日咳感染率增加,以致未接种疫苗或未完成全程疫苗接种的婴幼儿发生百日咳感染<sup>[2]</sup>。自上世纪 90 年代以来,百日咳再现于疫苗覆盖人群,产生这种现象的一部分原因是诊断技术的发展,医生警惕性提高,人群免疫减弱和病原的选择性。百日咳再现指出了建立快速、敏感、特异的实验室诊断方法的重要性<sup>[3]</sup>。

## 2 百日咳的实验室诊断现状

目前对于百日咳的诊断主要是依靠临床医生对症状的判断,但临床医生对非典型病例的认识存在严重不足。包括我国在内,目前大多数国家和地区用于百日咳诊断的临床标准中多数要求咳嗽时间至少在两周以上,但是由于非典型病例的增多,部分病例会因此延误诊断。因此,对于这些不典型的百日咳感染,尤其是青少年和成年人的隐性感染,需要结合可靠的实验室诊断方法来帮助确诊<sup>[4]</sup>。

百日咳的主要实验室诊断方法包括细菌培养法、免疫学方法和基因检测方法。尤其对于症状不典型的百日咳感染患者,实验室诊断方法是确诊百日咳感染的重要手段。传统的细菌培养法虽然是诊断百日咳的金标准,但是存在培养时间长、阳性率低等缺点。本法检测百日咳鲍特菌特异度高,但是灵敏度受到标本运送条件、标本质量、病程和抗菌药物等多种因素限制。免疫学检测是对病原微生物抗原抗体的检测,容易出现假阳性。其中以 PCR 为基础的百日咳基因检测方法的灵敏度好,阳性率高,并且受抗菌药物使用的影响小。但是百日咳普通 PCR 检测方法还存在

使用强烈致癌剂溴化乙锭作为染色剂、扩增时间长、依赖昂贵仪器、基层实验室无法开展等一些不足。鉴于上述原因,研究新的快速、敏感、特异、便于操作的百日咳诊断技术就显得十分必要。

## 3 LAMP 技术概述

LAMP 是一种新的核酸体外恒温扩增技术<sup>[5]</sup>。LAMP 技术主要通过一组特异性引物针对目的基因的 6 个特定区域,在恒温扩增环境条件下(60~65℃),依赖于一种具有链置换活性的 Bst DNA 聚合酶,高效率(30~60 min)地扩增目标 DNA。LAMP 产物的检测可根据反应过程中产生的焦磷酸镁白色沉淀,或在反应系统中加入荧光染料,可以用肉眼或实时检测仪器判断扩增与否<sup>[6]</sup>。

与 PCR 技术相比,LAMP 技术对标本前处理要求不高。有些病原体可以用简单处理的标本作为模板,例如甲型流感病毒 LAMP 检测试剂盒对标本处理要求是,只需把拭子标本在核酸提取试剂中进行简单搅拌即可完成标本中 DNA 的抽取。甚至有研究显示,省略标本 DNA 提取步骤,不会影响 LAMP 扩增的灵敏度<sup>[7-8]</sup>。LAMP 方法不仅对核酸提取要求低,而且灵敏度高,可从极微量的标本中扩增出目的基因,其最低检测限是传统 PCR 的 10~100 倍<sup>[9-10]</sup>。

虽然 LAMP 技术是一种快速、简便的核酸扩增方法,但该技术结果呈现方面仍然表现出不足和缺陷。该方法在检测过程的某些环节存在很多提升空间,LAMP 扩增产物的可视化成为近年的研究热点。LAMP-横向流动试纸条(LFD)技术是 LAMP 与 LFD 相结合的一种新技术,该技术将核酸恒温扩增和可视化试纸条检测有机地结合,使 LAMP 扩增产物现场检测可视化<sup>[11]</sup>。检测过程中加入特异性探针,不仅提高了检测的特异度,而且摆脱了对检测仪器设备的依赖,而无需 EB 等有毒试剂。LFD 技术结合了严格的碱基互补配对原则、抗原抗体反应的高特异度和 PCR 的高灵敏度,并融合了免疫层析技术和分子生物学手段<sup>[12]</sup>。

LAMP-LFD 技术在保留了 LAMP 优点的基础上,在产物可视化检测方面又迈进了一步,使检测过程更加便捷,摒弃了昂贵仪器的依赖,大幅度降低了从核酸扩增到结果展示过程中的仪器成本。LAMP-LFD 技术在检测的灵敏度和特异度方面具有特殊优点,其作为一种终极模式在微生物的即时检验方面具有无与伦比的优势。目前也有将 LAMP-LFD 技术用于麻疹病毒检测的报道<sup>[13]</sup>。

## 4 LAMP 在百日咳检测中的应用研究

自 LAMP 技术问世以来,以其检测的快速、敏感、低设备依赖性等优点在微生物检测方面得到了广泛应用。随着分子生物学的发展,LAMP 技术不断应

用于百日咳鲍特菌基因快速检测,这些报道大多针对百日咳基因的插入序列 IS481、百日咳毒素(PT)和目的基因 BP485 基因等片段。

BROTONS 等<sup>[14]</sup>建立了检测百日咳鲍特菌基因的 LAMP 方法。该实验中 LAMP 扩增可在 12~30 min 内完成,检测限可达 2 CFU/mL,是实时 PCR 的 2.5 倍。用这个方法检测百日咳的灵敏度为 96.55%,特异度为 99.46%,线性范围为  $10 \sim 10^5$  CFU/mL,适合用于百日咳鲍特菌的即时检验。KAMACHI 等<sup>[15]</sup>建立了一种检测百日咳鲍特菌的 LAMP 方法,其检测结果与传统 PCR 一致,且该 LAMP 法特异度高,与其他种属鲍特菌无反应。NAKAMURA 等<sup>[16]</sup>用 LAMP 方法检测一名出生 28 d 女婴鼻咽拭子和气管吸出液中的百日咳鲍特菌基因,这两种标本均发现扩增信号。由于婴幼儿百日咳的临床症状不典型,LAMP 方法对于婴幼儿百日咳的诊断具有不可替代的优势。

## 5 展 望

综上所述,LAMP 法检测百日咳鲍特菌核酸,准确快速、操作简便、无需昂贵的实验设备、易于推广使用。随着 LAMP 技术不断优化,其在产物的可视化检测方面也日趋完善。相信 LAMP-LFD 技术在百日咳的即时检验方面将会有广阔的应用前景。

## 参考文献

- [1] CHIAPPINI E, STIVAL A, GALLI L, et al. Pertussis re-emergence in the post-vaccination era [J]. BMC Infect Dis, 2013, 13: 151.
- [2] CHEN Z, ZHANG J, CAO L, et al. Seroprevalence of pertussis among adults in China where whole cell vaccines have been used for 50 years [J]. J Infect, 2016, 73(1): 38-44.
- [3] MOOI F R, VAN DER MASS N A, DE MELKER H E. Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation—two sides of the same coin [J]. Epidemiol Infect, 2014, 142(4): 685-694.
- [4] 张雨笑, 湛志筠, 何秋水. 国内外百日咳实验室诊断标准现状及血清学诊断的应用价值 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2017, 37(7): 560-564.
- [5] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): e63-e71.
- [6] ZHU P, ZHANG B F, WU J H, et al. Sensitive and rapid detection of microcystin synthetase E Gene (mcyE) by loop-mediated isothermal amplification: a new assay for detecting the potential microcystin-producing microcystis

- in the aquatic ecosystem [J]. Harmful Algae, 2014, 37: 8-16.
- [7] KANEKO H, KAWANA T, FUKUSHIMA E, et al. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances [J]. Biochem Biophys Methods, 2007, 70(3): 499-501.
- [8] MANABU N, MINORU O, KOJI T, et al. Direct detection of equine herpesvirus type 1 dna in nasal swabs by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) [J]. J Vet Med Sci, 2011, 73(9): 1225-1227.
- [9] ZHAO N, LIU J, SUN D, et al. Detection of HCV genotypes 1b and 2a assay by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification [J]. J Med Virol, 2017, 89(6): 1048-1054.
- [10] ELVIRA-GONZOLEZ L, PUCHADES A V, CARPINO C, et al. Fast detection of Southern tomato virus by one-step transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) [J]. J Virol Methods, 2017, 241: 11-14.
- [11] TSAI S M, LIU H J, SHIEN J H, et al. Rapid and sensitive detection of infectious bursal disease virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick [J]. J Virol Methods, 2012, 181(1): 117-124.
- [12] 黄海龙, 朱鹏, 杨浩. LAMP-LFD 技术及其在生物快检方面应用 [J]. 中国生物工程杂志, 2015, 35(12): 89-95.
- [13] XU C, FENG Y, CHEN Y, et al. Rapid detection of measles virus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification coupled with a disposable lateral flow device [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2016, 85(2): 168-173.
- [14] BROTONS P, DE PAZ H D, ESTEVA C, et al. Validation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid diagnosis of pertussis infection in nasopharyngeal samples [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2016, 16(1): 125-130.
- [15] KAMACHI K, TOYOIZUMI-AJISAKA H, TODA K, et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid diagnosis of Bordetella pertussis infection [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(5): 1899-1902.
- [16] NAKAMURA A, SAKANO T, NAKAYAMA T, et al. Neonatal pertussis presenting as acute bronchiolitis: direct detection of the Bordetella pertussis genome using loop-mediated isothermal amplification [J]. Eur J Pediatr, 2009, 168(3): 347-349.

(收稿日期: 2018-01-22 修回日期: 2018-04-28)