

• 论 著 •

预防性健康体检快速筛查沙门志贺氏菌的价值研究^{*}

朱素芬, 谭翰清

(广宁县疾病预防控制中心检验科, 广东广宁 526000)

摘要:目的 探讨 PCR 方法快速筛查健康体检沙门志贺氏菌的临床价值。方法 选取 2011 年 7 月至 2015 年 6 月 3 256 例健康体检人员作为研究对象, 采用实时荧光 PCR 法和培养法检测沙门志贺氏菌, 比较两种方法筛查沙门志贺氏菌的优劣。结果 沙门氏菌 PCR 法检出 46 例, 检出率为 1.41%, 传统培养法检出 41 例, 检出率为 1.26%; 志贺氏菌 PCR 法检出 39 例, 检出率为 1.20%, 传统培养法检出 32 例, 检出率为 0.98%, 两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。PCR 法检测沙门氏菌灵敏度 100.00%、特异性为 99.84%, 检测志贺氏菌灵敏度 100.00%, 特异性为 99.78%。PCR 法在人力、办证时间、满意度上优于传统培养法, 成本上显著高于传统培养法, 两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且 PCR 法技术含量高、客观性强。结论 实时荧光 PCR 法能很好地筛查肠道致病菌, 提高沙门志贺氏菌检出率和准确性, 省时省力, 效率高。

关键词: 沙门志贺氏菌; PCR; 健康体检; 临床价值

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.23.018

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)23-3268-03

Study on the value of PCR for rapid screening Salmonella/Shigella in preventive health physical examination^{*}

ZHU Sufen, TAN Hanqing

(Guangning County Center For Disease Control And Prevention, Clinical Laboratory, Guangning, Guangdong 526000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the clinical value of PCR method for rapid screening Salmonella/Shigella in health physical examination. **Methods** A total of 3 256 cases who were taken health physical examination from July 2011 to June 2015, were selected as the research object. Real-time fluorescence quantitative PCR method and the culture method were used for detecting Salmonella/Shigella, and two methods were compared on their strengths and weaknesses for screening Salmonella/Shigella. **Results** A total of 46 cases with Salmonella were detected by PCR, and the ratio was 1.41%; 41 cases with Salmonella were detected by traditional culture method, and the ratio was 1.26%. 39 cases with Shigella were detected by PCR and, the ratio was 1.20%; 32 cases were detected by traditional culture method, and the ratio was 0.98%. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). Sensitivity and specificity of PCR to detect Salmonella were 100.00% and 99.84%, respectively, and sensitivity and specificity of PCR to detect Shigella were 100.00% and 99.78%, respectively. The PCR method is better than the traditional culture method concerning manpower, processing time, and satisfaction of test-takers, and the cost of PCR method is significantly higher than that of traditional culture, with a significant difference ($P < 0.05$). PCR method contains high technology and has strong objectivity. **Conclusion** Real time fluorescent quantitative PCR method, with high efficiency, can be employed well for screening intestinal tract pathogenic bacteria, improve the detection rate and accuracy for detecting Shigella and Salmonella, and save time and energy as well.

Key words: Salmonella; Shigella; PCR; health physical examination; clinical value

我国是一个食品和消费大国, 随着市场经济的发展和人民生活水平的提高, 消费者对食品安全问题的重视程度越来越高。为了保障消费者健康和食品安全, 世界各国对食品病原菌均做了严格规定, 且列入各类食品标准, 作为食品安全强制性检测指标。沙门氏菌和志贺氏菌作为食物中毒的主要病原菌, 对人体损伤大, 对儿童伤害尤其大^[1]。沙门志贺氏菌作为食品或公共场所从业人员每年定期体检的必检项目, 大部分检测单位采用传统分离培养方法, 周期长、特异性差、不能满足现代检验需求。故建立一种快速、灵敏度高、准确性好、自动化程度高的检测方法至关重要^[2-3]。实时荧光 PCR 法就符合以上特点, 针对沙门志贺氏菌特异基因设计引物和分子信标探针, 应用于从业人员体检肠道致病菌检测操作便捷, 排查迅速, 灵敏度高。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2011 年 7 月至 2015 年 6 月 3 256 例健

康体检人员作为研究对象。均采用肛拭子标本。其中男 1 995 例, 女 1 261 例; 年龄 19~64 岁, 平均年龄 (42.3 ± 4.6) 岁; 从业时间 2 周至 12 年, 平均从业时间 (3.1 ± 1.2) 年。所有健康体检人员均知情同意, 签署知情同意书, 并征得医院伦理委员会同意。

1.2 仪器与试剂 一次性多功能采样器、实时荧光 PCR 试剂盒、培养基、琼脂、生化鉴定卡均由上海科苑有限公司提供。仪器包括 ABI730 实时荧光 PCR 仪、生物安全柜、恒温培养箱、加样枪、离心机等。

1.3 方法 培养法: 用一次性功能采样器采集肛拭子, 轻柔插入肛门内 3 cm 后轻轻旋转 3 周后取出, 保证每个采样头能采集到粪便标本。掰断采样器头部后在恒温箱中培养 6 h 以上。将采样管中培养的标本混匀, 每 10 份标本为 1 个组别; 从采样器头部滴 2 滴培养液到 1.5 mL 离心管中, 将离心管放入冷冻

^{*} 基金项目: 肇庆市科技创新计划项目 (2012E1819)。

作者简介: 朱素芬, 女, 主管技师, 主要从事微生物检验方向研究。

离心机中,1 200 r/min 离心 5 min 后去除上层清液,留沉淀;每管中加入 50 μ L DNA 提取物,震荡混匀,放入 100 $^{\circ}$ C 水浴 5 min 后再放入冷冻离心机中以 1 200 r/min 离心 5 min 后制成标本模板。显微镜下鉴别不同病原菌。实时荧光 PCR 法:取样本模板 5 μ L 到 PCR 反应管中,设置阴性、阳性对照管。将加好样本的 PCR 反应管置入 PCR 仪中,严格按照试剂说明书设置反应程序,进行 PCR 扩增,若 PCR 检测为阴性则直接出报告,若阳性则将 10 份标本按国际法进行分离、培养和鉴定。沙门氏菌分离则将检测阳性的 PCR 样本化线接种在科玛嘉沙门氏菌显色培养基中恒温培养 18~24 h,挑选出其中紫色或紫红色菌落,接种琼脂和生化卡鉴定为沙门氏菌。志贺氏菌则将标本接种在 XLD 培养基中进行培养,培养时间仍为 18~24 h,志贺氏菌为无色半透明湿润样小菌落,接种琼脂和生化卡鉴定为志贺氏菌。

1.5 统计学处理 应用 SPSS15.0 统计软件进行统计学处理。计量资料结果采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,计数资料采用 χ^2 检验,多组间样本对应数据采用独立样本 *F* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两种方法沙门志贺氏菌检出率比较 沙门氏菌 PCR 法阳性数 46 例,检出率为 1.41%,传统培养法检出数 41 例,检出率为 1.26%,志贺氏菌 PCR 法阳性数 39 例,检出率为 1.20%,传统培养法检出数 32 例,检出率为 0.98%,两者比较差异有统计学意义($P<0.05$)。PCR 法沙门氏菌灵敏度 100.00%,特异度为 99.84%;志贺氏菌灵敏度 100.00%,特异度为 99.78%。

2.2 两种方法相关指标比较 PCR 法在人力、办证时间、满意度上显著优于传统培养法,成本上显著高于传统培养法,两者比较差异有统计学意义($P<0.05$),且 PCR 法技术含量高、客观性强,见表 1。

表 1 两组各指标异常率比较($\bar{x}\pm s$)

项目	PCR 法	传统培养法	<i>t</i>	<i>P</i>
成本(元)	10.67 $\pm$ 1.45	7.84 $\pm$ 1.01	9.756	<0.05
人力(人)	0.50 $\pm$ 0.50	3.50 $\pm$ 0.50	9.413	<0.05
办证时间(d)	3.11 $\pm$ 0.78	5.43 $\pm$ 0.91	9.467	<0.05
满意度(%)	97.44 $\pm$ 4.56	90.34 $\pm$ 2.34	9.951	<0.05
主客观性	客观性强	主观性强		
技术含量	高	一般		

3 讨 论

沙门氏菌是肠杆菌属,革兰阴性细长杆菌,无芽孢,一般无荚膜,多数有周生鞭毛,能运动^[4]。其在一般琼脂培养基中生长良好,按其生化特性可分成五个亚属。其致病主要是活菌和内毒素协同下发病,而志贺氏菌是一种革兰阴性杆菌,是人类细菌性痢疾最常见病原菌,该细菌和一般肠道杆菌无明显区别,不形成芽孢,无荚膜,无鞭毛,不运动,多数有菌毛。为需氧或兼性需氧菌,营养要求不高,能在普通培养基中生长,致病依靠侵袭、内毒素和外毒素三者联合^[5-6]。

PCR 基本原理是体外合适条件下,以单链 DNA 为模板,以人工设计和合成的寡核苷酸为引物,利用热稳定 DNA 聚合酶渗入核苷酸特异性扩增 DNA 片段,整个反应过程为 20~40

个循环,每个循环均经过高温变性、低温复性和适温延伸组成^[7-9]。本次研究中采用实时荧光 PCR 检测,该技术能将液相杂交技术和荧光探针引入常规 PCR 中,通过 PCR 每个循环扩增产物相对应荧光信号来实现样品的定性和定量检测。

结果看出,实时荧光 PCR 检测对沙门氏菌、志贺氏菌检测灵敏度均为 100%,这说明该方法能检测出传统方法的检出率,无漏诊,另外在特异度上均在 98% 以上,这说明其特异度高,符合临床上预防性健康体检人群需求。传统培养法是根据细菌生长繁殖过程合成和释放某些特异性酶,选择相应底物和指示剂,根据反应颜色变化从而快速鉴定病原菌^[10]。有研究称,这种方法只有分离出单个菌落才能检测出,且在操作过程中受培养基质量、杂菌等影响性大^[11-13],且主观性强,受检测人员经验影响性大,故一方面限制该方法广泛运用,另外也降低该方法的准确性,容易出现漏诊,而漏诊沙门志贺氏菌危害性大,不良影响性广。结果显示,实时荧光 PCR 检测客观性强,且阳性标本要经过 PCR 和培养法双重确认,故检测准确性和客观性良好,加上 PCR 结合培养法减少后期细菌分离培养和鉴定工作,故阳性检出率高,在操作中减少玻璃器皿反复使用,减少清洁、灭菌等辅助环节,降低辅助环节污染引起假阳性,同时避免实验室污染^[14]。

有研究称,随着生态环境和抗生素滥用,很多致病菌引起临床症状不典型^[15],故常需要检测多种细菌才能确认病原菌,这就需快速检测,要省时省力,另外要快速检测多种病原微生物。结果显示,实时荧光 PCR 检测快速灵敏,操作方便,是国际上目前检测沙门志贺氏菌最理想方法之一,但随着技术发展,实时荧光 PCR 技术可能是未来发展方向。

参考文献

[1] 马凯,李宝明,白羽,等.基于免疫磁分离的三重荧光定量 PCR 检测食品中沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌[J].微生物学通报,2014,41(11):2369-2377.

[2] 刘忠梅,徐义刚,曲敏,等.3 种食源性致病菌 Tem-PCR 检测方法的建立[J].食品科学,2016,37(4):186-190.

[3] 舒畅,姜琛璐,钟慈平,等.三种食源性致病菌多重 PCR 检测方法的建立[J].食品工业科技,2014,35(12):49-54.

[4] 童桂香,黎小正,韦信贤,等.水产品中 4 种食源性致病菌多重 PCR 检测方法的建立[J].南方农业学报,2015,46(12):2217-2222.

[5] 肖勇,沙丹,凌霞,等.PCR 和毛细管电泳技术检测沙门氏菌等 5 种病原菌的方法研究[J].现代预防医学,2012,39(14):3611-3614.

[6] 陆红玉,罗彬,符明泰,等.食蟹猴志贺氏菌、沙门氏菌和小肠结肠炎耶尔森氏菌多重 PCR 检测方法的建立及初步应用[J].广东畜牧兽医科技,2015,40(1):34-39.

[7] 霍胜楠,孟静,杨振东,等.3 种食源性致病菌的实时荧光 PCR 快速检测[J].食品研究与开发,2016,37(16):143-147.

[8] Mojdeh HV, Jamileh N, Bahram K. Determination of distribution of icsA gene and icsA protein bands between shigella flexneri isolated from 3 hospitals in tehran[J]. Cell J, 2012, 7(4):250-253.

[2] Ali TA, Salahuddin U, Shoukat A, et al. Existence of renal dysfunction in diabetics undergoing coronary artery bypass[J]. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*, 2016, 24(7): 653-657.

[3] Nylund K, Meurman JH, Heikkinen AM, et al. Oral health in predialysis patients with emphasis on periodontal disease[J]. *Quintessence Int*, 2015, 46(10): 899-907.

[4] 彭永挑, 逯富华, 陈妙旋, 等. 糖尿病肾病透析患者肺部感染危险因素分析[J]. *糖尿病新世界*, 2016, 19(22): 94-96.

[5] 零小妹, 刘婧. 治疗糖尿病肾病的药物研究现状[J]. *检验医学与临床*, 2014, 15(22): 3204-3205.

[6] Estrella MM, Kirk GD, Mehta SH, et al. Vitamin D deficiency and persistent proteinuria among HIV-infected and uninfected injection drug users[J]. *AIDS*, 2012, 26(3): 295-302.

[7] Greca LF, Pinto LC, Rados DR, et al. Clinical features of patients with type 2 diabetes mellitus and hepatitis C infection[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2012, 45(3): 284-290.

[8] Senmaru T, Fukui M, Kuroda M, et al. Serum pepsinogen I/II ratio is correlated with albuminuria in patients with type 2 diabetes[J]. *Endocr J*, 2013, 60(2): 161-166.

[9] 赵媛媛, 夏瑗瑜, 喻业安, 等. 终末期糖尿病肾病维持性血液透析患者并发结核感染 11 例临床分析[J]. *中国医学创新*, 2012, 9(11): 123-124.

[10] 徐涛, 石梅, 邱云霞, 等. 终末期糖尿病肾病患者医院感染病原菌分布与耐药性分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2015, 25(17): 3884-3886.

[11] Ito H, Yamashita H, Nakashima M, et al. Current metabolic status affects urinary liver-Type fatty-acid binding protein in normoalbuminuric patients with type 2 diabetes[J]. *J Clin Med Res*, 2017, 9(4): 366-373.

[12] Sabatino A, Regolisti G, Cosola C, et al. Intestinal microbiota in Type 2 diabetes and chronic kidney disease[J]. *Curr Diab Rep*, 2017, 17(3): 16.

[13] 刘婧, 包宇实. 糖尿病肾病终末期患者延续性护理需求与自我护理能力的相关性分析[J]. *检验医学与临床*, 2016, 13(17): 2482-2483.

[14] Dong XG, An ZM, Guo Y, et al. Effect of triptolide on expression of oxidative carbonyl protein in renal cortex of rats with diabetic nephropathy[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2017, 37(1): 25-29.

[15] Kaur N, Kishore L, Singh R. Therapeutic effect of *Linum usitatissimum* L. in STZ-nicotinamide induced diabetic nephropathy via inhibition of AGE's and oxidative stress[J]. *J Food Sci Technol*, 2017, 54(2): 408-421.

(收稿日期: 2017-06-21 修回日期: 2017-09-13)

(上接第 3269 页)

[9] Lindsay B, Ochieng JB, Ikumapayi UN, et al. Quantitative PCR for detection of *Shigella* improves ascertainment of *Shigella* burden in children with moderate-to-severe diarrhea in low-income countries[J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(6): 1740-1746.

[10] Cao Y, Wei D, Kamara II, et al. Multi-Locus sequence typing (mLST) and repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction (REP-PCR), characterization of *shigella* spp. over two decades in Tianjin China[J]. *Int J Mol Epidemiol Genet*, 2012, 3(4): 321-332.

[11] Pierce SE, Bell RL, Hellberg RS, et al. Detection and identification of *salmonella enterica*, *escherichia coli*, and *shigella* spp. via PCR-electrospray ionization mass spectrometry; isolate testing and analysis of food samples[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(23): 8403-8411.

[12] Ojha Sc, Yean YC, Ismail A, et al. A pentaplex PCR assay for the detection and differentiation of *Shigella* species[J]. *Biomed Res Int*, 2013, 27(2): 412370.

[13] Binet R, Deer DM, Uhlfelder SJ. Rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* in produce enrichments by a conventional multiplex PCR assay[J]. *Food Microbiol*, 2014, 40(2): 48-54.

[14] 吴海娟. 实时荧光 PCR 快速同时检测从业人员沙门菌和志贺菌结果分析[J]. *现代预防医学*, 2013, 40(12): 2323-2325.

[15] Ma K, Deng Y, Bai Y, et al. Rapid and simultaneous detection of *Salmonella*, *Shigella*, and *Staphylococcus aureus* in fresh pork using a multiplex real-time PCR assay based on immunomagnetic separation[J]. *Food Control*, 2014, 42(3): 87-93.

(收稿日期: 2017-06-21 修回日期: 2017-09-28)

医学统计工作的基本内容

按工作性质及其先后顺序, 可将医学统计工作分为实验设计、收集资料、整理资料、分析资料。实验设计是开展某项医学研究工作的关键, 包括医学专业设计和统计学设计, 医学专业设计的内容包括研究对象纳入和排除标准、样本含量、获取样本的方法、分组原则、观察(检测)指标、统计方法等。收集资料的方法包括各种试验、检测或调查, 要求资料完整、准确、及时、有足够数量、具有代表性和可比性等。整理资料包括原始资料的检查与核对、对资料进行分组与汇总等。分析资料即对资料进行统计学分析, 包括进行统计描述和统计推断。