

LAMP 法在临床诊断的肺结核患者 BALF 标本中的应用评价*

王 鸿,刘权贤,陈 玲[△],李瑜琴,袁 阳,张建勇
(遵义医学院附属医院呼吸二科,贵州遵义 563000)

摘要:目的 评价环介导等温扩增法(LAMP)在临床诊断的肺结核与非肺结核两组患者中支气管肺泡灌洗液(BALF)结核分枝杆菌的检测效果。方法 收集 2017 年 6 月至 2018 年 2 月于遵义医学院附属医院住院的患者 130 例,其中临床诊断肺结核 51 例,非肺结核 79 例,分别行支气管肺泡灌洗(BAL)进一步寻找病原体。所有标本均送支气管刷检物行涂片抗酸染色,支气管肺泡灌洗液分别行结核分枝杆菌罗氏培养及 LAMP 检测,并进行统计学分析。分别计算 LAMP 法及培养法的阳性率及阳性检出率。结果 51 例临床诊断肺结核患者中,抗酸染色阳性 3 例,阳性率为 5.9%(3/51),18 例 BALF 培养阳性,阳性率为 35.3%(18/51),28 例 LAMP 阳性,阳性率为 54.9%(28/51)。非肺结核组 79 例标本中,支气管刷检物行涂片抗酸染色及肺泡灌洗液培养均阴性,LAMP 法阳性 2 例(1 例临床诊断为肺癌,1 例临床诊断为肺炎)。结论 在 BALF 标本中,TB-LAMP 法具有较高的灵敏度及特异度,对结核分枝杆菌的阳性率及阳性检出率高于罗氏固体培养,并明显高于抗酸染色法,且 LAMP 法具有快速、简便、准确的特点,可替代抗酸染色法用于临床上早期发现结核病患者。

关键词:环介导等温扩增技术; 肺结核; 支气管肺泡灌洗液; 抗酸染色; 细菌培养

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.07.004

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2019)07-0783-04

文献标识码:A

**Evaluation of LAMP method in detecting BALF specimens from patients
clinically diagnosed with pulmonary tuberculosis***

WANG Hong, LIU Quanxian, CHEN Ling[△], LI Yuqin, YUAN Yang, ZHANG Jianyong
(Department of Respiratory Medicine, Affiliated Hospital of Zunyi Medical
College, Zunyi, Guizhou 563000, China)

Abstract: Objective To evaluate loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method on detecting bronchoalveolar lavage fluid specimens from patients with clinically diagnosed tuberculosis. **Methods** Totally 130 bronchial brushing samples and bronchoalveolar lavage fluid specimens from 51 patients with clinically diagnosed tuberculosis and 79 patients with clinically diagnosed non-tuberculosis were collected from the hospital during June 2017 to February 2018. Each bronchial brushing sample was detected by using smear microscopy, and each BALF specimen was detected by using Roche solid culture (L-J) and TB-LAMP simultaneously. The positive and negative rates of smear, L-J culture, and LAMP were calculated and statistically analyzed. **Results** In 51 specimens from patients with clinically diagnosed pulmonary tuberculosis, 3, 18, and 28 specimens were positive for acid-fast staining test, L-J culture, and LAMP, and their positive rates were 5.9%(3/51), 35.3%(18/51), and 54.9%(28/51), respectively. In 79 specimens from patients with clinically diagnosed non-pulmonary tuberculosis, there were no positive samples were detected with acid-fast staining and culture methods, but there were 2 positive samples were detected with LAMP, in which one was from patient with clinically diagnosed as lung cancer, and the other was as pneumonia. **Conclusion** The LAMP method has higher sensitivity and specificity for detecting Mtb than the methods of smear microscopy and L-J culture for the BALF specimens, it is rapid, simple and accurate method for the detection of Mtb, hence, the LAMP can be used as a method to bacteriological diagnose of tuberculosis.

Key words: loop-mediated isothermal amplification; pulmonary tuberculosis; bronchoalveolar lavage fluid; acid-fast staining; bacterial culture

结核病是结核分枝杆菌感染引起的慢性传染病, 也是由单一病菌引起人类死亡人数最多的传染病。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81760003)。

作者简介:王鸿,女,在读硕士,主要从事肺部感染和肺结核基础与临床的相关研究。△ 通信作者,E-mail:lingjuncd@163.com。

本文引用格式:王鸿,刘权贤,陈玲,等.LAMP 法在临床诊断的肺结核患者 BALF 标本中的应用评价[J]. 国际检验医学杂志,2019,40(7):783-786.

我国是全球结核病高负担国家之一,据 2017 年世界卫生组织(WHO)估算,2016 年全球约有 1 040.0 万新发结核病病例,我国新发病例约 91.8 万,居世界第 3 位^[1]。目前,对于结核病的病原学检测依赖于传统的涂片抗酸染色法与培养法,然而结核病病原学传统检测方法已经不能满足临床早期诊断的需求。早期发现结核病患者并进行有效治疗是有效减少传染源、控制结核病传播的关键^[2],因此,迫切需要一种快速而有效的结核分枝杆菌检测技术,以提高结核病的早期诊断能力。

环介导等温扩增技术(LAMP)是由 Notomi 及其同事开发的一种新的核酸检测扩增技术,它使用一种 DNA 聚合酶和一套 4 种专门设计的引物,可以识别目标 DNA 上的 6 个不同序列,在等温条件下高效扩增 DNA,所产生的大量 DNA 和反应的高度特异性使得可以通过目视检查荧光或浊度来检测扩增,而不需要凝胶电泳或仪器检测标记的探针,使用封闭管系统,最大限度地减少了工作区被污染的风险。LAMP 检测与培养比有很大的速度优势,也具有极好的灵敏度与特异度,且与其他核酸扩增实验相比,它不需要专门的核酸扩增设备,不需要高度的技术支持,大大降低了成本,使 LAMP 在肺结核发病率高的发展中国家成为了结核分子检测有效工具^[2-5]。LAMP 法主要用于痰液检查,在检测痰液、脑脊液、尿液及胸腔积液中的结核分枝杆菌已有报道^[6-10],但用于支气管肺泡灌洗液(BALF)诊断肺结核的价值目前尚未见报道。

支气管肺泡灌洗(BAL)是一种能获得更直接、更多痰液的有效方法,通过支气管镜从病变相应的叶或段开口进行灌洗,因机械性的刺激,使得痰液增多,有利于结核分枝杆菌的检出。在无痰、涂阴或者标本获取困难时,可通过支气管镜检查获得肺泡灌洗液,提高肺结核的确诊率,有助于肺结核的早期诊断及治疗^[11-12]。本研究对肺部疾病患者支气管刷检物进行涂片抗酸染色检测,肺泡灌洗液进行 LAMP 及结核分枝杆菌培养检测,通过 3 种检测方法进行比较,了解肺泡灌洗液标本 LAMP 法检测结核分枝杆菌的阳性率及阳性检出率,评价 LAMP 检测技术在肺泡灌洗液中筛查结核分枝杆菌的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2017 年 6 月至 2018 年 2 月 130 例因呼吸道症状及肺部病变于遵义医学院附属医院住院的患者的信息,评估患者行支气管镜检查的可行性,与患者及家属进行沟通,并取得同意后行支气管镜检查,获得其病变部位支气管刷检物,然后对其同一病变局部进行 BAL,获得肺泡灌洗液标本 130 例。男性 76 例,女性 54 例,年龄 13~76 岁。130 例患者分为两组,肺结核组 51 例,非肺结核组 79 例。肺结核组诊断标准参照《肺结核诊断标准(WS288—2008)》。非肺结核病例中,临床诊断肺癌 14 例,肺脓肿 4 例,慢性支气管炎 5 例,慢性阻塞性肺疾病 6 例,

肺炎 24 例,支气管扩张并感染 6 例,肺中叶综合征 3 例,肺部炎性假瘤 2 例,尘肺 4 例,右肺上叶奇叶 1 例,肺部陈旧性病变 10 例。

1.2 仪器与试剂

Loopamp 恒温荧光核酸扩增仪(日本荣研株式会社,型号 LF-160)。Loopamp 核酸快速提取试剂盒(日本荣研株式会社,货号 VMP802)、Loopamp 结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂盒(日本荣研株式会社,货号 VMP521),生物安全柜(济南鑫贝西生物技术有限公司),离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司,型号 L530)。

1.3 方法

1.3.1 LAMP 法(根据试剂盒说明书进行操作)

(1)样本溶液采集。①在生物安全柜中取 10 mL BALF 标本离心 15 min(4 100 r/min),静置约 10 min 后弃上清;②取 60 μ L 沉淀物加入样本处理试管,颠倒混合 3~5 次后,将内容液甩至底部;③将样本处理试管放到 90 $^{\circ}$ C 加热器上,加热 5 min 后,在室温下放置 2 min 后,颠倒混合 3~5 次;④取下吸附剂试管的盖子,将样本处理试管拧入吸附剂试管后立即进行激烈振荡,待内容物充分混合后,将吸附剂试管水平横放;⑤在滴注盖嘴上安装步骤④中取下的吸附剂试管的盖子,将吸附剂试管安装滴注盖的部分(滴下侧)朝上,吸附剂试管(滴下侧)的对准线与滴注盖的对准线对准,先推入后旋紧至双方的对准线再次几乎并为一-条线为止;⑥将吸附剂试管中的内容物完全甩落到在步骤⑤中安装了盖子的滴注盖侧;⑦将安装在滴注盖上的盖子取下,挤压吸附剂试管的可挤压部分,形成样本溶液。(2)试剂与样本溶液的混合。①将 30 μ L 样本溶液添加至反应试管(结核分枝杆菌复合群检查用干燥试剂)中,盖上反应试管盖子并做好标记(30 μ L 大致标准为到达反应试管的 2 根刻度线的中间);②阴性对照结核分枝杆菌离心后用吸管取 40~60 μ L,按照操作说明使用核酸快速提取试剂盒提取出的溶液作为阴性对照溶液,在阴性对照反应中,代替样本溶液添加 30 μ L 阴性对照溶液至反应试管后盖上盖子,做好标记,作为阴性对照;③将阳性对照结核分枝杆菌离心后,使用附带的阳性对照用滴管添加 30 μ L 阳性对照结核分枝杆菌至反应试管后盖上盖子,做好标记,作为阴性对照;④将反应试管颠倒,使溶液移向盖子,保持颠倒状态放置 2 min 后,将反应试管反复颠倒混合 5 次,确保盖子上的干燥试剂已被充分溶解后,用力将管内溶液甩到反应试管底部。(3)扩增反应。①确认恒温荧光核酸扩增仪温度已达到 67 $^{\circ}$ C;②将反应试管放入恒温荧光核酸扩增仪中,按下右侧绿色按钮,开始进行扩增反应,反应时间 40 min。(4)荧光目视判定确认扩增反应结束后,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,对所检测样本进行判定,发出绿色荧光者为阳性,未发出荧光者为阴性。

1.3.2 罗氏固体培养法(L-J 培养)

(1)在生物安

全柜中取 BALF 标本 10 mL 溶于 10~20 mL 4% NaOH 中(根据标本性状,加入的 4% NaOH 体积为 BALF 的 1~2 倍),间隙振动摇匀,消化 15 min,使标本充分液化;(2)用一次性无菌吸管取标本沉淀 2~3 滴,均匀接种于酸性培养基斜面的上、中、下部,盖上盖子(避免完全拧紧),将接种标本的培养基管斜放入 35~37 °C 恒温培养箱中;(3)接种结核分枝杆菌标准菌株(H37Rv)10⁻³ mg/mL 菌悬液,作为阳性对照,4 周内菌落生长为合格;(4)分别于接种后第 3、7 天观察 1 次,以后每周观察 1 次,并记录观察结果,直至第 8 周末。酸性培养基斜面上见菌落生长后再进行抗酸染色复检,抗酸染色阳性后再进行菌型鉴定,采用对硝基苯甲酸(PNB)鉴定菌落为结核分枝杆菌复合群(MTBC)还是非结核分枝杆菌(NTM)^[13-15]。

1.3.3 涂片抗酸染色法 (1)取支气管刷检标本进行涂片,待其自然干燥;(2)染色:玻片经火焰固定,加苯酚复红染液盖满玻片,染色 5 min;(3)脱色:用流水自玻片一端冲洗染液,沥去玻片上的水,滴加脱色液,保持 1 min;(4)复染:滴加亚甲蓝溶液,染色 30 s,水洗干燥后镜检。结果判定按照中国防痨协会制订的结核病实验室检验规程进行^[13-15]。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行统计学

分析,以 L-J 培养结果为标准,计算 LAMP 检测的阳性率及阳性检出率。配对设计资料的 χ^2 检验比较 LAMP 与抗酸杆菌涂片及结核分枝杆菌培养在检出率上是否存在差异,当 $P < 0.05$ 时,差异具有统计学意义。

2 结 果

涂片法、LAMP 法及 L-J 培养法在结核组及非结核组中支气管刷检物及 BALF 结核分枝杆菌检出情况如下。51 例临床诊断肺结核患者中,抗酸染色阳性 3 例,阳性率为 5.9%(3/51),18 例 BALF 培养阳性,阳性率为 35.3%(18/51),28 例 LAMP 阳性,阳性率为 54.9%(28/51)。非肺结核组 79 例标本中,支气管刷检物行涂片抗酸染色及肺泡灌洗液培养均阴性,LAMP 法阳性 2 例,其中 1 例临床诊断为肺癌,另 1 例临床诊断为肺炎。在结核组中,LAMP 法与涂片法的结核分枝杆菌阳性率比较,两者差异具有统计学意义($\chi^2 = 23.04, P < 0.05$),LAMP 法对结核分枝杆菌的阳性率明显高于涂片法。LAMP 法与 L-J 培养在 BALF 中结核分枝杆菌阳性率比较,两者差异具有统计学意义($\chi^2 = 5.0625, P < 0.05$),LAMP 法对结核分枝杆菌的阳性率高于 L-J 培养。见表 1、2。

表 1 3 种方法在肺结核组及非肺结核组中检出结果的比较 [% (n/n)]

涂片法	肺结核组 (n=51)				非肺结核组 (n=79)			
	LAMP		L-J 培养		LAMP		L-J 培养	
	阳性率	阴性率	阳性率	阴性率	阳性率	阴性率	阳性率	阴性率
阳性率	5.9(3/51)	0(0/51)	5.9(3/51)	0(0/51)	0(0/79)	0(0/79)	0(0/79)	0(0/79)
阴性率	49.0(25/51)	45.1(23/51)	29.4(15/51)	64.7(33/51)	2.5(2/79)	97.5(77/79)	0(0/79)	100(79/79)

表 2 51 例临床诊断肺结核者 LAMP 法与 L-J 培养结核分枝杆菌阳性率比较

LAMP 法	L-J 培养 (n)		合计 [(%)n/n]
	阳性	阴性	
阳性	15	13	54.9(28/51)
阴性	3	20	45.1(23/51)
合计	18	33	100(51/51)

3 讨 论

LAMP 法使用 DNA 聚合酶和一套 4 个特别设计的引物,可以识别目标 DNA 上总共 6 个不同的序列,达到高选择性扩增目标序列的目的。LAMP 引物包括一对内引物(FIP、BIP)和一对外引物(F3、B3)。含有靶 DNA 正义链和反义链序列的内引物(FIP)启动 LAMP。由外引物(F3)引发的链置换 DNA 合成释放单链 DNA,单链 DNA 自身形成环状结构;第二个内引物(BIP)和外引物(B3)与靶 DNA 的另一端结合形成哑铃状结构,哑铃结构是 LAMP 循环的起始结构。它以自身为模板进行 DNA 合成,最后形成茎环 DNA

结构。在随后的循环中,一个内引物与茎环 DNA 结合,通过链置换形成原始茎环 DNA 和两倍长度的新茎环 DNA。在低于 1 h 的时间内,循环反应可累积达到 10⁹ 个拷贝目标,最终形成一系列长短不一的含茎环结构的 DNA 产物^[3,16]。

本研究共采集了 130 例支气管刷检物及肺泡灌洗液标本,其中临床诊断肺结核 51 例,非肺结核 79 例,分别用 LAMP、抗酸染色及 L-J 培养法进行检测。研究显示,51 例临床诊断的肺结核患者支气管刷检物及肺泡灌洗液标本中,3 例涂片阳性标本中 LAMP 均阳性;48 例涂片阴性标本中,25 例 LAMP 检测阳性,阳性率 52.1%(25/48)。51 例培养中,18 例培养阳性的标本中 3 例 LAMP 为阴性,LAMP 的检出率 83.3%(15/18),但 33 例培养阴性的标本中 13 例 LAMP 检出阳性,LAMP 在培养阴性的标本中阳性检出率达 39.1%(13/33)。

由此可见,在临床诊断的肺结核中,涂片法检出率为 5.9%(3/51),培养法检出率为 35.3%(18/51),LAMP 法检出率为 54.9%(28/51),LAMP 法明显高于抗酸染色涂片法和 L-J 培养法。与 BAL 采样相比,

支气管刷检采样的操作可控性较好,可在直视下确定取材部位,在此条件下,支气管刷检物行抗酸染色检测理应比 BALF 阳性率更高,但本研究中刷检物涂片行抗酸染色阳性检出率却低于 BALF 样本,说明 LAMP 检测病原菌的优势,提示 LAMP 法是一种快速、高效率、有价值的诊断技术,利于肺结核的早期发现、早期诊断。

有研究报道,以结核菌培养为标准,Xpert MTB/RIF 方法在 BALF 中检测的灵敏度为 80%^[17],与本研究 LAMP 法的检测灵敏度(83.3%)一致。但 TB-LAMP 检测成本较低,不需要昂贵的仪器,更适用于结核病高负担国家与地区。

本研究的 51 例肺结核患者 BALF 标本中,LAMP 与 L-J 培养结果并非完全一致,其中 LAMP 阳性而 L-J 培养阴性者 13 例,可能原因分析如下:(1) L-J 培养法在接种前需将 BALF 标本溶于 4% NaOH 中消化,若 4% NaOH 使用过多或者消化时间过长,可能会影响结核分枝杆菌活性,或者导致结核分枝杆菌死亡;(2) LAMP 法测定结核分枝杆菌的 DNA,无论是死菌或活菌,均可被检出,而培养法所检测出的是活的结核分枝杆菌^[18-19];(3) LAMP 法标本经过离心浓缩后进行检测,培养法标本未经过离心,导致载菌量不同,可能影响结果;(4) 尽管 LAMP 检测技术产生标本交叉污染的可能性低,但不能完全除外肺泡灌洗液标本污染可能,如内镜消毒不严、标本运送环节造成污染等。L-J 培养阳性而 LAMP 阴性者 3 例,可能原因分析如下:(1) 肺泡灌洗液中含有血性物质,可能会影响 LAMP 结果;(2) LAMP 的取样量小,为 60 μ L,操作者采样的量及部位均可影响检测结果^[18-19]。

针对 LAMP 法与 L-J 培养检测结果不一致,尚不能除外 LAMP 法检测结核分枝杆菌存在假阳性及假阴性可能,有待今后进一步行结核分枝杆菌基因测序进行鉴定。

另外,在 79 例临床诊断非肺结核组的 BALF 标本中,2 例 LAMP 阳性,其中 1 例病理诊断为肺癌,另 1 例临床诊断为肺炎,该 2 例患者是否同时合并肺结核尚需进一步追踪随访以明确或排除。

4 结 论

LAMP 法诊断肺结核具有快速、简便的特点,但在检测临床 BALF 标本中的应用目前尚未见报道,本研究表明 LAMP 在临床诊断的肺结核患者 BALF 标本中结核分枝杆菌阳性检出率明显高于普通培养与涂片法,值得临床推广。

参考文献

[1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2017[R]. Geneva:WHO,2017.
[2] YAN L, XIAO H, ZHANG Q. Systematic review: Comparison of Xpert MTB/RIF, LAMP and SAT methods for

the diagnosis of pulmonary tuberculosis[J]. Tuberculosis, 2016, 96(1):75-86.

- [3] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H A, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12):E63.
[4] BOEHME C C, NABETA P, HENOSTROZA G, et al. Operational feasibility of using loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of pulmonary tuberculosis in microscopy centers of developing countries[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(6):1936-1940.
[5] PANDEY B D, POUDEL A, YODA T, et al. Development of an in-house loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of Mycobacterium tuberculosis and evaluation in sputum samples of Nepalese patients [J]. J Med Microbiol, 2008, 57(Pt 4):439-443.
[6] 孙雯雯,肖和平. 环介导等温扩增技术早期诊断结核性脑膜炎的研究[J]. 中国防痨杂志, 2016, 38(12):1102-1108.
[7] 周福荣,孙建鹰,马文芳. 泌尿系统结核快速诊断方法的探讨[J]. 北方药学, 2011, 8(10):22-23.
[8] 张世慧. 泌尿系统结核实验室诊断方法在尿路感染中的应用探讨[J]. 内蒙古中医药, 2012, 31(12):106-107.
[9] 刘云,徐晶,谢燊,等. 环介导等温扩增技术对结核性胸腔积液的诊断价值[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(16):2735-2737.
[10] 刘洋,郭艳玲,姜广路,等. 环介导等温扩增技术在结核性胸膜炎快速诊断中的应用[J]. 临床肺科杂志, 2015(4):583-585.
[11] 唐神结,高文,陈昶,等. 临床结核病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2011.
[12] 彭文锋,陈玲. 支气管肺泡灌洗液检测在肺结核研究及临床应用中的进展[J]. 贵州医药, 2016, 40(1):100-102.
[13] 中华医学会. 临床技术操作规范[M]. 北京:人民军医出版社,2004.
[14] 赵雁林,逢宇. 结核病实验室检验规程[M]. 北京:人民卫生出版社,2015.
[15] 赵雁林,王黎霞,成诗明,等. 分枝杆菌分离培养标准化操作程序及质量保证手册[M]. 北京:人民卫生出版社,2012.
[16] 刘彬彬,沐晓芹,朱慧芬,等. 环介导等温核酸扩增法在基因检测中的应用[J]. 国际遗传学杂志, 2017, 40(5):307.
[17] ULLAH I, JAVAID A, MASUD H, et al. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampicin resistance in extrapulmonary tuberculosis and sputum smear-negative pulmonary suspects using Xpert MTB/RIF[J]. J Med Microbiol, 2017, 66(4):412-418.
[18] 丁卫忠,陈巍,石莲,等. 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[J]. 中国防痨杂志, 2016, 38(10):818-822.
[19] 刘权贤,向敏,陈玲,等. LAMP 法在肺结核患者痰标本中的应用评价[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(7):792-794.

(收稿日期:2018-09-16 修回日期:2018-12-16)