·临床研究·

多重 PCR 技术在儿童常见呼吸道病原体检测中的应用价值

顾午阳[1] 方路[2] 李亚梅[3] 陈煜齐[1]

（1.徐州市铜山区疾病预防控制中心，徐州 221110；2.徐州市第一人民医院检验科，徐州 221002；
3.徐州市铜山区妇幼保健院检验科，徐州 221110）

【摘要】 目的 探讨多重聚合酶链式反应（multiplex Polymerase Chain Reaction，mPCR）技术在检测儿童常见呼吸道病原体感染中的应用价值。**方法** 选取2023年5月—2024年5月徐州市铜山区妇幼保健院收治的因呼吸系统感染就诊的265例患儿的咽拭子样本。所有样本均采用多重PCR技术和直接免疫荧光法（Direct Immunofluorescence Assay，DFA）检测。比较多重PCR技术与直接免疫荧光技术在呼吸道病原体检测结果上的差异。**结果** 265例患儿样本中，多重PCR检测阳性98例，阴性167例。DFA检测阳性81例，阴性184例。多重PCR检测阳性病例数显著高于DFA检测，差异有统计学意义（$P<0.05$）。对比两种检测方法在各类病原体检测中的结果一致性，呼吸道合胞病毒（Respiratory Syncytial Virus，RSV）、甲型流感病毒（influenza A virus，FluA）、乙型流感病毒（influenza B virus，FluB）检测结果具有较高的一致性；腺病毒（adenovirus，ADV）、人副流感病毒Ⅰ型（Human Parainfluenza Virus 1，HPIV-1）及人副流感病毒Ⅲ型（Human Parainfluenza Virus 3，HPIV-3）的检测结果的一致性表现一般。多重PCR检测RSV、ADV、FluA、FluB、HPIV1、HPIV2及HPIV3的灵敏度、特异度和准确度均优于DFA检测。ROC分析结果显示，多重PCR检测对呼吸道病原体诊断效能优于DFA检测（$P<0.05$），多重PCR检测ROC曲线下面积为0.981，而DFA检测ROC曲线下面积为0.799。**结论** 多重PCR技术能够同时检测多种病原体，还具备较高的诊断效率，在儿童常见呼吸道病原体感染的诊断中具有重要作用。

【关键词】 呼吸道感染；病原体；多重PCR技术；直接免疫荧光

【中图分类号】 TH77；R725.6 **【文献标识码】** A **【DOI】** 10.11876/mimt202501010

The value of multiplex PCR for the detection of common respiratory pathogen infections in children

Gu Wuyang[1], Fang Lu[2], Li Yamei[3], Chen Yuqi[1]

(1. Tongshan District Center for Disease Control and Prevention, Xuzhou 221110, China; 2. Department of Inspection,Xuzhou First People's Hospilal, Xuzhou 221002, China; 3. Department of Inspection,Tongshan Maternal and Child Health Hospital, Xuzhou 221110, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the diagnostic value of multiplex PCR for detecting common pathogens in children with respiratory infections. **Methods** We collected throat swab samples from 265 children with respiratory infections admitted to Tongshan Maternal and Child Health Hospital in Xuzhou between May 2023 and May 2024. These samples were tested using both multiplex PCR and direct immunofluorescence assay (DFA). Analyze the differences in detection results between multiplex PCR and DFA for respiratory pathogens. **Results** For the 265 pediatric samples, multiplex PCR detected 98 positive cases and 167 negative cases, while DFA identified 81 positive cases and 184 negative cases. The number of positive cases detected by multiplex PCR was significantly higher than those detected by DFA, with a statistically significant difference ($P<0.05$). The detection results for RSV、FluA and FluB showed high consistency between the two methods. In contrast, the consistency of detection for ADV、PIV1 and PIV3 was ordinary. Multiplex PCR demonstrates superior sensitivity, specificity, and accuracy compared to DFA for the detection of RSV, ADV, FluA, FluB, HPIV1, HPIV2, and HPIV3. ROC analysis demonstrated that multiplex PCR exhibited superior diagnostic

第一作者：顾午阳，男，本科，主管检验师，研究方向：医学检验

performance for respiratory pathogens compared to DFA (P<0.05). The AUC for multiplex PCR was 0.981, whereas for DFA, it was 0.799. **Conclusion** Multiplex PCR enables the simultaneous detection of multiple pathogens with high diagnostic efficiency, which is crucial for accurately diagnosing common respiratory infections in children.

【**Key words**】 Respiratory tract infection; Pathogen; Multiplex PCR; Direct immunofluorescence assay

呼吸系统感染是全球范围内导致疾病和死亡的主要传染病之一[1]。患者常见的临床症状包括咳痰、胸痛、胸闷以及发热等，部分病例还可能出现腹泻。在病情严重时，可能引发心、肺、肝、肾等多个器官的功能障碍[2]。近年来，随着病原菌耐药性的不断增加，病毒的持续变异与流行趋势加剧，传统治疗手段的效果逐渐减弱，治疗难度和感染控制的复杂性逐渐增加，呼吸系统感染的诊断与治疗面临着前所未有的挑战。

儿童群体因其免疫系统尚处于发育阶段，尚未完全成熟，成为呼吸道感染的高风险人群。儿童不仅发病率较高，且更易遭受反复感染[3]。一项针对呼吸道感染儿童的大规模随访研究显示，全球因呼吸道感染而住院的儿童中，约60%的是由病毒引起，细菌感染占比不到30%[4,5]，其余10%左右则归因于真菌感染、结核病或不明原因。值得注意的是，对于病毒引起的呼吸道感染，使用抗生素进行治疗通常是无效的。鉴于不同病原体导致的呼吸道感染在症状表现、疾病严重程度、预后情况以及适宜治疗方法上存在显著差异[6,7]，及时准确地诊断出具体感染病原尤为重要[8]。Chambehian于1988年首次提出多重PCR（multiplex Polymerase Chain Reaction，mPCR）技术，通过优化反应体系和条件，可同时扩增多个片段。该技术灵敏度和特异度较高，相比传统方法更快捷、经济，已广泛应用于包括核酸诊断在内的多个领域[9]。然而，尽管多重PCR技术优势显著，但在实际应用中仍存在局限性。例如，在复杂样本中可能受非特异性扩增或引物间相互干扰的影响，导致检测结果稳定性下降。此外，多重PCR技术对实验条件要求较高，尤其是在多重引物设计及反应体系优化方面，可能需针对不同样本反复调试。这些因素是否会影响其检测效能，致使多重PCR在实际应用中的检测效果不如传统的直接免疫荧光检测法，尚待研究。本研究将多重PCR技术与直接免疫荧光检测法进行比较，旨在探讨两种技术在不同应用场景下的检测能力的差异，特别是针对日常样本的检测效果，以及不同病原体检测能力。分析多重PCR技术在诊断儿童常见呼吸道病原体感染中的应用价值，为相关研究和临床实践提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2023年5月—2024年5月徐州市铜山区妇幼保健院收治的因呼吸系统感染就诊的265例患儿的咽拭子样本。其中男144例，女121例。入选标准：年龄6个月～14岁；符合《诸福棠实用儿科学》[10]相关标准；存在流鼻涕、咽喉痛、咳嗽、咳痰、发热等症状；血常规白细胞总数4.0×10^9～12×10^9/L[11]。诊断标准：对检测的样本进行单靶标的qPCR验证，作为结果诊断标准[12]。排除标准：标本细胞数量相对较少；核酸提取含量不足；合并严重感染疾病；合并其他呼吸道疾病。

1.2 检测设备与试剂

①多重PCR检测：BioTeke全自动核酸提取仪（生产企业：无锡百泰克生物技术有限公司，型号：AU1001）；Applied Biosystems实时荧光定量PCR系统（生产企业：美国ABI公司，型号：QuantStudio 7Pro）；多重PCR核酸检测试剂盒（生产企业：深圳生科原生物有限公司）；磁珠法病毒DNA/RNA提取试剂盒（生产企业：无锡百泰克生物技术有限公司）；②荧光免疫检测：奥林巴斯BX43显微镜；七项呼吸道病毒检测试剂盒D3 Ultra DFA Respiratory Virus Screening & ID Kit（生产企业：海德诊断有限公司）；所有操作过程按照说明书进行。

1.3 检测方法

多重PCR检测：用无菌捻拭子采取患者鼻咽部分泌物，然后置入含有3ml磷酸盐缓冲液的病毒储存管中，在充分将采样管进行震荡混匀后，吸取200μl采样管混悬液于提取试剂进行提取，完成后取5μl提取完成的样本别加入A和B配置完成的PCR反应管中，封膜后于低速离心机中离心10s，最后移送至扩增区进行扩增反应。设置PCR反应通道FAM、JOE/VIC/HEX、CY5和ROX：A反应体系使用荧光反应通道FAM、JOE/VIC/HEX、CY5和ROX用于检测RSV、ADV、FluA和FluB；B反应体系使用

荧光反应通道FAM、JOE/VIC/HEX和ROX用于检测PIV1、HPIV2及HPIV3。反应条件：①温度50℃，时间15min，1个循环；②温度95℃，时间3min，1个循环；③温度95℃，时间5s，55℃，30s，45个循环。反应结束后采集荧光，系统依据荧光信号进行结果分析。检测结果判读：Ct值<38，判定为阳性；若Ct值在38～41，则进行复检，复检后Ct值仍在38～41，且有明显指数增长，判定阳性，否则为阴性；Ct值>41，判定为阴性。

直接免疫荧光法检测：对采集的咽拭子样本充分振荡混匀后，于600g转速下离心10min，弃上清液，加入1ml的磷酸盐缓冲液（Phosphate Buffer Solution，PBS），混匀后吸取25μl混悬液滴加到8孔板上，每个样本滴加七孔，风干后用冷丙酮固定10min，风干后每孔加入相应的DFA鉴定染色试剂，接着将载玻片放入37℃恒温箱（生产企业：江苏金怡仪器科技有限公司，160HL）内孵育30 min，最后用稀释好的洗液漂洗，滴加固定液，加上盖玻片，用荧光显微镜观察结果。结果判断：200倍显微镜每视野大于等于2个绿色荧光细胞则为阳性。

1.4 观察指标

（1）多重PCR检测与直接免疫荧光检测结果对比。

（2）不同方法检测各类病原的一致性分析。

（3）呼吸道病原体呼吸道合胞病毒（Respiratory Syncytial Virus，RSV）、腺病毒（Adenoviruses，ADV）、流感病毒A型（Influenza A virus，FluA）、流感病毒B型（Influenza B virus，FluB）、人副流感病毒1型（Human Parainfluenza Virus 1，HPIV1）、人副流感病毒2型（Human Parainfluenza Virus 2，HPIV2）及人副流感病毒3型（Human Parainfluenza Virus 3，HPIV3）检出结果比较。

（4）多重PCR检测与直接免疫荧光检测诊断效能分析。

1.5 统计学分析

使用SPSS 29.0软件进行数据分析，计数资料用［n（%）］表示，采用χ^2检验，以P<0.05为差异有统计意义。评估一致性程度采用Kappa检验，Kappa系数高于0.75是优秀的一致性；0.40～0.75之间是良好的一致性；低于0.40则表示一致性较差。采用受试者工作特征（Receiver Operat–Ingcharacteristic，ROC）曲线评价多重PCR检测与DFA检测的诊断效能。

2 结果

2.1 多重PCR检测与直接免疫荧光检测结果对比

以单靶标的qPCR检测作为诊断标准，在265例患儿中，qPCR检测阳性97例，阴性168例。相比之下，多重PCR检测阳性98例，阴性167例。DFA检测阳性81例，阴性184例。多重PCR检测阳性病例数显著高于DFA检测，差异有统计学意义（P<0.05），见表1。

表1 多重PCR检测与直接免疫荧光检测结果对比（n）

qPCR检测	病例数	多重PCR检测		DFA检测	
		+	−	+	−
阳性	97	95	2	67	30
阴性	168	3	165	14	154
合计	265	98	167	81	184

2.2 不同方法检测各类病原的一致性分析

多重PCR与DFA检测结果的一致性分析显示，RSV、FluA及FluB的检测结果具有较高得一致性（Kappa>0.75，P<0.001），表现优异；ADV、PIV1和PIV3的检测一致性表现一般；DFA检测的所有病例中，未发现PIV2的阳性病例，见表2。

表2 不同呼吸道病原体的多重PCR检测与DFA检测的结果分析

病原体	多重PCR检测（+）		多重PCR检测（−）		Kappa检验	P
	DFA检测（+）	DFA检测（−）	DFA检测（+）	DFA检测（−）		
RSV	29	8	7	221	0.76	<0.001
ADV	5	4	2	254	0.61	<0.001
FluA	20	4	4	237	0.81	<0.001
FluB	5	2	0	258	0.83	<0.001
HPIV1	3	4	1	257	0.53	<0.001
HPIV2	0	3	0	262	/	/
HPIV3	5	6	0	254	0.61	<0.001

2.3 呼吸道病原体RSV、ADV、FluA、FluB、HPIV1、HPIV2及HPIV3检出结果比较

多重PCR检测与DFA检测对各类病原体的检出结果，见表3，多重PCR检测出RSV感染的病例数最多，为35例，其次是FluA（23例），而HPIV2最少，仅有3例。相比之下，DFA检测出感染病例最高也是RSV（29例），其次是FluA（20例），而HPIV2感染未检出。进一步比较两种方法检测各

类病原体的灵敏度、特异度和准确度，结果显示，多重 PCR检测 RSV、ADV、FluA、FluB、HPIV1、HPIV2及HPIV3的各项指标均优于DFA检测，差异有统计学意义（P<0.05），见表4。

表3 RSV、ADV、FluA、FluB、HPIV1、HPIV2和HPIV3的各项检出结果（n）

病原体	多重 PCR 检测				DFA 检测			
	TP	FP	TN	FN	TP	FP	TN	FN
RSV	35	2	228	0	29	7	223	6
ADV	9	0	256	0	5	2	254	4
FluA	23	1	240	1	20	4	237	4
FluB	7	0	258	0	5	0	258	2
HPIV1	7	0	257	1	3	1	256	5
HPIV2	3	0	263	0	0	0	263	3
HPIV3	11	0	254	0	5	0	254	6

注：TP：真阳性；FP：假阳性；TN：真阴性；FN：假阴性。

表4 多重PCR检测与DFA检测各类病原体的指标分析（%）

病原体	多重 PCR 检测			DFA 检测		
	灵敏度	特异度	准确度	灵敏度	特异度	准确度
RSV	100.00	99.13	99.24	82.86	96.96	95.09
ADV	100.00	100.00	100.00	55.55	99.22	97.74
FluA	95.83	99.58	99.24	83.33	98.34	96.98
FluB	100.00	100.00	100.00	71.43	100.00	99.24
HPIV1	87.50	100.00	99.62	37.50	99.61	97.74
HPIV2	100.00	100.00	100.00	0.00	100.00	98.87
HPIV3	100.00	100.00	100.00	45.45	100.00	97.74
合计	97.94	98.21	98.11	69.07	91.67	83.40

2.4 多重PCR检测与直接免疫荧光检测诊断效能分析

采用ROC曲线评价多重PCR检测、DFA检测对呼吸道病原体的诊断价值，结果显示见表5，多重PCR检测ROC曲线下面积（AUC）为0.981（95%CI：0.961 ~ 1.000），而DFA检测ROC曲线下面积（AUC）为0.799（95%CI：0.737 ~ 0.860），见图1，多重PCR检测对呼吸道病原体诊断效能优于DFA检测（P<0.05）。

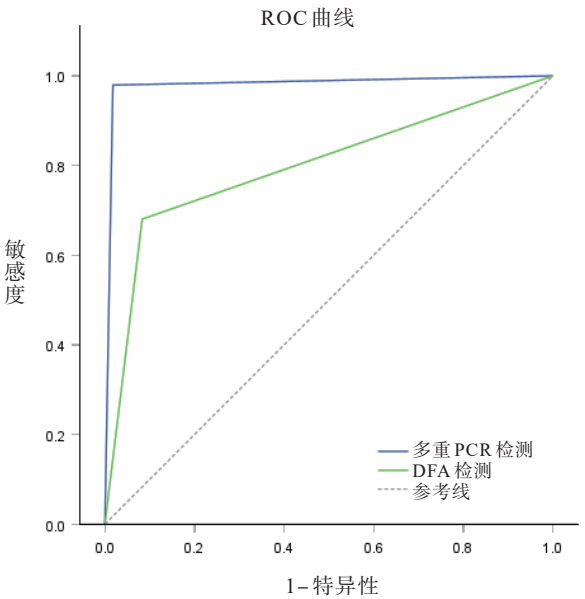


图1 多重PCR检测与DFA检测受试者工作特征曲线

表5 多重PCR检测与DFA检测诊断效能对比分析

检测方法	AUC	95%CI	SE	灵敏度（%）	特异度（%）	阳性预测值（%）	阴性预测值（%）	约登指数	P
多重PCR检测	0.981	0.961 ~ 1.000	0.010	97.94	98.21	96.94	98.80	0.962	<0.001
DFA检测	0.799	0.737 ~ 0.860	0.031	69.07	91.67	82.72	83.69	0.597	<0.001

3 讨论

WHO数据显示，全球每年约有近10%的儿童经历多达10次以上的呼吸道病毒感染，其中100万名儿童因肺炎死亡，肺炎已成为我国5岁以下儿童的第三大死因[13,14]。因此，对呼吸道感染的病原学诊断在临床诊疗中的重要性日益凸显。

准确诊断感染病因并制定合理的治疗方案，不仅有助于减少依赖经验性治疗，实现更加精准的目标治疗，还能减少抗生素的滥用，降低患者治疗和护理成本，从而减少病原体的传播风险。病毒病原学诊断有助于临床医生评估病情进展及预后，对于某些病毒感染，如腺病毒、呼吸道合胞病毒以及流感病毒，可以使用特效抗病毒药物[15]。有研究表明[16]，病毒感染病原学诊断在临床治疗中发挥着重要作用，如早期抗流感治疗不仅能够控制病情的进展，还可以显著改善重症流感患者的预后。目前，临床上常用的呼吸道病病原体检测方法主要包括直接抗原检测、血清学检测以及培养法，这些方法虽然经济、快速、简单易行，但仍存在很多不足，一方面是检测诊断窗口期较短，灵敏度较低，检测种类较少，另一方面则是存在假阳性[17]，易出现误诊。近年来，随着分子生物技术不断发展，多重PCR技术被越来愈多的应用于临床检测和实验室诊断。

本研究应用多重PCR检测和DFA检测对265例呼吸道感染患儿的咽拭子样本进行分析，目标病原体包括RSV、ADV、FluA、FluB、HPIV1、HPIV2和

HPIV3。结果显示，多重PCR检测的阳性病例数普遍高于DFA检测（P <0.05），其中RSV阳性率最高，其次是FluA，HPIV2最低，在灵敏度、特异度和准确度方面，多重PCR检测均优于DFA检测。两种方法在检测RSV、FluA、FluB方面的一致性表现优异（Kappa>0.75，P <0.05），而ADV、HPIV1和HPIV3检测结果一致性则表现一般。多重PCR检测的AUC为0.981（95%CI：0.961–1.000）显著高于DFA检测的0.799（95%CI：0.737 ~ 0.860），差异有统计学意义（P <0.05）。因此，相较于直接免疫荧光法，多重PCR技术在呼吸道病原体感染的诊断方面效能更高。

分析原因[18–22]：（1）常见呼吸道病原体种类繁多且复杂多样，主要包括流感病毒、呼吸道合胞病毒、腺病毒、细菌和非典型病原体等。在不同的感染阶段，病原体载量存在显著差异，尤其是在疾病早期和恢复期，部分病原体载量可能极低，而常规的检测方法因其灵敏度不足难以检出。此外，部分病原体（如流感病毒）变异率较高，基因组频繁发生突变，可能导致抗原性发生显著改变。这种抗原性变异不仅影响病毒的传播能力和致病性，还可能导致基于特定抗原表位的测方法失效。（2）多重PCR技术通过设计特异性引物和探针，能够同时扩增和检测多种病原体的DNA或RNA，不仅显著提高了检测效率，还能通过优化引物设计和反应条件，有效减少了非特异性扩增和交叉反应的发生。由于其高灵敏度和特异度，多重PCR技术在检测低载量病原体及复杂多样的病原体组合方面表现出显著优势。特别是在呼吸道感染诊断中，多重PCR技术能够同时检测流感病毒、呼吸道合胞病毒、腺病毒、细菌及非典型病原体等多种病原体，为临床提供快速、准确且全面的诊断结果。此外，多重PCR技术还可用于监测病原体的变异和流行趋势，为公共卫生决策提供重要依据。（3）直接免疫荧光法（DFA）是一种基于荧光标记的特异性抗原–抗体反应的检测技术。该方法操作简便，检测时间短，且除荧光显微镜外无需其他特殊设备，因此在临床实验室中具有较高的实用性。然而，DFA的灵敏度相对较低，尤其是在检测低病毒载量的样本时，可能出现漏检现象。此外，由于抗体的交叉反应和非特异性结合，DFA检测结果可能存在假阳性。

综上所述，多重PCR技术在检测儿童常见呼吸道病原体中相比于直接免疫荧光法具有显著优势，多重PCR技术具有较高的灵敏度和广泛的检测性，检测效能高，在儿童常见呼吸道感染的诊断中具有重要价值。

[参 考 文 献]

[1] 张交生,郑跃杰,张文双,等.中国儿童合理使用抗菌药物行动计划（2023—2025）[J].中国实用儿科杂志,2023,38(6):401–406.
[2] 朱星卓,李益行,赵恒,等.呼气分析技术在识别呼吸系统感染病原体中的研究进展[J].中国呼吸与危重监护杂志,2022,21(4):292–296.
[3] 赵顺英,陆权.提升对儿童侵袭性肺部真菌感染的认识与实践[J].中华儿科杂志,2022,60(4):271–273.
[4] 龙智,王倩,李雅春,等儿童社区获得性肺炎397例的病原学特征分析[J].中华传染病杂志,2024,42(2):71–76.
[5] 王亮,沈永明.呼吸道合胞病毒混合细菌感染患儿的免疫炎症状态[J].江苏医药,2022,48(9):939–942.
[6] 郑伯强,王桂兰,王冰洁.小儿反复呼吸道感染的临床病因相关性分析[J].中国妇幼保健,2014,29(17):2745–2747.
[7] 蔡梦云,江祎桢,杨燕珍,等.2022—2023年4747例急性下呼吸道感染儿童呼吸道病原体流行病学特征变化分析[J].延边大学医学学报,2024,47(2):112–115.
[8] 李小玲,祁媛媛,张晓波.病原学检测技术在儿童呼吸系统感染性疾病中的合理应用[J].中国临床医生杂志,2023,51(7):757–760.
[9] 常颖,黄光举,张慧玉,等.多重PCR检测技术在儿童社区获得性肺炎病原学诊断中的临床应用价值[J].中国煤炭工业医学杂志,2023,26(3):299–302.
[10] 胡亚美.诸福棠实用儿科学[J].北京:人民卫生出版社,2002.
[11] 张勇,刘海萍,任伟娟.细菌性急性上呼吸道感染患儿血常规,炎症因子水平变化及其相关性[J].海南医学,2023,34(15):2203–2205.
[12] 中华检验医学培训工程专家委员会,中华医学会呼吸病学分会,徐英春,等.成人呼吸道感染病原诊断核酸检测技术临床应用专家共识(2023)[J].协和医学杂志,2023,14(5):959–971.
[13] 王金津,段亚丽,艾军红,等.2017—2020年我国儿童急性下呼吸道人腺病毒感染流行病学特征分析[J].中国预防医学杂志,2024,25(3):283–288.
[14] 戴晓珊.住院儿童急性呼吸道感染病原学分析和FAM89A和IFI44L在细菌和病毒感染儿童中表达的实验研究[D].厦门:厦门大学,2019.
[15] 张玉林,曹彬.呼吸道感染的病原学检测及其临床应用[J].中华结核和呼吸杂志,2024, 47(5):497–500.
[16] 张悦,吕芳芳,贾晓慧,等.基于毛细电泳的多重PCR方法检测儿童呼吸道腺病毒感染常见血清型的价值[J].中华实用儿科临床杂志,2022,37(4):256–259.
[17] 刘洋.重视呼吸道病毒感染的实验室检测[J].实验与检验医学,2020,38(3):419–422.
[18] 黄斐,郭玮.呼吸道病毒快速检测的临床应用现状与挑战[J].中国临床医学,2024,31(5):826–831.
[19] 刘秀卿,顾大勇,黄磊,等.2021 ~ 2022年深圳市某医院常见呼吸道病毒流行病学特点[J].标记免疫分析与临床,2023,30(4):603–608.
[20] 罗丹,吴佳玲,周前选,等.多重荧光PCR技术在诊断儿童急性呼吸道感染中的应用[J].临床肺科杂志,2022,27(1):32–35.
[21] 邱碧原,徐梅,陈月华,等.直接免疫荧光法和间接免疫荧光法检测患儿下呼吸道感染病原体方法的比较[J].国际检验医学杂志,2023,44(S2):36–40.
[22] 黄小兰,贾楠,李正莉,等.3种多病原核酸检测技术在儿童呼吸道感染病原学检测中的对比研究[J].标记免疫分析与临床,2022,29(7):1194–1200.