



天津科技大学学报

Journal of Tianjin University of Science & Technology

ISSN 1672-6510, CN 12-1355/N

《天津科技大学学报》网络首发论文

题目: 3种下呼吸道病原菌 qPCR 同步检测法的建立与性能验证
作者: 谢群辉, 李姝丽, 王志贤, 赵青
DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20250148
收稿日期: 2025-09-29
网络首发日期: 2026-07-09
引用格式: 谢群辉, 李姝丽, 王志贤, 赵青. 3种下呼吸道病原菌 qPCR 同步检测法的建立与性能验证[J/OL]. 天津科技大学学报.
<https://doi.org/10.13364/j.issn.1672-6510.20250148>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。



3 种下呼吸道病原菌 qPCR 同步检测法的建立与性能验证

谢群辉¹, 李姝丽², 王志贤², 赵青¹

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2. 丹娜(天津)生物科技股份有限公司, 天津 300467)

摘要: 建立一种可在 80 min 内同步、精准检测下呼吸道感染 3 种常见病原体, 即肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的多重实时荧光定量 PCR (qPCR) 方法。针对肺炎克雷伯菌(*phoE* 基因)、铜绿假单胞菌(*gyrB* 基因)及金黄色葡萄球菌(*nuc* 基因)的高保守区, 设计并优化特异引物-探针组合, 构建高效扩增体系。对检测体系进行性能研究。结果表明, 体系对 3 个靶标的扩增效率均 $\geq 92\%$, 最低检测限均为 500 拷贝/mL, 与 8 种常见呼吸道病原菌无交叉反应, 重复性变异系数 (CV) $< 5\%$, 保存 12 个月性能稳定。该方法具有高灵敏度、高特异性和稳定性, 为临床快速诊断和精准防控提供了有力工具。

关键词: qPCR; 肺炎克雷伯菌; 金黄色葡萄球菌; 铜绿假单胞菌

中图分类号: R446.5 **文献标志码:** A

Establishment and Performance Evaluation of a Multiplex qPCR Assay for Simultaneous Detection of Three Lower Respiratory Tract Bacterial Pathogens

XIE Qunhui¹, LI Shuli², WANG Zhixian², ZHAO Qing¹

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China;

2. Dynamiker Biotechnology (Tianjin) Co., Ltd., Tianjin 300467, China)

Abstract: This study presents a multiplex quantitative PCR (qPCR) method for the rapid (80-minute) and simultaneous detection of *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus* in lower respiratory tract infections. The assay utilizes specifically designed primer-probe sets targeting the conserved *phoE*, *gyrB*, and *nuc* genes. Validation results showed that the assay is highly efficient (amplification efficiency $\geq 92\%$ for all targets), sensitive (limit of detection: 500 copies/mL for each pathogen), and specific (no cross-reactivity with eight other common respiratory pathogens). It also exhibited excellent repeatability (CV $< 5\%$) and long-term stability (12 months). This multiplex qPCR assay thus represents a potent diagnostic tool for the rapid and precise identification of these key bacterial pathogens, facilitating timely clinical intervention and control measures.

Key words: qPCR; *Klebsiella pneumoniae*; *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*

下呼吸道感染 (lower respiratory tract infections, LRTIs) 是全球范围内发病率和死亡率居高不下的主

要原因之一, 也是人类所面临的重要临床问题, 其中细菌性病原体是主要致病因素^[1]。肺炎克雷伯菌

(*Klebsiella pneumoniae*, *KP*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, *PA*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *SA*)作为3种常见的高危病原体,不但会引起社区获得性肺炎和医院获得性肺炎,还易发展为多重耐药感染,显著增加治疗难度与死亡风险^[2]。传统病原学检测依赖细菌培养和生化鉴定,耗时长(通常需24~72 h)且敏感性低^[3-4],难以满足临床快速诊断需求。尽管传统PCR技术已显著提升检测效率,但在混合感染普遍存在的背景下,单病原检测模式仍存在样本消耗大、操作繁琐等缺点^[5]。

近年来,多重实时荧光定量PCR(qPCR)技术通过整合多组特异性引物探针,实现了单管同时检测多种病原体,且兼具高灵敏度、高特异性和高通量等优势^[6-7]。本研究基于3种病原体的高度保守基因,

即*KP*的外膜孔蛋白编码基因*phoE*基因、*PA*的DNA旋转酶 β 亚基编码基因*gyrB*基因及*SA*的耐热核酸酶编码基因*nuc*基因,设计多重引物探针组合检测体系,通过优化反应体系与条件,建立了一种可同步检测上述3种病原体的高效多重qPCR方法^[8-11],实现了80 min内对上述3种目标病原体的同步检测,为混合感染的快速诊断提供新的方案,也为下呼吸道感染的早期精准诊断及流行病学监测提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

11种菌株均由丹娜(天津)生物科技股份有限公司保存和提供,具体信息见表1。

表1 菌株信息

Tab. 1 Strain information

菌株	拉丁学名	英文缩写	菌株库编号
金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	SA	ATCC 12600
肺炎克雷伯菌	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KP	ATCC 13883
铜绿假单胞菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA	ATCC 10145
溶血葡萄球菌	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	S.hae	ATCC 29970
表皮葡萄球菌	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S.epi	ATCC 14990
产酸克雷伯菌	<i>Klebsiella oxytoca</i>	KO	ATCC 13182
荧光假单胞菌	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	P.fluo	ATCC 13525
白色念珠菌	<i>Candida albicans</i>	CA	ATCC 10231
黄曲霉	<i>Aspergillus flavus</i>	A.flu	ATCC 16883
土曲霉	<i>Aspergillus terreus</i>	A.ter	ATCC 1012
烟曲霉	<i>Aspergillus fumigatus</i>	A.fum	ATCC 46645

1.1.2 仪器设备与试剂

SLAN-96S型全自动医用PCR分析系统,上海宏石医疗科技有限公司;DS-11型超微量紫外分光光度计,美国丹诺尔(Denovix)公司;BSC-1100-LIIB2型生物安全柜,北京东联哈尔仪器制造有限公司;HM100-Pro型加热振荡金属浴,大龙兴创实验仪器(北京)股份公司;DS17112型3微孔板离心机,天根生化科技(北京)有限公司;DYCP-31DN型电泳仪,北京六一生物科技有限公司;ZWY-211C型恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司;AR124CN型电子天平,奥豪斯仪器(上海)有限公司;TGL-16M型台式高速冷冻离心机,湘仪离心机仪器有限公司。

2×FastAmpliPremix-UNGIV(ProbeqPCR)(DG),珠海宝锐生物科技有限公司。SanPrep柱式质粒DNA小量抽提试剂盒(B518191-0050,50 PREPS),生工生物工程(上海)股份有限公司。琼脂糖(批次编号为5550225006,规格为100 g),北京索莱宝科技有限公司;使用1×TAE溶液配制成3%琼脂糖凝胶,在120V电压下,电泳30 min。磁珠法DNA提取试剂盒V2(批次编号为5E1501),苏州白垩纪生物科技有限公司;适用于从抗凝全血、血清、血浆、肺泡灌洗液、痰液、拭子洗脱液等样本中提取真菌DNA和细菌DNA,使用时按照说明书手动法进行操作。无酶无菌水,北京索莱宝科技有限公司。

所有相关引物、探针及质粒均由生工生物工程

(上海)股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 菌株的培养与核酸提取

金黄色葡萄球菌、溶血葡萄球菌、表皮葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌、铜绿假单胞菌和荧光假单胞菌为细菌, 使用前均于 LB 固体平板培养基上划线, 37 °C 培养 18~24 h 进行活化。随后挑取单菌落接种于 30 mL LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 14~18 h, 当菌液浑浊且均匀时, 用磁珠法 DNA 提取试剂盒 V2 进行核酸提取, 然后对提取的核酸使用分光光度计进行核酸浓度测定。

白色念珠菌、黄曲霉、土曲霉和烟曲霉为真菌, 在 PDA 培养基上划线培养。白色念珠 37 °C 培养 24~48 h, 然后挑取单菌落接种于 30 mL PDB 培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 24~48 h, 当培养基变浑浊且出现均匀的细小菌丝球悬浮于培养基中时, 用磁珠法 DNA 提取试剂盒 V2 进行核酸提取, 然后对提取的核酸使用分光光度计进行核酸浓度测定。黄曲霉、土曲霉和烟曲霉 30 °C 培养 24~48 h, 然后挑取单

菌落接种于 30 mL PDB 培养基中, 于 30 °C、200 r/min 振荡培养 24~48 h, 当培养基变浑浊且出现均匀的细小菌丝球悬浮于培养基中时, 用磁珠法 DNA 提取试剂盒 V2 进行核酸提取, 然后对提取的核酸进行核酸浓度测量。

1.2.2 引物和探针设计

根据肺炎克雷伯菌的 *phoE* 基因、铜绿假单胞菌的 *gyrB* 基因、金黄色葡萄球菌的 *nuc* 基因, 在 NCBI 数据库中, 分别以“*Klebsiella pneumoniae phoE gene*”、“*Pseudomonas aeruginosa gyrB gene*”、“*Staphylococcus aureus nuc gene*”为关键词数进行检索。为获得代表性, 各下载了不少于 50 条来自不同分离株的完整基因序列。利用 SnapGene 软件进行多序列比对, 选择所有序列中 100% 一致的保守区域用于引物和探针设计。

使用 BeaconDesigner7.9 引物设计软件在其保守区域设计引物及特异性 TaqMan 探针, 荧光定量 PCR 引物信息见表 2, 引物和探针均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 2 荧光定量 PCR 引物信息

Tab. 2 Primer information of fluorescence quantitative PCR

菌种	引物	引物序列(5'-3')	产物大小/bp	荧光标记
KP	KP-F	GAAGCGAAGAAACAGAACGG	120 bp	5'端标记 HEX 荧光报告基团 3'端标记 BHQ1 淬灭基团
	KP-R	CAGGTTCTGATCGTTGGTAC		
	KP-P	CGGCGTCGGCACCTCGTTAA		
PA	PA-F	GTACCTTCACCGAGATGATC	113 bp	5'端标记 ROX 荧光报告基团 3'端标记 BHQ2 淬灭基团
	PA-R	GCGTAACCTGAACAACACTACA		
	PA-P	AAGAAGTTCAAGATCGCCACCACC		
SA	SA-F	CAGACTATTATTAGTTGATACACCTGAA	124 bp	5'端标记 FAM 荧光报告基团 3'端标记 BHQ1 淬灭基团
	SA-R	CTCGACTTCAATTTTATTTGCATTTTC		
	SA-P	TGCACTTGCTTCAGGGCCATATTCTC		

对 KP、PA 和 SA 这 3 种病原菌提取的核酸目的片段长度进行验证。使用设计的检测体系对提取的单菌液核酸进行 qPCR 扩增, 然后使用电泳仪对扩增产物进行 120 V 30 min 电泳, 观察其条带位置, 如图 1 所示, 3 种病原菌电泳条带均位于 100~125 bp 之间, 与设计时的理论核酸目的片段长度一致。

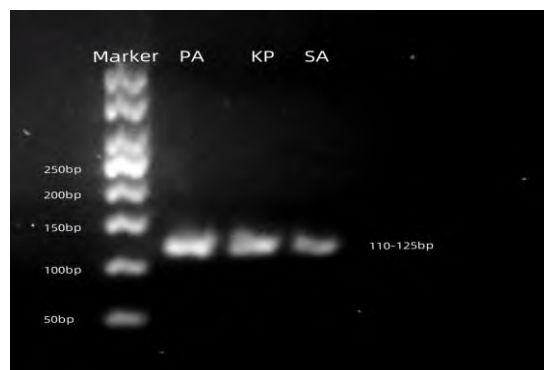


图 1 核酸电泳

Fig. 1 Nucleic acid electrophoresis

1.2.3 核酸模板的制备

质粒核酸：质粒由生工生物工程（上海）股份有限公司合成，以 pUC57 载体（2710 bp）为基础，插入 480 bp 目标序列，总长 3190 bp，具有氨苄青霉素抗性。提供的质粒干粉（4 μg）溶于 400 μL 无酶无菌水，配制为模板溶液。质粒分子量按双链 DNA 平均分子量 660 g/（mol bp）计算，为 2.11×10^6 g/mol。根据质粒总长度与 DNA 平均分子量，计算出该模板溶液为 2.86×10^9 拷贝/μL。

核酸稀释：对核酸进行 2.86 倍稀释，使其核酸浓度变为整数倍（ 1×10^9 拷贝/μL），方便后面实验计算分析；10 倍梯度稀释至 1×10^0 拷贝/μL，各梯度浓度作为质粒核酸模板，-20 °C 保存备用。

菌液核酸：各菌液核酸制备方法相同，以 SA 菌液核酸制备为例。使用磁珠法 DNA 提取试剂盒 V2 对活化的 SA 菌液进行核酸提取，然后使用超微量紫外分光光度计对提取的核酸进行检测，结果显示 SA 核酸浓度为 256.726 ng/μL，260/230 为 2.18，260/280 为 1.83，核酸纯度达标，然后把质量浓度（ng/μL）换算成拷贝数浓度（拷贝/μL）。

基因组拷贝数的换算：换算基于质量浓度与拷贝数的转换原理。3 种目标细菌的参考基因组大小及其专属换算系数如下：金黄色葡萄球菌（ 2.8×10^6 bp）为 3.26×10^5 ，肺炎克雷伯菌（ 5.5×10^6 bp）为 1.66×10^5 ，铜绿假单胞菌（ 6.3×10^6 bp）为 1.45×10^5 。据此，将测得的核酸质量浓度（ng/μL）乘以相应系数，即得到拷贝数浓度（拷贝/μL）。例如，SA 样本浓度为 256.7 ng/μL，经计算约为 8.37×10^7 拷贝/μL。

1.2.4 PCR 反应体系的优化

首先优化退火温度，设置退火温度为 55、57、60、63、65 °C 这 5 个温度梯度，以 1×10^5 拷贝/μL 质粒核酸为模板，每种病原菌的每个温度梯度均进行 2 组 qPCR 扩增实验。检测程序：95 °C 预变性 2 min；95 °C 变性 10 s，57 °C 退火和延伸 30 s，45 个循环；37 °C 冷却 10 s。除退火温度是变量外，其他扩增条件一致。根据实验结果中的荧光信号与 Ct 值，确定最佳退火温度。

确定退火温度之后，对体系中的引物探针用量进行优化。一般来说，正向引物和反向引物的用量一致，而探针会比引物用量少，这是为了避免背景荧光和减少成本。在 0.2~0.7 μL 之间设计了 12 组引物探针用量，其各组用量见表 3。使用 1×10^5 拷贝/μL 质粒核

酸为模板，每组用量进行 2 组 qPCR 扩增实验，根据实验结果中的荧光信号与 Ct 值，确定最佳用量。整个 qPCR 反应体系为 25 μL，其中包括 5 μL 核酸模板和 12.5 μL 酶，剩余 7.5 μL 为引物探针和无酶无菌水。反应体系不足 25 μL 时用无酶无菌水补足。

表 3 引物探针用量设计

Tab. 3 Primer and Probe Concentration Optimization

分组	引物探针用量（μL）		
	正向引物 F	反向引物 R	探针 P
第 1 组	0.7	0.7	0.7
第 2 组	0.7	0.7	0.5
第 3 组	0.7	0.7	0.3
第 4 组	0.6	0.6	0.6
第 5 组	0.6	0.6	0.4
第 6 组	0.6	0.6	0.2
第 7 组	0.5	0.5	0.5
第 8 组	0.5	0.5	0.3
第 9 组	0.4	0.4	0.4
第 10 组	0.4	0.4	0.3
第 11 组	0.4	0.4	0.2
第 12 组	0.3	0.3	0.3

1.2.5 扩增效率检测

分别以 3 种病原菌 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 拷贝/μL 单菌液核酸为模板，用 PCR 仪进行扩增，每个浓度重复 3 次，记录实验结果中不同模板浓度对应的 Ct 值。以模板浓度的常用对数(lg)值为横坐标，以模板浓度对应的 Ct 值纵坐标，进行线性拟合分析，根据回归线二元一次方程的斜率 k，利用扩增效率计算公式 $E=[10^{(-1/k)}-1] \times 100\%$ ，计算其扩增效率。

1.2.6 灵敏度检测与检出限的确定

将 KP、PA、SA 单菌液核酸进行 10 倍梯度稀释，先取 3 个浓度（10000、1000、100 拷贝/mL）作为模板，空白对照以无酶无菌水作为模板，各浓度模板用量均为 5 μL，采用建立的检测方法进行检测，每组 3 次重复，根据 Ct 值和扩增曲线选出以上 3 个浓度中的最低检测浓度（C）。然后再取 5 个浓度（4C、2C、C、1/2C、1/4C）作为模板，无酶无菌水作为空白对照模板进行 20 次重复实验，计算阳性检出率，其检出限(LOD)的阳性检出率不得低于 95%。

1.2.7 特异性检测

为验证检测体系的特异性，使用磁珠法 DNA 提取试剂盒 V2 分别提取表 1 中列出的 11 种菌株的基因组 DNA，然后对其核酸浓度进行测定，保证每种病

原菌的核酸浓度高于 1×10^3 拷贝/ μL (扩大交叉反应), 使其分别作为检测模板进行 qPCR 验证 (对活化培养的菌液进行核酸提取时, 所使用的菌液均为单菌液), 其中包括阳性对照和阴性对照。阳性对照为 3 种目标菌株 (*KP/PA/SA*) 的 DNA, 预期结果为阳性。阴性对照包括交叉反应对照和空白对照, 交叉反应对照为另外 8 种非目标呼吸道病原菌的 DNA, 用于检验引物-探针组合的特异性, 预期结果为阴性。空白对照使用无酶无菌水, 用于检测体系是否污染, 预期结果为阴性。将所有核酸模板分别置于建立的 qPCR 体系中进行扩增, 观察结果。

1.2.8 重复性检测

分别选取 *KP*、*PA* 和 *SA* 1 倍 LOD (500 拷贝/mL)、5 倍 LOD (2500 拷贝/mL) 和 20 倍 LOD (10000 拷贝/mL) 3 个单菌液浓度作为荧光定量 PCR 的阳性模板, 并设置空白对照 (无酶无菌水), 每个浓度进行 10 次重复实验, 对其实验结果进行计算分析, 要求各靶基因 Ct 值的变异系数 (CV) 均应不大于 5%。

1.2.9 稳定性检测

以 *KP*、*PA* 和 *SA* 1 倍 LOD (500 拷贝/mL)、5 倍 LOD (2500 拷贝/mL) 和 20 倍 LOD (10000 拷贝/mL) 3 个单菌液浓度作为荧光定量 PCR 的阳性

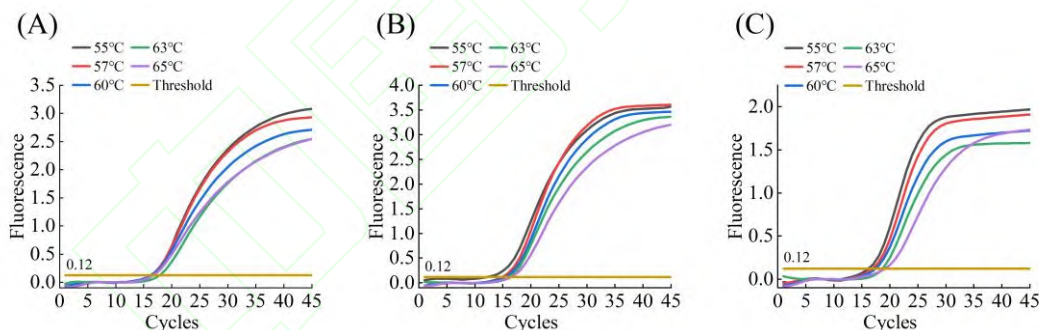
模板, 并设置空白对照 (无酶无菌水), 对配制好的体系分别在第 0、3、6、9、12 月进行 qPCR 实验, 分析其变异系数, 检测该方法的稳定性。

2 结果与分析

2.1 反应体系的优化

在退火温度的实验结果中 (图 2), 当退火温度为 57°C 时, 其 Ct 值相对较小, 荧光值相对较高。 55°C 和 57°C 两者的 qPCR 扩增曲线 Ct 值与荧光信号值相近, 当具有无显著性差异的 Ct 值时, 考虑到退火温度对特异性的影响, 选择 57°C 为体系的最适退火温度。最终检测程序: 95°C 预变性 2 min; 95°C 变性 10 s, 57°C 退火和延伸 30 s, 45 个循环; 37°C 冷却 10 s。

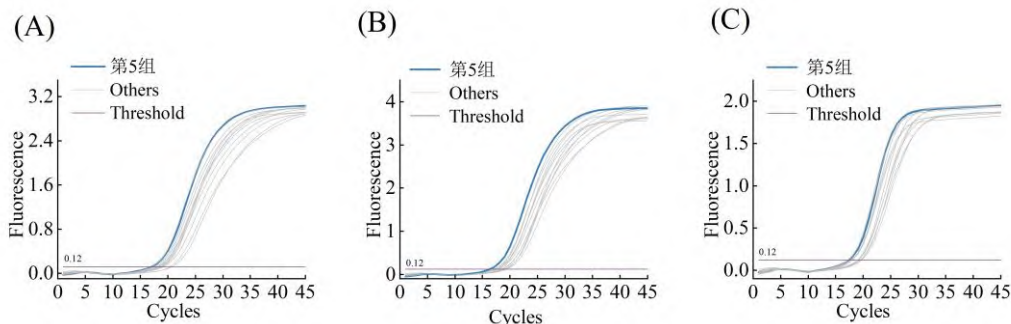
在 12 组引物探针用量结果中 (图 3), 以 Ct 值、荧光信号值为依据, 选出了 3 种病原菌各自的最佳用量 (第 5 组), *KP*、*PA* 和 *SA* 正向引物 F ($10 \mu\text{mol/L}$) 均为 $0.6 \mu\text{L}$, 反向引物 R ($10 \mu\text{mol/L}$) 均为 $0.6 \mu\text{L}$, 探针 P ($10 \mu\text{mol/L}$) 均为 $0.4 \mu\text{L}$ 。模板 $5 \mu\text{L}$, 无酶无菌水补足至 $25 \mu\text{L}$ 。



A、B、C 分别为 *KP*、*PA*、*SA* 不同退火温度下的扩增曲线

图 2 退火温度扩增曲线

Fig. 2 Amplification Curves of Annealing Temperatures



A、B、C 分别为 *KP*、*PA*、*SA* 不同引物探针用量下的扩增曲线

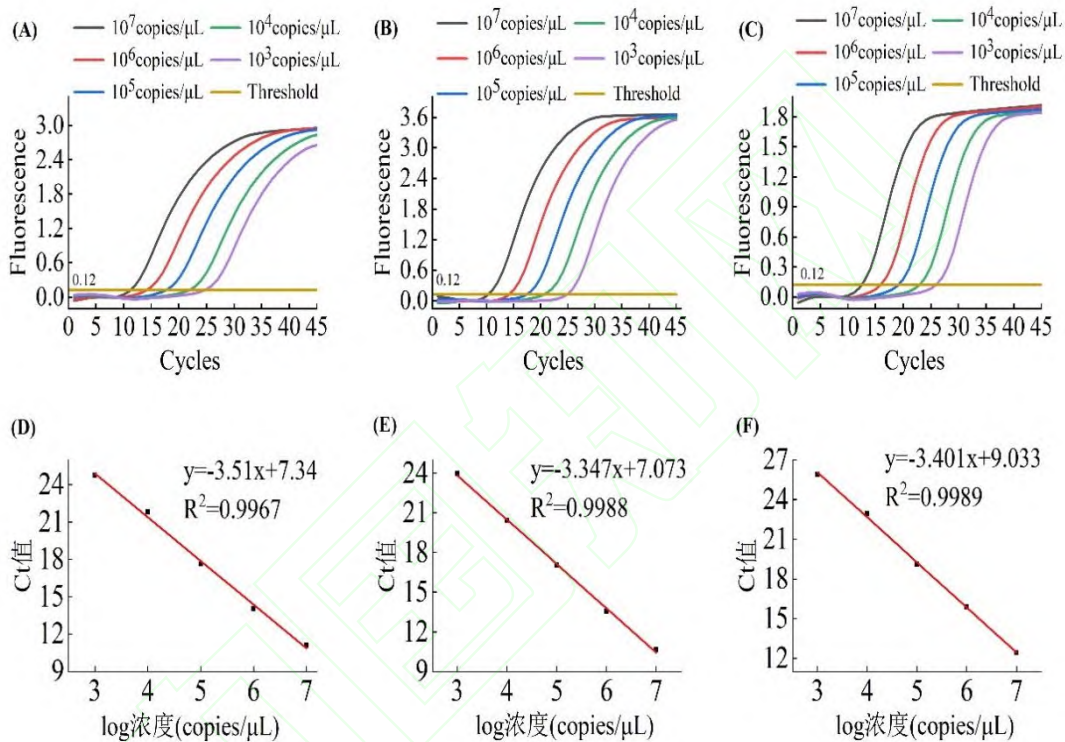
图 3 引物探针用量扩增曲线

Fig. 3 Amplification Curves of Primer and Probe Concentrations

2.2 扩增效率检测

实时荧光 PCR 扩增曲线与线性回归线如图 4 所示。在菌液核酸 10 倍浓度稀释下，5 个浓度的扩增曲线呈现出均匀的变化。对其每个浓度所对应的 Ct 值进行线性拟合，都呈现出了较好的线性关系。KP 的线性方程为 $y=-3.51x+7.34$ ，线性相关系数

$R^2=0.9967$ ，扩增效率为 92.7%。PA 的线性方程为 $y=-3.347x+7.073$ ，线性相关系数 $R^2=0.9988$ ，扩增效率为 98.9%。SA 的线性方程为 $y=-3.401x+9.033$ ，线性相关系数 $R^2=0.9989$ ，扩增效率为 96.8%，三者扩增效率均大于 90%，符合 MIQE 准则中扩增效率要求（90%~110%）。



A、B、C 分别为 KP、PA、SA 扩增曲线，D、E、F 分别为 KP、PA、SA 线性回归线

图 4 实时荧光 PCR 扩增曲线与线性回归线

Fig. 4 Real-time PCR amplification and linear regression line

2.3 灵敏度检测

将模板梯度稀释达到 100 拷贝/mL 时，在 45 个循环内未出现典型的 S 型扩增曲线或 Ct 值>40（或无 Ct 值），检测结果为阴性。为进一步确定其最低检测限，再设置 5 个梯度（4000、2000、1000、500、250 拷贝/mL）为阳性模板进行 20 组检测，计算其检出率，结果见表 4。当样本浓度为 250 拷贝/mL 时，KP 阳性检出率最高为 75%，PA 阳性检出率最高为 80%，SA 阳性检出率最高为 75%，不符合最低检测限所要求的检出率 95%以上，所以该检测方法的最低检测限为 500 拷贝/mL。

表 4 阳性检出率

Tab. 4 Positive detection rate

检出率		核酸浓度(拷贝/mL)				
		4000	2000	1000	500	250
菌株	KP	100%	100%	100%	100%	75%
		(20/20)	(20/20)	(20/20)	(20/20)	(15/20)
	PA	100%	100%	100%	100%	80%
		(20/20)	(20/20)	(20/20)	(20/20)	(16/20)
	SA	100%	100%	100%	100%	75%
		(20/20)	(20/20)	(20/20)	(20/20)	(15/20)

2.4 特异性检测

为全面评估建立的多重 qPCR 检测体系的特异性，分别对阳性对照（3 种目标菌 KP、PA 和 SA）、

交叉反应对照(除目标菌株外的 8 种非目标呼吸道病原菌)以及空白对照(无酶无菌水)进行检测,结果如图 5 所示。所有阳性对照样本均呈现出典型的 S 型扩增曲线,并成功检测到对应的特异性荧光信号,与预期结果完全一致。所有交叉反应对照样本在所有荧光通道中均未出现任何典型的 S 型扩增曲线,Ct 值为无或大于 40,检测结果为阴性。空白对照在所有荧光通道中同样未出现任何扩增信号。上述结果表明,本研究建立的多重 qPCR 检测体系能够准确识别并扩增 3 种目标病原体,同时与所选的一系列常见呼吸道共生菌及致病菌均无交叉反应,证明了该方法具有高度的特异性。

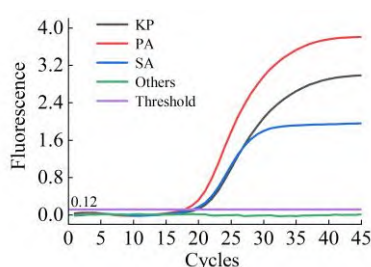


图 5 特异性扩增曲线

Fig.5 Amplification curves for specificity

2.5 重复性检测

以 *KP*、*PA* 和 *SA* 3 种目标病原菌 1 倍、5 倍和 20 倍 LOD 的菌液核酸作为模板,使用已建立检测方法对其进行重复实验,每种病原菌的每个浓度进行 10 次重复实验,结果见表 5。3 种病原菌不同模板浓度的变异系数(CV)均小于 5%,符合 FDA 对 IVD 试剂精密度的申报要求(CV≤5%)。

表 5 重复性数据分析

Tab. 5 Repeatability Data Analysis

病原	DNA 浓度/(拷贝/mL)	平均值	标准差	变异系数/%
<i>KP</i>	500	36.67	0.36	0.98
	2500	34.44	0.40	1.16
	10000	32.23	0.27	0.84
<i>PA</i>	500	35.42	0.32	0.90
	2500	33.25	0.26	0.78
	10000	31.24	0.35	1.12
<i>SA</i>	500	37.39	0.34	0.91
	2500	35.09	0.29	0.83
	10000	33.04	0.34	1.03

2.6 稳定性检测

以 3 种目标病原菌 1 倍、5 倍和 20 倍 LOD 的菌

液核酸作为模板,对该检测方法体系分别在第 0、3、6、9、12 月的稳定性实验进行数据分析,其中 *KP* 的 CV 值分别为 0.90%、1.03%和 0.59%,*PA* 的 CV 值分别为 0.96%、0.98%和 1.08%,*SA* 的 CV 值分别是 0.80%、0.63%和 0.72%,三者 CV 值均小于 5%,符合检测要求,表明该检测方法稳定可靠。

3 讨论

下呼吸道细菌感染的诊断时效性对临床决策至关重要。传统细菌培养法虽然为金标准,但是其耗时漫长(24~72 h),敏感性易受采样及转运影响,难以满足快速诊断需求。单通量 qPCR 虽然相较于培养法提升了效率,但是在混合感染普遍的情况下,其通量低、样本消耗大的问题凸显^[12]。

本方法的核心优势在于其 3 种病原体同步检测能力。这不仅显著缩短了报告时间(本文方法 80 min,培养法 24~72 h),大幅提高了检测通量,并减少了宝贵的临床样本消耗,为混合感染的快速识别与鉴别提供了有力工具。早期、准确的病原学信息对于指导临床合理使用抗生素、避免广谱抗生素滥用、遏制耐药菌发展以及降低患者死亡率具有直接意义^[13],同时也为流行病学监测提供了快速、标准化的技术支持。

虽然本研究建立的方法性能优越,但其临床试验仍需进一步验证。未来工作需在大规模的临床呼吸道样本(如痰液、支气管肺泡灌洗液)中进行验证评估。此外,当前检测体系聚焦于病原体鉴定。鉴于 *KP*、*SA* 和 *PA* 的耐药性问题严峻^[14],将关键耐药基因(如 *KP* 的 *blaKPC*、*SA* 的 *mecA*)整合到多重 qPCR 体系中,实现“病原体-耐药性”一体化检测,是提升其临床实用价值的必然方向。为实现更广泛的基层应用,可探索结合微流控芯片技术与自动化判读系统,开发“样本进-结果出”的即时检验(POCT)检测平台,进一步简化操作流程并缩短总检测时间^[15]。

尽管当前研究聚焦于方法学的建立与性能评估,未涉及实际临床样本的应用,但该方法展现出良好的应用潜力,未来有望在临床混合感染的快速筛查、抗生素合理使用及医院感染控制中发挥重要作用。后续将在真实临床样本中进一步验证其性能,并探索整合耐药基因检测与微流控技术,推动其向 POCT 平台发展。

参考文献:

- [1] Alonso B, Fernández-Barat L, Di Domenico E G, et al. Characterization of the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* strains causing ventilator-associated pneumonia [J]. BMC Infectious Diseases, 2020, 20(1): 909.
- [2] Alzeer A H, Somily A, Aldosari K M, et al. Microbial surveillance of Hajj tents: bioaerosol sampling coupled with real-time multiplex PCR [J]. American Journal of Infection Control, 2023, 51(2): 199-204.
- [3] Dung T T N, Phat V V, Vinh C, et al. Development and validation of multiplex real-time PCR for simultaneous detection of six bacterial pathogens causing lower respiratory tract infections and antimicrobial resistance genes [J]. BMC Infectious Diseases, 2024, 24(1): 164.
- [4] Hu Liuyang, Han Bing, Tong Qin, et al. Detection of eight respiratory bacterial pathogens based on multiplex real-time PCR with fluorescence melting curve analysis[J]. The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology, 2020, 2020: 2697230.
- [5] 陈舒影, 余方友. 呼吸道感染病原体检测技术与发展趋势[J]. 中国临床新医学, 2022, 15(10): 894-899.
- [6] Jamil M, Sidra S, Hussain A, et al. Optimization of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of key bovine respiratory infections[J]. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2025, 28(1): 73-81.
- [7] Jitmuang A, Puttinad S, Hemvimol S, et al. A multiplex pneumonia panel for diagnosis of hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia in the era of emerging antimicrobial resistance[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2022, 12: 977320.
- [8] Karolyi M, Pawelka E, Hind J, et al. Detection of bacteria via multiplex PCR in respiratory samples of critically ill COVID-19 patients with suspected HAP/VAP in the ICU [J]. Wiener Klinische Wochenschrift, 2022, 134(9/10): 385-390.
- [9] Károlyi S, Juhász E, Iván M, et al. Molecular microbiological testing of lower respiratory tract samples during COVID-19 pandemic[J]. Orvosi Hetilap, 2022, 163(33): 1295-1302.
- [10] Lim H J, Kang E R, Park M Y, et al. Development of a multiplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of four bacterial pathogens causing pneumonia[J]. PLoS One, 2021, 16(6): e0253402.
- [11] Lopinto J, Elabbadi A, Gibelin A, et al. Infectious aetiologies of severe acute chest syndrome in sickle-cell adult patients, combining conventional microbiological tests and respiratory multiplex PCR[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 4837.
- [12] Mackenzie G A, Mclellan J, Machuka E, et al. Aetiology of lobar pneumonia determined by multiplex molecular analyses of lung and pleural aspirate specimens in the Gambia: findings from population-based pneumonia surveillance [J]. BMJ Open, 2022, 12(3): e056706.
- [13] Nik Zuraina N M N, Mohamad S, Hasan H, et al. Diagnostic performance of an in-house multiplex PCR assay and the retrospective surveillance of bacterial respiratory pathogens at a teaching hospital, Kelantan, Malaysia[J]. Pathogens and Global Health, 2023, 117(1): 63-75.
- [14] Wang Huanyu, Hecht S, Kline D, et al. *Staphylococcus aureus* and methicillin resistance detection directly from pediatric samples using PCR assays with differential cycle threshold values for corroboration of methicillin resistance [J]. Journal of Microbiological Methods, 2019, 159:167-173.
- [15] Zhu Yajie, Ge Xiaoli, Xie Di, et al. Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* Secrete LasB elastase to induce hemorrhagic diffuse alveolar damage in mice [J]. Journal of Inflammation Research, 2021, 14: 3767-3780.