

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2025.05.013

多重实时荧光定量聚合酶链反应对儿童社区获得性肺炎病原学的诊断价值*

李 卫,柯买春,杨燕萍[△]

江西省九江市妇幼保健院检验科,江西九江 332000

摘要:目的 探讨多重实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)对儿童社区获得性肺炎(CAP)病原学的诊断价值。方法 选取2024年1—6月来该院就诊的120例CAP患儿作为研究对象,收集所有研究对象一般资料,并采集痰标本、血清标本、咽拭子标本、肺泡灌洗液标本,分别进行痰培养、免疫荧光、单重PCR、多重qPCR检测,比较不同检测方法病原学检测结果的差异。结果 痰培养检测CAP患儿细菌阳性率为17.50%(21/120);免疫荧光检测CAP患儿肺炎支原体阳性率为55.83%(67/120),肺炎衣原体阳性率为7.50%(9/120);单重PCR检测CAP患儿细菌阳性率为30.83%(37/120),肺炎支原体阳性率为64.17%(77/120),肺炎衣原体阳性率为10.83%(13/120);多重qPCR检测CAP患儿细菌阳性率为36.67%(44/120),肺炎支原体阳性率为65.83%(79/120),肺炎衣原体阳性率为10.83%(13/120)。多重qPCR检测CAP患儿细菌阳性率高于痰培养,差异有统计学意义($P<0.05$);多重qPCR检测与免疫荧光检测CAP患儿肺炎支原体和肺炎衣原体阳性率比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);多重qPCR检测与单重PCR检测CAP患儿细菌、肺炎支原体和肺炎衣原体阳性率比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。多重qPCR检测与痰培养、免疫荧光、单重PCR检测阳性率均一致性良好(Kappa值 >0.400 , $P<0.05$)。结论 多重qPCR对儿童CAP病原学诊断有积极意义,有较高的阳性率,有助于指导临床医生合理用药,且较单重PCR有更高的检测效率,有利于缩短临床诊疗流程。

关键词:儿童; 社区获得性肺炎; 病原学诊断; 多重实时荧光定量聚合酶链反应; 痰培养; 免疫荧光; 单重聚合酶链反应; 一致性分析

中图法分类号:R563.1;R446.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2025)05-0635-05

Diagnostic value of multiplex real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction for the etiology of community-acquired pneumonia in children*

LI Wei, KE Maichun, YANG Yanping[△]

Department of Clinical Laboratory, Jiujiang Maternal and Child Health Hospital, Jiujiang, Jiangxi 332000, China

Abstract: Objective To investigate the diagnostic value of multiplex real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) for the etiology of community-acquired pneumonia (CAP) in children. **Methods** A total of 120 children with CAP who visited the hospital from January to June 2024 were selected as the research objects. The general data of all the research objects were collected, and sputum specimens, serological specimens, throat swab specimens, and bronchoalveolar lavage fluid samples were collected. Sputum culture, immunofluorescence, single PCR and multiple qPCR detection were performed respectively. **Results** The positive rate of sputum culture in children with CAP was 17.50% (21/120). The positive rate of Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia pneumoniae in children with CAP was 55.83% (67/120) and 7.50% (9/120) respectively. The positive rate of bacteria detected by single PCR in children with CAP was 30.83% (37/120), the positive rate of Mycoplasma pneumoniae was 64.17% (77/120), and the positive rate of Chlamydia pneumoniae was 10.83% (13/120). The positive rate of bacteria detected by multiplex qPCR was 36.67% (44/120), the positive rate of Mycoplasma pneumoniae was 65.83% (79/120), and the positive rate of Chlamydia pneumoniae was 10.83% (13/120). The positive rate of bacteria detected by multiplex qPCR in children with CAP was higher than that by sputum culture, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). There was no significant difference in the positive rate of Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia pneumoniae between multiple qPCR and immunofluorescence detection in children with CAP ($P>0.05$). There was no significant

* 基金项目:江西省九江市科技计划项目(S2023ZDYFN493)。

作者简介:李卫,女,副主任技师,主要从事医学检验方面的研究。△ 通信作者,E-mail:yanpingyang83@163.com。

difference in the positive rate of bacteria, *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* between the multiplex qPCR and the single PCR in children with CAP ($P > 0.05$). The positive rate of multiplex qPCR was consistent with that of sputum culture, immunofluorescence and single PCR ($Kappa > 0.400, P < 0.05$).

Conclusion Multiplex qPCR has a positive significance in the etiological diagnosis of CAP in children, with a high positive rate, which is helpful to guide clinicians to use drugs rationally. Moreover, it has a higher detection efficiency than single PCR, which is conducive to shortening the clinical diagnosis and treatment process.

Key words: children; community-acquired pneumonia; etiological diagnosis; multiplex real-time quantitative polymerase chain reaction; sputum culture; immunofluorescence; single plex polymerase chain reaction; consistency analysis

社区获得性肺炎(CAP)是临床常见的呼吸系统疾病,是全球范围内 5 岁以下儿童死亡的重要原因^[1-2]。CAP 以药物治疗为主,重点是合理使用抗菌药物或抗病毒药物控制肺炎病原体增殖,因此诊疗早期明确致病病原体种类十分关键^[3]。既往经验性用药易造成抗菌药物滥用,不利于 CAP 患儿尽快康复,且长远来看有提升耐药菌出现的风险,尽早开展病原学检测具有重要价值^[4]。常规病原学检测为痰培养和血清抗体检测,前者可根据痰液中分离的优势细菌判断 CAP 的致病菌,后者可通过检测试剂观察血清中肺炎支原体或肺炎衣原体抗体水平,从而判断是否存在肺炎支原体或肺炎衣原体感染,二者均存在检测效率低的缺点,有一定局限性^[5]。随着医学诊断技术进步,基于遗传物质的分子诊断方法广泛应用于临床,其中以聚合酶链反应(PCR)较为常见,可通过检测生物遗传物质水平来判断是否存在感染^[6]。但常规单重 PCR 使用对应引物逐一检测效率较低,难以满足临床患儿就诊需求,因此还存在优化空间。多重实时荧光定量 PCR(qPCR)是新型检测技术,其通过优化反应体系和反应条件提高扩增的片段数量,从而实现多种物质同时检测,大大提高了临床病原学诊断效率^[7]。本研究选取本院收治的 120 例 CAP 患儿作为研究对象,分析多重 qPCR 的病原学诊断价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2024 年 1—6 月来本院就诊的 120 例 CAP 患儿作为研究对象,其中男 69 例,女 51 例;年龄 2~11 岁,平均(5.12±1.26)岁;病程 2~7 d,平均(4.12±0.54)d。纳入标准:(1)年龄<12 岁;(2)符合《儿童社区获得性肺炎诊疗规范(2019 年版)》^[8]中的诊断标准;(3)符合纤维支气管镜肺泡灌洗术适应证。排除标准:(1)医院获得性感染;(2)合并其他急、慢性呼吸系统疾病;(3)合并免疫系统疾病;(4)近 1 个月内使用过免疫抑制剂。所有患儿家属均知情同意并签署知情同意书。本研究经本院医学伦理委员会审核批准(LLSC-2023-110)。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 患儿入院 24 h 内采集痰标本、血

清标本、咽拭子标本、肺泡灌洗液标本。痰标本采集:采集前患儿使用清水漱口,刺激患儿咽反射区使之深咳,使用负压吸引气道分泌物,采用一次性无菌吸痰器收集痰标本,标本采集后 2 h 内送检;血清标本采集:使用一次性真空采血管采集患儿外周静脉血 4 mL,以 3 500 r/min 离心 10 min,离心半径 8 cm,分离上层血清作为待检血清标本;咽拭子标本采集:患儿仰头张嘴暴露两侧咽扁桃体,研究者使用无菌拭子快速擦拭患儿两侧腭弓和咽、扁桃体的分泌物,取出拭子头浸入含有 2~3 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)的病毒采样管中,尾部弃去,旋紧管盖待检;肺泡灌洗液标本采集:灌洗前使用 2%利卡多因咽喉局部麻醉,局部麻醉后将纤维支气管镜顶端导入病灶所在支气管以下肺段或亚肺段水平,少量多次注入 37 °C 灭菌生理盐水,总量不超过 300 mL,灌注后立即负压吸引回收灌洗液,肺泡灌洗液标本容量不少于 3 mL,标本采集后 2 h 内送检。

1.2.2 痰培养 对合格痰标本(鳞状上皮细胞<10 个/低倍视野,白细胞>25 个/低倍视野或二者之比为 1:25)在采集后 2 h 内接种至琼脂培养基上,在 5% CO₂ 环境下培养 24 h 后寻找可疑病原菌,以浓度≥10⁴ CFU/mL 判定为致病菌阳性^[9]。

1.2.3 免疫荧光 取待检血清标本,加样在包被肺炎支原体、肺炎衣原体抗原的载玻片上,室温孵育 30 min 后用 PBS 冲洗 5 min,加入异硫氰酸荧光素标记的羊抗人 IgM 抗体,室温孵育 30 min 后用 PBS 冲洗 5 min,使用 60%甘油封片,在荧光显微镜下观察。

1.2.4 单重 PCR 取待测咽拭子标本 500.0 μL,以 10 000 r/min 离心 1 min,弃上清液,使用核酸抽提液提取 DNA 离心,取上清液反应模板。取 36.0 μL 核酸荧光 PCR 检测混合液+0.4 μL 酶(Taq+UNG)+4.0 μL 反应模板进行扩增。扩增参数:95 °C 预变性 2 min,94 °C 变性 10 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 20 s,共 40 个循环。根据 Ct 水平判断结果,Ct≤35 报告为阳性。

1.2.5 多重 qPCR 从待检肺泡灌洗液标本中提取核酸,方法同 1.2.4,肺炎链球菌正向引物:5'-CG-GACTACCGCCTTTATATCG-3',反向引物:3'-

GTTTCAATCGTCAAGCCGTT-5'; 肺炎衣原体正向引物: 5'-ACACGATGCAGAGTGCTTCA-3', 反向引物: 3'-TGTTTACAGAGAATTGCGATACG-5'; 肺炎支原体正向引物: 5'-ACTCGGAGGACAATG-GTCAG-3', 反向引物: 3'-CAAACCCGGTCTTTTCGTTA-5'; 流感嗜血杆菌正向引物: 5'-TC-CTAAGAAGAGCTCAGAGAT-3', 反向引物: 3'-TGATCCA ACCCCAGCTTCC-5'。扩增参数: 94 °C 变性 10 min, 然后 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 40 个循环; 最后一个循环, 72 °C 延伸 7 min。扩增产物用琼脂糖凝胶电泳分析。扩增产物条带电泳位置与 Marker 电泳位置相同者判定为阳性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS24.0 统计软件进行数据分析处理。计数资料以例数或百分率表示, 组间比较采用 χ^2 检验。病原学诊断效能一致性分析采用 Kappa 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 痰培养检测结果 检出细菌 21 例 (17.50%, 21/120), 检出的细菌包括肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌和肺炎克雷伯菌。

2.2 免疫荧光检测结果 检出阳性标本 76 例, 包括肺炎支原体 67 例 (55.83%, 67/120), 肺炎衣原体 9 例 (7.50%, 9/120)。

2.3 单重 PCR 检测结果 检出病原体包括肺炎支原体、肺炎衣原体、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌及军团菌。细菌阳性 37 例 (30.83%, 37/120), 肺炎支原体阳性 77 例 (64.17%, 77/120), 肺炎衣原体阳性 13 例 (10.83%, 13/120), 2 种及以上病原体混合感染 47 例 (39.17%, 47/120)。

2.4 多重 qPCR 检测结果 检出病原体包括肺炎支原体、肺炎衣原体、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌及军团菌。细菌阳性 44 例 (36.67%, 44/120), 肺炎支原体阳性 79 例 (65.83%, 79/120), 肺炎衣原体阳性 13 例 (10.83%, 13/120), 2 种及以上病原体混合感染 56 例 (46.67%, 56/120)。

2.5 多重 qPCR 与痰培养检测 CAP 患儿细菌阳性率比较及一致性分析 多重 qPCR 检测 CAP 患儿细菌阳性率高于痰培养, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 11.161, P=0.01$)。见表 1。多重 qPCR 与痰培养检测 CAP 患儿细菌阳性率一致性分析结果显示 Kappa 值 = 0.537, 说明二者一致性良好 ($P<0.05$)。见表 2。

2.6 多重 qPCR 与免疫荧光检测 CAP 患儿肺炎支原体和肺炎衣原体阳性率比较及一致性分析 多重

qPCR 与免疫荧光检测 CAP 患儿肺炎支原体和肺炎衣原体阳性率比较, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 3。多重 qPCR 与免疫荧光检测 CAP 患儿肺炎支原体和肺炎衣原体阳性率一致性分析结果显示 Kappa 值 = 0.758、0.601, 说明二者一致性良好 ($P<0.05$)。见表 4、5。

表 1 多重 qPCR 与痰培养检测 CAP 患儿细菌阳性率比较 [n(%)]

方法	n	阳性	阴性
多重 qPCR	120	44(36.67)	76(63.33)
痰培养	120	21(17.50)	99(82.50)

表 2 多重 qPCR 与痰培养检测 CAP 患儿细菌结果 (n)

痰培养	多重 qPCR		合计
	阳性	阴性	
阳性	21	0	21
阴性	23	76	99
合计	44	76	120

表 3 多重 qPCR 与免疫荧光检测 CAP 患儿肺炎支原体和肺炎衣原体阳性率比较 [n(%)]

方法	n	肺炎支原体		肺炎衣原体	
		阳性	阴性	阳性	阴性
多重 qPCR	120	79(65.83)	41(34.17)	13(10.83)	107(89.17)
免疫荧光	120	67(55.83)	53(44.17)	9(7.50)	111(92.50)
χ^2		2.518		0.801	
P		0.113		0.371	

表 4 多重 qPCR 与免疫荧光检测 CAP 患儿肺炎支原体结果 (n)

免疫荧光	多重 qPCR		合计
	阳性	阴性	
阳性	66	1	67
阴性	13	40	53
合计	79	41	120

表 5 多重 qPCR 与免疫荧光检测 CAP 患儿肺炎衣原体结果 (n)

免疫荧光	多重 qPCR		合计
	阳性	阴性	
阳性	7	2	9
阴性	6	105	111
合计	13	107	120

2.7 多重 qPCR 与单重 PCR 检测 CAP 患儿细菌、肺炎支原体和肺炎衣原体阳性率比较及一致性分

析 多重 qPCR 与单重 PCR 检测 CAP 患儿细菌、肺炎支原体和肺炎衣原体阳性率比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 6。多重 qPCR 与单重 PCR 检

测 CAP 患儿细菌、肺炎支原体和肺炎衣原体阳性率一致性分析结果显示 Kappa 值=0.870、0.963、1.000,说明二者一致性良好($P<0.05$)。见表 7、8、9。

表 6 多重 qPCR 与单重 PCR 检测 CAP 患儿细菌、肺炎支原体和肺炎衣原体阳性率比较[n(%)]

方法	n	细菌		肺炎支原体		肺炎衣原体	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
多重 qPCR	120	44(36.67)	76(63.33)	79(65.83)	41(34.17)	13(10.83)	107(89.17)
单重 PCR	120	37(30.83)	83(69.17)	77(64.17)	43(35.83)	13(10.83)	107(89.17)
χ^2		0.913		0.073		<0.001	
P		0.339		0.787		>0.999	

表 7 多重 qPCR 与单重 PCR 检测 CAP 患儿细菌结果(n)

单重 PCR	多重 qPCR		合计
	阳性	阴性	
阳性	37	0	37
阴性	7	76	83
合计	44	76	120

表 8 多重 qPCR 与单重 PCR 检测 CAP 患儿肺炎支原体结果(n)

单重 PCR	多重 qPCR		合计
	阳性	阴性	
阳性	77	0	77
阴性	2	41	43
合计	79	41	120

表 9 多重 qPCR 与单重 PCR 检测 CAP 患儿肺炎衣原体结果(n)

单重 PCR	多重 qPCR		合计
	阳性	阴性	
阳性	13	0	13
阴性	0	107	107
合计	13	107	120

3 讨 论

随着多种耐药菌被发现,临床合理用药再次回到临床工作者视野中,儿童作为用药安全高风险群体,其合理用药应受到重点关注^[10]。CAP 是儿童常见疾病,但临床诊疗过程中存在大量未明确致病病原体就开始用药的情况,违背合理用药原则,可造成患儿病程延长及医疗资源浪费,明显增加患儿的家庭医疗负担^[11-13]。病原学检测是指导临床 CAP 患儿合理用药的必要措施,常见方法可分为细菌培养、抗体检测及分子诊断 3 大类,对应检测技术有痰培养、免疫荧光、

单重 PCR、多重 qPCR^[14]。

痰培养技术是将 CAP 患儿痰液接种至合适培养基中培养 18~24 h,通过分离优势菌群判断致病病原体的方法,此方法检测成本相对较低,但存在检测时间较长的局限性,此外菌群生长受到多种因素影响,因此难以保证每次所得培养结果的有效性统一。本研究结果显示,痰培养检测 CAP 患儿细菌阳性率仅为 17.50%。除检测环境因素及检测人员操作因素外,不容忽视的原因是许多 CAP 患儿在入院前可能服用过抗菌药物,可以造成部分致病菌死亡,使培养结果存在误差^[15-16]。

免疫荧光技术是使用荧光抗原标志物示踪检查对应抗体的技术,常用于血液标本检测,在 CAP 患儿中常用于肺炎支原体、肺炎衣原体此类非典型病原体的检测^[17],此方法较痰培养技术有环境影响小的优势,规范化的检测操作可保证检测结果的有效性。但临床实践中需要考虑患儿年龄小的特点,采血依从性低使血清免疫荧光的病原学诊断受限^[18]。本研究结果显示,免疫荧光检测 CAP 患儿肺炎支原体阳性率为 55.83%,肺炎衣原体阳性率为 7.50%。

目前临床使用的分子诊断技术以单重 PCR 和多重 qPCR 为主,二者核心原理相同,但多重 qPCR 在单重 PCR 的基础上优化可做到同时检测多种物质,对于 CAP 高发季节更能满足临床诊疗需求,可明显提高病原学诊断效率^[19]。本研究结果显示,单重 PCR 检测 CAP 患儿细菌阳性率为 30.83%,肺炎支原体阳性为 64.17%,肺炎衣原体阳性为 10.83%;多重 qPCR 检测 CAP 患儿细菌阳性率为 36.67%,肺炎支原体阳性为 65.83%,肺炎衣原体阳性为 10.83%。本研究结果显示,单重 PCR 和多重 qPCR 存在较高的诊断一致性,且二者检测细菌、肺炎支原体、肺炎衣原体阳性率均无明显差异,但仍值得注意单重 PCR 较多重 qPCR 存在细菌及肺炎支原体少数漏诊。分析原因:单重 PCR 逐个检测存在时间间隔,可能造成遗传物质丢失,难以满足检测标本要求,造成少数漏诊。

此外,本研究结果还显示,多重 qPCR 与痰培养及免疫荧光检测结果均存在一致性,其中多重 qPCR 在检测 CAP 患儿细菌阳性率方面较痰培养优势明显,与单重 PCR 无明显差异,由此可见多重 qPCR 用于 CAP 患儿病原学诊断具有便捷、准确的优势,能满足临床指导合理用药的要求,有重要应用价值^[20]。

综上所述,多重 qPCR 在儿童 CAP 病原学诊断中与痰培养、免疫荧光、单重 PCR 检测结果均存在一致性,不仅有较高的细菌及非典型病原体阳性率,而且还有助于提高临床检测效率,对指导临床医生合理用药有积极作用。

参考文献

[1] LIU L, JOHNSON H L, COUSENS S, et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000 [J]. *Lancet*, 2012, 379(9832): 2151-2161.

[2] 刘璐, 殷勇. 人工智能在儿童社区获得性肺炎诊断中的应用及研究进展[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2022, 37(4): 318-320.

[3] 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.

[4] KORPPI M, HEIKKILÄ P, PALMU S, et al. Antibiotic prescriptions for children with lower respiratory tract infections fell from 2014 to 2020, but misuse was still an issue[J]. *Acta Paediatr*, 2022, 111(6): 1230-1237.

[5] 焦明远, 聂庆东, 伊洁. 儿童社区获得性肺炎的病原体研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2013, 23(14): 3550-3551.

[6] 李少丽, 赵汉青, 孙红妹, 等. 培养法、PCR 法和血清学法在检测儿童肺炎支原体感染中的应用比较[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2017, 37(1): 73-77.

[7] 徐健, 周广, 邹立新, 等. 多重 qPCR 在快速检测临床常见病原菌中的应用[J]. *海南医学*, 2023, 34(20): 2966-2970.

[8] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 儿童社区获得性肺炎诊疗规范(2019 年版)[J]. *中国实用乡村医生杂志*, 2019, 26(4): 6-13.

[9] 中华预防医学会医院感染控制分会. 临床微生物标本采集和送检指南[J]. *中华医院感染学杂志*, 2018, 28(20): 3192-3200.

[10] 陈哲, 王其琼, 曾力楠, 等. 基于疾病或药物的儿童合理用

药评价指标的构建方法[J]. *中国循证医学杂志*, 2023, 23(6): 691-694.

[11] 陆芸芸, 罗蓉, 符州. 儿童重症社区获得性肺炎病原体分布及细菌耐药情况分析[J]. *中国当代儿科杂志*, 2017, 19(9): 983-988.

[12] 李燕菊, 冯英, 周晶晶, 等. 新疆某医院老年社区获得性肺炎住院患者抗菌药物使用情况调查[J]. *河北医药*, 2022, 44(22): 3496-3499.

[13] NGUYEN P T K, ROBINSON P D, FITZGERALD D A, et al. The dilemma of improving rational antibiotic use in pediatric community-acquired pneumonia[J]. *Front Pediatr*, 2023, 11: 1095166.

[14] YUN K W. Community-acquired pneumonia in children: updated perspectives on its etiology, diagnosis, and treatment[J]. *Clin Exp Pediatr*, 2024, 67(2): 80-89.

[15] 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.

[16] OGAWA M, HOSHINA T, ABUSHAWISH A, et al. Evaluation of the usefulness of culture of induced sputum and the optimal timing for the collection of a good-quality sputum sample to identify causative pathogen of community-acquired pneumonia in young children: a prospective observational study [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2023, 56(5): 1036-1044.

[17] 陈刚, 韦欢, 何永玲, 等. 儿童非典型肺炎病原体免疫球蛋白检测及病原学分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2015, 25(5): 1172-1174.

[18] 林琳, 应媛媛. 肺炎支原体抗体滴度和 RNA 病原检测在儿童肺炎支原体肺炎诊断和治疗中的应用价值[J]. *中国现代医药杂志*, 2021, 23(10): 37-40.

[19] 季亚勇, 沙丹, 马广源, 等. 多重 PCR 和单重 PCR 在流感病毒快速检测中的比较与应用[J]. *现代预防医学*, 2010, 37(4): 758-760.

[20] THURMAN K A, WARNER A K, COWART K C, et al. Detection of mycoplasma pneumoniae, chlamydia pneumoniae, and legionella spp. in clinical specimens using a single-tube multiplex real-time PCR assay[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2011, 70(1): 1-9.

(收稿日期: 2024-07-02 修回日期: 2024-11-26)

(上接第 634 页)

[20] HIRA K, BEGUM A S. Methods for evaluation of TNF- α inhibition effect[J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2248(1): 271-279.

[21] SOUZA R F, CAETANO M A F, MAGALHAES H I R, et al. Study of tumor necrosis factor receptor in the inflammatory bowel disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2023, 29(18): 2733-2746.

[22] JANG D I, LEE A H, SHIN H Y, et al. The role of tumor

necrosis factor alpha (TNF- α) in autoimmune disease and current TNF- α inhibitors in therapeutics[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5): 2719.

[23] WUI S R, KIM K S, RYU J I, et al. Efficient induction of cell-mediated immunity to varicella-zoster virus glycoprotein E co-lyophilized with a cationic liposome-based adjuvant in mice[J]. *Vaccine*, 2019, 37(15): 2131-2141.

(收稿日期: 2024-05-23 修回日期: 2024-11-10)