

## 鲁炳怀 | 解密流感（10）

少见、罕见、新发病原体很难快速明确诊断，当呼吸道病原类型复杂难分，哪些快速检测技术助力下一步临床治疗？



今天主要介绍呼吸道病毒快速检测技术的现状与发展方向。目前很难定义「快速检测」，是指「两个小时」以内拿到结果，还是需要「一天」的时间拿到结果？

因为对于一些少见病原体、罕见病原体或者新发病原体来说，很难达到几个小时就能明确诊断，需要更复杂的技术、更长的时间才能确认。

下面讲述的「快速检测」，指的是与传统的方法相比，得出结果更快的技术。

### 疾病特点

- 急性呼吸道感染（ARTI）最常见病，发病率居急性传染病的首位；
- 儿童每年6-9次上呼吸道感染，而约1/3儿童在1岁前至少1次下呼吸道感染；青少年和成人每年经历2-4次上呼吸道感染；我国CAP住院患者中65岁以上老人占28.7%，26-45岁青壮年占9.2%（2013年数据）；
- 肺炎是全球传染性疾病最主要死因之一，我国肺炎死亡率为184/10万-1223/10万人口（2011年中国CDC数据）。

### 诊疗需求

- 多种病原体引起：**病毒、细菌、支原体、衣原体**等；
- 由不同病原体感染引起，但**具有相似的临床症状**；
- 不同病原体的临床处理方案不同，需要**更早、更快、更准确**的诊断致病原，及早确定**治疗方案并合理用药**。

呼吸道与外界相通，环境中的病毒、细菌、真菌、寄生虫等可通过吸入方法，引起呼吸道感染，主要上下呼吸道感染。近几年对病毒的关注比较多，尤其是2019年底延续到现在的新冠（COVID-19）疫情以来，大家对病毒引起呼吸道感染性疾病或者其他部位的传染性疾病尤为关注，例如引起呼吸道感染的流感病毒、腺病毒，曾引起院内感染的消化道病毒诺如病毒。此外，人体定植的病毒，如某些冠状病毒、鼻病毒、巨细胞病毒等，也可能引起呼吸道感染。正是因为呼吸道病原的类型比较复杂，引起的临床症状，与一些细菌感染、真菌感染临床上难以区分。这就需要一些采用实验室技术手段检测病原，明确病原类型，才能明确诊断，决定下一步的临床治疗。

## 中国成人社区获得性肺炎诊断和治疗指南（2016年版）

2016年版CAP指南提到，我国成人CAP患者中病毒检出率为15%-34.9%，流感病毒占首位，其它病毒包括副流感病毒、鼻病毒、腺病毒、人偏肺病毒及呼吸道合胞病毒等。病毒检测阳性患者中5.7%-65.7%可合并细菌或非典型性病原体感染。对于儿童而言，病毒中的呼吸道合胞病毒占比较大，非典型病原体中的肺炎支原体为主，所以作为儿科医院的检验科或者微生物检验室，针对这些特殊的病毒或者非典型病原体的检测也非常关键。

另外，想提醒大家一点，随着检测技术的提高，我们现在发现对于引起呼吸道感染的衣原体而言，肺炎衣原体感染的几率并不是很多，而**鹦鹉热衣原体感染的比例有增高趋势**，常常与鸟类的饲养史有关。对于衣原体而言，不应只单纯检测肺炎衣原体，新生儿，沙眼衣原体是非常重要的病原；对于经常接触禽类鸟类的呼吸道感染的患者，鹦鹉热衣原体成为很重要的病原。建议生产厂家要根据不同的流行病学谱和感染的主要病原类型来设计试剂，特别是多重检测试剂，临床实验室也应以此为依据选用相关的试剂。

## 临床微生物病原检测方法学对比

临床微生物病原检测方法学对比			
	诊断试验	优点	缺点
1	PCR Direct PCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>简单，快速</li> <li>价格适中</li> <li>可做定量（quantitative PCR）</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>需推测病原类型选用不同试剂</li> <li>引物未必总是有效（如区域突变）</li> <li>仅扩增基因组的一小部分</li> </ul>
2	多重PCR Multiplex PCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>快速</li> <li>同步检测多种微生物</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>定量困难，存在假阳性，特异性差</li> <li>常需&gt;1扩增步骤</li> <li>仅扩增基因组的一小部分</li> <li>引物未必总是有效（如区域突变）</li> </ul>
3	多重PCR靶向扩增通用片段（如：16S，ITS）后 Sanger 测序	<ul style="list-style-type: none"> <li>鉴别同类微生物（如细菌或真菌）多个种</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>仅扩增基因组的一小部分</li> <li>引物未必总是有效</li> </ul>
4	多重PCR靶向扩增通用片段（如：16S，ITS）后 NGS	<ul style="list-style-type: none"> <li>鉴别同类微生物（如细菌或真菌）多个种</li> <li>多重病原检测</li> <li>可定量</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>仅扩增基因组的一小部分，引物未必总是有效</li> <li>价格昂贵，耗时较长</li> <li>常需&gt;1扩增步骤</li> </ul>
5	靶向NGS	<ul style="list-style-type: none"> <li>目标类别微生物检测较敏感</li> <li>可定量</li> <li>可与16S NGS结合</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>建库复杂，需&gt;1扩增步骤</li> <li>仅扩增基因组的一小部分</li> <li>价格昂贵，耗时较长</li> <li>易受环境微生物污染</li> </ul>
6	mNGS Metagenomic NGS	<ul style="list-style-type: none"> <li>无需预判病原，无主观偏倚</li> <li>可检出新发或未预见病原</li> <li>可定量</li> <li>检测全基因组</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>同时检测人基因组</li> <li>昂贵，耗时</li> <li>全基因组片段有漏检（Gap）</li> <li>易受环境微生物污染</li> </ul>
7	血清学	<ul style="list-style-type: none"> <li>快速，用于急性感染诊断</li> <li>价格适中</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>早期感染可阴性</li> <li>受免疫状况影响，可假阴性</li> <li>可假阳性</li> </ul>
8	显微镜检	<ul style="list-style-type: none"> <li>快速</li> <li>价格适中</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>灵敏度低</li> <li>特异性差</li> </ul>
9	培养	<ul style="list-style-type: none"> <li>可检测大量样本</li> <li>价格适中</li> <li>成熟</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>因患者使用抗生素致灵敏度下降</li> <li>苛养菌检出灵敏度低</li> <li>不适用于病毒检测</li> <li>耗时长，特别是分枝杆菌或真菌培养</li> </ul>
10	抗原	<ul style="list-style-type: none"> <li>特异性好</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>灵敏度差</li> </ul>

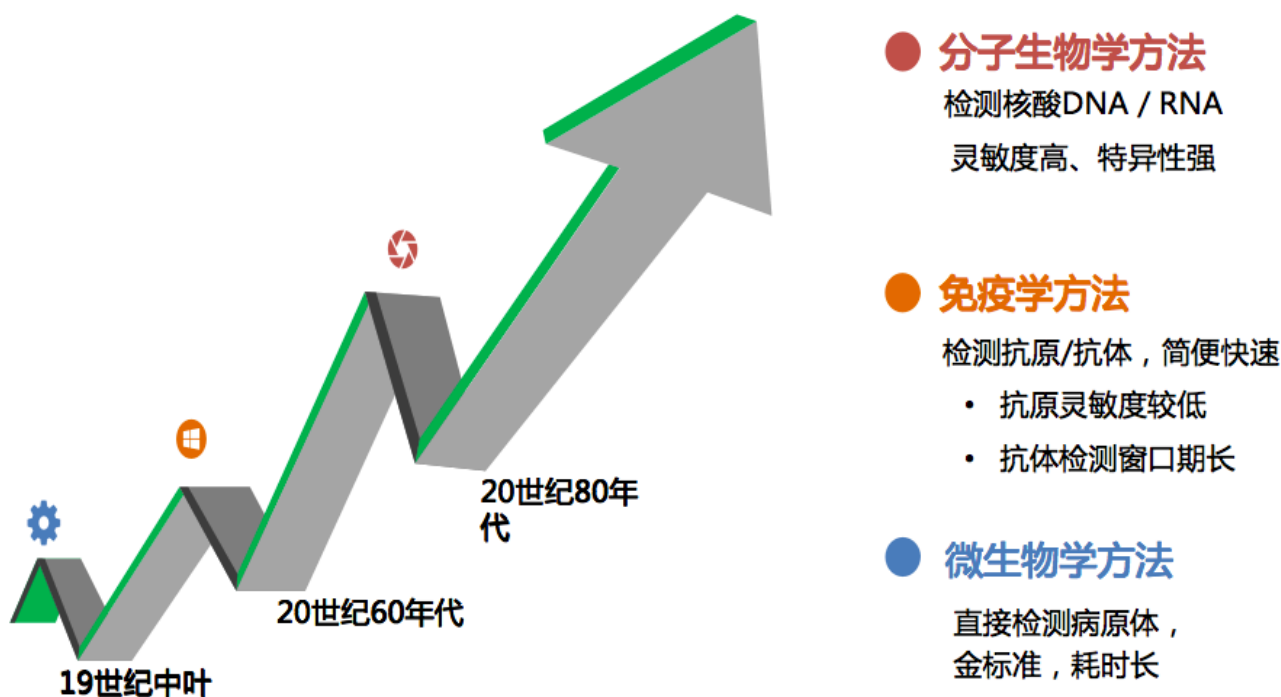
上图所示，来源于一篇CRITICAL REVIEWS IN MICROBIOLOGY的综述（DOI: 10.1080/1040841X.2019.1681933），告诉我们目前临床微生物检测手段主要包括哪些。分子生物学方法、抗原检测方法是常用的检测病毒的手段，在国外和国内的指南都有推荐。很多指南都不推荐采用快速**抗体检测方法**诊断呼吸道病原感染，比如腺病毒感染或者流感病毒感染，检测抗体，无论是IgM或IgG，单次检测，价值不是很大。抗原检测的主要特点是特异性良好，但灵敏度略差，在适宜采样的前提下，根据患者病毒载量的多少，灵敏度会在40%~70%，不同的文献报道具有一定差异。另外，有很多细菌侵犯人体后，降解产物进入血液，最终出现在我们的尿液中，然后通过尿液去检测相关的病原感染的情况。比如肺炎链球菌感染，检测尿液肺炎链球菌细菌壁的多糖成份（cell wall-associated polysaccharide），或军团菌（血清1型）感染的时候，检测军团菌尿抗原。肺炎链球菌尿抗原检测灵敏度50-80%，特异性在90%以上。重症感染时灵敏度会更高，但是如果病原载量不多的轻症感染或感染的不同阶段，灵敏度偏低。目前呼吸道病毒感染尚没有合适的尿抗原检测靶标，主要采集鼻咽拭子去检测抗原，包括流感病毒、腺病毒，或者冠状病毒。抗原检测适合病原载量比较高的情况下使用。

还有**分子生物学方法**，根据靶标的多少，PCR法可分为多重PCR或者单重PCR，未来的发展方向主要是多重PCR，至少是两重的。目前来说，针对两三个靶点设计产品，对于常规的分子试剂公司来没有多少问题。但是我们希望未来能够针对更多的病原，即拿到一份样本后，在短时间内针对多种病原靶

标进行快速检测，实现「样本进，报告出」这样的「快速检测」模式，在两个小时以内完成10种、20种甚至更多的病原检测，我认为这是非常重要的发展方向。多重检测可以降低检测成本。当然，对于一些少见病原或者极为罕见的病原，实验室不可能针对这种病原专门设计试剂，从经济效益上讲不太合算。所以像这些情况，做**宏基因组测序**会更有价值。目前可以在一个体系里面加入几十种甚至几百种引物，先扩增，再测序，这就称为tNGS，这种方式的理论上讲灵敏度也很高，成本将来有可能降低，但还没有广泛应用于临床检测工作中。

提到分子生物学方法，我们总会想到**PCR法**、**宏基因组测序**等方法。实际上分子生物学方法现在已经多种多样了，比如**恒温扩增技术**、**基因芯片**等，只是这些应用相对来说比荧光定量PCR和宏基因组测序要少一些。近几年应用恒温扩增技术逐渐增多，PCR要有反复升温、降温的过程，对反应速度有影响，对于仪器设备要求也高。而恒温扩增去掉反复升降温的过程，使速度提高，但一般恒温扩增的灵敏度与特异度会低于PCR。还有美国的张锋教授发现的**CRISPR技术**，现在也慢慢应用到分子生物学检测的领域中，灵敏度很高，也许未来会成为分子生物学检测非常重要的一个方向。

### 病原体检测技术发展——核酸检测



对于传统**微生物学方法**，现在病毒培养方法应用的越来越少，在一些专门的科研机构 and CDC部门需要活病毒开展研究工作时会使用。因为做病毒培养对实验室的硬件条件及人员防护要求更高，对于常规的一线的临床实验室，从人力成本和经济效益来看不好维持。后来慢慢过渡到**免疫学方法**，免疫学方法分为抗原检测和抗体检测。如前所述，抗体检测不太适合常规的呼吸道病毒检测与临床诊断，更适于回顾性分析。抗原检测简单易行，别有优势。**分子生物学方法**，根据DNA病毒或者RNA病毒去专门设计不同的引物进行相关的扩增。



## 新型冠状病毒抗原检测

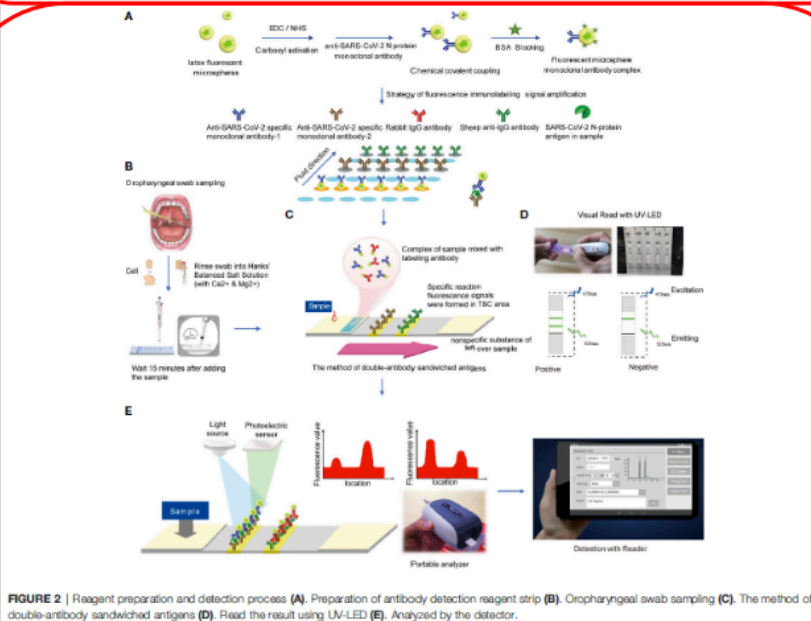
TABLE 5 | The specificity and sensitivity of test strip.

Study group	No. test	Antigen Strip				RNA test			
		Positive	Negative	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Positive	Negative	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Healthy controls	300	0	300	—	100	—	—	—	—
Other respiratory disease	443	12	431	—	97.29	0	443	—	100.00
SARS-CoV-2 Samples	247	100	147	40.49	—	95	152	38.46	—
Progress stage	137	92	45	67.15	—	95	42	69.34	—
Cured stage	110	8	102	7.02	—	0	110	0	—
Total (without healthy controls)	690	112	578	—	—	95	595	—	—
No. agreement with RNA test	—	79	582	—	—	—	—	—	—
Percentage agreement with RNA test	—	83.2%*	94.5%**	—	—	—	—	—	—

\*Positive Percentage Agreement \*\*Negative Percentage Agreement.

## 新型冠状病毒抗原检测

The detection results were significantly reduced after the sample inactivation. The results before and after the inactivation were compared, and it was found that the protein destruction after inactivation would affect the detection results



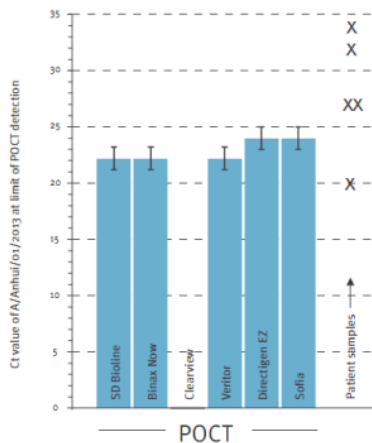
•Front Cell Infect Microbiol  
•2020 Nov 30;10:553837.

这是国内近期发表的一篇文章。即采用抗原方法检测新型冠状病毒感染，欧美的一些国家很欢迎抗原检测方法，非常快速、操作简单，缺点是灵敏度偏低。我们没有用过这样的检测试剂，因为国内的阳性也比较少。可能在一些高发地区，抗原检测具有一定价值，可用于可疑人员的初筛。

胶体金法不能作为病毒感染阴性确诊标准

Table 1  
Comparison of the influenza A and B sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive values (NPV) for the six different rapid tests to RETCIF

Rapid test	Influenza A				Influenza B			
	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
Binax Now Influenza A&B	36/49 (73)	127/128 (99)	36/37 (97)	127/140 (91)	3/10 (30)	167/167 (100)	3/3 (100)	167/174 (96)
BD Directigen EZ Flu A + B	34/49 (69)	128/128 (100)	34/34 (100)	128/143 (90)	3/10 (30)	167/167 (100)	3/3 (100)	167/174 (96)
Denka Seiken Quick Ex-Flu	35/49 (71)	128/128 (100)	35/35 (100)	128/142 (90)	3/10 (30)	167/167 (100)	3/3 (100)	167/174 (96)
Fujirebio Espline Influenza A&B-N	33/49 (67)	128/128 (100)	33/33 (100)	128/144 (89)	3/10 (30)	167/167 (100)	3/3 (100)	167/174 (96)
Rockeby Influenza A Antigen Test	5/49 (10)	128/128 (100)	5/5 (100)	128/172 (74)	Test detects influenza A antigen only			
Quidel Quickvue Influenza A + B Test	33/49 (67)	128/128 (100)	33/33 (100)	128/144 (89)	3/10 (30)	167/167 (100)	3/3 (100)	167/174 (96)



■ 胶体金法的准确性一般在70%左右，在病毒载量较低时无法检测到目标病毒，不能作为病毒阴性的诊断标准。

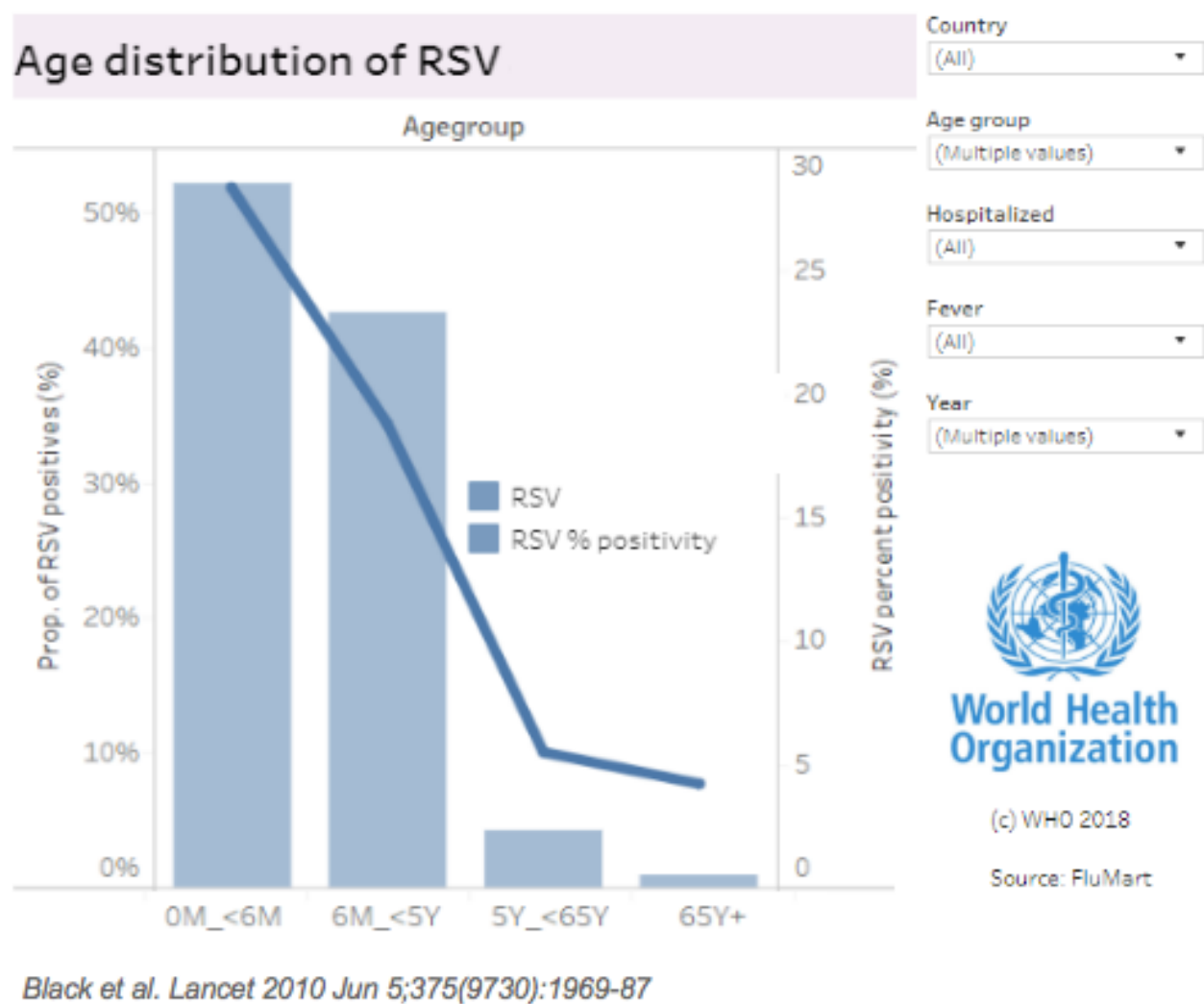
Aron C. et al. J Clin Virol. 2007;39(132)  
Baas C, et al. Euro Surveill. 2013;18(21)

为什么我们一直说用抗原检测不能够作为病毒感染阴性的确诊标准，就是因为灵敏度不够。比如患者的确是流感病毒感染、腺病毒感染或者呼吸道合胞病毒感染，但如果病原载量较低，或者是采样是咽拭子，没有采鼻咽拭子，或者采样的时候没有采到相应部位，本来应该从鼻腔进去，进去的程度要深一些，到鼻咽部的位置，实际中拭子进的较浅，采的是鼻拭子。或者病程较长。以上种种情况都会大大降低阳性率。所以，抗原检测结果如果是阴性，而患者的症状比较像，还是不能排除。建议用更灵敏的分子生物学检测方法。不同分子生物学检测方法的灵敏度还是存在一定差异，不同厂家之间差异比较大，所以我们建议实验室在使用某一种试剂之前要做好相应的评估。

流感病毒

在没有新冠病毒之前，我们特别关注每年的流感病毒。我们实验室每到秋冬季，每天都检出相当多的甲、乙型流感病毒。由于新冠疫情，大家开始佩戴口罩、采取个人防护等措施，2020年度-2021年初流感基本上已经「绝迹」了。可见控制新冠病毒的这种方式对于控制流感、控制呼吸道合胞病毒或腺病毒的感染流行都十分有效。

呼吸道合胞病毒（RSV）



呼吸道合胞病毒（RSV）主要见于一些免疫力比较低下的老年人群和学龄前儿童。RSV占2岁以下儿童下呼吸道感染住院原因的42-45%，尤以新生儿及6个月内婴儿为易感人群。一般来说症状比较轻，以咳嗽、喘鸣等呼吸道症状为主，可引起间质性肺炎、毛细支气管炎等。如病情严重或反复发作，可发展为支气管哮喘，导致呼吸衰竭等。当RSV与其他呼吸道病毒合并感染时，可能引起严重后果。

柳叶刀：以RSV为主的病毒已经成为中低收入国家重症儿童肺炎的主要病因

# THE LANCET

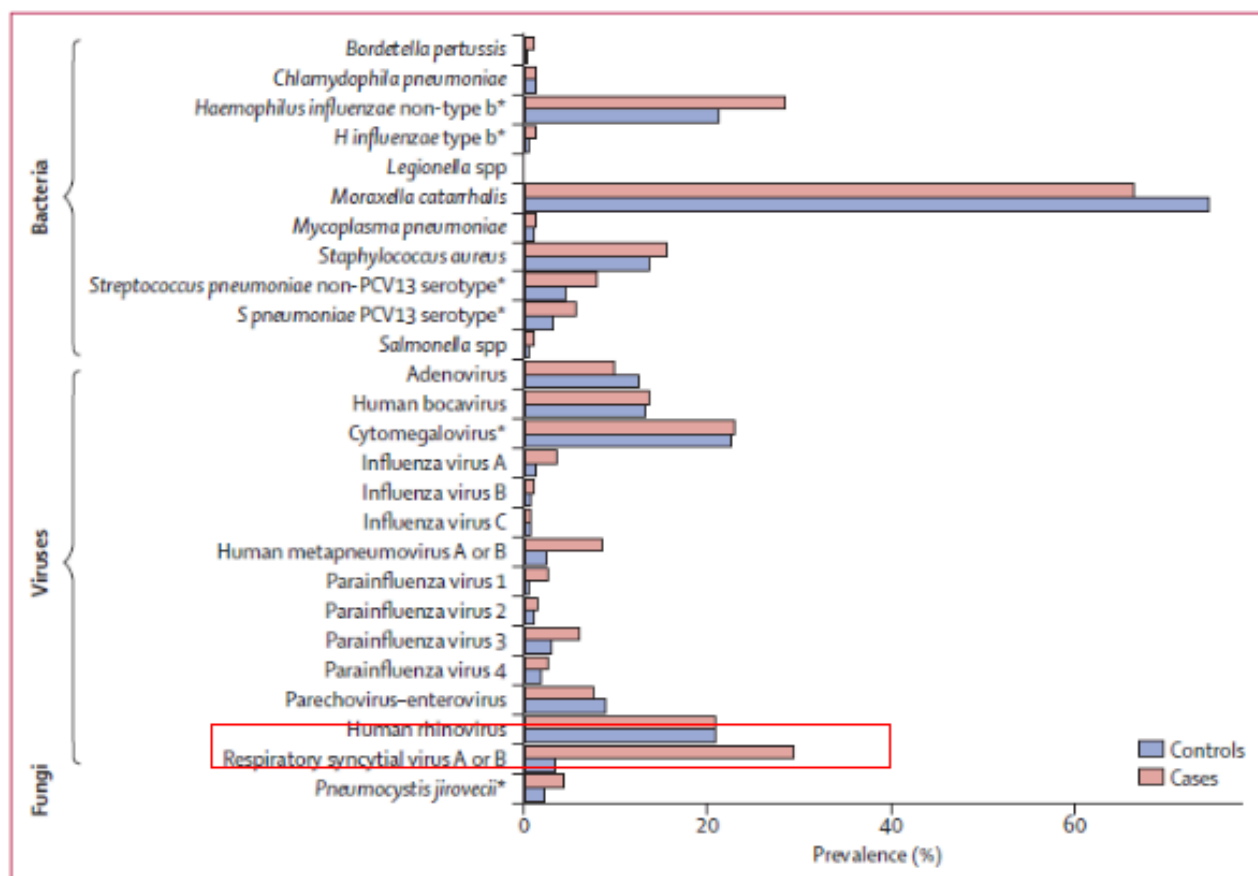
Log in 🔍 ☰

ARTICLES | ONLINE FIRST

## Causes of severe pneumonia requiring hospital admission in children without HIV infection from Africa and Asia: the PERCH multi-country case-control study

The Pneumonia Etiology Research for Child Health (PERCH) Study Group <sup>†</sup> • Show footnotes

Open Access • Published: June 27, 2019 • DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30721-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30721-4) •



O'Brien, K. L., et al. (2019). *The Lancet*, 6736(19), 1–23.

这是一项横跨亚非两大洲七个国家的多中心研究，自1980年以来同类研究中规模最大、最全面的研究，发表在2019年《柳叶刀》杂志。在儿童人群中：其中呼吸道合胞病毒导致的肺炎占到了全部病例的31.1%，而细菌仅占27.3%，结核分枝杆菌占5.9%，其余为真菌和其他病原体。这一文献告诉我们RSV已经成为非常重要的一类感染的病毒，尤其是儿童群体。所以作为儿童医院，建议至少有一种检测呼吸道合胞病毒的方法，可采用抗原快检试剂，也可是分子生物学检测方法。我们不要把所有的精力都关注在新冠病毒上，实际上其他的病毒还是会给我们带来一定的影响。

呼吸道合胞病毒做抗原检测不一定很灵敏，有一部分人检测不出来，特别是病原载量比较低的时候，这时候建议采用核酸检测的方法。



the Aries Flu A/B & RSV (Luminex Corp., Austin, TX) (15), Xpert Xpress Flu/RSV (Cepheid, Sunnyvale, CA) (13), and Cobas Flu A/B & RSV (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA)

**Influenza virus A (FluA), influenza virus B (FluB), and respiratory syncytial virus (RSV)** are among the leading causes of respiratory illness during the respiratory virus season, especially in children, elderly persons, and immunocompromised patients.

**TABLE 1** Sensitivities and specificities of Aries, Xpress, and Cobas assays

Virus	Assay	Test result/reference standard result				Sensitivity (%) (95%CI)	Specificity (%) (95%CI)	Kappa (95%CI)
		+/+	+/-	-/+	-/-			
FluA	Aries	48	1	2	143	96.0 (86.5–98.9)	99.3 (96.2–99.9)	0.96 (0.91–1.0)
	Xpress	50	0	0	144	100.0 (92.9–100)	100.0 (97.4–100)	1.0 (1.0–1.0)
	Cobas	50	0	0	144	100.0 (92.9–100)	100.0 (97.4–100)	1.0 (1.0–1.0)
FluB	Aries	44	1	1	148	97.8 (88.4–99.6)	99.3 (96.3–99.9)	0.97 (0.93–1.0)
	Xpress	44	0	1	149	97.8 (88.4–99.6)	100.0 (97.5–100)	0.99 (0.96–1.0)
	Cobas	45	1	0	148	100.0 (92.1–100)	99.3 (96.3–99.9)	0.99 (0.96–1.0)
RSV	Aries	48	0	1	145	98.0 (89.3–99.6)	100.0 (97.4–100)	0.99 (0.96–1.0)
	Xpress	49	0	0	145	100.0 (92.7–100)	100.0 (97.4–100)	1.0 (1.0–1.0)
	Cobas	49	1	0	144	100.0 (92.7–100)	99.3 (96.3–99.9)	0.99 (0.96–1.0)

**TABLE 2** Specimens with discrepant results among Aries, Xpress, and Cobas assays

No. of specimens detected	Target	Test result (C <sub>T</sub> value) <sup>a</sup>				
		FilmArray	Aries	Xpress	Cobas	Final
2	FluA	+	–	+ (18.1–35.4)	+	+
1	FluB	+	–	+ (35.5)	+	+
1	RSV	+	–	+ (37.0)	+	+
1	FluB	+	+ (31.8)	–	+	+
1	RSV	–	–	–	+	–
1	FluB	–	–	–	+	–
2	FluB	+	–	–	–	–
1	FluB	+	+ (30.2)	–	–	– <sup>c</sup>
1	FluA	+ <sup>b</sup>	+	+	+	+
1	FluB	+	+ <sup>d</sup>	+	+	+

the Aries, Xpress, and Cobas Liat assays demonstrated excellent sensitivities and specificities for simultaneous detection and identification of FluA, FluB, and RSV

[J Clin Microbiol.](#) 2018 Mar; 56(3): e01691-17.

上图所示，如果有些公司自己制备试剂的话，可以考虑甲型/乙型流感和呼吸道合胞病毒一起检测。

QIAstat-Dx Respiratory Panel V2 (RP) is a novel molecular-method-based syndromic test for the simultaneous and rapid (70-min) detection of 18 viral and 3 bacterial pathogens causing respiratory infections.

TABLE 2 Comparison of results of respiratory pathogen detection by the ePlex RPP assay and the QIAstat-Dx RP assay

QIAstat-Dx RP target	No. of results			
	ePlex+/QIAstat-Dx+	ePlex+/QIAstat-Dx-	ePlex-/QIAstat-Dx+	ePlex-/QIAstat-Dx-
<b>Viruses</b>				
Human adenovirus	17	2	2	266
Human bocavirus	17	3	1	266
Human coronavirus 229E			1	266
Human coronavirus HKU1	7		3	277
Human coronavirus NL63	9		1	277
Human coronavirus OC43	10	1	1	275
Human metapneumovirus A/B	26	1		260
Human rhinovirus/enterovirus	56	8	3	220
Influenza A virus	36	2	1	248
Influenza A H1N1/2009 virus	12	2		273
Influenza A H1 virus				287
Influenza A H3 virus	20		1	266
Influenza B virus	40	4		243
Parainfluenza virus 1	3		2	282
Parainfluenza virus 2	3			284
Parainfluenza virus 3	4		2	281
Parainfluenza virus 4		1	1	281
Respiratory syncytial virus A/B*	41	2		244
<b>Bacteria</b>				
<i>Bordetella pertussis</i>	2			285
<i>Legionella pneumophila</i>				287
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	5			282
<b>Total</b>	<b>312</b>	<b>26</b>	<b>19</b>	<b>5,670</b>

\*The QIAstat-Dx Respiratory Panel (RP) assay does not differentiate between respiratory syncytial virus (RSV) A and RSV-B. In total, 13 RSV-A and 30 RSV-B were detected using the ePlex Respiratory Pathogen Panel (RPP) assay.

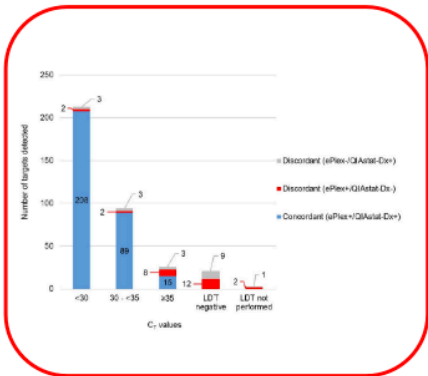


FIG 1 QIAstat-Dx Respiratory Panel assay workflow.

J Clin Microbiol. 2018 Mar; 56(3): e01691-17.

上图所示，除了常见的病毒，还可以纳入百日咳、衣原体、军团菌等进行多重快速病原学检测。检测结果与病原载量有关。如果病原载量比较多，常规的方法会得到阳性结果；但是如果病原载量非常少，如PCR检测的CT值在30个循环以上的话，这时候检测结果并不一定很准确，灵敏度可能下降，需要注意。

## 传统病原学检测方法仍有临床无法满足的需求

### 传统病原体检测<sup>1</sup>



在所有感染性疾病中, 超过30%的呼吸道感染<sup>2</sup>, 超过40~50% 血液感染<sup>3</sup>, 以及超过50~60% 脑炎或脑膜炎<sup>4</sup>, 通过传统的方法无法鉴别其病原体。

1. Infectious Disease. 3<sup>rd</sup> Version

2. Rev Mal Respir. 2017 Dec;34(10):1098-1113

3. Epidemiol Immunobiology. 2016 Mar-Apr;(2):91-9

4 Clinical Infectious Diseases, 43(12), 1565-1577.

## mNGS、WGS和tNGS的应用

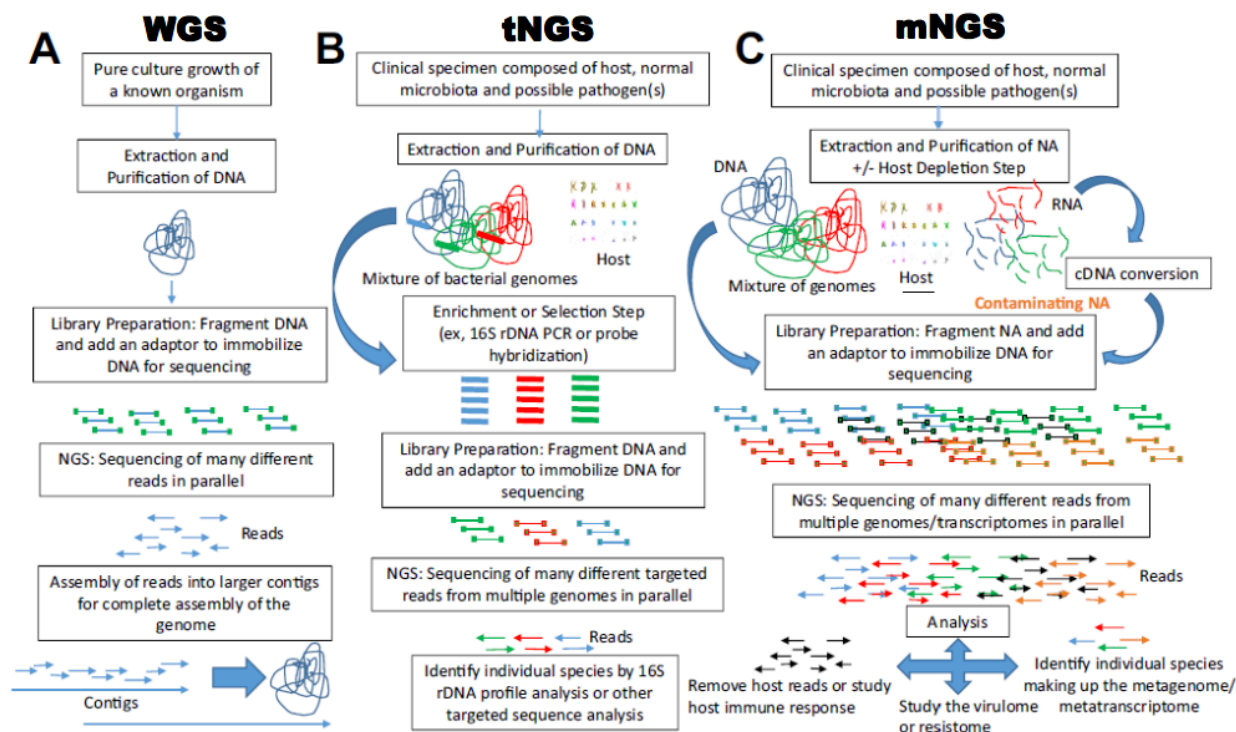
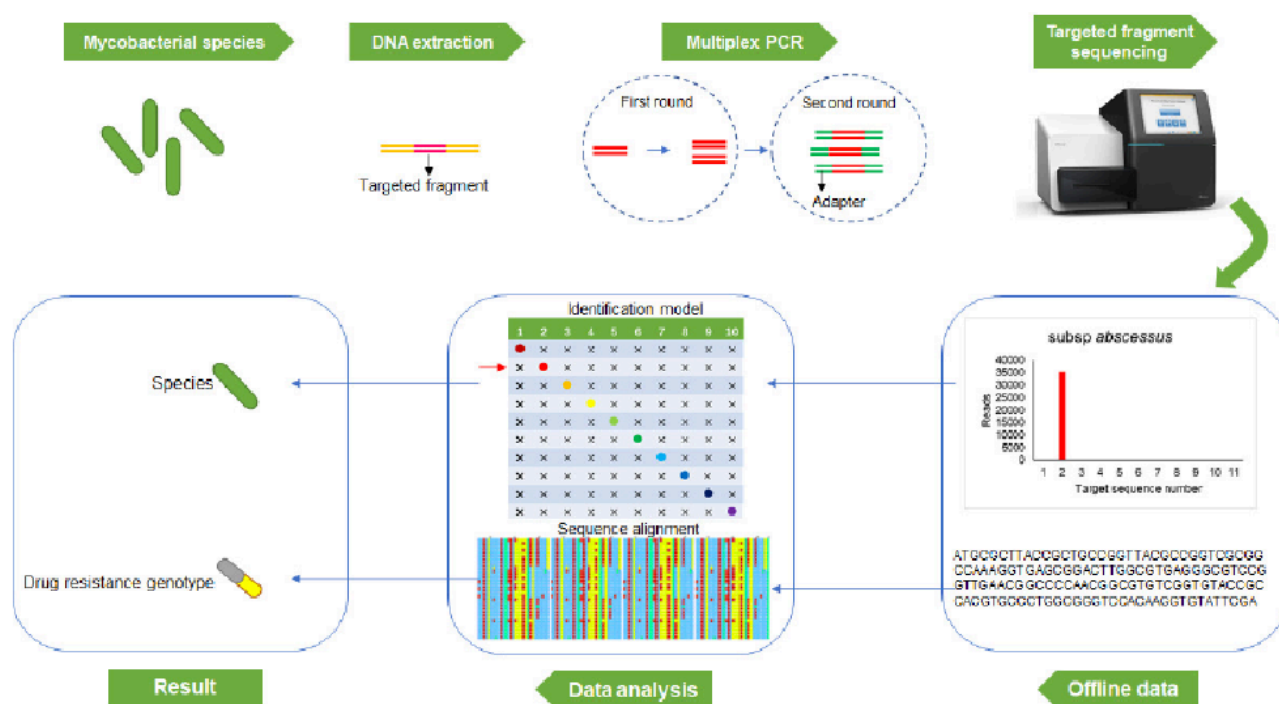


Fig. 1. The different applications of NGS in clinical microbiology laboratories. (A) WGS of a pure organism from cultured growth. (B) tNGS directly from specimen (example: 16S rDNA from a clinical specimen for bacterial profiling). (C) mNGS from clinical specimens. The nucleic acid (NA) composition of the specimens includes host (black), microbiome and pathogen detection (blue, green, and red), and last, the inadvertent introduction of contaminating nucleic acid (orange). Analysis of reads generally involves removing host nucleic acid from microbial NA. The microbial reads are analyzed to identify the composition and abundance of reads of organisms present or to study the resistome or virome. The study of RNA can allow for transcriptome-based analysis to identify organisms that are transcriptionally active. cDNA, complementary DNA. (Modified from Simner PJ, Miller S, Carroll KC. Understanding the promises and hurdles of metagenomic next-generation sequencing as a diagnostic tool for infectious diseases. Clin Infect Dis 2018;66(5):780; with permission.)

**宏基因组测序**在近几年应用较为广泛。在这次新冠病毒发现的过程中，有赖于宏基因组测序的使用。换句话说，我一直在强调对于少见病原、新发病原，或者从国外旅行回国感染的旅行相关感染，一般实验室很难针对这一类病原体设计检测方法，的确有赖于宏基因组测序。

实际上基因组测序不一定要做宏基因组测序。还有其他的方法，如上图所示，**WGS**主要是针对某一个分纯的菌落测序，检测其毒力特征、耐药特征、质粒分布、进化情况、同源性分析等。比如分枝杆菌，做药敏实验的话需要很长时间、需要特殊的条件，但是可以做WGS基因组测序，检测耐药基因，其耐药大多数都是通过点突变所致，和真实的药敏实验结果匹配良好。

还有**tNGS**，这是指有靶向的测序，先把需要检测的片段给扩增出来，然后再去测序。比如我只关心样本里面的细菌，就可以先把16s这个片段扩增出来，然后再去测序。若关心真菌的话，可以把ITS片段扩增出来，再去测序。还可以在这个体系里面加入我关心的数十种或上百种病原的引物，扩增后测序。这样的优点就是不用去测人基因组，降低成本，提高灵敏度。我们做mNGS的时候，实际上有相当一部分测序都耗费在人基因组上面。



2020 Nov  
11;JCM.00584-20

上图所示，前段时间国内的科研人员在JCM发表的文章，他是做非结核分枝杆菌的分类，先把很多个序列扩增出来以后再去测序，采用tNGS，也是非常重要的一个发展方向。

**Table 2. Prevalence of Respiratory Virus Detection With rRT-PCR in Asymptomatic Controls and Patients With CAP <18 Years Old**

Virus	Asymptomatic Children, No. (%) (n = 521)	Children With CAP, No. (%) (n = 832)	P Value <sup>a</sup>	aOR (95% CI) <sup>b</sup>	AF (95% CI)
Any virus <sup>c</sup>	127 (24.4)	572 (68.8)	<.01	NC <sup>d</sup>	NC
hRV	90 (17.3)	182 (21.9)	.04	1.13 (.84–1.51)	0.12 (–.18–.34)
RSV	10 (1.9)	221 (26.6)	<.01	15.2 (7.92–29.2)	0.93 (.87–.97)
hMPV	8 (1.5)	126 (15.1)	<.01	10.4 (5.02–21.6)	0.90 (.80–.95)
AdV	16 (3.1)	53 (6.4)	<.01	1.77 (.99–3.17)	0.44 (–.01 to .88)
Influenza (A and B)	0	28 (3.4)	<.01	NC	NC
PIV (types 1–3)	10 (1.9)	39 (4.7)	.01	2.29 (1.11–4.69)	0.56 (.10–.79)
CoV (229E, HKU1, NL63, OC43)	8 (1.5)	37 (4.5)	<.01	3.17 (1.44–6.99)	0.68 (.31–.86)

**Table 3. Prevalence of Respiratory Virus Detection With rRT-PCR in Asymptomatic Controls and Patients With CAP ≥18 Years Old**

Virus	Asymptomatic Adults, No. (%) (n = 238)	Adults With CAP, n (%) (n = 192)	P Value <sup>a</sup>	aOR (95% CI) <sup>b</sup>	AF (95% CI)
Any virus <sup>c</sup>	5 (2.1)	47 (24.5)	<.01	NC <sup>d</sup>	NC <sup>d</sup>
hRV	2 (0.8)	21 (10.9)	<.01	13.4 (3.04–59.1)	0.93 (.67–.96)
RSV	0	3 (1.6)	.09	NC <sup>d</sup>	NC
hMPV	1 (0.4)	8 (4.2)	.01	13.5 (1.65–110)	0.93 (.39–.99)
AdV	0	3 (1.6)	.09	NC	NC
Influenza (A and B)	0	5 (2.6)	.02	NC	NC
PIV (types 1–3)	0	3 (1.6)	.09	NC	NC
CoV (229E, HKU1, NL63, OC43)	2 (0.8)	6 (3.1)	.14	3.19 (.59–17.1)	0.69 (–.69 to .94)

Detections of **influenza, respiratory syncytial virus, and human metapneumovirus** among patients with CAP of all ages probably indicate an etiologic role, whereas detections of **parainfluenza, coronaviruses, rhinovirus, and adenovirus**, especially in children

JID 2016;213 (15 February)

有一点想要提醒大家，我们做病毒检测并不是检测出来都有临床价值。如上图所示，有些病毒容易出现在无症状感染者体内，包括鼻病毒、部分冠状病毒等，但是流感病毒很少出现在无症状患者身上。解读结果，即要看病原的类型，还要关注临床的情况。

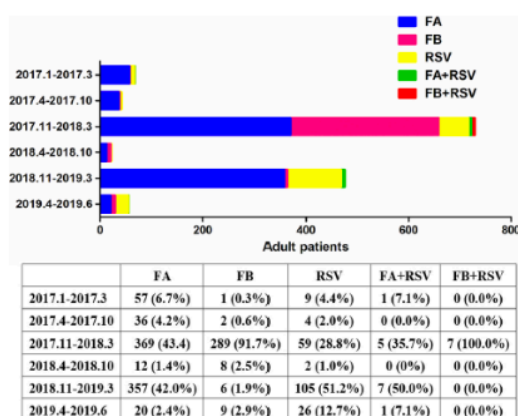


Fig. 2. Seasonal distribution of hospitalized adults infected by influenza virus and/or respiratory syncytial virus.

**Table 1**  
Demographic and clinical characteristics of the coinfected patients.

Patient ID	Viruses Detected	Age (years)/Sex	Underlying disease	Cause of admission	Acquisition	Antiviral prescribed	ICU admission	LOS (days)	Outcome
1	FA + RSV	47/M	Diabetes	Respiratory symptoms	Noncommunity	Yes	Yes	5	Death
2	FA + RSV	67/M	Diabetes, Cardiac disease	Respiratory symptoms	Noncommunity	No	Yes	3	Death
3	FA + RSV	75/M	Cancer	Respiratory symptoms	Noncommunity	No	No	26	Cured
4	FA + RSV	60/F	COPD, Cardiovascular disease	Respiratory symptoms	Community	Yes	Yes	13	Cured
5	FA + RSV	73/F	Diabetes	Respiratory symptoms	Noncommunity	Yes	No	16	Cured
6	FA + RSV	49/M	Cardiac disease	Cervical spondylitis	Noncommunity	No	No	6	Cured
7	FA + RSV	42/F	Organized pneumonia	Respiratory symptoms	Noncommunity	Yes	No	20	Cured
8	FA + RSV	67/M	Hypertension, Cardiac disease, Cardiovascular disease	Fracture of lumbar intervertebral disc	Noncommunity	Yes	No	15	Cured
9	FA + RSV	78/F	Hypertension, COPD	Respiratory symptoms	Noncommunity	Yes	Yes	21	Cured
10	FA + RSV	62/F	Hypertension, Diabetes	Respiratory symptoms	Noncommunity	Yes	No	16	Cured
11	FA + RSV	65/M	Cardiovascular disease	Respiratory symptoms	Community	Yes	Yes	11	Death
12	FA + RSV	77/M	Cardiac disease, Interstitial lung disease	Respiratory symptoms	Community	No	Yes	3	Death
13	FB + RSV	55/M	Diabetes, Cardiac disease, Cardiovascular disease	Respiratory symptoms	Noncommunity	Yes	Yes	14	Cured
14	FB + RSV	54/F	None	Respiratory symptoms	Community	Yes	Yes	9	Death
15	FB + RSV	53/F	Diabetes, Cardiac disease	Respiratory symptoms	Noncommunity	Yes	Yes	29	Death
16	FB + RSV	42/F	Allergic Rhinitis	Otitis media	Noncommunity	No	No	16	Cured
17	FB + RSV	67/F	Cardiac disease, Idiopathic Pulmonary Fibrosis	Respiratory symptoms	Noncommunity	Yes	No	11	Death
18	FB + RSV	50/M	Cardiac disease, COPD	Respiratory symptoms	Noncommunity	Yes	No	13	Cured
19	FB + RSV	50/M	Cardiovascular disease	Fracture	Noncommunity	Yes	No	55	Cured

Abbreviations: ICU, intensive care unit; LOS, length of hospital stay.

上图所示，这是前段时间中日呼吸中心总结的文章，发现呼吸道合胞病毒如果和甲流或乙流合并感染，患者的死亡率增加。这就告诉我们，临床检测的时候不能只关注一种病原，一种病毒感染以后引起另外一种细菌感染，比如肺炎链球菌或者金黄色葡萄球菌的感染，或者两种病毒同时感染，这种情况有可能发生。如果忽略另一种病原感染的话，可能治疗有失偏颇，会引起很严重的临床后果。



## 小结

儿童和成人病毒感染均不容忽视，很多微生物的建设忽视了病毒感染这方面，免疫力低下人群的病毒性肺炎更应该引起我们关注。随着基因组测序技术的应用，病毒感染逐渐被大家认识了解。快速多重PCR检测是未来发展的重要方向，希望试剂公司能够了解临床需求。另外，宏基因组测序虽然在发展中，但是诊断新发病毒或罕见呼吸道病毒感染，多重感染，具有独特优势，我们应该认识到它的优点和缺点。不同的NGS测序会逐渐应用到更多的场景中，为临床医生提供更多的便利。

## 参考文献（可上下滑动浏览）

- [1] 中国成人社区获得性肺炎诊断和治疗指南（2016年版）
- [2] Front Cell Infect Microbiol.2020 Nov 30;10:553837.
- [3] Aron C. et al. J Clin Virol. 2007;39(132)
- [4] Baas C, et al. Euro Surveill. 2013;18(21)
- [5] Black et al. Lancet 2010 Jun 5;375(9730):1969-87
- [6] O'Brien, K. L., et al.(2019).The Lancet, 6736(19),1–23.
- [7] J Clin Microbiol. 2018 Mar; 56(3): e01691-17.
- [8] Infectious Disease.3rd Version
- [9] Rev Mal Respir.2017 Dec;34(10):1098-1113
- [10] Epidemiol Immunobiology. 2016 Mar-Apr;(2):91-9
- [11] Clinical Infectious Diseases, 43(12), 1565-1577.
- [12] 2020 Nov 11;JCM.00584-20
- [13] JID 2016:213 (15 February)
- [14] Journal of Clinical Virology 133 (2020) 104685