

环介导等温扩增技术在肺结核诊断中的应用价值

李晓伟, 杨 伟, 赵先进

山西省长治市人民医院检验科, 山西长治 046000

摘 要:目的 评价环介导等温扩增技术(LAMP)在肺结核诊断中的应用价值。方法 选取 2016 年 1 月至 2019 年 1 月于长治市人民医院就诊的 295 例可疑肺结核患者为研究对象, 所有病例均送痰标本进行 LAMP 检测和涂片抗酸染色, 分别计算 LAMP 及涂片抗酸染色法的阳性检出率、阳性预测值、阴性预测值等, 并进行统计学分析。结果 295 例患者中, 临床诊断肺结核 180 例, 非肺结核 115 例, LAMP 和涂片抗酸染色法的灵敏度分别为 83%、28%。与涂片抗酸染色法比较, LAMP 的灵敏度明显高于涂片抗酸染色法。结论 LAMP 具有较高的特异度和灵敏度, 对肺结核尤其是痰涂片阴性的肺结核有很好的临床诊断价值和应用前景。

关键词:环介导等温扩增技术; 肺结核; 抗酸染色

中图法分类号:R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)18-2613-02

由结核分枝杆菌感染引起的结核病是目前流行最广的传染性疾病, 全球每年新发结核病患者 800 万~1 000 万例, 死于结核病的人数高达 180 万例。所以, 如何快速进行临床诊断是结核病防控的关键所在。传统的检测技术灵敏度较差, 阳性检出率低, 容易漏诊。结核分枝杆菌培养是诊断结核病最为直接和可靠的依据, 但是培养周期长, 不利于结核病的及时诊断和治疗。NOTOMI 等^[1]于 2000 年提出了环介导等温扩增技术(LAMP), 这是一种新的核酸扩增技术, 在恒温条件下即可快速完成核酸的扩增, 而且无需购置昂贵的核酸扩增仪, 操作过程简单, 不容易污染, 近年来已得到广泛的应用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 1 月至 2019 年 1 月在本院感染性疾病科就诊的 295 例疑似结核病患者为研究对象, 其中男 190 例, 女 105 例。

1.2 仪器与试剂 显微镜(日本奥林巴斯); 低温高速离心机(上海安亭飞鸽牌); 生物安全柜(上海复兴医学科技有限公司); PCR 扩增仪(日本荣研); 抗酸染色试剂(珠海贝索生物制剂公司); LAMP 试剂(日本荣研, 批号: 96002)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 嘱患者清晨漱口, 咳深部痰于一次性无菌杯中立即送检, 每人送检 2 份或 3 份痰液标本, 随机抽取一份, 共 295 份痰标本, 进行涂片抗酸染色并做 LAMP 试验, 对试验结果进行分析和比对。

1.3.2 痰涂片抗酸染色 涂片、染色、显微镜检查操作参照《中国结核病防治规划·痰涂片镜检标准化操作及质量保证手册》进行。结核分枝杆菌涂片抗酸染色镜检报告方式: 至少检查 300 个视野未发现抗酸菌(-), 1~2 个抗酸菌/300 个视野为±, 1~9 个抗酸菌/100 个视野为+, 1~9 个抗酸菌/10 个视野为++ , 1~9 个抗酸菌/视野为+++ , >9 个抗酸菌/视

野为++++。

1.3.3 LAMP 试验

1.3.3.1 DNA 提取 试剂盒通过对标本中所含的细菌进行破碎处理, 使其所含的核酸游离到溶液中, 并将得到的溶液与吸附剂试剂管中的多孔介质混合, 把标本中所含的阻碍核酸扩增反应的物质去除, 再通过滴注盖薄膜滤器, 使核酸溶液被提取出来。

1.3.3.2 LAMP 扩增 确认恒温荧光核酸扩增仪温度已达到 67 ℃, 将反应试管放入扩增仪中, 开始进行扩增反应, 反应时间为 40 min^[2]。

1.3.3.3 结果判读 扩增反应结束后, 将反应试管放在 LF-160 荧光目视检测装置上, 从反应试管的侧面进行观察; 在确认阳性对照发出绿色荧光, 阴性对照没有发出荧光后, 对所检测标本进行判定, 发出绿色荧光者为阳性, 未发出荧光者为阴性。

1.3.4 肺结核诊断原则 肺结核的诊断是以病原学(包括细菌学、分子生物学)检查为主, 结合流行病史、临床表现、胸部影像、相关的辅助检查及鉴别诊断等, 进行综合分析作出诊断, 以病原学、病理学结果作为确诊依据。

1.4 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行统计学分析, 以临床诊断结果为标准, 比较痰涂片抗酸染色镜检法和 LAMP 的检测效能, 计算灵敏度和特异度, 率的比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。各检测方法与临床诊断结果的一致性评价采用 Kappa 检验, Kappa 值 ≤ 0.40 时, 两者一致性差; Kappa 值 $> 0.40 \sim < 0.75$ 时, 两者中度一致; Kappa 值 ≥ 0.75 时, 两者一致性较高。

2 结 果

2.1 2 种方法对结核分枝杆菌的阳性检出率比较 在 295 例研究对象中, LAMP 的阳性检出率为 51% (150/295), 显著高于痰涂片抗酸染色法的 17% (51/295), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 23.65, P < 0.001$)。

2.2 2 种方法对结核分枝杆菌的检测效能评价 在本院感染性疾病科就诊的 295 例疑似结核病患者中,临床诊断肺结核的患者为 180 例,非肺结核患者为 115 例。以临床诊断为标准,痰涂片抗酸染色法灵敏度为 28%(50/180),特异度为 99%(114/115),阳性预测值为 98%(50/51),阴性预测值为 53%(114/214),Kappa 值为 0.17;LAMP 检测灵敏度为 83%(149/180),特异度为 99%(114/115),阳性预测值为 99%(149/150),阴性预测值为 79%(114/145),Kappa 值为 0.70。LAMP 检测的灵敏度显著高于痰涂片抗酸染色法,差异有统计学意义($\chi^2=12.31, P<0.001$)。

2.3 LAMP 在痰涂片抗酸染色阴性标本中检测结核分枝杆菌的效能评价 以临床诊断结果为标准,在 244 例痰涂片抗酸染色阴性的标本中,LAMP 的阳性检出率为 40%,灵敏度为 77%,特异度为 99%,Kappa 值为 0.90。

3 讨 论

目前,我国结核病防控形势严峻,提高结核病的诊断及治疗能力,对结核病的防治工作具有重要意义。传统的检测方法,虽然成本较低,但是灵敏度较低、特异性较差,检测周期长、检出率低,这些都限制了其诊断效能。LAMP 作为一种快速分子检测方法初步应用于本省各级结核病实验室,这对于提高本省的肺结核患者病原学阳性检出率具有重要意义^[3]。

本研究结果显示:以临床诊断为标准,LAMP 的阳性检出率为 51%,明显高于痰涂片抗酸染色法的 17%,LAMP 诊断肺结核的灵敏度(83%)显著高于痰涂片抗酸染色法(28%),这与国内外研究结果一致。痰涂片抗酸染色主要是以典型的杆状形态为病原学报告依据,因为环境和个体差异等因素影响,结核分枝杆菌形态呈现多样化,球状、短杆状、丝状、细胞壁缺陷的 L 型等,除了形态多样化,检验人员的识别能力,阅片的时间和范围,染片的质量等等都会影响结果的判读,故可能出现假阴性的情况,灵敏度较低^[4]。有文献报道痰标本的细菌载量在 5 000~10 000/mL 时,涂片镜检才会报告阳性^[5]。LAMP 具有许多优点,使用高效的 DNA 聚合酶和 2 对引物,识别靶基因的 6 个不同区域,特异性强,灵敏度高,检测时间短,无需昂贵的核酸扩增仪和检测设备,在等温条件下即可完成扩增反应^[6-8],产物易检测,同时整个反应始终在密闭的环境进行,仪器自动判断结果,实验室交叉污染风险低,适用于基层医院结核病的诊断^[9]。

以临床诊断为标准,LAMP 与临床诊断结果中度一致(Kappa 值=0.70),痰涂片抗酸染色与临床诊断结果一致性差(Kappa 值=0.17),由此可见,LAMP 对结核病的诊断有着重要的意义。本研究表明,在痰涂片抗酸染色阴性的 244 例患者中,LAMP 检测的灵敏度和特异度分别是 77%、99%,与临床诊断结果相

比,一致性较高(Kappa 值=0.90),在痰涂片抗酸染色阴性的患者中阳性检出率达 40%,比国内报道 LAMP 对痰涂片抗酸染色阴性标本的阳性检出率在 20%~30%的结果略高,以上数据提示 LAMP 对于检测痰涂片抗酸染色阴性标本肺结核患者也具有一定的技术优势^[10]。

综上所述,在诊断肺结核时,LAMP 具有较高的应用价值,阳性检出率和灵敏度均明显高于痰涂片抗酸染色,尤其在痰涂片抗酸染色阴性的结核病诊断中有较高的临床应用价值。但本研究具有标本来源单一、样本量少等局限性,可能在一定程度上对研究结果造成影响,在评估 LAMP 试验的临床应用价值时,还需增加样本数量并进一步研究。多种检测方法联合应用降低漏检率和误诊率,才能有效诊断结核病。

参考文献

- [1] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H A, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): 63-69.
- [2] 林世平, 杨应周, 谭卫国, 等. 环介导等温扩增法快速检测结核分枝杆菌的初步观察[J]. *中国防痨杂志*, 2010, 32(8): 466-469.
- [3] 陈涛, 周琳, 周杰, 等. 环介导等温扩增法快速检测结核分枝杆菌的临床应用评估[J]. *中国防痨杂志*, 2012, 34(7): 413-418.
- [4] 杨健, 张天华, 鲜小萍, 等. 环介导等温扩增技术在肺结核病诊断中的应用评价[J]. *中国实验诊断学*, 2018, 22(12): 2095-2098.
- [5] 于霞, 梁倩, 马异峰, 等. 环介导等温扩增技术快速检测痰标本中结核分枝杆菌的初步评价[J]. *中国实验诊断学*, 2013, 17(5): 846-849.
- [6] MCNALLY J D, MENON K, LAWSON M L, et al. 1, 25-dihydroxy vitamin D levels in pediatric intensive care units: risk factors and association with clinical course[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(8): 2942-2945.
- [7] ZHOU J C, ZHU Y M, GUO P, et al. Serum 25(OH)D and lipid levels in Chinese obese and normal weight males before and after oral vitamin D supplementation[J]. *Biomed Environ Sci*, 2013, 26(10): 801-807.
- [8] REDDY S, NTOYANTO S, SAKADAVAN Y, et al. Detecting mycobacterium tuberculosis using the loop mediated isothermal amplification test in South Africa[J]. *Inter J Tuber Lung Dis*, 2017, 21(10): 1154-1160.
- [9] 吴阳升, 罗淑萍. 一种新的高效快速核酸恒温扩增方法: LAMP 法[J]. *生物技术*, 2004, 14(4): 76-78.
- [10] 孙娇, 王悦, 孙秀华, 等. 环介导核酸等温扩增技术对疑似结核患者的筛查效果[J]. *中国防痨杂志*, 2017, 39(8): 833.