

# 肠腺病毒的检测方法

张茂, 李瑶\*

昭通卫生职业学院, 云南 昭通 657000

**摘要:** 肠腺病毒是一种双链 DNA 病毒, 是引起儿童感染性腹泻的重要病原体, 在国内外均有流行。检测肠腺病毒的方法分为三类: 生物学检测技术、免疫学诊断技术、核酸诊断技术, 目前使用较多的是双抗体夹心法 ELISA 法和 RT-PCR 法。正确检测感染性腹泻的病原体有助于后续临床治疗及疾病防控。

**关键词:** 肠腺病毒; 检测方法; 生物学检测技术; 免疫学诊断技术; 核酸诊断技术

## Detection Methods For Intestinal Adenovirus

Zhang Mao, Li Yao\*

Zhaotong Health Vocational College, Zhaotong, Yunnan 657000

**Abstract:** Enterovirus is a double stranded DNA virus that is an important pathogen causing infectious diarrhea in children, and is prevalent both domestically and internationally. The methods for detecting enteroadenoviruses can be divided into three categories: biological detection techniques, immunological diagnostic techniques, and nucleic acid diagnostic techniques. Currently, the most commonly used methods are double antibody sandwich ELISA and RT-PCR. Correctly detecting the pathogens of infectious diarrhea can help with subsequent clinical treatment and disease prevention and control.

**Keywords:** intestinal adenovirus; testing methods; biological testing techniques; immunological diagnostic techniques; nucleic acid diagnostic techniques

腺病毒 (ADV) 是一种广泛存在的病毒, 其基因组特征表现为双螺旋 DNA 结构, 相对分子质量大致处于  $(20 \sim 30) \times 10^6$  的区间内。根据病毒学的分类体系, ADV 被归属于 ADV 科, 并依据其生物安全性质被界定为生物安全标准 2 级 (BL2)。ADV 的种类繁多, 其中多数具有临床致病能力, 以至于 ADV 的深入研究和有效防控显得尤为重要, 对于保障公共卫生安全和个体健康具有不可忽视的意义。

### 一、生物学检测技术

#### 1. 电镜 (Electron Microscopy) 检查

电镜检查作为腺病毒检测领域的一项经典方法, 自其问世以来便一直发挥着重要作用。病毒颗粒非常小, 以纳米为单位, 普通方法无法观察到病毒颗粒的形态, 电镜显微镜相较于传统光学显微镜, 在观察细微结构方面, 具备更高的分辨率和更大的放大倍数, 可以观察到更细微的细节和更小的样品结构。由于粪便中排出的病毒量较大, 病毒颗粒多, 腺病毒形态独特, 易于辨认, 因此可用电镜直接检查。此方法形象直观, 快速准确, 其阳性率可达 90%, 对诊断意义较大。普通电镜即能明确腺病毒存在, 免疫电镜技术以其独特的优势, 不仅提高了检测敏感度和特异性, 还能够精确区分不同的血清型, 因此在病毒分型中发挥着关键作

用。然而尽管其效能显著, 但直接电镜法目前在区分普通腺病毒和肠道腺病毒方面仍存在局限性, 免疫电镜在识别腺病毒 40 型和 41 型时也面临挑战。许多关于流行病学的资料, 均以电镜为筛选指标。但是由于设备昂贵, 操作要求高, 不利于推广, 多用于流行病学调查。

#### 2. 分离培养

实验室里培养病毒是病毒研究中的里程碑式工作。病毒的实验室分离目前主要有三种方法: 动物接种、鸡胚接种、细胞培养。其中细胞培养最常用, 肠道病毒的分离培养一般均选用此种方法。

##### (1) 动物接种法

基于病毒在活宿主中增殖的生物学规律, 利用对病毒具备敏感性的实验动物作为研究载体。这些实验动物经过病毒接种后,

基金项目: 本文系昭通卫生职业学院 2023 年度云南省教育厅科学研究基金项目“2023 年到 2024 年昭通地区感染性腹泻患儿粪便中札如病毒、腺病毒的检测”(项目编号: 2023J1944) 的研究成果。

作者简介: 张茂 (1984-) 女, 汉族, 云南昭通人。医学学士, 副教授。研究方向为内科护理学、传染病护理学等相关教学。

通讯作者简介: 李瑶 (1989-) 女, 汉族, 陕西咸阳市人。医学学士, 副教授。研究方向为内科护理学、传染病学、内科学等相关教学。邮箱: 382193239@qq.com

病毒在其体内进行大量复制，并诱发一系列可观测的相关症状或体征，为后续对病毒的分离和诊断工作提供了重要依据。然而，动物活体对病毒的感染率并非一成不变，它受到多个因素的共同影响，包括动物对病毒的敏感程度、接种病毒的剂量、接种部位的选择以及病毒自身的毒力等。在实际操作中，尽管选择与人类更为接近的物种可能更具研究价值，但受到经济成本、伦理规范等因素的制约，实验室通常选择小鼠进行腹腔或颅内注射接种，通过观察小鼠的发病情况，判断病毒是否存在。改方法的优点在于不需要复杂的仪器设备，技术简单，易于成功。但缺点同样非常明显，操作繁琐，动物个体差异显著，实验结果易受多种因素影响，导致稳定性不足，因此需要多次重复实验以确保数据的可靠性与准确性。目前，除科研领域的特殊需求外，一般不推荐采用此方法用于肠道病毒的分离检测工作。

## （2）细胞培养

细胞培养在病毒学方面的研究最为广泛，可用于病毒的分离鉴定，病毒性疾病诊断和流行病学调查等。选用腹泻患者粪便标本、肛门拭子、咽拭子，将其去除污染进行样本处理后根据病毒的细胞嗜性选择合适的细胞进行接种，一般可分为原代细胞、二倍体细胞和传代细胞。经过病料中的病毒成功分离培养与鉴定，此过程已被确立为诊断病毒感染的“金标准”，但是由于地域不同，标本提纯方法不同会导致不同腺病毒相互干扰。此类检测法所需时间较长，操作繁琐，耗时费力，部分病毒无法进行细胞培养，而部分病毒即便能培养成功，亦难以在细胞层面上显现出明显的病理改变。因此，目前这些病毒主要被应用于科研教学领域，并不适宜用于大规模、高效且精确的临床检测工作。

## 二、免疫学诊断技术

### 1. 中和试验

中和试验法是一种基于病毒感染力测定的科学方法，其核心在于通过比较病毒在免疫血清中和后的残存感染力，来评估免疫血清中和病毒的能力。当动物体内受到病毒感染时，会产生特异性的中和抗体，这些抗体能够与相应的病毒粒子发生特异性结合，从而有效阻止病毒对敏感细胞的吸附或抑制其侵入，使病毒失去感染能力。此方法在病毒学研究中发挥着重要作用，不仅有助于揭示病毒的感染机制，还为制定科学的病毒防控和治疗策略提供了重要依据。<sup>[1]</sup>中和试验的应用范围极为广泛，其在多个关键领域发挥着重要作用。①用于病毒的准确鉴定，为病毒的分类和识别提供了重要依据。②通过中和试验可深入分析病毒抗原的特性，有助于了解病毒的生物学行为。③该试验还用于测定免疫血清的抗体效价以及评估疫苗接种后的效果，为疫苗的研发和应用提供了重要参考。④通过检测病人血清中的抗体，中和试验还能辅助诊断病毒性疾病。然而，由于病毒依赖活的宿主系统进行复制增殖，中和试验必须在敏感的动物体内或细胞培养环境中进行。虽然该试验具有高度的敏感性和特异性，但病毒对宿主系统产生作用需要一定时间，因此试验结果的获取可能相对较慢，故不适用于快速诊断。而且试验成本较高，实验受动物个体间免疫

力差异影响较大，实验结果不稳定，重复性也不如体外实验。中和试验的判断通常以半数致死剂量 LD<sub>50</sub>（体内实验）或是半数致细胞病变剂量 CCID<sub>50</sub> 为指标。然而很多病毒感染敏感细胞并不出现典型的 CPE 或是 CPE 出现比较晚，无法满足临床上需快速及时监测患者血清学状态的要求。

### 2. 酶联免疫吸附试验（Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）

酶联免疫吸附试验是一种高效的酶联免疫技术，其基本原理在于通过酶标记的抗体与固相载体表面吸附的已知抗原或抗体进行特异性反应。这种反应过程在固相载体表面进行，使得反应结果更为明确和易于观察。随后，利用洗涤步骤去除液相中的非特异性成分，确保结果的准确性。最后，通过酶催化底物产生的显色反应来判断结果，颜色反应的深浅程度直接反映了样本中相应抗体或抗原的含量。因此，酶联免疫吸附试验能够用于定性或定量分析，为生物医学研究提供了有力的工具。根据实验设计的不同，该技术可分为间接 ELISA、双抗体夹心 ELISA、双夹心 ELISA、竞争 ELISA、阻断 ELISA 以及抗体捕捉 ELISA 等多种类型，以满足不同研究需求。

此种检测方法不仅灵敏度和特异性高，而且重复性稳定，检测速度快，费用低廉、仪器简单易携、可用于现场检验，可以检测极低浓度的物质并且同时对多种抗原进行检测，该方法在大批量血清样品检测中展现出了显著优势，已被国际社会广泛接受并作为标准化诊断方法加以应用。

缺点是 ELISA 技术的检测精度不高，检测结果受很多因素的影响，可能会出现假阳性或假阴性结果。其次 ELISA 技术只能检测特定抗原或抗体，无法检测复杂的抗原抗体复合物。而且 ELISA 技术的操作复杂，操作过程需要严格控制，容易受外界环境的影响而出现错误。

### 3. 免疫荧光法 (Immunofluorescence technique)

免疫荧光技术，即荧光抗体技术，通过荧光色素标记抗体或抗原，实现抗原的精确定位。该技术特异性强、敏感性高、反应迅速，但存在非特异性染色、结果判定主观性、操作复杂、设备要求高等问题。为推动免疫荧光技术的进一步发展，需解决非特异性染色、提高客观性、简化操作、降低设备成本，以更好地服务于科研和临床实践。

### 4. 免疫胶体金标记法 (immune colloidal gold technique, ICG)

免疫胶体金技术是常用标记技术，该技术可通过胶体金与蛋白质等大分子物质结合，利用抗原抗体反应达到检测目的，具有操作简单、快捷直观、敏感度高等优点，现已在生物医学等领域获得广泛应用。

免疫胶体金技术实现从定性到定量、半定量检测的重要转变，其广泛的应用领域和显著的应用优势已得到广泛认可，不仅提高了病原体检测的效率，还为临床疾病的诊疗工作提供了更加准确、有效的参考依据。<sup>[2, 3]</sup>然而，免疫胶体金技术在实际应用中仍存在一定的局限性，试纸条结果的判定过程可能受到环境、标本加样量及观察时间等多种因素的影响，导致结果的不准确。此

外,当病原体检测中出现交叉反应时,可能会出现假阳性或假阴性的情况,这在多项目联合检测中尤为突出,需要进一步加强技术的优化和提升。<sup>[4]</sup>

### 三、核酸诊断技术

#### 1. 核酸杂交技术

核酸杂交技术作为分子生物学中的一项重要技术,主要用于精确识别 DNA 或 RNA 分子中的特定序列(即靶序列),在基因表达和基因定位的研究中发挥着不可或缺的作用,并且近年来在病毒病的特异、敏感及快速诊断中展现出巨大的应用潜力。杂交过程主要依赖于碱基互补的原则,即两条单链核酸分子通过配对形成稳定的双链结构。<sup>[5]</sup>在诊断应用中,杂交反应涉及已知序列的病毒探针与待测样品中的病毒核酸之间的相互作用。通过后续的检测手段能够判断样品中是否存在特定的杂交信号。<sup>[6]</sup>若存在杂交信号,则表明待测样品中含有相应的病毒核酸,从而证明病毒感染的存在。在肠道病毒的检测中,核酸杂交技术可以用于检测病毒基因的表达,以及病毒与宿主细胞的相互作用。

2. 核酸杂交技术凭借其高灵敏度和特异性在多个领域展现出强大的应用价值。然而,该技术的实施需要依赖放射性核素,具有一定的风险和限制。核素半衰期短,易污染,其贮藏需有严密的防护措施。同时,操作过程相对复杂,需要专业人员的操作和防护。

#### 3. 聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)

聚合酶链反应是一种高效的体外扩增技术,专门用于特异性地复制靶 DNA 序列。PCR 试剂的使用简便快捷,能够在短时间内获得大量的特异靶 DNA 序列复制品,这一特点使其在临床疾病的诊断、治疗过程监测以及预后评估中发挥着不可替代的作用。<sup>[7]</sup>作为实验室辅助手段,PCR 技术的应用极大地提升了医疗诊断的准确性和治疗的精准性,为医学领域的发展作出了重要贡献。

聚合酶链反应(PCR)是一种常用的基因扩增技术,可以用于肠道病毒的检测。通过 PCR 技术,可以快速、准确地检测出病毒核酸,从而诊断肠道病毒感染。PCR 技术具有高灵敏度和特异性,能够检测出极低浓度的病毒核酸,并且可以在短时间内完成大量基因的扩增。<sup>[8]</sup>在肠道病毒的检测中,PCR 技术通常用于粪便、血液或其他体液中病毒核酸的检测。然而,PCR 技术的局限性亦不容忽视。具体而言,PCR 技术对实验条件以及操作技术的要求颇为严格,稍有差池便可能影响实验结果的准确性。此外,PCR 技术在肠道病毒检测过程中,需要严格控制实验条件和操作过程,并进行多次重复实验以提高检测的准确性和可靠性。

#### 4. 基因芯片技术

基因芯片技术是一种高通量、高灵敏度的基因检测技术。微阵列技术是一项先进的科学研究手段,通过将大量的基因片段按照特定顺序或排列方式固定在固相支持物上,为后续研究提供了坚实的基础。随后,利用同位素或荧光标记的 DNA 探针,并借助碱基互补杂交的原理,研究人员能够对基因表达及监测等方面展开深入研究。<sup>[9]</sup>基因芯片技术不仅融合了分子生物学领域的专业

知识,还涉及半导体微电子、激光技术、化学染料以及生物信息学等多个领域,是一种融和了多项技术的高新技术。基因芯片技术的应用非常广泛,包括疾病诊断、药物研发、生物标志物的发现等。

基因芯片技术在肠道病毒的检测方面已经得到了一定的应用。例如,可以通过检测病毒基因的表达水平,诊断肠道病毒感染并评估其严重程度。此外,基因芯片技术还可以用于肠道病毒的种属和型别鉴定,有助于疾病的防控和治疗。然而,基因芯片技术在实际应用中仍存在一些局限性,如高昂的成本、对样本质量和数量的要求较高、需要专业的设备和数据分析技能等。因此,在应用基因芯片技术进行肠道病毒检测时,需要综合考虑其优缺点,选择最适合的方法进行检测。<sup>[10]</sup>

### 结语

在诊断肠道病毒感染时,可以将多种检测方法的结果进行比较和分析。通过比较不同检测方法的特异性和灵敏度,可以提高诊断的准确性和可靠性。同时,对不同检测方法的优缺点进行评估,可以选用最适合的方法进行诊断。在肠道病毒的检测领域,尽管现有的方法多种多样,但传统手段往往繁琐且耗时,而核酸检测方法尽管精确,却需要依赖高端仪器和专业技术人员。目前尚未找到一种既便捷又快速的通用检测方法,能够精准地将肠道病毒与其他病原体进行区分。因此,研发一种高效且通用的肠道病毒检测手段显得尤为迫切,这对于在患病初期快速识别肠道病毒病原体,并为后续的治疗和防控工作提供坚实支撑具有重要意义。

### 参考文献:

- [1] 马新博. 医学免疫学实验技术 [M]. 电子工业出版社: 202101.170.
- [2] 李霜君, 张治国, 余琴, 等. 胶体金免疫层析法检测结核分枝杆菌特异性 IgG/IgM 抗体对结核病诊断的应用价值 [J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(2): 139-143, 149.
- [3] 李芳彩, 戴志辉, 贺子翔, 等. ELISA 法与胶体金法在检测新型冠状病毒血清抗体中的应用探讨 [J]. 实用预防医学, 2020, 27(7): 780-783.
- [4] 况兆忠. 免疫胶体金技术在临床检验中的应用研究进展 [J]. 医学信息, 2022, 35(10): 95-97.
- [5] 潘庆军, 朱学芝. 腺病毒及其检测技术研究进展 [J]. 检验医学与临床, 2013, 10(24): 3362-3364.
- [6] 李相军, 任立群, 李广生. 用原位核酸杂交技术探讨肠道病毒与急性克山病的关系 [J]. 中国地方病防治杂志, 2003, 18(2): 72-73.
- [7] 郑雨桐, 闫美田, 万楠. 2种重叠延伸 PCR 技术构建 5 种立克次体融合基因的方法学比较 [J]. 临床检验杂志, 2020, 38(12): 881-885.
- [8] 顾卫芹, 翟旭东, 沈忠培, 等. ABI 7300 实时荧光定量 PCR 技术在肝癌患者基因检测效果 [J]. 现代仪器与医疗, 2021, 27(5): 1-3, 8.
- [9] 于全琦. 咪唑苯乙炔类衍生物作为 G-四链体 DNA 荧光探针的设计、合成与细胞成像应用研究 [D]. 江苏: 江苏大学, 2022.
- [10] 宋娜, 刘朝阳, 李梦蓝, 等. 微流控芯片介导恒温扩增技术快速检测 8 种肠道致病菌 [J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(12): 1425-1429.