

## PCR法检测粪便样本溶组织内阿米巴的初步研究\*

庞华胜<sup>1</sup>, 匡紫微<sup>1</sup>, 杨练<sup>2</sup>, 孟妍明<sup>1</sup>, 张春莹<sup>1</sup>, 马莹<sup>1△</sup>

1. 四川大学华西医院 实验医学科(成都 610041); 2. 成都市妇女儿童中心医院 检验科(成都 610073)

**【摘要】** 目的 建立直接检测粪便样本中溶组织内阿米巴的PCR方法。方法 根据溶组织内阿米巴标准株基因组中小亚基核糖体RNA (small subunit ribosome RNA, SSU rRNA) 序列合成4对特异性引物(2对自主设计引物和2对参考引物), 建立PCR检测方法, 用该方法对221例临床腹泻患者粪便标本进行检测, 同时采用病原学碘染涂片镜检法和酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测抗原, 对3种方法的阳性率进行比较, 并采用Kappa检验进行一致性分析, 分析3种检测方法结果的准确性。结果 4对引物均扩增出溶组织内阿米巴特异的片段, 建立了粪便样本溶组织内阿米巴检测的PCR法。选择其中2对引物(1对自主设计引物和1对参考引物)对221例粪便样本进行PCR扩增, 同时用碘染涂片镜检法查病原体, 用ELISA法进行抗原检测, 3种方法溶组织内阿米巴阳性检出率分别为2.26%、0.90%和9.50%。差异有统计学意义( $\chi^2=23.34, P<0.01$ )。PCR法与碘染涂片镜检法比较, Kappa值为0.216, 一致性微弱; PCR法与ELISA法比较, 一致性差, Kappa值为-0.134。PCR法的结果与临床诊断的一致性最好。结论 本研究通过自行设计引物建立的粪便样本溶组织内阿米巴PCR检测法在准确性上优于镜检法和ELISA抗原检测法, 为该方法用于临床诊断提供了实验基础。

**【关键词】** 溶组织内阿米巴 PCR ELISA SSU rRNA 镜检法

**Preliminary Study on PCR Method for Laboratory Diagnosis with Fecal Specimens of *Entamoeba histolytica* Infection** PANG Hua-sheng<sup>1</sup>, KUANG Zi-wei<sup>1</sup>, YANG Lian<sup>2</sup>, MENG Yan-ming<sup>1</sup>, ZHANG Chun-ying<sup>1</sup>, MA Ying<sup>1△</sup>. 1. Department of Laboratory Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Chengdu Women's and Children's Central Hospital, Chengdu 610073, China

△ Corresponding author, E-mail: majiying72@hotmail.com

**【Abstract】** **Objective** To develop a PCR method for *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) detection in fecal specimens, and to compare the performance of PCR to that of microscopy and ELISA. **Methods** Two pairs of self-designed primers and 2 pairs of primers from references based on small subunit ribosome RNA (SSU rRNA) fragment of *E. histolytica* standard strain were synthesized. DNA from *E. histolytica* reference strain were amplified by the conventional PCR using the 4 pairs of primers. 221 stool samples from diarrhea patients were collected and detected for *E. histolytica* by three methods: *Entamoeba* trophozoites and cysts detection by microscopy, *E. histolytica*-specific antigen detection using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (*E. HISTOLYTICA II*), amplification of SSU rRNA fragment of *E. histolytica* by PCR method. Positive rate of three methods were compared by chi-square test, and Kappa test was applied to determine the concordance among the three methods. **Results** Specific fragments of *E. histolytica* were amplified by the PCR method we developed in this study. Positive rates of PCR, microscopy and ELISA were 2.26%, 0.90% and 9.50%, respectively. The positive rates of the three methods were significantly different ( $\chi^2=23.34, P<0.01$ ). The Kappa value of PCR and microscopy was 0.216, and that of PCR and ELISA method was -0.134, both of which showed a weak consistency. PCR results showed best consistency with clinical diagnosis. **Conclusion** The PCR method we established in this study has a better performance in accuracy than microscopy and ELISA have in laboratory diagnosis of *E. histolytica* infection.

**【Key words】** *Entamoeba histolytica* PCR ELISA SSU rRNA Microscopy

溶组织内阿米巴是唯一具有致病性的内阿米巴属原虫, 至今在全球范围内均有流行<sup>[1]</sup>。据世界卫生组织(WHO)估计, 每年约有5000万人发生感染, 可导致4~11万人死亡<sup>[2]</sup>, 我国是溶组织内阿米巴感染率最高的亚洲国家之一。生理盐水涂片法和碘染涂片法是最常用的病原学镜检方法, 但该方法要求检测人员具有

丰富的形态学镜检经验, 结果具有一定主观性, 易漏检。虽然对同一标本进行重复检测可提高检出率, 但仍无法与光镜下形态结构几乎相同的非致病性的迪斯帕内阿米巴进行区分<sup>[3]</sup>。免疫学诊断方法较病原学诊断方法简单客观, 某些抗原检测试剂可区别溶组织内阿米巴和迪斯帕内阿米巴, 但其灵敏度和特异度存在一定争议。随着分子生物学技术的发展, PCR法逐渐应用于溶组织内阿米巴的检测, 溶组织内阿米巴和迪

\* 四川省科技厅支撑计划项目(No. 2016SZ0023)资助

△ 通信作者, E-mail: majiying72@hotmail.com

斯帕内阿米巴的核酸序列存在稳定差异,利用PCR方法可以将两者进行区分。本研究利用溶组织内阿米巴标准株基因组DNA,拟建立快速、准确的PCR方法用于检测粪便样本中的溶组织内阿米巴,并与碘染涂片镜检法和酶联免疫吸附实验(ELISA)抗原检测法的结果进行对比,期望为临床快速准确地诊断溶组织内阿米巴感染提供新的方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 PCR检测溶组织内阿米巴方法的建立

#### 1.1.1 溶组织内阿米巴标准株基因组DNA来源

标准株(HM-1:IMSS)基因组DNA(ATCC, 30459D, USA),质量浓度为50 ng/ $\mu$ L。

**1.1.2 引物设计** 共采用4对基于溶组织内阿米巴小亚基核糖体RNA(small subunit ribosome RNA, SSU rRNA)基因的特异性引物进行PCR检测,分别为Eh-f/Eh-r、Eh239f/Eh-88r、Eh-60f/Eh-60r以及Eh-31f/Eh-31r,其中前2对引物设计参考文献<sup>[4-5]</sup>,后2对为本研究自主设计,以NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上溶组织内阿米巴SSU rRNA的序列为依据,利用Oligo 7.0设计并筛选出2对最佳引物,即为Eh-60f/Eh-60r和Eh-31f/Eh-31r。所有引物均由成都擎科梓熙生物技术

表 1 4对溶组织内阿米巴特异性引物序列  
Table 1 Sequences of 4 pairs of specific primers of *Entamoeba histolytica*

Primers name	Nucleotide sequence (5' to 3')	Annealing temperature/ $^{\circ}$ C	Target fragment length/bp
Eh-f	AACAGTAATAGTTTCTTTGGTTAGTAAAA	50	134
Eh-r	CTTAGAATGTCATTTCTCAATTCAT		
Eh-239f	ATTGTCGTGGCATCCTAACTCA	58	172
Eh-88r	GCGGACGGCTCATTATAACA		
Eh60-f	AAGTATAAAGACCAAGTAG	50	199
Eh60-r	TGTCGTGGCATCCTAACT		
Eh31-f	TGATGTTAAAGATTAAGCCATG	50	304
Eh31-r	GTCCTCGATACTACCAACTGAT		

有限公司(TSINGKE)合成,引物序列见表1。

**1.1.3 PCR扩增** 以溶组织内阿米巴标准株DNA为模板,利用4对引物进行PCR扩增。反应条件为95  $^{\circ}$ C预变性5 min,然后95  $^{\circ}$ C变性30 s,退火温度50~58  $^{\circ}$ C(表1)30 s,72  $^{\circ}$ C延伸30 s,共35个循环,最后72  $^{\circ}$ C延伸10 min。PCR反应体系:2 $\times$ T5 Super PCR Mix (Colony) 12.5  $\mu$ L,上、下游引物(10 ng/ $\mu$ L)各1  $\mu$ L,DNA模板1  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu$ L,总体积25  $\mu$ L。以去离子水替代DNA模板作为空白对照。

**1.1.4 凝胶电泳分析及测序** 取5  $\mu$ L PCR产物以20 g/L琼脂糖凝胶(含5  $\mu$ L/100 mL溴化乙锭)进行电泳,用紫外凝胶成像仪观察扩增条带。用Sanger双脱氧链终止法对普通PCR产物进行双向测序,并利用BLAST分析工具在序列数据库中对查询序列进行同源性比对,确定PCR扩增产物是否为目的片段。测序工作由成都擎科梓熙生物技术有限公司(TSINGKE)完成。

**1.1.5 DNA模板最低检测质量浓度测定** 为比较4对不同引物的灵敏度,将质量浓度为50 ng/ $\mu$ L的

DNA用去离子水进行系列梯度稀释,稀释倍数依次为10、10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>、2 $\times$ 10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>7</sup>、5 $\times$ 10<sup>7</sup>和10<sup>8</sup>倍,稀释后的质量浓度分别为5 ng/ $\mu$ L、500 pg/ $\mu$ L、50 pg/ $\mu$ L、5 pg/ $\mu$ L、500 fg/ $\mu$ L、250 fg/ $\mu$ L、50 fg/ $\mu$ L、5 fg/ $\mu$ L、1 fg/ $\mu$ L和0.5 fg/ $\mu$ L。分别以相应质量浓度的DNA为模板扩增4对引物,并对产物进行电泳分析,观察不同质量浓度DNA模板的扩增效果。

### 1.2 PCR检测法与镜检法、ELISA抗原检测法的比较

**1.2.1 样本收集** 收集2016年9月至2017年3月临床腹泻患者的新鲜稀便或水样便样本221例,其中112例患者来自于四川大学华西医院(女性58例,男性54例,患者年龄18~57岁),109例来自于成都市妇女儿童中心医院(女童50例,男童59例,患者年龄3月~5岁)。所有样本按临床常规镜检流程完成检验后,于24 h内进行ELISA抗原检测和DNA提取,否则将样本置于-20  $^{\circ}$ C保存备用,避免反复冻融。

**1.2.2 碘染涂片镜检法** 在洁净的载玻片上滴加1滴卢戈氏碘液,用竹签挑取粪便中的可疑部分(黏液或血液部分)在载玻片上涂抹成均匀的粪膜,加上盖玻片后

在显微镜下查找溶组织内阿米巴滋养体或包裹。

**1.2.3 ELISA抗原检测法** 采用第2代溶组织内阿米巴特异性抗原检测试剂盒E.HISTOLYTICA II (Alere公司)检测粪便样本中的粪便中Gal/GalNAc黏附凝集素抗原,所有操作流程均按照试剂盒中说明进行,酶标仪检测其吸光度(A)值。实验有效性判定:阴性对照A值 $<0.15$ ,当阳性对照A值-阴性对照A值 $\geq 0.5$ 时证明实验结果有效。阳性样本的判定:当测试样本的A值-阴性对照A值 $\geq 0.05$ 时判定为阳性,否则为阴性。

**1.2.4 PCR检测法** 采用Fast DNA Spin Kit试剂盒(MP Biomedicals公司)提取粪便样本中DNA,所有操作流程均按照试剂盒中说明进行。以提取的样本DNA为模板,以Eh239f/Eh-88r和Eh-60f/Eh-60r为引物进行PCR扩增,PCR反应体系和反应条件与1.1中方法相同。采用相同方法、利用迪斯帕内阿米巴的特异引物<sup>[6]</sup>(成都擎科梓熙生物技术有限公司合成)对ELISA检测阳性标本进行基因检测。

### 1.3 统计学方法

采用配对资料的卡方检验对3种溶组织内阿米巴检测方法的阳性率进行比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用Kappa检验对这3种检测方法的结果进行一致性检验。

## 2 结果

### 2.1 PCR方法的建立

以溶组织内阿米巴标准株基因组DNA为模板,4对引物均扩增出单一的清晰条带,4条条带的片段长度与对应引物Eh-f/Eh-r(134 bp)、Eh-239F/Eh-88R(172 bp)、Eh-60f/Eh-60r(199 bp)和Eh-31f/Eh-31r(304 bp)的目的片段长度吻合,未出现非特异性条带,空白对照为阴性(图1)。

用Sanger双脱氧链终止法对普通PCR产物进行双向测序,分别获得4段与Eh-f/Eh-r、Eh-239F/Eh-88R、Eh60-f/Eh60-r和Eh-31f/Eh-31r对应的碱基序列,长度分别为128 bp、158 bp、185 bp和288 bp,与对应的目的片段长度基本一致。将测序所得碱基序列在NCBI网站进行BLAST分析,证实4对引物扩增出的产物均为溶组织内阿米巴目的片段。

分别以不同质量浓度的DNA为模板,对4对溶组织内阿米巴特异性引物进行PCR扩增,扩增产物进行20 g/L琼脂糖凝胶电泳分析,结果见图2。其中Eh-239f/Eh-88r和Eh-60f/Eh-60r两对引物从最高的DNA模板质量浓度5 ng/ $\mu$ L至5 fg/ $\mu$ L均扩增出相应大小的目的条带,且目的条带的清晰度随着DNA模板质量浓度的

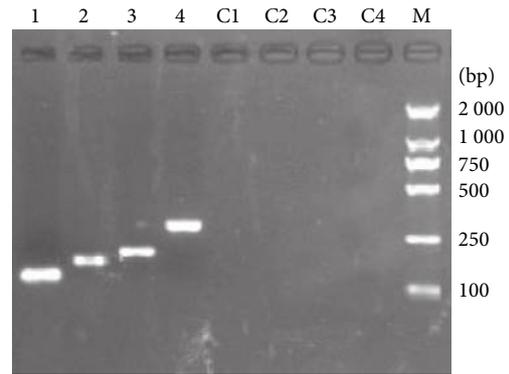


图1 普通PCR产物电泳图(20 g/L琼脂糖凝胶电泳)

Fig 1 Electrophoresis results of PCR products (20 g/L agarose gel electrophoresis)

1-4: PCR products of primer Eh-f/Eh-r, Eh-239F/Eh-88R, Eh-60f/Eh-60r, Eh-31f/Eh-31r, respectively; C1-C4: Blank control of primer Eh-f/Eh-r, Eh-239F/Eh-88R, Eh-60f/Eh-60r, Eh-31f/Eh-31r, respectively; M: DNA marker DL2000

降低而下降。其中引物Eh-f/Eh-r最低能检测到的DNA模板质量浓度为5 pg/ $\mu$ L,而引物Eh-31f/Eh-31r最低能检测到的DNA模板质量浓度为250 fg/ $\mu$ L。因此后续检测以Eh239f/Eh-88r和Eh-60f/Eh-60r为引物。

### 2.2 三种检测方法结果比较

分别采用碘染涂片镜检法、ELISA抗原检测法和PCR法对221例粪便样本进行溶组织内阿米巴检测,结果显示,碘染涂片镜检法检出2例溶组织内阿米巴阳性,阳性检出率为0.90%;ELISA法抗原检测21例抗原阳性,阳性检出率为9.50%;分别以Eh239f/Eh-88r和Eh-60f/Eh-60r为引物的PCR检测结果一致,均检出5例阳性溶组织内阿米巴样本,阳性检出率为2.26%。ELISA检测抗原阳性的21例中,2例碘染涂片镜检法及PCR法均为阳性,2例碘染涂片镜检法阴性、PCR法阳性,17例碘染涂片镜检法及PCR法均为阴性,进行迪斯帕内阿米巴PCR检测,2例阳性。PCR阳性的5例中包括碘染涂片镜检法和ELISA抗原检测法均为阳性2例,碘染涂片镜检法阴性而ELISA抗原检测法阳性2例,碘染涂片镜检法及ELISA抗原检测法均阴性1例。结合临床情况,PCR法的检测结果与临床诊断的一致性最好。

采用配对资料的卡方检验对3种溶组织内阿米巴检测方法的阳性率比较,差异有统计学意义( $\chi^2 = 23.34$ ,  $P < 0.01$ );两两比较:碘染涂片镜检法和ELISA法比较, $\chi^2 = 17.05$ ,  $P < 0.01$ ;碘染涂片镜检法和PCR法相比, $\chi^2 = 9.38$ ,  $P < 0.05$ ;ELISA法和PCR法比较, $\chi^2 = 12.50$ ,  $P < 0.01$ ;差异均有统计学意义。

采用Kappa检验对3种溶组织内阿米巴检测方法结果一致性进行分析。PCR方法与碘染涂片镜检法比较,Kappa值为0.216,一致性微弱;PCR方法与ELISA法

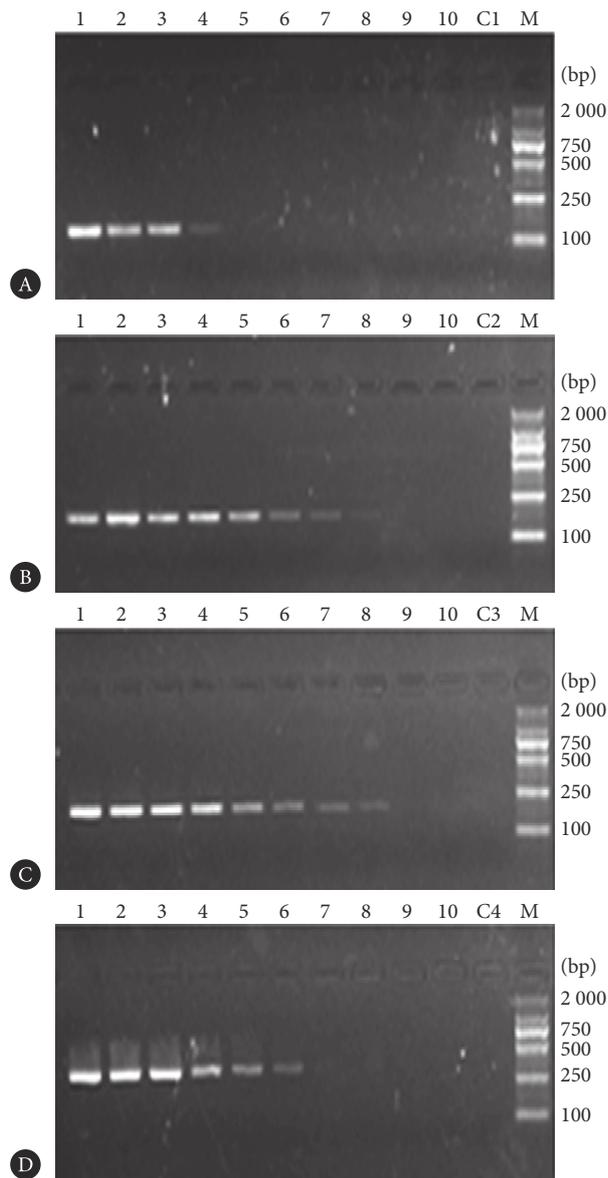


图2 4对引物普通PCR最低检测质量浓度比较

Fig 2 Limitation detecting mass concentrations of 4 pairs of primers for PCR

A: Eh-f/Eh-r; B: Eh-239F/Eh-88R; C: Eh-60f/Eh-60r; D: Eh-31f/Eh-31r; 1-10: DNA templates with different mass concentrations( 1: 5 ng/ $\mu$ L, 2: 500 pg/ $\mu$ L, 3: 50 pg/ $\mu$ L, 4: 5 pg/ $\mu$ L, 5: 500 fg/ $\mu$ L, 6: 250 fg/ $\mu$ L, 7: 50 fg/ $\mu$ L, 8: 5 fg/ $\mu$ L, 9: 1 fg/ $\mu$ L, 10: 0.5 fg/ $\mu$ L); C1-C4: Blank control of primer; M: DNA marker DL2000

比较,  $Kappa$ 值为 $-0.134$ , 一致性差。

### 3 讨论

溶组织内阿米巴是临床上引起腹泻最常见的肠道寄生虫之一<sup>[7]</sup>, 其病死率在原虫性寄生虫病中排列第二<sup>[8]</sup>, 仅次于疟疾, 严重危害人类健康。迪斯帕内阿米巴与溶组织内阿米巴形态相近, 生活史相同, 却无致病性, 但感染率可能远高于溶组织内阿米巴<sup>[9]</sup>。根据2015年在自然人群中开展的全国人体重要寄生虫病现

状调查数据显示, 新疆维吾尔自治区溶组织内阿米巴感染率为2.23%, 湖南省感染率为0.004%, 安徽省感染率为0.05%<sup>[10-12]</sup>, 不同地区的感染率存在较大的差异。PCR方法不仅灵敏度、特异度高, 还可以鉴别形态学一致的溶组织内阿米巴和迪斯帕内阿米巴。在发达国家, 利用PCR法检测样本中的溶组织内阿米巴已经成为临床实验室的常规检测项目, 但在我国大多数实验室对溶组织阿米巴的检测仍然停留在镜检的阶段, 导致相当病例的漏诊和误诊。在本研究建立的PCR方法中, 选用的4对引物均能扩增出特异的目的条带。进一步对4对引物灵敏度进行比较, 其中Eh-60f/Eh-60r和Eh-239F/Eh-88R灵敏度最高, 最低能检测的DNA模板质量浓度为5 fg/ $\mu$ L, Eh-f/Eh-r和Eh-31f/Eh-31r在普通PCR方法中的灵敏度表现不佳。在3种方法的比较中, ELISA抗原检测法的阳性率最高, 其次是PCR法, 碘染涂片镜检法最低, 3种检测方法阳性率的差异均有统计学意义。

5例PCR阳性样本中, 有2例样本的3种检测方法的结果均为阳性, 这2例样本的临床诊断支持溶组织内阿米巴感染; 2例样本碘染涂片镜检法结果为阴性, 而ELISA结果阳性, 通过回顾病历, 这2例样本的临床资料亦倾向于溶组织内阿米巴感染; 最后1例PCR阳性样本的碘染涂片镜检法和ELISA结果均为阴性, 而这1例样本的临床诊断支持溶组织内阿米巴感染, 提示碘染涂片镜检法和ELISA法漏检了该样本。综上所述, 本研究认为这5例PCR阳性样本的结果均与临床诊断吻合。

碘染涂片镜检法检出的2例样本PCR及ELISA法均为阳性, 临床诊断也相吻合, 从这一点看, 碘染涂片镜检法的特异度不错, 但另一方面, 根据ELISA、PCR的结果以及临床资料回顾, 碘染涂片镜检法出现了漏检, 提示其灵敏度较低。实际上碘染涂片镜检法阳性率与检测人员的镜检经验有很大的关系, 不同人员的检出率相差较大, 文献资料报道的阳性率从10%到80%以上不等<sup>[3]</sup>。本研究是按照临床工作中镜检常规流程进行检测, 阳性率可能比专人专门检测稍低, 但却是临床镜检情况的真实反映。

ELISA法阳性的21例样本中, 4例的结果与PCR相一致, 17例与PCR结果不同。这17例病例中有6例为住院患者, 有完整的诊疗记录, 但均不支持溶组织内阿米巴感染的诊断。利用迪斯帕内阿米巴的特异性引物对这17例抗原阳性样本进行检测, 结果显示其中2例为迪斯帕内阿米巴, 因此我们认为本研究中使用的ELISA检测试剂盒其特异性尚有待进一步研究, 不能

完全区分溶组织内阿米巴和迪斯帕内阿米巴,其过高的阳性检出率可能致误诊率高。

本研究采用的ELISA试剂盒为TECHLAB第2代溶组织内阿米巴ELISA试剂盒,是目前市场上评价较好的一种试剂盒,但其检验性能存在一定争议。STARK等<sup>[4]</sup>比较了本研究采用的*E.HISTOLYTICA* II kit和*Entamoeba* CELISA PATH kit(Cellabs, Brookvale, Australia)两个粪抗原试剂盒的检测性能,与PCR方法相比,*Entamoeba* CELISA PATH kit的灵敏度和特异度分别为28%和100%,而*E.HISTOLYTICA* II kit的检验性能则不理想,18例阳性样本,该试剂盒检测均未检出,检出的3例阳性样本结果证实为迪斯帕内阿米巴和莫氏内阿米巴,而非致病性的溶组织内阿米巴,提示ELISA检测试剂盒与某些非致病性内阿米巴存在交叉反应,这与我们的实验结果较为相似。而GONIN等<sup>[15]</sup>和MIRELMAN等<sup>[16]</sup>的研究则表明该试剂盒在孟加拉国某地区调查人群中溶组织内阿米巴感染率的灵敏度和特异度分别达到89%~93%和95%~100%。但GONIN和MIRELMAN等的研究均在溶组织内阿米巴高度流行区域进行,而我们国家的感染率却不高,这种感染率的不同可能会引起试剂盒的效果之间存在差异。另外不同流行地区的溶组织内阿米巴株可能存在基因型的不同,导致其表达的抗原成分有差异,也可能导致相同试剂盒对不同地区的检出率有一定差异。

本研究建立的PCR检测方法是以溶组织内阿米巴SSU rRNA基因作为目的片段。SSU rRNA基因参与编码溶组织内阿米巴核糖体小亚基,是一段高度保守的核苷酸序列,在溶组织内阿米巴和迪斯帕内阿米巴之间存在着稳定的遗传差异,具有多拷贝性,比单拷贝基因的DNA片段更易被检测,是区别两者的一个重要靶基因,被广泛应用于两种内阿米巴原虫的检测。这也是本研究选择SSU rRNA基因片段建立PCR方法用于临床粪便样本溶组织内阿米巴检测的原因。

本研究中,PCR检测方法的最低DNA模板质量浓度为0.5 fg/ $\mu$ L,表明该方法具有较高的灵敏性,适用于因送检不及时或服药导致的样本原虫数量稀少或形态不典型的情况,可对溶组织内阿米巴的各个生活史阶段进行检测。同时利用商品化试剂盒,可以方便快捷提取粪便样本中的溶组织内阿米巴滋养体或包囊DNA。PCR方法可同时对大批量样本进行检测,提高检测效率,减少镜检人员的依赖及主观影响。本研究首次应用PCR的方法对我国西南地区临床粪便样本中的溶组织内阿米巴进行调查检测,阳性率为0.90%,比范道勇等<sup>[17]</sup>利用碘液涂片镜检法0.10%的阳性率高,可

能原因是本研究的样本为来源于医院的患者,而后者是对当地居民进行的流行病学调查,两者的样本具有一定的选择偏倚,同时也与PCR检测方法本身的高灵敏性有关。镜检法、免疫学方法和PCR法3种检测方法各有优缺点:碘染涂片镜检法操作简单,成本低,是应用最广泛的溶组织内阿米巴检测方法,但灵敏度最低,对检验人员经验有要求,存在漏诊风险,且无法区分溶组织内阿米巴和迪斯帕内阿米巴,进行大规模检测耗时长;ELISA法检测抗原快速便捷,结果客观,检测人员无需丰富镜检经验,但是从现有文献报道和我们的实验结果来看,其检验效能也存在一定争议,存在误诊风险,因此采用国外的抗原检测试剂盒检测我国腹泻患者溶组织内阿米巴感染情况的可靠程度还需进一步验证。综合比较3种检测方法的结果以及病例回顾,本研究建立的PCR法相比镜检法和ELISA抗原检测法,PCR法显示了更好的准确性,并可对粪便样本的溶组织内阿米巴和迪斯帕内阿米巴进行区分,但进一步应用于临床检测仍需要更严格设计的大样本临床实验进行进一步确认。

综上所述,本研究建立了对粪便样本溶组织内阿米巴检测的PCR方法,自行设计引物的灵敏度不亚于甚至优于文献报道的引物。从已进行的临床对比试验来看,该PCR法的准确性高于镜检法和抗原检测法,为该方法用于临床诊断提供了实验基础并有望用于临床的辅助诊断。

## 参 考 文 献

- [1] MEHLHORN H. *Entamoeba* Species. Vienna : Springer Link, 2016: 70-210 [2018-06-23]. [https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-662-43978-4\\_1061](https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-662-43978-4_1061).
- [2] DUCHÊNE M. *Entamoeba*//Molecular Parasitology. Vienna : Springer Link, 2016: 325-379 [2018-06-23]. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-7091-1416-2\\_11](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-7091-1416-2_11).
- [3] ZEBRDAST N, YEGANEH F, GHARAVI MJ, et al. Simultaneous detection and differentiation of *Entamoeba histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium*, spp. in human fecal samples using multiplex PCR and qPCR-MCA. *Acta Tropica*, 2016, 162: 233-238 [2018-06-23]. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.07.004>.
- [4] VERWEIJ JJ, LAEIJENDECKER D, BRIENEN EA, et al. Detection and identification of *Entamoeba* species in stool samples by a reverse line hybridization assay. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(11): 5041-5045.
- [5] SKAPPAC C, AKIERMAN S, BELGA S, et al. Invasive amoebiasis: a review of *Entamoeba* infections highlighted with case reports. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2016, 28(7): 355-359.
- [6] GOMES TS, GARCIA MC, DE SOUZA CUNHA F, et al. Differential diagnosis of *Entamoeba* spp. in clinical stool samples using SYBR green

- real-time polymerase chain reaction. *Scientific World Journal*, 2014: 645084 [2018-06-23]. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/645084>.
- [7] XIMÉNEZ C, GONZÁLEZ E, NIEVES M, *et al.* Differential expression of pathogenic genes of *Entamoeba histolytica* vs *E. dispar* in a model of infection using human liver tissue explants. *Plos One*, 2017, 12(8): e0181962 [2018-06-23]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181962>.
- [8] FLETCHER SM, STARK D, HARKNESS J, *et al.* Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective. *CMR*, 2012, 25(3): 420–449.
- [9] VERKERKE HP, HANBURY B, SIDDIQUE A, *et al.* Multisite clinical evaluation of a rapid test for *Entamoeba histolytica* in stool. *JCM*, 2015, 53(2): 493–497.
- [10] 买买提江·吾买尔, 陈晓英, 伊斯拉音·乌斯曼, 等. 2015年新疆维吾尔自治区人体肠道原虫流行病学调查. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2016, 34(4): 361–365.
- [11] 金 伟, 郭见多, 刘道华, 等. 安徽省人体重点寄生虫病现状调查报告. *热带病与寄生虫学*, 2017, 15(1): 14–18.
- [12] 何 卓, 唐 阳, 李正祥, 等. 2015年湖南省人体重点寄生虫病流行现状调查. *实用预防医学*, 2017, 24(3): 291–296.
- [13] FOTEDAR R, STARK D, BEEBE N, *et al.* Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. *CMR*, 2007, 20(3): 511.
- [14] STARK D, HAL SV, FOTEDAR R, *et al.* Comparison of stool antigen detection kits to PCR for diagnosis of amebiasis. *JCM*, 2008, 46(5): 1678–1681.
- [15] GONIN P, TRUDEL L. Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* isolates in clinical samples by PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. *JCM*, 2003, 41(1): 237–241.
- [16] MIRELMAN D, NUCHAMOWITZ Y, STOLARSKY T. Comparison of use of enzyme-linked immunosorbent assay-based kits and PCR amplification of rRNA genes for simultaneous detection of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. *JCM*, 1997, 35(9): 2405–2407.
- [17] 范道勇, 王 力, 许汉英, 等. 四川泸定县人体重点寄生虫感染现状调查分析. *热带病与寄生虫学*, 2017, 15(1): 50–52.

(2018 – 10 – 13收稿, 2018 – 12 – 24修回)

编辑 沈 进