

G G

肖超广

(南昌市湾里管理局疾病预防控制中心检验股,江西 南昌 330004)

摘要:目的 探究荧光定量反转录聚合酶链反应(RT-PCR)对 G I 型、G II 型诺如病毒(NV)的检测效能。方法 以 2020 年 12 月-2023 年 12 月南昌市湾里管理局疾病预防控制中心收治的 50 例疑似 NV 感染患者为研究对象,采集其粪便样本,依次应用常规 RT-PCR 与荧光定量 RT-PCR 检测方式进行检验,比较两种检验方式的阳性检出率及检测效能(检测准确性、敏感度、特异度)。结果 荧光定量 RT-PCR 对 G I 型、G II 型诺如病毒的阳性检出率高于常规 RT-PCR 检测($P<0.05$)。荧光定量 RT-PCR 对 G I 型、G II 型诺如病毒的检测准确性、敏感度、特异度高于常规 RT-PCR 检测($P<0.05$)。结论 荧光定量 RT-PCR 在 G I 型、G II 型诺如病毒诊断中具有较高检测效能。

关键词:诺如病毒;荧光定量反转录聚合酶链反应;G I 型;G II 型;检测效能

中图分类号:R445.1

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2025.06.022

文章编号:1006-1959(2025)06-0127-04

Detection Efficiency of Fluorescence Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction for G I and G II Norovirus

XIAO Chaoguang

(Inspection Unit, Nanchang Wanli Administration Center for Disease Control and Prevention, Nanchang 330004, Jiangxi, China)

Abstract: Objective To explore the detection efficiency of fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for G I and G II norovirus (NV). **Methods** From December 2020 to December 2023, 50 patients with suspected NV infection admitted to the Nanchang Wanli Administration Center for Disease Control and Prevention from December 2020 to December 2023 were selected as the research objects. Their fecal samples were collected and tested by conventional RT-PCR and fluorescence quantitative RT-PCR in turn. The positive detection rate and detection efficiency (detection accuracy, sensitivity, specificity) of the two test methods were compared. **Results** The positive detection rate of G I and G II norovirus by fluorescence quantitative RT-PCR was higher than that by conventional RT-PCR ($P<0.05$). The detection accuracy, sensitivity and specificity of G I and G II norovirus by fluorescence quantitative RT-PCR were higher than those by conventional RT-PCR ($P<0.05$). **Conclusion** Fluorescence quantitative RT-PCR has a high detection efficiency in the diagnosis of G I and G II norovirus.

Key words: Norovirus; Fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction; G I type; G II type; Detection efficiency

诺如病毒(Norovirus, NV)是引发急性胃肠炎的主要病原体之一,以 G I 型、G II 型最为常见,其传播途径广、感染剂量低、病毒变异快,易引发诺如病毒感染聚集性疫情,对我国公共卫生安全构成了一定威胁,病毒的准确检验及快速管控是降低其传播风险的重要前提^[1,2]。近年来,随着诺如病毒全基因及部分序列的逐步测定,分子生物学技术被广泛应用于该病毒的检验及临床研究中,其中,反转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)为当前常用病毒检测方式,该技术可通过 RNA 提取、反转录及 PCR 扩增等过程,获取

目的基因序列及其表达水平^[3,4]。在此基础上,荧光定量 RT-PCR 可将荧光基因加入其 PCR 扩增反应体系中,利用其荧光信号的实时表达,实现病毒 RNA 的定量检测^[5,6]。为了进一步探究荧光定量 RT-PCR 在 NV 检测中的应用价值,本研究结合 2020 年 12 月-2023 年 12 月南昌市湾里管理局疾病预防控制中心收治的 50 例疑似 NV 感染患者,分析荧光定量 RT-PCR 对 G I 型、G II 型 NV 的检测效能,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 以 2020 年 12 月-2023 年 12 月南昌市湾里管理局疾病预防控制中心收治的 50 例疑似 NV 感染患者为研究对象,男 29 例,女 21 例,年龄 18~68 岁,平均年龄(33.84±7.65)岁,以上受检者均

作者简介:肖超广(1979.12-),男,江西宜春县人,本科,主管技师,主要从事卫生检验工作

以恶心、呕吐、腹痛、腹泻等消化道症状为主诉就诊,所有研究对象均知情且自愿参与本次研究。

1.2 纳入和排除标准 纳入标准:①经临床初步诊断为疑似 NV 感染;②可按要求采集粪便样本;③取样前未服用抗病毒药物。排除标准:①合并其他消化道疾病者;②伴全身感染者;③遗传代谢疾病史者;④粪便样本采集不合格者。

1.3 方法

1.3.1 RNA 提取 采用西安天隆 CqEx-DNA/RNA 病毒(CDC)核酸提取试剂盒对粪便样本进行处理,按试剂盒说明书提取 RNA,随后取 50 μl DEPC 水溶液用于 RNA 沉淀的溶解,静置 2 min 后,离心处理(4000 r/min, 20 min),随后取上清液分为两份,开始以下检测。

1.3.2 常规 RT-PCR 取逆转录试剂盒(上海伯杰医疗科技股份有限公司)进行逆转录操作,其过程严格按说明书进行,PCR 反应体系共 25 μl ,包括 2.5 μl 反应缓冲液(10 \times PCR Buffer)、0.5 U 耐热 DNA 聚合酶(Taq 酶)、3 μl 脱氧核苷三磷酸底物(dNTP-mix)、3 μl 互补脱氧核糖核酸(cDNA)与 2.5 μl 引物混合物,剩余取灭菌蒸馏水补足。反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性处理 3 min \rightarrow 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性处理 30 s \rightarrow 54 $^{\circ}\text{C}$ 退火处理 30 s \rightarrow 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共 40 个循环。

1.3.3 荧光定量 RT-PCR 逆转录步骤同上,PCR 反应体系为 20 μl ,包括 10 μl 2 \times Premix Ex Taq、0.4 μl

50 \times ROX Reference Dye II、2 μl cDNA、3.2 μl 引物混合物、0.8 μl 探针,剩余取灭菌蒸馏水补足。反应条件:50 $^{\circ}\text{C}$ 处理 2 min \rightarrow 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性处理 30 s \rightarrow 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性处理 5 s \rightarrow 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火处理 34 s,共 40 个循环,于 60 $^{\circ}\text{C}$ 条件下收集其荧光信号,获取 CT 值,绘制相应标准曲线。

1.4 观察指标 ①比较两种检验方式的阳性检出率;②以最终诊断结果为金标准,比较两种检验方式的检测效能,包括诊断准确性、敏感度与特异度。诊断准确性=(真阳性+真阴性)/总例数 \times 100%;敏感度=真阳性/(真阳性+假阴性) \times 100%;特异度=真阴性/(真阴性+假阳性) \times 100%。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 24.0 软件进行数据处理,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,组间行 t 检验对比,计数资料以[n(%)]表示,组间行 χ^2 检验分析, $P<0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种检验方式的阳性检出率比较 荧光定量 RT-PCR 对 G I 型、G II 型诺如病毒的阳性检出率高于常规 RT-PCR 检测($\chi^2=4.105, P=0.043$),见表 1。

2.2 两种检验方式的检测效能比较 荧光定量 RT-PCR 对 G I 型、G II 型诺如病毒的检测准确性、敏感度、特异度高于常规 RT-PCR 检测($P<0.05$),见表 2、表 3。

表 1 常规 RT-PCR 与荧光定量 RT-PCR 的阳性检出率比较[n(%)]

检测方式	n	G I 型	G II 型	合计
常规 RT-PCR	50	8(16.00)	19(38.00)	27(54.00)
荧光定量 RT-PCR	50	12(24.00)	22(44.00)	34(68.00)

表 2 常规 RT-PCR 与荧光定量 RT-PCR 的检测结果比较(n)

金标准	常规 RT-PCR		荧光定量 RT-PCR		合计
	阳性	阴性	阳性	阴性	
阳性	32	4	34	2	36
阴性	1	13	0	14	14
合计	33	17	34	16	50

表 3 常规 RT-PCR 与荧光定量 RT-PCR 的阳性检出率比较(%)

检测效能	<i>n</i>	准确性	敏感度	特异度
常规 RT-PCR	50	90.00	88.89	92.86
荧光定量 RT-PCR	50	96.00	94.44	100.00
χ^2		4.217	4.832	5.014
<i>P</i>		0.012	0.006	0.002

3 讨论

诺如病毒是人类杯状病毒科诺如病毒属的原型代表株,为单股正链 RNA 病毒,具有较高的传染性 & 传播能力,易引起非细菌性腹泻爆发,导致公共卫生安全问题,在此背景下,寻求特异、灵敏、快速的检测方法对诺如病毒感染的防控具有重要意义^[7,8]。目前,病原学检查为诺如病毒诊断金标准,现以 RT-PCR 等分子生物学检测方法最为常见,其中,常规 RT-PCR 检测技术可充分利用 RNA 逆转录与聚合酶链式反应等步骤,完成特定 RNA 序列的复制与扩增,实现病毒的定性、定量检验^[9,10]。常规 RT-PCR 检测方案成本较低、应用广泛,但其操作繁琐、敏感性中等,存在一定污染风险及非特异性扩增问题,应用局限性明显^[11,12]。荧光定量 RT-PCR 则是基于 RT-PCR 检测体系制定的精确化分析手段,可利用荧光基团的加入,凭借其荧光信号的累积情况,反映 PCR 扩增体系中循环扩增产物的变化,以此实现 PCR 进程的实时监测,完成目标分子的定量检测^[13,14]。近年来,该技术已日益成熟,其操作简单、灵敏度高,可增加定量检测的精确性,在基因表达分析及病毒载量检测中具有较高应用价值^[15,16]。

本研究结果显示,荧光定量 RT-PCR 对 G I 型、G II 型诺如病毒的阳性检出率高于常规 RT-PCR 检测($P<0.05$),提示荧光定量 RT-PCR 在 G I 型、G II 型诺如病毒的筛查中具有更高检测价值。分析认为,常规 RT-PCR 检测为非特异性测定方式,仅可反映病毒核酸的总载量,无法实现扩增反应的实时检测,存在定量不准确等问题,易引发漏检、误检等情况^[17]。相较之下,荧光定量 PCR 加入了荧光信号采集系统与计算机分析处理系统,可借助荧光信号监测扩增循环产物的积累情况,实时掌握扩增进程的同时,通过荧光曲线及 C_q 值等参数,完成目标病毒的定量

检测,其精确性更高,检出效果更佳^[18,19]。本研究显示,荧光定量 RT-PCR 对 G I 型、G II 型诺如病毒的检测准确性、敏感度、特异度高于常规 RT-PCR 检测($P<0.05$),表明荧光定量 RT-PCR 对诺如病毒的诊断效能优于常规 RT-PCR 检测。究其原因,常规 RT-PCR 检测技术仅可对 PCR 扩增反应的终点产物进行分析,无法完成起始模板的准确定量,其对病毒 RNA 质量的依赖性较高,易受到逆转录酶及 PCR 引物等因素的影响,随着循环次数的增多,其产物的扩增偏离模板剂量较不可控,检测效能较为有限^[20,21]。荧光定量 RT-PCR 则可充分利用扩增循环中的荧光表达,测定 PCR 的最终产物量,用于诺如病毒的检测,其操作过程均于封闭体系下完成,大大降低了污染概率,且解决了常规 RT-PCR 只能终点检测的局限性问题,其荧光信号检测可覆盖每轮循环,避免了扩增偏离引起的检测误差,有效降低了反应的非特异性,具有更高的检测准确性、敏感度及特异度^[22,23]。

综上所述,荧光定量 RT-PCR 在 G I 型、G II 型诺如病毒诊断中具有较高检测效能,可为其病毒感染的诊断提供可靠参考信息,值得临床应用。

参考文献:

- [1]杨艳歌,吴占文,李涛,等. GI 和 GII 诺如病毒 ERA 的可视化快速检测[J]. 华南理工大学学报(自然科学版),2023,51(12): 140-151.
- [2]Dey SK,Sharif N.Evaluation of a rapid immunochromatography(IC) diagnosis kit for the detection of rotavirus and norovirus in diarrheal stool specimens in Bangladesh [J].International Journal of Infectious Diseases,2021,101(S1):180-203.
- [3]付瑶,刘海婷,施俊超,等.反转录酶在微小 RNA 实时荧光定量聚合酶链反应中的作用[J].实用检验医师杂志,2023,15(2): 193-197.
- [4]Chhabra P,Browne H,Huynh T,et al.Single-step RT-PCR

- assay for dual genotyping of GI and GII norovirus strains [J]. *Clin Virol*, 2021, 134: 104689.
- [5] Bonura F, Urone N, Bonura C, et al. Recombinant GII.P16 genotype challenges RT-PCR-based typing in region A of norovirus genome [J]. *J Infect*, 2021, 83(1): 69-75.
- [6] 王婷, 田卓, 齐欣, 等. 聚乙二醇沉淀富集和预扩增反转录实时定量聚合酶链式反应高灵敏检测小浆果中低浓度甲型肝炎病毒 [J]. *分析化学*, 2022, 50(8): 1168-1178.
- [7] Quee FA, de Hoog MLA, Schuurman R, et al. Community burden and transmission of acute gastroenteritis caused by norovirus and rotavirus in the Netherlands (RotaFam): a prospective household-based cohort study [J]. *Lancet Infect Dis*, 2020, 20(5): 598-606.
- [8] Han Y, Wang J, Zhang S, et al. Rapid detection of norovirus genogroup II in clinical and environmental samples using recombinase polymerase amplification [J]. *Anal Biochem*, 2020, 605: 113834.
- [9] 温静, 郑天驰, 王希峰, 等. 2019年北京市大兴区诺如病毒GI引起急性胃肠炎疫情的病原学分析 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2021, 31(14): 1783-1786.
- [10] 卞莲莲, 王一平, 孙世洋, 等. 基于叠氮溴化丙烷-定量反转录-聚合酶链式反应的甲型肝炎病毒滴度快速检测方法 [J]. *中国病毒病杂志*, 2020, 10(6): 421-425.
- [11] 祝琳, 佟靖轩, 姚秀林, 等. 2017-2019年抚顺市急性胃肠炎患者诺如病毒检测结果分析 [J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2020, 43(5): 337-339.
- [12] 赵跃丽, 饶清, 孙强明, 等. 粪便标本中诺如病毒GII拷贝数定量检测方法的建立和应用 [J]. *中国感染控制杂志*, 2020, 19(10): 864-870.
- [13] 纪蕾, 刘光涛, 刘彬辉, 等. 一起GI、GII型诺如病毒混合感染疫情的病原鉴定及基因特征分析 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2020, 30(13): 1567-1570, 1573.
- [14] 黄晨璐, 许伟, 胡乾坤, 等. 实时荧光核酸恒温扩增试验和定量反转录-聚合酶链反应对血清乙型肝炎病毒RNA定量检测的一致性评价 [J]. *微生物与感染*, 2020, 15(3): 158-165.
- [15] 贾添慧, 董蕾, 王永杰, 等. 牡蛎中GII型诺如病毒巢式RT-PCR检测方法的优化与评价 [J]. *上海海洋大学学报*, 2021, 30(2): 239-246.
- [16] 曲莉, 王洪艳, 李环, 等. 常规RT-PCR快速检测诺如病毒方法的建立 [J]. *北京大学学报(自然科学版)*, 2020, 21(2): 188-190.
- [17] 颜伟, 张静, 吴杰, 等. 2017-2018年滨州市病毒性腹泻流行病学特征及病原学监测分析 [J]. *热带医学杂志*, 2020, 20(2): 264-266, 278.
- [18] Skyum F, Chen M, Mogensen CB. Evaluation of a new fast in-house Real-Time PCR assay for detecting both Norovirus and toxigenic *Clostridium difficile* using fecal sample and rectal swab [J]. *Am J Infect Control*, 2022, 50(1): 67-71.
- [19] Jahne MA, Brinkman NE, Keely SP, et al. Droplet digital PCR quantification of norovirus and adenovirus in decentralized wastewater and graywater collections: Implications for onsite reuse [J]. *Water Res*, 2020, 169: 115213.
- [20] 陈海丽, 杨春忆, 张万菊, 等. 2015-2016年上海地区成人门诊腹泻病例中诺如病毒GII型流行特征 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2020, 34(2): 145-150.
- [21] 严寒秋, 王永全, 崔海洋, 等. 应用2种RT-PCR方法检测和分析北京市市场销售牡蛎中诺如病毒基因特征 [J]. *中华流行病学杂志*, 2022, 43(1): 92-97.
- [22] 毛瑞, 曹三成, 王增国, 等. 673例急性腹泻患儿诺如病毒GI、GII型感染快速筛查结果分析 [J]. *传染病信息*, 2023, 36(4): 351-354.
- [23] Kulis-Horn RK, Tiemann C. Evaluation of a laboratory-developed test for simultaneous detection of norovirus and rotavirus by real-time RT-PCR on the Panther Fusion system [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2020, 39(1): 103-112.

收稿日期: 2024-02-19; 修回日期: 2024-02-28

编辑/成森