

# 多重核酸检测技术和传统检测方法 对胃肠道感染性病原体检测的比较\*

伊洁<sup>a</sup>, 解宏杰<sup>a</sup>, 刘文静<sup>a</sup>, 赵玉沛<sup>b</sup>, 徐英春<sup>a</sup>

(中国医学科学院北京协和医院 a. 检验科; b. 基本外科, 北京 100730)

**摘要:**目的 比较一种商品化的多重核酸检测试剂盒和传统检测方法对胃肠道感染性病原体检测的性能。方法 收集135例有胃肠道感染症状患者的135份粪便标本,分别用多重核酸检测技术和传统检测方法进行检测。结果 多重核酸检测技术和传统检测方法检出至少一种病原体的检出率分别是81.5%和33.3%,其中多重核酸检测技术可检出12种病原体,传统检测方法可检出5种病原体;传统方法检测的阴性标本中,用多重核酸检测技术可以检出48.1%的阳性标本;多重核酸检测技术和传统检测方法分别检出31.1%和0的混合感染标本;多重核酸检测技术检测的结果中,门诊、住院和急诊患者标本中病毒的阳性检出率均是最高,分别是15.6%,31.1%和3.7%。传统检测方法和多重核酸检测技术方法对住院的标本中病原体的检出率均高于急诊和门诊患者。采用配对资料 $\chi^2$ 检验进行统计学分析,两种方法的阳性检出率,混合感染标本的阳性检出率及不同环境中阳性标本检出率,差异均具有统计学意义( $\chi^2=45.57\sim58.887$ ,  $P<0.01$ )。结论 多重核酸检测技术相对于传统检测方法阳性检出率更高,为临床上诊断胃肠道感染提供一种可能有效的检测方法。

**关键词:**胃肠道感染性疾病;多重核酸检测技术;传统检测技术

中图分类号:Q503;R378 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2017)05-118-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.05.032

## Comparison of Pathogens in Infectious Gastroenteritis Cases Using Multiplex Nucleic Acid Amplification Testing and Conventional Laboratory Diagnostic Tools

YI Jie<sup>a</sup>, XIE Hong-jie<sup>a</sup>, LIU Wen-jing<sup>a</sup>, ZHAO Yu-pei<sup>b</sup>, XU Ying-chun<sup>a</sup>

(a. Department of Clinical Laboratory; b. Department of General Surgery, Peking

Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China)

**Abstract:** Objective To compare the performance of a commercial multiplex nucleic acid amplification test (MultiplexNAT) and the conventional microbiological testing for etiologic pathogens of gastroenteritis. **Methods** 135 stool specimens from 135 patients showing gastroenteritis symptoms were collected and detected by both the MultiplexNAT and the conventional testing. **Results** The detection rates of at least one potential etiologic agent was 81.5% and 33.3% by the MultiplexNAT and conventional testing, respectively. 12 pathogens could be detected by the MultiplexNAT while 5 pathogens could be detected by the conventional testing. Of the negative samples from conventional testing, 48.1% were positive with the MultiplexNAT. Furthermore, 31.1% and none of the stool specimens showed coinfection by MultiplexNAT and conventional testing, respectively. Using MultiplexNAT, the positive detection rates of viruses were highest in the outpatient settings, emergency and inpatient settings, which were 15.6%, 31.1% and 3.7% respectively. The overall proportion of pathogen-positive samples was higher for outpatient settings than for emergency and inpatient settings using both conventional testing and the MultiplexNAT.  $\chi^2$  test for paired data for statistical analysis; positive detection rates, coinfection positive detection rates and three settings positive detection rates using two methods was statistically significant respectively ( $\chi^2=45.57\sim58.887$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion** The MultiplexNAT significantly has more positive detection rates compared to the conventional testing, and could be a possible method in the diagnosis of infectious gastroenteritis diseases.

**Keywords:** infectious gastroenteritis diseases; multiplex nucleic acid amplification testing; conventional testing

胃肠道感染性疾病是发达国家和发展中国家人群发病和死亡的一个重要原因,尤其在5岁以下儿童中发生比例较高<sup>[1,2]</sup>。在中国,每年约有7000万人罹患胃肠道感染性疾病,发生率为55.9/10万

人,排在38种感染性疾病的前三位<sup>[3]</sup>。胃肠道感染性疾病的病原体可以是细菌、病毒或者寄生虫,地域不同病原体流行谱也不同,国内已有的研究仅是针对有限的病原体,没有将细菌、病毒和寄生虫

\* 基金项目:卫生部公益性行业科研专项(项目编号:201402001)。

作者简介:伊洁(1983-),女,博士,助理研究员,主要从事病原微生物和肿瘤分子检测, E-mail: yijie0908@126.com。

通讯作者:徐英春(1964-),男,本科,研究员,博士生导师,主要从事临床微生物研究, E-mail: xycpumch@139.com。

三种病原体都覆盖<sup>[4,5]</sup>。

传统检测胃肠道感染性病原体的检测方法包括细菌培养、酶联免疫法、显微镜镜检等。近年来分子检测技术逐渐被发展并广泛运用于临床,大多数的分子检测是进行单重 PCR 或者 real-time PCR,但是胃肠道感染病原体复杂多样,需要可以同时检测多种病原体的快速分子检测方法<sup>[6,7]</sup>。本研究利用一种可以同时检测 15 种病原体的商品化多重核酸检测技术,与传统检测方法比较,分析两种检测方法对胃肠道感染性疾病检测的性能。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 收集北京协和医院检验科 2014 年 9~12 月检测的 135 例有胃肠道感染性疾病症状(包括发热、呕吐、腹痛和腹泻)患者的粪便标本 135 份,其中 57.0%(77/135)来自住院患者标本,门诊和急诊患者的标本分别占 35.6%(48/135)和 7.4%(10/135)。以<18 岁为儿童组,19~50 岁为青年组,>50 岁为中老年组,三组患者年龄段分布比例为 16.3%(22/135) vs 69.6%(94/135) vs 14.1%(19/135)。所有粪便标本收集于无菌便盒并立即送往微生物实验室进行常规病原学检测,检测剩余标本冻存于-80℃统一应用多重核酸检测技术进行检测。

## 1.2 试剂与仪器

1.2.1 传统检测方法:粪便标本接种于木糖赖氨酸脱氧胆酸(xylose lysine desoxycholate, XLD)和中国蓝培养基(Oxoid, 英国),37℃培养 40~48 h 分类沙门氏菌和志贺氏菌,所有可疑菌落应用 VITEK 2 Compact 细菌鉴定系统(Biomérieux, 法国)和血清学检测进行鉴定;难辨梭菌毒素 A/B (Clostridium difficile toxins A and B, CDAB)采用 VIDAS® C. difficile toxin A and B 检测试剂盒(Biomérieux, 法国)进行检测;轮状病毒和腺病毒采用 Standard Diagnostics 公司的抗原免疫层析检测试剂盒(Standard Diagnostics Inc, 韩国)进行检测。

1.2.2 多重核酸检测技术:每份粪便标本吸取 200 μl 或 200 μg 至无 RNA 酶的 Eppendorf 管中,加入大肠埃希菌噬菌体 MS2 20 μl 作为内参照,按照 RNA 和 DNA 提取试剂盒操作说明进行核酸提取。多重核酸检测技术(Luminex Molecular Diagnostics Inc, 加拿大)按照试剂盒说明书进行操作。可检出 15 种病原体:沙门氏菌属、志贺氏菌属、产志贺毒素大肠埃希氏菌(Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, STEC)毒素 stx1/stx2、霍乱弧菌、小肠结肠炎耶尔森菌、CDAB、空肠弯曲菌属、大肠埃希氏菌 O157、产肠毒素大肠杆菌(*Esche-*

*richia coli*, ETEC)毒素 LT/ST、腺病毒 40/41、轮状病毒 A 组、诺如病毒 GI/GII、蓝氏贾第鞭毛虫、隐孢子虫和溶组织内阿米巴。

1.3 方法 使用传统检测方法和多重核酸检测技术分别对 135 份粪便进行 5 种病原体和 15 种病原体检测,比较两种方法的检出率;比较急诊、门诊和住院病人中使用两种方法对粪便中病原体的检出率,及用多重核酸检测技术对细菌、病毒和寄生虫的检出率。所有实验均严格按照仪器厂家和试剂说明书进行操作。

1.4 统计学分析 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。不同检测方法的差异性检验和不同来源的标本的差异性检验选用配对设计资料的  $\chi^2$  检验进行分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 多重核酸检测技术结果 见表 1。

表 1 多重核酸检测技术和传统检测方法病原体检出阳性结果分布[n(%)]

病原体	多重核酸检测技术 (n=110)	传统检测方法 (n=45)	P 值
诺如病毒 GI/GII	42(27.1)	- <sup>a</sup>	-
轮状病毒 A 组	24(15.5)	10(6.5)	0.08
腺病毒 40/41	23(14.8)	15(9.7)	0.39
隐孢子虫	21(13.5)	-	-
沙门氏菌属	19(12.3)	5(3.2)	0.03
CDAB	15(9.7)	8(5.2)	0.28
空肠弯曲菌属	4(2.6)	2(1.3)	0.62
蓝氏贾第鞭毛虫	2(1.3)	0(0.0)	1.00
ETEC 毒素 LT/ST	2(1.3)	-	-
STEC 毒素 stx1/stx2	1(0.6)	-	-
大肠埃希氏菌 O157	1(0.6)	-	-
志贺氏菌属	1(0.6)	1(0.6)	1.00
霍乱弧菌	0(0)	-	-
小肠结肠炎耶尔森菌	0(0)	-	-
溶组织内阿米巴	0(0)	-	-

注:<sup>a</sup>未检测。

135 份标本中有 110 份标本检测出至少一种病原体,阳性率为 81.5%(110/135),共检出病原体 155 个,分别是诺如病毒 GI/GII、轮状病毒 A 组、腺病毒、难辨梭菌毒素 A/B、空肠弯曲菌属、沙门氏菌、ETEC 毒素 LT/ST、STEC 毒素 stx1/stx2、志贺氏菌、大肠埃希氏菌 O157、蓝氏贾第鞭毛虫和隐孢子虫标本 12 种病原体,其中检出率最高的三种病毒:诺如病毒 GI/GII(27.1%),轮状病毒 A 组(15.5%),腺病毒(14.8%)。未检出小肠结肠炎耶尔森菌、霍乱弧菌和溶组织内阿米巴。110 份阳性标本中单一感染占 61.8%(68/110),混合感染占 38.2%(42/110),其中包括两种病毒的

混合感染[5.5%(6/110)],病毒和细菌的混合感染[19.1%(21/110)],细菌和寄生虫的混合感染[0.9%(1/110)]及病毒和寄生虫的混合感染[10.9%(12/110)]。

2.2 传统检测方法检测结果 见表1。135份标本中有45份标本检测出至少一种病原体,阳性率为33.3%(45/135),包括轮状病毒(6.5%),腺病毒(9.7%),CDAB(5.2%),沙门氏菌(3.2%)和志贺氏菌(0.6%),未检测出混合感染。

2.3 三种来源标本检测结果 见表2。多重核酸检测技术检测的结果中,门诊、住院和急诊患者标本中病毒的检出率均是最高,细菌和寄生虫的检出率在门诊和住院患者标本中高于寄生虫,而寄生虫的检出率在急诊患者标本中高于细菌。利用传统检测方法,门诊、住院和急诊患者的标本阳性检出率分别是11.1%(15/135),18.5%(25/135)和3.7%(5/135);利用多重核酸检测技术,门诊、住院和急诊患者的标本阳性检出率分别是25.9%(35/135),48.2%(65/135)和7.4%(10/135)。总体而言,传统检测方法检测结果与多重核酸检测技术结果相似,住院患者标本的阳性检出率高于门诊和急诊患者,差异具有统计学意义( $\chi^2=45.570, P<0.01$ ;  $\chi^2=58.887, P<0.01$ )。

表2 多重核酸检测技术在三种环境中的检出分布[n(%)]

病原体	门诊	住院	急诊
病毒	21(15.6)	42(31.1)	5(3.7)
细菌	8(5.9)	16(11.9)	2(1.5)
寄生虫	6(4.4)	7(5.2)	3(2.2)
合计	35(25.9)	65(48.2)	10(7.4)

3 讨论 引起胃肠道感染性疾病的原因较为复杂,而且不同病原体引起的症状不典型,因此很难根据临床症状进行诊断,需要有一种覆盖大多数病原体的有效检测方法。与传统检测方法相比,多重核酸检测技术具有明显的优势。首先,多重核酸检测技术对胃肠道病原体的检出率为81.5%,明显高于传统检测方法(33.3%)的检出率,差异具有统计学意义( $\chi^2=49.125, P<0.01$ )。已有的一些研究结果也表明传统检测方法的检出率为20.4%~63.5%<sup>[8~10]</sup>,较多重核酸检测技术的检出率低;其次,应用多重核酸检测技术后病原体检出率较传统检测方法检出率提高,轮状病毒阳性检出率增高9.0%,腺病毒阳性检出率增高5.1%,沙门氏菌阳性检出率增高9.1%,难辨梭菌毒素A/B阳性检出率增高4.5%和空肠弯曲菌阳性检出率增高1.3%,混合感染的阳性检出率增高31.1%,差异

具有统计学意义( $\chi^2=46.914, P<0.01$ )。有研究表明免疫力低下患者发生混合感染会增加大便次数从而加重病情<sup>[9]</sup>,本研究的入组患者中57.0%来自住院患者,由于他们的免疫力较低,易引起胃肠道感染性疾病,而且对于免疫力低下的患者,混合感染的检测尤为重要。

轮状病毒是急性非细菌感染性胃肠道感染最主要的病原体,而诺如病毒GII是引起大多数胃肠道感染和暴发的最主要病原体<sup>[11,12]</sup>。已有的研究表明轮状病毒A组是儿童胃肠道感染的主要病因,但是本研究中,利用多重核酸检测技术检出的病原体中,诺如病毒GI/GII是检出率最高的病原体,而且是混合感染病例中最常见病原体,而本研究中成人患者的标本占83.7%(113/135),因此与儿童不同,诺如病毒是成人胃肠道感染的主要原因。多重核酸检测技术的检测结果中,诺如病毒GI/GII,轮状病毒A组和腺病毒是检出率最高的三种病原体,这同Halligan等<sup>[13,14]</sup>人利用多重核酸检测技术的研究结果一致。

多重核酸检测技术在胃肠道细菌检测方面比传统的培养方法更为敏感,本研究发现多重核酸检测技术检出细菌,而传统培养法检测细菌。其中,难辨梭菌是成人院内感染和抗生素相关性腹泻的一个重要病因,其在儿童腹泻中的重要性也被逐渐关注<sup>[15]</sup>,但是由于症状不典型,常常被临床医生忽视。本研究中,临床医生未申请进行CDAB检测的标本中多重核酸检测技术检出7例阳性。总体而言,相对于传统检测方法,多重核酸检测技术通量大,敏感度高,有利于流行病学调查和院内感染的控制,也能避免由于临床症状不典型导致的漏诊情况发生。

蓝氏贾第鞭毛虫和隐孢子虫引起胃肠道感染的症状表现不一,即使无症状的携带者也可能是传染源,也需要进行治疗<sup>[16]</sup>。目前对这两种寄生虫的传统检测还是依靠显微镜镜检,其敏感度低,很容易造成漏诊。有研究表明,对于蓝氏贾第鞭毛虫和隐孢子虫的检测,PCR方法比显微镜镜检的敏感度高22倍<sup>[17]</sup>,本研究中多重核酸检测技术对蓝氏贾第鞭毛虫和隐孢子虫检出率为14.8%(23/155),高于传统检测方法检出率。

之前胃肠道感染性病原体的研究仅限于肠道细菌或肠道病毒或者肠道寄生虫检测<sup>[18,19]</sup>,很少有研究将三种病原体集中进行检测。此外,已有的研究多是疾控预防中心收集急诊或者门诊急性胃肠道感染患者标本的检测结果,未对住院胃肠道感染患者的病原体感染谱进行研究。本研究将15种常见的胃肠道感染细菌、病毒和寄生虫综合进行检

测,并收集门诊、急诊和住院患者的标本,分析不同来源患者胃肠道感染性病原体分布情况,多重核酸检测技术和传统检测方法均发现病毒在三种不同来源标本中的检出率均是最高,为首次国内进行不同来源多种胃肠道感染病原体检测的研究,可弥补中国胃肠道感染病原体监测数据的不足。

综上所述,本研究发现传统检测方法检出细菌或病毒阴性的标本中有 48.1% 的标本利用多重核酸检测技术检测为阳性,传统检测方法有限,花费时间长,而多重核酸检测技术检测谱广、速度快、敏感度高,可为临床医生诊断胃肠道感染提供有效检测手段,避免由于症状不典型或有技术手段所限导致的漏诊情况发生。

#### 参考文献:

- [1] Wang X, Wang J, Sun H, et al. Etiology of childhood infectious diarrhea in a developed region of China: compared to childhood diarrhea in a developing region and adult diarrhea in a developed region [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142136.
- [2] Walker CL, Rudan I, Liu L, et al. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea [J]. *Lancet*, 2013, 381(9875): 1405-1416.
- [3] Qu M, Deng Y, Zhang X, et al. Etiology of acute diarrhea due to enteropathogenic bacteria in Beijing, China [J]. *J Infect*, 2012, 65(3): 214-222.
- [4] 任强, 常文辉, 张梦妍, 等. 2009~2014 年陕西省艾滋病哨点监测重点人群 HIV 感染和新发感染检测分析 [J]. *现代检验医学杂志*, 2015, 30(3): 56-59.  
Ren Q, Chang WH, Zhang MY, et al. Analysis of HIV infection and new infections detection of AIDS sentinel surveillance focus groups in Shaanxi province 2009~2014 [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2015, 30(3): 56-59.
- [5] 肖海军, 殷晓晴, 张慧莲, 等. 深圳地区儿童 A 群致病性链球菌感染流行现状及 M 蛋白基因分型分析 [J]. *现代检验医学杂志*, 2016, 31(6): 51-54.  
Xiao HJ, Yin XQ, Zhang HL, et al. Analysis of the prevalence status and M protein gene classification of A group pathogenic *Streptococcus* infection of children in Shenzhen area [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2016, 31(6): 51-54.
- [6] Zhang H, Morrison S, Tang YW. Multiplex polymerase chain reaction tests for detection of pathogens associated with gastroenteritis [J]. *Clin Lab Med*, 2015, 35(2): 461-486.
- [7] Liu J, Gratz J, Amour C, et al. A laboratory-developed TaqMan Array Card for simultaneous detection of 19 enteropathogens [J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(2): 472-480.
- [8] Coste JF, Vuiblet V, Moustapha B, et al. Microbiological diagnosis of severe diarrhea in kidney transplant recipients by use of multiplex PCR assays [J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(6): 1841-1849.
- [9] Amar CF, East CL, Gray J, et al. Detection by PCR of eight groups of enteric pathogens in 4 627 faecal samples; re-examination of the English case-control Infectious Intestinal Disease Study (1993~1996) [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2007, 26(5): 311-323.
- [10] Maes B, Hadaya K, de Moor B, et al. Severe diarrhea in renal transplant patients: results of the DIDACT study [J]. *Am J Transplant*, 2006, 6(6): 1466-1472.
- [11] Atmar RL, Estes MK. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection [J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2006, 35(2): 275-290, viii.
- [12] Mai H, Jin M, Guo X, et al. Clinical and epidemiologic characteristics of norovirus GII. 4 Sydney during winter 2012-13 in Beijing, China following its global emergence [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e71483.
- [13] Halligan E, Edgeworth J, Bisnauthsing K, et al. Multiplex molecular testing for management of infectious gastroenteritis in a hospital setting: a comparative diagnostic and clinical utility study [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2014, 20(8): O460-O467.
- [14] Patel A, Navidad J, Bhattacharyya S. Site-specific clinical evaluation of the Luminex xTAG gastrointestinal pathogen panel for detection of infectious gastroenteritis in fecal specimens [J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(8): 3068-3071.
- [15] Sammons JS, Toltzis P, Zaoutis TE. Clostridium difficile Infection in children [J]. *JAMA Pediatr*, 2013, 167(6): 567-573.
- [16] Muhsen K, Levine MM. A systematic review and meta-analysis of the association between Giardia lamblia and endemic pediatric diarrhea in developing countries [J]. *Clin Infect Dis*, 2012, 55(4): S271-S293.
- [17] Verweij JJ, Stensvold CR. Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2014, 27(2): 371-418.
- [18] Lu L, Jia R, Zhong H, et al. Molecular characterization and multiple infections of rotavirus, norovirus, sapovirus, astrovirus and adenovirus in outpatients with sporadic gastroenteritis in Shanghai, China, 2010~2011 [J]. *Arch Virol*, 2015, 160(5): 1229-1238.
- [19] Jia LP, Qian Y, Zhang Y, et al. Prevalence and genetic diversity of noroviruses in outpatient pediatric clinics in Beijing, China 2010~2012 [J]. *Infect Genet Evol*, 2014(28): 71-77.