

儿童呼吸道感染病原体核酸检测专家共识



扫码阅读电子版

谢正德¹ 邓继岩² 任丽丽³ 张燕⁴ 陈祥鹏¹ 张海邻⁵ 赵林清⁶ 徐保平⁷ 钟礼立⁸ 秦强⁷ 卢根⁹ 郑跃杰¹⁰ 赵德育¹¹ 尚云晓¹² 曹玲¹³ 陈志敏¹⁴ 殷勇¹⁵ 刘瀚旻¹⁶ 申阿东¹⁷ 应斌武¹⁸ 符州¹⁹ 李昌崇⁵ 钱渊⁶ 许文波⁴ 王健伟³ 申昆玲^{7,10}

¹国家儿童医学中心,首都医科大学附属北京儿童医院,北京市儿科研究所,国家呼吸系统疾病临床医学研究中心,中国医学科学院儿童危重感染诊治创新单元,北京 100045;²深圳市儿童医院感染科,深圳 518038;³中国医学科学院 & 北京协和医学院病原生物学研究所,卫生部病原系统生物学重点实验室,北京 100730;⁴国家卫生健康委员会医学病毒和病毒病重点实验室,世界卫生组织西太平洋地区麻疹/风疹参比实验室,中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所麻疹室,北京 102206;⁵温州医科大学附属第二医院育英儿童医院儿童呼吸科,温州 325027;⁶首都儿科研究所病毒学研究室,儿童病毒病原学北京市重点实验室,北京 100020;⁷国家儿童医学中心,国家呼吸系统疾病临床医学研究中心,首都医科大学附属北京儿童医院呼吸科,北京 100045;⁸湖南省人民医院儿童医学中心儿童呼吸病学湖南省重点实验室,长沙 410005;⁹广州医科大学附属妇女儿童医疗中心呼吸科,广州 510623;¹⁰深圳市儿童医院呼吸科,深圳 518038;¹¹南京医科大学附属儿童医院呼吸科,南京 210008;¹²中国医科大学附属盛京医院小儿呼吸内科,沈阳 110004;¹³首都儿科研究所附属儿童医院呼吸科,北京 100020;¹⁴国家儿童健康与疾病临床医学研究中心,浙江大学医学院附属儿童医院呼吸内科,杭州 310052;¹⁵上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心呼吸科,上海 200127;¹⁶四川大学华西第二医院儿科,出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室(四川大学),国家卫生健康委员会时间生物学重点实验室(四川大学),成都 610041;¹⁷国家儿童医学中心,国家呼吸系统疾病临床医学研究中心,首都医科大学附属北京儿童医院,北京市儿科研究所,北京 100045;¹⁸四川大学华西医院实验医学科,成都 610044;¹⁹重庆医科大学附属儿童医院呼吸中心,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,国家儿童健康与疾病临床医学研究中心,儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地,儿科学重庆市重点实验室,重庆 400014

谢正德和邓继岩对本文有同等贡献

通信作者:申昆玲,Email:kunlingshen1717@163.com;王健伟,Email:wangjw28@163.com;许文波,Email:wenbo_xul@aliyun.com

【摘要】 急性呼吸道感染是儿童最常见的感染性疾病,严重威胁儿童生命健康。快速准确的病原学诊断对于该类疾病的临床诊疗及防控具有重要意义。核酸检测方法因具有较高的灵敏度和特异性,得以快速地在临床推广应用,成为呼吸道感染病原体诊断的主要方法。为规范儿童呼吸道感染病原体核酸检测的临床应用,提升病原体的诊断水平,特组织相关领域专家,撰写《儿童呼吸道感染病原体核酸检测专家共识》,以指导儿童呼吸道感染病原体的核酸检测,整体提升儿童呼吸道感染病原体的诊断能力。

【关键词】 儿童;急性呼吸道感染;病原体;核酸检测;共识

DOI:10.3760/cma.j.cn101070-20211222-01490

Expert consensus on nucleic acid amplification test of respiratory pathogens in children

Xie Zhengde¹, Deng Jikui², Ren Lili³, Zhang Yan⁴, Chen Xiangpeng¹, Zhang Hailin⁵, Zhao Lingqing⁶, Xu Baoping⁷, Zhong Lili⁸, Qin Qiang⁷, Lu Gen⁹, Zheng Yuejie¹⁰, Zhao Deyu¹¹, Shang Yunxiao¹², Cao Ling¹³, Chen Zhimin¹⁴, Yin Yong¹⁵, Liu Hanmin¹⁶, Shen Adong¹⁷, Ying Binwu¹⁸, Fu Zhou¹⁹, Li Changchong⁵, Qian Yuan⁶, Xu Wenbo⁴, Wang Jianwei³, Shen Kunling^{7,10}

¹Research Unit of Critical Infection in Children, Chinese Academy of Medical Sciences, National Clinical Research Center for Respiratory Diseases, Beijing Pediatric Research Institute, Beijing Children's Hospital, Capital Medical University, National Center for Children's Health, Beijing 100045, China; ²Department of Infection, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen 518038, China; ³NHC Key Laboratory of System Biology of Pathogens, Institute of Pathogen Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100730, China; ⁴NHC Key Laboratory of Medical Virology and Viral Diseases, World Health Organization Western Pacific Regional Office Reference Laboratory of Measles and Rubella, Measles Laboratory in National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Centers for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; ⁵Department of Children's Respiratory Disease, the Second Affiliated Hospital and Yuying Children's Hospital, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China; ⁶Laboratory of Virology, Beijing Key Laboratory of Etiology of Viral Diseases in Children, Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China; ⁷Department of Respiratory, Beijing Children's Hospital, Capital Medical University, National Clinical Research Center for Respiratory Diseases, National Center for Children's Health, Beijing 100045, China; ⁸Hunan Provincial Key

Laboratory of Pediatric Respirirolgy, Pediatric Medical Center, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha 410005, China; ⁹ Department of Respiratory, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510623, China; ¹⁰ Department of Respiratory, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen 518038, China; ¹¹ Department of Respiratory, Children's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210008, China; ¹² Department of Pediatric Respiratory, Shenjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China; ¹³ Department of Respiratory, the Affiliated Children's Hospital of Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China; ¹⁴ Department of Pulmonology, Children's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, National Clinical Research Center for Child Health, Hangzhou 310052, China; ¹⁵ Department of Respiratory Medicine, Shanghai Children's Medical Center Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200127, China; ¹⁶ Department of Pediatrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Key Laboratory of Ministry of Education for Birth Defects and Related Maternal and Child Diseases (Sichuan University), Key Laboratory of Time Biology of National Health and Health Commission (Sichuan University), Chengdu 610041, China; ¹⁷ Beijing Pediatric Research Institute, Beijing Children's Hospital, Capital Medical University, National Clinical Research Center for Respiratory Diseases, National Center for Children's Health, Beijing 100045, China; ¹⁸ Department of Laboratory Medicine, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610044, China; ¹⁹ Department of Respiratory Medicine, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatric, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China

Xie Zhengde and Deng Jikui contributed equally to the article

Corresponding author: Shen Kunling, Email: kunlingshen1717@163.com; Wang Jianwei, Email: wangjiw28@163.com;

Xu Wenbo, Email: wenbo_xu1@aliyun.com

【Abstract】 Acute respiratory tract infection is the most common infectious disease in children, which seriously threatens children's health. Rapid and accurate etiological diagnosis is of great significance for the clinical treatment and control of these diseases. Pathogen nucleic acid test was applied and became the main method of respiratory tract infection diagnosis for its high sensitivity and specificity. To regulate the application of pathogen nucleic acid amplification test in respiratory tract infection in children, improve the diagnosis level, expert consensus on nucleic acid amplification test of respiratory pathogens in children was prepared to guide the application and promote pathogens diagnosis ability.

【Key words】 Child; Acute respiratory tract infection; Pathogen; Nucleic acid amplification test; Consensus

DOI: 10.3760/cma.j.cn101070-20211222-01490

急性呼吸道感染是儿童最常见的感染性疾病,急性下呼吸道感染是 5 岁以下儿童病死的首位原因,严重威胁儿童生命健康,对家庭和社会造成了严重的疾病负担^[1]。

儿童呼吸道感染的病原复杂多样,包括病毒、细菌、非典型病原体、真菌等(常见病原体见附录)。近年来,新型冠状病毒、禽流感病毒等新发再发呼吸道感染病原体也对儿童生命健康造成了严重威胁。明确感染病原有助于抗微生物药物的合理使用及呼吸道传染病的早发现、早隔离、早报告和早治疗。因此,快速准确的病原学诊断对于呼吸道常见感染性疾病的临床诊疗及防控具有重要意义。

儿童呼吸道感染病原体检测方法包括分离培养、抗原检测、核酸检测和抗体检测等,各种方法均有各自的优缺点。由于病原体分离培养费时费力且敏感性较低,血清抗体检测因有窗口期不推荐使用,故呼吸道感染病原体的主要实验室诊断方法为抗原检测和核酸检测。核酸检测方法因在不同的疾病期均具有较高的灵敏度和特异性而得以快速地在临床推广应用,成为呼吸道感染病原体诊断的主要方法。多重核酸检测的合理使用,不仅有利于儿童呼吸道感染的病原学辅助诊断,同时也会为病原体的鉴别诊断及医院内感染的防控提供强有力的支持;宏基因组测序技术(metagenomics next generation sequencing, mNGS)为未知病原的明确提供了可能。

为规范儿童呼吸道感染病原体核酸检测的临床应用,提升儿童呼吸道感染病原体的诊断水平,实现国家卫生健康委制定的《2021 年国家医疗质量安全改进目标》中“提高呼吸道病原核酸检测率”的目标,特组织临床微生物学、分子生物学、临床医学及检验医学等各相关领域专家,结合国内外文献最新进展,形成《儿童呼吸道感染病原体核酸检测专家共识》,以指导儿童呼吸道感染病原体的核酸检测,整体提升儿童呼吸道感染病原体诊断能力。

1 呼吸道感染病原体核酸检测方法

病原体核酸检测方法以是否依赖于基因组序列特征分为基因组序列依赖性和非依赖性两类方法。病原体基因组序列依赖性核酸检测方法是根据已知的病原体基因组序列,设计特异性引物,靶向性地进行病原体核酸扩增和检测的方法,如常规的聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)。病原体基因组序列非依赖性核酸检测方法不需要根据病原体基因组序列设计特异性引物,而是对样本中的病原体序列进行高通量测序,将获得的序列与数据库中序列进行比对分析而确定病原体的方法,如 mNGS。病原体核酸检测方法按照技术原理又可分为核酸扩增、核酸杂交、基因测序、规律成簇的间隔短回文重复(clustered regularly interspaced

short palindromic repeats, CRISPR) 技术等。核酸扩增包括 PCR 扩增、等温扩增技术等。以 PCR 为主的核酸扩增技术因其高效特异、使用灵活、操作相对简单且成本低的优势,成为当前呼吸道病原体核酸检测最普遍的核酸诊断方法。靶向多种病原体的多重靶标设计以及与核酸提取、扩增、结果读取一体化设备的研发应用,凸显核酸检测在病原体多重快速检测方面的优势。覆盖呼吸道感染常见病原体及耐药基因的核酸检测,可为临床提供病原体诊断依据,有助于优化诊疗。根据分析 PCR 产物的技术平台不同,又可分为荧光法、毛细管电泳法和质谱分析法等,其中荧光法是最常用的方法。

核酸杂交,如基因固相和液相芯片技术以及基因测序技术因操作相对复杂,对设备及人员要求高,不适合在临床大规模使用,可根据实际情况选择应用。CRISPR 技术是一种新兴的检测手段,尚未在病原核酸检测领域普及。常见的核酸检测方法概述如下。

1.1 病原体基因组序列依赖性核酸检测方法 采用靶向病原体基因组的引物,通过链特异性延伸、杂交、编辑等方式实现靶向目标序列的扩增,获得可被检测到的信号,这是病原体检测常用的技术方法。常用的方法包括以下几类。

1.1.1 实时荧光定量 PCR (real-time PCR) 实现了 PCR 从定性到定量的飞跃,使用荧光报告分子来检测每一轮 PCR 扩增过程中的产物。该方法将核酸扩增和检测步骤相结合,无需对扩增产物进行凝胶电泳,具有简单、特异性和灵敏性高、重复性好、定量准确、速度快等诸多优点。

1.1.2 等温扩增技术 该技术具有操作简单、快速、高效、特异、无需专用设备的优点,较适用于基层和现场检测。代表性技术有环介导等温扩增(loop mediated isothermal amplification, LAMP) 和核酸序列依赖性扩增(nucleic acid sequence based amplification, NASBA)。LAMP 使用具有链置换特性的 BstDNA 聚合酶,在等温条件下高效、快速、特异性扩增靶标序列^[2]。基于 LAMP 技术开发的呼吸道病原体检测方法已有商品化试剂。NASBA 技术是一种检测 RNA 的等温扩增方法,一般在 42 °C 完成扩增,需反转录酶、RNA 酶 H、T7 RNA 聚合酶和序列特异性引物来完成。NASBA 尤其适用 RNA 病毒的检测^[3-4]。目前有基于 NASBA 技术检测常见呼吸道病毒和流感嗜血杆菌、脑膜炎奈瑟菌、肺炎链球菌的方法,用于辅助诊断^[5-6]。扩增产物的鉴定可以通过颜色、浊度、胶体金技术或与化学发光、荧光、芯片检测设备结合进行一体化检测。但等温扩增技术扩增体系的稳定性和方法的成熟度不及传统 PCR 方法。如 LAMP 技术对引物设计要求高,对扩增靶序列的长度有限制,一般不能进行长片段的扩增;NASBA 技术反应体

系和组分相对复杂,需要多种酶反应,增加了检测成本。

1.1.3 核酸即时检测 (point-of-care testing, POCT) 技术 核酸 POCT 因快速、自动、整合从细胞裂解、核酸提取扩增到产物分析的全部测定步骤,降低检测复杂性,有效防止交叉污染等优点,是病原学检测最受关注的发展方向^[7]。核酸 POCT 与 real-time PCR 方法比较,在敏感性和特异性方面并无显著差异^[8]。欧美国家核酸 POCT 产业发展较为成熟^[9],最为成熟的呼吸道感染病原临床检测是针对耐药型结核杆菌,甲、乙型流感病毒和呼吸道合胞病毒的多联检测体系,覆盖 20 种以上呼吸道病毒和细菌的多联检测体系正逐步推广。2020 年的新冠肺炎疫情推动了病原体核酸 POCT 的快速发展,严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 被迅速列入各 POCT 联合检测体系中。高质量国产核酸 POCT 的临床推广应用和前景仍是目前分子诊断领域发展的热点^[10]。

1.2 病原体基因组序列非依赖性核酸检测方法 mNGS 是非序列依赖的新型核酸检测方法,是新发传染病和临床未知病原体鉴定的重要技术方法。mNGS 是用高通量测序平台对感染部位样本中提取的核酸进行高通量测序,通过将测序数据与数据库序列的比对分析,获得样本中包含的病毒、细菌、真菌和寄生虫等的病原微生物种类。

该方法不依赖特异性的引物扩增^[11-12],以非序列依赖、无偏倚性、适用于各种临床样本等特点,在呼吸道感染的病原体检测和研究中具有较其他分子检测技术不可比拟的优势^[13-15]。对于儿童呼吸道感染,在病因不明且病情危重需要尽快明确病原体、疑似新发或特殊病原体感染、传统微生物检测技术多次阴性且治疗效果不佳等情况下,可以在常规病原检测的同时或在其基础上对样本进行 mNGS 分析,以高效获取感染病原体的信息。

mNGS 在临床的应用仍面临较大的挑战,尤其在呼吸道感染疾病领域^[14-16]。原因包括以下几点:(1) 基于 mNGS 方法的实验操作步骤多且较复杂,有一定技术难度^[14];(2) 宿主或环境噪音信号较多,检测结果容易受到人源宿主及环境物种遗传物质的干扰,影响有效病原体数据的获取^[17-18];(3) mNGS 技术检测样本中的核酸(包括 DNA 与 RNA),无法完全区分检测到的微生物是否为感染病原体,结果的解释需结合临床综合判断;(4) 报告解读复杂,下机数据的分析及结果报告应由临床专业人员结合患儿临床背景、影像学资料、其他的实验室检查结果综合判断其临床意义。此外, mNGS 方法的质量控制和标准化评价方法有待完善。由第三方实验室开展的临床样本 mNGS 检测,需强化过程监管,亟需开展我国病原 mNGS 临床应用的科学质量评价体系和标准化的评估方法。我国相关监管部门开始建立相关技

术标准,强化对 mNGS 检测产品的规范化^[19-20]。

2 呼吸道病原体核酸检测推荐人群

根据各种核酸检测方法的优缺点,对呼吸道病原体核酸检测适用的人群推荐如下。

2.1 门诊患儿 (1)急性上呼吸道感染患儿,一般不常规进行呼吸道病原体的核酸检测,但对于有特异性抗病毒药物的病毒感染,如流感病毒,可视条件或在其他检测方法不能明确诊断时,使用核酸检测,有利于抗病毒药物的合理应用。(2)急性下呼吸道感染患儿,或有心肺等重要脏器的基础疾病、免疫功能异常的急性呼吸道感染患儿,建议根据患儿年龄、临床特征和发病季节等及时选用可疑病原的核酸检测方法进行病原学确定,尽快明确病原体,有助于患儿治疗方案的确定和后续管理。

2.2 急诊及住院患儿 (1)对有急诊适应证及所有因急性呼吸道感染性疾病住院、住院期间新出现呼吸道感染症状(伴或不伴发热)、或出现不明原因的呼吸窘迫、慢性心肺疾病急性恶化、血液病、肿瘤患儿出现中性粒细胞减少/缺乏伴发热的,应根据年龄、临床特征和发病季节等,推荐选择核酸检测方法进行病原学诊断,为鉴别诊断需要可采用多重核酸检测。(2)有急性呼吸道感染的危重症患儿,建议首选多重核酸检测。若常规核酸检测不能明确病原,推荐采用 mNGS 进行病原学检测,但其结果需要结合临床表现综合分析,必要时使用其他方法进一步验证。

3 呼吸道病原体核酸检测的标本类型及选择

3.1 适宜标本类型 (1)上呼吸道标本主要有鼻拭子(nasal swab, NS)、口咽拭子(oropharyngeal swabs, OPS)、鼻咽拭子(nasopharyngeal swab, NPS)、鼻咽吸取物(nasopharyngeal aspirates, NPA)、鼻腔洗液(nasal washing, NW)和咽洗液等。SARS-CoV-2 感染流行以来,上呼吸道各种标本的组合也得到了验证,使用 OPS 和前鼻孔取样的配对采集被证明与 NPS 采集的效能相当。唾液和咽喉漱口水等非侵入性方法易于采集,并可用于大规模人群监测,也被广泛关注^[21]。(2)下呼吸道标本主要为痰、气管吸取物、支气管镜检查获得的标本,包括肺泡灌洗液(broncho alveolar lavage fluid, BALF)和保护性毛刷标本等。(3)血液、胸腔积液、组织或局灶穿刺物等标本也可应用病原体核酸扩增检测(nucleic acid amplification test, NAAT)。

3.2 不同病原体检测的标本类型选择 根据使用试剂盒的要求选择合适的呼吸道感染病原体检测的标本类型,对于非试剂盒指定适宜的标本类型,事先应对试剂盒进行适用性评估。

3.2.1 病毒 上、下呼吸道标本及血液、胸腔积液等标本均可用来行病毒 NAAT。

3.2.2 细菌 (1)上呼吸道标本通常不推荐用于细菌 NAAT。但百日咳鲍特菌主要感染鼻咽部,因此 NPS 适宜用于百日咳 NAAT^[22],有报道显示 OPS 与 NPS 检测百日咳的敏感性一致^[23]。(2)诱导痰、气管吸取物和 BALF 等下呼吸道标本及无菌体液或组织标本是进行细菌 NAAT 的适宜标本^[24]。

3.2.3 非典型病原体 上、下呼吸道标本均适宜于肺炎支原体、肺炎衣原体和军团菌的 NAAT,但下呼吸道标本的结果更具病原学诊断价值。

3.2.4 真菌 怀疑下呼吸道真菌感染时,建议采集 BALF、无菌体液或组织标本进行真菌 NAAT;怀疑真菌性鼻窦炎时可酌情采集鼻窦分泌物和组织标本。

各种标本采集及转运方法见表 1,参照美国传染病学会和美国微生物学会 2018 年更新的“用于传染病诊断的微生物实验室使用指南”修订,供临床医师参考^[24]。

4 呼吸道病原体核酸检测结果解读及注意事项

4.1 常规核酸检测 常规核酸检测是序列依赖的核酸检测,只能扩增特异性引物所覆盖的核酸序列。随着多重核酸检测方法越来越多的使用,同一份标本中可能会同时检测出多种病原体,提示存在混合感染。临床医师需要结合不同病原体的季节流行特征、生物学特性和致病特点,核酸检测结果提示的病原体相对载量高低,患儿临床特征等进行综合分析,以明确哪一种病原体是主要病原体。

4.1.1 核酸检测阳性 上、下呼吸道标本的病原体核酸阳性结果在病毒、细菌、非典型病原体及真菌感染中的诊断价值有差别。若核酸检测阳性结果与临床表现严重不符,要注意是否有引物的特异性差和实验室污染等方面的问题,另外,痰液也有被上呼吸道病原污染的可能,临床医师需及时与实验室方面沟通。

4.1.1.1 病毒 急性期上或下呼吸道标本检测阳性,可提供病原学参考。由于部分病毒存在较高的无症状感染率,故上呼吸道标本的阳性结果要结合临床综合考虑,下呼吸道标本的病原学诊断价值更大。

4.1.1.2 细菌 下呼吸道标本、血液等无菌体液标本核酸阳性检测结果具有诊断价值;百日咳鲍特菌主要感染鼻咽部,上呼吸道标本检测阳性具有诊断意义。

4.1.1.3 非典型病原体 上、下呼吸道标本核酸检测阳性,多数情况下对肺炎支原体、肺炎衣原体和军团菌等非典型病原体具有诊断价值,但下呼吸道标本结果更具有病原学价值。

4.1.1.4 真菌 下呼吸道标本、无菌体液、器官组织、鼻窦分泌物等标本真菌检测阳性结果,具有诊断价值。

4.1.2 核酸检测阴性 (1)结合患儿临床表现除外某种病原体感染。(2)若临床高度提示某种病原体感染,但核酸检测阴性,要考虑标本是否合格、病原体可能存

表 1 呼吸道感染病原核酸检测推荐标本及转运注意事项

Table 1 Recommended specimens and transporting precautions of nucleic acid amplification test for respiratory pathogens

| 怀疑病原 | 标本 | 转运介质和时间 |
|--|--|--|
| 常见呼吸道病毒包括 HRSV、H1FV、HRV、HPIV、HAdV、HMPV 等 | 鼻咽拭子或鼻咽吸取物、鼻拭子或鼻腔洗液、咽洗液或口咽拭子,肺炎患儿还可选择支气管镜获取的标本 | VTM 或无菌容器,室温下 2 h 内或 4 ℃ 下 24 h 内或置于 -70 ℃ 下保存 |
| 巨细胞病毒 | 血浆、支气管肺泡灌洗液 | 支气管肺泡灌洗液:参照常见呼吸道病毒 血浆:EDTA 管,室温下 2 h 内 |
| 单纯疱疹病毒 | 支气管镜获取组织标本、肺组织 | 参照常见呼吸道病毒 |
| 肺炎支原体/肺炎衣原体 | 鼻咽拭子或鼻咽吸取物、口咽拭子或咽洗液,肺炎患儿还可选择支气管镜获取的标本 | M4 转运培养基或其他专属培养基,室温下 2 h 内或 4 ℃ 下 2 d 内或置于 -70 ℃ 下保存 |
| 军团菌 | 诱导痰、气管内抽取物、支气管镜获取标本 | 无菌容器,室温下 2 h 内或 4 ℃ 下 24 h 内 |
| 百日咳鲍特菌 | 鼻咽拭子或鼻咽吸取物、口咽拭子 | 无菌容器,室温下 24 h 内 |
| 结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌 | 胃液、痰液、诱导痰、支气管镜获取标本 | 无菌容器,室温下 2 h 内或 4 ℃ 下 24 h 内 |
| 其他细菌 | 肺炎患儿可选择支气管镜获取的标本 | 无菌容器,室温下 2 h 内或 4 ℃ 下 24 h 内 |
| 真菌 | 痰液或诱导痰、支气管镜获取的标本 | 无菌容器,室温下 2 h 内或 4 ℃ 下 24 h 内 |

注:HRSV:人呼吸道合胞病毒;H1FV:人流感病毒;HRV:人鼻病毒;HPIV:人副流感病毒;HAdV:人腺病毒;HMPV:人偏肺病毒;VTM:病毒转运液;EDTA:乙二胺四乙酸;NAAT:核酸扩增检测;怀疑酿脓链球菌、C 组和 G 组 β -溶血性链球菌、淋病奈瑟氏菌导致的急性咽炎时,可以采集口咽拭子行细菌 NAAT;M4 转运培养基含有凝胶、万古霉素、两性霉素 B 和多黏菌素 E,用于运送病毒、衣原体、脲原体 and 支原体;拭子条应采用聚酯纤维、人造丝或尼龙材料的拭子,避免采用海藻酸钙(海绵)拭子 HRSV: human respiratory syncytial virus; H1FV: human influenza virus; HRV: human rhinovirus; HPIV: human parainfluenza virus; HAdV: human adenovirus; HMPV: human metapneumovirus; VTM: virus transport medium; EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid; NAAT: nucleic acid amplification test; oral and pharyngeal swabs may be taken for bacterial NAAT when acute pharyngitis is suspected to be caused by *Streptococcus pyogenes*, group C or G β -hemolytic streptococcus, and *Neisseria gonorrhoeae*; the M4 transport medium contains gel, Vancomycin, Amphotericin B, and Polymyxins E, which is used for the transporting of viruses, chlamydia, ureaplasma, and mycoplasma; swab strips should be made of polyester fiber, rayon or nylon materials, while calcium alginate (sponge) swabs should be avoided

在变异、试剂的检测阈值和质量以及实验室检测等方面的问题,临床医师要及时与实验室反馈和沟通。

4.2 mNGS mNGS 的标准操作、数据分析、结果判读等尚无标准化流程,但随着 mNGS 技术在临床上的不断推广,国内临床和检验领域发布了一系列专家共识,对 mNGS 中存在的某些共性问题,尤其是结果报告和解读提出建议^[25-28]。mNGS 病原检测结果可向临床提供有效的线索,但存在一定的局限性,建议由具有一定生物信息学知识,并从事临床感染或临床微生物等专业人员,结合患儿临床背景、影像学资料、其他实验室检查结

果进行综合判断,避免盲目依据 mNGS 报告开展治疗,导致抗微生物药物的滥用^[26]。

4.2.1 报告内容 (1)报告病原体列表:建议按照细菌、病毒、真菌和寄生虫等病原体类型以及临床关注程度分类呈现,便于快速锁定目标病原;病原体信息应准确到种信息,同时应包含相应的属信息。(2)建议至少列出但不限于如下报告参数:检出序列数(reads 数)、基因组覆盖度、鉴定置信度、相对丰度等。reads 数指的是测序获得的碱基序列的数量,检测报告中常列出某微生物种属名下的序列数,即匹配到该病原体的序列数目,其多少与标本中病原体本身载量、人源序列比例有关;基因组覆盖度是表示检测到的该微生物核酸序列覆盖到该微生物整个基因序列的比值,覆盖度高表示该微生物全基因组测到的比率高;鉴定置信度是根据序列比对数、基因组大小和基因组保守性,判断样本中存在该微生物的可信度;相对丰度是指按照细菌、真菌、病毒和寄生虫进行分类,结合基因组大小,计算出该病原体在相应分类中的相对比例^[25-26]。

4.2.2 报告解读 由于呼吸道中广泛存在定植微生物,为提高解读准确性,在 mNGS 检出序列数和覆盖度的基础上,应结合采集样本类型、采样位置、患儿的临床特征、基于传统技术检测的病原体和辅助检查报告,综合判断致病菌、定植菌和背景菌。报告解读中尤其需要重点关注以下几个方面。

(1)样本质量:对结果正确的解读首先要建立在合格样本的基础上。采集的样本应是感染部位的体液或组织,并严格执行样本采集的无菌流程。污染防控对样本结果的质量控制至关重要。(2)对照质控:每批次实验中均应设立内参照、阴性对照品和阳性对照品。阴性对照或内参用于提示流程是否存在异常,有助于判断样本结果的假阳性。(3)检出阈值:有研究认为,在 mNGS 的临床诊断应用中,检出阈值设定方法为,病毒的序列中有 ≥ 3 条不同基因组区域的非重叠 reads,细菌、真菌和寄生虫 reads 数高于阴性对照的 10 倍及以上^[29]。但在实践应用中,由于 mNGS 病原诊断的阈值影响因素较多,包括测序平台、测序流程、标本类型、病原种类、患儿状况等,目前尚无统一共识性或标准的检出阈值。(4)基于基因序列数量的解读:根据测序原理,病原体的基因序列数越多,相对丰度越高,表示样本中检测到该病原体的可信度就越高。样本中某一种微生物检出的 reads 数越多,其为致病病原体的可能性越大。但不同病原微生物的基因组差异较大(寄生虫 > 真菌 > 细菌 > 病毒),核酸提取效率存在差异,因此不能仅依靠 reads 数多少来判断是否感染,需同时考虑病原微生物种类差异与致病特性。对于在核酸提取过程中破壁困难的微生物,如分枝杆菌属、真菌等,即使在检测报告中 reads

数较低,也要考虑其为致病微生物的可能性,应采用其他方法开展验证,如特异引物的 PCR、产物测序验证和血清学试验等。此外,如发现特殊罕见的病原体,即使其 reads 数很少,也应予以关注,建议开展验证。(5) 基于临床表征符合度的解读:若 mNGS 测序结果符合患儿的临床表现和其他实验室检查,推荐根据测序结果指导临床决策;若缺乏除 mNGS 测序结果外的其他实验室支持证据,应采用 PCR 技术对 mNGS 所检出病原进行复核,建议临床进一步开展传统实验室检查进行验证;若临床表现或实验室检查结果不支持 mNGS 结果,则不能仅根据 mNGS 测序结果进行诊断,而应以传统实验室检查结果为首要临床诊断参考依据。同时也需考虑方法学不一致导致的差异及样本类型和送检时间的影响。

5 核酸检测结果对临床用药指导价值

5.1 抗呼吸道病毒药物的应用原则

参考病原学结果,结合临床及流行病学资料谨慎选择抗病毒药物。目前特异性抗呼吸道病毒的药物不多,只有流感病毒、疱疹病毒等有明确的针对性药物。儿科医师应尽量明确病毒感染的病原学,严格掌握抗病毒药物的适应证,根据患儿病情轻重及药物本身理化性质,按照 5R 原则(正确的患者、正确的时间、正确的药物、正确的剂量及正确的给药途径)进行抗病毒治疗^[30]。

5.2 核酸检测阳性患儿,抗菌药物的应用和选择原则

(1) 在儿童呼吸道感染中,各种细菌、真菌、支原体和衣原体等的核酸阳性结果需要临床综合评估。若考虑为致病病原体,具体抗菌药物需根据当地耐药监测数据和可及性进行选择。有些病原已经可以通过核酸检测耐药基因/耐药突变的存在,如耐青霉素肺炎链球菌、碳青霉烯类耐药革兰阴性杆菌、耐大环内酯的肺炎支原体/百日咳鲍特菌、耐利福平的结核分枝杆菌等,这些结果对抗菌药物的选择有较好的参考意义,同时也要充分考虑患儿对治疗的实际反应。(2) 当病毒核酸检测阳性时,如果患儿出现重症的早期征象、早期抗病毒治疗临床好转后病情再次恶化或应用抗病毒治疗 3~5 d 仍无好转,应该经验性治疗可能合并的细菌感染,并在治疗的同时行进一步检查。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Liu L, Oza S, Hogan D, et al. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals [J]. *Lancet*, 2016, 388 (163):3027-3035. DOI:10.1016/S0140-6736(16)31593-8.
- [2] Notomi T, Okayama H, Masubuchi HA, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12):e63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63.
- [3] Tillmann RL, Simon A, Müller A, et al. Sensitive commercial NASBA assay for the detection of respiratory syncytial virus in clinical specimen [J]. *PLoS One*, 2007, 2(12):e1357. DOI:10.1371/journal.pone.0001357.
- [4] Guichón A, Chiparelli H, Martínez A, et al. Evaluation of a new NASBA assay for the qualitative detection of hepatitis C virus based on the NucleiSens Basic Kit reagents [J]. *J Clin Virol*, 2004, 29(2):84-91. DOI: 10.1016/s1386-6532(03)00091-x.
- [5] Clancy E, Coughlan H, Higgins O, et al. Development of internally controlled duplex real-time NASBA diagnostics assays for the detection of microorganisms associated with bacterial meningitis [J]. *J Microbiol Methods*, 2016, 127:197-202. DOI:10.1016/j.mimet.2016.06.017.
- [6] Reed AJ, Connelly RP, Williams A, et al. Label-free pathogen detection by a deoxyribozyme cascade with visual signal readout [J]. *Sens Actuators B Chem*, 2019, 282:945-951. DOI:10.1016/j.snb.2018.11.147.
- [7] Maffert P, Reverchon S, Nasser W, et al. New nucleic acid testing devices to diagnose infectious diseases in resource-limited settings [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2017, 36(10):1717-1731. DOI:10.1007/s10096-017-3013-9.
- [8] Jy V, Matheeußen V, Loens K, et al. Performance and ease of use of a molecular point-of-care test for influenza A/B and RSV in patients presenting to primary care [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2020, 39(8):1453-1460. DOI:10.1007/s10096-020-03860-5.
- [9] Abel G. Current status and future prospects of point-of-care testing around the globe [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2015, 15(7):853-855. DOI:10.1586/14737159.2015.1060126.
- [10] Carlton HC, Savović J, Dawson S, et al. Novel point-of-care biomarker combination tests to differentiate acute bacterial from viral respiratory tract infections to guide antibiotic prescribing: a systematic review [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2021, 27(8):1096-1108. DOI:10.1016/j.cmi.2021.05.018.
- [11] Goldberg B, Sichtig H, Geyer C, et al. Making the leap from research laboratory to clinic: challenges and opportunities for next-generation sequencing in infectious disease diagnostics [J]. *MBio*, 2015, 6(6):01815-01888. DOI:10.1128/mBio.01888-15.
- [12] Westblade LF, Belkum AV, Grundhoff A, et al. Role of clinicogenomics in infectious disease diagnostics and public health microbiology [J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54(7):1686-1693. DOI:10.1128/jcm.02664-15.
- [13] Miao Q, Ma Y, Wang Q, et al. Microbiological diagnostic performance of metagenomic next-generation sequencing when applied to clinical practice [J]. *Clin Infect Dis*, 2018, 67(suppl_2):S231-240. DOI:10.1093/cid/ciy693.
- [14] Gu W, Miller S, Chiu CY. Clinical metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection [J]. *Annu Rev Pathol*, 2019, 14:319-338. DOI:10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012751.
- [15] Carr VR, Chagusa C. Metagenomics for surveillance of respiratory pathogens [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(5):285. DOI:10.1038/s41579-021-00541-8.
- [16] Chiu CY, Miller SA. Clinical metagenomics [J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(6):341-355. DOI:10.1038/s41576-019-0113-7.
- [17] Briese T, Kapoor A, Mishra N, et al. Virome capture sequencing enables sensitive viral diagnosis and comprehensive virome analysis [J]. *MBio*, 2015, 6(5):e01415-01491. DOI:10.1128/mBio.01491-15.
- [18] Wylie TN, Wylie KM, Herter BN, et al. Enhanced virome sequencing using targeted sequence capture [J]. *Genome Res*, 2015, 25(12):1910-1920. DOI:10.1101/gr.191049.115.
- [19] 刘东来, 许四宏, 王佑春. 深入病原 mNGS 技术质量控制与评价研究, 探索建立创新型体外诊断试剂质量评价体系 [EB/OL]. (2021-07-06) [2022-01-15]. <http://www.cnpharm.com/c/2021-07-06/795369.shtml>.
- [20] Liu DL, Xu SH, Wang YC. Further study on the quality control and evaluation of pathogenic metagenomic next generation sequencing technology, and explore the establishment of an innovative in vitro diagnostic reagent quality evaluation system [EB/OL]. (2021-07-06) [2022-01-15]. <http://www.cnpharm.com/c/2021-07-06/795369.shtml>.
- [20] 中华预防医学会. 基于高通量测序的病原体筛查通用准则 (T/CMPA 010-2020) [J]. *中国病原生物学杂志*, 2021, 16(6):738-740. DOI:10.13350/j.cjpb.210626. Chinese Preventive Medicine Association. General criteria for pathogen screening based on high-throughput sequencing (T/CMPA 010-2020) [J]. *J Pathog Biol*, 2021, 16(6):738-740. DOI:10.13350/j.cjpb.210626.
- [21] Safiabadi TS, Leblanc JJ, Sadiq Z, et al. Tools and techniques for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 detection [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2021, 34(3):e00220-00228. DOI: 10.1128/CMR.00228-20.
- [22] 中华医学会儿科学分会感染学组,《中华儿科杂志》编辑委员会. 中国儿童百日咳诊断及治疗建议 [J]. *中华儿科杂志*, 2017, 55(8):568-572. DOI:10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2017.08.004. The Subspecialty Group of Infectious Diseases, the Society of Pediatrics, Chinese Medical Association; The Editorial Board, Chinese Journal of Pediatrics. Recommendation for diagnosis and treatment of Chinese children with pertussis [J]. *Chin J Pediatr*, 2017, 55(8):568-572. DOI:10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2017.08.004.

- [23] van der Zee A, Schellekens JF, Mooi FR. Laboratory diagnosis of pertussis[J]. Clin Microbiol Rev, 2015, 28(4): 1005-1026. DOI: 10.1128/CMR.00031-15.
- [24] Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, et al. A Guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology[J]. Clin Infect Dis, 2018, 67(6): 813-816. DOI: 10.1093/cid/ciy584.
- [25] 宏基因组分析和诊断技术在急危重症感染应用专家共识组. 宏基因组分析和诊断技术在急危重症感染应用的专家共识[J]. 中华急诊医学杂志, 2019, 28(2): 151-155. DOI: 10.3760/cma.j. issn. 1671-0282. 2019. 02. 005.
Expert Consensus Group of the Application of Metagenomic Analysis and Diagnostic Techniques in Acute and Critical Infections. Expert consensus on the application of metagenomic analysis and diagnostic techniques in acute and critical infections[J]. Chin J Emerg Med, 2019, 28(2): 151-155. DOI: 10.3760/cma.j. issn. 1671-0282. 2019. 02. 005.
- [26] 中华医学会检验医学分会临床微生物学组, 中华医学会微生物学与免疫学分会临床微生物学组, 中国医疗保健国际交流促进会临床微生物与感染分会. 宏基因组高通量测序技术应用于感染性疾病病原检测中国专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(2): 107-120. DOI: 10.3760/cma.j. cn114452-20201026-00794.
Clinical Microbiology Group of Chinese Society of Laboratory Medicine, Clinical Microbiology Group of Chinese Society of Microbiology and Immunology, Society of Clinical Microbiology and Infection of China International Exchange and Promotion Association for Medical and Healthcare. Chinese expert consensus on metagenomics next-generation sequencing application on pathogen detection of infectious diseases[J]. Chin J Lab Med, 2021, 44(2): 107-120. DOI: 10.3760/cma.j. cn114452-20201026-00794.
- [27] 《中华传染病杂志》编辑委员会. 中国宏基因组学第二代测序技术检测感染病原体的临床应用专家共识[J]. 中华传染病杂志, 2020, 38(11): 681-689. DOI: 10.3760/cma.j. cn311365-20200731-00732.
Editorial Board of Chinese Journal of Infectious Diseases. Clinical practice expert consensus for the application of metagenomic next generation sequencing[J]. Chin J Infect Dis, 2020, 38(11): 681-689. DOI: 10.3760/cma.j. cn311365-20200731-00732.
- [28] 中华医学会检验医学分会. 高通量宏基因组测序技术检测病原微生物的临床应用规范化专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(12): 1181-1195. DOI: 10.3760/cma.j. cn114452-20200903-00704.
Chinese Society of Laboratory Medicine. Expert consensus on clinical standardized application of metagenomics next-generation sequencing for detection of pathogenic microorganisms[J]. Chin J Lab Med, 2020, 43(12): 1181-1195. DOI: 10.3760/cma.j. cn114452-20200903-00704.
- [29] Miller S, Naccache SN, Erik S, et al. Laboratory validation of a clinical metagenomic sequencing assay for pathogen detection in cerebrospinal fluid[J]. Genome Res, 2019, 29(5): 831-842. DOI: 10.1101/gr.238170. 118.
- [30] 中国医院协会, 国家儿童医学中心(北京), 国家感染性疾病医疗质量控制中心, 等. 抗病毒药物在儿童病毒感染性呼吸道疾病中的合理应用指南[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2020, 35(19): 1441-1450. DOI: 10.3760/cma.j. cn101070-20200727-01254.
Chinese Hospital Association; National Center for Children's Health Quality Control Center; China National Medical Quality Control Center for Infectious Diseases, et al. Guidelines for the rational use of antiviral drugs in children with respiratory viral infectious diseases[J]. Chin J Appl Clin Pediatr, 2020, 35(19): 1441-1450. DOI: 10.3760/cma.j. cn101070-20200727-01254.

附录 A 儿童呼吸道感染病原学

1 常见呼吸道病毒及新发再发病毒

病毒是儿童呼吸道感染的主要病原体,包括常见呼吸道病毒及新发再发病毒,儿童呼吸道感染病毒种类至少涉及 7 个病毒科共 200 多个型别的病毒。

1.1 人呼吸道合胞病毒(human respiratory syncytial virus, HRSV) HRSV 是全球引起 5 岁以下儿童急性下呼吸道感染(acute lower respiratory tract infection, ALRTI)最重要的病毒病原体,占有儿童 ALRTI 的 22%^[1]。据估计,全球每年大约有 270 万~380 万 5 岁以下儿童因 HRSV 感染住院,引起约 4.8 万~7.5 万人死亡^[2]。

HRSV 属于肺炎病毒科,正肺病毒属,为非节段性单股负链 RNA 病毒。目前,ON1 和 BA9 基因型为我国及全球很多国家的优势流行基因型^[3-5]。

HRSV 感染呈全球广泛流行,其流行受地理位置、温度和湿度等因素影响。在北半球国家和地区,HRSV 的流行存在明显的流行季,主要集中于 11 月至次年 2 月的冬季和早春季;在热带和亚热带,HRSV 在潮湿的雨季感染率出现明显增高^[6]。我国北方地区 HRSV 流行季开始于第 41 周(10 月中旬),结束于次年第 20 周(5 月中旬),持续 33 周^[7]。

HRSV 感染在不同年龄人群临床表现差异很大,毛细支气管炎和肺炎是婴幼儿 HRSV 感染的重要疾病,严重者可发生呼吸衰竭,甚至死亡,年长儿 HRSV 感染可表现为症状轻微的上呼吸道感染或中耳炎^[8]。

1.2 人流感病毒(human influenza virus, HIFV) HIFV 是急性呼吸道感染的重要病原,全人群人普遍易感,儿童和老年人感染后危害最为严重,每年可引起季节性流行,亦可引起暴发疫情^[9]。

HIFV 可分为甲、乙、丙,共 3 型^[10]。甲型流感病毒依据其血凝素(hemagglutinin, HN)和神经氨酸酶(neuraminidase, NA)的亚型组合可进一步分为多种亚型,目前 HN 有 18 个亚型(H1 ~

H18), NA 有 11 个亚型(N1 ~ N11)^[11]。乙型流感病毒根据 HA 的抗原性可分为 Victoria 和 Yamagata 两个种系^[12]。引起季节性流行的 HIFV 主要有甲型 H1N1、H3N2 亚型和乙型的 Victoria 和 Yamagata 系 4 个亚型 HIFV。

HIFV 在全球呈广泛流行,但不同地区的 HIFV 型别和流行规模有所不同。我国甲型 HIFV 在北方省份以冬季为流行高峰,南方省份每年 4~6 月份出现流行高峰,而中部省份则呈现每年 1~2 月和 6~8 月双流行峰^[13-14]。

HIFV 感染后引起的临床表现轻重不一,包括无症状感染、上下呼吸道感染,重症病例可以迅速进展为肺炎,亦可并发心肌炎、脑膜炎或脑炎,甚至危及生命^[15]。

1.3 人副流感病毒(human parainfluenza virus, HPIVs) HPIVs 主要导致儿童和青少年呼吸道感染性疾病,是仅次于 HRSV 的第二大引起儿童呼吸道感染住院的病原体^[16]。

HPIVs 属于副黏病毒科(Paramyxoviridae),有 4 个血清型(HPIV1、2、3 和 4),HPIV1 和 HPIV3 属于呼吸道病毒属(Respirovirus genus),HPIV2 和 HPIV4 属于腮腺炎病毒属(Rubulavirus genus)。通常 HPIVs 的流行是散发的,无明显的季节性^[17]。

HPIVs 感染可引起鼻炎、咽炎、喉炎、气管支气管炎、细支气管炎和肺炎等,也可引发鼻窦炎和中耳炎^[18]。

1.4 人鼻病毒(human rhinovirus, HRV) HRV 长期以来被认为是“普通感冒”的主要病原体,主要引起上呼吸道感染。据统计,每年有 30%~50% 的呼吸道感染疾病与 HRV 感染有关^[19]。儿童是 HRV 的易感人群,据报道,有 60%~80% 在急诊科就诊的哮喘发作患儿伴有 HRV 感染^[20-21],在 3 岁以下被诊断为毛细支气管炎的住院儿童病例中,有大约 50% 的婴儿感染或合并感染 HRV^[22],而几乎所有婴儿在出生后均会经历至少 1 次的 HRV 感染^[23]。

HRV 属小核糖核酸 RNA 病毒科,肠道病毒属。截至目前已

经发现了 A、B、C 3 个种共 169 个型别。HRV 在全球范围内流行,一年四季均可发病。

HRV 感染后主要表现为普通感冒症状,可引起喘息和哮喘急性加重^[24]。引起婴幼儿的支气管炎和毛细支气管炎。

1.5 人腺病毒 (human adenovirus, HAdV) HAdV 可分为 7 个种 (A~G) 和至少 104 个基因型^[25],其中与呼吸道感染相关的 HAdV 主要型别为 B 种 (HAdV-3, 7, 11, 14, 16, 21, 50, 55), C 种 (HAdV-1, 2, 5, 6) 和 E 种 (HAdV-4)^[26]。HAdV-3 和 HAdV-7 型是引起我国儿童呼吸道 HAdV 感染最常见的血清型, HAdV-55 是引起成人 HAdV 社区型肺炎最常见的型别。

HAdV 感染一年四季均可发生,在我国北方以冬春季节多见,南方以春夏季节常见^[27]。HAdV 传染性较强,常可引起暴发流行。

HAdV 感染可表现为上下呼吸道感染。HAdV 是儿童重症肺炎的重要病原体,导致危重患者出现休克、呼吸衰竭、弥散性血管内凝血等,甚至导致死亡^[26]。

1.6 人偏肺病毒 (human metapneumovirus, HMPV) HMPV 是导致儿童呼吸道感染的重要病毒病原之一。在急性呼吸道感染住院患者中, HMPV 感染约为 6.24%^[28]。

2017 年国际病毒分类委员会将 HMPV 种属划分为肺病毒科 (Pneumoviridae), 偏肺病毒属^[29]。根据 HMPV F、G 蛋白基因序列的差异,将 HMPV 分为 A1、A2a、A2b、A2c、B1 和 B2 共 6 个基因型^[30]。

HMPV 在热带地区全年活跃,在温带气候地区, HMPV 季节性流行发生在冬季和春季,在 3 月和 4 月达到顶峰,其流行高峰与 HRSV 重叠或稍晚于后者^[31]。

HMPV 感染患者临床症状与 HRSV 感染相似,严重者可发展为细支气管炎和肺炎^[32]。有研究表明儿童 HMPV 感染可能与中枢神经系统疾病相关,如癫痫、脑炎等^[33]。

1.7 人冠状病毒 (human coronavirus, HCoV) HCoV 是人类上呼吸道感染常见病原体。普通感冒中有 15%~30% 是由 HCoV 引起的^[34]。HCoV 属于套式病毒目 (Nidovirales), 冠状病毒科 (Coronaviridae), 冠状病毒属 (Coronavirus), 分为 4 个属: α -HCoV、 β -HCoV、 γ -HCoV 和 δ -HCoV^[35]。HCoV 可分为普通人冠状病毒 (HCoV-NL63、HCoV-HUK1、HCoV-OC43、HCoV-N229E) 及高致病性冠状病毒[严重急性呼吸综合征 (severe acute respiratory syndrome, SARS)-CoV、中东呼吸综合征 (Middle East respiratory syndrome, MERS)-CoV 和严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 等]。

1.7.1 普通 HCoV 引起儿童呼吸道感染的常见普通 HCoV 有 4 种,分别为 α 属的 HCoV-229E、HCoV-NL63, β 属的 HCoV-OC43、HCoV-HUK1。

HCoV 感染呈全年流行。不同型别的 HCoV 在不同地区流行特点具有差异性,流行高峰随地理区域有所不同,有一定的季节差异。北京地区 HCoV-OC43 感染多发于春季 (4 月和 5 月), HCoV-229E 的流行高峰是在 2 月^[36]。在上海地区 HCoV-OC43 感染多发于夏秋季, HCoV-NL63 感染多发生于秋冬季节^[37]。在中国香港地区 HCoV-OC43 感染主要发生在秋冬季, HCoV-HUK1 在冬季检出更多, HCoV-229E 多发生于冬春季节, HCoV-NL63 感染多发生于夏秋季^[38]。

这 4 种 HCoV 通常引起上呼吸道感染,多为自限性,但在婴幼儿、老年人或免疫缺陷患者也可引起严重的下呼吸道感染,表

现为喘息、气促等。

1.7.2 高致病性冠状病毒 SARS 是由 SARS-CoV 感染引起的一种严重的致死性传染病,于 2002 年 11 月,在我国广东省首次报道。随后, SARS 病例数在我国大幅增加,并在全球蔓延,超过 30 个国家和地区相继出现病例^[39]。2003 年 7 月,世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 宣布其流行结束。全球 SARS 病例数达到 8 437 例,死亡 813 例,病死率约为 10%。SARS-CoV 感染起病迅速,常见的早期症状包括发热、畏寒、咳嗽、身体不适、肌肉疼痛和头痛等,可发展为进行性呼吸困难和低氧血症,严重者可造成急性呼吸窘迫综合征 (ARDS),患者常因肺部损伤导致呼吸衰竭而死亡^[40]。与成人相比,儿童发病率低,且多为散发,患儿一般与 SARS 成人有密切接触史,未见在学校、托幼机构内流行;临床表现较轻,预后较好,一般没有远期严重并发症,未见死亡病例报道。

MERS 是由 MERS-CoV 引起的一种严重的致死性传染病,于 2012 年 9 月在沙特阿拉伯王国首次报道^[41]。截至 2020 年,全球约 27 个国家报道过该疾病,其中沙特阿拉伯、阿拉伯联合酋长国和韩国疫情最为严重。截至 2019 年 11 月 30 日,全球总计 2 494 例实验室确诊病例和 858 例死亡病例。我国于 2015 年 5 月 29 日确诊了首例由韩国输入的病例。MERS-CoV 的潜伏期为 2~14 d,平均 5~7 d,起病急,病情进展迅速;早期主要表现为发热、畏寒、乏力、头痛、肌痛等,随后出现咳嗽、胸痛、呼吸困难,部分病例还可出现呕吐、腹痛、腹泻等症状;重症病例多在 7 d 内进展为重症肺炎,可发生 ARDS、急性肾衰竭,甚至多脏器功能衰竭等危及生命。MERS 致死率较高,死亡率约为 37%。老年人、免疫力较差或有基础疾病的患者病情较重,病程进展较快,预后较差。儿童发病率低,且大多数为无症状感染,死亡率较低,预后较好^[42]。

SARS-CoV-2 是引起新型冠状病毒肺炎 (coronavirus disease 2019, COVID-19) 的病毒病原体。自 2020 年 3 月 11 日,WHO 宣布 COVID-19 大流行,至今已 1.5 年的时间。目前,全球正处于第 3 次高峰的高位平台期。截至 2021 年 11 月 29 日,全球累计报告确诊病例超过 2.5 亿,死亡病例 515 万多例,病死率约为 2.1%。

SARS-CoV-2 属于冠状病毒科, β 冠状病毒属。依据 SARS-CoV-2 的流行程度,WHO 于 2021 年 2 月 25 日提出了关切变异株 (variant of concern, VOC) 和关注变异株 (variant of interest, VOI) 的定义。目前,WHO 界定的 VOC 为 4 种,分别为 Alpha (B. 1. 1. 7 及其亚分支)、Beta (B. 1. 351 及其亚分支)、Gamma (P. 1 及其亚分支) 和 Delta (B. 1. 617. 2 及其亚分支) 变异株; VOI 为 5 种,分别为 Eta (B. 1. 525)、Iota (B. 1. 526)、Kappa (B. 1. 617. 1)、Lambda (C. 37 和 C. 37. 1) 和 Mu (B. 1. 621 和 B. 1. 621. 1) 变异株^[43]。目前,Delta 变异株为全球优势流行毒株。

SARS-CoV-2 主要传播途径为呼吸道飞沫和密切接触传播,接触病毒污染的物品也可造成感染,在相对封闭的环境中暴露于高浓度气溶胶情况下存在经气溶胶传播可能^[44]。病毒在宿主外不能繁殖,但可在短期内存活,存活时间主要与湿度、温度和材质有关。在相同的材质下,低温干燥的环境有利于病毒的存活。因此,污染了 SARS-CoV-2 的冷链产品可通过国际贸易远距离跨国、跨地区和跨大洋传播^[45]。

SARS-CoV-2 感染的临床表现差异很大,从无症状到死亡。确诊病例临床可分为轻型、普通型、重型、危重型。轻型患者症状很轻微,无肺炎表现;普通型有发热和呼吸道症状,影像有肺炎证

据;重症患者气促、缺氧、肺部影像学进展迅速;危重型会出现呼吸衰竭、休克或合并其他脏器衰竭^[46]。

1.8 人博卡病毒 (human bocavirus, HBoV) HBoV 属于细小病毒科,细小病毒亚科,博卡病毒属。目前为止发现 4 个基因型 HBoV(HBoV1~4)。

HBoV 所引起的呼吸道感染疾病四季均可发生,季节性不明显。

HBoV 呼吸道感染所致临床表现与呼吸道其他病毒相比无特异性,轻者可无症状,或发热、流涕、咳嗽等,重者可致喘息、呼吸困难等,甚至死亡。

1.9 人肠道病毒 (human enterovirus, HEV) HEV 在急性呼吸道感染中阳性检出率为 4.7%~16.2%,EV-D68 是公共卫生关注的一种肠道病毒病原体。

HEV 属小核糖核酸 RNA 病毒科,肠道病毒属。基因组结构为单股正链 RNA,可分为 HEV-A($n=25$),HEV-B($n=63$)、HEV-C($n=23$)和 HEV-D($n=5$)4 组。

HEV 全年散发,各月份均有检出。但在急性呼吸道感染中,HEV 在我国流行具有明显的季节性,高峰期主要集中在 4~7 月,年龄分布主要在 5 岁以下。

HEV 大多数血清型对人类可致病,既可表现为无症状或上下呼吸道感染,也可引起包括急性出血性结膜炎、病毒性脑炎、急性迟缓性麻痹、病毒性心肌炎等严重疾病。

2 常见细菌

引起儿童呼吸道感染的常见细菌有 A 族链球菌、肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、流感嗜血杆菌、百日咳鲍特菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、结核分枝杆菌、铜绿假单胞菌等。这些常见细菌性呼吸道感染季节性并不明显,可能多见于季节变换的时期。

2.1 A 族链球菌 具有 β 溶血性特点,也称为 A 组 β 溶血性链球菌,是致病力最强的链球菌。其主要致病因子包括链球菌 M 蛋白、溶血素和胞外酶等。在呼吸系统主要引起上呼吸道感染,包括咽扁桃体炎、化脓性中耳炎、鼻窦炎等,较少引起肺炎和胸膜炎。该菌可致链球菌感染后肾小球肾炎和急性风湿热。

2.2 肺炎链球菌 定植在人上呼吸道,可通过飞沫传播,其侵袭力主要为荚膜,溶血毒素 (haemolysin, HL) 和 NA 也是其主要致病因子,多引起呼吸道疾病;根据肺炎链球菌表面荚膜多糖抗原的差异,可分为不同血清型,目前已知有 100 种血清型,目前引起我国儿童感染的主要有 19F、19A、23F、14、6A 和 6B 型等;可以引起上下呼吸道感染,是儿童社区获得性肺炎最常见的细菌性病原。WHO 建议将肺炎链球菌疫苗纳入婴儿常规免疫计划,对所有 <2 岁的儿童进行肺炎链球菌疫苗接种,以预防由该菌引起的多种感染。

2.3 流感嗜血杆菌 是一种多形性革兰阴性杆菌,常定植于人上呼吸道,有 3 种主要抗原成分,型特异性荚膜多糖抗原 (M 抗原)、型特异性菌体抗原 (S 抗原) 和种特异性菌体抗原 (R 抗原),分为可分型 (有荚膜) 和不可分型 (无荚膜) 两类菌株,有荚膜流感嗜血杆菌分为 a、b、c、d、e、f 6 个血清型,其中 b 血清型致病力最强, f 型次之。目前全球范围内致病型别以无荚膜型最为常见,是急性中耳炎、急性上颌窦炎、迁延性细菌性支气管炎、肺炎的重要病因。疫苗可以预防 b 型流感嗜血杆菌疾病。

2.4 金黄色葡萄球菌 金黄色葡萄球菌在显微镜下排列成葡萄串状,无芽孢,鞭毛,大多数无荚膜,常见于皮肤表面和上呼吸道黏膜,约 30% 的人可在鼻腔,特别是鼻前庭后部携带该细菌;产生并分泌外毒素休克综合征毒素 1 (toxic shock syndrome toxin-1,

TSST-1) 和肠毒素,特别是杀白细胞素 (panton-valentine leukocidin, PVL),是一种具有强效细胞溶解及炎症活性的打孔毒素,另外 HL、表皮剥脱素和耐热核酸酶也是金黄色葡萄球菌的毒力因子。金黄色葡萄球菌致病特点之一是引起化脓,造成组织坏死和脓肿。除了可以引起上呼吸道感染外,还可以导致支气管炎、肺炎、肺脓肿、肺大疱、胸膜炎等。由于广泛使用抗生素,耐药性 (mecA) 的传播越来越受到医疗机构的重视。

2.5 百日咳鲍特菌 是百日咳的病原体,人类是其唯一宿主,通过呼吸道飞沫传播,传染性强,易感人群主要集中在 1 岁以下婴儿,其致病物质包括荚膜、菌毛、内毒素和多种生物活性物质。百日咳毒素是主要的致病毒素。细菌附着在上呼吸道的纤毛上,释放毒素,从而损害纤毛并导致气道肿胀。尽管全球范围常年维持较高的疫苗接种率,近一二十年来多个国家地区出现了明显的百日咳再现。百日咳鲍特菌导致肺炎的比例为 25%~88%,部分合并肺不张,极少见侵袭致胸膜炎^[47-49]。

2.6 大肠埃希菌 为革兰阴性杆菌,是一大群多样的细菌,大多数位于肠道内的大肠埃希菌为非致病性菌株,部分大肠埃希菌群含有毒力因子,可发生胃肠道外传播及致病;目前基于主要表面抗原可分为约 190 个血清群,某些种类的大肠埃希菌会导致腹泻,部分种类可致尿路感染,在呼吸系统常致新生儿和小婴儿肺炎,可伴有脓胸,较少致肺脓肿,多在医院环境下发生。

2.7 肺炎克雷伯菌 是肠杆菌科克雷伯杆菌属的一种细菌,属于人类口腔和肠道正常菌群,在致病性克雷伯杆菌中,肺炎克雷伯杆菌感染最为多见,是社区和医院获得性肺炎的重要细菌性病原,尤其是碳青霉烯耐药和高毒力肺炎克雷伯菌,肺部可形成空洞、单个或多个脓腔,与其他细菌比较,并发菌血症机会多。临床实验室分离的肺炎克雷伯菌主要分为 3 个亚种,分别为肺炎克雷伯菌肺炎亚种、肺炎克雷伯菌硬鼻亚种和肺炎克雷伯菌臭鼻亚种。

2.8 结核分枝杆菌 结核病是由一群关系密切的分枝杆菌引起的,统称为结核分枝杆菌复合群,包含至少 13 个成员,最常见的为人型、牛型、非洲型及鼠型,对人致病主要为人型,其次为牛型,在呼吸道主要导致原发性肺结核、血型播散性肺结核、支气管内膜结核及胸膜炎等。耐多药结核分枝杆菌是由至少对异烟肼和利福平这两种最有效的结核药物有抗药性的病菌引起,成为危害人类健康的重要病原。

2.9 铜绿假单胞菌 是一种非发酵革兰阴性杆菌,在自然界分布广泛,各种水、空气、正常人的皮肤、呼吸道和肠道等均有本菌存在。为条件致病菌,是医院内感染的主要病原菌之一。主要的致病因子包括绿脓菌素、脂多糖、弹性蛋白酶和外毒素 A,外毒素 A 是最主要的致病因子,经常引起术后伤口感染,也可引起褥疮、脓肿、化脓性中耳炎等;亦是呼吸机相关性肺炎的常见原因。

3 非典型病原体

儿童呼吸道感染的非典型病原体主要包括肺炎支原体 (Mycoplasma pneumoniae, MP)、肺炎衣原体 (Chlamydia pneumoniae, CP)、沙眼衣原体 (Chlamydia trachomatis) 及嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*, LP)。

3.1 支原体 是一类无细胞壁、多形性、可通过滤菌器的原核细胞型微生物。是目前所知的能在无生命培养基中繁殖的最小的微生物。其属于柔膜体纲支原体目下的支原体属^[50]。其中 MP 是呼吸道感染的常见病原体之一。全球感染率达 9.6%~66.7%,且有逐年增高的趋势。全年发病,冬季更多见,每 3~7 年发生一

次大流行。MP 感染以学龄儿童多见,潜伏期为 2~3 周,突出表现为阵发性刺激性咳嗽,以夜间为重,咳少量黏痰或黏液脓性痰,有时痰中带血,也可有呼吸困难、胸痛。发热可持续 2~3 周,体温正常后仍可遗有咳嗽。严重 MP 感染可出现肺内肺外并发症的重症肺炎^[51]。

3.2 衣原体 是一群体积较小,能通过细菌滤器,细胞内专性寄生,并有独特发育周期的原核细胞型微生物,属于衣原体目衣原体科衣原体属。根据衣原体的抗原构造和 DNA 同源性的特点,将衣原体属分为 4 个种,包括沙眼衣原体、CP、鹦鹉热衣原体和家畜衣原体。能引起人类致病的主要是前 3 种。其中沙眼衣原体可分 3 个生物亚种,可引起结膜炎和婴幼儿肺炎。CP 只有 1 个血清型,即 TWAR 组,CP 传播方式主要是人与人之间经飞沫或呼吸道分泌物传播,常可呈地方性、散发性流行。CP 引起的呼吸道感染约 70% 是无症状的或仅具有轻度症状,约 30% 为社区获得性肺炎。

3.3 军团菌 系需氧革兰阴性杆菌,广泛存在于湖泊和河流等天然水源及土壤中,也可在冷热水管道等人造水系统中繁殖^[1]。目前已知军团菌属有 58 个种和 3 个亚种,70 个血清型,能引起人类疾病的约有 30 种,其中与人类疾病关系最密切的是 LP,已确认有 15 个血清型,其中 1 型和 6 型最为常见,在欧美国家感染病例中,1 型占 80%。LP 在自然界存活时间长,常在宿主免疫能力下降时依靠胞内寄生功能产生致病性,全年均可发病,夏秋季多,各年龄段均可以发病,成人发病高于儿童,男多于女。LP 能引起社区获得性肺炎,特别是重症肺炎,还可引起医院内感染和旅游性肺炎,其潜伏期大约为 2~14 d。可能出现前驱疾病,症状包括头痛、肌痛、虚弱和厌食。除了一些免疫功能低下的患者外,通常会出现发热,并且通常伴有相对的心动过缓。肺炎患者出现胃肠道和神经系统表现应提示军团病。胃肠道症状可能很突出,包括腹泻、恶心、呕吐和腹痛。约 50% 的患者咳嗽时会产生脓痰,并可能出现胸膜炎性胸痛。头痛可能很突出,并伴有意识模糊、癫痫发作和局灶性神经系统表现^[52-53]。

4 主要真菌 (Fungi)

真菌是一种具有真核、能产孢、无叶绿体的真核生物^[54]。目前儿童呼吸道真菌感染的常见种类为假丝酵母菌属 (*Candida*)、荚膜组织胞浆菌 (*Histoplasma capsulatum*)、皮炎芽生菌 (*Blastomyces dermatitidis*)、球孢子菌属 (*Coccidioides*)、曲霉菌 (*Aspergillus*) 和新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*) 等^[55-56]。真菌侵袭性感染常见于免疫功能受损时,尤其是各种免疫功能缺陷病、中性粒细胞减少、接受长期免疫抑制治疗及人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染的儿童;某些特殊情况下,如糖尿病酮症酸中毒患者的血清可刺激毛霉菌的生长。呼吸道真菌感染无明显季节特点。

由于全球气候变化和人类活动范围的扩大,真菌感染的流行病学也在发生变化。组织胞浆菌病和球孢子菌病在北美比较多见,芽生菌病和孢子丝菌病在北美和世界其他地区引起散发性病例,东南亚地区马尔尼菲青霉菌 (*Penicillium marneffei*) 病在免疫缺陷(如获得性免疫缺陷综合征)患儿中比较常见,而在南美洲,副球孢子菌经常引起皮肤和骨关节的感染^[57]。

4.1 假丝酵母菌感染 假丝酵母菌属菌体呈圆形或卵圆形,直径 3~6 μm ,革兰阳性,着色不均匀。可形成芽生孢子和假菌丝,经培养假菌丝中间或顶端可形成厚膜孢子。具有侵袭性的菌株在体内易形成假菌丝。

多种假丝酵母菌都能引起临床症状,但儿童以白色假丝酵母菌 (*Candida albicans*) 感染最常见。临床表现不一,可表现为局部黏膜感染,也可表现为广泛性播散,累及多系统器官。口咽假丝酵母菌病(鹅口疮)常见于小婴儿,也可见于使用抗菌药物、吸入性糖皮质激素(治疗哮喘或鼻炎)、化疗或放疗的年龄较大儿童以及有细胞免疫缺陷的儿童。侵袭性假丝酵母菌病尚与气管插管、中心静脉置管等有关^[58-59]。

4.2 荚膜组织胞浆菌感染 荚膜组织胞浆菌在自然界广泛分布,在被鸟类或蝙蝠粪便污染的土壤中最容易增殖。35 $^{\circ}\text{C}$ 培养时,可见直径 3~5 μm ,大小均匀的梨形孢子,人体感染荚膜组织胞浆菌后,一般可在巨噬细胞内或其周围发现其孢子,直径约 2~4 μm ,卵圆形,大小均一。

大多数病例是在较大的暴露后数周发病,临床表现较轻,除发热外,体格检查通常无明显异常,但也可能发现啰音或实变证据。某些急性组织胞浆菌病患者可表现出流感样症状,伴呼吸道症状和影像学异常。症状通常在数周内缓解,但疲劳和乏力可能持续数月,尤其是病情更严重者。X 线影像学通常显示局灶性浸润及纵隔或肺门淋巴结大^[60]。组织胞浆菌病经常被误诊为社区获得性肺炎,只有在经验性抗菌药物治疗无效后才会考虑该诊断。

4.3 隐球菌属感染 隐球菌在世界范围内广泛分布,其中新型隐球菌感染最为多见,其为圆形或卵圆形,单芽,厚壁,有宽阔、折光性的胶质样荚膜。隐球菌大小相差很大,一般直径多为 4~7 μm ,有些直径可达 20 μm 。周围荚膜由黏多糖组成,厚约 3~5 μm 。

隐球菌已成为一个重要的真菌感染病原体,可见于免疫功能正常的儿童。中枢神经系统和肺部是两个最常受累的器官,可表现为致命性脑膜脑炎和/或肺炎^[61]。咳嗽、呼吸困难和胸痛是最常见的肺部感染症状,但胸部影像学显示肺部结节或隐球菌性肉芽肿的儿童也可能无呼吸道症状^[62]。除了累及中枢神经系统和肺部,隐球菌还可累及皮肤、软组织、骨、关节、骨髓和淋巴结等,腹腔内隐球菌病少见。

4.4 曲霉菌感染 曲霉菌是一种典型的丝状菌,主要以枯死的植物、动物的排泄物及动物尸体为营养源。曲霉菌丝有隔膜,直径 3~6 μm ,分支呈锐角 45 $^{\circ}$,菌丝两侧平行。

曲霉菌感染多见于宿主免疫抑制情况下。侵袭性曲霉菌病最常累及肺部。患儿表现出多种症状和体征,包括发热、胸痛、呼吸急促、咳嗽和/或咯血。中性粒细胞减少的肺曲霉菌病患者存在典型三联征:发热、胸痛和咯血。胸部影像学检查常见肺结节和/或浸润影^[63]。烟曲霉亦可引起变应性支气管肺曲霉菌病 (allergic bronchopulmonary aspergillosis, ABPA),急性期主要为咳嗽、喘息、咯痰、咯血及发热。可咯出棕色痰栓。曲霉菌可以引起中枢神经系统感染。

4.5 毛霉菌 (Mucor) 感染 毛霉菌在土壤、粪便、禾草及空气等环境中存在。菌丝粗大不规则,无隔、多核、分枝状,直径约 5~60 μm ,不产生定形菌落。

毛霉菌感染在儿童中发病率逐渐升高,与免疫受损或其他免疫抑制患儿生存率的提高有关^[64]。毛霉菌病的特征为菌丝侵犯血管系统导致宿主组织梗死和坏死。糖尿病酮症患儿容易发生鼻脑型毛霉菌病或肺毛霉菌病,这是一种罕见但通常致死的真菌感染^[65]。鼻脑型毛霉菌病表现为急性鼻窦炎,伴发热、鼻充血、脓性鼻分泌物、头痛和鼻窦区疼痛。所有鼻窦均受累,并蔓延至邻近结

构。肺毛霉菌病主要表现为发热伴咯血,亦有肺梗死及血栓形成。

4.6 马尔尼菲蓝状菌感染 马尔尼菲蓝状菌,原名马尔尼菲青霉菌,是双相型真菌,在 30 °C 时呈现为菌丝形态,而在 37 °C 时则为酵母形态。在细胞内菌体呈卵圆形、椭圆形,其大小形状一致,直径约 2 μm。而游离于组织细胞外的菌则具有多形性,大小形状差异大,直径为 1~8 μm。

马尔尼菲蓝状菌可引起全身性真菌感染,主要来自东南亚和中国南方,在免疫功能低下者中会发生蓝状菌病^[66]。马尔尼菲蓝状菌的传播方式仍不明确。症状和体征不一,轻则为单纯性皮肤病变,重则发生呼吸衰竭和循环衰竭,儿童和成人的表现相似^[67]。呼吸系统受累患儿可出现咳嗽、发热、呼吸困难和胸痛,胸片可显示弥漫性网状结节浸润、局限性或弥漫性肺泡浸润。

附录 B 核酸检测常用名称术语^[68]

1 核酸(nucleic acid) 由核苷酸或脱氧核苷酸通过 3',5'磷酸二酯键连接而成的一类生物大分子。具有非常重要的生物功能,主要是贮存遗传信息和传递遗传信息。包括核糖核酸(RNA)和脱氧核糖核酸(DNA)两类。

2 引物(primer) 有固定长度并与待扩增目标 DNA/RNA 存在互补序列的寡聚核苷酸。

3 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR) 一种体外进行 DNA 片段扩增的方法。当存在模板 DNA、底物、上下游引物和耐热的 DNA 聚合酶时,经过多次“变性-复性-延伸反应”的循环过程,模板 DNA 可扩增至几百万倍。

4 病原体(pathogens) 指致人类或动植物感染性疾病的生物总称,包括细菌、病毒、寄生虫、真菌等微生物或其他生物体。

5 宏基因组(metagenome) 标本中全部生物(宿主、微生物等)遗传物质的总和,也称元基因组。

6 高通量测序(high-throughput sequencing) 以一次并行几十万至几十亿条甚至更多核酸分子序列测定为标志,适用于 DNA 或 RNA 的测序技术。

7 读序(reads) 高通量测序平台产生的碱基和质量值组成的字符串。

参考文献

- Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet*, 2010, 375 (9725): 1545-1555. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60206-1.
- Shi T, Mcallister DA, O'brien KL, et al. Global, regional, and National disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study [J]. *Lancet*, 2017, 390 (198): 946-958. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)30938-8.
- Song J, Zhang Y, Wang H, et al. Emergence of ON1 genotype of human respiratory syncytial virus subgroup A in China between 2011 and 2015 [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 5501. DOI: 10.1038/s41598-017-04824-0.
- Song J, Wang H, Shi J, et al. Emergence of BA9 genotype of human respiratory syncytial virus subgroup B in China from 2006 to 2014 [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 16765. DOI: 10.1038/s41598-017-17055-0.
- Chen XP, Zhu Y, Wang W, et al. A multi-center study on molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus from children with acute lower respiratory tract infections in the Mainland of China between 2015 and 2019 [J]. *Virol Sin*, 2021, 36 (6): 1475-1483. DOI: 10.1007/s12250-021-00430-7.
- Liu W, Chen D, Tan W, et al. Epidemiology and clinical presentations of respiratory syncytial virus subgroups A and B detected with multiplex real-time PCR [J]. *PLoS One*, 2016, 11(10): e0165108. DOI: 10.1371/

journal.pone.0165108.

- Yu J, Liu C, Xiao Y, et al. Respiratory syncytial virus seasonality, Beijing, China, 2007-2015 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2019, 25 (6): 1127-1135. DOI: 10.3201/eid2506.180532.
- Perk Y, Özdil M. Respiratory syncytial virus infections in neonates and infants [J]. *Turk Pediatri Ars*, 2018, 53 (2): 63-70. DOI: 10.5152/TurkPediatriArs.2018.6939.
- Nair H, Brooks WA, Katz M, et al. Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young children: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet*, 2011, 378 (987): 1917-1930. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)61051-9.
- Krammer F, Smith G, Fouchier R, et al. Influenza [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4(1): 3. DOI: 10.1038/s41572-018-0002-y.
- Pleschka S. Overview of influenza viruses [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2013, 370: 1-20. DOI: 10.1007/82_2012_272.
- Caini S, Kroneman M, Wieggers T, et al. Clinical characteristics and severity of influenza infections by virus type, subtype, and lineage: a systematic literature review [J]. *Influenza Other Respir Viruses*, 2018, 12(6): 780-792. DOI: 10.1111/irv.12575.
- Yu H, Alonso WJ, Feng L, et al. Characterization of regional influenza seasonality patterns in China and implications for vaccination strategies: spatio-temporal modeling of surveillance data [J]. *PLoS Med*, 2013, 10(11): e1001552. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001552.
- Zou J, Yang H, Cui H, et al. Geographic divisions and modeling of virological data on seasonal influenza in the Chinese mainland during the 2006-2009 monitoring years [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58434. DOI: 10.1371/journal.pone.0058434.
- Mertz D, Kim TH, Johnstone J, et al. Populations at risk for severe or complicated influenza illness: systematic review and meta-analysis [J]. *BMJ*, 2013, 347: f5061. DOI: 10.1136/bmj.f5061.
- Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus [J]. *N Engl J Med*, 2001, 344(25): 1917-1928. DOI: 10.1056/NEJM200106213442507.
- Linster M, Do L, Minh N, et al. Clinical and molecular epidemiology of human parainfluenza viruses 1-4 in children from Viet Nam [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 6833. DOI: 10.1038/s41598-018-24767-4.
- Branche AR, Falsey AR. Parainfluenza virus infection [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2016, 37 (4): 538-554. DOI: 10.1055/s-0036-1584798.
- Heikkinen T, Järvinen A. The common cold [J]. *Lancet*, 2003, 361 (9351): 51-59. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)12162-9.
- Zheng SY, Wang LL, Ren L, et al. Epidemiological analysis and follow-up of human rhinovirus infection in children with asthma exacerbation [J]. *J Med Virol*, 2018, 90(2): 219-228. DOI: 10.1002/jmv.24850.
- Heymann PW, Carper HT, Murphy DD, et al. Viral infections in relation to age, atopy, and season of admission among children hospitalized for wheezing [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 114(2): 239-247. DOI: 10.1016/j.jaci.2004.04.006.
- Vandini S, Biagi C, Fischer M, et al. Impact of rhinovirus infections in children [J]. *Viruses*, 2019, 11(6): 521. DOI: 10.3390/v11060521.
- van der Zalm MM, Wilbrink B, van Ewijk BE, et al. Highly frequent infections with human rhinovirus in healthy young children: a longitudinal cohort study [J]. *J Clin Virol*, 2011, 52(4): 317-320. DOI: 10.1016/j.jcv.2011.09.003.
- Rotbart H, Hayden FG. Picornavirus infections: a primer for the practitioner [J]. *Arch Fam Med*, 2000, 9(9): 913-920. DOI: 10.1001/archfam.9.9.913.
- HAdV Working Group. HAdV genotype numbers 53-104 have been assigned [EB/OL]. [2022-01-15]. <http://hadwv.gmu.edu/>.
- 人腺病毒呼吸道预防控制技术指南编写审定专家组. 人腺病毒呼吸道预防控制技术指南(2019年版) [J]. *中华预防医学杂志*, 2019, 53(11): 1088-1093. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2019.11.003
- Expert Writing Group of Technical Guidelines for Prevention and Control of Human Adenovirus Respiratory Infection. Technical guidelines for prevention and control of human adenovirus respiratory infection (2019 edition) [J]. *Chin J Prev Med*, 2019, 53(11): 1088-1093. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2019.11.003.
- 段亚丽, 谢正德. 我国呼吸道感染人腺病毒的基因型流行概况 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2018, 32(4): 430-434. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2018.04.022.
- Duan YL, Xie ZD. Prevalence of different genotypes of human adenovirus in patients with respiratory infection in China [J]. *Chin J Exp Clin*

- Viol, 2018, 32 (4) : 430-434. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1003-9279. 2018. 04. 022.
- [28] Lefebvre A, Manoha C, Bour JB, et al. Human metapneumovirus in patients hospitalized with acute respiratory infections; a meta-analysis [J]. *J Clin Virol*, 2016, 81: 68-77. DOI: 10. 1016/j. jcv. 2016. 05. 015.
- [29] Rima B, Collins P, Easton A, et al. ICTV virus taxonomy profile: pneumoviridae [J]. *J Gen Virol*, 2017, 98 (12) : 2912-2913. DOI: 10. 1099/jgv. 0. 000959.
- [30] Yi L, Zou L, Peng J, et al. Epidemiology, evolution and transmission of human metapneumovirus in Guangzhou China, 2013-2017 [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1) : 14022. DOI: 10. 1038/s41598-019-50340-8.
- [31] Divarathna MVM, Rafeek RAM, Noordeen F. A review on epidemiology and impact of human metapneumovirus infections in children using TIAB search strategy on PubMed and PubMed Central articles [J]. *Rev Med Virol*, 2020, 30 (1) : e2090. DOI: 10. 1002/rmv. 2090.
- [32] Boivin G, Abed Y, Pelletier G, et al. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus; a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups [J]. *J Infect Dis*, 2002, 186 (9) : 1330-1334. DOI: 10. 1086/344319.
- [33] Falsey AR, Erdman D, Anderson LJ, et al. Human metapneumovirus infections in young and elderly adults [J]. *J Infect Dis*, 2003, 187 (5) : 785-790. DOI: 10. 1086/367901.
- [34] Greenberg SB. Update on human rhinovirus and coronavirus infections [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2016, 37 (4) : 555-571. DOI: 10. 1055/s-0036-1584797.
- [35] Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17 (3) : 181-192. DOI: 10. 1038/s41579-018-0118-9.
- [36] Hu Q, Lu R, Peng K, et al. Prevalence and genetic diversity analysis of human coronavirus OC43 among adult patients with acute respiratory infections in Beijing, 2012 [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (7) : e100781. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0100781.
- [37] 周艳秋, 滕峰, 王嘉瑜, 等. 2015-2019 年上海市急性呼吸道感病人冠状病毒感染情况分析 [J]. *疾病监测*, 2021, 36 (7) : 653-658. DOI: 10. 3784/jbjc. 202101040002.
- Zhou YQ, Teng Z, Wang JY, et al. Characteristics of human coronavirus infection in acute respiratory infection cases in Shanghai, 2015-2019 [J]. *Dis Surveill*, 2021, 36 (7) : 653-658. DOI: 10. 3784/jbjc. 202101040002.
- [38] Yip CC, Lam CS, Luk HK, et al. A six-year descriptive epidemiological study of human coronavirus infections in hospitalized patients in Hong Kong [J]. *Virol Sin*, 2016, 31 (1) : 41-48. DOI: 10. 1007/s12250-016-3714-8.
- [39] Wang C, Horby PW, Hayden FG, et al. A novel coronavirus outbreak of global health concern [J]. *Lancet*, 2020, 395 (1223) : 470-473. DOI: 10. 1016/S0140-6736(20)30185-9.
- [40] Drosten C, Günther S, Preiser W, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348 (20) : 1967-1976. DOI: 10. 1056/NEJMoa030747.
- [41] Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, et al. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia [J]. *N Engl J Med*, 2012, 367 (19) : 1814-1820. DOI: 10. 1056/NEJMoa1211721.
- [42] Thabet F, Chehab M, Bafaqih H, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus in children [J]. *Saudi Med J*, 2015, 36 (4) : 484-486. DOI: 10. 15537/smj. 2015. 4. 10243.
- [43] World Health Organization. Tracking SARS-CoV-2 variants [EB/OL]. (2022-01-10) [2022-01-15]. <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>.
- [44] Wu T, Kang S, Peng W, et al. Original hosts, clinical features, transmission routes, and vaccine development for coronavirus disease (COVID-19) [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 8: 702066. DOI: 10. 3389/fmed. 2021. 702066.
- [45] Chi Y, Wang Q, Chen G, et al. The long-term presence of SARS-CoV-2 on cold-chain food packaging surfaces indicates a new COVID-19 winter outbreak: a mini review [J]. *Front Public Health*, 2021, 9: 650493. DOI: 10. 3389/fpubh. 2021. 650493.
- [46] Ziegler CGK, Miao VN, Owings AH, et al. Impaired local intrinsic immunity to SARS-CoV-2 infection in severe COVID-19 [J]. *Cell*, 2021, 184 (18) : 4713-4733. e22. DOI: 10. 1016/j. cell. 2021. 07. 023.
- [47] Farizo KM, Cochi SL, Zell ER, et al. Epidemiological features of pertussis in the United States, 1980-1989 [J]. *Clin Infect Dis*, 1992, 14 (3) : 708-719. DOI: 10. 1093/clinids/14. 3. 708.
- [48] 胡云鸽, 刘泉波. 儿童百日咳 247 例临床特点及重症百日咳危险因素分析 [J]. *中华儿科杂志*, 2015, 53 (9) : 684-689. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0578-1310. 2015. 09. 010.
- Hu YG, Liu QB. Clinical analysis of 247 children with whooping cough and the risk factors of severe cases [J]. *Chin J Pediatr*, 2015, 53 (9) : 684-689. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0578-1310. 2015. 09. 010.
- [49] 黄建琼, 马卓妮, 郑跃杰, 等. 婴幼儿百日咳的临床特征 [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2014, 29 (22) : 1724-1727. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-428X. 2014. 22. 013.
- Huang JQ, Ma ZY, Zheng YJ, et al. Clinical manifestations of Bordetella pertussis infection in infants [J]. *Chin J Appl Clin Pediatr*, 2014, 29 (22) : 1724-1727. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-428X. 2014. 22. 013.
- [50] Waites KB, Talkington DF. Mycoplasma pneumoniae and its role as a human pathogen [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2004, 17 (4) : 697-728. DOI: 10. 1128/CMR. 17. 4. 697-728. 2004.
- [51] Krafft C, Christy C. Mycoplasma pneumoniae in children and adolescents [J]. *Pediatr Rev*, 2020, 41 (1) : 12-19. DOI: 10. 1542/pir. 2018-0016.
- [52] Jong B, Hallström LP. European surveillance of legionnaires' disease [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2021, 42: 81-96. DOI: 10. 21775/cimb. 042. 081.
- [53] Burillo A, Pedro-Botet ML, Bouza E. Microbiology and epidemiology of legionnaire's disease [J]. *Infect Dis Clin North Am*, 2017, 31 (1) : 7-27. DOI: 10. 1016/j. idc. 2016. 10. 002.
- [54] Köhler JR, Hube B, Puccia R, et al. Fungi that infect humans [J]. *Microbiol Spectr*, 2017, 5 (3) : 1128/microbiolspec. FUNK-0014-2016.
- [55] Azar MM, Malo J, Hage C. Endemic fungi presenting as community-acquired pneumonia: a review [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2020, 41 (4) : 522-537. DOI: 10. 1055/s-0040-1702194.
- [56] Robert MK, Joseph WG, Nathan JB, et al. *Nelson Textbook of Pediatrics* [M]. 21th ed. Amsterdam: Elsevier, 2019: 8959.
- [57] Montenegro BL, Arnold JC. North American dimorphic fungal infections in children [J]. *Pediatr Rev*, 2010, 31 (6) : e40-48. DOI: 10. 1542/pir. 31-6-e40.
- [58] Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, et al. Executive summary: clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the infectious diseases society of America [J]. *Clin Infect Dis*, 2016, 62 (4) : 409-417. DOI: 10. 1093/cid/civ1194.
- [59] Walsh TJ, Katragkou A, Chen T, et al. Invasive candidiasis in infants and children: recent advances in epidemiology, diagnosis, and treatment [J]. *J Fungi (Basel)*, 2019, 5 (1) : 11. DOI: 10. 3390/jof5010011.
- [60] Wheat LJ, Conces D, Allen SD, et al. Pulmonary histoplasmosis syndromes: recognition, diagnosis, and management [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2004, 25 (2) : 129-144. DOI: 10. 1055/s-2004-824898.
- [61] Gao LW, Jiao AX, Wu XR, et al. Clinical characteristics of disseminated cryptococcosis in previously healthy children in China [J]. *BMC Infect Dis*, 2017, 17 (1) : 359. DOI: 10. 1186/s12879-017-2450-5.
- [62] Galanis E, Macdougall L, Kidd S, et al. Epidemiology of cryptococcus gattii, British Columbia, Canada, 1999-2007 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2010, 16 (2) : 251-257. DOI: 10. 3201/eid1602. 090900.
- [63] Segal BH. Aspergillosis [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360 (18) : 1870-1884. DOI: 10. 1056/NEJMra0808853.
- [64] Alabaz D, Yılmaz G, Uğuz A, et al. Mucormycosis in a pediatric population: a review of 20 cases from southern Turkey [J]. *Turk J Pediatr*, 2021, 63 (1) : 11-22. DOI: 10. 24953/turkped. 2021. 01. 002.
- [65] Dkmetaş HS, Canbay E, Yılmaz S, et al. Diabetic ketoacidosis and rhino-orbital mucormycosis [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2002, 57 (2) : 139-142. DOI: 10. 1016/s0168-8227(02)00021-9.
- [66] Deng ZL, Yun M, Ajello L. Human penicilliosis marneffeii and its relation to the bamboo rat (*Rhizomys pruinosus*) [J]. *J Med Vet Mycol*, 1986, 24 (5) : 383-389. DOI: 10. 1080/0268121860000581.
- [67] Sirisanthana V, Sirisanthana T. Disseminated penicillium marneffeii infection in human immunodeficiency virus-infected children [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 1995, 14 (11) : 935-940. DOI: 10. 1097/00006454-199511000-00003.
- [68] 中华预防医学会. 基于高通量测序的病原体筛查通用准则 (T/CM-PA 010-2020) [J]. *中国病原生物学杂志*, 2021, 16 (6) : 738-740. DOI: 10. 13350/j. cjpb. 210626.
- Chinese Preventive Medicine Association. General criteria for pathogen screening based on high-throughput sequencing (T/CM-PA 010-2020) [J]. *J Pathog Biol*, 2021, 16 (6) : 738-740. DOI: 10. 13350/j. cjpb. 210626.

(收稿日期:2021-12-22)

(本文编辑:李建华)