

- prediction of acute myocardial infarction[J]. Gene, 2016, 591(1):90-96.
- [33] LUO L, CHEN B, LI S, et al. Plasma miR-10a: A potential biomarker for coronary artery disease[J]. Dis Markers, 2016, 2016:3841927.
- [34] ERYILMAZ U, AKGULLU C, BESER N, et al. Circulating microRNAs in patients with ST-elevation myocardial infarction[J]. Anatol J Cardiol, 2016, 16(6):392-396.
- [35] HUANG L, LI L, CHEN X, et al. MiR-103a targeting Piezo1 is involved in acute myocardial infarction through regulating endothelium function[J]. Cardiol J, 2016, 23(5):556-562.
- [36] YAO X L, LU X L, YAN C Y, et al. Circulating miR-122-5p as a potential novel biomarker for diagnosis of acute myocardial infarction[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(12):16014-16019.
- [37] WEI T, FOLKERSEN L, EHRENBORG E, et al. MicroRNA 486-3P as a stability marker in acute coronary syndrome[J]. Biosci Rep, 2016, 36(3):e00351.
- [38] Zhang C. Novel functions for small RNA molecules[J]. Curr Opin Mol Ther, 2009, 11(6):641-651.
- [39] 杨志寅. 现代医学科学发展中的缺憾与思考[J/CD]. 中华诊断学电子杂志, 2013, 1(1):1-7.
- (收稿日期:2017-10-22 修回日期:2018-01-03)
- 综 述 •

腹泻病原体检测技术研究进展

王 健¹, 王鑫森², 李青凤^{1△}综述, 年庆功¹审校

(1. 北京军区疾病预防控制中心, 北京 100042; 2. 陆军军医大学军事预防医学院学员 17 营, 重庆 400038)

摘 要:腹泻发病率居高不下, 是全球范围内的重要公共卫生问题。腹泻最常见的原因是肠道病原体感染, 不同病原体引起的腹泻症状相似, 病原体种类繁多且常存在混合感染, 给肠道病原体的快速检测带来了困扰。本文对目前实验室、临床常用的肠道病原体检测方法进行综述, 汇总目前肠道病原体检测最有效、快捷的方法, 旨在为及时发现肠道病原体感染疫情、深入开展肠道病原体研究提供参考。

关键词:肠道病原体; 病原检测; 免疫学; PCR; 细菌培养

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.09.028

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2018)09-1119-04

文献标识码:A

肠道病原体感染是腹泻发生的重要原因^[1]。腹泻不仅是婴幼儿死亡的主要原因之一, 也是全球范围内重要的公共卫生问题^[2]。全球每年约有多达 20 亿的腹泻病例, 主要集中在发展中国家^[3], 可能与较差的卫生条件有关。因而肠道病原体检测至关重要。目前检测肠道病原体的常见方法有: 显微镜检查、细菌和病毒的分离培养、免疫学方法、聚合酶链反应技术(PCR)、实时荧光定量 PCR 等, 但这些方法在检出率、时效性、成本等诸多方面均存在一定的缺陷。缺乏快速有效的病原体检测方法和体系, 即使对腹泻患者的粪便进行了相应的病原学检查, 其病因也较难明确。本文对目前肠道病原体的检测方法进行归纳对比, 旨在为一线检测工作者选择合适的方法提供参考。

1 检测方法概述

1.1 粪便常规检查 粪便常规检查的内容主要包含粪便的性状、颜色、有无寄生虫、红细胞、白细胞等。通过粪便的颜色和性状可获得一些疾病的信息。正常大便呈软泥样柱状, 棕黄色或黄色。如果呈黑色表示可能为上消化道出血; 呈红色则常见于肠下段出血性疾病, 如结肠或直肠癌、痔出血、痢疾等; 呈果酱色

则有可能是菌痢、阿米巴痢疾急性发作; 呈灰白色常见于阻塞性黄疸、钡餐造影术后。黏液便或脓血便常见于菌痢、肠炎等; 米汤样便则常见于霍乱、副霍乱。粪便常规检查对寄生虫疾病和真菌感染的检出具有重要意义。真菌属条件致病菌, 由真菌感染引起的慢性腹泻其发病率呈逐渐上升趋势, 在医院感染性腹泻中已成为主要病原体^[4]。粪便常规检查操作简便易行, 但获得的信息较为有限, 难以获得病原体的详细信息^[5]。即便如此, 粪便常规检查仍是临床辅助诊断的重要常用手段之一, 在腹泻患者的诊疗过程中发挥重要作用。

1.2 病毒及细菌分离培养

1.2.1 病毒培养 导致腹泻的常见病毒有: 轮状病毒、诺如病毒、札如病毒、星状病毒等。采用病毒分离培养的方法灵敏度较低, 需要特殊的培养条件, 分离时间较长, 且只有部分病毒能进行培养, 因此肠道病毒培养并不作为临床常规检测方法使用^[6]。但在科研机构中, 病毒分离培养是进行相关病毒研究的基础方法, 在未来一定时间内仍将被广泛应用。

1.2.2 细菌培养 肠道细菌培养是将粪便接种于特殊培养基或增菌液中进行培养的方法。常见的选择

△ 通信作者, E-mail: lqfnds69@sina.com.

本文引用格式: 王健, 王鑫森, 李青凤. 腹泻病原体检测技术研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(9): 1119-1122.

培养基有:伊红美蓝琼脂培养基、沙门志贺培养基、麦康凯琼脂培养基、硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基。伊红美蓝琼脂培养基主要用于革兰阴性肠道菌的分离培养,其原理是大肠杆菌分解乳糖时带正电荷被染为红色,与美蓝结合后可形成紫黑色菌落。沙门志贺选择培养基主要用于沙门和志贺菌属的分离。在沙门志贺选择培养基上,这两个菌属形成不分解乳糖的无色菌落,而大肠杆菌等非致病菌多为分解乳糖的粉红色菌落。麦康凯琼脂培养基可抑制革兰阳性菌,但部分革兰阴性菌也不生长,大肠埃希菌生长良好,形成红色菌落。硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基主要用于霍乱、副溶血弧菌的分离培养,其他种类的细菌在该种培养基上生长不佳或无法生长。

常见的鉴别培养基有:克氏双糖铁培养基、动力-吡啶-尿素培养基、邻硝基酚- β -半乳糖苷培养基、氧化酶试验培养基。克氏双糖铁培养基常用于观察微生物发酵葡萄糖和乳糖的能力,用于肠杆菌科细菌的鉴定。动力-吡啶-尿素培养基主要用于鉴别大肠埃希菌和普通变形杆菌。邻硝基酚- β -半乳糖苷培养基用于可产生 β -半乳糖苷酶菌属的鉴定, β -半乳糖苷酶可催化分解邻硝基酚- β -半乳糖苷,生成黄色的邻硝基苯酚。可产生 β -半乳糖苷酶的有:埃希菌属、枸橼酸杆菌属、克雷伯菌属等,不产生 β -半乳糖苷酶的有:沙门菌属、变形杆菌属等。氧化酶试验培养基用于奈瑟菌属的鉴定,该菌属氧化酶试验均为阳性。

细菌培养所需条件较为简单,适合作为大样本的初筛,以前为各级疾控中心所广泛采用。但随着抗菌药物的普及,细菌培养方法敏感性较低的弊端进一步显露,目前仅作为一种辅助检测的手段使用^[7]。另外,由于细菌培养、鉴别周期较长,且需要操作人员具有丰富的鉴别经验,因此,随着更多检测技术的出现,无论在临床和科研领域,细菌培养法都可能会被其他快速检测手段取代。

1.3 免疫学检测法

1.3.1 酶联免疫吸附试验(ELISA) ELISA 一般不需要分离即可对样品进行检测,操作快速简便。目前已有针对多种肠道病原体的 ELISA 检测方法^[8]。其原理为检测粪便标本中病原体的抗原,必要试剂有固相的抗体(免疫吸附剂)、酶标记的抗体(酶标物)、酶作用的底物(显色剂)。检测时,抗原先结合在固相载体上,但仍保留其免疫活性,然后加保留免疫活性与酶活性的酶标物,当酶标物抗原反应结合后,再加上酶的相应底物,即起催化水解或氧化还原反应而呈现不同颜色。该方法在检测时需要选择不同病原体的特异性抗体,因病原体种类繁多,如何选择适合的抗体至关重要,尤其是一些不常见的病原,该方法较难应用^[9]。但该检测方法具有灵敏度高、特异度高、操作简单等多种优点,在临床和科研领域均具有广泛的应用市场和前景,是一种重要的快速检测手段。

1.3.2 免疫胶体金技术 免疫胶体金具有更加快捷、简单的优点,其原理是将被测抗原(病原体)的抗体包被到胶体金颗粒的表面(金标抗体),将被测抗原的另一抗体固定在检测线处,而将抗金标抗体固定在对照线处。在吸水材料的牵引下,待测抗原在试条上向上走,首先与金标抗体结合成抗原抗体复合物,抗原抗体复合物上行到检测线时,被测抗原的另一结合位点与包被在此处的单抗结合,形成两个抗体结合一个抗原(双抗体夹心)的金标复合物,因有金颗粒在此沉积,故检测线显红色。未结合抗原的金标抗体上行到对照线时,与“抗金标抗体”结合,所以对照线也显红色。目前已有针对轮状病毒^[10]、霍乱弧菌^[11]等多种肠道病原体的胶体金检测试剂。该方法具有灵敏度高、特异性强、操作简单的优点,但单一的检测并不能满足快速检测的需求。尽管也有研究关于多种病原体的多通道胶体金检测技术^[12],以适应病原体多重快速筛查的需求,但由于技术不够成熟,目前尚未广泛应用。随着检测技术的不断发展,免疫胶体金技术在现场快速检测领域具有较好的应用前景。

1.3.3 免疫电镜技术 免疫电镜技术是免疫化学技术与电镜技术结合的产物。该项技术是利用带有特殊标记的抗体与相应抗原相结合,由于带标志物的抗体形成一定的电子密度而在电子显微镜下可观察到相应抗原所在的部位^[13]。该技术很早就应用在腹泻病毒性病原体的诊断中,而对于细菌,该技术使用较少。因其价格昂贵,免疫电镜在肠道病原体检测的临床应用中并不多见,在科研领域内有一定的应用前景。

1.4 分子生物学检测法

1.4.1 普通 PCR 技术 PCR 是在体外将微量 DNA 进行扩增检测的技术。PCR 检测需先提取粪便中的总 DNA 或提取 RNA 逆转录得到 DNA,再以不同病原体的引物进行 PCR 扩增。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离,在紫外灯下观察其片段大小。PCR 具有灵敏度高、特异性强的特点,是目前应用最为广泛的检测手段,但相较更新方法,其操作步骤多,已呈现出被淘汰的趋势。

1.4.2 荧光定量 PCR 在普通 PCR 体系中加入 1 对引物的同时加入一个特异性的荧光探针,每进行 1 次扩增,就形成荧光分子,实现荧光信号累积与 PCR 产物形成完全同步。因其操作简便、灵敏度高,已广泛应用于诸如病毒、霍乱弧菌、轮状病毒、副溶血性弧菌、金黄色葡萄球菌、菌痢疾杆菌、沙门菌等的检测^[14]。该方法准确性好、灵敏度高、快速有效,是一种较为理想的肠道病原体检测方法,目前已被广泛应用于各类检测机构的日常检测中^[15],未来一段时间内,仍将是临床和科研领域内重要的检测手段。

1.4.3 多重 PCR 多重 PCR 即在同一体系中加入 2 对及以上的引物进行扩增。多重 PCR 既能检测不同种类病原体,也能检测同一病原体的不同分型,其在

轮状病毒、诺如病毒、大肠杆菌等肠道病原体的检测中已有广泛应用^[16]。因同时加入多对引物,引物之间存在相互干扰的问题。针对多重 PCR 存在的引物间相互干扰和容易形成引物二聚体等问题,滕勇勇^[17]研究了基于同源加尾系统的多重 PCR 技术,即相同标签辅助-无引物二聚体系统,其目的是消除 PCR 中的引物二聚体^[18]。该系统有低浓度的加尾引物和高浓度的尾巴引物 2 种引物。加尾引物的 3' 端为特异性结合序列,5' 端是添加的通用尾巴序列,高浓度的尾巴引物序列与加尾引物 5' 端的通用尾巴相同。其原理为:在 PCR 过程中,加尾引物首先与模板发生特异性结合,扩增形成初始 PCR 产物,该产物两端均含有与尾巴引物相同(互补)的序列。若此时加尾引物之间形成引物二聚体,由于其两端存在有互补的序列,形成的引物二聚体会各自形成稳定的发夹结构,而该结构会阻止下一个循环的扩增,从而有效减少引物二聚体的形成。低浓度的加尾引物消耗完以后,高浓度的尾巴引物会与初始 PCR 产物发生特异性结合,以初始 PCR 产物为模板至扩增完成。该方法的建立,可明显减少引物二聚体的形成,但增加了操作的复杂性,因此应用较少。

同普通 PCR 相比,多重 PCR 检测更为快速,可同时检测多种病原体,是对 PCR 检测技术的重要改进。结合荧光实时定量手段,多重 PCR 技术具有广阔的应用前景,在未来的临床和实验室检测领域将发挥重要的作用。

1.4.4 环介导等温扩增技术 环介导等温扩增技术是一种基于具有链置换活性的 DNA 聚合酶而开展的核酸扩增技术^[19]。该方法具有恒温、快速、特异性强、结果直观等优点,且不需要昂贵的仪器,已广泛应用于多种肠道病原体的检测,尤其是在现场检测、快速检测中应用较多。其在未来有可能替代 PCR 技术,成为临床和科研领域内重要的病原检测手段。

1.4.5 基因芯片技术 基因芯片又称 DNA 芯片或生物芯片,其原理是将大量的探针分子固定在支持物上,通过 DNA 分子之间碱基互补配对来检测被测样本是否含有特定的片段。DONATIN 等^[20]建立了 7 种肠道病毒和 33 种肠道致病菌的基因芯片,结果显示具有良好的灵敏度和特异性。因其价格昂贵,目前并不作为临床常规检测手段。但该方法具有高通量的特点,是科研领域内进行病原筛选的重要方法,在未来仍将具有广阔的应用前景。

1.4.6 再测序芯片技术 再测序芯片除具有传统芯片的一般优点外,还具有测序的功能。目前再测序芯片已用于呼吸道和肠道病原体的检测。王佶^[21]建立了一种可同时检测 14 种轮状病毒,7 种杯状病毒,8 种星状病毒,28 种肠道病毒和 16 种少见致泻病毒的芯片。该方法具有高通量、高灵敏度的特点,对于未知的样本,有较好的检出能力。但是同生物芯片一样,因价格昂贵,限制了其在临床领域内的大规模推

广应用。而在科研领域内,该方法具有良好的应用前景,尤其在肠道菌群研究领域内,将发挥重要作用。

1.4.7 悬浮芯片技术 悬浮芯片技术是一种新型的高通量生物芯片技术。将激光技术、流式细胞术、应用流体学等技术结合在一起,其检测载体为悬浮在液相中具有分类荧光编码的微球,该技术有高通量、灵敏度高、特异性强、检测快速、重复性好等优点。目前,国外已研发一系列的商品化检测试剂盒,且该技术也是被美国 FDA 批准用于临床诊断的唯一一种新型生物芯片产品。该方法受限于研究条件和实验设备,在临床领域内应用较难,在科研领域内的应用还有待观察。

1.4.8 熔解曲线技术 熔解曲线技术是替代电泳分析的技术^[22],其原理为不同的 DNA 双螺旋结构降解一半的温度值,即熔解温度不同,以此区分不同 DNA 双链,判断产物的特异性。在荧光定量 PCR 扩增结束后,通过逐渐增加温度来使 DNA 双链变性,同时监测记录不同温度条件下的荧光信号,形成一条熔解曲线。熔解曲线上有一特征峰,即对应了扩增产物的熔解温度,若出现非单一峰,则提示扩增产物不纯。该方法仅限于和染料法而非探针法的荧光定量 PCR 结合使用,是对荧光定量 PCR 检测技术的辅助。

1.4.9 16S rRNA 测序技术 细菌 rRNA 按沉降系数不同分为 3 种,分别为 5S rRNA,16S rRNA,24S rRNA。16S rDNA 是细菌染色体上编码 16S rRNA 相对应的 DNA 序列,其存在于所有的细菌染色体基因中。16S rDNA 具有高度的保守性和特异性,且该基因序列足够长(包含约 50 个功能域)。16S rDNA 中有多个保守性区段,根据这些保守区可以设计出细菌通用引物,继而扩增出所有细菌 16S rDNA 片段,这些引物对细菌是特异性的,不会与非细菌的 DNA 相互作用,16S rDNA 的可变区可以用来区分不同的细菌。该方法能获得粪便中所有的菌属构成及其比例,对于不明原因引起的腹泻,有较好的筛查效果。因其具有高通量、高特异性、高灵敏度的特点,被广泛应用于肠道菌群研究中,成为肠道菌群研究的首选方法^[23]。但由于该方法周期较长,成本偏高,不适用于临床应用。

1.5 荧光标记噬菌体技术 噬菌体是一种在细菌体内繁殖的特殊生物,具有严格的宿主特异性,只寄居在易感宿主菌体内,因此可利用不同的噬菌体,对其宿主细菌进行鉴定。姜琴^[24]利用荧光标记的噬菌体,实现了沙门菌、大肠杆菌、志贺菌的单一和联合检测。其结果表明,该方法具有快速、高特异性的特点,但因其检测范围有限,且对特异性噬菌体的处理要求较为严格,该方法应用并不广泛^[25],在临床较难推广,但在科研领域内或将成为一种备选检测手段。

1.6 粪便联合检测技术 腹泻是由多因素、多病原引起的症状,单一的检测无法满足其诊断的需求。联合检测技术是指同时或系统地运用 2 种或 2 种以上

技术的检测方法,既能增加检测的范围,同时也能增加灵敏度和特异性。目前较为常见的有分离培养和免疫学方法相结合^[26]、免疫学方法和分子生物学方法相结合等。联合检测能适应不同的检测需求和不同的检测条件,灵活应用各种联合检测方法对于肠道病原体的检测有重要意义^[27]。因此,未来的联合检测技术必将在临床和科研领域内得到广泛应用,成为腹泻检测的主要方法。

2 结 语

腹泻是一类严重危害人类健康的疾病,是由多因素、多病原引起的临床症状,粪便病原体的检测是治疗腹泻的基础。因受检测条件限制,目前没有统一的检测规范。本文对目前实验室和临床常用的检测方法进行对比,得出以下结论:粪便常规检测适合大部分的检测单位,是肠道病原体检测的基础;细菌培养适用范围较为广泛,可作为基层单位的常规检测手段,也可作为疾控中心的筛查手段及医院的辅助检测手段;ELISA 和免疫胶体金技术,可作为传染性腹泻已有怀疑病原体的确诊,也可作为现场的快速筛查;PCR、多重 PCR、荧光定量 PCR 技术,可作为有条件单位的常规检测方法;基因芯片技术、再测序芯片技术、16S rRNA 测序技术等检测方法成本较高,目前应用较为有限,但随着科技的进步以及人们对腹泻诊断的特异性、灵敏度、快速性等要求进一步提高,这些新技术在未来将会成为肠道病原体检测手段的重要组成部分。

参考文献

- [1] 姚静,王文婷,宁岩. 感染性腹泻流行现状分析及护理管理对策研究[J]. 中国卫生产业, 2015, 119(20): 119-121.
- [2] KOSEK M, BERN C, GUERRANT R L. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000[J]. Bull World Health Organ, 2003, 81(3): 197-204.
- [3] FARTHING M, SALAM M A, LINDBERG G, et al. Acute diarrhea in adults and children: a global perspective [J]. J Clin Gastroenterol, 2013, 47(1): 12-20.
- [4] 李云,李忠涛,夏正武,等. 真菌性腹泻的病原体检测及临床意义[J]. 现代预防医学, 2013, 40(4): 730-731.
- [5] 陆玉静,丛玉隆,孙魁明,等. 粪便常规检查临床价值的探讨[J]. 现代检验医学杂志, 2008, 23(3): 19-20.
- [6] 张德友,何晓青,程莉,等. 轮状病毒检测技术概述[J]. 现代农业科学, 2009, 16(2): 11-12.
- [7] 王江玉. 细菌培养法在食源性致病检测中的应用分析[J]. 临床合理用药杂志, 2012, 5(24): 116.
- [8] 温来欣,司萍,杨东平,等. 诺如病毒抗原的异硫氰酸荧光素标记-酶联免疫吸附检测法[J]. 环境与健康杂志, 2015, 32(3): 252-255.
- [9] 李显,曾晓燕,郭喜玲,等. 实验室感染 SARS 病例的血清

- 学验证[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2006, 26(1): 9.
- [10] 施前锋,潘新娣,邵伟芳,等. 金标免疫层析法检测儿童腹泻粪便标本轮状病毒及结果分析[J]. 中华全科医学, 2014, 12(6): 982-983.
- [11] 萨仁高娃,其木格,吴岩. 胶体金免疫电泳技术及其应用[J]. 内蒙古医学院学报, 2007, 29(5): 373-377.
- [12] MUKHERJEE P, GHOSH S, RAMAMURTHY T, et al. Evaluation of a rapid immunochromatographic dipstick kit for diagnosis of cholera emphasizes its outbreak utility[J]. Jpn J Infect Dis, 2010, 63(4): 234-238.
- [13] 王浩然. UPT 十通道免疫层析技术在食源性致病菌多重检测中的应用[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2011.
- [14] 夏体娇. 诺如病毒荧光定量检测方法的建立及氯灭活诺如病毒消毒规律研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2012.
- [15] 雷永良,叶碧峰,梅建华,等. 实时荧光定量 PCR 技术在群体感染性腹泻病原体快速筛查中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(6): 1000-1003.
- [16] 吴海娟,谢淑娴,刘萍,等. 改良分子信标多重荧光 PCR 快速检测产毒性大肠杆菌[J]. 中国热带医学, 2015, 15(7): 785-788.
- [17] 滕勇勇. 基于 HAND 系统的腹泻病原体多重 PCR 检测方法的建立和应用研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2014.
- [18] BROWNIE J, SHAWCROSS S, THEAKER J, et al. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(16): 3235-3241.
- [19] Tanner N A, Evans T C. Loop-mediated isothermal amplification for detection of nucleic acids[J]. Curr Protoc Mol Biol, 2014, 105(15): 14-15.
- [20] DONATIN E, BUFFET S, LEROY Q, et al. A DNA microarray for the versatile diagnosis of infectious diarrhea [J]. APMIS, 2013, 121(7): 634-642.
- [21] 王估. 基于电泳和再测序芯片的腹泻症候群检测方法的建立及初步应用[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2014.
- [22] 陈清凉. 探针熔解曲线技术在食源性致病菌检测分型中的应用[D]. 厦门: 厦门大学, 2014.
- [23] 张守印,张集,叶长芸,等. 用 16S rRNA 基因克隆文库研究腹泻粪便中菌群分布[J]. 临床检验杂志, 2008, 26(3): 164-166.
- [24] 姜琴. 荧光标记噬菌体技术检测食源性肠道病原菌方法的建立及初步应用[D]. 南京: 南京农业大学, 2009.
- [25] 韩海英,于富丽,张金宝,等. 噬菌体试验在细菌质控中的应用[J]. 内蒙古农业大学学报, 2007, 28(1): 207-208.
- [26] 管红霞. 腹泻标本中病原体快速检测流程的建立与评价[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2014.
- [27] 陈如昌,王利健. 粪便联合检测致病病原体在婴幼儿腹泻中的应用[J]. 中华医院感染学杂志, 2009(12): 1610-1612.