# 多重聚合酶連鎖反應：感染性腹瀉病原之診斷利器

蔡進相[1,2,3]　李南瑤[2,3]

[1]國立成功大學醫學院附設醫院斗六分院　內科部
國立成功大學醫學院附設醫院　[2]感染管制中心　[3]內科部感染科

腹瀉一直是人類公共衛生的重要議題。感染性腹瀉的處置，傳統以症狀評估為導向，檢驗以鏡檢與培養為主。多重聚合酶連鎖反應敏感度相對較高，已有許多商業化組套供檢驗單位使用，能快速檢驗甚至同時偵測到多種病原。多重聚合酶連鎖反應也有其侷限，例如引子互相干擾、引子特異性不夠導致偽陽性、無法區分寄生或是感染，且若無菌株則無法進一步分析。多重聚合酶連鎖反應診斷工具，適合用在嚴重腹瀉甚至下痢 (dysentery)、症狀持續超過三天無改善、免疫低下、男同志族群、疑似群聚或群突發事件調查，有助於抗生素管控、判斷防護等級、以及群突發或公衛疫情調查。（**感控雜誌 2022:32:91-98**）

**關鍵詞：** 多重聚合酶連鎖反應，感染性腹瀉，群突發，病原

## 前　言

自古以來，腹瀉就是一個困擾人類的大問題。屢次發生的大規模腹瀉疫情，數千年來不僅奪去無數性命，有時甚至因此改寫歷史。19 世紀後半葉，科學家確認細菌與病毒的存在，醫學界也陸續證實導致疫情的各種腸胃炎，是由細菌或病毒造成，包含霍亂、傷寒、痢疾、諾羅病毒、輪狀病毒，都有可能藉由糞口傳播導致嚴重的疫情。21 世紀的今日，發展中與低度開發國家仍然因為公共衛生基礎設施條件不足，飽受腹瀉之苦，以輪狀病毒、志賀氏菌、痢疾阿米巴等病原為主。根據 WHO 統計，目

民國 110 年 12 月 6 日受理
民國 110 年 12 月 29 日修正
民國 111 年 2 月 22 日接受刊載

通訊作者：李南瑤
通訊地址：704台南市勝利路138號
連絡電話：06-2353535#3596

DOI: 10.6526/ICJ.202204_32(2).0003

前每年仍有 17 億兒童得到感染性腹瀉，每年超過 50 萬名五歲以下兒童因此死亡[1]。高度開發國家儘管供水、衛生建設較完善，感染性腹瀉的盛行率大幅降低，每到冬季仍有諾羅病毒流行的問題[2]；多重共病、免疫低下族群，或是男同志族群亦有細菌、寄蟲導致的腹瀉群聚。歐美國家歷年亦偶有生飲自來水導致隱孢子蟲感染的疫情[3]。

近年來由於多重聚合酶連鎖反應 (multiplex PCR) 的技術已日益成熟，甚至有許多商業化組套供檢驗單位使用，能快速偵測病原，不僅能及時對症下藥，對於抗生素管控 (antibiotic stewardship)、感染管制的群突發事件、判斷照護腹瀉患者的防護等級、公衛疫情調查都有莫大助益。本文欲介紹 multiplex PCR 的優勢，與傳統的核酸檢測做比較，並列舉 multiplex PCR 在實際運用可能遭遇的侷限性，供第一線醫護人員、感染管制人員參考。

## 感染性腹瀉的傳統檢驗方法與其侷限性

感染性腹瀉的處置，以症狀評估為導向 (syndromic approach)。除了依賴病史詢問釐清腹瀉的形態、患者的症狀、相關接觸史，實驗室診斷以往皆高度依賴糞便的的常規檢查、蟲卵檢查、細菌培養、個別病毒的抗原或核酸檢測。然而感染性腹瀉的成因甚多 (表一)，症狀又相當類似，故要朝向單一病原診斷不易，同時開立各項檢驗囊括所有病原亦有成本考量[4]。常規檢查與蟲卵檢查需要檢驗

**表一　感染性腹瀉常見病原**

| 種類 | 病原名稱 |
|---|---|
| 細菌 (bacteria) | 彎曲桿菌 (*Campylobacter*) |
| | 導致腹瀉的大腸桿菌 (diarrheagenic *Escherichia coli*) |
| | 沙門氏菌 (*Salmonella*) |
| | 志賀氏菌 (*Shigella*) |
| | 弧菌 (*Vibrio*) |
| | 困梭桿菌 (*Clostridioides difficile*) |
| 病毒(virus) | 腺病毒 (adenovirus) |
| | 星狀病毒 (astrovirus) |
| | 諾羅病毒 (norovirus) |
| | 輪狀病毒 (rotavirus) |
| | 札幌病毒 (sapovirus) |
| 寄蟲(parasite) | 痢疾阿米巴 (*Entamoeba histolytica*) |
| | 梨形鞭毛蟲 (*Giardia lamblia*) |
| | 隱孢子蟲 (*Cryptosporidium*) |

人員的經驗，特別是寄生蟲鏡檢，因蟲體與蟲卵大多體積小、沒有特殊形態、需特殊染色，且未必持續出現在糞便檢體，所以不同檢驗單位的實驗敏感度未必一致[5]。

由於腸道並非無菌區，故糞便細菌培養需靠第一線臨床醫師有所警覺，開立適當的選擇性培養基送檢，例如 xylose lysine deoxycholate (XLD) agar、thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) agar、Campylobacter agar，並且要盡快送達微生物實驗室進結接種與後續培養，避免運送過程太久導致微生物無法生長，才有機會檢測出個別的病原。傳統細菌培養遇到的其他挑戰，一則有些細菌性腹瀉例如沙門氏菌腸胃炎，並不建議一律投予抗生素，避免患者帶菌時間過長；二則近年許多國家抗藥性問題益發嚴重，無論沙門氏菌、志賀氏菌、彎曲桿菌都有高比例對第一線抗生素：fluoroquinolone 產生抗藥性[6-8]。傳統糞便細菌培養的時間較長(48~72 小時)，故未必能及時發現上述問題。

細菌造成的感染性腹瀉，如志賀氏菌造成的桿菌性痢疾 (shigellosis; bacillary dysentery)，致病所需的菌量極低[9]，故培養的陽性率也會受影響；彎曲桿菌 (*Campylobacter*) 造成的腸胃炎於歐美仍常見，但彎曲桿菌本身挑剔性生物 (fastidious organism)，應採用特殊培養基並在 42℃環境培養。然而即便實驗室提供上述培養條件，與分子診斷工具如 16S rRNA qPCR 相比仍有可能低估實際盛行率[10]。病毒導致的腸胃炎因為實驗室診斷不易，患者只要接受足夠的支持性療法，通常屬於自限性疾病 (self-limited)，故更常以臨床診斷為主。然而若發生群聚或疫情產生需進一步做感染管制調查時，實驗室診斷的角色便顯得重要。若為了提高實驗室診斷的敏感度，進而採用傳統的核酸檢測方式，不僅檢驗時間長，一次只能做一種病原的核酸檢測，同時成本也增加許多。

## 腸道病原多重聚合酶連鎖反應的優勢

目前有許多商業化 multiplex PCR 組套 (表二)，優勢在於可以同時偵測到共同感染的病原 (co-infections)。根據西雅圖華盛頓大學針對 1,887 位腸道感染患者的追蹤研究，傳統檢驗方式大約只有 6% 的機率能找出共同感染，利用 multiplex PCR 可增加至 35%；從開始檢驗到發出報告的時間 (中位數)，傳統檢驗所需 47 小時，利用 multiplex PCR 則可縮短至 18 小時[4]。在較短的時間獲得病原的判讀結果，有助於落實抗生素管控原則，讓患者得到正確的治療[11]。

根據佛羅里達大學醫院的回溯性觀察，納入 2013 年於該院困難梭狀桿菌 (困梭桿菌) 檢測陰性、輪狀病

**表二　腸道病原多重聚合酶連鎖反應商業化組套比較[23]**

| 病原 | BD Max® enteric parasite & bacterial panel | BioFire ® FilmArray ® GI Panel | Luminex® xTAG GI Panel |
|---|---|---|---|
| 細菌 | | | |
| 沙門氏菌 (*Salmonella*) | Y | Y | Y |
| 志賀氏菌 (*Shigella*) | Y | Y | Y |
| 志賀毒素 (Shiga-toxin) | Y | Y | Y |
| 腸毒性大腸桿菌 (ETEC) | N | Y | Y |
| 腸致病性大腸桿菌 (EPEC) | N | Y | N |
| 腸侵襲性大腸桿菌 (EAEC) | N | Y | N |
| 出血性大腸桿菌 (*E. coli* O157) | N | Y | Y |
| 彎曲桿菌 (*Campylobacter*) | Y | Y | Y |
| 腸炎耶爾森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*) | N | Y | N |
| 類志賀鄰單胞菌 (*Pleisimonas shigelloides*) | N | Y | N |
| 困梭桿菌 (*Clostridium difficile*) | N | Y | Y |
| 病毒 | | | |
| 諾羅病毒 (norovirus) | N | Y | Y |
| 腺病毒 (adenovirus) | N | Y | Y |
| 輪狀病毒 (rotavirus) | N | Y | Y |
| 星狀病毒 (astrovirus) | N | Y | N |
| 札幌病毒 (sapovirus) | N | Y | N |
| 寄生蟲 | | | |
| 痢疾阿米巴 (*Entamoeba histolytica*) | Y | Y | Y |
| 梨形鞭毛蟲 (*Giardia*) | Y | Y | Y |
| 隱孢子蟲 (*Cryptosporidium*) | Y | Y | Y |
| 環孢子蟲 (*Cyclospora*) | N | Y | N |

毒檢測陰性的腹瀉患者共 158 位，事後將冷凍檢體進一步以腸道 multiplex PCR 檢驗，有 25 位患者均陰性，但由於臨床照護時高度懷疑，維持事後看來未必需要的隔離與防護；有 35 位患者檢體偵測出至少一種其他病原，包含諾羅病毒、志賀氏菌、星狀病毒、隱孢子蟲、產毒大腸桿菌等。這 35 位事後意外檢測出其他腸道病原的患者，有 21 位患者 (60%) 的腸道病原具有高傳染力，但臨床照護時沒有檢測出來，並未給予適當的隔離與防護[12]。由此可知，腸道 multiplex PCR 快速檢測多重病原

的優勢，也有利於臨床照護上加強應該落實的防護措施，減少不必要的隔離。佛羅里達大學醫院的另一項研究顯示，儘管腸道 multiplex PCR 的成本較高，但檢驗結果可讓醫師決策更有效率，顯著減少住院天數、抗生素使用天數、未必需要的影像檢查，簡化微生物檢驗項目，顯著降低整體的醫療支出[13]。

感染性腹瀉在已開發國家則有另一個特殊問題。1970 年代起各國開始注意到男同志族群有梨形鞭毛蟲的群聚感染[14]。1990 年代起美國政府開始注意到桿菌性痢疾群聚好發於男同志、愛滋感染者、有口肛交行為的族群[15]。2010 年起北美地區開始注意到彎曲桿菌流行於男同志族群，甚至有抗藥性菌株在國際間傳播[16]。2015 年台灣的男同志族群爆發 A 型肝炎疫情，接下來數年桿菌性痢疾的本土個案也由過去的山地鄉、人口密集機構，轉變為男同志與愛滋感染者為主[17]。由此可知，男同志族群的感染性腹瀉，除了過去已知的直腸淋病、披衣菌感染，另外如 A 型肝炎、梨形鞭毛蟲、桿菌性痢疾、彎曲桿菌感染，皆應視為性傳染病[18]。更重要的是，淋病、桿菌性痢疾、彎曲桿菌等病原，近年皆有抗藥性的問題。近年西雅圖華盛頓大學的研究顯示，利用腸道 multiplex PCR 可以更快速偵測男同志感染性腹瀉的腸道病原，讓臨床醫師適時調整經驗性抗生素[19]。

## 腸道多重聚合酶連鎖反應於實際應用的侷限性

目前通行的腸道 multiplex PCR 組套，最大侷限在於沒有藥物敏感性測試供參考，尤其是沙門氏菌、志賀氏菌、彎曲桿菌等，即便檢驗結果陽性，除非有同時培養出菌株，否則無法得知是否對於 fluoroquinolone 具有抗藥性[20]。儘管現今許多其他感染症的 multiplex PCR 商業化組套，例如肺炎、菌血症，皆有同時偵測抗藥性基因的產品，但偵測出抗藥性基因並不完全等同於致病的菌株具有抗藥性。若是面對群突發事件或是疫情調查，需利用脈衝式電泳 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)、次世代定序 (next-generation sequencing, NGS) 比對感染者病原的關聯性時，腸道 multiplex PCR 檢驗目前仍無法取代傳統的細菌培養[21]。

多重聚合酶連鎖反應 (multiplex PCR) 是在檢驗過程放入多個引子 (primer)，希望能在操作一次 PCR 便能同時得到多組訊息，可以是偵測多個病原的基因，也可以是針對單一菌種的基因分型或毒力因子分析 (virulence factor)。但是同時放入多個引子，互相干擾的機率增加，使 PCR 的靈敏度降低，並且還可能會產生偽陽性反應。巢式 PCR (nested PCR) 可避免此類情形，但需另一組引子，實驗成本較高且過程較耗時，而且也無法完全避免互相干擾。

腸道的 multiplex PCR 與傳統的 PCR 一樣，僅能偵測檢體是否帶有微生物的基因片段，無法判定微生物的活性，也無法區別真正的感染 (infection) 與定殖 (colonization) 的狀態。腸道 multiplex PCR 可同時偵測出共同感染 (co-infection) 的多重病原，但是否偵測出來的每一種病原都需要治療，仍需依患者狀況個別處理。目前各種商業化組套 multiplex PCR，某些產品有提供 cycle of threshold (Ct 值)，且有陰性內控制 (internal negative control) 做對照組，可讓檢驗單位或臨床醫師藉由 Ct 值判斷病原的陽性報告是否為雜訊干擾導致偽陽性。更重要的是，腸道 multiplex PCR 的檢驗結果不能當作確診的唯一依據，還是要搭配臨床的症狀與病史詢問，才能正確判斷 [13]。

## 結　語

儘管腸道 multiplex PCR 可以快速偵測腸道病原，讓第一線醫師更有效率做出判斷，減少不適當的經驗性抗生素使用。但必須注意這些病菌都有可能無症狀帶原 (asymptomatic carriage)。除非是流病研究需求，否則針對無症狀的健康人安排此種檢驗的意義不大。對於健康免疫力正常的成人，一般的急性腹瀉通常兩到三天可自行改善，大部分都由病毒造成，不需要腸道 multiplex PCR 成本較高的檢驗，應保留在嚴重腹瀉甚至下痢 (dysentery)、症狀持續超過三天無改善、免疫低下族群、男同志族群、疑似群聚或群突發事件調查等[22]，可減少病菌傳播，節省不必要的醫療支出。診斷感染性腹瀉，最基本也是最重要的病史詢問、理學檢查仍無法省略；傳統檢驗包含鏡檢、細菌培養，在後續的疫情調查 (如 PFGE 或 NGS)、抗藥性評估，仍有存在的價值。

## 參考文獻


1. World Health Organization. Diarrhoeal disease. Available at: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease. Accessed 12 December 2021.
2. Burden of norovirus illness in the U.S. 2021. Available at: https://www.cdc.gov/norovirus/trends-outbreaks/burden-US.html. Accessed 14 December 2021.
3. Gharpure R: Cryptosporidiosis Outbreaks-United States, 2009-2017. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2019:68. Available at: https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/68/wr/mm6825a3.htm. Accessed 14 September 2019.
4. Cybulski RJ, Bateman AC, Bourassa L, et al: Clinical Impact of a multiplex gastrointestinal polymerase chain reaction panel in patients with acute gastroenteritis. Clin Infect Dis 2018;67:1688-96.
5. Ricciardi A, Ndao M: Diagnosis of Parasitic Infections: What's Going On? J Biomol Screen 2015;20:6-21.
6. Chiu CH, Wu TL, Su LH, et al: The emergence in Taiwan of fluoroquinolone resistance in Salmonella enterica serotype choleraesuis. N Engl J Med 2002;346:413-9.
7. Liao CH, Chuang CY, Huang YT, et al: Bacteremia caused by antimicrobial resistant Campylobacter species at a medical center in Taiwan, 1998-2008.

J Infect 2012;65:392-9.

8. Chiou CS, Izumiya H, Kawamura M, et al: The worldwide spread of ciprofloxacin-resistant Shigella sonnei among HIV-infected men who have sex with men, Taiwan. Clin Microbiol Infect 2016;22:383.e11-383.e16.
9. DuPont HL, Levine MM, Hornick RB, et al: Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. J Infect Dis 1989;159:1126-8.
10. Buss JE, Cresse M, Doyle S, et al: Campylobacter culture fails to correctly detect Campylobacter in 30% of positive patient stool specimens compared to non-cultural methods. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2019;38:1087-93.
11. Beatty N, Nix D, Matthias K, et al: Efficacy and cost comparison between a rapid multiplex polymerase chain reaction gastrointestinal pathogen panel versus conventional stool analysis techniques in suspected cases of infectious diarrheal disease at a tertiary medical center. Open Forum Infect Dis 2016;3:214.
12. Rand KH, Tremblay EE, Hoidal M, et al: Multiplex gastrointestinal pathogen panels: implications for infection control. Diagn Microbiol Infect Dis 2015;82:154-7.
13. Beal SG, Tremblay EE, Toffel S, et al: A gastrointestinal PCR panel improves clinical management and lowers health care costs. J Clin Microbiol 2018;56:e01457-17.
14. Escobedo AA, Almirall P, Alfonso M, et al: Sexual transmission of giardiasis: a neglected route of spread? Acta Trop 2014;132:106-11.
15. Aragón TJ, Vugia DJ, Shallow S, et al: Case-control study of shigellosis in San Francisco: the role of sexual transmission and HIV infection. Clin Infect Dis 2007;44:327-34.
16. Gaudreau C, Helferty M, Sylvestre JL, et al: Campylobacter coli outbreak in men who have sex with men, Quebec, Canada, 2010-2011. Emerg Infect Dis 2013;19:764-7.
17. Wu HH, Shen YT, Chiou CS, et al: Shigellosis outbreak among MSM living with HIV: a case-control study in Taiwan, 2015-2016. Sex Transm Infect 2019;95:67-70.
18. Mitchell H, Hughes G: Recent epidemiology of sexually transmissible enteric infections in men who have sex with men. Curr Opin Infect Dis 2018;31:50-6.
19. Newman KL, Newman GS, Cybulski RJ, et al: Gastroenteritis in men who have sex with men in Seattle, Washington, 2017-2018. Clin Infect Dis 2020;71:109-15.
20. Binnicker MJ: Multiplex molecular panels for fiagnosis of gastrointestinal infection: performance, result interpretation, and cost-effectiveness. J Clin Microbiol 2015;53:3723-8.
21. Riddle MS, DuPont HL, Connor BA: ACG cinical guideline: diagnosis, treatment, and prevention of acute diarrheal infections in adults. Am J Gastroenterol 2016;111:602-22.
22. Shane AL, Mody RK, Crump JA, et al: 2017 Infectious Diseases Society of America clinical practice guidelines for the diagnosis and management of infectious diarrhea. Clin Infect Dis 2017;65:e45-e80.
23. Hanson KE, Couturier MR: Multiplexed molecular diagnostics for respiratory, gastrointestinal, and central nervous system infections. Clin Infect Dis 2016;63:1361-7.

# Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Diagnostic Tool for Detection of Infectious Diarrhea-causing Pathogens

Chin-Shiang Tsai[1,2,3], Nan-Yao Lee[2,3]

[1]Department of Internal Medicine, National Cheng Kung University Hospital, Dou-Liou Branch, College of Medicine, National Cheng Kung University, Yunlin,
[2]Center for Infection Control,
[3]Division of Infectious Disease, Department of Internal Medicine, National Cheng Kung University Hospital, College of Medicine, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan

Diarrhea is an important public health concern. The current management of infectious diarrhea is mainly a syndromic approach using conventional diagnostic methods, including microscopic examinations and cultures. The sensitivity of multiplex polymerase chain reaction (PCR) is relatively high, and many commercial kits are available for testing, which can rapidly detect multiple pathogens simultaneously. Multiplex PCR faces some limitations, such as primer interference, the lack of specific primers leading to false positivity, and an inability to distinguish between colonization and infection. Further analyses cannot be performed without the identification of bacterial isolates. Multiplex PCR can be applied to refractory, prolonged or severe diarrhea (even dysentery), immunocompromised hosts, men who have sex with men, or any clusters or outbreaks under investigation. Multiplex PCR can improve antibiotic stewardship, inform precaution levels, and investigate outbreaks of public health concern.

Key words: Multiplex polymerase chain reaction, infectious diarrhea, pathogen, outbreak