

# 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  
2019-2-26



- 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，尤其是要幼儿和老人
- 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技术手段  
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

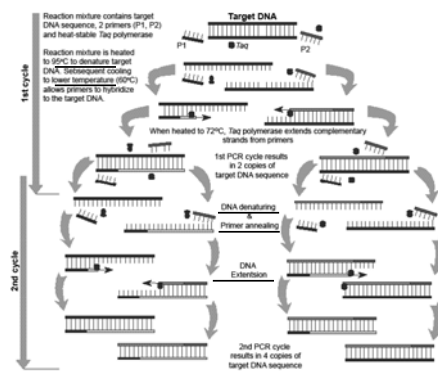


### 核酸扩增技术

- 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 Sequence 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)

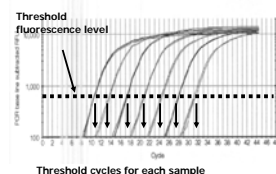


### Polymerase Chain Reaction (PCR)



### 实时荧光定量PCR (RFQ-PCR)

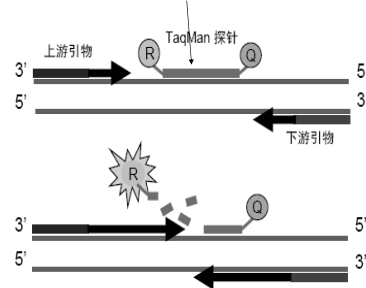
实时荧光定量PCR (real-time fluorescence quantitative PCR)是指在 扩增周期每个时间点 (通常是每个循环结束后), 通过检测荧光强度对PCR过程中产物量进行实时监测, 并根据标准曲线算出PCR的初始模板量。



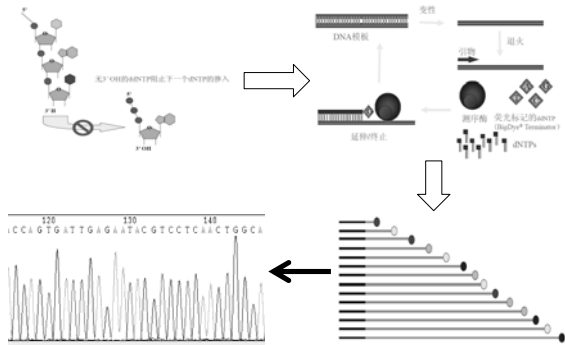
### 水解探针技术

TaqMan 5'-3' Exonuclease

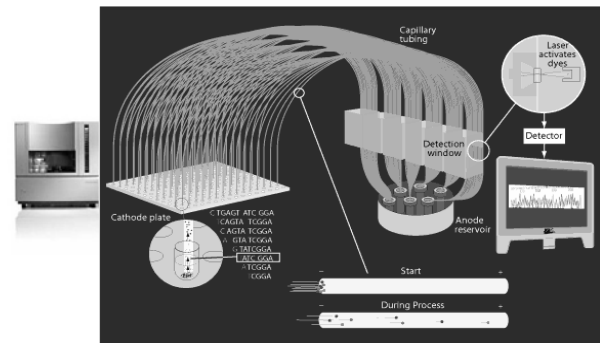
荧光标记探针



## 一代测序(Sanger法)



## 一代测序(Sanger法)



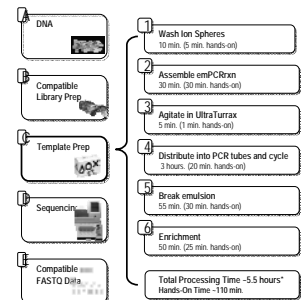
## 高通量基因测序技术

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



NGS: 一次性对多个靶向进行检测，操作复杂，步骤繁多

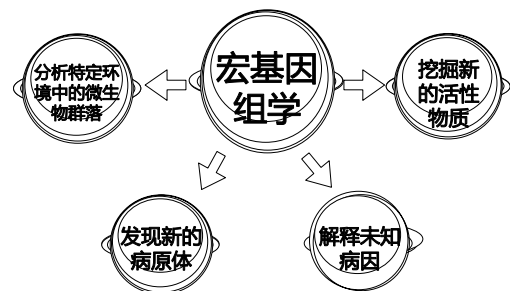
## 宏基因组学

•宏基因组学(Metagenomics)是将环境中全部微生物的遗传信息看作一个整体, 研究微生物与自然环境或生物体之间的关系。

•研究对象是特定环境下所有生物遗传物质的总和, 它包含了可培养的和不可培养的微生物的基因总和。

•热点：细菌和病毒宏基因组学

## 宏基因组学的应用



## 宏基因组学分析技术的比较

### 传统方法

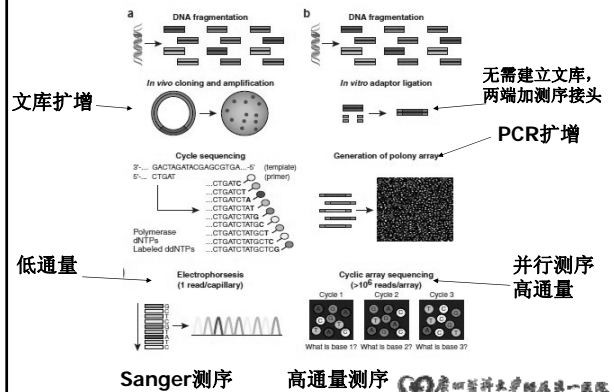
- 样品的处理
- 遗传物质的分离与富集
- 构建文库
- 宏基因组学文库的筛选
- 序列分析

### 基于NGS的方法

- 样品的处理
- 遗传物质的分离与富集
- 构建测序文库
- 高通量测序
- 生物信息学分析



## 宏基因组学分析方法的比较



## 病原微生物常规检测技术的瓶颈

大量的微生物不能被单独纯培养, 无法进行分离研究。

培养方法往往只针对某种微生物, 无法同时对所有微生物完成检测

### 四大瓶颈

PCR法必须基于基因序列, 对于未知序列的微生物无法检测。

微生物的相互作用复杂, 需作为整体研究



## 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

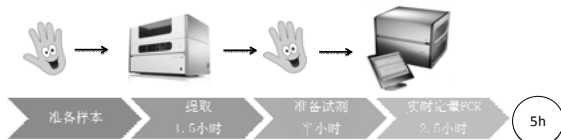
目前世界上已经商业化的从样本处理、核酸提取至扩增检测为一体的自动化分析仪

- 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**

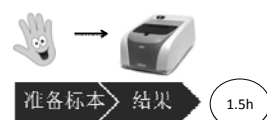


## 提高检测效率

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Cepheid (赛沛)  
最近被美国丹纳赫  
以40亿美元收购



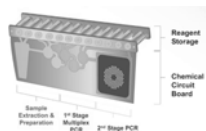
美国Alere q



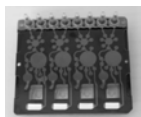
罗氏 cobas Liat



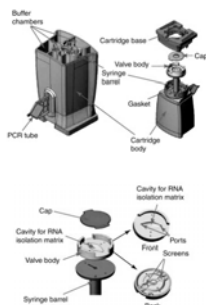
## 一体化核酸检测技术



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



## 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



Sample Prep  
核酸提取和制备



Amplification  
核酸扩增



Detection  
产物检测



## FilmArray 的原理

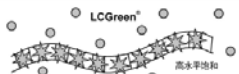
### 巢式多重 PCR

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

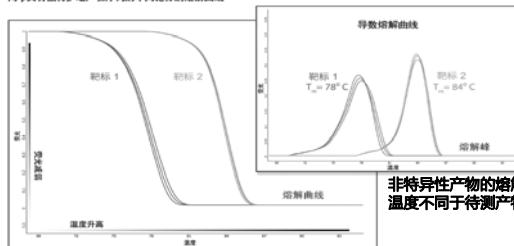
FilmArray PCR 反应包含 DNA 结合染料 LCGreen® Plus。LCGreen Plus 在每个 PCR 循环期间随着 DNA 拷贝的生成而与其结合。当结合到双链 DNA 时, 染料发出荧光。这些荧光被 FilmArray 仪检测到。随着温度的升高和双链 DNA 拷贝的解链, LCGreen Plus 染料被释放且检测到荧光减弱。



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。这会产生一个熔解曲线 (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。

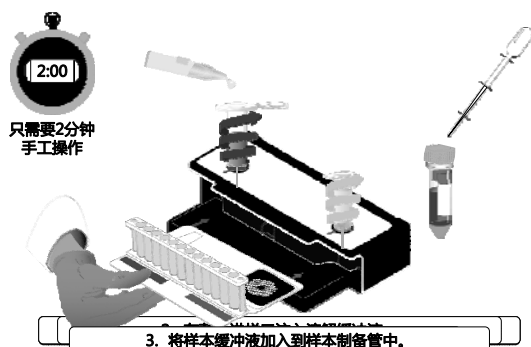
具有独特扩增产物序列的不同靶标的熔解曲线



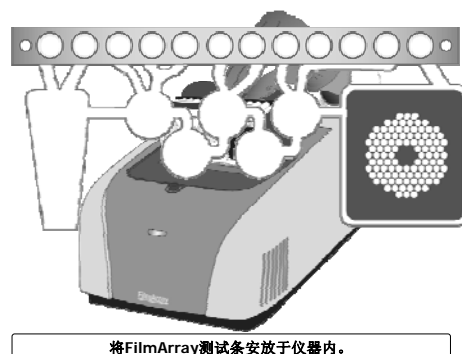
非特异性产物的熔解  
温度不同于待测产物



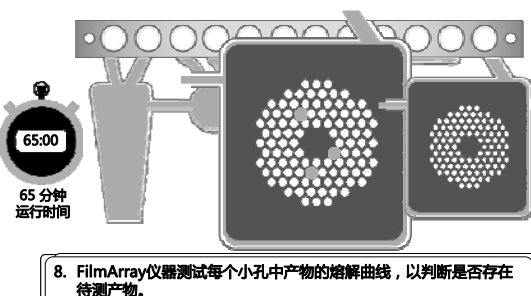
## 操作简单的测试条准备工作



## 样本裂解、提纯、扩增、检测一步到位！

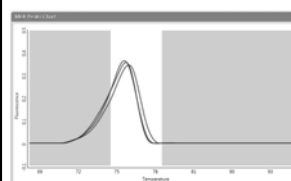


## 样本裂解、提纯、扩增、检测一步到位！

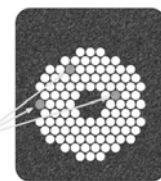


## 自动化结果分析

- 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，从而生成了易读的检测报告。



## 上呼吸道感染(RP)测试条

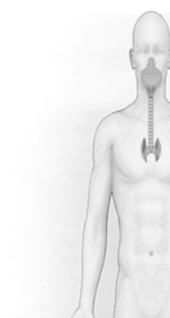
### 病毒(17种):

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H1N1亚型  
甲型流感病毒H1-2009亚型  
甲型流感病毒H3N2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):

白假丝酵母

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



广州医科大学附属第一医院

## 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):

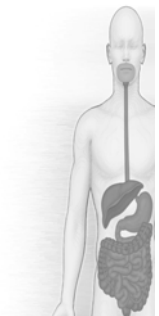
F组腺病毒40/41

星状病毒

诺沃克病毒GI/GII

A群轮状病毒

札幌病毒



广州医科大学附属第一医院

## 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

副粘病毒属

水痘带状疱疹病毒



广州医科大学附属第一医院



## 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
- 内置质控

### 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只需要1天的培训



广州医科大学附属第一医院

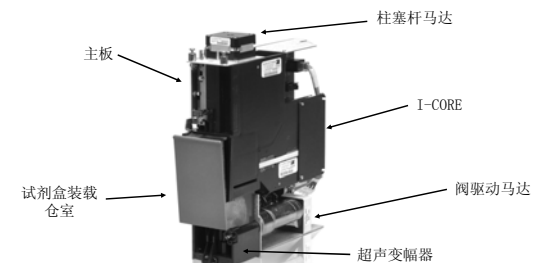
## GeneXpert MTB/RIF 检测

- 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



广州医科大学附属第一医院

## GeneXpert 模块



广州医科大学附属第一医院

## 操作程序一览

1  
混合



2  
加入



3  
插入



4  
检测



Cepheid公司基于Xpress快速诊断技术，Xpert Xpress Flu和Xpert Xpress Flu/RSV的两个分子诊断产品，2017年通过FDA批准，可在30分钟内获得诊断结果。



## 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，结果不相同的样本以巢式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, 471; 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.



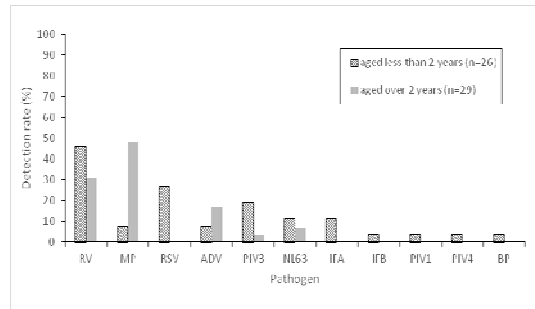


### Pathogens in NPS from children with RTI detected by Filmarray

	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 group of under 2 years old and group of 2 to 6 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



昆明医科大学第一附属医院

### 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)

昆明医科大学第一附属医院

### 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。

昆明医科大学第一附属医院

### 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

昆明医科大学第一附属医院

### 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.

昆明医科大学第一附属医院

- 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**

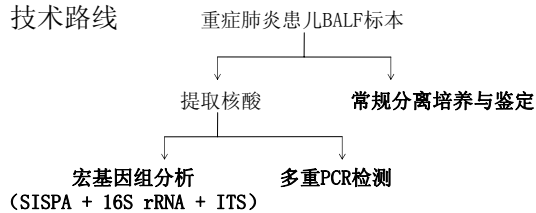
No.	Sample type	By Film array	By real-time PCR	Verification by nested PCR
1	NPS	Negative	H3N2, IFB	H3N2, IFB
2	NPS	Negative	IFB	IFB
3	NPS	RV, RSV, PIV3	RV, RSV	RV, RSV
4	NPS	RSV, PIV3	PIV3	PIV3
5	NPS	RV, MP	MP	MP
6	NPS	RV	Negative	Negative
7	NPS	RV, ADV	RV	RV
8	NPS	RV, PIV4	RV	RV
9	NPS	ADV, MP	MP	MP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



## 儿童重症肺炎宏基因组学病原体检测的实践

- 标本
  1. 9份BALF标本采集自重症肺炎患儿，其中病例9和病例10取自同一患儿，时间相隔一周。
  2. 1份BALF标本取自骨髓移植术后发生GVHD反应的患儿。

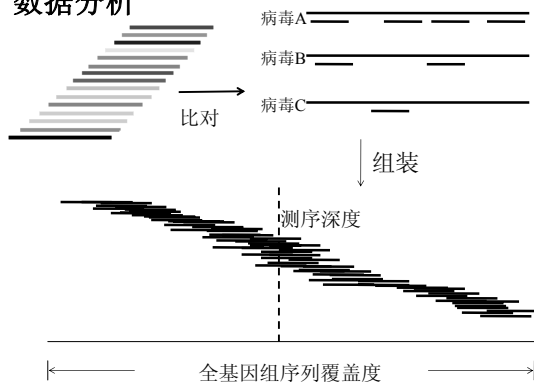
### 技术路线



## 宏基因组学生物信息学分析流程



## 数据分析



## 10例BALF标本宏基因组学分析结果

病例	病毒	细菌	真菌	其他	临床诊断
1	腺病毒-7	恶臭假单胞	无	肺炎支原体	重症肺炎
2	腺病毒-7	正常菌群	热带假丝酵母	无	重症肺炎
3	腺病毒-7、副流感病毒	大肠杆菌	无	无	重症肺炎
4	人偏肺病毒	副流感嗜血杆菌、鼻疽诺卡氏菌	无	无	重症肺炎
5	甲型流感病毒（H3N2）	副流感嗜血杆菌	无	无	重症肺炎
6	腺病毒-7	副流感嗜血杆菌	无	无	重症肺炎
7	无	正常菌群	无	无	GVHD
8	腺病毒-7	黏液罗斯菌	无	无	重症肺炎
9	腺病毒-7	正常菌群	无	无	重症肺炎
10	腺病毒-7	正常菌群	无	肺炎支原体	重症肺炎

宏基因组学分析（NGS）、PCR扩增及常规培养结果的比较				
病例	NGS结果	普通PCR结果	细菌、真菌培养及肺炎支原体血清学检查	备注
1	7型腺病毒、肺炎支原体、肺炎链球菌	7型腺病毒 16S rRNA阳性	正常菌群	细菌培养未鉴定出肺炎链球菌
2	7型腺病毒 热带假丝酵母菌	7型腺病毒 16S rRNA阳性、ITS阳性、	酿酒酵母	真菌结果不一致
3	7型腺病毒、副流感病毒、大肠杆菌	7型腺病毒 16S rRNA阳性	大肠杆菌	普通PCR未检出副流感病毒
4	人偏肺病毒、鼻疽诺卡氏菌、副流感嗜血杆菌	人偏肺病毒 16S rRNA阳性	星形诺卡菌	细菌结果不一致
5	甲型流感病毒(H3N2)、副流感嗜血杆菌	甲型流感病毒 16S rRNA阳性、ITS弱阳性、	副流感嗜血杆菌	一致
6	7型腺病毒 副流感嗜血杆菌	7型腺病毒 16S rRNA阳性、ITS阳性、	副流感嗜血杆菌 白假丝酵母菌(10 <sup>3</sup> )	NGS未检出白假丝酵母菌
7	正常菌群	16S rRNA阳性	正常菌群	一致
8	7型腺病毒	7型腺病毒 16S rRNA阳性	正常菌群	一致
9	7型腺病毒	7型腺病毒、16S rRNA阳性	正常菌群	一致
10	7型腺病毒、肺炎支原体	7型腺病毒、16S rRNA阳性	正常菌群、肺炎支原体	一致

病例2(肺泡灌洗液)标本中微生物组成分析					
分类	病原体	数量	覆盖度(%)	深度	百分比(%)
病毒	7型腺病毒	2739	99 (34946/35140)	16	95.9
	甲型流感病毒(H5N1, H9N2?)	14	10.8 (1466/13590)	1	0.4
	肠杆菌噬菌体	7	10 (1698/168903)	2.5	0.28
细菌	代尔夫特食酸菌	2156	5.7 (382285/6685842)	1.1	23.2
	氧化木糖无色杆菌	1663	4.6 (320566/7013095)	1.1	15.7
	粘质沙雷菌	1614	6 (316838/5241455)	1	15.3
	嗜麦芽窄食单胞菌	1090	4.3 (207404/4851126)	1	10.3
	百日咳博德特氏菌	148	0.48 (30524/3449360)	1.1	1.4
真菌	热带假丝酵母菌	3430	0.04 (5328/14630139)	81	66.1
	白假丝酵母菌	328	0.01 (3064/27558918)	7	6.3
	球形马拉色菌	151	0.03 (2432/8958118)	4.6	2.9

