

- therapy in rectal cancer[J]. Eur Radiol, 2020, 30(1):224 - 238.
- [16] Liu Y, Zhang F J, Zhao X X, et al. Development of a Joint Prediction Model Based on Both the Radiomics and Clinical Factors for Predicting the Tumor Response to Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Patients with Locally Advanced Rectal Cancer[J]. Cancer Manag Res, 2021, 13:3235 - 3246.
- [17] Bellini D, Carbone I, Rengo M, et al. Performance of Machine Learning and Texture Analysis for Predicting Response to Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Locally Advanced Rectal Cancer with 3T MRI[J]. Tomography, 2022, 8(4):2059 - 2072.
- [18] Chen J, Chen Y, Zheng D, et al. Pretreatment MR - based radiomics nomogram as potential imaging biomarker for individualized assessment of perineural invasion status in rectal cancer[J]. Abdom Radiol(NY), 2021, 46(3):847 - 857.
- [19] Petresc B, Lebovici A, Caraiani C, et al. Pre - Treatment T2 - WI Based Radiomics Features for Prediction of Locally Advanced Rectal Cancer Non - Response to Neoadjuvant Chemoradiotherapy: A Preliminary Study[J]. Cancers(Basel), 2020, 12(7):1894.
- [20] Wei Q, Yuan W, Jia Z, et al. Preoperative MR radiomics based on high - resolution T2 - weighted images and amide proton transfer - weighted imaging for predicting lymph node metastasis in rectal adenocarcinoma[J]. Abdom Radiol(NY), 2023, 48(2):458 - 470.
- [21] 苏兰芳, 王芳, 李韩建, 等. 磁共振成像中 T2 加权成像和弥散加权成像序列预测直肠癌患者淋巴结转移风险研究[J]. 中国医学装备, 2023, 20(5):77 - 81.

收稿日期:2025-01-19

责任编辑:陆玉娟

多重荧光 PCR 检测小儿呼吸道病原体的应用研究

吴晨姿, 谈王蓉

(宜兴市中医医院, 江苏 宜兴 214200)

【摘要】目的:探讨多重荧光 PCR (MFCPCR) 在小儿呼吸道病原体检测中的应用价值。**方法:**选取本院 2023 年 4 月至 2024 年 4 月收治的 120 例呼吸道感染患儿作为研究对象。分别对其采用 MFCPCR 与传统检测方法 (直接涂片镜检) 进行检测, 以病原体分离培养、核酸检测、血清学检测等综合检测作为小儿呼吸道病原体检的金标准, 比较两种检测方法与真实结果的一致性。**结果:**综合检测结果显示, 120 例呼吸道感染患儿中, 病毒性病原体 49 例, 细菌性病原体 38 例, 支原体性病原体 33 例; MFCPCR 检测结果显示, 病毒性病原体 49 例, 细菌性病原体 37 例, 支原体性病原体 32 例; 传统检测方法结果显示, 病毒性病原体 30 例, 细菌性病原体 28 例, 支原体性病原体 24 例。与金标准比较, MFCPCR 检测小儿呼吸道病原体的一致性较高, 且高于对照组 ($P < 0.05$), 同时其准确率、灵敏度、特异度均高于传统检测方法 ($P < 0.05$)。**结论:**在小儿呼吸道病原体检测中, MFCPCR 检测结果更加精准可靠, 可为该疾病患者的早期治疗提供有效依据。

【关键词】 小儿; 呼吸道感染; 病原体检测; 多重荧光 PCR

【中图分类号】 R446.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-4983(2025)03-0297-04

Application of multiplex fluorescent PCR for detecting pediatric respiratory pathogens

WU Chen - zi, TAN Wang - rong

(Yixing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yixing, Jiangsu 214200, China)

【Abstract】Objective: To investigate the clinical value of multiplex fluorescent PCR (MFCPCR) in detecting pediatric respiratory pathogens. **Methods:** A total of 120 children with respiratory infections admitted to our hospital from April 2023 to April 2024 were enrolled. All samples were tested using MFCPCR and traditional methods (direct smear microscopy). A comprehensive reference standard—including pathogen culture, nucleic acid testing, and serological assays—was used as the gold standard for identifying respiratory pathogens.

作者简介: 吴晨姿 (1992 -), 女, 主管检验师, 主要从事临床检验方向研究。

通信作者: 谈王蓉 (1987 -), 女, 副主任技师, 主要从事临床检验和急诊检验方向研究。

The consistency of both detection methods with the gold standard was compared. **Results:** According to the comprehensive gold standard, among the 120 children, 49 had viral pathogens, 38 had bacterial pathogens, and 33 had mycoplasma pathogens. MFCPCR detected 49 viral, 37 bacterial, and 32 mycoplasma cases, while traditional methods identified 30 viral, 28 bacterial, and 24 mycoplasma cases. Compared to the gold standard, MFCPCR showed significantly higher consistency than traditional methods ($P < 0.05$). Furthermore, MFCPCR demonstrated significantly higher accuracy, sensitivity, and specificity ($P < 0.05$). **Conclusion:** MFCPCR provides more accurate and reliable results in detecting pediatric respiratory pathogens, offering an effective basis for early diagnosis and treatment.

【Key words】 Pediatrics; respiratory infection; pathogen detection; multiplex fluorescent PCR

小儿呼吸道感染是儿童最常见的疾病之一,其病原体种类繁多,包括病毒、细菌、支原体、衣原体等。传统的病原体检测方法如培养法、血清学检测等,虽然在一定程度上能够诊断病原体,但存在检测周期长、灵敏度和特异性不高等问题。随着分子生物学技术的发展,MFCPCR以其高灵敏度、高特异性和快速检测的优势,在小儿呼吸道病原体检测中显示出巨大的应用潜力^[1]。MFCPCR,即多重实时荧光定量PCR,是一种在PCR反应中同时检测多种病原体的核酸技术,该技术通过使用不同的荧光探针标记不同的病原体特异性引物或探针,能够在同一个反应管中同时对多种病原体进行检测和定量,与传统检测技术相比,其不仅提高了检测效率,还减少了样本用量,缩短了检测时间,特别适合于小儿呼吸道感染的快速诊断^[2]。本研究旨在探讨MFCPCR技术在小儿呼吸道病原体检测中的应用,通过优化多重荧光PCR检测体系,建立一种快速、准确、高通量的检测方法,以提高小儿呼吸道感染病原菌种类的诊断效率和准确性,进而为小儿呼吸道感染的防控和治疗提供新的思路和方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取宜兴市中医医院在2023年4月至2024年4月诊治的120例呼吸道感染患儿为研究对象,分别对其采用MFCPCR与传统检测方法(直接涂片镜检)进行检测。纳入标准:(1)受试患儿符合《儿童呼吸道感染病原体核酸检测专家共识》^[3]中提供的小儿呼吸道感染诊断标准;(2)患儿年龄3~14岁;(3)患儿样本采集后24h内进行检测;(4)家长或监护人同意参与研究。排除标准:(1)有其他系统性疾病或免疫缺陷的患儿;(2)近期使用过抗生素治疗的患儿;(3)样本采集不符合要求的病例。120例患儿共包括男64例,女56例;年龄3~14岁,平均(6.37±2.02)岁;病程3~7d,平均(4.37±0.35)d。

1.2 方法

1.2.1 MFCPCR检测 (1)操作前准备。①试剂准备:选择合适的小儿呼吸道病原体多重荧光定量PCR检测试剂盒,检查试剂盒的有效期、完整性,确保试剂没有变质、污染,准备好PCR反应所需的各种溶液,如PCR缓冲液、dNTPs、酶等。②样本采集:采集鼻咽拭子、痰液

等呼吸道样本,采集过程中要严格遵守无菌操作规范,避免样本被污染。③仪器设备准备:准备好荧光定量PCR仪,并确保仪器正常运行、校准准确;准备好离心机、移液器等实验室常用设备。(2)操作方法与步骤。①样本处理:将采集到的鼻咽拭子或痰液样本放入含有适当保存液的无菌管中,若为痰液样本,可加入适量的痰液消化液,以液化痰液,便于后续处理,短暂离心样本管,使样本沉淀在管底。②核酸提取:采用合适的核酸提取方法,如柱式提取法或磁珠提取法,从样本中提取病原体的核酸(DNA或RNA),严格按照核酸提取试剂盒的操作说明进行操作,确保提取的核酸质量高、纯度好。③PCR反应体系配制:根据试剂盒说明书,计算所需的各种试剂的用量,在无菌离心管中依次加入PCR缓冲液、dNTPs、引物、探针、酶和提取的核酸样本,充分混匀,注意避免产生气泡,以免影响PCR反应效果。④PCR扩增:将配制好的PCR反应体系分装到PCR反应管中,盖紧管盖,将反应管放入荧光定量PCR仪中,预变性温度和时间为95℃,3~5min;变性温度和时间为95℃,10~15s;退火温度和时间为55~60℃,15~30s;延伸温度和时间为72℃,15~30s;循环次数为40~45个循环,在PCR扩增过程中,实时监测荧光信号的变化。(3)结果分析:PCR扩增结束后,根据荧光定量PCR仪生成的扩增曲线和Ct值(循环阈值)来判断结果,Ct值小于设定的阈值为阳性结果,表示样本中存在相应的呼吸道病原体;Ct值大于或等于阈值为阴性结果,并通过荧光颜色来区分不同的病原体。

1.2.2 直接涂片镜检 (1)操作前准备。①试剂准备:革兰染色液:包括结晶紫染液、碘液、95%乙醇、稀释复红染液等;抗酸染色液:石炭酸复红染液、3%盐酸酒精、碱性美蓝染液等;固定液:如甲醇等。②器材准备:载玻片、盖玻片、镊子、接种环、酒精灯等。③显微镜。(2)操作方法与步骤。①样本采集:采用鼻咽拭子、痰液等作为呼吸道样本,鼻咽拭子采集时,将拭子轻轻插入患儿鼻腔或咽部,旋转几圈后取出,痰液样本可让患儿自然咳出或通过吸痰等方式获得。②涂片制作。鼻咽拭子样本:将拭子在载玻片上均匀涂抹成薄层,面积约为1cm×1cm;痰液样本:取一小滴痰液置于载玻片中央,用接种环均匀涂抹成薄层,涂片自然干燥后,在酒

精灯火焰上快速通过三次进行固定。③革兰染色。初染：滴加结晶紫染液覆盖涂片，染色1 min，水洗；媒染：滴加碘液覆盖涂片，染色1 min，水洗；脱色：用95%乙醇脱色，约20~30 s，至无紫色脱下为止，水洗；复染：滴加稀释复红染液覆盖涂片，染色1 min，水洗，干燥后镜检。④抗酸染色。初染：滴加石炭酸复红染液覆盖涂片，在微火上加热至出现蒸气，维持5 min，勿使染液沸腾或干涸，水洗；脱色：用3%盐酸酒精脱色，至无红色脱下为止，水洗；复染：滴加碱性美蓝染液覆盖涂片，染色1 min，水洗；干燥后镜检。(3)结果观察。①革兰染色结果：革兰阳性菌被染成紫色，革兰阴性菌被染成红色。②抗酸染色结果：抗酸菌被染成红色，其他细菌和细胞被染成蓝色。

1.3 观察指标 以病原体分离培养、核酸检测、血清学检测等综合检测作为小儿呼吸道病原体检验的金标准，对比两种检测方式的检测结果与真实结果的一致性。另分别计算MFCPCR与直接涂片镜检的诊断效能，包括敏感度、特异度。其中准确率 = (真阳性 + 真阴性) / 总例

数 × 100%，灵敏度 = 真阳性 / (真阳性 + 假阴性) × 100%，特异度 = 真阴性 / (真阴性 + 假阳性) × 100%。

1.4 统计学方法 选用SPSS 26.0处理与分析数据。计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示，两组间进行独立t检验；计数资料用[n(%)]表示，进行 χ^2 检验；一致性采用Kappa分析，Kappa > 0.75表明一致性较好。P < 0.05为差异具有统计学差异。

2 结果

2.1 两种检测方法检测结果比较 综合检测结果(金标准)显示：120例呼吸道感染患儿中，病毒性病原体49例，细菌性病原体38例，支原体性病原体33例。MFCPCR检测结果显示：病毒性病原体49例，细菌性病原体37例，支原体性病原体32例。传统检测方法结果显示：病毒性病原体30例，细菌性病原体28例，支原体性病原体24例。相对来看，MFCPCR检测小儿呼吸道病原体的一致性较高，且高于对照组(P < 0.05)，同时其准确率、灵敏度、特异度均高于传统检测方法(P < 0.05)。见表1、表2、表3。

表1 MFCPCR检测结果

| 诊断结果 | 金标准(病毒性病原体) | | 合计 | 金标准(细菌性病原体) | | 合计 | 金标准(支原体性病原体) | | 合计 |
|--------|-------------|-------|----|-------------|-------|----|--------------|-------|----|
| | 阳性 | 阴性 | | 阳性 | 阴性 | | 阳性 | 阴性 | |
| 阳性 | 49 | 0 | 49 | 37 | 1 | 38 | 30 | 3 | 33 |
| 阴性 | 0 | 71 | 71 | 1 | 81 | 82 | 3 | 84 | 87 |
| Kappa值 | | 1.000 | | | 0.867 | | | 0.769 | |
| P值 | | 0.000 | | | 0.017 | | | 0.025 | |

表2 传统检测方法检测结果

| 诊断结果 | 金标准(病毒性病原体) | | 合计 | 金标准(细菌性病原体) | | 合计 | 金标准(支原体性病原体) | | 合计 |
|--------|-------------|-------|----|-------------|-------|----|--------------|-------|----|
| | 阳性 | 阴性 | | 阳性 | 阴性 | | 阳性 | 阴性 | |
| 阳性 | 30 | 19 | 49 | 28 | 10 | 38 | 24 | 9 | 33 |
| 阴性 | 19 | 52 | 71 | 10 | 72 | 82 | 9 | 78 | 87 |
| Kappa值 | | 0.368 | | | 0.472 | | | 0.563 | |
| P值 | | 0.455 | | | 0.248 | | | 0.074 | |

表3 两种检测方法检测效能比较 [% (n/m)]

| 组别 | n | 病毒性病原体 | | | 细菌性病原体 | | | 支原体性病原体 | | |
|------------|-----|---------------------|-------------------|-------------------|--------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|
| | | 准确率 | 敏感度 | 特异度 | 准确率 | 敏感度 | 特异度 | 准确率 | 敏感度 | 特异度 |
| MFCPCR | 120 | 100.00 (120/120) | 100.00 (49/49) | 100.00 (71/71) | 98.33 (118/120) | 97.37 (37/38) | 98.78 (81/82) | 95.00 (114/120) | 90.91 (30/33) | 96.55 (84/87) |
| 传统检测方法 | 120 | 84.17 (101/120) | 61.22 (30/49) | 73.24 (52/71) | 83.33 (100/120) | 73.68 (28/38) | 87.80 (72/82) | 85.00 (102/120) | 72.73 (24/33) | 89.66 (78/87) |
| χ^2 值 | | 20.634 | 23.570 | 21.935 | 16.214 | 8.610 | 7.893 | 6.667 | 3.682 | 4.369 |
| P值 | | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.003 | 0.005 | 0.010 | 0.046 | 0.023 |

3 讨论

本研究发现，MFCPCR检测小儿呼吸道病原体在临床实践中展现出诸多显著优点，为小儿呼吸道感染的诊治带来了重要契机。快速性是一大突出优势，小儿呼吸道感染病情变化往往较为迅速，及时明确病原体对于早期干预至关重要，与传统检测技术相比，该技术能够在较短时间内完成对多种病原体的检测，大大缩短了诊断周

期，这使得医生可以迅速根据检测结果制定针对性的治疗方案，为患儿争取宝贵的治疗时间，避免病情的进一步恶化^[3]。表3结果表明，准确性高是MFCPCR检测方法的重要特点，通过特定的引物和探针，能够高度特异性地识别目标病原体，减少了传统检测方法中可能出现的交叉反应和假阳性结果，同时，其敏感性强，能够检测出低浓度的病原体，对于早期感染或隐性感染的患儿