

PCR 病原体分子检测在下呼吸道感染中的应用

迟翠玲

日照市岚山区疾病预防控制中心 山东 日照 276800

【摘要】目的: 研究在诊断下呼吸道感染当中, 多重 PCR 病原体分子检测技术的应用价值。方法: 纳入 65 例疑似下呼吸道感染患者(2022.3~2022.12), 全部患者均接受多重 PCR 病原体分子检测技术与免疫荧光法, 比较两种检测方式诊断效果。结果: 采用对比分析方式得出多重 PCR 检测法灵敏度与特异度及诊断符合率分别是 97.87%、88.89%、95.38% 明显高于免疫荧光法 ($P < 0.05$)。结论: 在诊断下呼吸道感染当中, 多重 PCR 病原体分子技术的应用, 可使诊断准确性提升, 可推荐。

【关键词】: 多重 PCR 病原体分子检测; 下呼吸道感染; 诊断效果

Application of PCR Molecular Detection of Pathogens in Lower Respiratory Tract Infection

Cuiling Chi

Disease Control and Prevention Center Lanshan District Rizhao City Shandong Rizhao 276800

Abstract: Objective: To study the application value of multiplex PCR molecular detection technology in the diagnosis of lower respiratory tract infection. Methods: Sixty-five patients with suspected lower respiratory tract infection (2022.3~2022.12) were included. All patients received multiple PCR pathogen molecular detection technology and immunofluorescence method. The diagnostic effects of the two detection methods were compared. Results: The sensitivity, specificity and diagnostic coincidence rate of multiplex PCR were 97.87%, 88.89% and 95.38% respectively, which were significantly higher than those of immunofluorescence assay ($P < 0.05$). Conclusion: In the diagnosis of lower respiratory tract infection, the application of multiple PCR pathogen molecular technology can improve the diagnostic accuracy and can be recommended.

Keywords: Multiple PCR molecular detection of pathogens; Lower respiratory tract infection; Diagnostic effect

在临床上, 呼吸道感染为常见的一种呼吸系统病症, 其包含上呼吸道及下呼吸道感染^[1]。就当前来说, 伴随工业化进程日益增快, 环境污染明显加重, 导致此病发病率, 呈现出明显升高的趋势, 使得人类身心健康受到严重威胁。对于下呼吸道感染, 其发病因素极为复杂, 主要是由于患者感染了细菌、支原体或者病毒等病原体而引起的, 在临床上对于此疾病不能及时获取到病原学根据。对于下呼吸道感染患者在发病之后, 其会有程度不同的发热及头痛与气喘等症状等^[2]。针对下呼吸道感染, 病原体分布十分广泛, 在发达国家主要以感染病毒为主, 而在发展中国家主要是感染细菌。对于下呼吸道感染来说, 病原体感染情况十分复杂, 同时患者临床症状缺少特异性, 传统病原学诊断法是经检测分离培养病原体开展诊断工作, 但是此种诊断方式用时长, 同时鉴定数量有限, 所以, 很难将临床诊断需求满足^[3]。伴随临床诊断技术日益发展与完善, 免疫荧光法于临床上应用十分广泛, 且在病毒及衣原体检测当中发挥了极大的作用, 特异度非常的高, 但是灵敏度较低^[4]。多重 PCR 技术在生物医学等方面广泛应用。目前, 多重 PCR 方法在检测感染性疾病当中包含两个方向: 第一, 针对每种病原单一特异基因开展多重的检测, 可以同时同一种或者几种病原体是否存在进行检查; 第二, 对于某个病原多个基因开展多重检测, 能够避免出现假阳性的结果。在开展 PCR 扩增期间, 于同一个 PCR 反应管当中一同将多种病原微生物特异性的引物加入, 可以将多种病原体一并

检测出来, 且可以将病原体的感染类型确定下来^[5]。多重 PCR 检测法也可以将肠道常见致病菌检测出来, 对确保食品安全可起到重要作用。此种检测手段主要表现是于同一个反应体系内加入种类不同的目的基因引物, 以确保可以一次性对多种目的基因, 进行有效的扩增。鉴于此, 本次纳入 2022.3~2022.12 期间收治的 65 例疑似下呼吸道感染患者, 探讨多重 PCR 病原体分子检测技术, 对此类感染的诊断价值, 如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

纳入 65 例疑似下呼吸道感染患者(2022.3~2022.12) 全部患者均接受多重 PCR 病原体分子检测技术与免疫荧光法, 比较两种检测方式诊断效果, 男性 35 例、女性 30 例; 年龄 31~80 岁, 平均年龄 (54.35 ± 8.51) 岁; 病程 1~7d, 平均 (4.51 ± 2.23) d。

1.2 方法

(1) 标本采集与处理: 全部患者均培养痰液标本, 在患者入院之后的 24 小时借助吸痰管, 通过患者鼻孔由鼻咽部插入, 再将黏液收集器连接之后, 对患者痰液标本采集, 在提取标本之后, 用漩涡混合器把其打散, 借助离心机离心十分钟, 将转速调整至 1500r/min, 把沉淀物用在 10 毫升 pH 值 7.2 的磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 洗涤, 共进行两次洗涤, 之后用 1 毫升 PBS 缓冲液把其调制成为悬液, 对于标本借助全自动核酸提取仪器对其进行核酸提取, 且放置

到 PCR 管内进行保存。全部痰液标本都送检开展微生物病原学的诊断。(2) 免疫荧光法：把标本离心沉淀之后制作成片，放置到常温条件下使其自然干燥，借助冷丙酮固定十分钟之后将其取出，等到冷丙酮完全挥发之后，借助荧光所标记的呼吸道病毒单克隆抗体，对标本病原体进行检测，主要操作步骤依据试剂盒说明书内相关要求样的操作，将两个及以上完整的细胞中包含明亮黄绿色荧光代表阳性。(3) 多重 PCR 检测：按照美国国立生物技术信息中心所公布的病原体目的序列将各个病原体相对的保守区域找到，且涉及引物，并且在中国食品药品检定研究院购置一个病原体当作对应的参考品，经对参考品梯度稀释用各个引物检测，若是病原体的浓度，难以有效的扩增时，则代表此位点扩增灵敏度。收集与检测其他呼吸道病原，保障研究当中全部引物不会被病原核酸形成扩增效果，来对确定特异度，且把全部检测靶点正向及反向引物，混合成反转录引物混合液及 PCR 引物混合液。在扩增 PCR 之后，借助遗传分析仪毛细电泳片段，来分离样品 PCR 的产物，对各个

样品峰形图进行分析，全部病原体 PCR 产物片段的长度及参考大小间距不可以有在 1.5bp 以上。

1.3 观察指标

比较两种检测方式的诊断准确性以及特异度与敏感度， $\text{诊断准确率} = \frac{\text{准确数}}{\text{总数}} \times 100\%$ ； $\text{灵敏度} = \frac{\text{真阳性人数}}{\text{真阳性人数} + \text{假阴性人数}} \times 100\%$ ； $\text{特异度} = \frac{\text{真阴性人数}}{\text{真阴性人数} + \text{假阳性人数}} \times 100\%$ 。

1.4 统计学方法

统计学软件 SPSS21.0 计量资料以 $(\bar{X} \pm s)$ 表示，t 检验，计数资料以 % 表示，进行 χ^2 检验； $P < 0.05$ 代表数据差异。

2 结果

在本次所纳入的 65 例疑似下呼吸道感染患者当中，47 例为下呼吸道感染患者。多重 PCR 检测法灵敏度与特异度及诊断符合率分别是 97.87%、88.89%、95.38% 明显高于免疫荧光法，($P < 0.05$)，详见表 1 表 2 和表 3。

表 1 多重 PCR 检测

多重 PCR	病理检查		合计
	阳性	阴性	
阳性	46	2	48
阴性	1	16	17
合计	47	18	65

表 2 免疫荧光法检出情况

免疫荧光法检查	病理检查		合计
	阳性	阴性	
阳性	31	9	40
阴性	16	9	25
合计	47	18	65

表 3 两组各项指标结果比较

组别	灵敏度	特异度	诊断符合率
多重 PCR	97.87%	88.89%	95.38%
免疫荧光法检查	65.96%	50.00%	61.54%
χ^2 值	16.157	6.415	22.031
P 值	0.000	0.011	0.000

3 讨论

下呼吸道感染属于临床上常见的一种呼吸道感染类疾病，其发病率及死亡率均非常高。近些年来，各种抗菌药物出现及广泛应用，使下呼吸道感染致病菌的病原谱发生明显的改善，使得临床诊断与治疗难度显著增加。传统培养法为诊断下呼吸道感染病原体的金标准，但是因为其于整个培养期间十分复杂，所以耗时极长，在临床早期为患者治疗当中应用效果欠佳，易出现延误病情的情况。当前，直接及间接免疫荧光法，在诊断下呼吸道感染病原体当中，有着极大的应用价值，但是，诊断灵敏度及特异度不高^[6-8]。所以，需要探究出诊断价值高的诊断手段。

伴随分子生物学技术的日益发展，病原体分子检测技术于临床诊断研究当中显著增多，特别是以分子遗传水平为基础的核酸检测方法，逐渐成为病原体检测技术当中的核心技术。多重 PCR 为以传统 PCR 为基础的检测，可一同检测多种病原体，在近些年其在检测下呼吸道感染当中

发挥了极大的价值。多重 PCR 技术包含了于同一 PCR 体系当中一同加入多个靶标序列的一个特异性的引物，可以对多个 RNA 及 DNA 模板，或者同个模板当中多区域一同对 PCR 扩增^[7]。从 Chamberlin 等等在 1988 年初次提出此概念开始，多重 PCR 技术在核酸诊断领域当中广泛应用，其包含了基因敲除分析以及多态性与突变分析和 RNA 检测等，其被广泛的用于对感染类疾病诊断当中。有着高效性以及可靠性等特征，也具有一定的简便性。多重 PCR 技术包含下述以下 3 个方面应用：第一，可以检测同一份标本内多个病原，如细菌以及病毒等，可将病原分别检出；第二，也可一同将同一个病原多个位点检出，能将检测性能显著提升。且此种检查方式可在区分病原体多个基因型 / 血清型当中应用，如甲流不同的分型等。第三，伴随细菌耐药问题的不断出现，对病原及耐药基因检测，在临床检测当中的重要性就体现出来。多重 PCR 有下述几个特点：第一，可对病原体全面且系统的进行鉴别诊断，有着操作方便且

快速等特点,在检测成组病原体当中比较适用,例如:肝炎病毒以及肠道致病性细菌等;第二,采用多重 PCR 能够见检测效率提升,使得检测周期缩短,能够将检测成本降低,有着显著的社会效益,在临床检测及卫生防疫等手段当中均比较适用。张莹莹^[9]指出当前 PCR 技术于临床诊断当中被广泛的应用,尤其是 PCR 和 PCR 发展至多重以及实时定量与反转录 PCR 等,使得最终检测效果及检测准确性显著提升。相关研究在为呼吸道病毒感染患者病原体筛查当中,PCR 技术检出率在 60.0%,比直接免疫荧光技术更高,后者检出率约 40.0%。其在实践研究当中纳入 200 例下呼吸道感染患儿,共 121 例病毒为阳性,阳性检出率在 60.5% 左右;在感染病毒当中呼吸道合胞病毒(RSV)占比最高,在 35.0% 左右。RSV 是使得婴儿出现喘息性呼吸道病症的常见病毒,多见于一岁以内小儿,可引起间质性肺炎,及毛细支气管炎。RSV 为副粘病毒科,易在免疫力下降群体当中出现,在病毒感染模式上面主要将单一的病毒感染为核心。对于下呼吸道感染患儿,腺病毒(ADV)为主要病毒病原体,在急性婴儿呼吸道感染当中,住院患儿 ADV 感染约 15.0%。对于下呼吸道感染来说,其属于全球范围内所面临的一种严重的公共卫生类问题,对于病原体有着多样性特征,但是患儿临床症状无特异性,免疫法和病毒分离培养诊断用时非常的长,难以将诊断实际需求满足。其通过总结得出,多重 PCR 技术在为下呼吸道感染婴儿检测病原体,可对病原体类型鉴别,诊断敏感性及特异性较高。叶泽辉^[10]指出在二十世纪 20 世纪八十年代,在分子诊断领域当中,PCR 技术应用十分的广泛,且于起初的常规 PCR 慢慢发展到多重及实时定量 PCR 等,检测的准确性及扩增能力提升明显,而多重 PCR 技术,在诊断呼吸道病毒感染当中,在筛查病原体起到了显著的作用。其通过实践研究结果显示,和直接荧光免疫检测法相比,多重 PCR 病原体分子对于下呼吸道感染检测,灵敏及特异度均较高。与本次研究结果具有相似性,65 例疑似下呼吸道感染患者,47 例为下呼吸道感染。多重 PCR 检测法灵敏度与特异度及诊断符合率分别是 97.87%、88.89%、95.38% 明显高于免疫荧光法,差异有统计学意义, ($P < 0.05$)。由此能够看出:

采用多重 PCR 病原体分子诊断法,对于下呼吸道感染进行诊断,诊断准确性较高。由此能够看出相比于传统直接免疫检测手段,多重 PCR 能够将诊断灵敏性及准确率以及特异性提升,临床应用价值较高。

综上所述,对于下呼吸道感染的诊断,采用多重 PCR 病原体分子技术,对提升诊断准确性具有重要意义,值得进一步推广并应用。

参考文献:

- [1] 温雅,杜焰家,黄娟,等.环介导等温扩增技术对慢性阻塞性肺疾病急性加重伴下呼吸道感染的诊断价值[J].实用心脑血管病杂志,2022,30(12):114-118.
- [2] 齐晓丽,马晓兵,胡晓艳,等.环介导恒温扩增芯片法在中医辅助诊断下呼吸道感染中的价值研究[J].标记免疫分析与临床,2022,29(11):1872-1876.
- [3] 任燕飞,张敏,杨涛,等.下呼吸道感染病原体检测方法及相关病原体研究[J].中国现代医生,2022,60(25):114-117.
- [4] 谭艳玲,刘艳影,陈建华.痰培养联合血清 PCT、CRP、ESR 水平检测诊断下呼吸道的价值[J].名医,2022(16):57-59.
- [5] 钱菲菲.痰涂片与痰培养在下呼吸道感染诊断中的对比[J].系统医学,2022,7(13):51-54.
- [6] 王媛.痰涂片与痰培养在下呼吸道感染诊断中的价值比较[J].世界复合医学,2021,7(04):109-111.
- [7] 宋春雁.痰真菌培养及涂片镜检在下呼吸道感染中的诊断价值分析[J].中国现代药物应用,2022,16(06):64-66.
- [8] 贾西中,蒋蕾,许东风.多层螺旋 CT 常规及高分辨扫描对矽肺合并下呼吸道感染的诊断价值[J].临床心身疾病杂志,2022,28(03):102-105.
- [9] 张莹莹.多重 PCR 技术在婴儿下呼吸道感染病原体检测中的应用[J].中文科技期刊数据库(全文版)医药卫生,2021(1):152-153.
- [10] 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(04):518-521.