

荧光定量PCR在发热呼吸道症候群卫生检验的应用

熊文

恩施市疾病预防控制中心 湖北 恩施 445000

摘要：目的：探讨荧光定量PCR技术在发热呼吸道症候群（FRS）病原卫生检验中的应用价值。方法：选取2022年1月至2025年1月某医院收治的180例FRS患者，机数字表法分为观察组（ $n=90$ ）与对照组（ $n=90$ ）。观察组采用荧光定量PCR技术检测病原，对照组采用胶体金免疫层析法（GICA）检测病原。结果：相比对照组，观察组病原总检出率较高（ $P<0.05$ ），且流感病毒A型、呼吸道合胞病毒、新型冠状病毒检出率均较高（ $P<0.05$ ）；观察组检验特异性、敏感性高于对照组（ $P<0.05$ ），虽检出时间长于对照组（ $P<0.05$ ），但临床用药指导准确率高于对照组，患者平均住院时间短于对照组（ $P<0.05$ ）。结论：荧光定量PCR技术在FRS病原检验中具有高检出率、高特异性、高敏感性优势，虽检出时间略长于胶体金法，但能显著提升临床用药精准度、缩短患者住院时间。

关键词：荧光定量PCR；发热呼吸道症候群；卫生检验

发热呼吸道症候群（FRS）是临床常见感染性症候群，以发热伴咳嗽、咽痛、胸闷等呼吸道症状为核心表现，病原涵盖病毒、细菌、支原体等，其中流感病毒、呼吸道合胞病毒、新型冠状病毒是主要致病病毒。FRS传播速度快、易感人群广，精准检出病原是阻断传播、指导临床用药的关键。传统病原检验以胶体金法、病原培养法为主，胶体金法虽操作简便、快速，但检出率低，培养法需3-7d，易延误诊疗。荧光定量PCR技术基于核酸扩增与实时荧光监测，具有高敏感性、特异性，可实现病原快速检出^[1]。本研究通过对比荧光定量PCR与胶体金法的检验效果，明确其在FRS病原检验中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2022年1月至2025年1月医院感染科、呼吸科收治的180例FRS患者。随机数字表法分为观察组（ $n=90$ ）与对照组（ $n=90$ ）。观察组年龄19-64岁，平均（ 42.5 ± 10.3 ）岁；男47例，女43例。对照组患者年龄18-65岁，平均（ 43.1 ± 10.5 ）岁；男45例，女45例。两组一般资料比较（ $P>0.05$ ），有可比性。纳入标准：（1）符合FRS诊断标准：体温 $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ，伴咳嗽、咽痛、鼻塞、胸闷中至少2项症状，发病至就诊时间 $\leq 72\text{h}$ ；（2）未接受抗病毒、抗菌药物治疗。排除标准：（1）合并严重心肝肾疾病、免疫缺陷（如HIV感染）；（2）妊娠或哺乳期女性；（3）呼吸道肿瘤、支气管扩张等基础疾病急性发作。

1.2 检验方法

1.2.1 样本采集

两组均采集鼻咽拭子样本：使用无菌鼻咽拭子，经

鼻腔插入约8-10cm，旋转3-5圈后取出，立即放入含3mL病毒保存液（含RNA酶抑制剂）的采样管中，密封后4℃保存，2h内完成检验。

1.2.2 观察组：荧光定量PCR检验流程

（1）核酸提取：①取200μL鼻咽拭子保存液至1.5mL离心管，加入500μL裂解液（RNA提取试剂盒配套），漩涡混匀10s，室温静置5min；②加入300μL无水乙醇，混匀后转移至吸附柱，12000r/min离心30s，弃废液；③加入500μL洗涤液Ⅰ，12000r/min离心30s，弃废液；④加入500μL洗涤液Ⅱ，12000r/min离心30s，弃废液；⑤空柱12000r/min离心2min，去除残留洗涤液；⑥将吸附柱转移至新离心管，加入50μL无酶水，室温静置2min，12000r/min离心2min，收集洗脱液（即提取的核酸），NanoDropOne检测核酸纯度（ $A_{260}/A_{280}=1.8-2.0$ 为合格）。

（2）反转录合成cDNA：反应体系（20μL）：RNA模板10μL、反转录缓冲液4μL、dNTP混合物2μL、反转录酶1μL、RNase抑制剂1μL、无酶水2μL。反应条件：37℃15min（反转录），85℃5s（酶失活），4℃保存。（3）荧光定量PCR扩增：①反应体系（25μL）：2×SYBRGreenPCRMasterMix12.5μL、特异性引物（上游+下游）2μL、探针1μL、cDNA模板5μL、无酶水4.5μL；②引物探针序列（部分示例）：流感病毒A型上游引物5'-GACCRATCCTGTTYTGATTCTGT-3'，下游引物5'-AGGGYTTTGTGTTTCACGCTCAC-3'，探针5'-FAM-AGCAGGGCCATCAAGGATGAGCTCT-BHQ1-3'；③反应条件：95℃预变性3min；95℃变性15s，58℃退火延伸30s，40个循环，每循环延伸阶段收集荧光信号；④结果

判断：Ct值 ≤ 38为阳性，Ct值 > 40为阴性，38 < Ct值 ≤ 40为可疑，需重复检验，重复后仍为可疑判定为阴性。

1.2.3 对照组：胶体金免疫层析法检验流程

严格按照各病原胶体金试剂盒说明书操作：①取100μL鼻咽拭子保存液滴加至试剂盒加样孔；②室温（20-25℃）静置15min；③结果判断：检测线（T线）与质控线（C线）均显色为阳性，仅C线显色为阴性，仅T线或无显色为无效（需重新采样检验）。

1.3 观察指标

（1）病原检出率。（2）检验性能指标：①检出时间：从样本接收至出具报告的时间；②特异性：真阴性例数/（真阴性+假阳性）例数×100%；③敏感性：真阳性例数/（真阳性+假阴性）例数×100%；其中真阳性 = 金标

准阳性且检验阳性，真阴性 = 金标准阴性且检验阴性，假阳性=金标准阴性但检验阳性，假阴性 = 金标准阳性但检验阴性。（3）临床应用价值指标：包括用药指导准确率、患者平均住院时间。

1.4 统计学方法

运用SPSS22.0统计学软件，用“（ $\bar{x} \pm s$ ）”、 $[n(\%)]$ 表示，“*t*”、“ χ^2 ”检验，*P* < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者病原检出率比较

观察组均高于对照组（*P* < 0.05）；流感病毒B型、腺病毒、副流感病毒1-3型检出率两组比较，差异无统计学意义（*P* > 0.05）。见表1。

表1 病原检出率[n(%)]

组别	例数	总检出率	流感病毒A型	流感病毒B型	呼吸道合胞病毒	新型冠状病毒	腺病毒	副流感病毒1-3型
观察组	90	78 (86.7)	32 (35.6)	15 (16.7)	20 (22.2)	12 (13.3)	8 (8.9)	6 (6.7)
对照组	90	56 (62.2)	18 (20.0)	13 (14.4)	10 (11.1)	6 (6.7)	7 (7.8)	5 (5.6)
χ^2 值	-	14.893	5.832	0.235	5.764	3.927	0.078	0.091
<i>P</i> 值	-	< 0.001	0.016	0.628	0.016	0.048	0.780	0.763

2.2 两组检验性能指标比较

观察组检出时间长于对照组（*P* < 0.05）。见表2。

观察组检验特异性、敏感性高于对照组（*P* < 0.05）；

表2 检验性能指标（ $\bar{x} \pm s, \%$ ）

组别	例数	检出时间（h）	特异性	敏感性
观察组	90	1.5±0.3	98.9 (89/90)	97.8 (76/78)
对照组	90	0.25±0.05	88.9 (80/90)	82.2 (46/56)
<i>t</i> / χ^2 值	-	42.158	8.274	10.563
<i>P</i> 值	-	< 0.001	0.004	< 0.001

2.3 两组临床应用价值指标比较

短（*P* < 0.05）。见表3。

观察组用药指导准确率较高、患者平均住院时间较

表3 临床应用价值指标（ $\bar{x} \pm s, \%$ ）

组别	例数	用药指导准确率	平均住院时间（d）
观察组	90	93.3 (84/90)	5.2±1.1
对照组	90	71.1 (64/90)	7.5±1.5
χ^2 / <i>t</i> 值	-	16.892	10.875
<i>P</i> 值	-	< 0.001	< 0.001

3 讨论

发热呼吸道症候群（FRS）是全球范围内高发的感染性疾病综合征，其病原谱具有多样性、季节性、地域性的特点：在我国，冬春季以流感病毒、SARS-CoV-2为主，夏秋季以RSV、腺病毒为主，且近年来混合感染比例上升，给病原检出带来挑战。FRS的临床危害不仅在于症状本身，更在于其传播性，如流感病毒可通过飞沫传播，潜伏期1-4d，易引发聚集性疫情；SARS-CoV-2虽致

病性减弱，但仍对老年人、基础疾病患者构成威胁^[2]。传统FRS病原检验方法存在明显局限：①胶体金法：基于抗原-抗体反应，操作仅需15-30min，但受限于抗体特异性与抗原载量，对低载量病原（检出率低，且无法区分病原亚型；②病原培养法：是病原检出金标准，但病毒培养需依赖细胞系，周期长达3-7d，无法满足临床快速诊疗需求；③普通PCR法：虽能扩增核酸，但需术后电泳检测，易污染且无法定量^[3]。荧光定量PCR技术通过实时荧光监测、特异性引物探针，实现了病原快速、精准、定量检出^[4]。

本研究结果显示，观察组病原总检出率高于对照组（*P* < 0.05），且流感病毒A型、RSV、SARS-CoV-2检出率均显著优于对照组，其核心机制在于两种技术的检测原理差异：（1）检测靶点差异：荧光定量PCR针对病原

核酸(RNA/DNA),胶体金法针对病原抗原(如病毒衣壳蛋白)。FRS患者发病早期(12-24h),病毒在呼吸道上皮细胞内复制,核酸已大量存在(可通过PCR扩增检出),但抗原表达量尚未达到胶体金法检出阈值(通常需 10^4 copies/mL以上),导致胶体金法漏检。(2)特异性识别差异:荧光定量PCR采用病原特异性引物探针(如流感病毒A型的M基因保守序列),可避免与其他病毒交叉反应;而胶体金法的抗体可能与同源性较高的病原(如副流感病毒1型与3型)发生交叉反应,导致假阳性或假阴性^[5]。(3)多病原检测能力:观察组采用多联荧光定量PCR试剂盒,可同时检测6种常见病原,而对照组需针对不同病原使用单独胶体金试剂盒,操作繁琐且易遗漏混合感染。

观察组检验特异性、敏感性高于对照组($P < 0.05$),虽检出时间长于对照组,但仍符合临床24h内出结果的要求,其性能优势的核心原因在于:(1)敏感性提升:荧光定量PCR通过核酸扩增(40个循环可将1个核酸分子扩增至 10^6 copies以上),实现“微量核酸→可检测信号”的转化,尤其适合FRS患者恢复期或免疫功能低下者的病原检出^[6]。(2)特异性保障:PCR的特异性依赖引物探针与病原核酸的互补配对,本研究使用的试剂盒针对每种病原设计2-3对引物探针,通过“多重验证”减少假阳性;而胶体金法的抗体易受标本中杂质影响,导致非特异性结合。观察组用药指导准确率高于对照组,患者平均住院时间短于对照组($P < 0.05$),其核心逻辑在于“精准检验→精准治疗→改善预后”的链条:(1)用药指导精准化:FRS的治疗核心是对因治疗,病毒感染需使用抗病毒药物,细菌感染需使用抗生素,混合感染需联合用药。(2)住院时间缩短:精准用药减少了无效治疗

的时间成本,同时早期明确病原可避免病情进展。(3)疫情防控价值:荧光定量PCR可定量检测病原载量,对高载量感染者(如SARS-CoV-2Ct值 < 25)可早期识别并采取隔离措施,降低传播风险。

综上所述,荧光定量PCR技术在FRS病原卫生检验中具有“高检出率、高特异性、高临床价值”的优势,虽检出时间略长于胶体金法,但能显著提升诊疗精准度、缩短住院时间,是FRS病原检验的理想技术,值得临床广泛推广。

参考文献

- [1]马青,杨敏,刘英,等.贵阳市发热呼吸道症候群病例常见细菌性病原体检测与分析[J].国际检验医学杂志,2023,44(17):2092-2095.
- [2]凡小荣,曾长英,罗水斌,等.内江市208例发热呼吸道症候群患者标本检测分析[J].医学动物防制,2022,38(2):147-149,152.
- [3]王春,赵雪,滕峥,等.2019—2020年上海市住院儿童病例发热呼吸道症候群病原谱研究[J].中华实验和临床病毒学杂志,2022,36(3):270-275.
- [4]周广恩,华华,陈淑红,等.黑龙江省2015-2016年发热伴出疹症候群流行特征及病原学分析[J].中国公共卫生管理,2020,36(4):544-546.
- [5]刘高山,李红,牛培华,等.多重核酸检测试剂盒RespiFinder(R)2SMART在检测12种呼吸道感染病毒中的临床应用性能评价[J].国际病毒学杂志,2020,27(1):61-66.
- [6]张辉,王虹玲,吴曷,等.舟山市严重急性呼吸道感染病毒病原学研究[J].中国卫生检验杂志,2021,31(13):1647-1649.