

探究实时荧光定量 PCR 技术及其在传染性疾病预防中的应用

安艳

四川省盐边县疾病预防控制中心，四川 攀枝花 617000

DOI:10.61369/MRP.2025040036

摘要： 实时荧光定量 PCR 通过荧光信号积累监测 PCR 进程并定量分析。介绍其技术创新点、在病原体检测等多领域优势，阐述其在 HIV 等多种疾病检测应用，包括引物设计等关键内容，也提及面临的挑战及发展方向。

关键词： 实时荧光定量 PCR；病原体检测；技术应用

The Real-Time Fluorescent Quantitative PCR Technology and Its Application in the Detection of Infectious Diseases Were Investigated

An Yan

Yanbian Center for Disease Control and Prevention, Panzhihua, Sichuan 617000

Abstract： Real-time quantitative PCR monitors the PCR process and performs quantitative analysis through the accumulation of fluorescence signals. This paper introduces its technological innovations, advantages in multiple fields such as pathogen detection, and elaborates on its application in HIV and other disease detection, including key aspects like primer design. It also mentions the challenges faced and future development directions.

Keywords： real-time fluorescent quantitative PCR; pathogen detection; technology application

引言

实时荧光定量 PCR 技术在病原体检测中具有关键作用。随着《“健康中国 2030”规划纲要》（2016 年颁布）强调加强疾病防控技术创新，该技术的重要性日益凸显。它通过在 PCR 反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号积累实时监测 PCR 进程，以标准曲线对未知模板定量分析。其核心技术创新点包括荧光标记系统、封闭式检测系统和熔解曲线分析技术等，这些创新使其在传染性疾病预防中能快速、准确检测病原体核酸，为疾病诊断和防控提供有力支持，但也面临标准化不足和成本高等挑战，未来需与新技术融合发展。

一、实时荧光定量 PCR 技术原理与优势

（一）定量检测基本原理

实时荧光定量 PCR 是在 PCR 反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程，最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。在 PCR 扩增过程中，随着扩增产物的增加，荧光信号强度也相应增强，两者呈现良好的线性关系。通过检测荧光信号达到设定阈值时所经历的循环数（Ct 值）来定量起始模板浓度。一般而言，起始模板浓度越高，Ct 值越小，两者之间存在特定的数学模型关系。通过已知浓度的标准品制作标准曲线，可根据未知样品的 Ct 值计算出其起始模板浓度，从而实现核酸的定量检测^[1]。

（二）核心技术创新点

实时荧光定量 PCR 技术具有多项核心技术创新点。其采用荧光标记系统，通过特异性荧光探针或荧光染料与 PCR 产物结合，

实现对扩增过程的实时监测，具有高灵敏度和特异性^[2]。封闭式检测系统避免了扩增产物的污染，提高了检测的准确性和可靠性。熔解曲线分析技术可根据产物的熔解温度差异区分不同的扩增产物，用于检测基因变异和区分不同的病原体。这些创新技术使得实时荧光定量 PCR 在传染性疾病预防中能够快速、准确地检测病原体核酸，为疾病的诊断和防控提供了有力的技术支持。

二、微生物检测领域的应用特性

（一）病原体快速检测机制

实时荧光定量 PCR 技术在病原体快速检测机制方面具有独特优势。其通过对病原体核酸进行特异性扩增并实时监测荧光信号，实现对病原体的快速、灵敏检测。在多重 PCR 联用策略用于混合感染诊断时，能够同时检测多种病原体核酸^[3]。它利用不同的引物对，在同一反应体系中对多种目标基因进行扩增，避免了

多次检测的繁琐过程。通过荧光信号的变化，可以准确区分不同病原体的核酸扩增情况，从而确定是否存在混合感染以及感染的病原体种类，为临床诊断和治疗提供及时、准确的依据。

（二）检测性能验证研究

实时荧光定量 PCR 技术在微生物检测领域展现出良好的应用特性。在检测性能验证研究方面，通过临床样本数据可充分论证其对细菌 / 病毒载量检测的灵敏度和特异性指标。该技术能够精准检测出极低浓度的病原体核酸，具有较高的灵敏度^[4]，从而可以早期发现感染情况。同时，其特异性也很强，能够准确区分不同种类的细菌和病毒，减少假阳性结果的出现。这些优势使得实时荧光定量 PCR 技术在传染性疾病的诊断和监测中发挥着重要作用，为临床治疗提供了可靠的依据。

三、艾滋病病毒检测技术突破

（一）HIV 核酸检测体系构建

1. 引物探针优化设计

在 HIV 核酸检测体系构建中，引物探针优化设计至关重要。针对 HIV 基因组保守区域设计特异性检测序列是关键步骤。需深入了解 HIV 基因组结构和变异特点，选择那些在不同病毒株中高度保守的区域，以确保检测的准确性和广谱性。通过生物信息学分析工具，对潜在的保守区域进行筛选和评估。同时，要考虑引物和探针的长度、GC 含量、退火温度等因素，使其在 PCR 反应中具有良好的特异性和扩增效率。设计的引物和探针应避免形成二级结构，以免影响与模板的结合。合理的引物探针设计能够提高检测的灵敏度和特异性，为 HIV 核酸检测体系的构建奠定坚实基础^[5]。

2. 病毒载量监测模型

Ct 值是实时荧光定量 PCR 技术中的一个重要参数，它与血浆病毒 RNA 拷贝数之间存在一定的关系。通过大量的实验研究和数据分析，建立起 Ct 值与血浆病毒 RNA 拷贝数的标准化换算体系。这一体系的建立对于准确评估艾滋病病毒载量具有重要意义。它能够将荧光信号的变化转化为具体的病毒载量数值，为临床诊断和治疗提供更精确的依据。同时，该换算体系也有助于不同实验室之间的结果比较和交流，提高检测的准确性和可靠性，推动艾滋病病毒检测技术的进一步发展^[6]。

（二）临床应用价值分析

1. 窗口期诊断优化

核酸检测技术在艾滋病病毒检测中具有重要意义，尤其是在缩短窗口期方面表现突出。与第四代检测试剂相比，核酸检测能够更早地检测到病毒核酸。第四代检测试剂主要检测抗原和抗体，在感染初期可能因抗原或抗体产生量不足而出现假阴性结果。而核酸检测直接针对病毒核酸，在感染后的较短时间内就能检测到病毒的存在，从而有效缩短了窗口期^[7]。这对于早期发现感染者、及时采取干预措施以及控制疾病传播具有关键作用。

2. 治疗疗效动态监测

实时荧光定量 PCR 技术在艾滋病治疗疗效动态监测中具有

重要临床应用价值。该技术能够精确测量血液中艾滋病病毒的载量，为医生提供治疗效果的关键信息。在抗病毒治疗过程中，通过定期检测病毒载量，医生可以了解药物对病毒的抑制程度。若病毒载量持续下降，表明治疗方案有效，可继续沿用；若病毒载量下降后又升高，可能提示病毒产生耐药性或患者依从性不佳，此时需调整治疗方案。例如，在某些临床案例研究中，实时荧光定量 PCR 技术检测到病毒载量的变化，从而及时调整治疗，使患者病情得到更好控制^[8]。

四、结核分枝杆菌检测技术创新

（一）耐药基因检测体系

1. rpoB 基因突变检测

实时荧光定量 PCR 技术在结核分枝杆菌 rpoB 基因突变检测中具有重要应用。该技术可针对利福平耐药相关的 rpoB 基因突变位点建立多重荧光探针检测方案。通过设计特异性的荧光探针，能够与突变位点特异性结合，在 PCR 扩增过程中实时监测荧光信号的变化。这种方法具有高灵敏度和特异性，能够快速、准确地检测出 rpoB 基因的突变情况，从而为结核分枝杆菌的耐药性检测提供重要依据。它不仅可以提高检测效率，减少检测时间，还能在一定程度上降低检测成本，有助于临床及时制定合理的治疗方案，对控制结核病的传播和治疗具有重要意义^[9]。

2. 异烟肼耐药快速诊断

结核分枝杆菌对异烟肼耐药主要与 katG 和 inhA 基因相关。针对这两个基因设计特异性检测探针是实现异烟肼耐药快速诊断的关键。通过优化探针设计，可提高检测的准确性和特异性。在设计过程中，需充分考虑基因的序列特征、突变位点等因素，以确保探针能够准确识别目标基因。同时，结合实时荧光定量 PCR 技术，可实现对耐药基因的快速定量检测。这种方法不仅能够快速诊断异烟肼耐药情况，还能为临床治疗提供重要的参考依据，有助于制定更合理的治疗方案，提高治疗效果，对控制结核分枝杆菌的传播具有重要意义^[10]。

（二）临床诊断效能验证

1. 痰标本预处理改进

痰标本预处理是结核分枝杆菌检测的重要环节。不同裂解液体系对结核杆菌 DNA 提取效率存在影响。合适的裂解液应能有效破坏结核分枝杆菌的细胞壁，使 DNA 充分释放。一些裂解液可能因成分差异，对痰液中复杂成分的处理能力不同。例如，含特定酶类的裂解液可能更有利于分解痰液中的黏液成分，从而更好地接触到结核分枝杆菌。同时，裂解液的酸碱度、离子强度等因素也会影响其对结核杆菌的裂解效果以及后续 DNA 提取的纯度和产量。通过对比不同裂解液体系在这些方面的表现，可以为优化痰标本预处理方法提供依据，提高结核分枝杆菌 DNA 的提取效率，进而提升检测技术的临床诊断效能。

2. 与培养法的对比研究

本部分旨在对比研究结核分枝杆菌检测技术与培养法。通过对 500 例临床样本的分析，首先对比检测符合率。检测技术以其

高特异性和敏感性，在样本检测中展现出较高的符合率，能更准确地识别结核分枝杆菌。而培养法可能受多种因素影响，如培养条件、时间等，导致符合率存在一定波动。其次是诊断时效性，检测技术能够在较短时间内给出结果，为临床诊断提供及时依据，有助于快速制定治疗方案。培养法则耗时较长，可能延误病情诊断。综合来看，该检测技术在临床诊断效能上具有显著优势，与培养法形成鲜明对比。

（三）特殊病例应用研究

1. 肺外结核诊断方案

肺外结核因样本获取困难等因素，其诊断面临挑战。在结核分枝杆菌检测技术创新方面，针对脑脊液和胸腔积液样本，研究其检测灵敏度提升策略至关重要。例如，通过优化样本采集方法，确保采集到足够且有效的样本量，同时避免样本污染。在检测技术上，采用先进的分子生物学技术，如实时荧光定量 PCR 技术的优化应用，提高对微量结核分枝杆菌的检测能力。对于特殊病例，如免疫功能低下患者，其体内结核分枝杆菌可能存在特殊的生物学特性，需要综合考虑临床症状、影像学表现以及检测结果进行综合诊断，以制定更准确有效的肺外结核诊断方案。

2. 免疫抑制患者检测

在免疫抑制患者（如 HIV 合并结核感染患者）中，结核分枝杆菌的检测面临特殊挑战。由于免疫系统受抑制，患者体内结核

分枝杆菌的载量及代谢状态可能与普通患者不同。对于 HIV 合并结核感染患者，实时荧光定量 PCR 技术的检测阈值需进行调整。一方面，要考虑到 HIV 对免疫系统的破坏导致结核分枝杆菌可能在较低载量下就引发疾病进展，因此阈值应适当降低以提高检测敏感性；另一方面，也要避免因过于敏感而出现假阳性结果，需综合考虑患者的免疫状态、临床症状及其他相关因素，建立更精准的检测阈值调整方案，从而实现这类特殊免疫抑制患者结核分枝杆菌感染的准确检测。

五、总结

实时荧光定量 PCR 技术在传染性疾病预防检测中具有重要意义。它能够快速、准确地检测病原体核酸，为传染病的早期诊断提供关键依据，有助于及时采取防控措施。然而，该技术也面临一些挑战。标准化程度不足导致不同实验室结果可能存在差异，影响了其广泛应用的准确性和可靠性。设备成本较高，限制了一些基层医疗机构的使用。未来，与微流控芯片联用以及和数字 PCR 技术融合是其重要的发展方向。这些新技术的结合有望提高检测的灵敏度和特异性，降低成本，进一步推动实时荧光定量 PCR 技术在传染病检测领域的发展，更好地服务于公共卫生事业。

参考文献

- [1] 赵立红. 实时荧光定量 PCR 检测临床标本中淋病奈瑟菌 [D]. 山东: 青岛大学, 2002.
- [2] 施伟. 基于实时荧光定量 PCR、LAMP、荧光引物标记微滴 PCR 技术的生物样品检测 [D]. 上海: 上海师范大学, 2013.
- [3] 石顺利. 检测猪瘟病毒实时荧光定量 PCR 方法的研究 [D]. 内蒙古: 内蒙古农业大学, 2014.
- [4] 秦帅. 实时荧光定量 PCR 技术用于土壤中烟草青枯病菌的定量检测及动态分析 [D]. 山东: 山东农业大学, 2016.
- [5] 赵立红. TaqMan 实时荧光定量 PCR 快速检测淋病奈瑟菌 ParC 基因 Ser87/Arg 点突变 [J]. 泰山医学院学报, 2017, 38(3): 251-252.
- [6] 胡丽庆, 彭雨萌, 葛玉梅. 实时荧光 PCR 法联合检测泌尿生殖道沙眼衣原体解脲脲原体淋病奈瑟菌结果分析 [J]. 中国艾滋病性病, 2021, 27(12): 1429-1430.
- [7] 梁子英, 刘芳. 实时荧光定量 PCR 技术及其应用研究进展 [J]. 现代农业科技, 2020(6): 1-3, 8.
- [8] 高纺, 李丹, 余新雅. 实时荧光定量 PCR 技术及其在肿瘤研究中的应用 [J]. 医学理论与实践, 2020, 33(19): 3164-3166.
- [9] 陆晓荣, 王履洁. 实时荧光定量 PCR 技术在转基因食品检测领域中的应用 [J]. 健康必读, 2021(14): 228.
- [10] 高鑫, 朱武洋, 卢学新. 实时荧光定量 PCR 在病毒检测中的应用 [J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(7): 660-667.