

# 荧光定量逆转录聚合酶链式反应法在病原微生物 检验中的应用研究

郭金芳\*

(滨州市第二人民医院检验科, 滨州 256800)

**摘要: 目的** 对荧光定量逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 法在病原微生物检验中的应用结果进行分析。**方法** 回顾性分析我院检验科于2023年1月14日—2023年12月14日期间检验的7502份微生物检验资料, 分别实施了常规RT-PCR法及荧光定量RT-PCR法检验, 金标准为特殊染色镜检结果, 分析两种检验结果的诊断效能等指标差异。**结果** ①金标准检测出阴性、阳性占比为490:7012, 常规RT-PCR法检验结果为阴性、阳性为:479:6358, 荧光定量RT-PCR法检验阴性、阳性比为:488:7010。②荧光定量RT-PCR法的灵敏度为99.97%、特异度为99.59%、准确度为99.95%, 均高于常规RT-PCR法, 有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。③荧光定量RT-PCR法检验各类微生物检出率依次为99.91%、100.00%、100.00%、99.91%、100.00%、100.00%、99.97%, 高于常规RT-PCR法, 有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论** 荧光定量RT-PCR法在病原微生物检验中诊断效能及各类微生物检出率高, 能够为医生诊疗提供科学依据, 可推行。

**关键词:** 荧光定量逆转录聚合酶链式反应法; 病原微生物; 检验; 常规逆转录聚合酶链式反应法; 支原体

## Analysis of application results of fluorescence quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction in pathogenic microorganism detection

GUO Jin-Fang\*

(Department of Clinical Laboratory, The Second People's Hospital of Binzhou, Binzhou 256800, China)

**ABSTRACT: Objective** To analyze the application results of fluorescence quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in the detection of pathogenic microorganisms. **Methods** A retrospective analysis was made of 7502 microbiological test data examined in the laboratory of our hospital from January 14th, 2023 to December 14th, 2023. Conventional RT-PCR method and fluorescent quantitative RT-PCR method were performed respectively, and the gold standard was the results of special staining microscopy. The diagnostic efficiency and other indicators of the two test results were analyzed. **Results** ① The ratio of negative to positive by gold standard was 490 : 7012, the ratio of negative to positive by conventional RT-PCR was 479 : 6358, and the ratio of negative to positive by fluorescence quantitative RT-PCR was 488 : 7010. ② The sensitivity, specificity and accuracy of fluorescence quantitative RT-PCR method were 99.97%, 99.59% and 99.95%, which were higher than that of conventional RT-PCR method, with statistical significance ( $P < 0.05$ ). ③ The detection rates of various microorganisms by fluorescence quantitative RT-PCR were 99.91%, 100.00%, 100.00%, 99.91%, 100.00%, 100.00%, 99.97%, higher than that by conventional RT-PCR, with statistical significance ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Fluorescence quantitative RT-PCR method has high diagnostic efficiency and detection rate in pathogenic microorganisms, which can provide scientific basis for doctors' diagnosis and treatment and can be implemented.

**KEY WORDS:** fluorescence quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction method; pathogenic microorganism; inspect; conventional reverse transcription-polymerase chain reaction method; mycoplasma

## 0 引言

病原微生物检验属于医学上常见的检验, 目前临床常见的微生物检验涉及传统的微生物培养法、显微镜检查、血清学检

测等, 目前病原微生物检测已经被广泛应用于临床各科室, 如呼吸科、感染科、消化科等多种感染性疾病的诊断<sup>[1]</sup>。病原微生物在医学领域有至关重要的作用, 医生通过对患者的样本检验结果进行分析, 能够确定患者感染病原体的重量, 并有针对

\* 通信作者: 郭金芳, 副主任技师, 实验室主任, 研究方向: 临床医学检验。E-mail: 1303609333@qq.com

\*Corresponding author: GUO Jin-Fang, Deputy Chief Technician, Laboratory Director, Department of Clinical Laboratory, The Second People's Hospital of Binzhou, Binzhou 256800, China. E-mail: 1303609333@qq.com

性制定治疗方案。同时病原微生物检验还有助于检测抗生素的疗效,以便对产生耐药性的患者及时调整方案,并做到对疾病有效控制和预防。目前临床上将特殊染色镜检结果作为金标准,另外还有常规逆转录聚合酶链式反应(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)法及荧光定量 RT-PCR 法检验等,常规 RT-PCR 法在临床较为常见,但检测结果不太理想,荧光定量 RT-PCR 法能够弥补常规法的不足,同时针对样本较少的情况检测结果也十分准确<sup>[2]</sup>。本文研究的意义在于,分析荧光定量 RT-PCR 法检验的灵敏度、特异度以及准确度,以及对不同类型病原微生物的检出率,以证明该种方式在一定程度上比常规 RT-PCR 法更具优势。鉴于此,为分析荧光定量 RT-PCR 法在病原微生物检验中的应用结果,文章回顾性分析了本院检验科于 2023 年 1 月 14—2023 年 12 月 14 日期间检验的 7502 份微生物检验资料,下文将报道。

## 1 资料与方法

### 1.1 资料

回顾性分析本院检验科于 2023 年 1 月 14—2023 年 12 月 14 日期间检验的 7502 份微生物检验资料,以上资料来自不同的患者,患者男女比例为 4010:3492,年龄范围 22~95 周岁,中间值(45.64±1.37)岁,患者知情同意,并且基础相仿,研究可行( $P>0.05$ )。

### 1.2 纳排标准

纳入标准:所有参与的患者均属于微生物感染症状;相关资料完整;资料中途无丢失。

排除标准:检测出酒精成分的样本;有传染病的样本;采集过程中被污染的样本。

### 1.3 方法

所有样本均进行常规 RT-PCR 法以及荧光定量 RT-PCR 法检验。常规 RT-PCR 法检验:检验样本为患者的粪便,每位患者取粪 1 g,并用 10 mL 无菌生理盐水混合后,再继续加入氯仿 0.2 mL,将样本均匀晃动 30 s,让样本和试剂充分结合,之后将样本放置于室温下等待 3 min,之后将样本离心处理,离心温度为 4℃ 以下,12000 g 离心 15 min,用取上清液进行检验,将上层清液放置到离心管中,加入清液同等数量的异丙醇,将其放置在 -20℃ 环境中半小时,继续离心,低于 4℃ 温度下,12000 g 离心 15 min。将深层清液中加入 75% 乙醇 1 mL,离心,继续在 4℃ 下以 7500 g 离心 10 min。得到上层清液,将残留液用滤纸吸取,将处理好的样本放置于室温下干燥处理。后继续在处理好的样本中加入 20 μL 焦碳酸二乙酯(DEPC),将其混合均匀,并取出 1 μL,继续加入 DEPC 79 μL,并计算出样本的核糖核酸(Ribonucleic Acid, RNA)浓度,计算方法为分光光度法,后实施逆转录处理,合成互补脱氧核糖核酸(DeoxyriboNucleic Acid, DNA),应用 PCR 仪进行扩增,实施 25~35 个循环检测,取扩增后聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)产物,

进行纯化与测序处理。

荧光定量 RT-PCR 法检验:样本采取,制作、互补 DNA 合成方法和常规 RT-PCR 法检验一致,互补 DNA 扩增有所差异,此法中采取特异引物与染料法荧光定量试剂盒,检测循环次数为 40,取扩增后 PCR 产物,进行纯化与测序处理。

### 1.4 观察指标

①检验结果:对比常规 RT-PCR 法及荧光定量 RT-PCR 法检验的结果。

②诊断效能:分别计算常规 RT-PCR 法及荧光定量 RT-PCR 法的诊断效能,准确度=(真阴性+真阳性)例数/总例数×100%,灵敏度=真阳性例数/(真阳性+假阴性)例数×100%,特异度=真阴性例数/(真阴性+假阳性)例数×100%。

③各类病原微生物的检出率:对比两种方法检测下不同病原微生物的检出率。

### 1.5 统计学分析

研究所获得数据均输入 SPSS 22.0 统计学软件,以  $[(n)\%]$  代表计数指标,由  $\chi^2$  实施组间诊断效能、各种病原微生物检出率等差异检验,当  $P<0.05$  具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 检验结果

金标准检测出 7502 份样本中,阴性、阳性占比为 490:7012,常规 RT-PCR 法检验结果中,阴性、阳性比为 479:6358,荧光定量 RT-PCR 法检验阴性、阳性比为:488:7010,结果表明荧光定量 RT-PCR 法检验结果与金标准更为接近,如表 1 所示。

表 1 常规 RT-PCR 法及荧光定量 RT-PCR 法检验结果  $[(n)\%]$   
Table 1 Test results of conventional RT-PCR and fluorescent quantitative RT-PCR  $[(n)\%]$

特殊染色镜检 (金标准)	常规 RT-PCR 法		荧光定量 RT-PCR 法		合计
	阳性	阴性	阳性	阴性	
阳性	6358	654	7010	2	7012
阴性	11	479	2	488	490
合计	6369	1133	7012	490	7502

### 2.2 诊断效能

荧光定量 RT-PCR 法的灵敏度、特异度、准确度均高于常规 RT-PCR 法,有统计学意义( $P<0.05$ ),如表 2 所示。这是由于荧光定量 RT-PCR 能够实时监测 PCR 扩增过程,同时一体化操作减少了人为干扰,能够有效提高检测的灵敏度和特异性。

### 2.3 各类病原微生物的检出率

特殊染色镜检(金标准)检测出衣原体感染 1142 份,支原体感染 1304 份,寄生虫 1467 份,细菌感染 1142 份,真菌感染 815 份,病毒感染 1142 份,荧光定量 RT-PCR 法检验的微生物检出率较常规 RT-PCR 法更高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 3。

表 2 常规 RT-PCR 法及荧光定量 RT-PCR 法检验诊断效能  $[(n)\%]$   
Table 2 Diagnostic efficacy of conventional RT-PCR and fluorescent quantitative RT-PCR  $[(n)\%]$

检测方法	例数	灵敏度	特异度	准确度
常规 RT-PCR 法	7502	6358/7012(90.67)	479/490(97.76)	6837/7502(91.14)
荧光定量 RT-PCR 法	7502	7010/7012(99.97)	488/490(99.59)	7498/7502(99.95)
$\chi^2$	—	677.7408	4.9893	681.5082
$P$	—	0.0000	0.0255	0.0000

表3 常规 RT-PCR 法及荧光定量 RT-PCR 法检验对各类病原微生物的检出率 [(n)%]

Table 3 Detection rates of various pathogenic microorganisms by conventional RT-PCR and fluorescent quantitative RT-PCR method [(n)%]

检验方法	衣原体(n=1142)	支原体(n=1304)	寄生虫(n=1467)	细菌(n=1142)	真菌(n=815)	病毒(n=1142)	总检出(n=7012)
常规 RT-PCR 法	953(83.45)	1271(97.47)	1430(97.48)	953(83.45)	794(97.42)	957(83.80)	6358(90.67)
荧光定量 RT-PCR 法	1141(99.91)	1304(100.00)	1467(100.00)	1141(99.91)	815(100.00)	1142(100.00)	7010(99.97)
$\chi^2$	200.7470	31.4280	35.4744	200.7470	19.2962	199.1350	677.8408
P	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

### 3 讨论与结论

主要针对细菌、病毒、真菌等多种微生物的检测,是医生诊断疾病、评估感染源以及预测疾病发展趋势的主要手段之一。不同类型的病原微生物侵入患者身体,可导致多种疾病,严重威胁患者生命<sup>[3]</sup>。病原微生物检验的主要目的是能尽快确定患者感染的类型,进而帮助医生对疾病进行判断及预测,为患者健康做出保障。目前常见的有常规 RT-PCR 检验法及荧光定量 RT-PCR 法,通过研究检验样本的分子结构和功能,对各种疾病做出客观评估<sup>[4]</sup>。PCR 技术属于一种利用多种引物进行聚合酶链式反应的分子生物学技术,能够得出多种病原微生物的 DNA、RNA 序列,RT-PCR 检验法在针对样本较少的情况下结果可能不是十分准确,而荧光定量 RT-PCR 法的准确性、灵敏度等均比较高,同时检测结果迅速,比常规方法更具优势<sup>[5]</sup>。

在本研究中,荧光定量 RT-PCR 法检验出的阴性、阳性比与金标准更为接近,究其原因,该种检测方式主要以计算机和软件分析实现 PCR 扩增、产物检测和定量分析,实施的是一体化操作。并且荧光定量 RT-PCR 法能够将 DNA 杂交的高特异性和光谱技术的高精准性融合,应用荧光探针和光电传导,直接探测基因扩增过程中荧光信号的变化,以获得定量结果,相当于在 PCR 反应过程中自动完成了 Northern 杂交,该种方法操作简便、速度快通过计算机和分析软件实现 PCR 扩增、产物检测和定量分析一体化,最终得到的结果观测重复性好一起在线实时观测,结果判断直观,避免人为因素干扰,因而能够与金标准更为接近,让阴性和阳性结果更加准确<sup>[6]</sup>;荧光定量 RT-PCR 法的灵敏度、特异度、准确度均高于常规 RT-PCR 法 ( $P < 0.05$ ),证明荧光定量 RT-PCR 法可对单个基因进行逐一检验,还能对极低浓度的微生物进行检验,除此之外,该种检测方法能对一系列特定微生物做到精准识别,防止出现非特异性反应,并在检测中克服假阳性的问题。同时应该定量 RT-PCR 能够检测非常低浓度的 RNA 分子,甚至能够检测到单个细胞中的 RNA 表达。通过设计特异性引物,该种检测方法可以精确地扩增目标 RNA 序列,从而避免非特异性扩增的干扰。这种特异性使得 RT-PCR 在复杂生物样本中能够准确识别并扩增目标基因。并且可以根据实验需求进行多种变通,如使用不同的引物来扩增不同的基因片段,或者通过调整反应条件来优化扩增效果。这种灵活性使得 RT-PCR 能够适应不同的研究目的和实验条件,最终得出的数据更加可靠,减少了因非特异性扩增导致的假阳性结果,从而提高了实验的准确度,因此其灵敏度、特异度、准确度均较高<sup>[7]</sup>;荧光定量 RT-PCR 法检验各类微生物检出率高于常规 RT-PCR 法 ( $P < 0.05$ ),证明荧光定量 RT-PCR 法在病原微生物检验中,其结果十分接近金标准检验,并且诊断效能较高,微生物检出率也较常规方法更高。究其原因,主要是荧光定量 RT-PCR 法结合了 PCR 技术与荧光检测技术,在分子生物学的范畴内,能够对 PCR 产物进行标记和跟踪,实时监测反应物变化,并能够通过扩增循环产物,定量分析,最终提升诊断效能以及病原微生物的检出率<sup>[8]</sup>。在应该定量 RT-PCR 法检测中,PCR 扩增时在加入一对引物的同时加入一个特异性的荧光

探针,该探针两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团。开始时,探针完整地结合在 DNA 任意一条单链上,报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收,检测不到荧光信号;PCR 扩增时,Taq 酶将探针酶切降解,使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离,从而荧光监测系统可接收到荧光信号,即每扩增一条 DNA 链,就有一个荧光分子形成,实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步。另外,该种方法将 DNA 杂交的高特异性和光谱技术的高精准性融合,应用荧光探针和光电传导,直接探测基因扩增过程中荧光信号的变化,以获得定量结果,相当于在 PCR 反应过程中自动完成了 Northern 杂交,提升微生物检出率<sup>[9-10]</sup>。

荧光定量 RT-PCR 法在病原微生物检验中的,灵敏度、特异度、准确度均较高,能够有效检出各种病原微生物,对临床诊断有积极意义,可推广。

### 参考文献

- [1] 罗有红. 荧光定量 RT-PCR 法在病原微生物检验中的应用价值 [J]. 中国社区医师, 2023, 39(33): 92-94.
- [2] CAPUTO V, CALVINO G, STRAFELLA C, *et al.* Tracking the Initial Diffusion of SARS-CoV-2 Omicron Variant in Italy by RT-PCR and Comparison with Alpha and Delta Variants Spreading [J]. *Diagnostics*, 2022, 12(02): 467-467.
- [3] 古小珠, 陈春梅, 李晓清. 酶联免疫吸附法与 RT-PCR 法对血液标本内乙肝病毒检验的价值分析 [J]. 黑龙江中医药, 2022, 51(05): 68-70.
- [4] 陶琴芳. 酶联免疫吸附法与 RT-PCR 法对血液标本内乙肝病毒的检验结果比较 [J]. 人人健康, 2022, (06): 105-107.
- [5] 张刚. 酶联免疫吸附法与 RT-PCR 法对血液标本内乙肝病毒的检验价值比较 [J]. 云南医药, 2021, 42(02): 179-181.
- [6] 燕雯雯, 沈继录, 李晓峰, 等. 多重实时 PCR 检测腹膜透析相关性腹膜炎致病菌的应用分析 [J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(05): 712-717.
- [7] 燕雯雯. 多重实时 PCR 检测腹膜透析相关性腹膜炎致病菌的应用分析 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2016.
- [8] 梅冰, 彭绪亚, 谢影. 采用 RT-PCR 法解析餐厨垃圾厌氧消化微生物群落多样性 [J]. 环境污染与防治, 2015, 37(08): 26-30.
- [9] 代洪亮, 严人, 王普, 等. 实时定量 RT-PCR 在微生物分子特性研究中的应用 [J]. 生物学通报, 2013, 48(06): 1-4.
- [10] 尚慧锋, 武艳飞. 实时荧光定量 PCR 法在检测 3 种泌尿生殖道病原微生物中的应用 [J]. 中国医药指南, 2012, 10(31): 450-451.

### 作者简介

郭金芳, 副主任技师, 实验室主任, 研究方向: 临床医学检验。