

研究报告

环介导恒温扩增技术在呼吸道感染常见细菌临床检测中的应用评价

卫清, 李荷楠*, 彭秋生, 杨硕, 王启, 王占伟, 王知任, 王辉

北京大学人民医院检验科, 北京 100044

卫清, 李荷楠, 彭秋生, 杨硕, 王启, 王占伟, 王知任, 王辉. 环介导恒温扩增技术在呼吸道感染常见细菌临床检测中的应用评价[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1811-1822

Wei Qing, Li Henan, Peng Qiusheng, Yang Shuo, Wang Qi, Wang Zhanwei, Wang Zhiren, Wang Hui. Application evaluation of loop-mediated isothermal amplification in clinical detection of common bacteria in respiratory tract infection[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1811-1822

摘要:【背景】传统的细菌培养为下呼吸道感染诊断的金标准, 但其检验周期长且敏感性低。环介导恒温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术方法简单、检测快速, 可应用于临床呼吸道感染常见细菌的快速检测。【目的】评估环介导恒温扩增技术对呼吸道感染常见7种细菌的检测能力。【方法】设计呼吸道感染常见的7种病原菌肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, AB)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, SP)、卡他莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*, MC)和流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*, HI)的环介导恒温扩增特异性引物, 建立检测7种病原菌的LAMP方法。通过梯度稀释的方法检测敏感性, 交叉反应实验检测特异性。回顾性分析2019年11月-2021年3月北京大学人民医院的240例疑似下呼吸道感染患者的呼吸道标本(痰和肺泡灌洗液)。利用自动化核酸提取仪提取DNA后, 利用特异性引物进行环介导恒温扩增检测7种病原菌。检测结果与常规细菌培养结果进行比较, 分析环介导恒温扩增的灵敏度和特异性, 评估优化不同菌种的阳性判断值(C_t 值), 探讨环介导恒温扩增技术在临床上的应用价值。【结果】LAMP法检测结果与模板浓度具有较好的线性相关性, 特异性实验结果表明LAMP体系的特异性较好, 与其他菌株无交叉反应。共检测了218例痰和22例肺泡灌洗液样本, 其中178例样本培养出7种目标菌, 采用环介导恒温扩增法检测出7种目标菌的样本共176例。从提取核酸到环介导恒温扩增结果检出的平均检测时间为2-3 h, 可同时检测多个样本。7种常见呼吸道病原菌流感嗜血杆菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、卡他莫拉菌、金黄色葡萄球菌、铜

基金项目: 国家科技重大专项(2018ZX10732401-003-016)

Supported by: National Science and Technology Major Project of China (2018ZX10732401-003-016)

*Corresponding author: E-mail: lhnpu@163.com

Received: 2021-05-31; Accepted: 2021-08-26; Published online: 2021-10-26

绿假单胞菌和肺炎链球菌的最佳 C_t 值分别为 18.5、20.0、20.0、15.0、25.0、19.0 和 18.0。检测灵敏度和特异性分别为肺炎克雷伯菌 90.7%和 94.1%，鲍曼不动杆菌 84.0%和 94.2%，铜绿假单胞菌 90.8%和 89.1%，卡他莫拉菌 75.0%和 99.2%，金黄色葡萄球菌 81.8%和 97.4%，流感嗜血杆菌 75.0%和 90.3%，肺炎链球菌 33.3%和 95.4%。肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌的环介导恒温扩增技术检测结果与痰培养半定量检测结果具有较好的符合率， R^2 值分别是 0.855 7、0.804 4 和 0.924 3。【结论】环介导恒温扩增技术操作简单、检测快速。与培养方法相比，环介导恒温扩增检测具有较高的特异性(89.1%–99.2%)，其中针对肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的检测具有较高灵敏度(81.8%–90.8%)，可用于临床呼吸道感染病原菌的快速诊断。环介导恒温扩增技术的检测结果与痰培养半定量的检测结果符合率较好。流感嗜血杆菌和肺炎链球菌由于培养阳性标本量较少，有待进一步评估。

关键词：环介导恒温扩增(LAMP)；下呼吸道感染；病原学诊断

Application evaluation of loop-mediated isothermal amplification in clinical detection of common bacteria in respiratory tract infection

WEI Qing, LI Henan^{*}, PENG Qiusheng, YANG Shuo, WANG Qi, WANG Zhanwei, WANG Zhiren, WANG Hui

Department of Clinical Laboratory, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China

Abstract: [Background] The traditional method of bacterial culture is the gold standard for the diagnosis of lower respiratory tract infection. However, bacterial culture needs a long cycle and has low sensitivity. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) as a simple and rapid method can be used for rapid detection of common bacteria in clinical respiratory tract infection. [Objective] To evaluate the detection capability of LAMP for seven common bacterial species of respiratory tract infection. [Methods] Specific primers were designed for the LAMP of seven common pathogens of respiratory tract infections, including *Klebsiella pneumoniae* (KP), *Acinetobacter baumannii* (AB), *Staphylococcus aureus* (SA), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Streptococcus pneumoniae* (SP), *Moraxella catarrhalis* (MC), and *Haemophilus influenzae* (HI). The sensitivity and specificity of this LAMP method were evaluated by gradient dilution method and cross-reaction experiment, respectively. We then retrospectively analyzed the residual tract specimens (sputum and bronchoalveolar lavage fluid) from 240 patients with suspected lower respiratory tract infection in Peking University Peoples Hospital from November 2019 to March 2021. After DNA extraction by the automatic nucleic acid extraction system, we employed LAMP to detect the seven common pathogens. Further, we compared the results obtained from LAMP and bacterial culture to evaluate the sensitivity and specificity of LAMP. The cut-off value (C_t value) of different species were optimized, and the application value of LAMP in clinical practice were discussed. [Results] The LAMP method had a good linear correlation with the template

concentration. The LAMP system had good specificity as there was no cross reaction with other strains. A total of 218 sputum specimens and 22 bronchoalveolar lavage fluid specimens were detected in this study. The seven pathogens were detected in 178 specimens based on the bacterial culture method and in 176 specimens based on the LAMP method. The LAMP method generally consumed 2–3 h for detection and could simultaneously detect multiple specimens. The optimal C_t values of HI, KP, AB, MC, SA, PA, and SP were 18.5, 20, 20, 15, 25, 19, and 18, respectively. The sensitivity and specificity were as follows: KP (90.7%, 94.1%), AB (84.0%, 94.2%), PA (90.8%, 89.1%), MC (75.0%, 99.2%), SA (81.8%, 97.4%), HI (75.0%, 90.3%), and SP (33.3%, 95.4%). The LAMP results for KP, AB, and PA showed good coincidence with the semi-quantitative results of sputum culture, and the R^2 values were 0.855 7, 0.804 4, and 0.924 3, respectively. **[Conclusion]** LAMP had low requirements for operating personnel, short cycle, and high specificity (89.1%–99.2%) compared with the culture method. It has high sensitivity (81.8%–90.8%) for the detection of *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *S. aureus*, and *P. aeruginosa*, and thus can be used for the rapid detection of these bacteria in clinical respiratory tract infection. The results of LAMP were in good agreement with the semi-quantitative results of sputum culture. The detection of *H. influenzae* and *S. pneumoniae* needs to be further evaluated due to the lack of positive culture specimens.

Keywords: loop-mediated isothermal amplification; low respiratory tract infection; etiological diagnosis

下呼吸道感染主要由病毒、细菌、支原体、衣原体等病原微生物引起, 是全球人类发病和死亡的主要原因之一^[1]。根据 2020 年中国细菌耐药监测网 CHINET (<http://www.chinets.com/>)监测结果, 引起下呼吸道感染常见的细菌主要有肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌和卡他莫拉菌等。SARS-CoV-2 型冠状病毒感染患者分离的病原菌中, 危重型患者主要合并感染的细菌为鲍曼不动杆菌和肺炎克雷伯菌^[2]。传统的细菌培养是下呼吸道感染诊断的金标准, 但其检验周期长、人为因素多且敏感性低。传统的 PCR 技术及在此基础上发展起来的荧光 PCR 等核酸检测方法对仪器设备和操作人员要求高, 需要反复升降温, 耗时较长^[3]。现有一种新的检测方法——环介导恒温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术, 该方法操作简单、检测快速, 即使样本量很少的情况

下也可以扩增^[4]。目前, 该方法已应用于多个领域, 如新型冠状病毒的检测^[5]、结核分枝杆菌的诊断^[6]、毛癣菌属的鉴定^[7]及寄生虫的鉴定^[8]等方面。本研究以 LAMP 技术对下呼吸道感染常见的 7 种细菌进行检测, 对所得结果进行统计学分析, 探讨环介导恒温扩增技术在临床应用上的可行性。

1 材料与方法

1.1 样品

选取 2019 年 11 月–2021 年 3 月北京大学人民医院 240 例疑似下呼吸道感染患者的呼吸道标本。采集痰和肺泡灌洗液作为研究对象, 其中痰 218 例(包括咳痰或支气管镜吸痰), 肺泡灌洗液 22 例。所采用样本均经革兰氏染色(Gram stain)涂片镜检为可接受样本。本研究经北京大学人民医院伦理委员会审批通过(2019PHB063)。

1.2 主要试剂和仪器

核酸提取试剂盒, 上海复星长征医学科学有限公司。恒温核酸扩增分析仪, 上海复星长征医学科学有限公司。

1.3 样本处理和检测方法

1.3.1 细菌培养

根据下呼吸道感染细菌培养操作规范行业标准^[9], 采集痰、支气管分泌物标本时, 先涂片染色, 若镜下白细胞>25 个/低倍镜视野, 或白细胞介于 10–25 个/低倍镜视野, 而且鳞状上皮细胞<25 个/低倍镜视野, 此为可接受标本。采集肺泡灌洗液时, 涂片染色镜检鳞状上皮细胞比例小于 1%为可接受标本。接种于血平板、巧克力平板及麦康凯平板^[9]上, 于 35 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育过夜, 观察菌落形态及半定量计数, 用 Bruker 基质辅助激光解析飞行时间质谱仪进行菌种鉴定。

1.3.2 核酸提取

将 300 μL 下呼吸道标本加入样本管, 每管中加入等体积 4% NaOH 溶液, 充分振荡, 室温液化 30 min, 用核酸提取试剂盒在核酸提取仪上提取核酸, 按照说明书进行。

1.3.3 恒温扩增

利用软件 PrimerExplorer 设计 LAMP 引物 (<http://primerexplorer.jp/e/>), 选取各菌种高度保守区序列的多个不同位点设计获得 7 种目标菌的检测引物, 引物序列见表 1。将 80 μL 核酸提取液作为模板, 与 10 μL 混合酶和 PCR 反应液(含 *Bst* DNA 聚合酶 8 U/μL, dNTPs 各 100 mmol/L) 振荡混匀, 瞬时离心, 制备形成加样混合液。每个检测孔位加入 11 μL 加样混合液和 14 μL 引物, 构成 25 μL 反应体系, 混匀后瞬时离心, 置于恒温核酸扩增分析仪中恒温扩增。检测程序: 63 °C 反应 30 min。结果采用受试者工作特

征(receiver operating characteristic, ROC)曲线计算得到 7 种呼吸道细菌的阳性判断值: 流感嗜血杆菌为 18.5、肺炎克雷伯菌为 20.0、鲍曼不动杆菌为 20.0、卡他莫拉菌为 15.0、金黄色葡萄球菌为 25.0、铜绿假单胞菌为 19.0、肺炎链球菌为 18.0。当检测细菌的 T_t (仪器检测的阈值时间) 小于或等于该细菌的阳性判断值时, 判读为阳性; 当检测细菌的 T_t 值大于该细菌的阳性判断值时, 判读为阴性。

1.4 敏感度试验

配制包含 7 种目标菌(流感嗜血杆菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、卡他莫拉菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和肺炎链球菌)的混合液, 利用生理盐水梯度稀释为 10⁷、10⁶、10⁵ CFU/mL, 对这 3 个浓度梯度样本进行 LAMP 检测, 每个浓度梯度检测 20 次。

1.5 特异性试验

选择化脓链球菌、表皮葡萄球菌、大肠埃希菌、摩根摩根菌、尿肠球菌、粪肠球菌、单核细胞性李斯特菌、副溶血弧菌、施氏假单胞菌和斯氏普鲁威登菌共 10 种病原菌, 利用生理盐水配制 10⁶ CFU/mL 菌液作为模拟样本, 利用 LAMP 技术进行特异性验证。

1.6 统计学分析

数据采用 GraphPad Prism 统计软件处理, 分析数据。绘制 LAMP 技术检测的阳性 T_t 值与阴性 T_t 值的 ROC 曲线, 并计算 ROC 曲线下面积(area under curve, AUC), AUC 比较采用 *P* 检验。细菌培养半定量结果与 T_t 值比较采用组间单因素方差分析。以细菌培养结果作为金标准, LAMP 技术特异性(specificity)计算公式为: 真阳性人数/(真阳性人数+假阳性人数)×100%, 灵敏度(sensitivity)计算公式: 灵敏度=真阳性人数/(真阳性人数+假阴性人数)×100%, 阳性预

表 1 7 种目标菌的引物序列

Table 1 Primer sequences for seven target bacteria

细菌名称	引物名称	引物序列
Bacterial name	Primer name	Primer sequence (5'→3')
流感嗜血杆菌 <i>Haemophilus influenzae</i> (HI)	HI-F3	TGGGCTCATCCTATGGCA
	HI-B3	GCAGGCTTAACACATGCAAG
	HI-FIP	AACGACGGGAAACTGTCGCTAACCTCTCAGTCCCCGACTT
	HI-BIP	CAAGCATTACTCACCCGTCCGCTCGAACGGTAGCAGGAGAA
	HI-LF	ACCGCGTATTATCGGAAGATGA
肺炎克雷伯菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i> (KP)	HI-LB	CACTCGTCAGCAAGAAAGCA
	KP-F3	AAGGGCGGTACAGGTTCC
	KP-B3	AGTACTCCGCCTCTAGCC
	KP-FIP	GCTTACGTGCGTTCTGAGAGCGAAGGAGCTGCTTCACCACT
	KP-BIP	CCACGTGAGCCCGTAGAACGGCAAGACCCACGAAATCACC
鲍曼不动杆菌 <i>Acinetobacter baumannii</i> (AB)	KP-LF	AGGGCTTTGCAGGGTGG
	AB-F3	TGACATGCTTGTCCGTTCC
	AB-B3	ATGAAGATAACCATACAGTTTGA
	AB-FIP	CCTTCGATTTCTGCTTTAGGTGTAAGGCGCAATTGATTTAATCGTT
	AB-BIP	TGAGATGGGTGACTCTCATATGGACGTTTAGCATTACCCGTAA
卡他莫拉菌 <i>Moraxella catarrhalis</i> (MC)	AB-LF	TGCAGCCACCGAGTCCA
	AB-LB	GTCTACAAGCGCGTCTTATGAG
	MC-F3	GACCACACAATCCGATGT
	MC-B3	GTTTTTCCATTAATAAATCTGCC
	MC-FIP	TTGCTTCATGACTGGGCGTATGCCCATATTTATGCACGG
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> (SA)	MC-BIP	TGCCCCTGAATTAATAAATTTCAAGTTCCCAAACCATAAATCTGAATCC
	MC-LF	TCTGTAAAGGTTAAAGCTGCTGAG
	SA-F3	AACAACAAAACCTTCTACTGAA
	SA-B3	TCCTAAACCAACACCTCC
	SA-FIP	TCCGATTACAAAAGTGTCAAATGTGCAACTGAGGATAATCATGTGCT
铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PA)	SA-BIP	CCTGGTAACCGCTTTCCACAAGATAAATAATGGATTGTACGCT
	SA-LF	GGCATTGAATTGCTCTCTACCA
	SA-LB	GCGAGTTTAGCTGTGGCC
	PA-F3	GCGGACAACCTCAAGCAC
	PA-B3	CGTTGATGGCGTTGAGCT
肺炎链球菌 <i>Streptococcus pneumoniae</i> (SP)	PA-FIP	CGCATGCATCAGGTGGGTCTTGGGCTACAACCCGCTGTTC
	PA-BIP	CCGAACGCCAAGGTGGTCTACGCAAGGCCTTCACCATGTC
	PA-LF	AGACCGACGCCACCGTAGAG
	SP-F3	CTCGAGGAGAGGCTTGTC
	SP-B3	AGTGATGTGCTTGATGGC
SP-FIP	TGTAATAATGGCAATACGTGTTTCAAGCGTTTTAGTTGGGGATTG	
SP-BIP	AGGCTACAATTTCCAAAGTGATACTTCCCTCAAGATCTCGAACA	
SP-LF	AGGGGGTGTGATAGTTTGTGT	
SP-LB	CTAGAATACCTAGCTGGGCAATTT	

测值(positive predictive value, PPV)计算公式:
阳性预测值=真阳性/(真阳性+假阳性), 阴性预
测值(negative predictive value, NPV)计算公式:
阴性预测值=真阴性/(真阴性+假阴性)。

2 结果与分析

2.1 LAMP 技术的检测性能分析

将含有 7 种目标菌的混合菌液使用 LAMP 法检测, 每个浓度梯度(10^7 、 10^6 、 10^5 CFU/mL)检测 20 次。分别计算 7 种目标菌的 T_t 平均值, 结果显示(图 1), 7 种目标菌的模板浓度与 LAMP 技术检测的 T_t 值均存在较好的线性相关性, 流感嗜血杆菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、卡他莫拉菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和肺炎链球菌 R^2 分别为 0.974 3、0.931 9、0.920 2、0.999 1、0.958 3、0.993 4 和 0.923 1。

2.2 LAMP 技术的特异性分析

使用 LAMP 技术检测含有 10^6 CFU/mL 的化脓链球菌、表皮葡萄球菌、大肠埃希菌、摩根摩根菌、尿肠球菌、粪肠球菌、单核细胞性李斯特菌、副溶血弧菌、施氏假单胞菌和斯氏普鲁威登菌共 10 种细菌的模拟样本, 结

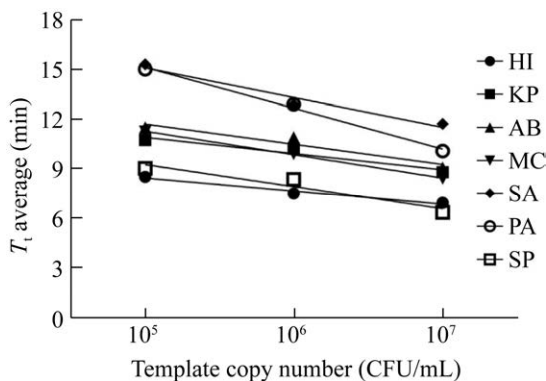


图 1 模板浓度与 T_t 值的相关性分析

Figure 1 Correlation analysis between template concentration and T_t value.

果均为阴性, 说明本研究设计的引物具有较高的特异性。

2.3 不同标本类型细菌培养的病原菌分布情况

采用痰和肺泡灌洗液作为研究对象, 不同标本类型阳性检出率不同, 痰标本中(包括咳痰和吸痰)共检出 52 株肺炎克雷伯菌(22.5%)、46 株鲍曼不动杆菌(19.9%)、11 株金黄色葡萄球菌(4.8%)、64 株铜绿假单胞菌(27.7%), 检出率高于肺泡灌洗液。而肺泡灌洗液标本中检出苛养菌流感嗜血杆菌 1 株(4.5%)、肺炎链球菌 3 株(13.6%)、卡他莫拉菌 1 株(4.5%), 检出率高于痰标本。结果见表 2。其中有 13 例痰标本培养出 2 种目标菌。

2.4 传统细菌培养法与 LAMP 技术检测结果分析

在 240 例样本中, 传统细菌培养法含有 7 种目标菌的样本共 178 例, 包括 4 株流感嗜血杆菌、54 株肺炎克雷伯菌、50 株鲍曼不动杆菌、4 株卡他莫拉菌、11 株金黄色葡萄球菌、65 株铜绿假单胞菌和 3 株肺炎链球菌。LAMP 技术含有 7 种目标菌的样本共 176 例, 包括 26 株流感嗜血杆菌、60 株肺炎克雷伯菌、53 株鲍曼不动杆菌、5 株卡他莫拉菌、15 株金黄色葡萄球菌、78 株铜绿假单胞菌、12 株肺炎链球菌(表 3)。检测灵敏度(sensitivity)和特异性(specificity)分别是: 流感嗜血杆菌 75.0%和 90.3%, 肺炎克雷伯菌 90.7%和 94.1%, 鲍曼不动杆菌 84.0%和 94.2%, 卡他莫拉菌 75.0%和 99.2%, 金黄色葡萄球菌 81.8%和 97.4%, 铜绿假单胞菌 90.8%和 89.1%, 肺炎链球菌 33.3%和 95.4%。阳性预测值(PPV)和阴性预测值(NPV)分别是流感嗜血杆菌 11.5%和 99.5%, 肺炎克雷伯菌 81.7%和 97.2%, 鲍曼不动杆菌 79.2%和 95.7%, 卡他莫

表 2 不同标本类型细菌培养的病原菌分布情况

Table 2 Distribution of pathogenic bacteria in bacterial culture of different specimen types

细菌名称 Bacterial name	痰 Sputum		肺泡灌洗液 Bronchoalveolar lavage fluid	
	例数 Number	阳性率 Positive rate (%)	例数 Number	阳性率 Positive rate (%)
流感嗜血杆菌 <i>Haemophilus influenzae</i> (HI)	3	1.3	1	4.5
肺炎克雷伯菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i> (KP)	52	22.5	2	9.1
鲍曼不动杆菌 <i>Acinetobacter baumannii</i> (AB)	46	19.9	4	18.2
卡他莫拉菌 <i>Moraxella catarrhalis</i> (MC)	3	1.3	1	4.5
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> (SA)	11	4.8	0	0.0
铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PA)	64	27.7	1	4.5
肺炎链球菌 <i>Streptococcus pneumoniae</i> (SP)	0	0.0	3	13.6
非靶标菌 Non-target bacteria	52	22.5	10	45.6
总数 Total	231	100.0	22	100.0

表 3 细菌培养法和 LAMP 检测结果

Table 3 Results of bacterial culture and LAMP

细菌名称 Bacterial name	细菌培养法/LAMP 法检测结果 Culture method results/LAMP method results			
	+/+	+/-	-/+	-/-
流感嗜血杆菌 <i>Haemophilus influenzae</i> (HI)	3	1	23	213
肺炎克雷伯菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i> (KP)	49	5	11	175
鲍曼不动杆菌 <i>Acinetobacter baumannii</i> (AB)	42	8	11	179
卡他莫拉菌 <i>Moraxella catarrhalis</i> (MC)	3	1	2	234
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> (SA)	9	2	6	223
铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PA)	59	6	19	156
肺炎链球菌 <i>Streptococcus pneumoniae</i> (SP)	1	2	11	226

注: +/+ : 培养方法和 LAMP 法检测结果均为阳性。+/- : 培养方法为阳性而 LAMP 检测结果为阴性。-/+ : 培养结果为阴性而 LAMP 法检测结果为阳性。-/- : 培养方法及 LAMP 法检测结果均为阴性

Note: +/+ : The results of LAMP method and culture method were both positive. +/- : The culture method was positive and LAMP was negative. -/+ : The culture results were negative and LAMP results were positive. -/- : The results of LAMP method and culture method were both negative.

拉菌 60.0%和 99.6%, 金黄色葡萄球菌 60.0%和 99.1%, 铜绿假单胞菌 75.6%和 96.3%, 肺炎链球菌 8.3%和 99.1% (表 4)。

2.5 LAMP 检测的 ROC 曲线

采用 GraphPad Prism 统计软件处理, 肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌的 ROC 曲线下面积(AUC)分别是

0.930 8、0.899 9、0.926 1 和 0.900 0, 均接近 1。95%置信区间(confidence interval, CI)分别是肺炎克雷伯菌 0.882 5–0.979 1, 鲍曼不动杆菌 0.837 6–0.962 2, 铜绿假单胞菌 0.880 1–0.972 0, 金黄色葡萄球菌 0.764 2–1.000 0。P 值均小于 0.000 1, 见图 2。结果显示 LAMP 法检测 7 种常见呼吸道感染病原菌具有较好的检测性能。

表 4 细菌培养法和 LAMP 法检测结果符合率分析

Table 4 Analysis of coincidence of bacterial culture and LAMP

细菌名称 Bacterial name	细菌培养阳性数量 Number of positive bacterial culture results	LAMP 法阳性数量 Number of positive LAMP method results	特异性 Specificity (%)	灵敏度 Sensitivity (%)	阳性 预测值 PPV (%)	阴性 预测值 NPV (%)
流感嗜血杆菌 <i>Haemophilus influenzae</i> (HI)	4	26	90.3	75.0	11.5	99.5
肺炎克雷伯菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i> (KP)	54	60	94.1	90.7	81.7	97.2
鲍曼不动杆菌 <i>Acinetobacter baumannii</i> (AB)	50	53	94.2	84.0	79.2	95.7
卡他莫拉菌 <i>Moraxella catarrhalis</i> (MC)	4	5	99.2	75.0	60.0	99.6
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> (SA)	11	15	97.4	81.8	60.0	99.1
铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PA)	65	78	89.1	90.8	75.6	96.3
肺炎链球菌 <i>Streptococcus pneumoniae</i> (SP)	3	12	95.4	33.3	8.3	99.1

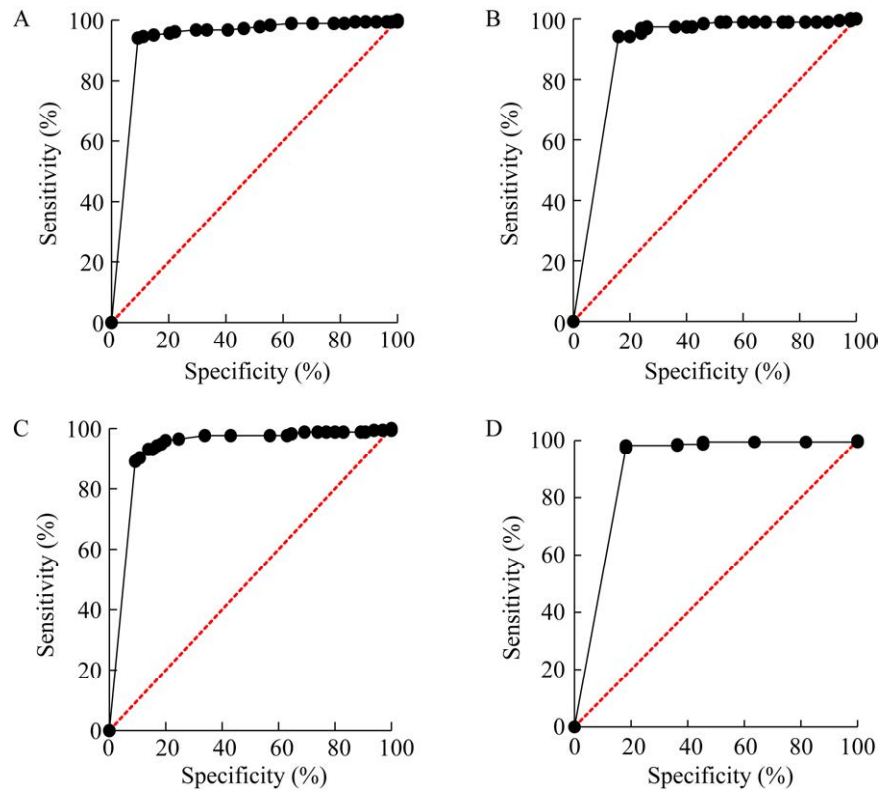


图 2 LAMP 检测不同细菌的 ROC 曲线 A: KP 的 ROC 曲线; B: AB 的 ROC 曲线; C: PA 的 ROC 曲线; D: SA 的 ROC 曲线

Figure 2 ROC curve of LAMP for detecting different bacteria. A: The ROC curve of KP; B: The ROC curve of AB; C: The ROC curve of PA; D: The ROC curve of SA.

2.6 细菌培养半定量结果与 LAMP 法 T_t 值相关性比较

为了分析 LAMP 法 T_t 值与细菌半定量是否存在相关性, 将 178 例痰标本细菌培养半定量结果与 LAMP 的 T_t 值进行比较分析。将细菌培养半定量+、++、+++、++++设为横坐标, 肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌及铜绿假单胞菌的 T_t 均值设为纵坐标做线性拟合, 肺炎克雷伯菌的 R^2 值为 0.855 7, 鲍曼不动杆菌的 R^2 值为 0.804 4, 铜绿假单胞菌的 R^2 值为 0.924 3 (图 3)。提示 LAMP 结果与半定量符合率较好, 随着标本中细菌量增加, T_t 值逐渐降低。

3 讨论与结论

LAMP 是 2000 年由日本学者 Notomi 等^[10]提出的一种恒温核酸扩增技术, 本研究是采用 LAMP 法检测 7 种呼吸道感染常见病原菌的特异性保守序列。利用超顺磁性氧化硅磁珠, 与核酸分子特异性地识别和高效结合, 在盐和外加磁场的作用下, 从样本中分离 DNA 分子。然后利用具有链置换特性的 *Bst*DNA 聚合酶在 65 °C 恒定温度下, 以病原体核酸为模板进行特异性扩增。扩增过程可分为启动阶段和循环扩增阶段, 最终形成双链 DNA 混合物。扩增产物与核酸染料结合后发出荧光信号, 荧光信号可由仪器捕获, 并进行处理分析, 形成扩增曲线, 并根据 T_t 值判断检测结果。

肺炎可以分为社区获得性肺炎(community acquired pneumonia, CAP)和医院获得性肺炎(hospital acquired pneumonia, HAP)两大类。据宁永忠等^[11]报道, CAP 病原谱包括肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、流感嗜血杆菌、卡他莫拉菌、肠杆菌目(如肺炎克雷伯菌)和铜绿假单胞菌等。HAP 病原谱包括鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌和

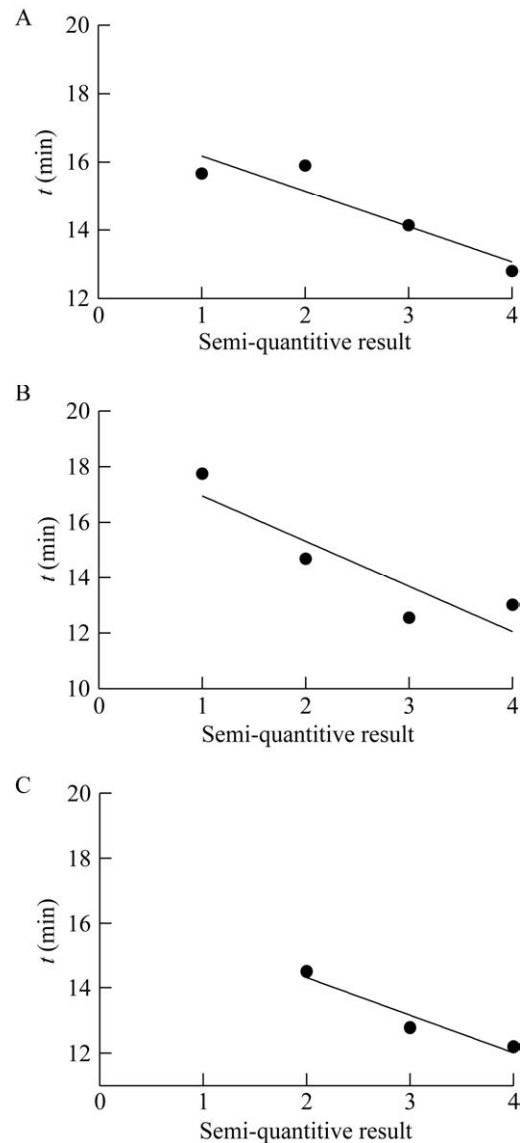


图 3 细菌培养半定量结果与 T_t 均值的线性拟合
A: KP 的细菌培养半定量结果与 T_t 均值的线性拟合;
B: AB 的细菌培养半定量结果与 T_t 均值的线性拟合;
C: PA 的细菌培养半定量结果与 T_t 均值的线性拟合

Figure 3 Linear fit between semi-quantitative results of bacterial culture and T_t mean value. A: The linear fitting of KP bacterial culture semi-quantitative results and T_t mean value; B: The linear fitting of AB bacterial culture semi-quantitative results and T_t mean value; C: The linear fitting of PA bacterial culture semi-quantitative results and T_t mean value.

大肠埃希菌等。本研究检测的 7 种病原菌覆盖了大部分的 CAP 及 HAP 病原菌。以细菌培养为金标准, 利用环介导恒温扩增技术检测 240 例下呼吸道标本, 并且在验证了试剂盒的灵敏度与特异性的情况下, 将检测结果与细菌培养结果进行比较分析。7 种目标菌特异性较好, 均大于 89.0%, 肺炎克雷伯菌特异性为 94.1%, 高于司玉莹等报道的 87.5%^[12]。肺炎克雷伯菌和铜绿假单胞菌灵敏度较高(>90.0%), 除肺炎链球菌、流感嗜血杆菌和卡他莫拉菌外, 其他目标菌灵敏度均大于 70.0%。据 Hou 等^[13]研究报告 LAMP 检测流感嗜血杆菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和肺炎链球菌的灵敏度分别为 6.3%、14.7%、12.5%、10.9%、22.0%、11.3%。刘芮等^[14]研究报告 LAMP 检测流感嗜血杆菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、肺炎链球菌的灵敏度分别为 41.9%、21.4%、45.2%、23.9%、0% 和 28.6%。除卡他莫拉菌外, 本研究 6 种目标菌灵敏度均显著高于国内外相关报道。卡他莫拉菌的 LAMP 法检测的相关报道极少, 本研究的卡他莫拉菌具有较高的特异性(99.2%)。本研究肺炎链球菌检测的灵敏度较低, 分析原因可能是由于样本检测量少, 也可能是由于本实验为回顾性分析, 标本放置时间较长。有研究发现肺炎链球菌分离率随标本放置时间延长呈现下降趋势^[15]。本研究存在的局限性是 CAP 主要病原菌肺炎链球菌、流感嗜血杆菌和卡他莫拉菌培养阳性标本数较少。基于中国细菌耐药监测网 CHINET 数据显示, 2018 年我国呼吸道标本分离的流感嗜血杆菌和肺炎链球菌分别占 7.06% 和 5.25%, 2020 年受新冠肺炎疫情影响, 人群口罩佩戴率增加, 我国呼吸道标本分离的流感嗜血杆菌和肺炎链球菌的数量和比

例均明显下降, 比例分别降至 4.19% 和 5.12%。此外, 由于三级医院接诊患者大多不是首次就诊患者, 大部分已经使用了抗菌药物, 也是本研究肺炎链球菌、流感嗜血杆菌和卡他莫拉菌培养阳性标本数较少的因素之一。尽管阳性标本较少, 但本研究共检测了 240 例临床标本, 结果显示 LAMP 技术检测肺炎链球菌、流感嗜血杆菌和卡他莫拉菌的阴性预测值均高于 99%, 提示 LAMP 技术具有一定的临床应用价值。今后可选择在多中心多级别医院收集更多数量的阳性标本, 进一步对 LAMP 技术检测肺炎链球菌、流感嗜血杆菌和卡他莫拉菌进行性能评价。

本研究 240 例样本中有 13 例痰培养出 2 种目标菌, 其中 11 例样本 LAMP 能同时检出 2 种细菌, 检出率为 84.6%, 剩余 2 个样本只检测出一种菌。可见 LAMP 对混合感染的诊断有较好的灵敏度与特异性。另有 9 例样本细菌培养半定量较少+或者++, LAMP 未检出。将普通培养未检出而 LAMP 检测为阳性且 T_1 值较低的标本挑出, 重新接种血平板观察, 其中有 5 例样本可以培养出 LAMP 阳性菌, 但菌量很少, 低于临床报告的阈值, 表明由于所含目标菌量少或菌落较其他细菌菌落小而被覆盖可能会造成培养阴性。LAMP 检测方法针对的是 DNA, 可有效地避免漏检, 对细菌培养结果起到补充作用。然而 LAMP 无法区分活菌和死菌, 这也是 LAMP 的局限性之一。所以当 LAMP 检测阳性时, 还应结合患者临床情况和其他临床检验结果综合判断。另外, 选取 2 例培养为金黄色葡萄球菌阳性而 LAMP 阴性的标本加入 200 μ L 溶葡萄球菌酶重新检测, 其中 1 例检出, 另外 1 例 T_1 值大于 25, 因此对细胞壁较厚的细菌, 可考虑加入溶葡萄球菌酶增加核酸提取效率, 提高病原菌的检出率。

在检测周转时间方面, 本研究的 7 种病原菌引物通过软件(PrimerExplorer)设计外引物 F3/B3、内引物 FIP/BIP 和环引物 LF/LB。通过特异性识别 7 种目标菌的目标 DNA 区域, 启动循环链置换反应。引物的环状结构提高了引物末端的稳定性, 减少了热循环过程, 使反应时间明显缩短, 并且在反应过程中加入荧光剂, 可实时监测整个反应过程。核酸提取用时约 30 min, 恒温扩增用时 0.5 h, 从标本处理到报告结果全过程用时为 2–3 h 之间, 检测周期明显缩短, 而细菌培养通常至少需要 2–3 d。据报道, 缩短检测周转时间, 有助于及时对患者进行针对性抗菌药物治疗, 能降低患者住院率及死亡率^[16]。另有文献显示, 将标本预加热后进行 LAMP 检测, 可省略 DNA 提取步骤^[17], 这样更有利于提高检测速度。

综上所述, 随着人们对恒温扩增技术的进一步认识, LAMP 已经广泛用于多个领域, 在床旁诊断、病原体快速筛查方面有无限的潜力^[18]。LAMP 技术操作简便, 耗时短, 本研究的检测靶标涵盖了医院和社区呼吸道感染常见的 7 种病原菌, 灵敏度和特异性较高, 具有较好的临床应用价值。

致谢: 感谢深圳市中医院对第一作者卫清的支持。

REFERENCES

- [1] Malosh RE, Martin ET, Ortiz JR, Monto AS. The risk of lower respiratory tract infection following influenza virus infection: a systematic and narrative review[J]. *Vaccine*, 2018, 36(1): 141-147
- [2] 罗璇, 侯红艳, 章波, 闫少珍, 田磊, 朱旭慧, 孙自镛, 陈中举. 95 例 COVID-19 患者合并细菌及真菌感染的临床分析[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2021, 41(1): 1-5
Luo X, Hou HY, Zhang B, Yan SZ, Tian L, Zhu XH, Sun ZY, Chen ZJ. Clinical characteristics of 95 COVID-19 patients with bacterial and fungal infections[J]. *Journal of Microbiology and Immunology*, 2021, 41(1): 1-5 (in Chinese)
- [3] Sun XY, Wang L, Zhao MS, Zhao CZ, Liu SF. An autocatalytic DNA machine with autonomous target recycling and cascade circular exponential amplification for one-pot, isothermal and ultrasensitive nucleic acid detection[J]. *Chemical Communications: Cambridge, England*, 2016, 52(74): 11108-11111
- [4] 滕新栋, 张瑾, 徐翻飞, 徐颖, 张娟, 梁洁, 陈晓光. 环介导恒温扩增技术检测人冠状病毒的研究进展[J]. *口岸卫生控制*, 2020, 25(1): 4-7, 19
Teng XD, Zhang J, Xu HF, Xu Y, Zhang J, Liang J, Chen XG. Research progress of loop mediated isothermal amplification in the detection of human coronavirus[J]. *Port Health Control*, 2020, 25(1): 4-7, 19 (in Chinese)
- [5] Kashir J, Yaqinuddin A. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19[J]. *Medical Hypotheses*, 2020, 141: 109786
- [6] Acharya B, Acharya A, Gautam S, Ghimire SP, Mishra G, Parajuli N, Sapkota B. Advances in diagnosis of tuberculosis: an update into molecular diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Molecular Biology Reports*, 2020, 47(5): 4065-4075
- [7] 邓穗燕, 郭旭光, 何文茵, 易江华, 夏勇. 实时荧光环介导等温扩增检测毛癣菌属方法的建立[J]. *中华临床实验室管理电子杂志*, 2020, 8(4): 211-216
Deng SY, Guo XG, He WY, Yi JH, Xia Y. Establishment of a real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification method for the detection of *Trichophyton*[J]. *Chinese Journal of Clinical Laboratory Management: Electronic Edition*, 2020, 8(4): 211-216 (in Chinese)
- [8] 郝朔. 华支睾吸虫核酸检测方法的建立与初步应用[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2020
Hao S. Establishment and preliminary application of nucleic acid detection method of clonorchissinensis[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2020 (in Chinese)
- [9] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. WS/T 499—2017 下呼吸道感染细菌培养操作指南[S]. 北京: 中华人民共和国卫生行业标准, 2017
National Health Commission of the People's Republic of China. WS/T 499—2017 Performance guideline for bacterial culture of lower respiratory tract infections[S]. Beijing: People's Republic of China Health Industry Standards, 2017 (in Chinese)
- [10] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids*

- Research, 2000, 28(12): e63
- [11] 宁永忠, 白志宇, 王辉. 成人肺炎的病原学检查和病原谱[J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(2): 175-178
Ning YZ, Bai ZY, Wang H. Pathogen of adult pneumonia[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2021, 44(2): 175-178 (in Chinese)
- [12] 司玉莹, 赵望, 叶蓓, 成宇, 张雯雁, 叶杨芹, 王玉超, 王岚, 范列英. 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, 65
Si YY, Zhao W, Ye B, Cheng Y, Zhang WY, Ye YQ, Wang YC, Wang L, Fan LY. Detection of *Klebsiella pneumoniae* in respiratory tract samples by the loop-mediated isothermal amplification method[J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2020, 38(1): 56-59, 65 (in Chinese)
- [13] Hou JY, Wu HM, Zeng X, Rao H, Zhao PS. Clinical evaluation of the loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of common lower respiratory pathogens in patients with respiratory symptoms[J]. Medicine, 2018, 97(51): e13660
- [14] 刘芮, 沈秉正, 刘煜, 邬开朗, 刘芳, 祝成亮. 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
Liu R, Shen BZ, Liu Y, Wu KL, Liu F, Zhu CL. Clinical value of LAMP in common bacterial infection of lower respiratory tract[J]. Medical Journal of Wuhan University, 2020, 41(6): 954-958 (in Chinese)
- [15] 潘芬, 赵婉彤, 张天栋, 石迎迎, 蒋婕, 张泓. 儿童患者下呼吸道标本苛养菌阳性分离率的影响因素分析[J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 17(5): 541-545
Pan F, Zhao WT, Zhang TD, Shi YY, Jiang J, Zhang H. Factors affecting the isolation of fastidious bacteria from lower respiratory tract specimens in children[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2017, 17(5): 541-545 (in Chinese)
- [16] 侯莉莉, 刘莉莉, 党萍, 康冠楠, 张勤风, 李东玲. 河北省三甲医院2013至2016年呼吸道感染致病菌变化特点分析: 附单中心7497例病例报告[J]. 中华危重病急救医学, 2017, 29(9): 799-804
Hou LL, Liu LL, Dang P, Kang GN, Zhang QF, Li DL. Analysis of characteristics of bacteria in respiratory tract infection in 2013–2016 in Hebei 3A hospital: a single-center report of 7497 patients[J]. Chinese Critical Care Medicine, 2017, 29(9): 799-804 (in Chinese)
- [17] Nemoto M, Ohta M, Tsujimura K, Bannai H, Yamanaka T, Kondo T, Matsumura T. Direct detection of equine herpesvirus type 1 DNA in nasal swabs by loop-mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. The Journal of Veterinary Medical Science, 2011, 73(9): 1225-1227
- [18] 李美, 陈飘飘, 应斌武. 基于环介导等温扩增技术的即时检测在检验医学中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(9): 776-780
Li M, Chen PP, Ying BW. Application of loop-mediated isothermal amplification based point-of-care testing in laboratory medicine[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2021, 44(9): 776-780 (in Chinese)