

实时荧光聚合酶链式反应技术在手足口病检测中的应用价值

刘明哲¹, 刘毅^{2*}

(1. 菏泽医学专科学校, 菏泽 274000; 2. 平度市人民医院, 平度 266700)

摘要: **目的** 分析实时荧光聚合酶链式反应 (Fluorescent polymerase chain reaction, PCR) 技术在手足口病检测中的应用价值。**方法** 从2020年1月—2024年1月疑似手足口病的患儿中抽取100例, 对其分别实施荧光PCR与病毒分离培养方法, 分析检出准确性、敏感性以及特异性。**结果** 100例患儿经病原学、实验室检查与临床症状进行综合诊断, 均确诊为手足口病。实时荧光PCR检测准确性为91%, 敏感性为91%, 特异性为89%, 病毒核酸的准确性78%, 敏感性为78%, 特异性为68%, 故实时荧光检测准确性、敏感性、特异性均高于病毒分离培养方法, $P < 0.05$ 。**结论** 临床检测手足口病的时候可以使用实时荧光PCR, 其敏感性比较高, 可以为医生提供诊断依据, 提高检查准确性。

关键词: 实时荧光PCR技术; 手足口病; 检测

0 引言

手足口病 (Hand, foot and mouth disease, HFMD) 是一种在儿童中普遍存在的疾病, 其主要由各类人类肠道病毒感染导致。这种疾病的主要特征是在孩子的手、足、口等部位出现皮肤红肿, 同时还会出现发烧的症状^[1]。手足口病是肠道病毒引起的急性发热和出疹性传染病, 高发人群集中在婴儿和儿童, 特别是5岁以下的孩子, 少数的严重病例病程会迅速恶化, 存在较高的致命威胁^[2]。HFMD主要发生在10岁以下的小孩中, 通常由病毒感染的物体、通过呼吸道的飞沫、饮用受到污染的水源或食物等因素引发^[3]。医学实验表明, HFMD的病原体多样, 其中柯萨奇病毒A组16型(Coxsackievirus A16)以及肠道病毒71型(EV71)的感染是最普遍的病原。如果不能立即实行有力的医疗干预, 病情会持续恶化, 最终可能导致心肌炎、脑膜炎等严重的后果, 对孩子的生命健康构成威胁。HFMD的传播路径繁多且迅猛, 其传播过程相当复杂, 这使得其管理起来相当困难, 容易引起疾病的扩散与爆发^[4]。所以, 研究如何以高效、迅捷、精确的方式来识别人类肠道病毒显得至关重要。在过去, 医生通常会根据病原学的测试数据、病人的病症和实验室的检测数据来评估HFMD。病毒分离培养法被广泛应用, 能够精确地识别病人是否患有HFMD^[5]。然而, 这种方法的相对繁琐,

需要花费更多的时间, 很可能会影响到早期的HFMD治疗计划的制订, 进一步加剧病人的病况^[6]。PCR技术在病毒核酸检测方面表现优秀, 通过PCR进行核酸的高效和迅速扩展, 达到了减少检测周期和迅速提供检验结果的目标, 并且在HFMD病毒核酸检测方面可能表现出更强的特异性。本文从2020年1月—2024年1月疑似手足口病的患儿中抽取100例, 对其分别实施荧光PCR与病毒分离培养方法, 以此分析实时荧光PCR技术的应用价值, 以期临床检测手足口病提供参考, 试验如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

从2020年1月—2024年1月疑似手足口病的患儿中抽取100例, 均为平度市人民医院门急诊收治的患儿, 年龄在5个月~5岁, 平均为(2.74±0.23)岁, 男60, 女40。纳入标准: (1) 了解试验积极加入。(2) 认知、语言功能正常。(3) 疑似手足口病。排除标准: (1) 合并其他病变。(2) 精神病变。(3) 意识障碍。

1.2 方法

所有仪器(见图1)、试剂厂家均为赛默飞生产。

病毒分离培养法: 收集患儿咽拭子样本, 对其进行0.2 mL的注射, 然后把它们注入健康的单层RD细胞中, 在33℃的条件下进行培育。利用4XB的双目倒置金相显微镜, 对细胞的

第一作者: 刘明哲, 副教授, 研究方向为流行病与卫生统计。

* 通信作者: 刘毅, 卫生管理中级, 研究方向为公共卫生。E-mail: 176653318@qq.com

变化进行持续 7 天的监测。如果特定的肠道病毒细胞病变效应超过 75% 或更多，把它们储藏在 -20℃ 的条件下，准备二次繁殖。如果 7 天的检测结果中，细胞病变效应没有明显，选择盲法繁殖。如果在进行 7 天的观测和记录之后，两代人的遗传都没有发生变化，保证结果准确性。

荧光 PCR 技术：使用 StepOne Plus PCR 仪进行检验，收集患儿咽拭子样品，将其储藏在 -20℃ 的条件下，在 12 h 之后运送到实验室以便进行检查。使用即时荧光 PCR 仪来构建反应系统，使用 RNA 提取 (TRIZOL Reagent 100 mL) 和逆转录扩增试剂 (Thermo RevertAid RT) 逆转录试剂盒来执行病毒 RNA 的提取和扩增步骤。对于阴性结果，如果在样本的检查过程中 Ct 值超过 35，并没有呈现出标准的 S 形曲线；而对于阳性结果，Ct 值低于 35 并呈现了标准的 S 形曲线。

1.3 观察指标

2 名工作经验在 5 年及以上的专家对结果进行检阅，根据实验室检查结果、病原学综合诊断结果作为金标准，根据手足口病诊断标准分析对比两组的准确性、特异性、敏感性^[5]。

1.4 统计和分析

SPSS 23.0 分析，计数型指标(n/%)表示，χ² 检验。P < 0.05，有差异。



图 1 PCR 分析仪

2 结果与分析

2.1 诊断结果

100 例患儿经病原学、实验室检查与临床症状进行综合诊断，均确诊为手足口病。

2.2 检测结果

实时荧光 PCR 检测准确性为 91%，敏感性为 91%，特异性为 89%，均高于病毒核酸检测结果 (P < 0.05)，实时荧光检测在准确性、敏感性和特异性方面优势显著。见表 1。

表 1 检测结果 [n (%)]

组别	例数	确诊	准确率	敏感性	特异性
实时荧光	100	91	91(%)	91(%)	89(89%)
病毒核酸	100	78	78(%)	78(%)	68(68%)
χ ² 值	—	6.4516	6.4516	6.4516	13.0647
P 值	—	0.0111	0.0111	0.0111	0.0003

3 讨论与结论

尽管手足口病的大部分表现不严重，但它依旧存在引起严重并发症的风险，因此，对其实施适当且有力的治疗显得尤其必要。在开始治疗之前，通过病毒的检测，我们可以准确地判断病人是否已经被手足口病病毒所侵害，从而实施适当的医疗和防护手段，防止病毒的扩散。Cox A4、A5、A8、A10、A16、B3、B7 以及 EV 71 型病毒都可能导致手足口病的出现，其中 EV 71 型和 Cox A16 是最重要的病原体，这种疾病的症状呈现出各种不同的特征，并且容易引发大规模的流行病。所以，在最短的时间内进行实验室检测以确定这种肠道病毒，对于立即执行预防和治疗手段至关重要 ev71 的诊断通常采取病毒分离培养、中和抗体的检测以及实时荧光 PCR 法。

病毒分离培养法是 HFMD 病原体的常规检测手段，它能够通过分离样品来识别病毒种类，并能够被应用到更深入的病毒学研究^[7]。然而，这个分离过程耗时较长，对实验环境的温度管理需求也相当严格，整个操作过程复杂耗时，并且这种方法对操作者的专业知识提出了更高的标准^[8]。因此，在 HFMD 病毒肆虐的情况下，这种方法并不能满足处理众多样品的实际需

求，这并不利于向基层医疗机构的普及^[9]。所以，必须找到一种更为高效、迅速的 HFMD 病毒检查手段，这样才能迅速确定 HFMD 病人^[10]。但是，病毒分离培养法的技术难度和成本都相当高，而且其检测周期通常在 4~15 d 天之间，还会产生各种不一的实验室分离阳性结果。因此，它在病毒传播的过程中，往往难以同步处理大批的样品，只能作为一种实验室的研究手段。另外，中和抗体的检测通常需要将病人的急性和恢复阶段的血清中和抗体的浓度进行比较。对于仅依赖一次血清中和抗体的浓度来做出评估是困难的，并且这种方式既耗时又耗力，不能达到早期诊断的标准。

近些年，经常使用的快速检测手段包括传统的 RT-PCR 法和巢式 PCR^[11]。然而，这些手段都有许多不足之处，例如，传统的 RT-PCR 技术需要进行 PCR 后续操作，容易导致伪阳性结果，以及产生交叉污染。RT-PCR 的实时荧光定量技术，也被称为核酸测量方法，其优势在于其高度的灵敏度，易于操控，稳健且可以被重复使用，目前已经被广泛用于肠道病毒的检测^[12]。相较于传统的 RT-PCR，这种方法的逆转录、扩增反应以及分析都是在完全封闭的环境中执行的，这样可以有效避免 PCR 产品的污染。整个分析流程都由 PCR 仪器来执行，不必再依赖于电泳或者紫外线照射。降低了执行过程，增强了工作效

能,并且也增强了检验数据的稳定性。RT-PCR法的实时荧光定量技术,能够在3~4 h内完成总核酸的提取和检测,这大大减少了肠道病毒的检测周期。这种技术不仅可以迅速确认手足口病,也能作为一种有力的实验工具,帮助医生在病情发展初期就能立即制订出应对策略。

PCR-反向点杂交技术在基因的分类和突变检测中有着广泛的运用,其关键在于将探测器安装在玻璃芯片或尼龙膜上,并利用杂交的数据来确认扩增的产物中是否含有预设的基因。这个技术有助于人乳头瘤病毒(Human papillomavirus, HPV)的基因分类,但是其执行步骤较为繁琐,检测时间也相对较长,使用开放的杂交方法可能会导致交叉污染。尽管HC-II技术能够通过提高抗体的捕获信息、检测化学反应的反馈信息来识别HPV感染,其准确度和灵敏度也非常优秀。PCR法的实时荧光法,是一种将传统PCR的高灵敏度、DNA杂交的高特异性以及光谱技术的高精度相结合的创新方式,但由于其复杂的操作流程、耗时的成本以及昂贵的花费,导致不能有效地进行HPV的分类,从而影响了该方式在实践应用中的广泛推广。PCR反应体系的运行机制就是把荧光基团融入其内部,并利用这些荧光信号的累积对PCR的全部流程进行监测。荧光染料的渗透到DNA的双链结构,不仅能引发荧光信号,还能提升PCR的结果。另外,在真正的医疗应用场景下,将采取荧光定量PCR仪器进行全自动的研究与检验。这种方式不仅减轻了人力负担,简化了测试环节,还能减少人为系统误差,从而提高了测试的灵敏度与准确率。

近些年,由于具有独特的荧光探针特征的PCR技术,如完全封闭的操作、低污染、迅捷的反应和极高的灵敏度,已经在病毒样品的检测范围得到了大量的应用,并且得到了临床实验师和医护人员的热烈欢迎。100例患儿经病原学、实验室检查与临床症状进行综合诊断,均确诊为手足口病。实荧光检测准确性、敏感性、特异性均高于病毒核酸, $P < 0.05$ 。由此可见,与病毒分离培养法相比,HFMD病毒的核酸检测更依赖于荧光PCR技术。这主要归功于它作为一种精确的核酸定量方法,无需考虑样品种类,并且它的逆转录和扩增反应都可以在完全密闭的环境中执行,这样就能有效地防止PCR产生的无用污染,从而确保了检测结果的精确度。此外,PCR分析是由PCR设备执行的,它拥有高度的自动化和易于使用的特性,无须依赖紫外线或者电泳来观察,这样能够显著降低不必要的实验步骤,从而提高检测的效率和精度。另一方面,荧光PCR技术是通过抽取核酸来执行的,缩短了检测的周期,为HFMD的迅速诊断提供了一种高效的实验工具。另一方面,利用病毒感染的小孩的咽部拭子、排泄物、疱疹液等来做荧光PCR的实验,这种方法的优势在于,它的取样和操作都非常便捷,而

且不会给小孩带来身体上的损害,因此,这种实验的安全性很高,特别是在婴幼儿范围。所以,与病毒分离培养法相比,荧光PCR技术在HFMD病毒的核酸检测上表现得尤其优秀,它能够更准确、更迅速地识别HFMD,这对于临床诊断和治疗这种疾病的孩子们起到了关键的作用。然而,由于荧光PCR技术需要的设备较多,一些基础医院可能不会采纳,所以需要根据实际环境来挑选最适宜的检测手段。

手足口病作为小儿常见疾病,该病具有一定的传染性,故需及时发现、检测,临床检测手足口病的方法较多,本文选择实时荧光PCR准确性较高,但也存在一定的误差率,故为了降低误诊率,还需结合其他检验,提高检查精准性。

参考文献

- [1] 叶莹,杨应松,阮燕如,等.荧光定量PCR技术与酶联免疫法在手足口病肠道病毒检测中的应用价值比较[J].中国当代医药,2023,30(31):133-136.
- [2] 陈樱花.荧光PCR技术在手足口病病毒核酸检测中的应用价值分析[J].基层医学论坛,2021,25(34):4970-4972.
- [3] 罗滢娟.荧光PCR技术在手足口病病毒核酸检测中的应用价值分析[J].当代医学,2021,27(23):38-40.
- [4] 职建军,侯自员.一步法实时RT-PCR检测技术在手足口病病原学检测中的应用[J].临床心身疾病杂志,2021,27(04):129-131.
- [5] 卢艳玲.实时荧光PCR与DNA测序技术检测手足口病病毒结果分析[J].实验与检验医学,2021,39(03):534-537.
- [6] 张蕾,张秀娟,张云帆.实时荧光依赖解旋酶恒温扩增技术和实时荧光RT-PCR在手足口病中的应用价值[J].临床医学研究与实践,2021,6(13):117-119.
- [7] 李文瑞,叶敏南,何月敬,等.实时荧光定量PCR法在手足口病中的诊断价值[J].中国医药科学,2021,11(07):177-179.
- [8] 朱义芳,孙照华,蔡晶娟,等.IgM胶体金法与RT-PCR法对手足口病诊断及随访的价值分析[J].四川医学,2021,42(02):123-126.
- [9] 赵禹.实时荧光定量PCR技术在手足口病检测中的应用[J].中国现代医生,2020,58(15):148-150,154.
- [10] 张杨武.实时荧光PCR法在手足口病病毒检测中应用分析[J].标记免疫分析与临床,2019,26(11):1872-1875.
- [11] 霍咏姬,钟柳贤.手足口病病原的实时荧光PCR法检测与结果分析[J].深圳中西医结合杂志,2019,29(15):68-69.
- [12] 王倩,党一兵,李天顺.手足口病检测中应用实时荧光定量PCR的应用效果[J].中国医疗器械信息,2019,25(14):62-63.