

呼吸道病原体分子检测技术的进展与应用

林勇平

lin_y_p@hotmail.com

2018-4-10



广州医科大学附属第一医院

THE FIRST AFFILIATED HOSPITAL OF GUANGZHOU MEDICAL UNIVERSITY

- 一、呼吸道感染与实验室诊断
- 二、常见分子检测技术简述
- 三、呼吸道感染分子检测技术进展
- 四、呼吸道感染分子检测新技术的临床实践

一、呼吸道感染与实验室诊断

呼吸道感染

- 急性呼吸道感染是常见的临床感染症状，尤其是婴幼儿和老人
- 呼吸道感染的病原体种类繁多
- 多病原体混合感染

<1岁、1~3岁、3~6岁和≥6岁组病毒阳性患儿中检出2种以上病毒的比例分别为38.2%、36.4%、30.2%和15.2%

- 不同年龄患者感染的病原体不同
- 病原体感染具有季度和月度差异
- 每年儿童大约被感染6-9次，青少年和成人大约2-4次
- 呼吸道病原体的快速检测可使医生合理选择治疗方案，并减少抗生素的使用
- 多项中心研究显示，我国成人社区获得性肺炎CAP患者中病毒检出率为15%-34.9%



呼吸道感染

- 呼吸道感染，尤其在儿童中为常见的疾病，可导致轻微咽喉炎，或发展为重症肺炎甚至导致死亡。
- 据2000年至2013年全球儿童死亡率分析显示，肺炎位居5岁以下儿童死亡原因的前三位。
- 呼吸道病毒及肺炎支原体为常见的呼吸道感染病原。
- 快速、准确、全面检出各种病原体，利于疾病及时诊疗。

Li L, Oza, S, Hogan D, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000-2013, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *The Lancet*, 2015; 385, 9965, 371-379.

呼吸道感染的实验室诊断

- 病原体的培养与鉴定
- 呼吸道病毒抗原的检测
- 呼吸道病原体血清抗体的检测
- 病原体核酸的检测（荧光定量**PCR**）

•病原体培养与鉴定

阳性可作为确诊依据；是发现新病毒的重要手段

特异性良好，成本低，对实验室硬件要求低

但耗时耗力，难以应用于临床早期诊断和指导治疗；一些病毒条件苛刻，难以培养

•病原体抗原的检测

七项呼吸道病毒检测试剂盒(免疫荧光法, DFA)

(腺病毒，呼吸道合胞病毒，甲型、乙型流感病毒，I、II、III型副流感病毒)

•病原体血清抗体的检测

中和试验、补体结合试验和血凝-血凝抑制试验等，敏感度、特异度较差；易出现假阳性和假阴性；血清特异性抗体检测对早期诊断意义有限。

九项呼吸道感染病原体IgM抗体检测试剂盒(免疫荧光法, IFA)

(嗜肺军团菌血清1型、肺炎支原体、Q热立克次体、肺炎衣原体、腺病毒、呼吸道合胞病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒和副流感病毒1、2和3型)



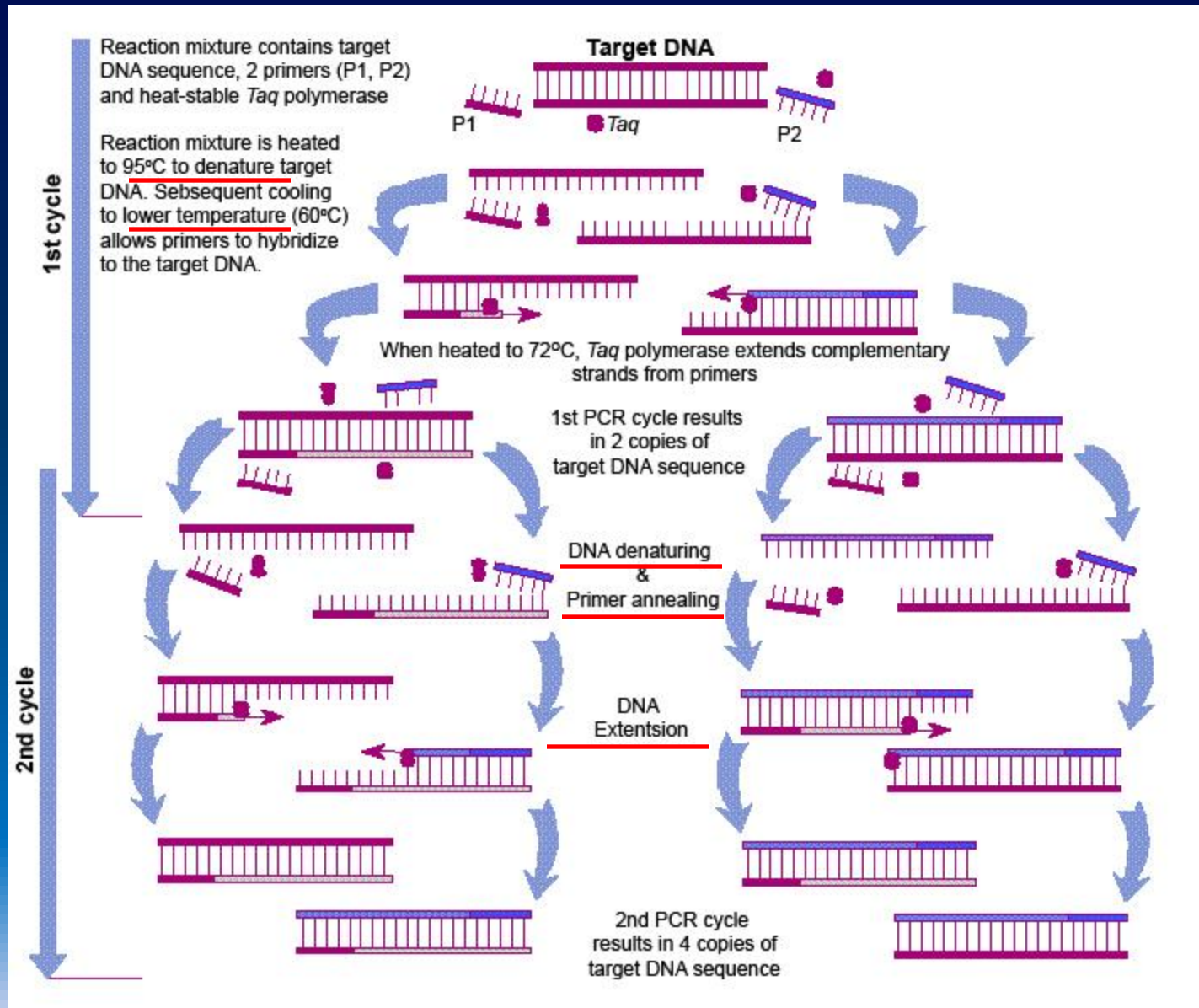
二、常见分子检测技术简述

核酸扩增技术

- **Thermocycling based**
 - PCR (Polymerase Chain Reaction, Roche Diagnostics)
 - Reverse Transcription-PCR ("RT-PCR")
 - Pre-Post versus Real-Time PCR
 - Multiplex PCR
 - Nested PCR
 - On-Array-PCR
 - Digital PCR
 - LCR (Ligase Chain Reaction, Abbott Laboratories)
 - MLPA (Multiplex Ligation-dependent probe amplification)
- **Isothermal techniques**
 - NASBA (Nucleic Acid Squence Based Amplification)
 - RCA (Rolling Circle Amplification)
 - RPA (Recombinase Polymerase Amplification)
 - SDA (Strand Displacement Amplification)
 - LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)
- **Signal Amplification**
 - bDNA (Branched DNA, Bayer→Siemens)

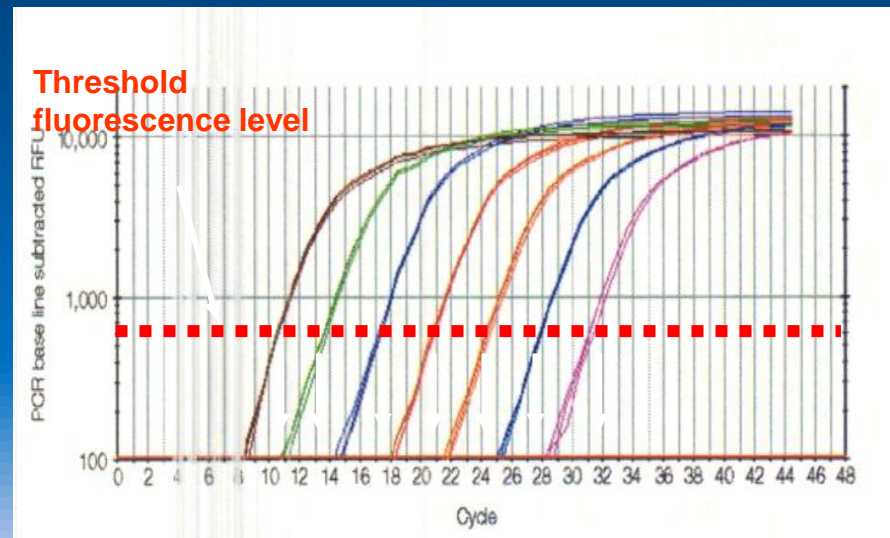


Polymerase Chain Reaction (PCR)



实时荧光定量PCR (RFQ-PCR)

实时荧光定量PCR (real-time fluorescence quantitative PCR)是指在 扩增周期每个时间点（通常是每个循环结束后），通过检测荧光强度对PCR过程中产物量进行实时监测，并根据标准曲线算出PCR的初始模板量。

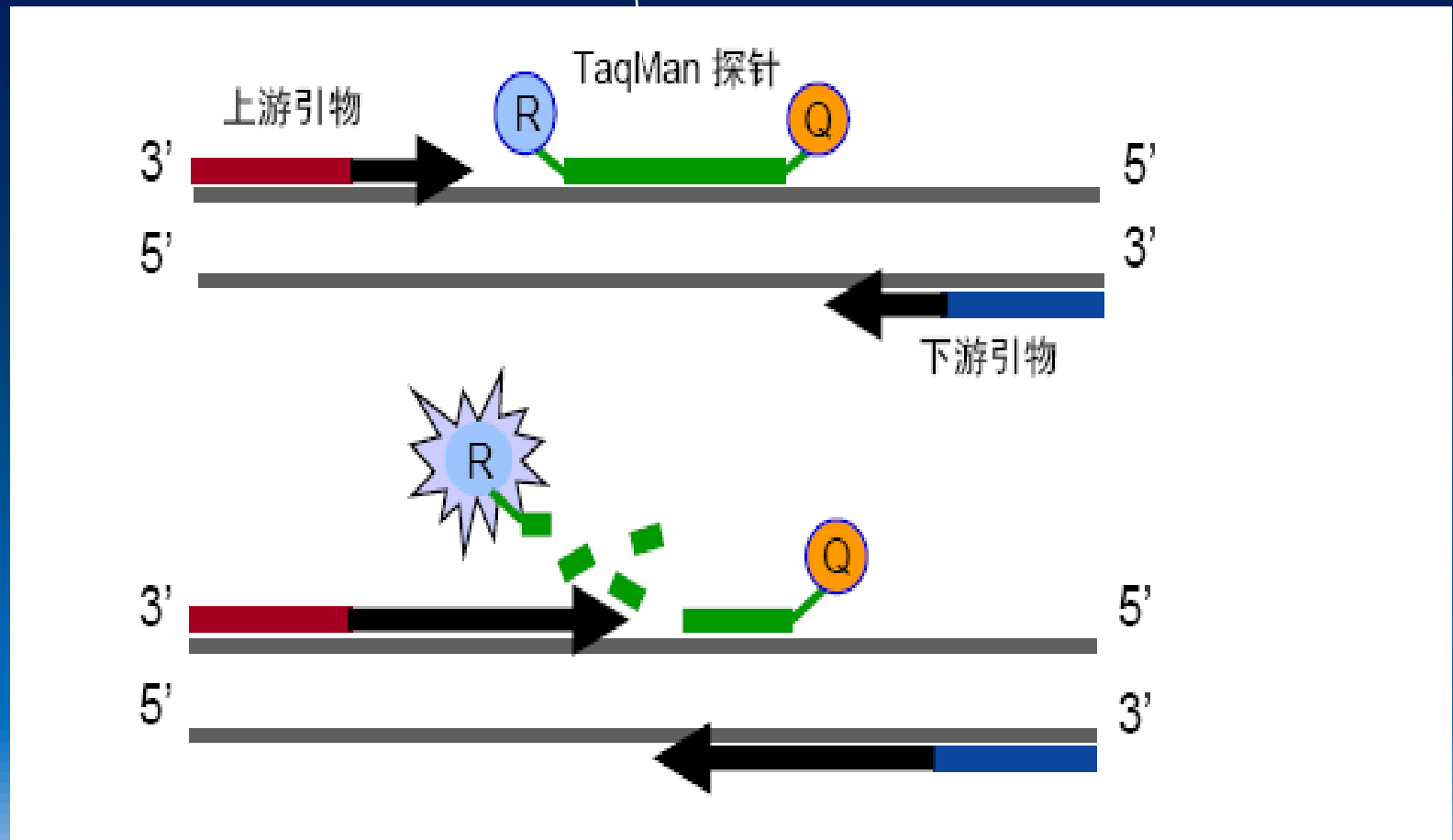


Threshold cycles for each sample

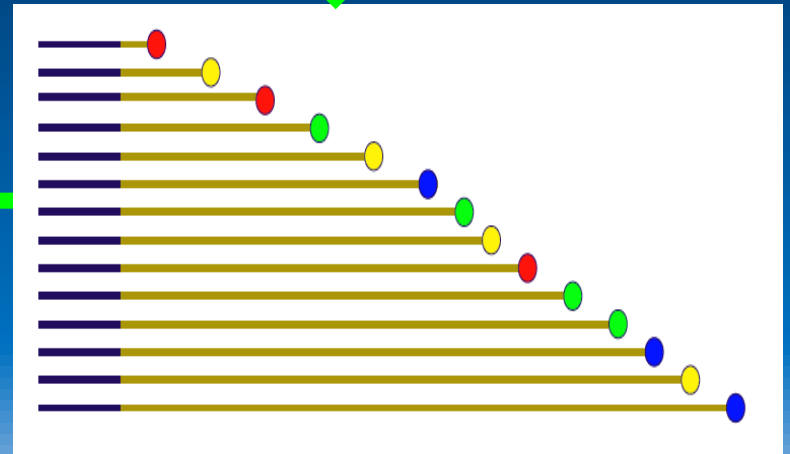
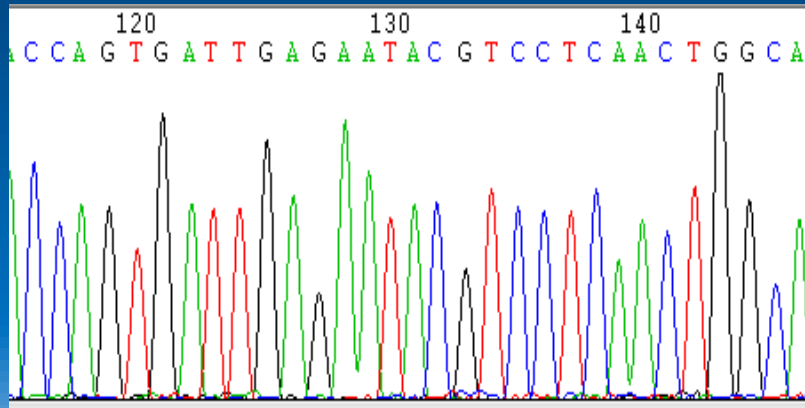
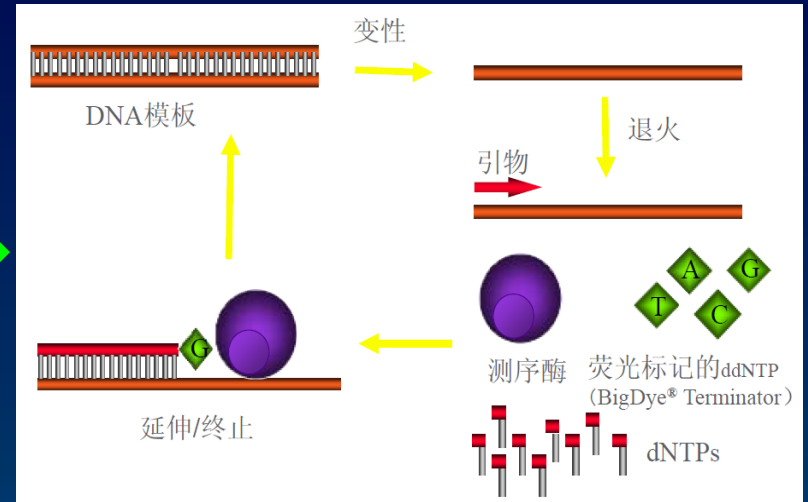
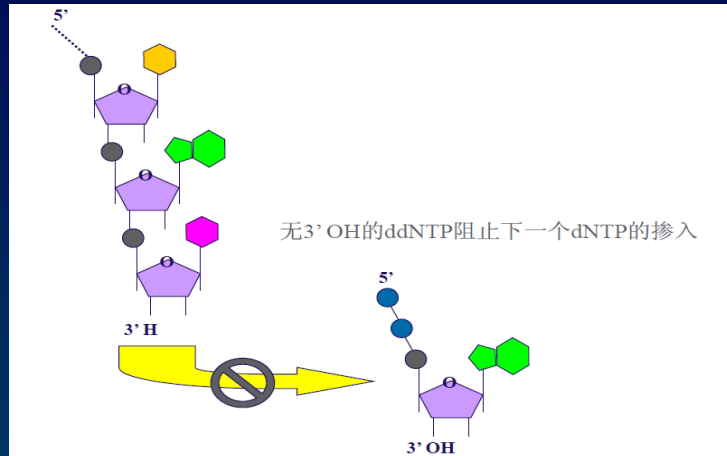
水解探针技术

TaqMan 5'-3' Exonuclease

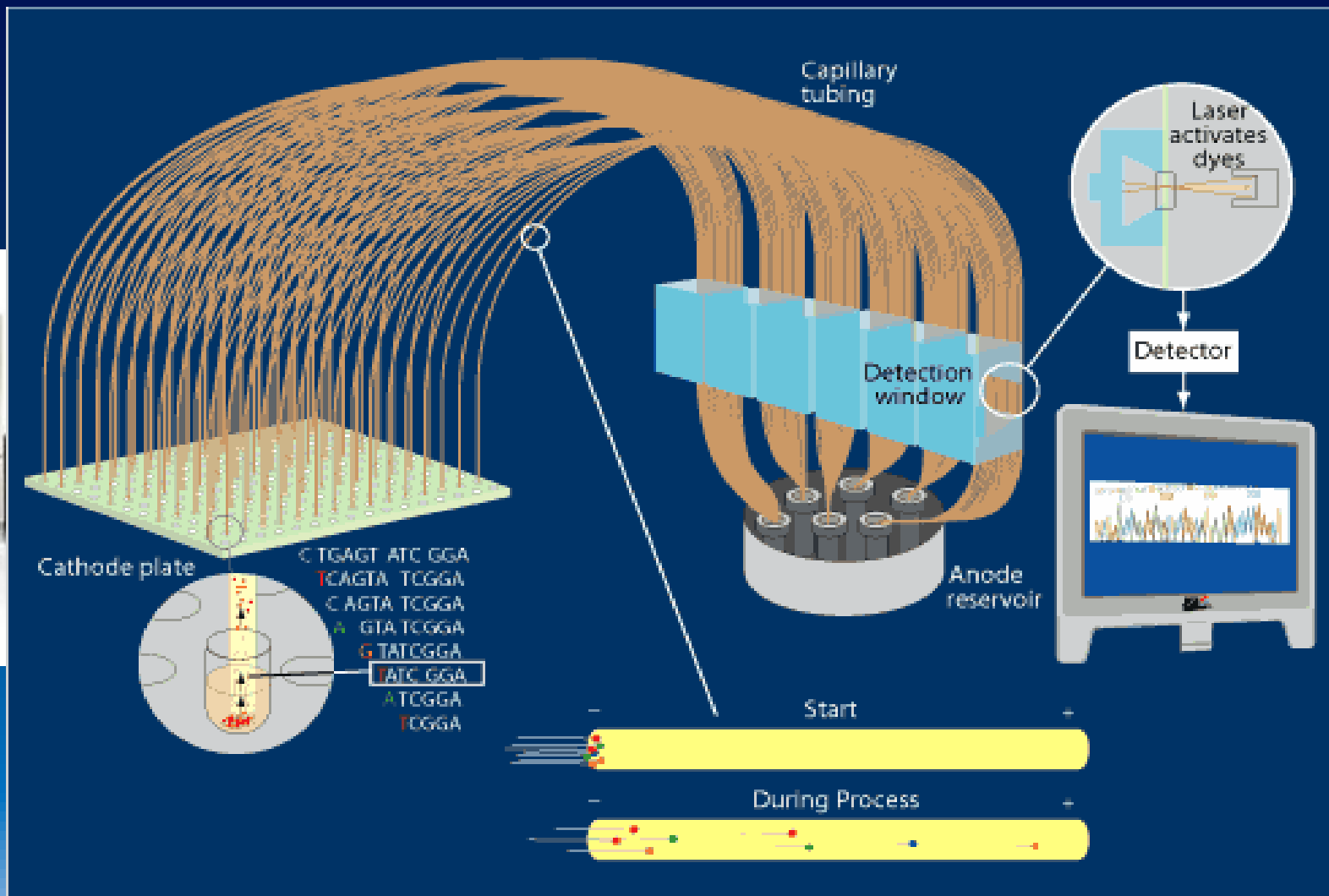
荧光标记探针



一代测序 (Sanger法)



一代测序 (Sanger法)



高通量基因测序技术

一次性对几百万到百亿条DNA分子进行并行测序，又称为下一代测序技术，其使得可对一个样品的DNA序列进行深入、细致、全貌的分析，所以又被称为深度测序。

Next Generation Sequencing (NGS)

High-throughput Sequencing

Deep Sequencing

高通量基因测序技术



A
DNA



B
Compatible
Library Prep



C
Template Prep



D
Sequencing



E
Compatible
FASTQ Data



Wash Ion Spheres

10 min. (5 min. hands-on)

Assemble emPCRrxn

30 min. (30 min. hands-on)

Agitate in UltraTurrax

5 min. (1 min. hands-on)

Distribute into PCR tubes and cycle

3 hours. (20 min. hands-on)

Break emulsion

55 min. (30 min. hands-on)

Enrichment

50 min. (25 min. hands-on)

Total Processing Time ~5.5 hours*

Hands-On Time ~110 min.

NGS: 一次性对多个靶向进行检测，操作复杂，步骤繁多



广州医科大学附属第一医院

THE FIRST AFFILIATED HOSPITAL OF GUANGZHOU MEDICAL UNIVERSITY

三、呼吸道病原体感染分子检测技术进展

（多重病原体感染快速分子检测）

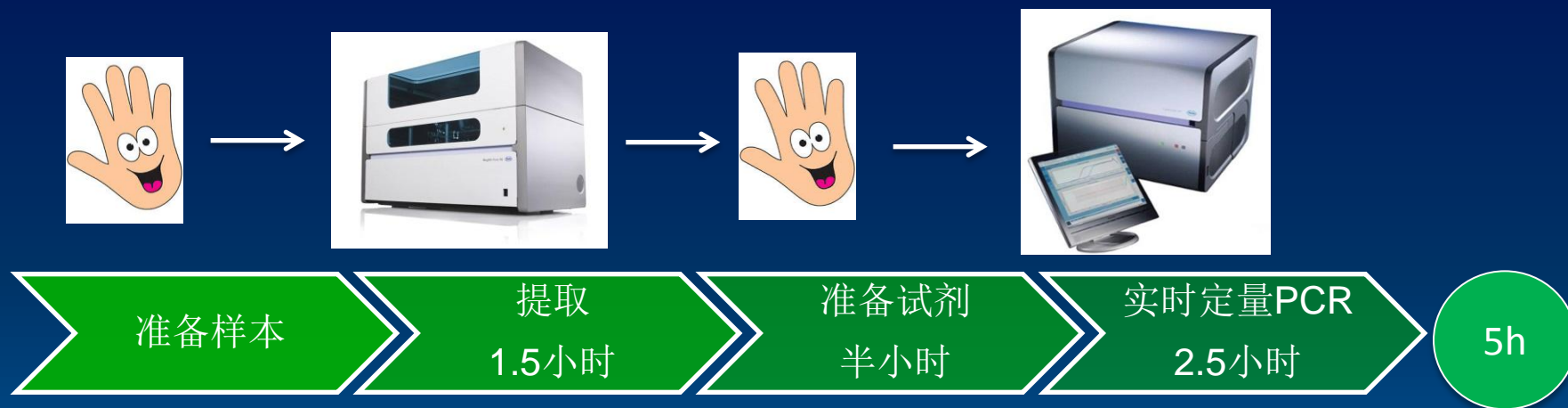
- “十三五”科技规划体外诊断产品明确提出要“突破微流控芯片、单分子检测、自动化核酸检测等关键技术，开发全自动核酸检测系统，...”
- 北京市食药局9月5日发布的《聚合酶链反应（PCR）检验实验室检查要点指南（2016版）》在第二条“检查要点”中明确提出
 - 原则上PCR检验实验室应当设置以下区域：试剂储存和准备区、标本制备区、扩增区、扩增产物分析区。若使用实时荧光定量PCR仪且不需要进行后续产物分析工作，扩增区、扩增产物分析区可合并。若使用样本处理、核酸提取及扩增检测为一体的自动化分析仪，则标本制备区、扩增区、扩增产物分析区可合并。

商业化的自动化核酸检测产品

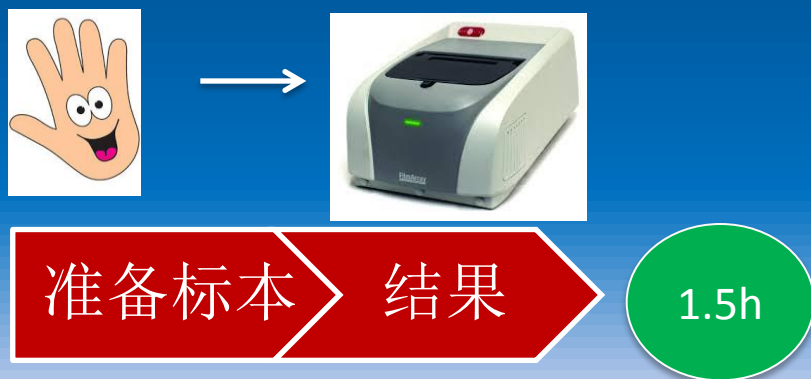
- 目前世界上已经商业化的从样本处理、核酸提取至扩增检测为一体的自动化分析仪
 - BioFire FilmArray
 - Cepheid geneXpert, Infinity
 - GenProbe (Hologic) Tigers and Panther
 - 罗氏 cobas Liat
 - Alere q
 - 博晖创新 HPV检测芯片

提高检测效率

一般分子实验室流程



床旁化的分子检测平台



商业化的自动化核酸检测产品



美国BioFire
2013年被法国生物梅里埃以50亿美元收购



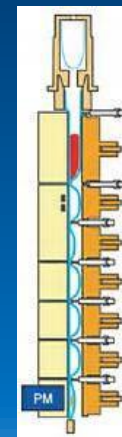
美国Cephid（赛沛）
最近被美国丹纳赫以40亿美元收购



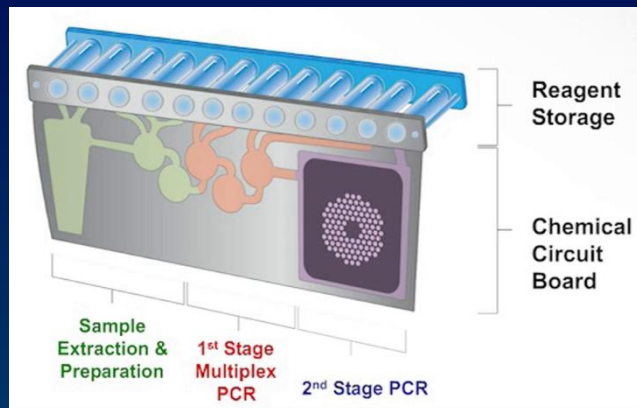
美国Alere q



罗氏 cobas Liat



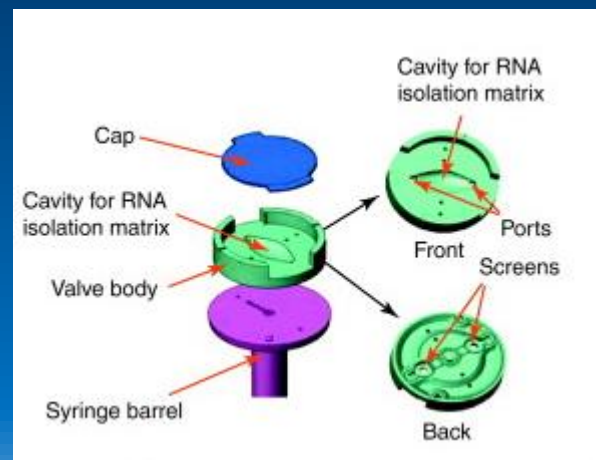
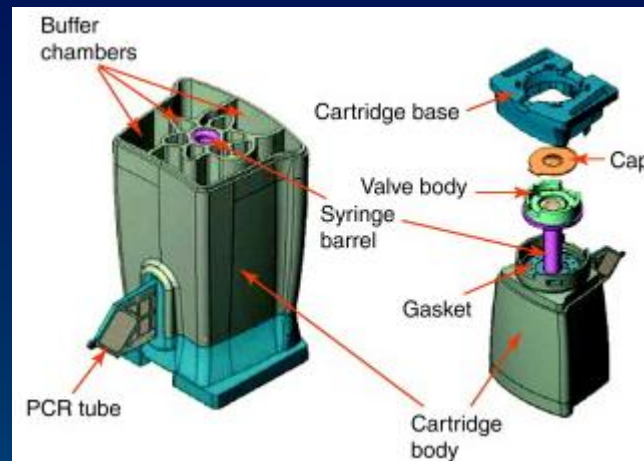
一体化核酸检测技术



BioFire的产品有多层结构和微型PCR反应器



博晖的微流控芯片一次成型，生产工艺简单，成本远低于其它非微流控器件



赛沛采用传统的阀门结构



广州医科大学附属第一医院

THE FIRST AFFILIATED HOSPITAL OF GUANGZHOU MEDICAL UNIVERSITY

Film Array呼吸道病原检测平台



1.5小时内完成核酸制备、扩增、检测步骤，操作简便，减少污染机会



FilmArray 的原理

巢式多重 PCR

巢式多重 PCR (nmPCR) 采用两轮 PCR。在第一轮 PCR 期间，使用多个“外引物”对样本中存在的靶模板执行多重 PCR。

第二轮 PCR 以单重方式进一步对第一轮 PCR 期间生成的 DNA 片段进行扩增。第二轮 PCR 所采用的“内引物”由“嵌套”在第一轮 PCR 产物内的序列组成。

高分辨率熔解分析 扩增曲线适合定量分析 熔解曲线适合定性分析

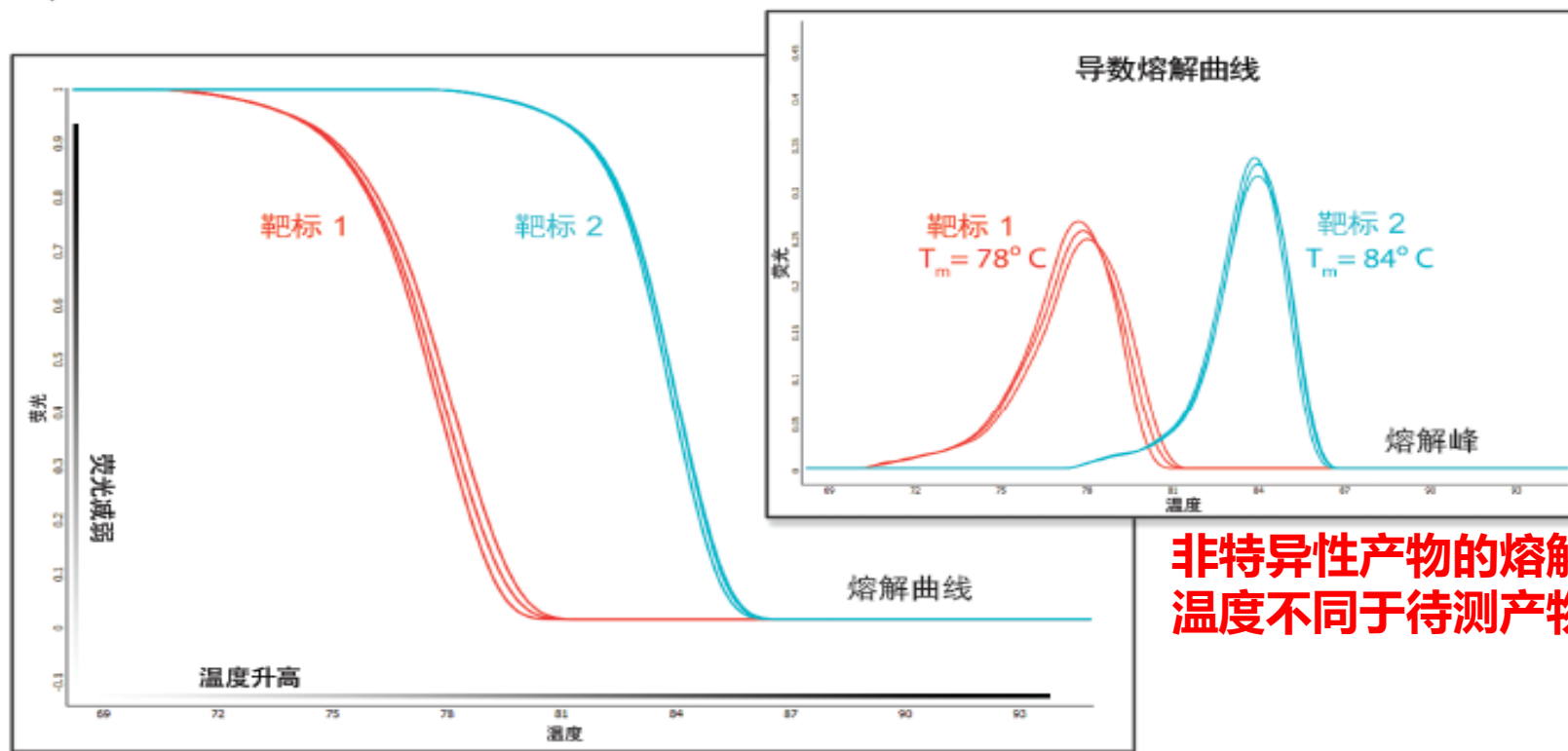
FilmArray PCR 反应包含 DNA 结合染料 LCGreen® Plus。LCGreen Plus 在每个 PCR 循环期间随着 DNA 拷贝的生成而与这些拷贝结合。当结合到双链 DNA 时，染料发出荧光，这些荧光被 FilmArray 仪器检测到。随着温度的升高和双链 DNA 拷贝的解链，LCGreen Plus 染料被释放且检测到荧光减弱。



PCR 期间生成的双链 DNA 拷贝（称为 PCR 产物或扩增产物）将具有基于扩增模板的独特序列。扩增产物的长度和序列决定着双链 DNA 将在什么温度下解离，该温度称为扩增产物的熔解温度 (T_m)。由不同靶标生成的 PCR 产物将具有不同的序列，因此也具有不同的 T_m 。

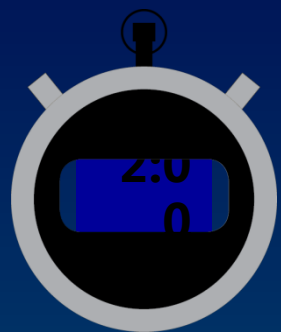
在最后一个 PCR 循环后，FilmArray 仪器将反应温度从 60°C 逐渐升高到 94°C 。当温度到达扩增产物的 T_m 时，扩增产物变性且荧光减弱，释放出 LCGreen Plus。这会生成一个熔解曲线（见下图），该曲线显示荧光急剧减弱。通过绘制此熔解曲线的负导数曲线，为每个扩增产物生成一个带特定 T_m 的熔解峰。

两具有独特扩增产物序列的不同靶标的熔解曲线

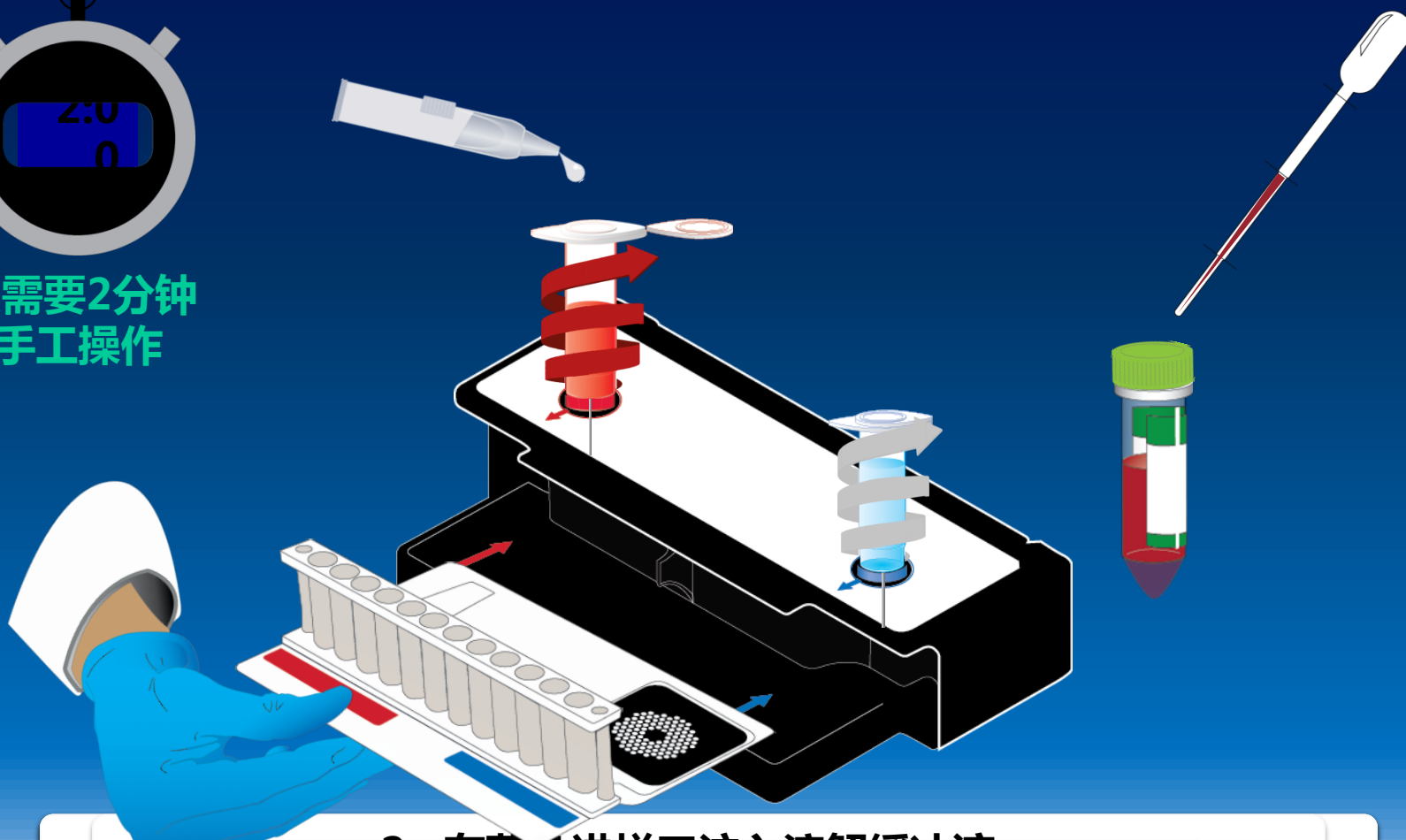


非特异性产物的熔解温度不同于待测产物

操作简单的测试条准备工作

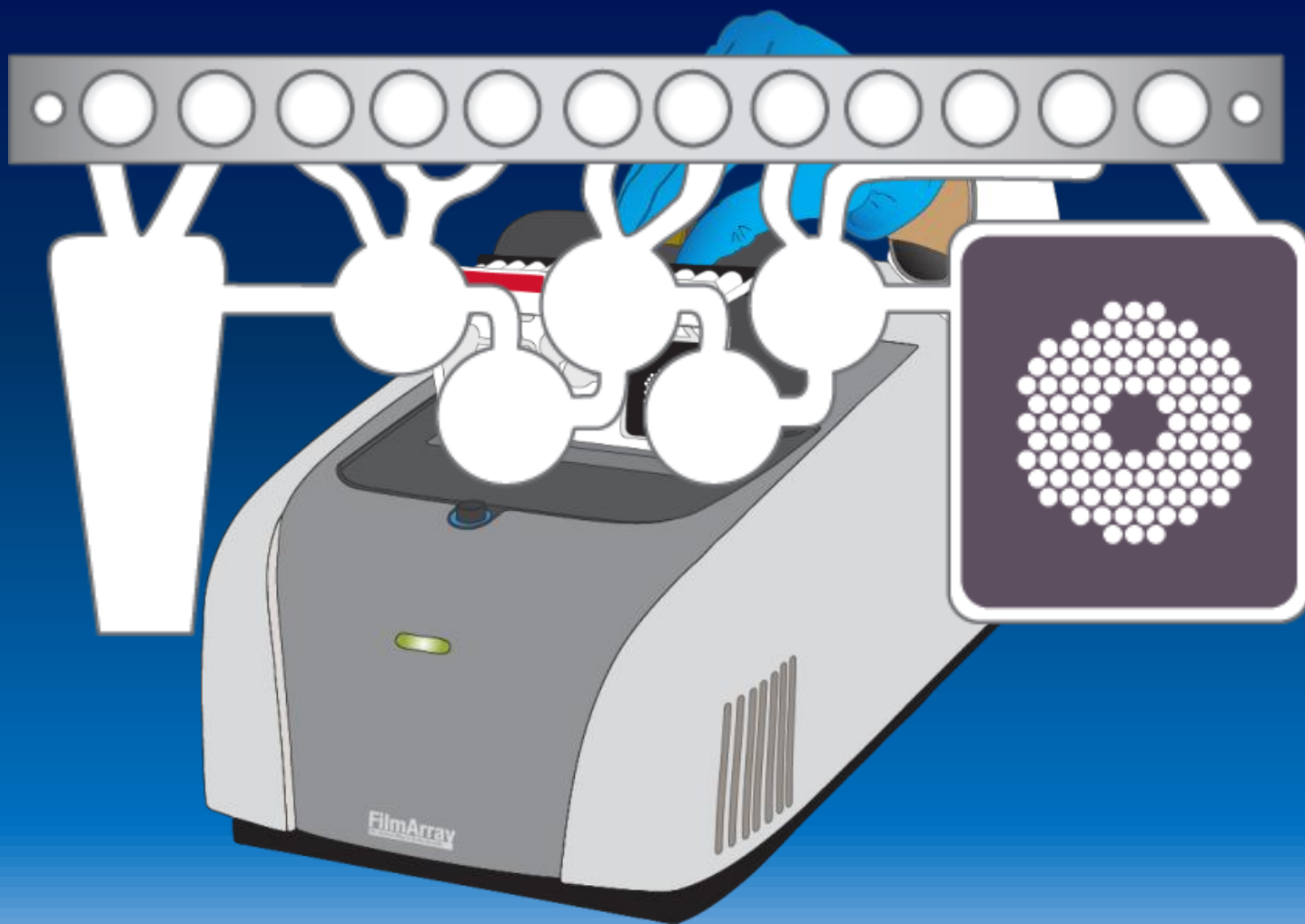


只需要2分钟
手工操作



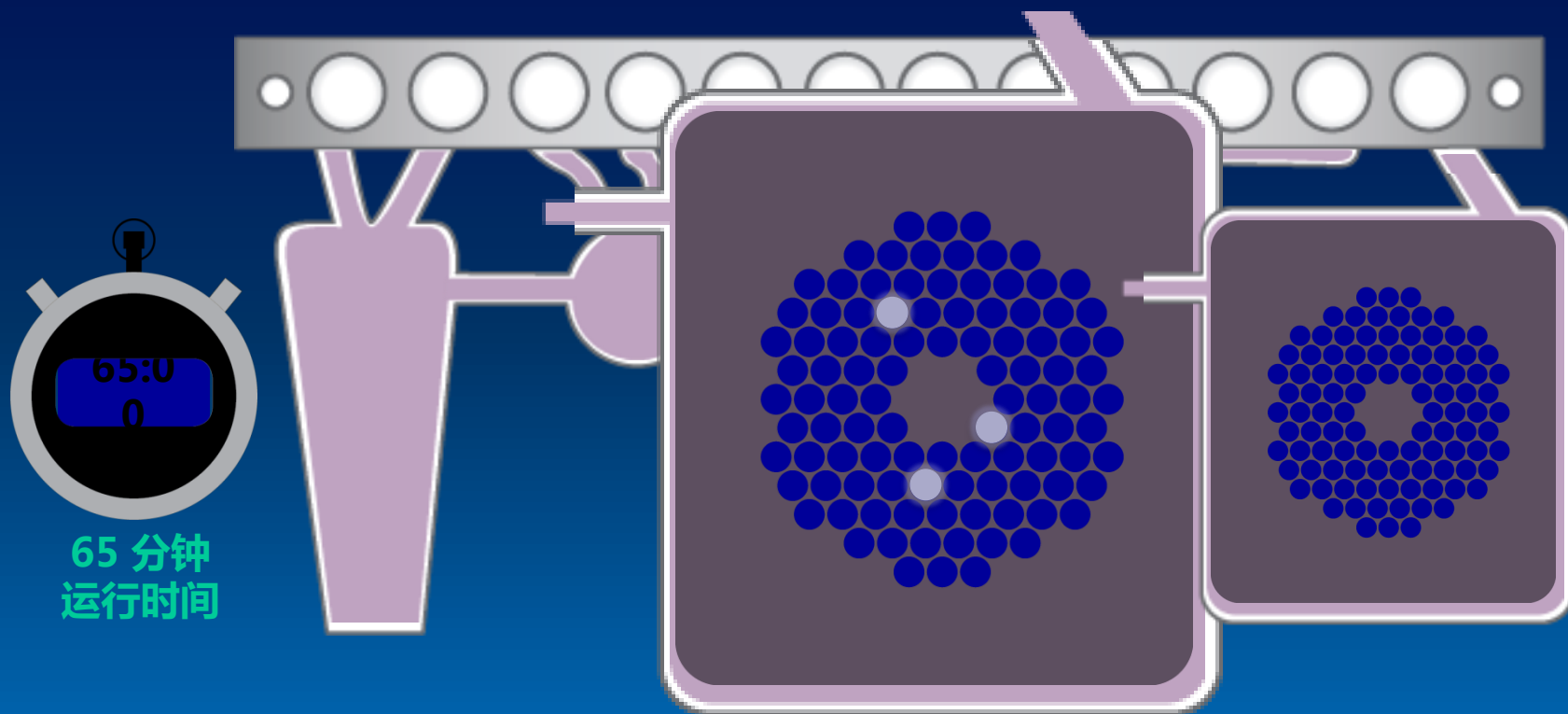
3. 将样本缓冲液加入到样本制备管中。

样本裂解、提纯、扩增、检测一步到位！



将FilmArray测试条安放于仪器内。

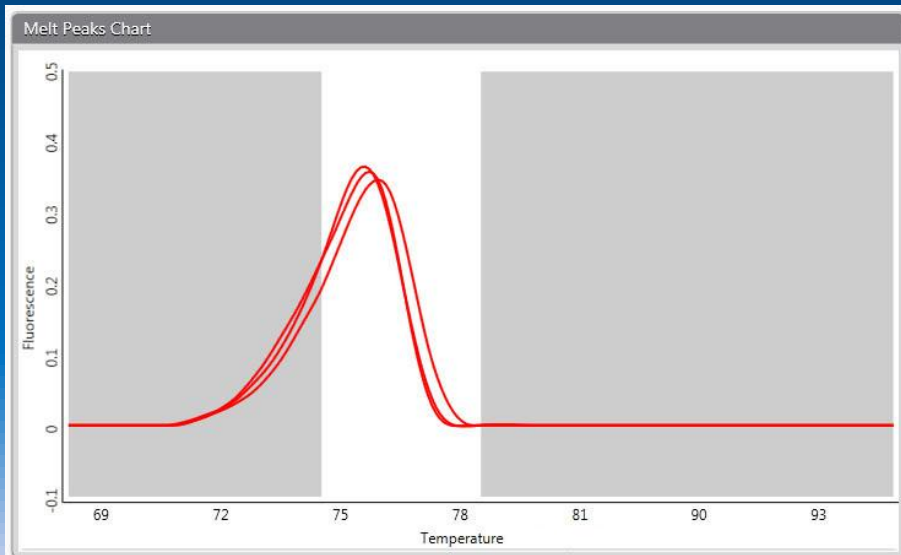
样本裂解、提纯、扩增、检测一步到位！



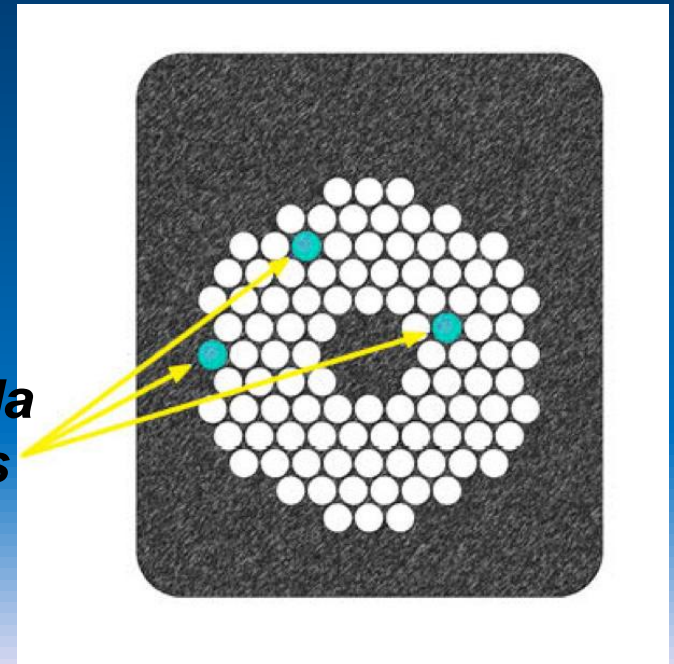
8. FilmArray仪器测试每个小孔中产物的熔解曲线，以判断是否存在待测产物。

自动化结果分析

- 所有靶标都重复测试3次
- 三次测试中，2个以上阳性才会判读为阳性
- 熔解曲线峰值必须处于正确温度区间
- 重复测试的熔解曲线峰值必须高度一致
- 内控必须正确 (RNA process and PCR 2)



***Bordetella
pertussis***



自动判读结果

- FilmArray软件处理数据，对于数据中每个结果信息都进行判读，从而生成明了易读的检测报告。

FilmArray® Respiratory Panel		BIO FIRE	
Run Summary			
Sample ID: RYNAND0232	Run Date: 21 Jun 2013 7:34 PM		
Detected: Influenza A H1-2009 Respiratory Syncytial Virus	Controls: Passed		
Equivalocal: None			
Result Summary			
Not Detected	Adenovirus		
Not Detected	Coronavirus 229E		
Not Detected	Coronavirus HKU1		
Not Detected	Coronavirus NL63		
Not Detected	Coronavirus OC43		
Not Detected	Human Metapneumovirus		
Not Detected	Human Rhinovirus/Enterovirus		
✓ Detected	Influenza A H1-2009		
Not Detected	Influenza B		
Not Detected	Parainfluenza Virus 1		
Not Detected	Parainfluenza Virus 2		
Not Detected	Parainfluenza Virus 3		
Not Detected	Parainfluenza Virus 4		
✓ Detected	Respiratory Syncytial Virus		
Not Detected	Bordetella pertussis		
Not Detected	Chlamydia pneumoniae		
Not Detected	Mycoplasma pneumoniae		
Run Details			
Pouch: Respiratory Panel v1.7	Protocol: NPS v2.0		
Run Status: Completed	Operator: KMRAP		
Serial No.: 00345787z	Instrument: ITI FA "FA2004"		
Lot No.: 114612			

FilmArray® BCID Panel		BIO FIRE	
Run Summary			
Sample ID: SDY_9621_LED_50_6	Run Date: 29 May 3:41 PM		
Organisms Detected: Enterobacteriaceae Klebsiella pneumoniae	Controls: Passed		
Applicable Antimicrobial Resistance Genes: KPC - Detected			
Result Summary - Interpretations			
Antimicrobial Resistance Genes			
✓ Detected	KPC (carbapenem-resistance gene)		
⊗ N/A	mecA (methicillin-resistance gene)		
⊗ N/A	vanA/B (vancomycin-resistance genes)		
NOTE: Antimicrobial resistance can occur via multiple mechanisms. A Not Detected result for the FilmArray antimicrobial resistance q does not indicate antimicrobial susceptibility. Subculturing is required for species identification and susceptibility testing of isolates.			
Gram Positive Bacteria			
Not Detected	Enterococcus		
Not Detected	Listeria monocytogenes		
Not Detected	Staphylococcus		
Not Detected	Staphylococcus aureus		
Not Detected	Streptococcus		
Not Detected	Streptococcus agalactiae (Group B)		
Not Detected	Streptococcus pneumoniae		
Not Detected	Streptococcus pyogenes (Group A)		
Gram Negative Bacteria			
Not Detected	Acinetobacter baumannii		
✓ Detected	Enterobacteriaceae		
Not Detected	Enterobacter cloacae complex		
Not Detected	Escherichia coli		
Not Detected	Klebsiella oxytoca		
✓ Detected	Klebsiella pneumoniae		
Not Detected	Proteus		
Not Detected	Serratia marcescens		
Not Detected	Haemophilus influenzae		
Not Detected	Neisseria meningitidis		
Not Detected	Pseudomonas aeruginosa		
Yeast			
Not Detected	Candida albicans		
Not Detected	Candida glabrata		
Not Detected	Candida krusei		
Not Detected	Candida parapsilosis		
Not Detected	Candida tropicalis		
Run Details			
Pouch: BCID Panel	Protocol: BCID		
Run Status: Completed	Operator: RJones		
Serial No.: 00631374	Instrument: FA2075		
Lot No.: 125313			

FilmArray™ GI Panel		BIO FIRE	
Run Summary			
Sample ID: 009196-03-0790	Run Date: 27 Sep 2013 12:03 PM		
Detected: Giardia lamblia	Controls: Passed		
Result Summary			
Bacteria			
Not Detected	Campylobacter		
Not Detected	Clostridium difficile toxin A/B		
Not Detected	Plesiomonas shigelloides		
Not Detected	Salmonella		
Not Detected	Vibrio		
Not Detected	Vibrio cholerae		
Not Detected	Yersinia enterocolitica		
Diarrheagenic E. coli/Shigella			
Not Detected	Enteraggregative E. coli (EAEC)		
Not Detected	Enteropathogenic E. coli (EPEC)		
Not Detected	Enterotoxigenic E. coli (ETEC) lt/st		
Not Detected	Shiga-like toxin-producing E. coli (STEC) stx1/stx2		
⊗ N/A	E. coli O157		
Not Detected	Shigella/Enteroinvasive E. coli (EIEC)		
Parasites			
Not Detected	Cryptosporidium		
Not Detected	Cyclospora cayentanensis		
Not Detected	Entamoeba histolytica		
✓ Detected	Giardia lamblia		
Viruses			
Not Detected	Adenovirus F 40/41		
Not Detected	Astrovirus		
Not Detected	Norovirus GI/GII		
Not Detected	Rotavirus A		
Not Detected	Sapovirus		
Run Details			
Pouch: GI Panel v2.1	Protocol: Stool FA v2.3		
Run Status: Completed	Operator: John Madison (jrm)		
Serial No.: 00788640	Instrument: ITI FA "FA1315"		
Lot No.: 133813			

上呼吸道感染(RP)测试条

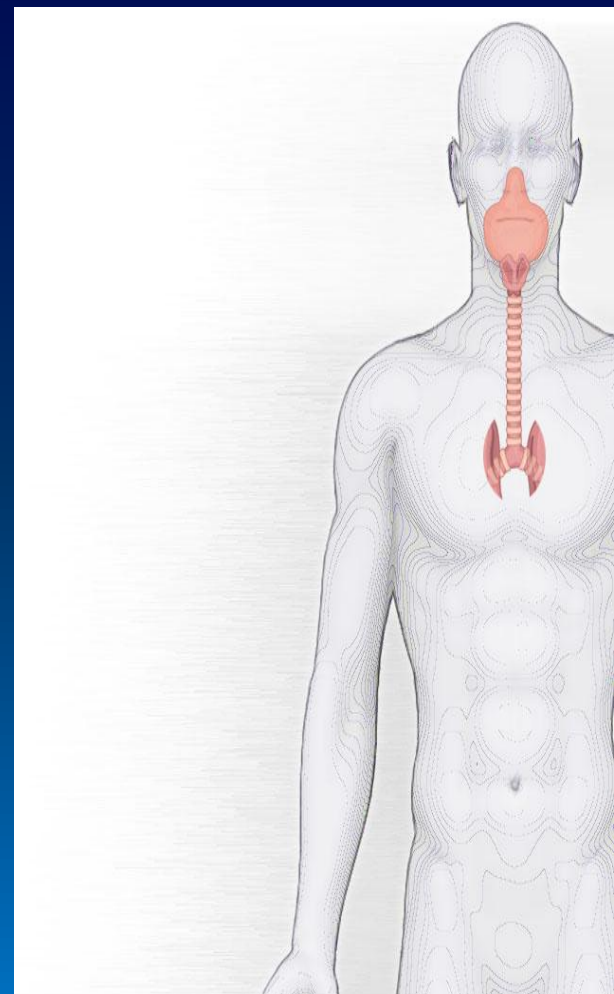
病毒(17种):

腺病毒
冠状病毒229E
冠状病毒HKU1
冠状病毒OC43
冠状病毒NL63
人类偏肺病毒
人鼻病毒/肠病毒
甲型流感病毒
甲型流感病毒H1亚型
甲型流感病毒H1-2009亚型
甲型流感病毒H3亚型
乙型流感病毒

副流感病毒1型
副流感病毒2型
副流感病毒3型
副流感病毒4型
呼吸道合胞病毒

细菌(3种):

百日咳杆菌
肺炎衣原体
肺炎支原体



血流感染 (BCID) 测试条

革兰阳性细菌(8种):

肠球菌属
产单核细胞李斯特菌
葡萄球菌属
金黄色葡萄球菌
链球菌属
B族无乳链球菌
A族酿脓链球菌
肺炎链球菌

耐药基因(3种):

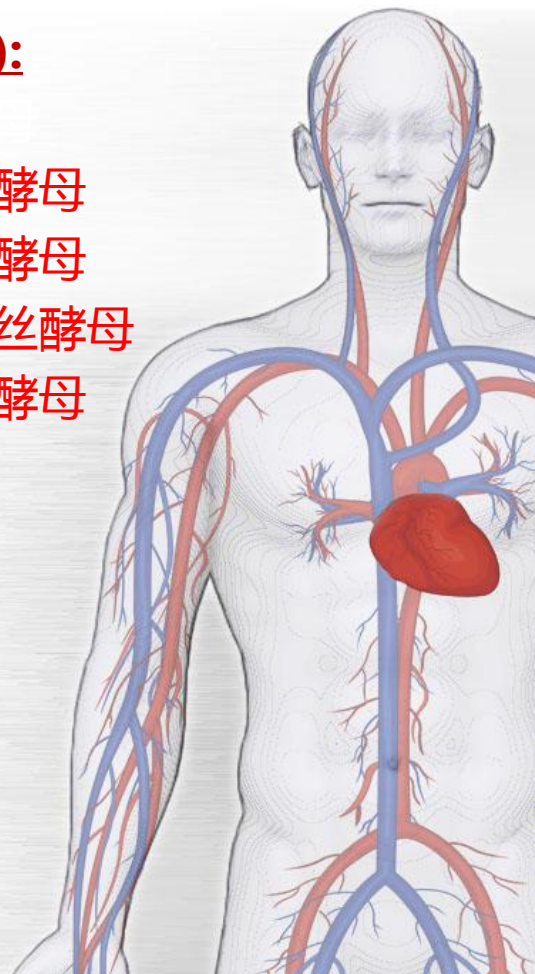
mecA
Van A/B
KPC

革兰阴性细菌(11种):

鲍曼不动杆菌
肠杆菌科细菌
阴沟肠杆菌复合群
大肠埃希菌
产酸克雷伯菌
肺炎克雷伯菌
变形杆菌
粘质沙雷菌
流感嗜血杆菌
脑膜炎奈瑟菌
铜绿假单胞菌

真菌(5种):

光滑假丝酵母
克柔假丝酵母
近平滑假丝酵母
热带假丝酵母



胃肠道疾病(GI)测试条

细菌(7种):

弯曲菌属
难辨梭菌(毒素A/B)
类志贺邻单胞菌
沙门菌属
弧菌属
 霍乱弧菌
小肠结肠炎耶尔森菌

致泻大肠埃希菌/志贺菌(6种):

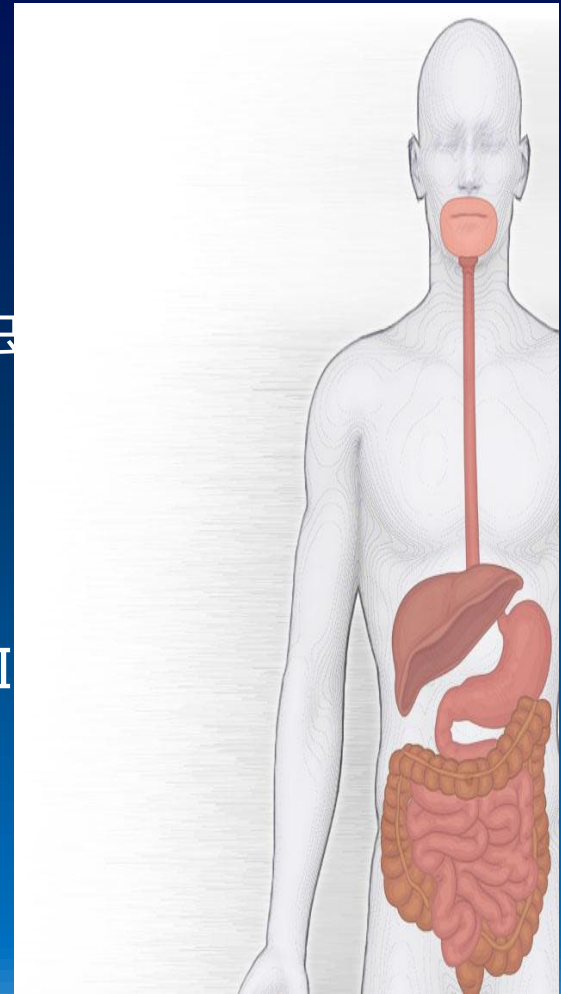
肠道聚集性的大肠埃希菌
肠道致病性的大肠埃希菌
肠道毒性的大肠埃希菌
大肠埃希菌O157
产类志贺毒素的大肠埃希菌
志贺菌、肠侵性的大肠埃希菌

原生动物(4种):

隐孢子虫
环孢子虫
溶组织内阿米巴
兰伯氏贾第鞭毛虫

病毒(5种):

F组腺病毒40/41
星状病毒
诺沃克病毒GI/GII
A群轮状病毒
札幌病毒



脑炎 / 脑膜炎测试条

细菌(6种):

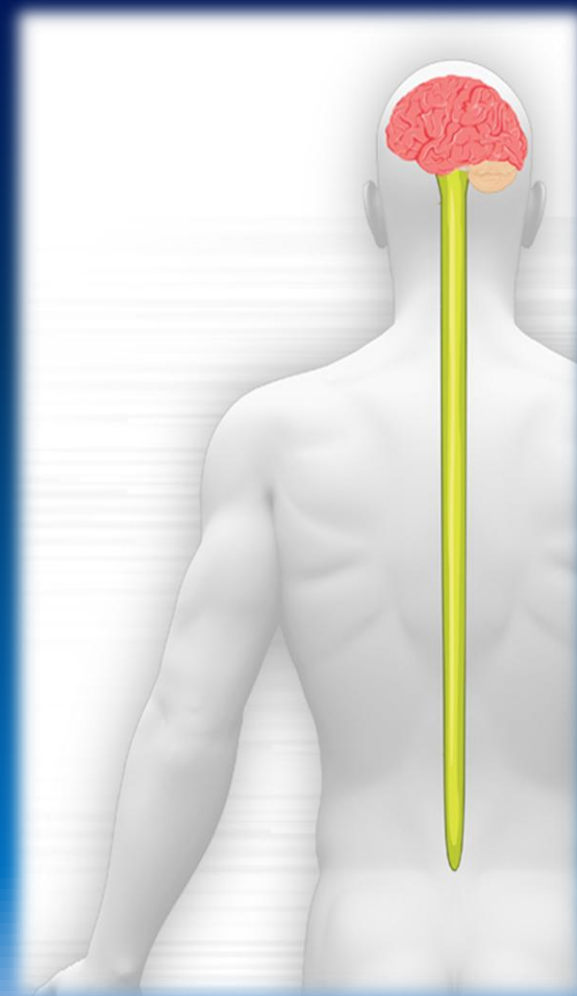
大肠埃希菌
流感嗜血杆菌
产单核细胞李斯特菌
脑膜炎奈瑟菌
无乳链球菌
肺炎链球菌

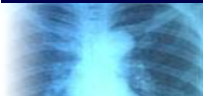
真菌(1种):

新型隐球菌
neoformans/gattii

病毒(7种):

巨细胞病毒
肠病毒
单纯疱疹病毒1 型
单纯疱疹病毒 2 型
人疱疹病毒6型
副肠孤病毒属
水痘带状疱疹病毒





WHO与FIND共同支持研发出Xpert MTB/RIF

工作流程

- 直接检测痰或痰沉淀
- 操作简单，仅需1个步骤的准备工作
- 获得结果的时间 110min
- 不需要生物安全柜
- 内设质控

性能

- 对结核分枝杆菌特异性敏感性与培养相似
- 通过rpoB 基因检测利福平耐药

产品和系统设计

- GeneXpert 系统的独立检测模块
- 测试模块的可扩增性
- 对非结核实验室专业人员也仅需要1天的培训

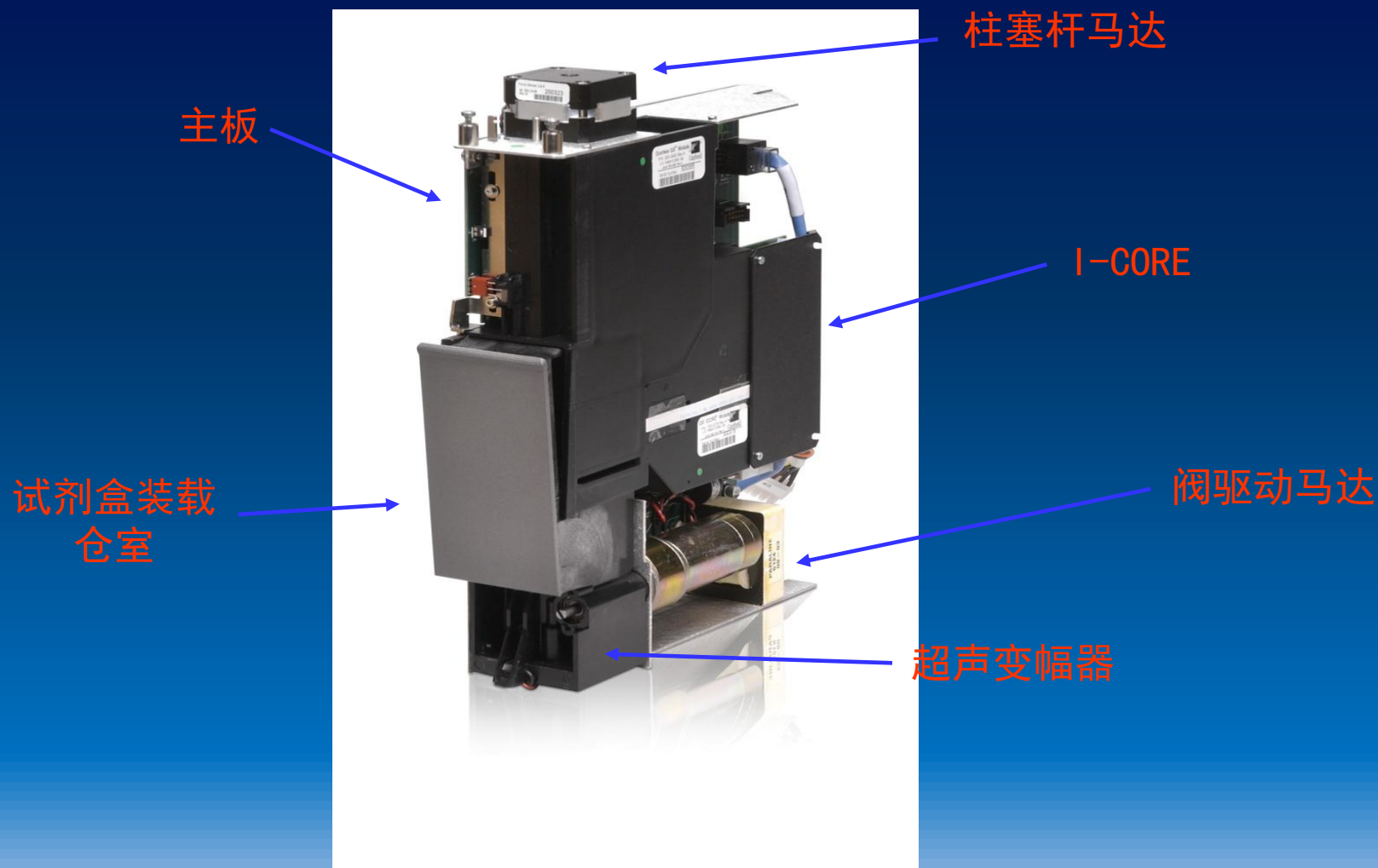


GeneXpert MTB/RIF 检测

- 两小时内能同时检测结核分枝杆菌及其对利福平耐药性
- 对于诊断结核病，包括合并HIV感染的结核病，比涂片镜检更加敏感。其敏感度和固体培养接近
- 不会检测非结核分枝杆菌 (NTM)，不像涂片镜检
- 使用可以检测多种疾病的GeneXpert平台, 可以在低级别的实验室及卫生保健中心应用



GeneXpert 模块



操作程序一览

1
混合



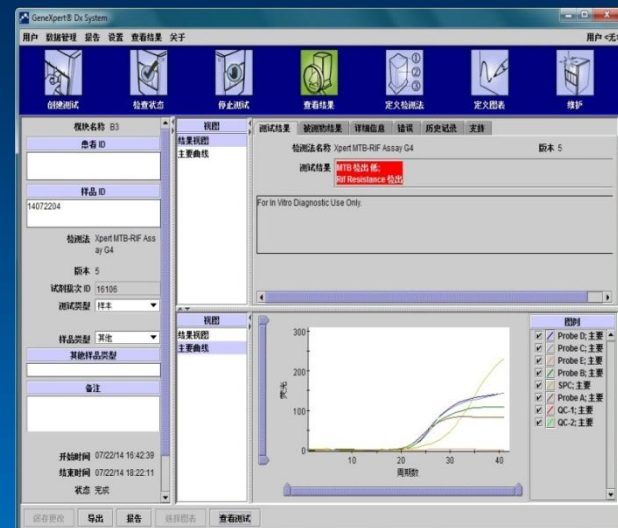
2
加入



3
插入



4
检测



四、呼吸道感染分子检测新技术的临床实践

Filmarray在儿童呼吸道感染（RTI）患者病原体检测的应用实践

研究目的

- 分析儿童呼吸道感染患者中感染病原体的种类、病原体混合感染的状况。
- 探讨在同一患者上呼吸道与下呼吸道中病原体的检出情况及相互关系。



研究方法

病例：2016年2月至10月；在广州医科大学附属第一医院儿科，年龄小于14岁、被诊断为呼吸道感染患者共**55例**。

样本：共从**55例**患者中采集得**55份**鼻咽拭子（NPS），其中**30例**患者在采集鼻咽拭子时，同时采集肺泡灌洗液（BALF）。

方法：以**Filmarray**及实验室自建**荧光定量PCR**方法共同检测NPS及BALF中的18种呼吸道病原体，结果不相符的样本以**巢式PCR**方法进行检测。

呼吸道感染患儿病原体的检出情况

- 对**55份NPS**进行**18种**呼吸道病原检测，检出率最高为**RV**，其余根据检出率从高到低依次为**MP**、**RSV**、**ADV**、**PIV3**、**NL63**、**IFA**、**IFB**、**PIV1**、**PIV4**、**BP**。
- 混合感染在儿童呼吸道病原感染中占**53.7%**。
- **MP**在**2岁以上**儿童中检出率高于**2岁以下**儿童($P<0.05$)；**RSV**在**2岁以下**儿童中检出率高于**2岁以上**儿童($P<0.05$)。
- **2岁以下**儿童较**2岁以上**儿童更易感染呼吸道病原，混合感染在各年龄段检出率未见统计学差异。

da Silva, E. R et al. Severe lower respiratory tract infection in infants and toddlers from a non-affluent population: viral etiology and co-detection as risk factors. *BMC Infect. Dis.* 2013, 13, 41;

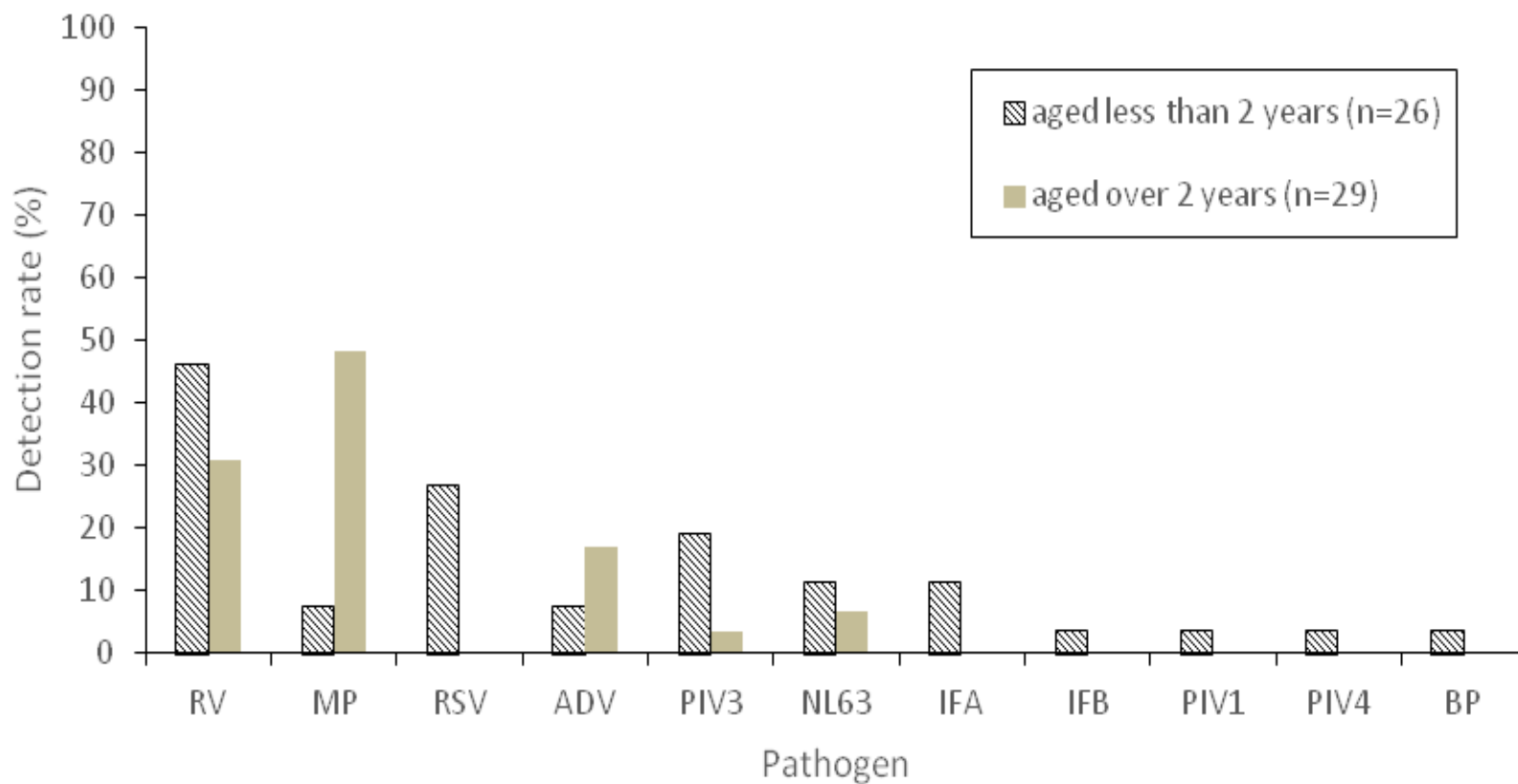
Principi, N.; Esposito, S. Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia pneumoniae cause lower respiratory tract disease in paediatric patients. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2002, 15 (3), 295–300.

Pathogens in NPS from children with RTI detected by Filmarray

	Under 2 years old (n=26)	2 to 6 years old (n=20)	7 to 14 years old (n=9)	Total (n=55)
Pathogen positive	22 (84.6%)	14 (70.0%)	5 (55.6%)	41 (64.5%)
Co-infected cases	11 (50.0%)	8 (57.1%)	3 (60.0%)	22 (53.7%)
RV	12 (46.2%)	7 (35.0%)	2 (22.2%)	21 (38.2%)
MP*	2 (7.7%)	10 (50.0%)	4 (44.5%)	16 (29.1%)
RSV*	7 (26.9%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	7 (12.7%)
ADV	2 (7.7%)	3 (15.0%)	2 (22.2%)	7 (12.7%)
PIV3	5 (19.2%)	1 (5.0%)	0 (0.0%)	6 (10.9%)
NL63	3 (11.5%)	2 (10.0%)	0 (0.0%)	5 (9.1%)
IFA	3 (11.5%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	3 (5.5%)
H1N1	2 (7.7%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (3.6%)
H3N2	1 (3.8%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (1.8%)
IFB	1 (3.8%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (1.8%)
PIV1	1 (3.8%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (1.8%)
PIV4	1 (3.8%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (1.8%)
BP	1 (3.8%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (1.8%)

* Having significant difference between groupsof under 2 years old and group of2 to 6or 7 to 14 years old by the chi-square test ($P<0.05$).

Detection rates for 11 pathogens in children aged less than 2 years and those aged over 2 years



Pathogens detected in multi-analyte-positive NPS samples by Filmarray

Analyte 1	Analyte 2	Analyte 3	Analyte 4	No. of cases (%)
RV	MP			5 (22.7)
RV	MP	PIV3		1 (4.5)
RV	ADV			3 (13.6)
RV	RSV			1 (4.5)
RV	RSV	PIV3		1 (4.5)
RV	PIV3			1 (4.5)
RV	PIV3	NL63		1 (4.5)
RV	PIV3	PIV1	BP	1 (4.5)
RV	PIV4			1 (4.5)
RV	NL63			1 (4.5)
MP	ADV			2 (9.1)
MP	NL63			2 (9.1)
MP	NL63	IFA (H1N1)		1 (4.5)
RSV	PIV3			1 (4.5)

呼吸道感染患儿上、下呼吸道标本的 病原体检测结果

30例患者的**NPS**及**BALF**样本的检测结果，**23例**
（76.6%）患者**NPS**病原可覆盖**BALF**中检出的病原
，其中**16例****（53.3%）**患者**NPS**与**BALF**中病原完全
一致，表明在上、下呼吸道标本中检出的病原体具有
较高的一致性。

Pathogens in NPS and BALF detected by Filmarray

Patient	In NPS	In BALF	Patient	In NPS	In BALF
1	RV, PIV3	RV, PIV3	16	Negative	Negative
2	RV, NL63	RV, NL63	17	MP, ADV	MP
3	RV, MP	RV, MP	18	RV, ADV	RV
4	MP	MP	19	RV, MP, PIV3	RV, MP
5	MP	MP	20	NL63, MP	MP
6	RSV	RSV	21	RV, PIV4	RV
7	RSV	RSV	22	RV, NL63, PIV3	RV
8	RV	RV	23	MP, ADV	MP
9	RV	RV	24	RV, RSV	RV, RSV, MP
10	RV, ADV	RV, ADV	25	MP	MP, NL63
11	Negative	Negative	26	RV	RV, ADV
12	Negative	Negative	27	RSV	RSV, BP
13	Negative	Negative	28	ADV	ADV, MP
14	Negative	Negative	29	Negative	MP
15	Negative	Negative	30	Negative	PIV3

Clinical characteristics of 55 children having NPS detected by Filmarray

Characteristics	No. (%) detected by Filmarray		P value
	SI (n=19)	CI (n=22)	
Mean age (month)	32.6±35.8	35.8±31.7	P>0.05
Fever	18 (94.7)	22 (100.0)	P>0.05
Cough	18 (94.7)	21 (95.5)	P>0.05
Nasal obstruction	6 (31.6)	3 (13.6)	P>0.05
Rhinorrhoea	7 (36.8)	3 (13.6)	P>0.05
Dyspnea	10 (52.6)	8 (36.4)	P>0.05
Shortness of breath	13 (68.4)	9 (40.9)	P>0.05
Diagnosed as pneumonia	16 (84.2)	21 (95.5)	P>0.05
Severe pneumonia	6 (31.6)	4 (18.2)	P>0.05
Pleural effusion	2 (10.5)	3 (13.6)	P>0.05
Complication	0 (0.0)	1 (4.5)	P>0.05

SI: single-pathogen infections , CI: co-infections.

- 85例呼吸道样本（55份NPS和30份BALF）经FilmArray与荧光定量PCR检测，71例（83.5%）样本的结果一致；14例样本的结果不一致。
- 14例结果不一致的样本以巢式PCR方法检测，2例标本结果与Film Array一致，使Film Array与PCR结果一致率达85.9%。

Samples with inconsistent results detected by Filmarray, real-time PCR and verification by nested PCR

No.	Sample type	By Film array	By real-time PCR	Verification by nested PCR
1	NPS	Negative	H3N2, IFB	H3N2, IFB
2	NPS	Negative	IFB	IFB
3	NPS	RV, RSV, PIV3	RV, RSV	RV, RSV
4	NPS	RSV, PIV3	PIV3	PIV3
5	NPS	RV, MP	MP	MP
6	NPS	RV	Negative	Negative
7	NPS	RV, ADV	RV	RV
8	NPS	RV, PIV4	RV	RV
9	NPS	ADV, MP	MP	MP
10	NPS	RV, ADV	RV	RV
11	NPS	RSV	Negative	RSV
12	BALF	RSV	Negative	RSV
13	BALF	RV, ADV	RV	RV
14	BALF	RV, RSV, MP	RV, RSV	RV, RSV



致 谢

- 刘忠民教授、陈德晖教授、陈定强老师
- 硕士研究生（梁伟雯、缪丹云）
- 检验科、转化医学实验室、儿科
- 法国生物梅里埃公司（Filmarray设备与试剂）
- 广州市重大医疗协同创新专项

谢谢