

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.01.036

晶芯呼吸道病原菌核酸检测技术与痰培养在临床中的应用

吴晓晴, 汪东, 薛文静, 李念, 赵秋芬

(北京首儿李桥儿童医院检验科, 北京 101304)

摘要:目的 应用恒温扩增技术,在微流控碟式芯片上进行反应,检测痰液中 13 种临床常见的下呼吸道感染病原菌,并与常规痰培养检测法的结果进行比较。方法 对 80 例疑似下呼吸道感染的患儿痰液进行呼吸道病原菌核酸检测和痰培养检测,以痰培养为金标准,评价晶芯呼吸道病原菌核酸检测技术的应用价值。结果 与痰培养结果相比,晶芯呼吸道病原菌核酸检测技术的敏感度和特异度分别为 98% 和 72%,K 值为 0.77。结论 晶芯呼吸道病原菌核酸检测技术采用恒温扩增微阵列基因芯片技术,操作简便快速,可同时对痰液中 13 种临床常见的呼吸道病原菌定性检测,具有较高的敏感度和特异度,提高了检测率和准确性,具有一定的临床应用价值。

关键词:恒温扩增技术; 痰培养; 下呼吸道感染; 病原学诊断

中图分类号:R446.9

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)01-0107-03

下呼吸道感染是我国临床上最常见的疾病之一,其中绝大多数为细菌性下呼吸道感染。世界卫生组织 2013 年发布的统计结果显示,世界十大病死原因中下呼吸道感染(5.9%)位列第 3 位(前 2 位为冠心病和中风),位列第 4 位的慢性阻塞性肺病(5.4%)病死也多和感染相关。临床常见的生化指标分析无法对患者所感染的病原菌种属作出准确鉴定,大多数临床治疗仍处于经验抗菌药物的应用阶段,在使用高级抗菌药物方面存在较大的盲目性,目前临床鉴定病原菌的方法主要依靠细菌培养法。晶芯呼吸道病原菌核酸检测试剂盒采用恒温扩增技术,在微流控碟式芯片上进行反应,利用荧光染料掺入法在恒温扩增微流控芯片核酸分析仪上进行恒温(65℃)反应和实时荧光分析,一步完成对靶基因的扩增和检测。可定性检测痰液中 13 种临床常见的下呼吸道感染病原菌,包括肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林葡萄球菌、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、大肠埃希菌、嗜肺军团菌、结核分枝杆菌复合群、肺炎支原体、肺炎衣原体。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取北京首儿李桥儿童医院综合内科病房 80 例疑似下呼吸道感染患儿。均使用斯曼峰吸痰器(上海上医康鸽一次性使用的吸痰包),专业培训的护士吸取患儿下呼吸道深部痰液,除去咳出、吐出的不合格痰液。标本采集后由专人送检验科微生物室进行检测。需保存的标本置 -20℃ 冰箱冷冻保存。

1.2 仪器与试剂 痰培养是由安图生物提供的血琼脂平板,巧克力琼脂平板。革兰染液由珠海贝索生物技术有限公司提供。细菌鉴定仪是 BD Phoenix100。博奥生物集团有限公司提供的晶芯呼吸道病原菌核酸检测试剂盒。RTisochip™-A 恒温扩增微流控芯片

核酸分析仪。晶芯呼吸道病原菌核酸检测原理是恒温扩增技术,在微流控碟式芯片上进行反应,利用荧光染料掺入法在恒温扩增微流控芯片核酸分析仪上进行恒温(65℃)反应和实时荧光分析。在具有链置换功能的聚合酶作用下,扩增阳性的样品会产生类似“S”形扩增曲线,一步完成对靶基因的扩增和检测。检验步骤分为痰液提取核酸,芯片加样,核酸扩增及结果判断。同时将痰液接种血琼脂平板,巧克力琼脂平板,培养 24 h 后挑起菌落,革兰染色镜下形态鉴定;上机鉴定。

1.3 结果判定 以痰培养为金标准,培养出、鉴定出该细菌为准。晶芯呼吸道病原菌核酸检测完成后软件将采用最大二阶导数法结合其他算法计算出“S 型”扩增曲线进入快速扩增期的第一个拐点,拐点对应的时刻与原点时刻的差值定义为 T_p 值,根据 T_p 值并结合阳性判断值进行结果判读。“荧光曲线区域”显示归一化曲线,“检测结果”区域显示质控结果和各检测指标的检测结果。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,进行 Kappa 检验, $K \geq 0.75$ 说明一致性较好; $K < 0.40$ 说明一致性不理想; K 值为 0.40~0.74 说明一致性在可接受范围内。计数资料以例数或百分率表示,组间比较使用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 种方法检测下呼吸道感染标本的结果比较 下呼吸道感染的 80 份痰标本,以痰培养为金标准。晶芯呼吸道病原菌核酸检测技术的敏感度和特异度分别为 98% 和 72%。Kappa 值为 0.77。见表 1。

2.2 2 种方法检测 8 种传统可培养细菌的结果比较 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)在80例标本检测中,有58例表现为2种检测方法一致。见表2。

表1 2种方法检测下呼吸道感染标本的结果比较

晶芯呼吸道病原核酸	痰培养		
	阳性(+)	阴性(-)	合计
阳性(+)	61	5	66
阴性(-)	1	13	14
合计	62	18	80

表2 58例标本在2种方法学一致的菌株数

细菌名称	菌株数[n(%)]	百分率(%)
肺炎链球菌	19(80)	23.75
金黄色葡萄球菌	18(80)	22.50
大肠埃希菌	7(80)	8.75
肺炎克雷伯菌	6(80)	7.50
铜绿假单胞菌	5(80)	6.25
鲍曼不动杆菌	1(80)	1.25
嗜麦芽窄食单胞菌	0(80)	0.00
流感嗜血杆菌	2(80)	2.50

2.3 2种方法检测下呼吸道感染标本的差异性 有5例标本采用核酸检测为阳性,细菌培养法为阴性(流感嗜血杆菌3例,肺炎链球菌2例)。有13例标本核酸检测13种病原菌为阴性,痰培养为咽部正常菌群。另有1例标本痰培养为阴沟肠杆菌,核酸检测为阴性。

3 讨 论

据世界卫生组织20世纪90年代的统计,各种感染性疾病仍是危害人类健康的主要疾病之一,占全球病死例数的1/3。其中呼吸道感染居各类感染之首。下呼吸道感染指声门以下的呼吸道感染,主要包括社区获得性肺炎、慢性阻塞性肺疾病急性加重、支气管扩张合并感染等,是一组常见的感染性疾病。由于婴幼儿呼吸系统发育不成熟,免疫功能和免疫防御系统不完善。婴幼儿下呼吸道感染严重者可引起各种并发症甚至导致婴幼儿病死。其中肺炎是严重威胁小儿健康的首位感染性疾病。小儿肺炎的主要病原体是细菌,为确诊病原体,常规痰培养检查也必不可少。但传统培养的检测周期长,难以获得培养结果,且阳性率低、主观性较强等。NOTOMID等^[6]提出一种全新的核酸扩增技术——环介导恒温扩增技术,检测人员只要将待测标本DNA和试剂一起放入63℃恒温装置中,约1h便可判断扩增与否。该技术特异性强,敏感度高,检测成本低和操作步骤简单,已广泛应用于细菌、真菌、病毒、寄生虫等多种病原体的快速检测^[4]。原理是基于DNA在约为65℃处于动态平衡

状态,任何1个引物向双链DNA的互补部位进行碱基配对延伸时,另一条链就会解离,变成单链。针对靶序列的6个区域4条特异引物(2条内引物和2条外引物),利用具备链置换功能的DNA聚合酶在恒温下不断复制扩增,循环复制。对常见的肺炎病原进行检测,该芯片可同时检测12种病原体,并可筛选耐甲氧西林葡萄球菌的mecA基因。从痰液标本处理到报告结果全过程仅需2h,与传统痰培养法比较,大幅缩短了检验周期。

本研究晶芯呼吸道病原菌核酸检测技术的高敏感度和高特异度,和痰培养有较好的一致性。2种方法学具有一致性,阳性率最高的是肺炎链球菌(23.75%),其次是金黄色葡萄球菌(22.5%)。郑东宇等^[8]测序结果分析显示,LAMP扩增区不同菌株序列一致性约为95%,具有很好的保守性,核酸检测技术的敏感度高于痰培养法^[8]。刘志远等^[1]研究结果显示,恒温扩增芯片法检出63株病原体,培养法检出10株病原体,前者的敏感度显著高于后者。陈愉生等^[2]研究报道,核酸检测敏感度高于培养法,核酸检出的病原菌分布也和细菌培养法有差异。可能原因是痰标本被口腔污染或实验室检测条件的限制,未检测到真正的病原体。核酸检测较细菌培养法的病原菌检出率更高,更能反映下呼吸道感染的真实病原菌。本研究有13例标本核酸检测13种病原菌为阴性,痰培养法为咽部正常菌群;另有1例标本痰培养为阴沟肠杆菌,核酸检测为阴性,与报道的呼吸道病原菌菌种仅限于本试剂盒所检。

晶芯呼吸道病原菌核酸检测另外包括结核分枝杆菌检测,本研究未涉及。郝志华^[5]研究结果表明,环介导恒温扩增法在肺结核诊断中有重要的临床价值,环介导恒温扩增法的阳性率为77.78%,涂片抗酸染色法的阳性率52.78%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。涂阳培养,环介导恒温扩增法的阳性率为99.73%;涂阴培养,环介导恒温扩增法的阳性率为58.82%。环介导恒温扩增法技术的优势:(1)同涂片抗酸染色法比较,肺结核患者的阳性检出率提高。(2)检出时间大约需要1h,有利于快速诊断及控制传染。(3)等温扩增的操作简单,技术要求低,同时不需要昂贵的扩增仪器^[5]。核酸检测还可检测3种非常规培养的病原体:军团菌、肺炎支原体、肺炎衣原体。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。本研究中未检出衣原体、军团菌。李辉腾等^[7]研究显示建立的实时荧光(LAMP)检测方法具有特异度强、稳定性高的特点,能快速、准确地检测嗜肺军团菌,具有较大的推广及应用前景。本研究检出3例肺炎支原体和免疫室被动凝集法检测肺炎支原体抗体的结果一致。

随着时间的推移, LAMP 技术会进一步向着更加快速、简便、特异、现场检测的方向发展, 与其相关的试剂盒也将被开发出来。该技术极有可能用于嗜麦芽窄食单胞菌及其他病原菌的临床检验^[4]。

晶芯呼吸道病原菌核酸检测与细菌培养法相比, 可快速诊断感染病原菌, 并提高阳性率。以痰培养为金标准, 具有较高的敏感度和特异度, 2 种方法有较好的一致性。核酸检测为下呼吸道感染的诊断提供了更为快速、简便、敏感的方法。固相芯片技术可与多种技术联合建立快速、高通量、自动化的检测平台, 如 ArrayTube™ (AT, Germany) 系统是基于多重 PCR 技术而建立的一种新型的酶标记、低密度、低消耗的芯片; FilmArray 分子诊断平台是集提取、扩增、产物处理及数据分析为一体的全自动检测系统, 且在 1 h 内可完成检测, 该平台已通过美国食品药品监督管理局 (FDA) 认证, 用于检测 15 种呼吸系统病毒和几种呼吸道病原菌^[10]。因此开展基因芯片技术极其必要。基因芯片技术将使临床检验提高到新的高度。

参考文献

[1] 刘志远, 潘健, 张婷菊, 等. 恒温扩增芯片法在下呼吸道病原体检测中的应用[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(8): 3412-3413.

• 临床探讨 • DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2019. 01. 037

头状葡萄球菌在临床感染的分布状况和耐药分析

冯洁仪, 邓述欢, 赖少芬, 黎艳枝

(广州医科大学附属顺德医院检验科, 广东佛山 528315)

摘要:目的 了解该地区头状葡萄球菌在医院感染的分布状况及其对抗菌药物的耐药性, 为临床合理使用抗均药物提供科学的依据。**方法** 收集 2013 年 10 月至 2017 年 2 月该院检出的 88 例头状葡萄球菌, 对其在临床感染疾病的分布及耐药状况进行分析。**结果** 头状葡萄球菌在临床感染最多的是肺部感染, 占 70.45%; 其次为伤口感染, 占 13.64%。药敏试验结果显示, 万古霉素的敏感度最高, 占 100.00%, 其次是替考拉宁, 为 90.91%; 耐药率为 100.00% 的抗菌药物有苯唑西林、庆大霉素、复方磺胺甲噁唑、克林霉素。**结论** 头状葡萄球菌虽为条件致病菌, 但免疫力低下者易成为疾病的致病菌, 应得到临床的重视。

关键词: 头状葡萄球菌; 感染分布; 耐药分析

中图法分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2019)01-0109-03

头状葡萄球菌属于凝固酶阴性葡萄球菌属 (CNS)。葡萄球菌属在自然界分布很广, 存在于空气、水、尘埃、皮肤上的葡萄球菌大多数无致病性^[1]。近年来, 临床广泛应用各种广谱抗菌药物、免疫抑制剂、化疗药物, 普遍实施各种侵袭性操作, 导致该菌的分离率逐年增高, 耐药性也不断提高^[2-3]。凝固酶阴性葡萄球菌的致病作用日益受到临床重视, 故临床分离的凝固酶阴性葡萄球菌, 不可忽视其致病性。现探讨本院 2013 年 10 月至 2017 年 2 月分离的 88 例头状葡萄球菌, 了解其在医院感染的分布及耐药状况, 为临床正确选用抗菌药物提供参考, 有效控制其传播

[2] 陈榆生, 王大璇, 等. 环介导等温扩增技术在呼吸道感染病原体检测中的应用[J]. 海峡预防医学杂志, 2011, 17(6): 2167-2168.

[3] 王健力. 儿童下呼吸道感染调查分析[J]. 医学检验与临床, 2016, 17(2): 1539-1540.

[4] 郭旭光, 黄美淦. 实时荧光环介导恒温扩增技术检测嗜麦芽窄食单胞菌方法的建立[J]. 广东医学, 2016, 37(24): 1981-1982.

[5] 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.

[6] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBCHI H, et al. Loop-mediated Isothermal Amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 15, 28 (12): 63-64.

[7] 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.

[8] 郑东宇, 唐震. 环介导恒温扩增检测小肠结肠炎耶尔森菌[J]. 江苏预防医学, 2017, 28(2): 583-584.

[9] 齐诗蕊, 陈俊. 环介导恒温扩增技术快速检测幽门螺杆菌方法的建立及评价[J]. 解放军医学院学报, 2018, 39(3): 812-813.

[10] 邱红芹, 王晓玲. 呼吸道病原体分子诊断技术研究进展[J]. 河北医科大学学报, 2016, 37(12): 691-692.

(收稿日期: 2018-05-29 修回日期: 2018-08-28)

流行。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2013 年 10 月至 2017 年 2 月本院门诊及住院患者的痰、血液、分泌物等临床标本, 共分离出 88 株头状葡萄球菌。菌株标准: 尿液标本菌落计数 ≥ 105 cfu/mL, 其他标本在血平板中实行 5 区分区划线法接种, 数量在第 3 区以上出现的菌^[4-5]。质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC29213。

1.2 方法 按照《全国临床检验操作规程》的标准操作方法对临床标本进行常规的细菌培养^[6]。采用法国梅里埃 ATB Expression 细菌鉴定/药敏分析仪进