

• 论 著 •

多重不对称 PCR-电化学芯片技术检测感染性腹泻病原体的临床价值*

程 强,周 磊,付晓蕊,徐修礼,刘家云,郝晓柯[△]

空军军医大学西京医院检验科,陕西西安 710032

摘 要:**目的** 探索基于多重不对称 PCR-电化学芯片技术检测感染性腹泻病原体的临床价值。**方法** 收集 2018 年 10 月至 2019 年 6 月该院住院及门诊腹泻患儿标本,以细菌培养鉴定和测序结果作为感染性腹泻病原体诊断的“金标准”,采用多重不对称 PCR-电化学芯片技术和 FilmArray gastrointestinal panel 法(以下简称 FilmArray 法)进行检测并比较结果。**结果** 共收集 102 例感染性腹泻患儿标本,多重不对称 PCR-电化学芯片技术的阳性检出率为 76.47%,与“金标准”方法比较,灵敏度为 90.24%,特异度为 80.00%,2 种方法检测结果完全和部分一致的有 90 例,一致率为 88.24%,具有较好的一致性(Kappa>0.4)。FilmArray 法的阳性检出率为 84.31%,与“金标准”方法比较,灵敏度 97.56%,特异度 70.00%,2 种方法检测结果完全和部分一致的有 94 例,一致率为 92.16%,具有较好的一致性(Kappa>0.4)。**结论** 多重不对称 PCR-电化学芯片技术系统灵敏度、特异度较好,具有良好的临床应用价值。

关键词:感染性腹泻; 多重不对称 PCR-电化学芯片技术; Filmarray gastrointestinal panel

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.03.015 **中图法分类号:**R-331;R446.5

文章编号:1673-4130(2021)03-0317-05

文献标志码:A

Clinical value of multiplex asymmetric PCR-electrochemical chip technology in detection of infectious diarrhea pathogens*

CHENG Qiang, ZHOU Lei, FU Xiaorui, XU Xiuli, LIU Jiayun, HAO Xiaoke[△]

Department of Clinical Laboratory, Xijing Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China

Abstract: Objective To explore the clinical value of multiplex asymmetric PCR-electrochemical chip technology in detection of infectious diarrhea pathogens. **Methods** The samples of diarrhea children in the Hospital from October 2018 to June 2019 were collected, bacterial culture identification and sequencing results were used as the "gold standard" for pathogen diagnosis of infectious diarrhea, multiple asymmetric PCR-electrochemical chip technology and the FilmArray gastrointestinal panel (hereinafter referred to as the FilmArray method) were used to detect and compare the results. **Results** A total of 102 samples of diarrhea patients were collected. The positive detection rate of multiplex asymmetric PCR electrochemical chip technology was 76.47%, compared with the "gold standard" method, the sensitivity was 90.24%, and the specificity was 80.00%, the detection results of the two methods were completely and partially consistent in 90 cases, the consistent rate was 88.24%, with good consistency (Kappa>0.4). The positive detection rate of FilmArray method was 84.31%, compared with the "gold standard" method, the sensitivity was 97.56%, and the specificity was 70.00%, the detection results of the two methods were completely and partially consistent in 94 cases, and the consistent rate was 92.16%, the consistency test showed good consistency (Kappa>0.4). **Conclusion** Multiple asymmetric PCR-electrochemical chip technology has good sensitivity and specificity, and has good clinical application value.

Key words: infectious diarrhea; multiple asymmetric PCR-electrochemical chip technology; FilmArray gastrointestinal panel

腹泻是指每日排便 3 次或 3 次以上,且粪便性状异常,如稀便、水样便、黏液便、脓血便或血便等^[1]。

* 基金项目:陕西省科技统筹创新工程计划(2016KTZDSF01-05-02)。

作者简介:程强,男,主管技师,主要从事微生物研究。 [△] 通信作者, E-mail: haoxkg@fmmu.edu.cn。

本文引用格式:程强,周磊,付晓蕊,等.多重不对称 PCR-电化学芯片技术检测感染性腹泻病原体的临床价值[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(3): 317-320.

感染性腹泻是指由病原微生物及其产物或寄生虫所引起的、以腹泻为主要临床特征的一组肠道传染病^[2]。感染性腹泻居我国法定传染病发病率首位,具有病原体种类复杂、混合发病率高、发病聚集性等特征,是重要的公共卫生事件之一。在暴发流行时,对感染性腹泻病原体进行快速诊断,对疫情的防控具有重要意义^[3]。本研究以多重不对称 PCR-电化学芯片技术(简称电化学芯片法)检测感染性腹泻相关病原体,与 FilmArray gastrointestinal panel 法(简称 FilmArray 法)、普通细菌培养和病毒测序方法比较,计算检测结果的阳性检出率和一致性,探讨电化学芯片法的临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2018 年 10 月至 2019 年 6 月本院儿科住院及门诊病例标本,患儿以呕吐或腹泻等消化道症状为主诉,24 h 内腹泻大便次数 ≥ 3 次,粪便性状异常的腹泻患儿新鲜粪便标本。本研究采取患儿自愿原则,获得患儿及家属的知情同意。

1.2 仪器与试剂 DA910 电化学基因传感器检测系统、Smart 32 全自动核酸提取仪购自中山大学达安基因股份有限公司;FilmArray 全自动 PCR 分析系统购自法国生物梅里埃股份有限公司。核酸提取或纯化试剂(磁珠法)、腹泻病原体检测试剂盒(电化学芯片法)购自中山大学达安基因股份有限公司;FilmArray gastrointestinal panel 购自法国生物梅里埃公司。选择性培养基(SS 平板);显色培养基(弧菌显色培养基、大肠显色培养基)。沙门菌诊断用血清;副溶血弧菌诊断用血清。所有试剂均在有效期内使用。

1.3 方法 取就诊时腹泻患儿新鲜粪便标本,立即放入 Copan 转运培养基中送检。以普通细菌培养和病毒测序结果作为诊断的“金标准”。普通细菌培养:取新鲜待测标本立即接种于大肠显色培养基、弧菌显色培养基、沙门菌显色培养基、TCBS 平板、XLD 平板、SS 平板培养基上,37℃ 培养箱孵育 16~24 h,同时接种 3% 氯化钠碱性蛋白胨水、改良亚硒酸盐磺绿增菌肉汤增菌培养后,挑取可疑菌落转种至三糖铁琼脂等培养基,进一步进行肠道致病菌生化试验、血清型分型试验和药敏试验。结果依据每年美国临床实验室标准化协会(CLSI)M100-S23 标准进行判读。病毒测序:待测标本采用冰壶加冰或泡沫箱加冰密封送往上海生工生物工程股份有限公司进行测序。电化学芯片法:使用 Smart 32 全自动核酸提取仪或纯化试剂(磁珠法)进行待测标本的核酸提取、纯化、扩增、杂交等,之后使用腹泻病原体检测试剂盒,针对 17 种常见的腹泻相关病原体设计特异性引物和探针,探针包括捕获探针和信号探针。捕获探针分别固定在特制的印刷电路板金电极表面,制备成腹泻电化学传感器(芯片),用于捕获 PCR 多重扩增产物;信号探针与

已捕获的 PCR 产物特异结合。由于信号探针标记有二茂铁分子,通过夹心杂交产生电流的变化,应用电化学基因传感器检测系统检测出电流值(信号值),最后对 17 种病原体检测信息进行判定。试剂盒中的阴性质控品参与提取,用于对环境进行监控;C-FX 阳性质控品参与提取,用于 PCR 检测试剂的质控。FilmArray 法:将待测标本根据规定条件加样,使用 FilmArray gastrointestinal panel 和分析系统检测。标准菌株:致泻性大肠埃希菌、肠炎沙门菌、副溶血性弧菌、福氏志贺菌等均来自于本实验室保存。

1.4 统计学处理 使用 SPSS20.0 统计软件进行数据处理,计数资料以率表示,电化学芯片法、FilmArray 法与“金标准”方法结果比较,采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。电化学芯片法、FilmArray 法与“金标准”方法结果的一致性使用 Kappa 一致性检验进行分析,Kappa > 0.4 表示具有一致性。

2 结果

2.1 研究对象人群特征及不同方法病原检出情况 随机选取 102 例感染性腹泻患儿,年龄 1~15 岁,男性 54 例,女性 48 例,以普通细菌培养和病毒测序结果作为“金标准”,使用 3 种不同方法对 102 例腹泻标本进行肠道病原体检测,结果见表 1。“金标准”方法共 82 例标本呈阳性,阳性检出率为 80.39%,共检出病毒 102 株,细菌 18 株。电化学芯片法检测出 78 例标本呈阳性,阳性检出率为 76.47%,共检出病毒 81 株,细菌 15 株。FilmArray 法检测出 86 例标本呈阳性,阳性检出率为 84.31%,共检出病毒 111 株,细菌 32 株。3 种方法同时检出最多的腹泻相关病原体为轮状病毒 A 群。

2.2 电化学芯片法和 FilmArray 法分别与“金标准”方法检测结果比较 以“金标准”方法作为对照,分别与电化学芯片法和 FilmArray 法进行统计学比较。电化学芯片法与“金标准”方法比较,灵敏度为 90.24%,特异度为 80.00%,2 种方法检测结果差异有统计学意义($\chi^2 = 44.092, P < 0.05$)。FilmArray 法与“金标准”方法比较,灵敏度为 97.56%,特异度为 70.00%,2 种方法检测结果差异有统计学意义($\chi^2 = 55.490, P < 0.05$)。见表 2。

2.3 电化学芯片法和 FilmArray 法分别与“金标准”方法一致性比较 以“金标准”方法作为对照,分别与电化学芯片法和 FilmArray 法进行一致性比较并进行 Kappa 检验。电化学芯片法与“金标准”方法比较,检测结果完全和部分一致的标本有 90 例,不一致的标本有 12 例,一致率为 88.24%,进行一致性检验,Kappa 值为 0.653,2 种方法在统计学上具有较好的一致性。FilmArray 法与“金标准”方法比较,检测结果完全和部分一致的标本有 94 例,不一致的标本有 8 例,一

致率为 92.16％,进行一致性检验,Kappa 值为 0.731,2 种方法在统计学上具有较好的一致性。见表 3。

表 1 3 种方法对 102 例感染性腹泻标本病原体检出情况

检出情况	“金标准”方法		电化学芯片法		FilmArray 法	
	<i>n</i>	百分率(%)	<i>n</i>	百分率(%)	<i>n</i>	百分率(%)
阳性						
沙门菌	0	0.00	0	0.00	0	0.00
弯曲菌	0	0.00	0	0.00	0	0.00
弧菌	0	0.00	0	0.00	0	0.00
小肠结肠炎耶尔森菌	0	0.00	0	0.00	0	0.00
类志贺邻单胞菌	0	0.00	0	0.00	0	0.00
难辨梭菌	5	4.90	3	2.94	16	15.69
大肠埃希菌 O157	0	0.00	0	0.00	0	0.00
肠侵袭性大肠埃希菌/志贺菌	0	0.00	0	0.00	0	0.00
肠集聚性大肠埃希菌	0	0.00	0	0.00	2	1.96
肠致病性大肠埃希菌	5	4.90	3	2.94	10	9.80
人肠产毒性大肠埃希菌	2	1.96	1	0.98	2	1.96
肠出血性大肠埃希菌	2	1.96	2	1.96	0	0.00
产志贺毒素大肠埃希菌	4	3.92	6	5.88	2	1.96
轮状病毒 A 群	70	68.63	60	58.82	75	73.53
诺如病毒 GⅠ/GⅡ型	20	19.61	15	14.71	20	19.61
星状病毒	5	4.90	4	3.92	5	4.90
腺病毒 F 组 40/41 型	7	6.86	2	1.96	11	10.78
阴性	20	19.61	24	23.53	16	15.69

表 2 电化学芯片法和 FilmArray 法分别与“金标准”方法结果比较

病原体	电化学芯片法				FilmArray 法			
	灵敏度(%)	特异度(%)	χ^2	<i>P</i>	灵敏度(%)	特异度(%)	χ^2	<i>P</i>
难辨梭菌	60.00	100.00	59.964	<0.001	100.00	88.66	28.260	<0.001
肠致病性大肠埃希菌	60.00	100.00	59.964	<0.001	100.00	94.85	48.371	<0.001
人肠产毒性大肠埃希菌	50.00	100.00	50.495	<0.001	50.00	99.00	24.490	0.039
肠出血性大肠埃希菌	100.00	100.00	102.000	<0.001	0.00	100.00	—	—
产志贺毒素大肠埃希菌	75.00	96.94	35.924	<0.001	50.00	100.00	49.984	0.001
轮状病毒 A 群	81.43	90.63	47.072	<0.001	97.14	78.13	63.921	<0.001
诺如病毒 GⅠ/GⅡ型	70.00	98.78	60.641	<0.001	100.00	100.00	102.000	<0.001
星状病毒	40.00	97.94	18.164	0.110	100.00	100.00	102.000	<0.001
合计	90.24	80.00	44.092	<0.001	97.56	70.00	55.490	<0.001

注:—表示未做统计学分析。

表 3 电化学芯片法和 FilmArray 法分别与“金标准”方法一致性比较

检测项目	“金标准”方法	电化学芯片法				FilmArray 法			
		阳性(<i>n</i>)	阴性(<i>n</i>)	一致率(%)	Kappa	阳性(<i>n</i>)	阴性(<i>n</i>)	一致率(%)	Kappa
难辨梭菌	阳性	3	0	98.04	0.740	5	11	89.22	0.434
	阴性	2	97			0	86		
肠致病性大肠埃希菌	阳性	3	0	98.04	0.740	5	5	95.10	0.643
	阴性	2	97			0	92		

续表 3 电化学芯片法和 FilmArray 法分别与“金标准”方法一致性比较

检测项目	“金标准”方法	电化学芯片法				FilmArray 法			
		阳性(n)	阴性(n)	一致率(%)	Kappa	阳性(n)	阴性(n)	一致率(%)	Kappa
人肠产毒性大肠埃希菌	阳性	1	0	99.02	0.662	1	1	98.04	0.490
	阴性	1	100			1	99		
肠出血性大肠埃希菌	阳性	2	0	100.00	1.000	0	0	98.04	—
	阴性	0	100			2	100		
产志贺毒素大肠埃希菌	阳性	3	3	96.06	0.580	2	0	98.04	0.658
	阴性	1	95			2	98		
轮状病毒 A 群	阳性	57	3	84.31	0.664	68	7	91.18	0.786
	阴性	13	29			2	25		
诺如病毒 GⅠ/GⅡ型	阳性	14	1	93.14	0.760	20	0	100.00	1.000
	阴性	6	81			0	82		
星状病毒	阳性	2	2	95.10	0.419	5	0	100.00	1.000
	阴性	3	95			0	97		
腺病毒 F 组 40/41 型	阳性	2	0	95.10	0.427	7	4	96.08	0.757
	阴性	5	95			0	91		
合计	阳性	74	4	88.24	0.653	80	6	92.16	0.731
	阴性	8	16			2	14		

注：—表示此项无数据。

3 讨 论

通过对本院儿科门诊腹泻患儿新鲜粪便标本进行检测,“金标准”方法的阳性检出率为 80.39%,感染性腹泻以轮状病毒感染为主,且混合感染发病率高,与张辉等^[4]调查研究基本一致。“金标准”方法发现 20 例诺如病毒感染患儿,占比较高,应引起注意。诺如病毒感染后,极易在适龄儿童聚集地,如学校引起暴发流行^[5-6]。细菌性病原体以致病性大肠埃希菌为主,未发现沙门菌,与以往报道有差别^[7],可能与采集标本时间、地点、标本量有关。未发现志贺菌和霍乱弧菌等引起法定传染病的致病菌,且在实际工作中发现,采用普通细菌培养方法诊断感染性腹泻致病菌的阳性检出率低于 FilmArray 法^[8-9]。在感染性腹泻的诊断中,分子诊断技术是对传统细菌培养方法的良好补充。

在检测腹泻患儿标本中发现,应用 FilmArray 法检测准确率高,与国外报道一致,标本周转时间 2.0 h 左右,耗时短,仅需一步手工加样,操作简单^[10-11],但此方法每台仪器只能检测 1 例患儿标本,通量严重不足,单标本检测费用较高^[12],患儿家庭负担较重,目前在國內不适合开展大规模诊断。电化学芯片法与“金标准”方法结果比较,灵敏度为 90.24%,特异度为 80.00%,一致率为 88.24%,检测结果整体情况较好。电化学芯片法发现多重感染性腹泻病原体能力不如 FilmArray 法^[13-14],标本周转时间约为 5.5 h,多于 FilmArray 法,但是少于实时荧光定量 PCR 方法^[15],

可同时检测 32 例患儿标本,通量高,手工操作步骤少,在一定程度上降低人为操作误差,人员经简单培训,即可进行检测,便于开展,且标本检测成本较 FilmArray 法大幅降低。

电化学芯片法检测结果与其他方法比较时,也发现了一些问题。(1)整体阳性检出率为 76.47%,还需要进一步提高;(2)检测结果的准确率还需要进一步提高;(3)在混合感染中,该方法的鉴别能力不足,应继续优化试剂成分,以达到更好的效果。

总之,多重不对称 PCR-电化学芯片技术,系统灵敏度、特异度较好,具有良好的临床应用价值。

参考文献

[1] 周永明, 阚飙, 徐闻. 2011—2013 年云南省感染性腹泻疫情及监测现状分析[J]. 寄生虫病与感染性疾病, 2014, 12 (4): 179-183.

[2] 中华人民共和国卫生部. 感染性腹泻诊断标准[S]. 北京: 北京标准出版社, 2008.

[3] 梁丹, 车荣飞, 石倩萍, 等. 感染性腹泻疾病负担及其病原谱变化的研究进展[J]. 中国公共卫生, 2017, 35(11): 1-4.

[4] 张辉, 谢龙, 寇玲玲, 等. 2010—2018 年西安市其他感染性腹泻流行病学特征分析[J]. 现代预防医学, 2019, 46 (17): 3211-3216.

[5] 陈波, 翁正军, 陈莫娇, 等. 学校感染性腹泻疫情中诺如病毒的分子流行病学分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2019, 29 (2): 174-175.

[6] 翁熹君, 王哲, 任婧寰, 等. 2014—2016 年(下转第 324 页)

床疗效,治疗后的总有效率较对照组高。

综上所述,在阿司匹林治疗的基础上采用静脉滴注 rt-PA 进行溶栓治疗,对缺血性脑卒中中具有显著的临床疗效。

参考文献

- [1] 罗根培,李润雄,吴志强,等. 血管内取栓治疗急性后循环缺血性脑卒中临床分析[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2020,23(11):930-934.
- [2] 姚立岩,杨晓炜. 肿瘤坏死因子- α 对缺血性脑卒中的作用[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2020,23(11):1009-1013.
- [3] 李永安. 急性脑梗死患者应用重组组织型纤溶酶原激活物早期静脉溶栓治疗的临床研究[J]. 影像研究与医学应用, 2018,2(5):5-6.
- [4] 陈灏珠. 内科学[M]. 9 版. 北京:人民卫生出版社, 2018: 235.
- [5] 沈永玲,朱海暴,李勇,等. 静脉低剂量重组组织型纤溶酶原激活物治疗短暂性脑缺血发作的临床对照研究[J]. 实用临床医药杂志, 2017,21(19):34-37.
- [6] 全国第 4 届脑血管病学术会议. 脑卒中患者临床神经功能缺损程度评分标准(1995)[J]. 中华神经科杂志, 1996, 29(6):381.
- [7] 韩杨,周其达,秦琳等. 急性脑梗死患者经重组组织型纤溶酶原激活物静脉溶栓治疗后预后的影响因素研究[J]. 实用心脑血管病杂志, 2018,26(11):42-45.
- [8] 刘惠丽. 重组组织型纤溶酶原激活物(rt-PA)静脉溶栓治疗超早期脑梗死的临床疗效及预后[J]. 中国医药指南, 2018,16(5):136-137.
- [9] 赵秋艳,裴蕾,李碧,等. 观察重组组织型纤溶酶原激活物

(rt-PA)溶栓结合补阳还五汤治疗急性脑梗死患者的临床疗效及安全性[J/CD]. 临床医药文献电子杂志, 2020,7 (21):81.

- [10] 路峰,李立峰,杜远生. 阿托伐他汀联合 rt-PA 静脉溶栓治疗脑梗死的疗效及预后多因素分析[J]. 实用医院临床杂志, 2020,17(3):198-201.
- [11] 樊文香. 缺血性脑卒中的机制研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2018,49(6):751-759.
- [12] MANAGHAN D T, BRIDGES R J, CONTMAN C W. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the central nervous system[J]. Ann Rev Pharmacol Toxicol, 1989, 29: 365-402.
- [13] 汪丽华,陈金和,吴基良,等. 褪黑素对大鼠局灶性脑缺血后 NO 含量和 NOS 活性的影响及其机制[J]. 咸宁医学院学报, 2002,16(1):11-13.
- [14] 伏彩霞,马宝山,鲁晓波. 缺血性脑卒中患者血清 SOD、NO、MDA 水平动态变化与焦虑症发生的相关性[J]. 现代检验医学杂志, 2018,33(6):46-49.
- [15] VAN WIJNGAARDEN J, VAN BEEK E, VAN ROS-SUM G, et al. Celecoxib enhances doxorubicin-induced cytotoxicity in MDA-MB231 cells by NF-KB-mediated increase of intracellular doxorubicin accumulation[J]. Eur J Cancer, 2007,43(2):433-442.
- [16] 孟倩,徐珊,肖林林,等. 尿酸和脑钠肽水平评估进展性缺血性脑卒中的价值分析[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(2):196-198.

(收稿日期:2020-05-02 修回日期:2020-08-28)

(上接第 320 页)

- 全国其他感染性腹泻突发公共卫生事件流行特征分析[J]. 疾病监测, 2019,34(6):565-570.
- [7] 李艳,张晓蕾,李金平,等. 2013—2017 年感染性腹泻的病原体特点和流行特征[J]. 中华医院感染学杂志, 2019,29 (11):1732-1736.
- [8] LELI C, DI MATTEO L, GOTTA F, et al. Evaluation of a multiplex gastrointestinal PCR panel for the aetiological diagnosis of infectious diarrhoea[J]. Infect Dis, 2020, 52 (8):1-7.
- [9] MACHIELS J D, CREMERS A J H, VAN BERGEN-VE RKUYTEN MURIËL C G T, et al. Impact of the biofire film-marray gastrointestinal panel on patient care and infection control[J]. PLoS One, 2020,15(2):e0228596.
- [10] BUSS S N, LEBER A, CHAPIN K, et al. Multicenter evaluation of the BioFire FilmArray gastrointestinal panel for etiologic diagnosis of infectious gastroenteritis[J]. J Clin Microbiol, 2015,53(3):915-925.
- [11] POULETTY M, DE P L, LOPEZ M, et al. Multiplex PCR reveals a high prevalence of multiple pathogens in traveller's diarrhoea in children[J]. Arch Dis Child, 2019,104(2):141-146.

- [12] BEAL S G, TREMBLAY E E, TOFFEL S, et al. A gastrointestinal PCR panel improves clinical management and lowers health care costs[J]. J Clin Microbiol, 2018,56 (1):e01457.
- [13] STOCKMANN C, ROGATCHEVA M, HARREL B, et al. How well does physician selection of microbiologic tests identify clostridium difficile and other pathogens in paediatric diarrhoea? Insights using multiplex PCR-based detection[J]. Clin Microbiol Infect, 2015, 21(2): 179.
- [14] WALKER C R, LECHIILE K, MOKOMANE M, et al. Evaluation of anatomically designed flocced rectal swabs for use with the BioFire FilmArray gastrointestinal panel for detection of enteric pathogens in children admitted to hospital with severe gastroenteritis[J]. J Clin Microbiol, 2019,57(12):e00962.
- [15] 张雅琴,张吉,雷永良. 实时荧光定量 PCR 技术快速检测儿童腹泻病原体[J]. 中国卫生检验杂志, 2015,25(12): 1941-1942.

(收稿日期:2020-05-02 修回日期:2020-09-09)