



实时荧光 PCR 技术在诺如病毒引起的感染性腹泻诊断中应用价值分析

刘凡兵 (湖南省石门县疾病预防控制中心 湖南石门 415300)

摘要: **目的** 探究实时荧光 PCR 技术在诺如病毒引起的感染性腹泻诊断中应用价值。**方法** 选取县人民医院收治的 90 例诺如病毒引起的感染性腹泻患者为研究对象,提取其粪便中的 RNA 作为检测标本,采用常规 ELISA 与实时荧光 PCR 技术进行检测,比较两种方法支持下的检测结果。**结果** 在 90 例样本中,采用实时荧光 PCR 技术检测出 73 例阳性样本,检出率达到 81.1%;而采用常规 ELISA 技术仅检测出 50 例阳性样本,检出率仅为 55.6%。**结论** 与常规 ELISA 检测技术相比,在诺如病毒引起的感染性腹泻诊断中应用实时荧光 PCR 技术在特异性、灵敏性以及检测速度等方面更有优势。

关键词: 实时荧光 PCR 技术 诺如病毒 感染性腹泻 应用价值

中图分类号: R181.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-5187 (2017) 20-215-02

诺如病毒也被称为诺瓦克病毒 (Norwalk Viruses, NV), 该病毒是一组形态相似、抗原性略有不同的病毒颗粒^[1]。基于对诺如病毒的分析,该病毒会造成患者发生感染性腹泻,且该病毒造成的感染性腹泻并无特效药物与疫苗,但是临床中的快速诊断有助于确定腹泻患者致病原因,进而提供具有针对性的治疗,为此,本文通过采取比较分析方式,研究了常规 ELISA 与实时荧光 PCR 技术在检测由诺如病毒引起的感染性腹泻中的应用价值,期望可以为诺如病毒建立快速诊断新方法奠定基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料

此次临床研究资料选取了我县人民医院自 2016 年 7 月至 2017 年 11 月收治的 90 例由诺如病毒引起的感染性腹泻患者,患者年龄区间为 7-62 岁,平均年龄为 37.5±2.7 岁,男性患者 52 例,女性患者 38 例,所有患者一般资料有可比性,但是 $p > 0.05$ 无统计学意义。

1.2 方法

提取 90 例由诺如病毒引起的感染性腹泻患者粪便中的 RNA 作为临床检测标本,使用了 QIAGEN 公司所生产的 RNA 提取试剂盒,按照 RNA 提取试剂盒说明提取患者粪便中的 RNA: 粪便样本使用 PBS 或生理盐水制成 20% 的粪便悬液,在将其充分混匀的基础上,采用每分钟 4500 转的速度进行 20 分钟离心操作,取离心所得 200 μ l 上清液作为提取 RNA 的材料,在常温状态下提取病毒 RNA,并将其保存在 -70℃。

对照组:采用常规 ELISA 技术,使用了德国 R-biopharm 公司生产的诺如病毒 ELISA 试剂盒,按照试剂盒操作方法对粪便样本进行检测。

观察组:采用实时荧光 PCR 技术进行检测技术,使用了 one step Prime Script RT-PCR 试剂盒,反应体系为 25 μ l,具体反应体系划分如下: 0.4 μ l 探针、9.5 μ l RNA 模板、0.8 μ l 上游引物、0.8 μ l 下游引物、0.5 μ l EX Taq HS、0.5 μ l RT Enzyme Mix II、12.5 μ l 2×one step Prime Script RT-PCR buffer。主要设置为 30min 42℃、5min 95℃、15s 95℃、1min 56℃等循环,在每一次循环结束后,需要进行实时荧光 PCR 检测。

1.3 临床观察指标

此次临床观察的指标为采用不同方式检测所得的诊断结果。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件分析数据,计量资料采用均数 ± 标准差表示,组间比较采用 t 检验。计数资料采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

表一: 标本采用不同方式所得检测结果的比较

检测方式	检测样本 (n)	阳性样本 (n)	检出率 (%)
常规 ELISA	90	50	55.6
实时荧光 PCR 技术	90	73	81.1
χ^2		2.92145	
P		0.019	

3 讨论

诺如病毒具有感染剂量低、环境抵抗力强、变异快等特点,在患者感染该病毒后,其排毒时间长、潜伏期短,导致患者疾病发生速度较快,且由于全人群易感度高,病毒传播途径多样,造成诺如病毒传播速度快、传染性更高,临床中通常将由于诺如病毒造成的感染性腹泻称为急性胃肠炎,在全球上诺如病毒是爆发疫情与急性胃肠炎的致病病原。

诺如病毒常见的传播途径有以下几种:一是消化道传播,其主要包含粪便、呕吐物等途径进行传播,此时传播媒介则为食物、受污染的水以及手部^[2]。其中最容易导致诺如病毒爆发流行的主要食物为生贝类食物;二是呼吸道传播,空气也是诺如病毒传播的一个媒介,患者腹泻物以及呕吐物干化后,其中存在的病毒颗粒则会经过空气,从呼吸道进入人体;三是接触传播,由于诺如病毒为病毒颗粒,因此其可以通过公共场所扶梯、门把手、桌椅等物品进行接触传播。当患者感染到诺如病毒时,病毒潜伏期大多在 24h-48h 之间,其中最短时间为 12 小时,最长时间为 72 小时,感染者发病相对突然,会出现呕吐、恶心、腹泻、发热、腹痛等症状。由于全人群都易感诺如病毒,因此疾病预防控制中心应做好诺如病毒传播控制工作,此时就必须准确进行临床检测与诊断。

目前诺如病毒的检测方法相对较多,具有直接电镜检查、放射免疫法和生物素-亲和素免疫法、免疫电镜检查、常规 ELISA 方法以及实时荧光 PCR 技术,由于 ELISA 方法具有操作便捷性、检测准确性的特点,因此该方法应用最为广泛^[3]。与常规 ELISA 检测方法相比,实时荧光 PCR 技术灵敏度更高,可以检测出病毒量在 10^2 - 10^4 copies/ml 的标本,但是由于实时荧光 PCR 技术操作要求相对较高,因而当前应用并不十分广泛。在本次临床研究中则重点进行了常规 ELISA 方法与实时荧光 PCR 技术检测价值的对比,通过对 90 例均为诺如病毒造成的感染性腹泻患者标本进行检测,发现使用实时荧光 PCR 技术检测时,在 90 例标本中共有 73 例标本呈现阳性,其检出率达到 88.1%;而使用常规 ELISA 检测方法时,在 90 例标本中仅有 50 例标本呈现阳性,其检出率仅为 55.6%。

实时荧光 PCR 技术是在常规 PCR 技术基础上增加了荧光探针或荧光染料,通过使用荧光信号对整个 PCR 进程进行实时检测,进而利用标准曲线进行未知量的分析,此时可以有效将原有 PCR 技术定性检测提升至定量检测,其自动化程度更高、检测特异性更强。针对实时荧光 PCR 技术使用优势与使用特点,在临床中将其分为非探针技术以及探针技术两种,不同技术适合应用的范围不同。在统计实时荧光 PCR 技术应用效果后,发现该项技术具有以下明显的优缺点:一是优点,由于实时荧光 PCR 技术会在同一 PCR 试管中完成荧光探针杂交、PCR 扩增以及信号检测,因此更有效的避免了在检测过程中发生的污染概率,此时检测特异性以及准确度明显得到提升。与此同时,在同一 PCR 试管中完成检测过程中会使得 PCR 扩增,此时 PCR 扩增与靶标核

(下转第 218 页)



强你可以识别。但非典型囊性和囊性肾细胞癌有时影像学非常相似,鉴别困难,此时要注意多种影像结合综合考虑,必要时可进行活检或术中取样^[2]。

此外,多房性囊性肾细胞癌也应与多房性囊性肾瘤鉴别。多模态肾瘤是一种良性肿瘤,临床上罕见的肿瘤。影像学,多房囊性肾细胞癌与多发性萎缩性肾细胞癌有许多相似之处,找出一些困难。多囊肾病在4岁以上的男孩和40-60岁的成年人(女性为主)多见,多为肿胀生长,管壁光滑而均匀(1-2mm),管壁分离无粘连结节,有时可以增强,囊内出血很少见。多囊性肾细胞癌多见于成年男性,多为扩张生长,假包膜和不同数量的隔室;常见结节壁或多见,局限性增厚($\geq 2\text{mm}$)有时可见钙化;增强扫描的壁和结节增强扫描;囊液中更多的液体,密度或信号不均匀地增加。

总之,囊性肾细胞癌与各种肾囊性病变的表现形式相似,容易误诊,所以要看多中隔囊肿,壁厚不均或壁结节改变的患者,应注意进一步确认诊断,积极处理,以免延误治疗。目前对于囊性肾细胞癌的

诊断,CT和MRI是主要的检查方法^[3]。观察的重点是囊液密度或信号,壁厚和壁厚,壁结节,钙化,假囊和增强的扫描性能。

参考文献

- [1] CT与超声诊断囊性肾细胞癌影像学对比分析[J]. 赵桂东. 医学理论与实践. 2015(01)
- [2] 超声造影在囊性肾瘤中的应用价值[J]. 朱夏蓓, 陈方红, 赖小伟, 孙终霞. 浙江中西医结合杂志. 2014(10)
- [3] 超声造影对多房囊性肾细胞癌的诊断价值[J]. 李丛, 黄备建, 王文平, 薛立云, 严丽霞. 中国临床医学. 2013(05)
- [4] 肖宁, 周兴, 曾格瓦, 等. 多房囊性肾细胞癌六例报告并文献复习[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015, 21(6): 464-468.
- [5] 金迪, 张进, 孔文, 等. Bosniak II ~ IV级肾囊性占位临床与病理学特点分析[J]. 现代泌尿外科杂志, 2014, 19(1): 22-25
- [6] 李红, 房世保, 纪清连, 等. 囊性肾瘤的影像诊断与鉴别诊断[J]. 青岛大学医学院学报, 2013, 47(1): 93-94.

(上接第213页)

高价值,可将其与血清学检测以及其他检测项目相结合,从而将疾病的诊断准确率提高,为小儿患者的疾病治疗提供依据。

参考文献

- [1] 杨文青, 吕晓丽, 李锐成等. 实时荧光定量PCR检测肺炎支原体DNA在小儿肺炎诊断中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(4): 416-418.
- [2] 王宁. 快速血清学检验和微生物快速培养检测对小儿肺炎支原体感染的临床诊断价值研究[J]. 航空航天医学杂志, 2016, 27(2): 167-169.

(上接第214页)

果提示在冠心病的进展与发展期间,存在血脂异常情况。若血脂水平越高,则会进一步加重患者病情,说明血脂指标可良好反映出该病的严重程度。

综合上述,常规血脂检验诊断冠心病,效果肯定,能够获得良好的预测价值,建议临床进一步加强应用。

参考文献

- [1] 牟蓉. 常规血脂检验在冠心病合并糖尿病患者诊断中的应用

[3] 刘烨. 小儿肺炎支原体感染中快速血清学检验与微生物快速培养检测的临床诊断价值[J]. 母婴世界, 2015, 15(20): 10-10.

[4] 王孟燕, 雷雪明. 快速血清学检验和微生物快速培养检测对小儿肺炎支原体感染诊断的临床价值分析[J]. 临床医学研究与实践, 2016, 1(14): 59.

[5] 马敏. 小儿肺炎支原体感染行快速血清学检验与微生物培养检测的价值比较[J]. 饮食保健, 2017, 4(13): 12.

[6] 韩玉芳, 魏琴, 冯艳广等. 新乡市小儿肺炎支原体、肺炎衣原体感染情况[J]. 实用儿科临床杂志, 2012, 27(10): 731.

价值研究[J]. 糖尿病新世界, 2014, 24: 44.

[2] 唐伶俐. 探究常规血脂检验诊断冠心病的临床意义[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2014, 14: 33+35.

[3] 冯绍文, 张成功. 常规血脂检验在冠心病诊断中的应用价值[J]. 中国现代药物应用, 2014, 06: 97.

[4] 刘慧. 常规血脂检验在冠心病诊断中的临床价值分析[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2015, 34: 71+73.

[5] 董新梅. 常规血脂检验在冠心病诊断中的应用价值分析[J]. 大家健康(学术版), 2016, 14: 70.

(上接第215页)

苷酸探针杂交处于同时进行状态下,有助于快速实时的评估PCR产物,后期也并不需要电泳工作。基于荧光探针灵敏度更高,使得实时荧光PCR技术也拥有检测灵敏度的优点,为检测质量与准确度的提升做出贡献;二是缺点,任何一项技术都不是完美的,实时荧光PCR技术在运用过程中主要存在着RNA样品保存与运输困难的缺点,在技术水平不断提升背景下仍需对此进行改善。

综上所述,在临床中诊断感染性腹泻患者致病原因时,为提高诺如病毒检出率,进而做好疾病控制工作,控制爆发性腹泻疫情的发展

速度,建议推广使用实时荧光PCR技术。

参考文献

- [1] 马晓薇, 李明, 李庆伦, 张慧婷, 罗彩琴. 实时荧光定量PCR技术在侵袭性真菌感染诊断中的应用价值[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(20): 5119-5121.
- [2] 郭明日, 吴敏, 张立, 肖红侠, 王冰冰. 实时荧光PCR技术在不同类型结核病诊断中的应用价值[J]. 临床肺科杂志, 2012, 17(01): 82-83.
- [3] 袁海涛, 刘丽娜, 李忠延, 彩花. 实时荧光PCR技术在手足口病实验诊断中的应用价值[J]. 中国农村卫生, 2015, (08): 81.

(上接第216页)

控制中,并且从最终两组患者的实际效果对比来看,观察组的效果要显著的优于对照组,也就是说全面质量控制相比于常规操作更能保障临床免疫的准确性,对患者的诊疗与康复也更有价值。观察组患者中91.7%的患者有效,同比之下,对照组则仅有70%,可见观察组相对于对照组而言所显露出来的巨大的优势。由此可以得出结论,在医院检验科临床免疫检验中,质量控制是非常重要的内容,对于全面提升临床免疫检验结果的准确性有着非常不错效果,因此,医院检验科在临床免疫检验中要做好相应的质量控制工作。

参考文献

- [1] 王世贤. 探讨临床免疫检验的质量控制[J]. 中国卫生产业, 2015, 12(23): 40-42
- [2] 张昊春. 临床免疫检验的质量控制问题分析[J]. 医学美学美容, 2015(04): 291-292
- [3] 单洪继, 李雪. 临床免疫检验的质量控制探讨[J]. 中外健康文摘, 2011, 8(31): 110-111
- [4] 冯晓丽. 临床免疫检验的质量控制问题分析[J]. 大家健康, 2014, 8(08): 73