

呼吸道病原体核酸检测在下呼吸道感染中的诊断价值

李群娟 包艳 赵继华 高晶 李国华

作者单位: 655000 云南曲靖, 曲靖市妇幼保健院临床分子诊断实验室(李群娟)

655000 云南曲靖, 曲靖市第二人民医院检验科(包艳、高晶)

678000 云南保山, 保山市中心血站检验科(赵继华)

655000 云南曲靖, 曲靖市中心血站检验科(李国华)

通信作者: 李群娟, Email: 13678785678@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2025.01.005

【摘要】 目的 分析呼吸道病原体核酸检测在下呼吸道感染中的诊断价值。**方法** 收集 2023 年 2 月—2024 年 4 月曲靖市妇幼保健院收治的 500 例疑似下呼吸道感染患儿的临床资料。采用多重荧光 PCR 法与微生物分离培养法分别检测呼吸道病原体, 对比两种方法的阳性标本检出率; 采用 Kappa 检验分析两种方法检测结果的一致性($\kappa > 0.4$ 代表具有一致性)。**结果** 多重荧光 PCR 法检出阳性标本 321 例, 总阳性率为 64.20% (321/500); 微生物分离培养法检出阳性标本 179 例, 总阳性率为 35.80% (179/500); 两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。多重荧光 PCR 法与微生物分离培养法对肺炎克雷伯菌、流感嗜血杆菌、铜绿假单胞菌检出率的一致性分析显示, κ 值分别为 0.750、0.782、0.753, 具有高度一致性(均 $P < 0.05$)。**结论** 呼吸道病原体核酸检测在下呼吸道感染诊断中检出率较高, 且操作简便, 可为临床诊断提供可靠依据。

【关键词】 呼吸道病原体; 下呼吸道感染; 多重荧光 PCR 法; 诊断价值

Diagnostic value of nucleic acid detection for respiratory pathogenic bacteria in lower respiratory tract infection

Li Qunjuan, Bao Yan, Zhao Jihua, Gao Jing, Li Guohua. Clinical Molecular Diagnosis Laboratory, Qujing Maternal and Child Health Hospital, Qujing 655000, Yunnan, China (Li QJ); Department of Clinical Laboratory, Qujing Second People's Hospital, Qujing 655000, Yunnan, China (Bao Y, Gao J); Department of Clinical Laboratory, Baoshan Central Blood Station, Baoshan 678000, Yunnan, China (Zhao JH); Department of Clinical Laboratory, Qujing Central Blood Station, Qujing 655000, Yunnan, China (Li GH)

Corresponding author: Li Qunjuan, Email: 13678785678@163.com

【Abstract】 Objective To analyze the diagnostic value of nucleic acid detection for respiratory pathogens in lower respiratory tract infection. **Methods** The clinical data of 500 children with suspected lower respiratory tract infection admitted in Qujing Maternal and Child Health Hospital from February 2023 to April 2024 were collected. Respiratory pathogens were detected using multiplex fluorescence PCR and microbial isolation and culture methods. The positive detectable rates were compared between the two methods, and consistency between the two methods was analyzed using Kappa test ($\kappa > 0.4$ indicated consistency). **Results** The multiplex fluorescence PCR method detected 321 positive cases, with a total positive rate of 64.20% (321/500), while microbial isolation and culture method identified 179 positive cases, with a total positive rate of 35.80% (179/500). The difference between the two methods was statistically significant ($P < 0.05$). Consistency analysis for *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Pseudomonas aeruginosa* detection showed κ values of 0.750, 0.782 and 0.753, respectively, indicating high consistency (all $P < 0.05$). **Conclusion** Nucleic acid detection for respiratory pathogens demonstrates a higher detectable rate in diagnosing lower respiratory tract infection, with simple operational procedures, providing a reliable basis for clinical diagnosis.

【Key words】 Respiratory pathogen; Lower respiratory tract infection; Multiplex fluorescence PCR method; Diagnostic value

下呼吸道感染是常见的呼吸系统疾病, 主要包括肺炎、支气管炎等, 其发病率在全球范围内居高不下, 尤其在季节交替和气候变化时更为常见^[1]。

该类感染通常由多种病原体引起, 包括细菌、病毒以及真菌等, 准确快速地识别病原体对指导临床治疗和改善患者预后至关重要^[2]。

传统的微生物分离培养方法耗时较长,且部分病原体难以培养,导致阳性检出率有限。近年来,随着分子生物学技术的快速发展,特别是核酸检测技术的应用,为下呼吸道感染的病原体检测提供了新的途径^[3]。多重荧光 PCR 法作为一种高效、灵敏的核酸检测技术,能够同时检测多种病原体,显著提高了检测效率和准确度^[4]。因此,本研究分析呼吸道病原体核酸检测在下呼吸道感染患儿中的诊断价值,通过与传统的微生物分离培养法进行比较,评估多重荧光 PCR 法的检测效能,并探讨两种方法所得结果在不同病原体检测中的一致性,现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象与一般资料 收集本院 2023 年 2 月—2024 年 4 月收治的 500 例疑似下呼吸道感染患儿的临床资料,其中男性 273 例,女性 227 例;年龄 2~12 岁,平均 (8.35 ± 2.21) 岁。

1.1.1 纳入标准 ① 有下呼吸道感染症状,经影像学检查(如 X 线、计算机断层扫描等)提示疑似下呼吸道感染^[5]。② 入组患儿法定监护人均在充分了解试验细节的前提下自愿签署书面知情文件。

1.1.2 排除标准 ① 存在严重肝肾功能不全;② 检查前接受过抗菌药物治疗;③ 患有先天性疾病。

1.1.3 伦理学 本研究符合医学伦理学标准,并已通过曲靖市妇幼保健院医学伦理委员会审查(审批号:2024-001-01)。

1.2 仪器与试剂 实时荧光定量 PCR 系统(LAN-96S 型,上海宏石医疗科技有限公司)用于核酸扩增检测,自动化微生物分析平台(VITEK[®]2 Compact 30 型,法国生物梅里埃公司)完成菌株鉴定,配备冷冻功能的高速离心系统(Centrifuge 5424 R 型,艾本德有限公司)处理生物样本,温控精度达 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 的恒温水浴装置(HH-4 型,常州国华电器有限公司)提供稳定反应环境。实验试剂采用美国 MP 公司的土壤样本 DNA 纯化试剂盒进行核酸提取,关键生化试剂(包括溶菌酶及蛋白酶 K)购自美国西格玛奥德里奇公司,缓冲体系使用北京索莱宝科技有限公司提供的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer, PBS; pH 值 7.4),多重荧光检测体系采用达安基因认证试剂盒,配套消化液由生工生物工程(上海)股份有限公司供应。

1.3 研究方法

1.3.1 核酸提取 吸取患儿痰液样本 1 mL,加入等体积的 1 mol/L 氢氧化钠(NaOH)溶液,充分混合液化

痰液。以 12 000 r/min(离心半径 15 cm)离心 10 min,使用 PBS 第 2 次离心清洗。加入 1 mL PBS 后轻微混匀,再次以相同转速和时间离心,弃去上清液。加入 180 μL 溶菌酶和 20 μL 蛋白酶 K 的混合溶液,消化样本中的蛋白质和细胞壁,从而释放 DNA。将混合物置于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 30 min 以上,确保酶解过程充分进行。酶解完成后进行瞬时离心,收集管底液体。加入 200 μL 菌体消化液,充分混合以促进 DNA 的释放。按照核酸提取或纯化试剂盒的说明书进行操作,从上述混合物中提取 DNA,所得 DNA 应妥善保存于 -80°C 冰箱,以备后续使用。

1.3.2 多重 PCR 检测 使用宏石荧光 PCR 扩增仪进行 PCR 反应,从每个痰液样本中提取 DNA,在单独反应管中进行 PCR 检测。PCR 反应均按照以下程序进行:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min,随后进行 38 个循环,每个循环包括 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s 和 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火与延伸 60 s。为验证 PCR 检测结果的准确性,同时使用 VITEK[®]2 Compact 全自动微生物鉴定仪进行微生物的分离与培养。

将准备好的 PCR 反应管按顺序放入扩增仪样品槽中,确保阳性对照品、阴性对照品及待测样本的位置正确,并为每个样本设置相应的名称。在扩增仪上选择不同通道检测特定病原菌:FAM 通道用于检测肺炎克雷伯菌和嗜肺军团菌;XEX(或 HEX/VIC)通道用于检测肺炎链球菌和内标;ROX 通道用于检测流感嗜血杆菌;CY5 通道用于检测铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌。在扩增过程中内标的检测信号通过 HEX 通道的溶解曲线获得,为准确分析扩增结果,设置合适的基线和阈值。基线校准范围设定为 3~15 个扩增周期,需排除初始荧光采集阶段的不稳定信号,并将循环数阈值(cycle threshold, Ct)调整至首例阳性样本扩增起始点前 1~2 个周期。阈值线确定原则为基准线略高于阴性对照品的最高荧光强度值。实验有效性验证需满足:HEX 通道内标显示特异性解链曲线,且解链温度(melting temperature, T_m)处于 65.8~68.5 $^{\circ}\text{C}$ 范围内。符合上述质控指标的数据方可纳入后续分析。病原菌判定标准:FAM 通道出现典型 S 型扩增趋势且 $Ct \leq 39$ 时,提示肺炎克雷伯菌阳性;当该通道同时检测到 T_m 值 68.8~71.3 $^{\circ}\text{C}$ 的特征峰时,则判定嗜肺军团菌阳性;HEX 通道检测到 $Ct \leq 39$ 的 S 型曲线表征肺炎链球菌感染;ROX 通道同等条件下显示阳性结果对应流感嗜血杆菌;CY5 通道满足条件则指示铜绿假单胞菌阳性。若内

标在 HEX 通道未呈现符合要求的 Tm 特征峰,提示样本可能存在核酸浓度不足或存在抑制因子,需重新检测以确保数据的可靠性。

1.4 统计学方法 使用 SPSS 26.0 软件统计数据。计量资料符合正态分布以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述,采用 t 检验;计数资料以例 (%) 表示,采用 χ^2 检验;采用 Kappa 分析检测结果的一致性, $\kappa > 0.4$ 为具有一致性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 痰培养结果 500 份标本中未检出肺炎衣原体、肺炎支原体、嗜肺军团菌、结核分枝杆菌、大肠埃希菌。传统微生物分离培养法检出 179 例阳性,阳性率为 35.80%。其中肺炎克雷伯菌 88 例 (17.60%), 流感嗜血杆菌 20 例 (4.00%), 铜绿假单胞菌 40 例 (8.00%), 嗜肺军团菌 26 例 (5.20%), 金黄色葡萄球菌 5 例 (1.00%)。

2.2 不同检测方法对下呼吸道常见病原体的检出情况 多重荧光 PCR 法检出阳性标本 321 例,总阳性率为 64.20% (321/500);而微生物分离培养法检出阳性标本 179 例,总阳性率为 35.80% (179/500),显著低于多重荧光 PCR 法 ($P < 0.05$)。两种方法对肺炎克雷伯菌、流感嗜血杆菌、铜绿假单胞菌的检出率一致 ($\kappa > 0.4$,具有一致性)。见表 1~5。

表 1 多重荧光 PCR 法与微生物分离培养法检测肺炎克雷伯菌结果

多重荧光 PCR 法	例数 (例)	微生物分离培养法 (例)		κ 值	P 值
		肺炎克雷伯 菌 (+)	肺炎克雷伯 菌 (-)		
肺炎克雷伯菌 (+)	79	68	11	0.750	< 0.001
肺炎克雷伯菌 (-)	278	34	244		

注: + 为阳性, - 为阴性

表 2 多重荧光 PCR 法与微生物分离培养法检测金黄色葡萄球菌结果

多重荧光 PCR 法	例数 (例)	微生物分离培养法 (例)		κ 值	P 值
		金黄色葡萄 球菌 (+)	金黄色葡萄 球菌 (-)		
金黄色葡萄球菌 (+)	8	8	0	0.105	0.310
金黄色葡萄球菌 (-)	332	51	281		

注: + 为阳性, - 为阴性

表 3 多重荧光 PCR 法与微生物分离培养法检测嗜肺军团菌结果

多重荧光 PCR 法	例数 (例)	微生物分离培养法 (例)		κ 值	P 值
		嗜肺军团菌 (+)	嗜肺军团菌 (-)		
嗜肺军团菌 (+)	20	20	0	0.143	0.254
嗜肺军团菌 (-)	330	128	202		

注: + 为阳性, - 为阴性

表 4 多重荧光 PCR 法与微生物分离培养法检测铜绿假单胞菌结果

多重荧光 PCR 法	例数 (例)	微生物分离培养法 (例)		κ 值	P 值
		铜绿假单胞 菌 (+)	铜绿假单胞 菌 (-)		
铜绿假单胞菌 (+)	45	37	8	0.753	< 0.001
铜绿假单胞菌 (-)	310	17	293		

注: + 为阳性, - 为阴性

表 5 多重荧光 PCR 法与微生物分离培养法检测流感嗜血杆菌结果

多重荧光 PCR 法	例数 (例)	微生物分离培养法 (例)		κ 值	P 值
		流感嗜血 杆菌 (-)	流感嗜血 杆菌 (-)		
流感嗜血杆菌 (+)	25	20	5	0.782	< 0.001
流感嗜血杆菌 (-)	317	5	312		

注: + 为阳性, - 为阴性

3 讨论

下呼吸道感染作为常见呼吸系统疾病,对全球人群健康构成了严重威胁^[6]。该类感染通常可由多种病原体引起,包括细菌、病毒、真菌等,其流行情况因地区、季节和人群差异而有所不同^[7]。准确快速地识别病原体对指导临床治疗和改善患者预后至关重要。

传统的微生物分离培养法用于下呼吸道感染诊断存在一定的局限性。该方法阳性率低,往往无法检测到所有潜在的病原菌;检测周期长,需要较长时间才能获得结果,可能导致治疗延误;此外,微生物分离培养法的敏感度也较低,对部分难以培养的病原体可能无法给出准确的诊断^[8]。在分子生物学领域的革新性进展推动下,核酸精准检测技术的出现显著提升了临床病原学诊断效能,为下呼吸道感染性疾病的病原识别提供了新的解决方案^[9]。核酸检测技术具有高敏感度、高特异度以及检测快速等优势,能够准确识别呼吸道病原体,为临床诊断和治疗提供有力支持^[10-12]。因此,采用核酸检测技术逐渐成为下呼吸道感染诊断的新趋势。

多重 PCR 核酸检测技术是一种先进的分子生物学检测方法,该技术通过设计特定的引物,对呼吸道病原体的相应基因序列进行扩增,从而实现病原体的快速检测^[13-14]。多重 PCR 核酸检测的操作流程通常包括样本处理、引物设计、PCR 扩增、产物检测等步骤,其中产物检测常采用荧光标记或电泳等方法进行^[15]。在呼吸道病原菌的核酸检测中,常见的检测项目包括肺炎克雷伯菌、流感嗜血杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎支原体等多种病原体^[16]。上述病

原体在核酸检测中均能被有效检出,且结果准确可靠。采用核酸检测技术可以快速准确地识别引起下呼吸道感染的病原菌,为临床诊断和治疗提供有力支持^[17-18]。相比传统微生物分离培养法,核酸检测技术具有明显的优势,该方法具有高敏感度,能够检测到极低浓度的病原菌,从而提高诊断准确率。核酸检测技术具有高特异度,能够准确区分不同种类的病原菌,避免误诊和漏诊^[19]。此外,核酸检测技术还具有快速检测的优势,能在短时间内获得检测结果,及时为临床治疗提供指导^[20],因此在呼吸道病原菌的检测中具有广泛的应用前景。

本研究比较多重荧光 PCR 法与微生物分离培养法在下呼吸道感染诊断中的应用,结果表明多重荧光 PCR 法在呼吸道病原菌检测中展现出较大的优势,总阳性率为 64.20%,高于微生物分离培养法的 35.80%,这一结果充分证明核酸检测技术在下呼吸道感染诊断中的高敏感度。高阳性率意味着更多的患者能够得到准确的诊断,从而及时接受有效治疗,这对改善患者预后、减轻医疗负担具有重要意义。本研究还表明,多重荧光 PCR 法在检测肺炎克雷伯菌、流感嗜血杆菌、铜绿假单胞菌等常见呼吸道病原菌时,与微生物分离培养法的检出率具有高度的一致性($\kappa > 0.4$),表明核酸检测技术不仅具有高敏感度,还具有较高的特异度和准确度,能够准确识别不同的病原菌,为临床提供可靠的诊断依据。相关研究显示,多重荧光 PCR 法相比微生物分离培养法还具有操作简便、检测周期短等优势^[21]。传统的微生物分离培养法需要较长的培养时间,且操作繁琐,容易受到外界因素的干扰,而多重荧光 PCR 法能够在短时间内完成检测,且操作方法简单,大大降低了检测难度和成本。

综上所述,呼吸道病原体核酸检测在下呼吸道感染诊断中检出率较高,且操作简便,可为临床诊断提供可靠依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- 庄红焰,冯佳靖,王栋菁.呼吸道病原菌核酸检测在重症监护患者感染诊断中的价值[J/CD].临床医药文献电子杂志,2021,8(10):1-4.
- 徐晓娜,孙昕,王莉莉,等.LAMP法和传统培养法检测下呼吸道感染常见病原体的比较研究[J].安徽医学,2021,42(7):802-805. DOI: 10.3969/j.issn.1000-0399.2021.07.025.
- 卓影,李步任,江莹莹,等.老年下呼吸道感染患者痰液培养细菌分布及新型冠状病毒感染对其分布的影响[J].检验医学与临床,2023,20(23):3493-3495,3500. DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.

- 2023.23.018.
- 江杨华,宋然,林应标,等.呼吸道病原菌恒温扩增检测与PCT、WBC等关联研究[J].检验医学与临床,2019,16(21):3161-3163. DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2019.21.026.
- 吴晓晴,汪东,薛文静,等.晶芯呼吸道病原菌核酸检测技术与痰培养在临床中的应用[J].检验医学与临床,2019,16(1):107-109. DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2019.01.036.
- 陈梦佳,刘斌,刘辉成,等.儿童下呼吸道感染细菌的流行特征及耐药性分析[J].实用检验医师杂志,2023,15(4):405-409. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2023.04.017.
- 魏军龙,赵鸿薇,郭艳琴,等.环县地区呼吸科就诊患儿常见病原体分布特征[J].实用检验医师杂志,2023,15(2):176-180. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2023.02.016.
- 郑凯文,黄晓园,陈渡波,等.基于多重PCR和第二代高通量测序技术快速检测下呼吸道感染病原微生物方法的建立和应用[J].国际检验医学杂志,2020,41(17):2066-2070. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.17.004.
- 叶泽辉,郭惠玲,陈茂生,等.多重PCR病原体分子检测技术在下呼吸道感染诊断中的应用价值[J].分子诊断与治疗杂志,2021,13(4):518-521. DOI: 10.3969/j.issn.1674-6929.2021.04.004.
- 王然,刘雨,于津伟,等.多重荧光定量PCR快速检测6种常见下呼吸道感染病原菌[J].天津医科大学学报,2021,27(3):285-290.
- 卓献霞,赵建康,曹彬.呼吸道病原菌在细菌培养阳性组和阴性组中多重定量PCR检测结果的对比分析[J].首都医科大学学报,2022,43(5):782-786. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7795.2022.05.018.
- 赵亚玲.PCR联检呼吸道常见病原体在呼吸道感染早期诊断中的价值[J].基层医学论坛,2023,27(13):65-68. DOI: 10.19435/j.1672-1721.2023.13.021.
- 赵溜.晶芯呼吸道病原菌核酸检测技术与痰培养在临床中的应用[J].实用检验医师杂志,2019,11(3):162-164. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2019.03.011.
- 左丽娜,陈碧,陈玉玲,等.利用核酸恒温扩增技术检测下呼吸道感染病原菌的分布特征[J].中国校医,2021,35(2):93-96.
- 蔡耿鑫,周媛,温妙云.单细胞测序和数字PCR技术筛选单核细胞差异基因集对脓毒症早期诊断的临床意义[J].中华危重病急救医学,2021,33(7):779-785. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210607-00832.
- 刘东来,周海卫,沈舒,等.病原菌多重核酸检测试剂盒分析性能质量评价研究[J].传染病信息,2022,35(3):214-219. DOI: 10.3969/j.issn.1007-8134.2022.03.006.
- 黄保明,田根全,李仲廷,等.6项呼吸道病原体核酸检测对小儿呼吸道感染的辅助诊治作用分析[J].当代医学,2021,27(19):163-165. DOI: 10.3969/j.issn.1009-4393.2021.19.067.
- 陶文学,陈来秀,李正国,等.晶芯呼吸道病原菌核酸检测在临床中的应用价值探究[J].当代医学,2021,27(22):107-109. DOI: 10.3969/j.issn.1009-4393.2021.22.040.
- 丁伟超,许铁,燕宪亮,等.呼吸道病原菌核酸检测在HAP/VAP患者中的应用[J].临床急诊杂志,2019,20(7):559-563. DOI: 10.13201/j.issn.1009-5981.2019.07.013.
- 谢成纲,李亚红,王丽君.呼吸道病原体核酸检测对小儿呼吸道感染的临床诊治意义[J].当代临床医刊,2023,36(2):56-57. DOI: 10.3969/j.issn.2095-9559.2023.02.32.
- XIE L, ZHU X Y, XU L, et al. Accurate and affordable detection of rifampicin and isoniazid resistance in Tuberculosis sputum specimens by multiplex PCR-multiple probes melting analysis [J]. Infection, 2024, 52(6): 2371-2398. DOI: 10.1007/s15010-024-02295-w.

(收稿日期:2024-11-07)

(本文编辑:邵文)