

· 论 著 ·

环介导等温扩增法对痰标本中结核分枝杆菌检测效果的评估

丁卫忠 陈巍 石莲 梁秋 李玲 孙德斌 王悦 张申富 孙娇 谭珂
孙炳奇 冈田耕辅 野口典久 安中敏光 吴邦杰

【摘要】 目的 评价环介导等温扩增法(loop-mediated isothermal amplification, Lamp)对结核分枝杆菌快速检测效果的临床验证与应用,评估该方法在结核病临床诊断中的效能。方法 选取本院临床诊断结核病患者的痰标本 483 份,分别采用直接涂片法、固体培养法、液体培养法及 Lamp 法检测痰标本,并应用 χ^2 检验对不同方法的检测结果进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。结果 在 483 例结核病患者痰标本中,以传统检测方法(涂片+培养)为标准进行比较,Lamp 检测的敏感度为 84.67% [232/(232+42)],特异度为 87.08% [182/(27+182)],阳性预测值为 89.58% [232/(232+27)],阴性预测值为 81.25% [182/(42+182)],一致性为 85.71% [(232+182)/483]。在干酪样痰标本中,Lamp 和传统检测方法的阳性检出率分别为 77.96% (145/186) 和 77.42% (144/186),均高于黏液痰的阳性率 [38.46% (110/286) 和 42.66% (122/286)] ($\chi^2 = 70.78$ 和 $\chi^2 = 53.05$, P 值均 < 0.01)。结论 与传统检测方法比较,Lamp 对结核分枝杆菌的检出,具有良好的敏感度、特异度和一致性。Lamp 对干酪样痰标本的检出阳性率高于传统检测方法,而对于同一性状的标本检测,两种方法之间并无显著差异。

【关键词】 核酸扩增技术; 分枝杆菌,结核; 结核,肺; 细菌学技术; 评价研究

Evaluation of the loop-mediated isothermal amplification method for detecting *M. tuberculosis* in sputum specimens
DING Wei-zhong*, CHEN Wei, SHI Lian, LIANG Qiu, LI Ling, SUN De-bin, WANG Yue, ZHANG Shen-fu, SUN Jiao, TAN Ke, SUN Bing-qi, Kosuke Okada, Norihisa Noguchi, Toshimitsu Annaka, WU Bang-jie. Tuberculosis Laboratory, Shenyang Chest Hospital, Shenyang 110044, China
Corresponding author: SUN Bing-qi, Email: Sunbq2004@163.com

【Abstract】 Objective To evaluate the diagnostic value of loop-mediated isothermal amplification (Lamp) method for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*. Methods Four hundred and eighty-three sputum samples were collected from clinically diagnosed TB patients in our hospital, and samples were examined by smear, liquid culture, solid culture and Lamp methods to detect *Mycobacterium tuberculosis*. Results from different testing methods were compared using the χ^2 test. Results For the 483 specimens tested, the sensitivity of Lamp was 84.67% (232/(232+42)), and the specificity was 87.08% (182/(27+182)). The positive predictive value was 89.58% (232/(232+27)), the negative predictive value was 81.25% (182/(42+182)), and the consistency was 85.71% ((232+182)/483). For caseous sputum samples, the positive detection rate was 77.96% (145/186) and 77.42% (144/186) by Lamp and bacteriological testing methods, respectively, and was higher than that for mucus sputum, which was 38.46% (110/286) and 42.66% (122/286), respectively ($\chi^2 = 70.78$, $P < 0.01$ and $\chi^2 = 53.05$, $P < 0.01$). Conclusion The Lamp method had a comparably high positive detection rate for *Mycobacterium tuberculosis* as smear and liquid culture methods, and showed good sensitivity, specificity and consistency. For caseous sputum samples, the positive detection rate of Lamp was higher than that for bacteriological testing, and test results for Lamp-TB and bacteriological methods on the same sputum samples was not significantly different.

【Key words】 Nucleic acid amplification techniques; *Mycobacterium tuberculosis*; Tuberculosis, pulmonary; Bacteriological techniques; Evaluation studies

doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2016.10.007

作者单位:110044 沈阳市胸科医院结核病实验室(丁卫忠、王悦、张申富、孙娇、谭珂、孙炳奇),结核科(陈巍、石莲、梁秋、李玲、孙德斌);日本结核预防会国际部(冈田耕辅);日本荣研化学株式会社企划部(野口典久、安中敏光、吴邦杰)

通信作者:孙炳奇,Email:sunbq2004@163.com

结核病是由结核分枝杆菌引起的严重危害人类健康的慢性传染性疾病。我国是结核病高负担国家,根据《2015 年全球结核病报告》统计,2014 年我国结核病年发病患者约 93 万例,位居全球第 3 位^[1]。世界卫生组织强调遏制结核病的主要方法是普及高效和以人为本的检测诊断技术,而准确可靠的快速检测手段是先决条件。目前,大多数结核病高发国家的实验室对于结核病的病原学检测仍依赖于传统的涂片与培养法,而传统方法已经不能满足结核病早期诊断的临床需求。近年来随着分子诊断技术的快速发展,应用核酸扩增技术检测结核分枝杆菌感染已成为传统诊断方法的重要补充,也是结核病快速诊断主要的研究方向。环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是 Notomi 等^[2]于 2000 年发明的一种核酸扩增技术。该技术不依赖温度循环变化,只需恒定温度就能进行扩增反应。由于此方法简单、设备低廉,可肉眼检查扩增结果,且保持了核酸扩增快速、高敏感度的特点,因此,该技术自问世起就得到广泛关注^[3],我国最近也批准了该技术的临床应用。本研究拟对我院 2015 年 5 月至 2016 年 1 月收治的临床疑似结核病患者的痰标本分别采用传统方法(直接涂片法、固体培养法和液体培养法)和 LAMP 法进行检测,通过与传统检测方法比较(即涂片法和培养法中任一结果为阳性即为阳性),分析 LAMP 方法检测的敏感度、特异度等指标,系统评价该技术检测痰标本中结核分枝杆菌的效果和临床应用价值。

材料和方法

一、研究对象

前瞻性连续选取我院 2015 年 5 月至 2016 年 1 月收治的临床疑似结核病(所有研究对象均经临床表现、胸部 X 线摄影及 CT 检查、痰标本传统方法检查)患者 503 例,入选标准参照《肺结核诊断标准(WS288-2008)》^[4]。最后经临床诊断结核病为 483 例,年龄 11~96 岁,平均年龄(50.56±17.87)岁。男 350 例,年龄 15~93 岁,平均年龄(50.52±17.87)岁;女 133 例,年龄 11~96 岁,平均年龄(50.61±17.85)岁。其他肺部疾病 20 例,年龄 27~89 岁,平均年龄(50.54±18.14)岁,其中男 11 例,年龄 27~89 岁,平均年龄(50.39±18.20)岁;女 9 例,年龄 30~86 岁,平均年龄(50.36±17.60)岁;其他肺部疾病患者中 NTM 肺病 1 例,肺癌 5 例,肺炎 12 例,支气管扩张 1 例,支气管肿瘤 1 例。本研

究经本院伦理委员会批准,所有患者均知情同意。

二、方法

本研究由沈阳市胸科医院、日本结核预防会国际部及日本荣研化学株式会社三方共同完成,日本结核预防会国际部负责整个研究各个环节的协调工作,并与沈阳市胸科医院共同进行数据统计。实验中 LAMP 检测所用试剂盒(loop amp pure DNA 提取试剂盒和 loop amp 结核分枝杆菌复合群(MTBC)核酸检测试剂盒]均由日本荣研化学株式会社提供。所有实验操作部分由沈阳市胸科医院结核病实验室完成,标本分别进行涂片镜检、罗氏固体培养、MGIT960 液体培养和 LAMP 检测,并对不同方法的检测结果及不同性状痰标本对检测结果的影响进行比较。

对 LAMP 技术的检测效果评价以传统检测结果作为标准(即涂片法和培养法中任一结果为阳性,则为阳性)。若培养结果怀疑为非结核分枝杆菌(non-tuberculous mycobacterium, NTM),则使用博奥基因芯片对培养物进行菌种鉴定。

(一)金胺 O 染色

按照《结核病实验室诊断技术培训教程》^[5]中的要求进行操作。

(二)罗氏固体培养和 MGIT 960 液体培养

按照《结核病实验室诊断技术培训教程》^[5]中的要求操作。本研究中所有标本的培养过程中,罗氏固体培养方法有 27 例污染标本, MGIT960 液体培养方法有 3 例污染标本,此 30 例标本经去污后重新培养。

(三) LAMP 技术检测

采集痰液:吸取痰液 60 μ l 放入吸附剂试管中,充分混匀并加热裂解(90 $^{\circ}$ C, 5 min)。

DNA 提取:将吸附试管装到样本处理管上,摇晃 8~10 次后得到初步提取的核酸,在样本处理管上加滴注盖,轻压样本处理管将样本滴入到反应管中。

扩增和检测:试剂干燥于管盖上,盖上管盖,充分混合后即可进行 LAMP 反应,67 $^{\circ}$ C 40 min 反应结束,然后直接放入恒温荧光核酸扩增仪 LF-160 的荧光目视检测单元,通过仪器配套的紫外线激发荧光观察反应结果。整个检测过程在 1 h 内完成。

(四)统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,以传统方法检测结果(即涂片法和培养法中任一结果为阳性即为阳性)为标准计算 LAMP 检测的敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值和一致性。不同检测方法的结果间比较采用 χ^2 检验,统计学分析由沈阳

市胸科医院和日本结核预防会国际部共同完成。

结 果

一、不同方法检测痰标本的结果比较

在全体 503 例受检者中,肺结核临床确诊患者为 483 例,其中 LAMP 法检测阳性为 259 例,涂片法检测阳性为 187 例,液体及固体培养检测阳性分别为 234 和 211 例。肺部其他疾病患者中有 1 例为 NTM 肺病,涂片及培养检测结果均为阳性,LAMP 法检测结果为阴性(此标本经 MPB64 抗原检测鉴定为非结核分枝杆菌,经博奥基因芯片菌种鉴定为鸟分枝杆菌);另有 19 例肺部其他疾病者,各项检测结果均为阴性(表 1)。

二、LAMP 法与传统方法检测结果的比较

本研究对 483 例临床诊断患者的 LAMP 检测结果进行分析,以传统方法检测结果(即涂片法和培养法中任一结果为阳性即为传统方法阳性)作为标准,真阳性为 232 例,真阴性 182 例,假阳性 27 例,假阴性 42 例。计算 LAMP 法检测的敏感度为 84.67% $[232/(232+42)]$,特异度为 87.08% $[182/(27+182)]$,阳性预测值为 89.58% $[232/(232+27)]$,阴性预测值为 81.25% $[182/(42+182)]$,一致性为 85.71% $[(232+182)/483]$ 。

在 483 例患者的检测结果中,LAMP 法与传统方法检测结果不一致者共 69 例,其中 LAMP 检测阳性而传统方法检测阴性为 27 例,LAMP 法检测阴性而传统方法检测阳性为 42 例。对此结果进行关联 χ^2 检验, $\chi^2 = 242.58, P < 0.01$,说明两种检测方法有较好的一致性;对两组检测结果的差异进行 χ^2 检验, $\chi^2 = 3.26, P > 0.05$,两组检测结果差异无统计学意义(表 2)。

三、不同性状痰标本对 LAMP 法及传统方法检测结果影响的比较

本研究将 483 例临床诊断患者的痰标本分成黏液痰、干酪痰和血痰三类。其中,黏液痰 286 例,干酪痰 186 例,血痰 11 例。LAMP 法对干酪痰的阳性检出率为 77.96% $(145/186)$,对黏液痰的阳性检出率为 38.46% $(110/286)$,差异具有统计学意义($\chi^2 = 70.78, P < 0.01$);同样笔者对传统方法检测不同性状痰标本的结果也进行了比较,对干酪痰的阳性检出率为 77.42% $(144/186)$,对黏液痰的阳性检出率为 42.66% $(122/286)$,差异具有统计学意义($\chi^2 = 53.05, P < 0.01$)。

另外,本研究还采用不同技术对同一性状痰标本的检测结果进行比较,结果无论是黏液痰还是干酪痰,LAMP 法和传统方法检测的结果(表 3)差异

表 1 不同方法对 503 例疑似结核病患者痰标本的检测结果(例)

检测方法	结核病(483 例)		NTM 肺病(1 例)		其他肺部疾病(19 例)	
	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
涂片	187	296	1	0	0	19
液体培养	234	249	1	0	0	19
固体培养	211	272	1	0	0	19
LAMP	259	224	0	1	0	19

表 2 483 例临床诊断为结核患者的痰标本采用 LAMP 法与传统方法检测结果的比较

LAMP 检测	传统方法检测			
	阳性例数	阳性率(%)	阴性例数	阴性率(%)
阳性	232	48.03	27	5.59
阴性	42	8.70	182	37.68

表 3 483 例临床诊断结核患者的不同性状痰标本进行 LAMP 法和传统方法检测结果的比较

样本性状	LAMP 法				传统方法			
	阳性例数	阳性率(%)	阴性例数	阴性率(%)	阳性例数	阳性率(%)	阴性例数	阴性率(%)
黏液痰(286 例)	110	38.46	176	61.54	122	42.66	164	57.34
干酪痰(186 例)	145	77.96	41	22.04	144	77.42	42	22.58
血痰(11 例)	4	36.36	7	63.64	8	72.73	3	27.27

均无统计学意义($\chi^2=3.27, P>0.05$ 和 $\chi^2=0.00, P>0.05$)。对于血痰标本, LAMP 法和传统方法检测的阳性检出率分别为 36.36% 和 72.73%, 但由于血痰只有 11 例, 例数较少, 故不做统计学分析。

讨 论

结核病是危害人类生命健康的主要疾病之一, 是当今世界单一致病菌引起死亡率最高的疾病, 占世界总死亡率的第七位^[6-8]。我国常规结核病实验室通常采用直接涂片镜检法、固体培养法及液体培养法结核分枝杆菌检测, 这些方法耗时久、操作复杂, 不能满足临床诊治的需要。随着结核病患者增多, 临床上迫切需要快速、低廉、高通量的筛选方法来提高结核患者的阳性检出率。

伴随着结核分枝杆菌基因组的阐明, 通过检测结核分枝杆菌核酸进行快速诊断的技术日益受到重视^[9-13], 各种相关检测技术也应运而生。LAMP 检测方法具有 PCR 技术的全部优点, 且使用高效的 DNA 聚合酶和 4 种引物, 识别靶基因的 6 个不同区域, 进一步缩短了检测时间, 增强了反应的特异度^[2]。

本研究共检测 503 份疑似结核病患者, 经初步筛选后, 对 483 例临床诊断为结核患者的数据进行统计学分析, 其中 LAMP 检测阳性为 259 例, 涂片检测阳性为 187 例, 液体及固体培养检测阳性分别为 234 和 211 例。在被剔除的 20 例标本中, 有 1 例最终确诊为非结核分枝杆菌感染(博奥基因芯片菌种鉴定为鸟分枝杆菌), 其检测结果为涂片和培养均为阳性, LAMP 阴性, 这也再次证明了 LAMP 技术对结核分枝杆菌复合群的检测具有很高的特异度。本研究对 LAMP 与传统方法检测结果进行分析, 其敏感度为 84.67%, 特异度为 87.08%, 阳性预测值为 89.58%, 阴性预测值为 81.25%, 一致性为 85.71%。这些数据显示, LAMP 方法不但具有较高的阳性检出率, 而且具有良好的敏感度、特异度和一致性。

另外, 本实验也分析了 LAMP 法检测与传统方法检测不一致的 69 例结果, 其中 LAMP 检测阳性而传统方法检测阴性为 27 例, LAMP 检测阴性同时传统方法检测阳性者 42 例。笔者简要分析了造成两类检测结果不一致的原因如下: (1) 传统检测方法阳性而 LAMP 阴性: LAMP 与传统方法检测的敏感度不同; 标本性状的影响, 如血性标本影响 LAMP 的检出; 操作者采样位置的影响, LAMP 只

取 60 μ l 的标本, 存在错过阳性部位的可能。(2) 传统检测方法阴性而 LAMP 阳性: 标本培养前需要前处理, 而前处理液在某种程度上会影响结核分枝杆菌的活性, 造成培养阳性率下降。受结核分枝杆菌状态影响: 培养法检出为活菌, 而 LAMP 检测的对象为结核分枝杆菌 DNA, 无论细菌是否存活皆能检出。

在本研究中还发现, 不同的样本性状对检测结果有较大的影响, LAMP 和传统方法检测对于酪痰的阳性检出率较高, 分别为 77.96% 和 77.42%, 高于黏液痰的 38.46% 和 42.66%, 且差异具有统计学意义($P<0.01$); 而在血痰中, LAMP 的阳性检出率仅为 36.36%, 而传统方法检测的阳性检出率为 72.73%, 虽然由于血痰例数太少, 不适合做统计学分析, 但是本研究仍然可以看出, LAMP 对于血痰的阳性检出率较低。这是 LAMP 检测方法的性质造成的, 由于 LAMP 检测的方法学基础是 PCR 反应, 而血液成分中血红蛋白、免疫球蛋白、乳铁蛋白等会抑制 PCR 反应^[14], 造成阳性检出率降低。因此, 进行与 PCR 原理相关的技术进行检测标本时, 要尽量避免采用血性标本, 这也提醒检验者要正确指导患者留痰以提高标本阳性检出率。

总之, LAMP 是一项操作简便并可在 1 h 内得到结果的结核分枝杆菌分子检测技术, 其在临床研究与传统方法检测相比展现了良好敏感度、特异度及一致性。LAMP 具有高通量检测优势且不需要复杂精密的仪器, 在现有的条件下就可以有效地提高结核分枝杆菌的检出率, 值得在常规结核病实验室推广应用。

参 考 文 献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2015. Geneva: World Health Organization, 2015.
- [2] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): E63.
- [3] Neonakis IK, Spandidos DA, Petinaki E. Use of loop-mediated isothermal amplification of DNA for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2011, 30(8): 937-942.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 肺结核诊断标准(WS 288-2008). 北京: 中华人民共和国卫生部, 2008.
- [5] 赵雁林, 欧喜超, 李强, 等. 结核病实验室诊断技术培训教程. 北京: 人民卫生出版社, 2014.
- [6] Yu CC, Chang CY, Liu CE, et al. Drug resistance pattern of *Mycobacterium tuberculosis*, complex at a medical center in central Taiwan, 2003—2007. *J Microbiol Immunol Infect*, 2010, 43(4): 285-290.
- [7] Gumbo T. New susceptibility breakpoints for first-line antituberculosis drugs based on antimicrobial pharmacokinetic/phar-

- macodynamic science and population pharmacokinetic variability. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010, 54(4):1484-1491.
- [8] Li GL, Zhao DF, Xie T, et al. Molecular characterization of drug-resistant Beijing Family isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Tianjin, China. *Biomed Environ Sci.* 2010, 23(3): 188-193.
- [9] Kaku T, Minamoto F, D'Meza R, et al. Assessment of accuracy of LAMP-TB method for diagnosing tuberculosis in Haiti. *Jpn J Infect Dis.* 2016. [Epub ahead of print]
- [10] Bojang AL, Mendy FS, Tientcheu LD, et al. Comparison of TB-LAMP, GeneXpert MTB/RIF and culture for diagnosis of pulmonary tuberculosis in the Gambia. *J Infect.* 2016, 72(3): 332-337.
- [11] Yoshida H, Onohara K, Tazawa T, et al. Study of direct TB-LAMP using non-centrifugal sputums about efficiency for rapid diagnosis of tuberculosis. *Kekkaku.* 2015, 90(5):497-502.
- [12] Ou X, Li Q, Xia H, et al. Diagnostic accuracy of the PURE-LAMP test for pulmonary tuberculosis at the county-level laboratory in China. *PLoS One.* 2014, 9(5):e94544.
- [13] 李金莉, 王峰, 彭毅, 等. 环介导等温扩增技术检测痰样结核分枝杆菌临床价值评价. *中国防痨杂志*, 2015, 37(2): 134-139.
- [14] 沈克锋, 杨默, 江千里. 血液和骨髓标本中常见 PCR 反应抑制物的探究与分析. *中国实验血液学杂志*, 2014, 22(3): 842-846.

(收稿日期:2016-06-28)

(本文编辑:范永德)

第三届耐药结核病防控与诊治新进展研讨会征文通知

由中国防痨协会临床专业分会、《中国防痨杂志》期刊社、中国医疗保健国际交流促进会结核病防治分会、同济大学附属上海市肺科医院联合主办,苏州市第五人民医院和江苏省疾病预防控制中心结核病防治研究所承办的“第三届耐药结核病防控与诊治新进展研讨会”拟于 2016 年 11 月 16 日—19 日(16 日为报到日,19 日为撤离日)在苏州召开。本届论坛将邀请国内外著名结核病专家进行专题学术讲座,并就耐药结核病的基础、诊断、治疗、预防等方面的最新研究成果及相关进展进行探讨。

1. 征文要求:(1)稿件要求未在国内公开发行人物上发表(请在文题上方注明未公开发表,未一稿多投);(2)论著类稿件为全文+800 字左右的摘要,摘要包括目的、方法和结论,也可仅提供符合上述要求的摘要;(3)其他类型稿件为全文投稿;(4)全文 4000 字以内,编排顺序为:题目、单位、邮编、姓名、中文摘要、正文、参考文献;(5)本次会议征文不接受通过邮局邮寄的纸质版论文,只接收 Word 版电子文件,格式要求为题目 3 号黑体、正文 5 号宋体,单倍行距;

(6)请务必附第一作者与通信作者的通信地址、联系电话、手机、Email。

2. 征文发送注意事项:(1)请通过 Email 发送至联系人邮箱,邮件注明“耐药结核病会议征文”;(2)截止日期:2016 年 10 月 25 日。

3. 联系人:李敬文,手机:13691010045;电话(传真):010-62257257;Email:lijwflzz@163.com。

入选论文将纳入会议《论文汇编》,优秀论文将由大会学术委员会推荐刊登于《中国防痨杂志》或《结核病与肺部健康杂志》。参加会议者均可获得国家继续医学教育学分证书。欢迎结核病及相关专业的临床医师及广大学者积极撰写会议征文并参加本次论坛。

中国防痨协会临床专业分会

《中国防痨杂志》期刊社

中国医疗保健国际交流促进会结核病防治分会

同济大学附属上海市肺科医院

2016 年 10 月