

· 论著 ·

多重聚合酶链反应技术在成人肺部感染病原体快速检测中的效能评估与临床价值

王与可¹ 张臻云² 杨慧军³ 牛斌⁴ 王蓉² 任姣龙²

¹ 山西医科大学公共卫生学院, 太原 030001; ² 山西医科大学第一医院感染病科, 太原 030001; ³ 山西省疾病预防控制中心科教科(重大传染性疾病与诊治山西省重点实验室), 太原 030012; ⁴ 山西医科大学第一临床医学院, 太原 030001

通信作者: 张臻云, Email: zlysgzy@163.com

【摘要】 目的 探讨多重实时荧光 PCR 在成人肺部感染病原体检测中的临床应用。**方法** 回顾性分析 2022 年 8 月至 2023 年 12 月山西医科大学第一医院以肺部感染收治入院的 161 例患者临床资料。所有患者同时进行了呼吸道样本多重实时荧光 PCR 和传统微生物检查(conventional microbiological testing, CMT)。分析多重 PCR 的病原体检出率及病原体种类分布; 并与 CMT 的病原体检出率进行比较。各组间率的比较采用卡方检验, 一致性检验采用 Kappa 值并计算敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值及准确率等评估多重 PCR 的诊断效能。**结果** 161 例患者通过多重 PCR 检测出病原体阳性者 144 例(144/161, 89.44%), 共检测到 22 种病原体, 细菌以肺炎链球菌检出率最高, 为 19.25%(31/161), 病毒以新型冠状病毒检出率最高, 达 21.12%(34/161), 混合感染率 40.99%(66/161)。多重 PCR 与痰培养在肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌和耐甲氧西林葡萄球菌等多数细菌及真菌检测中的一致性良好(Kappa $\geq$ 0.75), 但与血清学抗体的检测一致性一般(0.40 $\leq$ Kappa<0.75)。多重 PCR 对细菌的检出率高于痰培养($\chi^2=4.32, P=0.038$), 对所有病原体检出特异性均在 90% 以上。**结论** 与痰培养相比, 多重实时荧光 PCR 检出率高, 尤其对混合感染的检出具有优势; 与血清学抗体相比, 特异性好。多重 PCR 同时兼具快速高效的优点, 在肺部感染的病原体检测中具有重要的临床应用价值。

【关键词】 实时荧光聚合酶链反应; 微生物学检查; 病原体; 肺部感染

基金项目: 国家重点研发计划(2023YFC3043501); 山西省级公立医院改革与高质量发展项目(晋财社[2023] 23 号); 山西省卫生健康委 2023 年新冠研究科研项目(2023XG022)

DOI:10.3760/cma.j.cn331340-20241109-00184

Evaluation of the efficacy and clinical value of multiplex PCR technology in the rapid pathogen detection for pulmonary infection in adults

Wang Yuke¹, Zhang Liaoyun², Yang Huijun³, Niu Bin⁴, Wang Rong², Ren Jiaolong²

¹School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; ²Department of Infectious Diseases, the First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; ³Scientific Research and Education Department of Shanxi Provincial Center for Disease Control and Prevention (Key Laboratory of Major Infectious Diseases and Diagnosis and Treatment in Shanxi Province), Taiyuan 030012, China; ⁴The First Clinical Medical College, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: Zhang Liaoyun, Email: zlysgzy@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the clinical application of multiplex real-time PCR in pathogen detection for adult pulmonary infections. **Methods** A retrospective analysis was conducted on the clinical data of 161 patients admitted for pulmonary infections in the First Hospital of Shanxi Medical University between August 2022 and December 2023. All patients underwent both multiplex real-time PCR testing of respiratory specimens and conventional microbiological testing (CMT). The pathogen detection rate and distribution of pathogens by multiplex PCR were analyzed and compared with those of CMT. Rates between groups were compared using the chi-square test. Consistency was assessed using the Kappa value. Additionally, sensitivity, specificity, positive predictive value,

negative predictive value and accuracy were calculated to evaluate the diagnostic performance of multiplex PCR. **Results** Among 161 patients, 144 were detected to be positive for pathogens using multiplex PCR (144/161, 89.44%), with a total of 22 types of pathogens identified. The detection rate of *Streptococcus pneumoniae* was the highest among bacteria (19.25%, 31/161), while the detection rate of SARS-CoV-2 was the highest among viruses (21.12%, 34/161). The mixed infection rate was 40.99% (66/161). Multiplex PCR showed good consistency with sputum culture in detecting most bacteria and fungi, including *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ($\text{Kappa} \geq 0.75$). However, its consistency with serological antibody testing was moderate ($0.40 \leq \text{Kappa} < 0.75$). The detection rate of bacteria by multiplex PCR was higher than that by sputum culture ($\chi^2=4.32$, $P=0.038$), and the specificity for detecting all pathogens exceeded 90%. **Conclusions** Compared to sputum culture, multiplex real-time PCR exhibits a higher detection rate, particularly for the detection of mixed infections. It also demonstrates superior specificity compared to serological antibody testing. With its rapid and efficient performance, multiplex PCR has significant clinical value in pathogen detection for pulmonary infections.

[Key words] Realtime fluorescence PCR; Microbiological examination; Pathogen; Pulmonary infection

Fund program: National Key Research and Development Program of China (2023YFC3043501); Shanxi Provincial Public Hospital Reform and High-Quality Development Project (Jincashe [2023] NO.23); COVID-19 Research Project of Shanxi Provincial Health Commission in 2023 (2023XG022)

DOI:10.3760/cma.j.cn331340-20241109-00184

肺部感染是全球范围内导致发病和死亡的主要疾病之一^[1],成人年发病率为 24.8/万,且随着年龄的增长呈上升趋势^[2]。肺部感染的临床表现多样,症状组合因病原体、环境和宿主的差异而不同,仅凭症候及影像诊断难以准确区分病因从而延误病情。因此,快速明确病原体并予患者精准治疗对临床至关重要。本研究采用多重实时荧光 PCR 技术,对 25 种常见呼吸道病原体的靶基因进行扩增检测,并与血清学抗体检测及培养等传统微生物检查 (conventional microbiological testing, CMT) 进行比较,探讨多重实时荧光 PCR 技术在临床中的检测性能和应用价值,为临床提供更快速、可靠的实验室诊断依据。

对象与方法

一、研究对象

以 2022 年 8 月至 2023 年 12 月因肺部感染而就诊于山西医科大学第一医院感染病科的 161 例患者为研究对象。本研究方案通过山西医科大学第一医院科研伦理委员会审批 (伦理审批号:SYDYY-KYLL-AF-003/01)。

依据中华医学会呼吸病学分会感染学组《中国成人社区获得性肺炎诊断和治疗指南(2016 年版)》^[3]

为诊断标准,需满足以下五条纳入标准:(1)发热,体温 $> 37.3\text{ }^{\circ}\text{C}$,出现症状时间 $< 7\text{ d}$,存在肺部感染的相关临床表现。(2)胸部影像学检查显示新出现的斑片状浸润影、叶或段实变影、磨玻璃影或间质性改变,伴或不伴胸腔积液。(3)至少具备以下一种与临床表现一致的病原学或血清学检查结果:①病原体核酸检测阳性;②病原体抗原检测阳性;③病原体培养阳性;④病原体特异性 IgM 阳性,或恢复期 IgG 抗体水平较急性期升高 4 倍以上。(4)同时接受多重实时荧光 PCR 检查。(5)患者知情并同意。

排除标准:(1)年龄 < 18 岁。(2)妊娠妇女。(3)免疫缺陷患者:长期使用糖皮质激素(强的松剂量 $> 0.3\text{ mg/kg}$,至少 3 周)或其他细胞毒性药物;近一个月内接受化疗;血液系统恶性肿瘤患者;6 个月内接受过器官移植;获得性免疫缺陷如 HIV 感染^[4]。(4)合并肺脏、肝脏或其他恶性肿瘤的患者。(5)合并严重心、脑、肾并发症的患者。(6)病历资料不完整或未接受多重实时荧光 PCR 或传统微生物检查的患者。

二、研究方法

1. 样本采集

包括鼻咽拭子、口咽拭子、痰液及肺泡灌洗液样本,立即置于专用无菌样本收集管内送检。

2. 仪器和试剂

仪器设备:四通道实时荧光定量 PCR 仪(宏石 SLAN-96 P/S)、冰盒、生物安全柜、恒温培养箱、水浴锅或金属浴、涡旋振荡器、磁力架、迷你离心机(适用于 1.5 mL 离心管和 0.2 mL × 8 PCR 管)。

试剂:荧光扩增试剂为广州市宝创生物技术有限公司生产的呼吸道 25 项病原体核酸检测试剂盒:肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、耐甲氧西林葡萄球菌、卡他莫拉菌、嗜肺军团菌、肺炎克雷伯菌、流感嗜血杆菌、鲍曼不动杆菌、结核分枝杆菌复合群、白念珠菌、耶氏肺孢子菌、A 族链球菌、肺炎支原体、肺炎衣原体、甲型流感病毒、乙型流感病毒、副流感病毒、腺病毒、鼻病毒、冠状病毒、新型冠状病毒、博卡病毒、偏肺病毒、呼吸道合胞病毒。无水乙醇、纯化水、痰液液化试剂 Sputasol(或自行配制的 4%NaOH 溶液)。

3. 多重 PCR 检测方法

采用多重荧光探针 RT-PCR 技术(四通道检测:FAM、VIC、ROX、CY5)并结合熔解曲线分析法。其中,FAM、VIC、ROX 通道用于病原体的扩增检测,通过 Ct 值和熔解温度鉴定病原体,CY5 通道用于内源性内标监测样本质量(具体操作步骤按说明书进行)。

三、统计学方法

采用 SPSS 27.0 统计软件进行数据分析。计数资料以例数和百分率来表示,正态分布的计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,非正态分布的计量资料采用中位数(四分位间距)[$M(Q_1, Q_3)$]表示。配对卡方检验比较多重实时荧光 PCR 与传统微生物检查检出率差异;McNemar 检验比较两种诊断方法的边界频率;使用 Kappa 值进行一致性分析评价,Kappa 值 ≥ 0.75 表示一致性良好, $0.40 \leq \text{Kappa} < 0.75$ 表示一致性一般,Kappa < 0.40 表示一致性较差。计算多重实时荧光 PCR 对所检测病原体(细菌、真菌、DNA 病毒和 RNA 病毒)的灵敏度、特异性、阳性预测值、阴性预测值及准确率。显著性水平设定为 $\alpha = 0.05$ 。

结 果

一、基本情况

本研究共纳入 161 例患者,年龄中位数为 57 岁,其中男性 101 例(62.73%,101/161),女性 60 例(37.27%,60/161)。患者的主要临床症状包括咳嗽、咳痰、发热、鼻塞、流涕、头痛、恶心、呕吐、食欲缺乏乏力及呼吸困难。实验室检查显示,白细胞计数、中性粒细胞绝对值、降钙素原的均值及 C 反应蛋白中位数均超出正常范围,具体见表 1。115 例患者(71.43%,115/161)在痰培养前接受了经验性抗生素治疗。影像学检查显示,53 例患者(32.92%,53/161)为单肺累及,108 例患者(67.08%,108/161)为双肺累及。本次研究对象的合并症以高血压占比最高,为 21.12%(34/161),其次为糖尿病和肝硬化,占比分别为 9.32%(15/161)和 8.07%(13/161)。

二、多重 PCR 技术检测结果

1. 病原体检测情况

在 161 例样本中,使用多重 PCR 技术共检出 22 种病原体,有 144 例至少检出一种呼吸道病原体,阳性率为 89.44%(144/161)。其中,细菌中肺炎链球菌的检出率最高(19.25%,31/161),其次为肺炎克雷伯菌(18.01%,29/161);真菌中白念珠菌的检出率最高(11.18%,18/161);病毒中,新型冠状病毒的检出率最高(21.12%,34/161),其次为甲型流感病毒(14.91%,24/161);此外,支原体检出 14 例(8.70%,14/161),衣原体检出 7 例(4.35%,7/161)。

2. 病原体分布情况

多重 PCR 共检出病株 249 株,细菌的检出率最高,占 44.58%(111/249),其次为病毒,占 39.36%(98/249),真菌的检出率最低,占 7.63%(19/249)。在具体病原体分布上,除冠状病毒、偏肺病毒和 A 族链球菌未检出外,共检出 22 种病原体。其中,新型冠状病毒检出率最高(13.65%,34/249),依次为肺炎链球菌(12.45%,31/249)、肺炎克雷伯菌(11.65%,29/249)、甲型流感病毒(9.64%,24/249)、白念珠菌(7.23%,18/249)等。

表 1 肺部感染患者基本特征(n=161)

项目	肺部感染患者情况
年龄[岁, $M(Q_1, Q_3)$]	57(41,72)
性别[例(%)]	
男性	101(62.73)
女性	60 (37.27)
体温($^{\circ}\text{C}$, $\bar{x}\pm s$)	38.97 $\pm$ 0.85
临床症状[例(%)]	
咳嗽、咳痰	118 (73.29)
鼻塞	15 (9.32)
流涕	18 (11.18)
头痛	33 (20.50)
恶心	25 (15.53)
呕吐	17 (10.56)
食欲缺乏乏力	56 (34.78)
其他	11 (6.83)
实验室指标	
白细胞计数($\times 10^9/\text{L}$, $\bar{x}\pm s$)	11.90 $\pm$ 2.73
中性粒细胞绝对值($\times 10^9/\text{L}$, $\bar{x}\pm s$)	9.15 $\pm$ 4.12
淋巴细胞绝对值($\times 10^9/\text{L}$, $\bar{x}\pm s$)	1.42 $\pm$ 0.65
单核细胞绝对值($\times 10^9/\text{L}$, $\bar{x}\pm s$)	0.66 $\pm$ 0.53
血红蛋白(g/L , $\bar{x}\pm s$)	122.00 $\pm$ 30.26
ALT[U/L, $M(Q_1, Q_3)$]	37.00(14.00,62.00)
AST[U/L, $M(Q_1, Q_3)$]	32.00(19.00,58.00)
总胆红素[$\mu\text{mol/L}$, $M(Q_1, Q_3)$]	15.40(9.90,22.85)
C 反应蛋白[mg/L , $M(Q_1, Q_3)$]	41.49(10.03,113.22)
降钙素原(pg/mL , $\bar{x}\pm s$)	1.32 $\pm$ 0.63
APACHE II ($\bar{x}\pm s$)	3.24 $\pm$ 0.83
SOFA 评分($\bar{x}\pm s$)	0.82 $\pm$ 0.47
培养前使用抗生素[例(%)]	115(71.43)
影像学浸润[例(%)]	
单肺	53(32.92)
双肺	108(67.08)
合并症[例(%)]	
高血压	34(21.12)
糖尿病	15(9.32)
肝硬化	13(8.07)

注:APACHE II:急性生理与慢性健康评分;SOFA:序贯器官衰竭评估

3.病原体混合感染情况

144 份阳性样本中,54.17%(78/144) 为单一病原体感染,45.83%(66/144)为混合感染。在多重感染中,最常见的组合为新型冠状病毒或甲型流感病毒与肺炎链球菌、肺炎克雷伯菌、白念珠菌或铜绿假单胞菌的混合感染。其他病原体的混合感染较少见。单一感染与混合感染的病原体分布见图 1。

三、多重 PCR 与 CMT 的比较

1.比较多重 PCR 与痰培养的检出率

多重 PCR 对肺炎链球菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌及白念珠菌的检出率分别为 19.25% (31/161)、10.56% (17/161)、18.01% (29/161)、10.56%(17/161)和 11.18%(18/161)均高于痰培养,差异有统计学意义($\chi^2=4.17$ 、4.00、5.14、4.92 和 4.08, $P=0.031$ 、0.039、0.016、0.022 和 0.039),具体见表 2。

表 2 多重 PCR 与痰培养检出比较(n=161)

病原体	多重 PCR [例(%)]	痰培养 [例(%)]	χ^2 值	P 值
细菌				
肺炎链球菌	31 (19.25)	25 (15.53)	4.17	0.031
金黄色葡萄球菌	2 (1.24)	3 (1.86)	NA	1.000
铜绿假单胞菌	17 (10.56)	10 (6.21)	4.00	0.039
耐甲氧西林葡萄球菌	6 (3.73)	5 (3.11)	NA	1.000
卡他莫拉菌	1 (0.62)	0(0)	NA	NA
嗜肺军团菌	1 (0.62)	0(0)	NA	NA
肺炎克雷伯菌	29 (18.01)	22 (13.66)	5.14	0.016
流感嗜血杆菌	2 (1.24)	1(0.62)	NA	1.000
鲍曼不动杆菌	17 (10.56)	8 (4.97)	4.92	0.022
结核分枝杆菌复合群	5 (3.11)	5 (3.11)	NA	1.000
A 族链球菌	0(0)	0(0)	NA	NA
真菌				
白念珠菌	18 (11.18)	10 (6.21)	4.08	0.039
耶氏肺孢子菌	1 (0.62)	1 (0.62)	NA	1.000

2.比较多重 PCR 与血清学抗体的检出率

多重 PCR 对甲型流感病毒 (14.91%,24/161)、乙型流感病毒(3.11%,5/161)、腺病毒(5.60%,9/161)、鼻病毒 (9.94% ,16/161)、新型冠状病毒 (21.12% ,34/161)、支原体(8.70% ,14/161)及衣原体(4.35% ,7/161)的检出率低于抗体阳性率,差异具有统计学意义($\chi^2=4.27$ 、6.13、6.75、4.27、4.00、4.92 和 4.00, $P=0.035$ 、0.008、0.006、0.035、0.039、0.022 和 0.039),具体见表 3。

3.比较多重 PCR 与 CMT 的诊断效能

多重 PCR 对肺炎链球菌、耐甲氧西林葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、流感嗜血杆菌和耶氏肺孢子菌的灵敏度、特异性及准确率较高,对金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌的特异性、准确率高而灵敏度稍

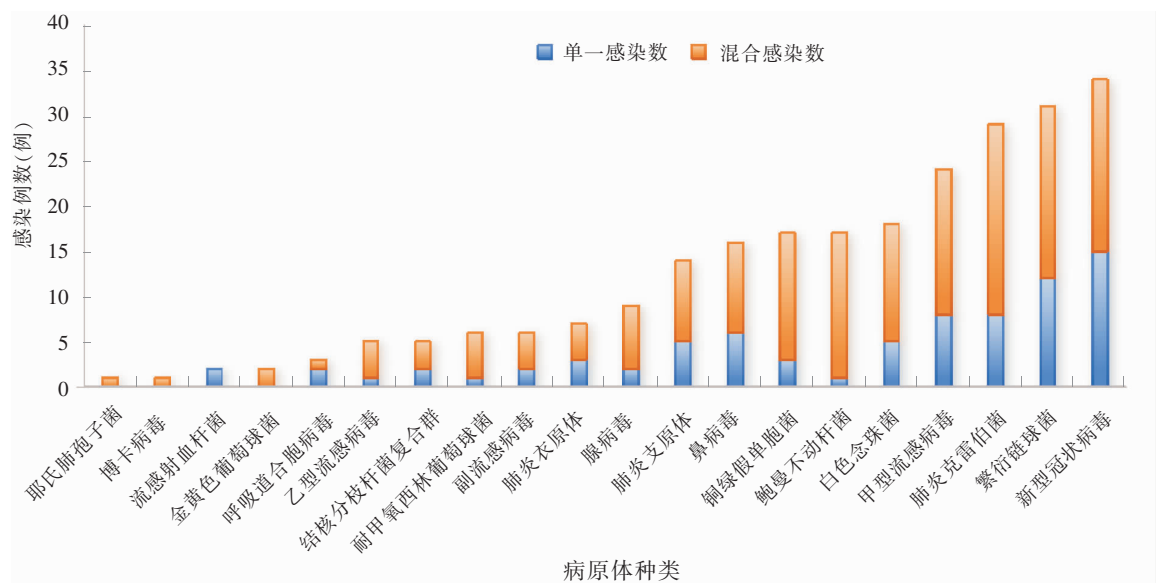


图 1 病原体混合感染检测结果

表 3 多重 PCR 与血清学抗体检出比较(n=161)

病原体	多重 PCR [例(%)]	血清学抗体 [例(%)]	χ^2 值	P 值
非典型病原体				
肺炎支原体	14 (8.70)	23 (14.29)	4.92	0.022
肺炎衣原体	7 (4.35)	14 (8.70)	4.00	0.039
病毒				
甲型流感病毒	24 (14.91)	33 (20.50)	4.27	0.035
乙型流感病毒	5 (3.11)	13 (8.07)	6.13	0.008
副流感病毒	6 (3.73)	11 (6.83)	3.20	0.063
腺病毒	9 (5.60)	19 (11.80)	6.75	0.006
鼻病毒	16 (9.94)	25 (15.53)	4.27	0.035
冠状病毒 229E 型	0(0)	0(0)	NA	NA
冠状病毒 HKU1 型	0(0)	0(0)	NA	NA
冠状病毒 NL63 型	0(0)	0(0)	NA	NA
冠状病毒 OC43 型	0(0)	0(0)	NA	NA
博卡病毒	1 (0.62)	0(0)	NA	NA
偏肺病毒	0(0)	0(0)	NA	NA
呼吸道合胞病毒	3 (1.86)	5 (3.11)	0.25	0.625
新型冠状病毒 ORF1ab 型	34 (21.12)	41 (25.47)	4.00	0.039
新型冠状病毒 N 型	34 (21.12)	41 (25.47)	4.00	0.039

低。整体而言,多重 PCR 对所检测的细菌和真菌有较高的特异性和准确率(均在 90%以上),阴性预测值表现佳(均在 95%以上)。除铜绿假单胞菌、流感嗜血杆菌、鲍曼不动杆菌及白念珠菌外,多重 PCR 与痰培养在细菌、真菌检测中均一致性良好($Kappa \geq 0.75$)(见表 4)。

多重 PCR 对病毒、支原体及衣原体的诊断特异

性及准确率高,但灵敏度相对较低。阴性预测值均在 90%以上,且阳性预测值在病毒、支原体及衣原体的表现上较部分细菌和真菌更佳。由表 4 可见,多重 PCR 与血清学抗体在病毒与非典型病原体的检测中一致性一般($0.40 \leq Kappa < 0.75$)。整体而言,多重 PCR 与 CMT 检测细菌、真菌的一致性优于检测病毒或不典型病原体。

4. 比较多重 PCR 与 CMT 对单一、混合感染的检出率

对细菌、真菌等通过痰培养明确的病原体,多重 PCR 检出一种病原体的阳性率为 34.78% (56/161),显著高于痰培养的 24.22% (39/161, $\chi^2=4.32$, $P=0.038$);多重 PCR 检出 2 种或以上病原体的阳性率为 23.60% (38/161),亦高于痰培养的 14.91% (24/161, $\chi^2=3.92$, $P=0.048$)。对病毒、支原体、衣原体等通过血清学抗体判别的病原体,多重 PCR 检出一种病原体的阳性率为 34.16% (55/161),低于血清学抗体的 45.34% (73/161, $\chi^2=4.20$, $P=0.040$);多重 PCR 检出两种或以上病原体的阳性率为 11.80% (19/161),低于血清学抗体的 22.98% (37/161, $\chi^2=7.00$, $P=0.008$)。

讨 论

在中国,确诊和未确诊的肺炎患者的院内死亡

率分别为 21.7%和 25.9%，在接受延迟或无效治疗的患者中报告的死亡率显著增加^[5]。大部分呼吸道感染患者由于感染后缺乏特异性的临床表现,无法及时明确诊断,而不得不接受经验性广谱抗生素的治疗,导致抗菌药物滥用,抗菌药物耐药相关的发病率和死亡率逐渐增加。另有研究表明,抗菌药物耐药与住院时间的延长以及住院费用的增加有关^[6]。早期明确病原学诊断,不仅可以精准治疗,改善预后,还可以减轻患者痛苦,降低经济负担^[7]。

一、多重 PCR 检测病原体谱特征及临床可靠性
在本研究中,161 份样本通过多重 PCR 技术共检测出 22 种病原体。除 A 族链球菌、冠状病毒及偏肺病毒未检出外,细菌感染者以肺炎链球菌的检出率最高,其次为肺炎克雷伯菌;病毒感染者以新型冠状病毒的检出率最高,其次为甲型流感病毒。这一结果与当时报道的呼吸道病原体流行态势基本一致^[8-9],说明本研究结果具有一定可信度,在临床实践中具有实际意义。

表 4 多重 PCR 检测技术与 CMT 诊断效能的比较 (n=161)

病原体	阳性/阴性例数				Kappa 值	灵敏度 (%)	特异性 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)	准确率 (%)
	TP (例)	FP (例)	FN (例)	TN (例)						
细菌(与痰培养比较)										
肺炎链球菌	25	6	0	130	0.871	100.00	95.59	80.65	100.00	96.27
金黄色葡萄球菌	2	0	1	158	0.797	66.67	100.00	100.00	99.37	99.38
铜绿假单胞菌	9	8	1	143	0.638	90.00	94.70	52.94	99.31	89.44
耐甲氧西林葡萄球菌	5	1	0	155	0.906	100.00	99.36	83.33	100.00	99.38
卡他莫拉菌	0	1	0	160	<0.001	—	99.38	—	100.00	99.38
嗜肺军团菌	0	1	0	160	<0.001	—	99.38	—	100.00	99.38
肺炎克雷伯菌	22	7	0	132	0.837	100.00	94.96	75.86	100.00	95.65
流感嗜血杆菌	1	1	0	159	0.664	100.00	99.38	50.00	100.00	99.38
鲍曼不动杆菌	6	11	2	142	0.442	75.00	92.81	35.29	98.61	91.93
结核分枝杆菌复合群	4	1	1	155	0.794	80.00	99.36	80.00	99.36	98.76
A 族链球菌	0	0	0	161	<0.001	—	—	—	—	—
真菌(与痰培养比较)										
白念珠菌	8	10	2	141	0.534	80.00	93.38	44.44	98.60	92.55
耶氏肺孢子菌	1	0	0	160	1.000	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
非典型病原体(与血清学抗体比较)										
肺炎支原体	12	2	11	136	0.606	52.17	98.55	85.71	92.52	91.93
肺炎衣原体	6	1	8	146	0.545	42.86	99.32	85.71	94.81	94.41
病毒(与血清学抗体比较)										
甲型流感病毒	21	3	12	125	0.682	63.64	97.66	87.50	91.24	90.68
乙型流感病毒	5	0	8	148	0.535	61.54	100.00	100.00	94.87	95.03
副流感病毒	6	0	5	150	0.691	54.54	100.00	100.00	96.77	96.89
腺病毒	8	1	11	141	0.536	42.11	99.30	88.89	92.76	92.55
鼻病毒	13	3	12	133	0.584	52.00	97.79	81.25	91.72	90.68
冠 状 病 毒 229E、HKU1、NL63、OC43 型	0	0	0	161	<0.001	—	—	—	—	—
博卡病毒	0	1	0	160	<0.001	—	99.38	—	100.00	99.38
偏肺病毒	0	0	0	161	<0.001	—	—	—	—	—
呼吸道合胞病毒	2	1	3	156	0.488	40.00	99.36	66.67	98.11	98.14
新型冠状病毒 ORF1ab 型	33	1	8	119	0.844	80.49	99.17	97.06	93.70	94.41
新型冠状病毒 N 型	33	1	8	119	0.844	80.49	99.17	97.06	93.70	94.41

注:CMT:传统微生物检查;TP:真阳性例数;FP:假阳性例数;FN:假阴性例数;TN:真阴性例数

二、多重 PCR 较传统细菌、真菌培养的灵敏度、特异性及准确率高

与传统细菌、真菌培养相比,多重 PCR 对多数细菌和真菌的灵敏度、特异性及准确率较高,与痰培养一致性良好且检出率高于痰培养。

长期以来,传统的微生物培养和涂片检测作为细菌和真菌诊断的“金标准”^[10]一直在沿用,但因其检测耗时长(痰培养需 48~72 h)^[11-12]、检测方法单一及难以同时检测混合感染和未知病原体的短板,影响临床快速确诊病原体,不仅可能导致疾病迁延,发展为慢性或重症肺炎,还会在重症肺炎治疗早期,由于经验性使用广谱抗生素,影响培养的阳性结果,导致假阴性^[13]。本研究中,多重 PCR 对多数细菌和真菌的灵敏度、特异性及准确率较高,与痰培养一致性良好且检出率高于痰培养,可能的原因是痰培养合格痰样本要求严苛,常呈阴性结果。此外,161 例患者中,115 例患者在培养前接受了经验性抗生素治疗,这也可能导致痰培养出现阴性结果^[14]。而多重 PCR 通过对样本进行核酸提取,在一个反应管体系内同时完成扩增及对扩增产物进行分析,无论细菌、真菌状态如何均能检测到,明显提高了病原体的检出率^[15]。

三、多重 PCR 的灵敏度和准确率低于病原体血清学抗体检测

与病原体血清学抗体检测相比,多重 PCR 对病毒、支原体及衣原体的诊断灵敏度及准确率相对较低,诊断一致性一般。这可能归因于抗体性质所限:(1)通常情况下特异性 IgM 抗体多在 3~5 d 后呈阳性,此后水平逐渐降低,而 IgG 抗体开始产生晚,但维持时间较长,可至数月甚至数年^[16-17],患者既往感染后抗体可能长时间存在于体内,故抗体阳性往往不能区分既往与现症感染;(2)人体受到环境中多种病原体感染及各种致敏原的刺激,会产生大量干扰物质(如自身抗体、类风湿因子、嗜异性抗体和补体等),与抗体检测试剂发生非特异性结合^[5];(3)抗体之间存在交叉反应,某些抗体蛋白具有高度相似的结构和序列^[18]。这些原因皆会导致抗体检测假阳性而多重 PCR 为阴性,从而低估多重 PCR 的效能及

准确性。因此,多重 PCR 在病毒、支原体及衣原体等难以体外培养的呼吸道病原体中仍然具有检测优势。

四、多重 PCR 检测适宜人群及检测优势

本研究发现,多重 PCR 对所有病原体的阴性预测值均在 90% 以上,而阳性预测值在病毒、支原体及衣原体的表现上较部分细菌和真菌更佳,这有助于未感染者及血清学抗体阳性而未能确诊者的判别。

曾有研究报道,与抗体和培养方法相比,多重 PCR 可将呼吸道病毒的检出率提高 30%~50%^[19],通过扩增基因组片段,多重 PCR 能够快速且精准地检测大量呼吸道病毒^[20]。因此,本研究采用的多重实时荧光 PCR 技术能够同时检测 25 种呼吸道病原体(包括 11 株细菌、2 株真菌、10 株病毒及支原体和衣原体各 1 株),在一定程度上实现了对常见呼吸道病原体的广泛覆盖,且从样本采集到出具报告的时间不超过 6 h,从而实现对肺部感染患者病原体的快速诊断。

综上所述,多重实时荧光 PCR 技术在病原体检测的种类和时效性方面相较于传统方法具有明显优势。多重 PCR 可在单次反应中检测 10~30 种病原体,覆盖范围广,且费用低、耗时少,可与传统检测方法相结合并广泛应用,将更好地服务于临床实践。本研究限于样本数量,少见病原体的病例数较少,影响统计学结果,今后需进一步扩大样本量继续研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 王与可:研究设计、文章撰写、数据统计分析、图表制作;张缵云:研究指导、论文审阅及修改、经费支持;杨慧军:数据处理;牛斌、王蓉:资料收集与样本采集;任姣龙:样本检测

参 考 文 献

- [1] Oliveira E Silva PG, Cerqueira Batista Filho LA, Ismael PF, et al. Community-acquired pneumonia: Epidemiology, diagnosis, prognostic severity scales, and new therapeutic options[J]. Medwave, 2023, 23 (11): e2719. DOI: 10.5867/medwave.2023.11.2719.
- [2] Richter J, Panayiotou C, Tryfonos C, et al. Aetiology of acute respiratory tract infections in hospitalised children in cyprus[J]. PLoS One, 2016, 11(1): e0147041. DOI: 10.1371/journal.pone.0147041.

- [3] 中华医学会呼吸病学分会. 中国成人社区获得性肺炎诊断和治疗指南(2016 年版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2016, 39(4): 253-279. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2016.04.005.
- [4] Peng JM, Du B, Qin HY, et al. Metagenomic next-generation sequencing for the diagnosis of suspected pneumonia in immunocompromised patients[J]. J Infect, 2021, 82(4): 22-27. DOI: 10.1016/j.jinf.2021.01.029.
- [5] Qu J, Zhang J, Chen Y, et al. Aetiology of severe community acquired pneumonia in adults identified by combined detection methods: A multi-centre prospective study in China[J]. Emerg Microbes Infect, 2022, 11(1): 556-566. DOI: 10.1080/22221751.2022.2035194.
- [6] Aghlmandi S, Halbeisen FS, Saccilotto R, et al. Effect of antibiotic prescription audit and feedback on antibiotic prescribing in primary care: A randomized clinical trial[J]. JAMA Intern Med, 2023, 183(3): 213-220. DOI: 10.1001/jamainternmed.2022.6529.
- [7] 陈诗颖, 樊晔, 张玲, 等. 致急性呼吸道感染人腺病毒的体外感染特性初步比较[J]. 病毒学报, 2019, 35(5): 741-747. DOI: 10.13242/j.cnki.bingduxuebao.003591.
- [8] 许太彬, 邵束钰, 史军, 等. 住院重症肺炎患者 368 例呼吸道病原体检测结果及影响因素分析[J]. 现代疾病预防控制, 2024, 35(5): 329-333. DOI: 10.13515/j.cnki.hnjpm.1006-8414.2024.05.012.
- [9] 王艺霖, 宜建英, 周春雷, 等. 奥密克戎低流行时期新型冠状病毒肺炎与甲型流感的流行特点分析[J]. 天津医科大学学报, 2024, 30(2): 162-166. DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2024.02.0162.
- [10] 胡晏宁, 鲁炳怀. 呼吸道感染性疾病病原学诊断的挑战与解决策略[J]. 中国临床新医学, 2021, 14(1): 8-12. DOI: 10.3969/j.issn.1674-3806.2021.01.02.
- [11] Enne VI, Personne Y, Grgic L, et al. Aetiology of hospital-acquired pneumonia and trends in antimicrobial resistance[J]. Curr Opin Pulm Med, 2014, 20(3): 252-258. DOI: 10.1097/MCP.0000000000000042.
- [12] van Hecke O, Wang K, Lee JJ, et al. Implications of antibiotic resistance for patients' recovery from common infections in the community: A systematic review and Meta-analysis[J]. Clin Infect Dis, 2017, 65(3): 371-382. DOI: 10.1093/cid/cix233.
- [13] 邹晓辉, 曹彬. 呼吸道感染病原学诊断年度进展 2021[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2022, 45(1): 78-82. DOI: 10.3760/cma.j.cn112147-20211116-00809.
- [14] 吴瑞珊, 刘婉婷, 龙天娣, 等. 宏基因组二代测序技术在呼吸系统感染病原学诊断中的应用价值[J]. 热带医学杂志, 2024, 24(2): 171-175. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3619.2024.02.005.
- [15] Liu CF, Shi XP, Chen Y, et al. Rapid diagnosis of sepsis with TaqMan-based multiplex real-time PCR[J]. J Clin Lab Anal, 2018, 32(2): e22256. DOI: 10.1002/jcla.22256.
- [16] 董春丽, 宋海涛, 张靓靓, 等. 新型冠状病毒肺炎患者康复期血清特异性 IgM、IgG 抗体监测及其影响因素分析[J]. 山东医药, 2023, 63(23): 15-18, 23. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2023.23.004.
- [17] Kissler SM, Tedijanto C, Goldstein E, et al. Projecting the transmission dynamics of SARS-CoV-2 through the postpandemic period[J]. Science, 2020, 368(6493): 860-868. DOI: 10.1126/science.abb5793.
- [18] Hicks J, Klumpp-Thomas C, Kalish H, et al. Serologic cross-reactivity of SARS-CoV-2 with endemic and seasonal *Betacoronaviruses*[J]. J Clin Immunol, 2021, 41(5): 906-913. DOI: 10.1007/s10875-021-00997-6.
- [19] Babady NE. The FilmArray respiratory panel: An automated, broadly multiplexed molecular test for the rapid and accurate detection of respiratory pathogens[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2013, 13(8): 779-788. DOI: 10.1586/14737159.2013.848794.
- [20] Huang HS, Tsai CL, Chang J, et al. Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection: Systematic review and meta-analysis [J]. Clin Microbiol Infect, 2018, 24 (10): 1055-1063. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.11.018.

(收稿日期:2024-11-09)