

高通量测序在儿童重症肺炎病原学诊断中的应用*

邱梅冰, 杨彤[△]

广西壮族自治区柳州市人民医院儿科, 广西柳州 545006

摘要:目的 探讨高通量测序在儿童重症肺炎病原学诊断中的应用价值。方法 选择 2019 年 1 月至 2020 年 1 月该院收治的 99 例儿童重症肺炎患儿作为研究对象, 所有患儿均进行常规检测(血常规、超敏 C 反应蛋白、降钙素原)、常规病原学检测(肺炎支原体抗体滴度检测、咽拭子免疫荧光病毒检测、血培养), 入院后第 2 天或第 3 天行支气管镜检查, 采集肺泡灌洗液进行传统病原学检测(涂片显微镜检查和培养)及高通量测序病原学检查, 分析并比较以上检测方法患儿病原体检出情况。结果 99 例重症肺炎患儿传统病原学检测, 检出病原体 66 例(66.67%), 其中单一病原体 55 例, 混合病原体 11 例; 细菌 24 例(24.24%), 肺炎支原体 55 例(55.56%), 病毒 8 例(8.08%)。肺泡灌洗液高通量测序检出病原体 97 例(97.98%), 包括单一细菌 10 例, 单一病毒 17 例, 单一支原体 28 例, 混合病原体 42 例。肺泡灌洗液高通量测序细菌和病毒的检出率均高于传统检测方法($P < 0.05$), 而肺炎支原体的检出率虽然低于血清肺炎支原体抗体滴度检测的检出率, 但差异无统计学意义($P > 0.05$)。传统方法未培养出真菌, 高通量测序方法检出真菌 4 例。结论 高通量测序能快速、准确地检测和鉴定病原体, 有助于及时、准确地治疗儿童重症肺炎。

关键词:重症肺炎; 病原体; 儿童; 肺泡灌洗液; 高通量测序

中图分类号:R725.6

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)18-2625-05

Application of high throughput sequencing in etiological diagnosis of severe pneumonia in children*

QIU Meibing, YANG Tong[△]

Department of Pediatrics, Liuzhou People's Hospital, Guangxi Zhuang Autonomous Region, Liuzhou, Guangxi 545006, China

Abstract: Objective To investigate the value of high throughput sequencing in the etiological diagnosis of severe pneumonia in children. **Methods** Ninety-nine children with severe pneumonia treated in this hospital from January 2019 to January 2020 were selected as the research objects, routine tests (blood routine, high-sensitivity C-reactive protein, procalcitonin), routine pathogenic tests (Mycoplasma pneumoniae antibody titer test, throat swab immunofluorescence virus test, blood culture) were performed for them. Bronchoscopy was performed on the 2nd or 3rd day after admission, and the alveolar lavage fluid was collected for traditional pathogenic testing (smear microscopy and culture) and high throughput sequencing pathogenic testing. The pathogenic physical examination of children with the above methods were analyzed and compared. **Results** In 99 cases of children with severe pneumonia, 66 cases (66.67%) of pathogens were detected by traditional pathogenic testing, including 55 cases of single pathogen and 11 cases of mixed pathogens; 24 cases of bacteria (24.24%), 55 cases of Mycoplasma pneumoniae (55.56%) and 8 cases of virus (8.08%). There were 97 cases (97.98%) of pathogens by high throughput sequencing of alveolar lavage fluid, including 10 cases of single bacteria, 17 cases of single virus, 28 cases of single Mycoplasma and 42 cases of mixed pathogens. The detection rate of bacteria and virus by high throughput sequencing of alveolar lavage fluid was higher than that of traditional detection methods ($P < 0.05$). The detection rate of Mycoplasma pneumoniae was lower than that of serum Mycoplasma pneumoniae antibody titer detection, the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). No fungi was cultured by traditional methods, and 4 cases of fungi were detected by high-throughput

* 基金项目:广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费科研课题(Z20200035)。

作者简介:邱梅冰,女,副主任医师,主要从事儿童重症及新生儿疾病方面的研究。△ 通信作者,E-mail:yangtong0705@sina.com。

本文引用格式:邱梅冰,杨彤.高通量测序在儿童重症肺炎病原学诊断中的应用[J].检验医学与临床,2021,18(18):2625-2628.

sequencing methods. **Conclusion** High throughput sequencing can quickly and accurately detect and identify pathogens, which is helpful for timely and accurate treatment of severe pneumonia in children.

Key words: severe pneumonia; pathogen; children; alveolar lavage fluid; high throughput sequencing

儿童肺炎是 5 岁以下儿童死亡的最主要原因之一^[1-2], 而重症肺炎具有复杂性、缺乏可预测性等特点, 且常涉及其他器官的功能障碍, 因此具有更高的病死率。早期应用有效的抗感染治疗方案可以改善患儿的预后, 而精准的抗感染治疗方案有赖于病原体的检测。迄今为止, 儿童重症肺炎感染源的识别仍然是临床的一个主要难题。检测病原体的标本包括血液、咽拭子、痰液及支气管肺泡灌洗液, 其中支气管肺泡灌洗液标本的检测常用于重症肺炎患儿的微生物检查^[3]。本科室自 2019 年 1 月以来征得患儿家长同意后对重症肺炎患儿的肺泡灌洗液实行高通量测序病原体检测, 实现了对重症肺炎病原体的精准诊断, 为临床抗感染治疗方案的制订提供了精准的依据, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2019 年 1 月至 2020 年 1 月在本院儿科住院的 99 例重症肺炎患儿作为研究对象, 其中男 53 例, 女 46 例; 年龄 1 个月至 14 岁, 中位年龄 3 岁 2 个月; 所有患儿均已在门诊及基层医院给予口服及静脉抗菌药物治疗, 入院后均给予经验性抗感染治疗, 病原学检测结果回报后根据病情调整抗感染治疗方案; 13 例应用呼吸机辅助通气治疗, 3 例使用体外膜肺氧合 (ECMO) 循环支持治疗; 经抗感染及对症支持治疗后, 97 例患儿好转出院, 2 例死亡。纳入标准: 所有患儿诊断均符合《儿科学》第 9 版儿童重症肺炎的诊断标准^[4]; 家属均签署知情同意书, 书面同意进行支气管镜及高通量测序等检查; 患儿均有支气管镜检的适应证, 无禁忌证^[5]。

1.2 方法 患儿入院第 1 天在开始经验性抗感染治疗前均进行常规检测, 包括血常规、超敏 C 反应蛋白、降钙素原、肺炎支原体抗体滴度、咽拭子免疫荧光病毒 (包括呼吸道合胞病毒、甲型流感病毒、副流感病毒 1/2/3 型、腺病毒) 检测以及血培养, 根据病情选择性进行真菌 D-葡聚糖等检测。入院后第 2 天或第 3 天行支气管镜镜检查并采集肺泡灌洗液, 每例标本分 2 份, 1 份送一般细菌涂片及培养检查, 另 1 份送高通量测序检查。高通量测序标本交由深圳华大基因股份有限公司检测, 与该公司病原体数据库进行比对, 得出报告结果序列数。高通量测序结果判读阳性的标准如下^[6]: (1) 在属水平上, 细菌 (不包括结核分枝杆菌) 和真菌的相对丰度大于 30%; (2) 如果至少有一个

读数在物种或属水平上与参考基因组一致, 则认为结核分枝杆菌呈阳性; (3) 当严格的图谱读数 (SMRN) 不小于 3 时, 认为病毒检测呈阳性; (4) 当用传统的病原学检测方法检测到病原体, 且高通量测序的序列数大于 50 时, 也可以认为该病原体被检出。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计学软件对数据进行统计处理。计数资料以频数、率表示, 组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 传统常规检测结果 99 例患儿中白细胞增高 20 例 (18 例以中性粒细胞升高为主, 2 例以淋巴细胞升高为主), 白细胞下降 7 例; 超敏 C 反应蛋白增高 72 例; 降钙素原增高 47 例; 真菌 D-葡聚糖阳性 6 例; 检出病原体 66 例 (66.67%), 其中单一病原体 55 例, 混合病原体 11 例。临床传统病原学检测检出细菌 24 例 (24.24%), 其中痰培养检出 17 例 (17.17%), 血培养检出 4 例 (4.04%), 痰培养及血培养均检出 3 例 (3.03%); 肺炎支原体抗体滴度检测检出肺炎支原体 55 例 (55.56%); 咽拭子检测检出病毒 8 例 (8.08%)。

2.2 肺泡灌洗液涂片及细菌培养结果 肺泡灌洗液涂片检出病原体 36 例 (36.36%), 分别为革兰阳性球菌 25 例 (25.25%), 革兰阴性杆菌 1 例 (1.01%), 革兰阳性球菌及阴性杆菌混合 9 例 (9.09%), 真菌孢子 1 例 (1.01%)。肺泡灌洗液细菌培养检出 16 例, 分别为流感嗜血杆菌 7 例, 肺炎链球菌 4 例, 肺炎克雷伯菌 2 例, 铜绿假单胞菌 1 例, 鲍曼不动杆菌 1 例, 嗜麦芽单胞菌 1 例。

2.3 肺泡灌洗液高通量测序病原体检出结果 肺泡灌洗液高通量测序检出病原体 97 例 (97.98%), 包括单一细菌 10 例, 单一病毒 17 例, 单一支原体 28 例, 混合病原体 42 例 (混合有细菌的 38 例; 混合有病毒的 25 例, 混合有肺炎支原体的 20 例)。检出的细菌为肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、铜绿假单胞菌及肺炎克雷伯菌, 病毒为腺病毒及巨细胞病毒, 混合病原体中有腺病毒 7 型、肺炎支原体、缓征链球菌、肺炎链球菌、产黑色普雷沃菌、嗜血杆菌、烟曲霉。

2.3.1 肺泡灌洗液细菌培养与高通量测序细菌检出结果比较 99 例肺泡灌洗液标本中, 细菌培养检出细菌 16 例 (16.16%), 高通量测序检出细菌 48 例 (48.48%), 2 种检测方法均检出细菌 12 例 (12.12%)。肺泡灌洗液高通量测序的细菌检出率高

于细菌培养的细菌检出率($P < 0.05$),见表 1。

表 1 肺泡灌洗液细菌培养与高通量测序细菌检出结果比较(n)

细菌培养	高通量测序		合计
	阳性	阴性	
阳性	12	4	16
阴性	36	47	83
合计	48	51	99

2.3.2 咽拭子和肺泡灌洗液高通量测序病毒检出结果比较 99 例咽拭子标本中检出病毒 8 例(8.08%),肺泡灌洗液高通量测序检出病毒 42 例(42.42%),2 种检测方法均检出病毒 5 例(5.05%)。肺泡灌洗液高通量测序的病毒检出率高于咽拭子的病毒检出率($P < 0.05$),见表 2。

表 2 咽拭子和肺泡灌洗液高通量测序病毒检出结果比较(n)

咽拭子	高通量测序		合计
	阳性	阴性	
阳性	5	3	8
阴性	37	54	91
合计	42	57	99

2.3.3 血清肺炎支原体抗体滴度检测与肺泡灌洗液高通量测序肺炎支原体检出结果比较 肺炎支原体抗体滴度检测,99 例患儿中检出肺炎支原体 55 例(55.56%),肺泡灌洗液高通量测序检出肺炎支原体 48 例(48.48%),2 种检测方法均检出肺炎支原体 36 例(36.36%)。肺泡灌洗液高通量测序的肺炎支原体检出率低于血清肺炎支原体抗体滴度检测的检出率,但差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 3。

表 3 血清肺炎支原体抗体滴度检测与肺泡灌洗液高通量测序肺炎支原体检出结果比较(n)

肺炎支原体抗体	高通量测序		合计
	阳性	阴性	
阳性	36	19	55
阴性	12	32	44
合计	48	51	99

2.3.4 传统培养方法与高通量测序真菌检出结果比较 血液、痰、肺泡灌洗液标本传统培养均未检出真菌,高通量测序检出真菌 4 例,主要为烟曲霉。

3 讨 论

重症肺炎是儿科常见危重疾病,由于其病情进展迅速、并发症多,可累及多系统多器官,在临床上有较高的病死率。重症肺炎的常见病原体包括细菌、病

毒、真菌、支原体等,重症肺炎可由单一病原体引起,也可由混合病原体引起。尽快明确引起重症肺炎的病原体是实现精准抗感染治疗的前提。尽管有全面的检测方法,但高达 60% 的患儿没有检测到病原体^[7]。在病原体未明前,经验性使用抗菌药物通常作为最初的抗感染治疗。经验性抗菌药物治疗通常缺乏针对性,广谱抗菌药物可能导致抗菌药物耐药性的出现;如为病毒感染,则导致不必要的广谱抗菌药物使用,诱导抗药性,并增加医疗成本。目前临床上采用的传统病原学检测方法包括病原体培养、抗原抗体检测等。目前这些传统的病原体检测技术均无法为临床精准的抗感染治疗提供依据,临床上迫切需要一种可以较快速且精准的病原学检测手段。

近年来随着高通量测序技术的发展,人们能够检测、鉴定甚至量化定值在人类消化道或呼吸管腔的原核或真核微生物群落。高通量测序技术,其原理在于直接从临床标本中提取全部病原体的 DNA 或 RNA,利用基因组学的研究策略研究标本中所包含的全部病原体的遗传组成及其群落功能,通过同源序列比对以筛查鉴定病原体。这种方法不需要病原体的分离培养,可实现在数小时到数天的单一测序过程中从许多样本中产生数据,不仅有效地克服了现有分子诊断技术的缺陷,还为多种病原体(尤其是真菌和病毒)混合感染的检测开辟了新的技术路径^[8]。高通量测序技术从引入临床应用后即取得了令人瞩目的成绩^[9-12]。高通量测序技术在呼吸系统病原学诊断和鉴定中的应用,特别是在重症肺炎和不明原因感染患儿中的应用越来越广泛。

细菌仍是目前重症肺炎的常见病原体。传统的细菌培养仍然被视为诊断细菌感染的金标准,但它很费时,阳性率不高,而且仅限于特定的病原体检测,并非所有病原体都可以培养。本研究显示,肺泡灌洗液高通量测序细菌检出率为 48.48%,高于传统细菌培养方法的细菌检出率(16.16%),差异有统计学意义($P < 0.05$),高通量测序使细菌检出率提高了近 2 倍。本研究中所有肺泡灌洗液的采集均在使用抗菌药物治疗后 1~2 d,提示高通量测序结果不受到先前抗菌药物使用的影响,这与 PARIZE 等^[13]的研究结果一致。高通量测序在混合细菌检出方面也表现良好^[8],本研究中检出混合细菌感染,这是传统细菌培养所不能的。根据高通量测序结果可优化治疗方案和减少药物不良反应,甚至减少医疗费用。

由病毒引起的呼吸道感染是全球人类最常见的疾病之一,病毒不仅能引起轻微的上呼吸道感染,也能引起重症肺炎。而由新型冠状病毒引起的新型冠状病毒肺炎至今仍未得到完全控制,其对全球公共卫

生存在巨大威胁^[14]。快速和准确地识别病原体,对于选择适当的治疗方法,挽救人们的生命,控制流行病,以及避免不必要地使用抗菌药物很重要。病毒分离培养是诊断病毒感染的金标准,但其灵敏度和特异度差,且费时费力,需要有经验的技术人员进行分析,结果仍不确定,临床上不易开展。常规诊断检测,例如用于快速检测病毒抗体或病毒抗原的测定方法,已在许多临床实验室中广泛应用。本研究提示,咽拭子病毒检出率为 8.08%,而肺泡灌洗液高通量测序的病毒检出率为 42.42%,较常规检测方法明显升高($P < 0.05$)。有研究发现病毒合并细菌感染患者的病死率增高^[15],从而突出了快速诊断细菌共感染或重叠感染的重要性。高通量测序在检测病毒合并细菌感染方面显示出巨大的优势^[16]。本研究中混合病原体感染有 42 例,这些病例在高通量测序结果回报后加用针对性抗感染药物治疗后病情得到改善。本研究中 2 例死亡患儿为腺病毒感染,发生于 2019 年腺病毒流行季节,初期临床医师对该疾病认识不足,进行肺泡灌洗液高通量测序后明确患儿病原体,调整治疗方法,随后发病率及病死率均降低。

肺炎支原体是儿童社区获得性肺炎的主要病因。近年来,与肺炎支原体相关的重症肺炎病例的报道越来越多^[17]。肺炎支原体抗体滴度检测是目前许多基层医院最常用的方法,但这种方法在对不同发病时期采集的血清样本以及使用不同的商业检测试剂盒进行检测时,会产生不一致的结果,具有较高的假阴性率和假阳性率。对某些患儿来说,由于肺炎支原体抗体可持续存在很长时间,故很难确认患儿当前是否存在肺炎支原体现症感染^[18]。本研究显示,肺炎支原体抗体滴度检测肺炎支原体检出率为 55.56%,而高通量测序检出率为 48.48%,即高通量测序法肺炎支原体检出率较肺炎支原体抗体滴度检测的检出率低,与李学清等^[19]的研究结果一致。但高通量测序通过检测肺炎支原体的序列数可明确是否为现症感染,还可显示肺炎支原体与其他病原体的共患感染,这是常规检测方法无法实现的。

此外,本研究采用高通量测序检出 4 例真菌,主要为烟曲霉,而传统病原学检测均未检出真菌。DECKER 等^[20]对 50 例真菌脓毒症患儿在其发病后的 28 d 内连续 6 个时间点进行了真菌培养、高通量测序,并对血浆 β -D-葡聚糖、 γ -干扰素、肿瘤坏死因子等指标进行检测,结果提示,高通量测序的诊断方法适用于真菌脓毒症患儿和血培养阴性患儿的真菌病原体鉴定,可弥补常规培养诊断的空白。同时,已证实高通量测序在检测真菌感染方面存在可行性^[7],可为临床及时抗真菌治疗提供重要依据,对改善患儿预

后、抢救患儿生命起到非常重要的作用。高通量测序能帮助临床医生快速、准确地诊断原因不明的呼吸系统疾病,但也存在许多挑战,如缺乏通用的结果分析标准和通用的报告解释指南,同时背景病原体与真实病原体的鉴别仍然是临床需要解决的问题^[21]。目前高通量测序的成本仍较高(3 500 元/例),需注意选择合适的患儿进行检测。

综上所述,高通量测序能快速、准确地检测和鉴定病原体,有助于及时、准确地治疗儿童重症肺炎。随着医学发展,高通量测序有望为临床儿童重症肺炎精确诊断和治疗提供重要依据。

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 (10063): 3027-3035.
- [2] ZAR H J. Bacterial and viral pneumonia: new insights from the drakenstein child health study [J]. *Paediatr Respir Rev*, 2017, 9(24): 8-10.
- [3] JIANG J, HU C P, LI Y Y, et al. Transmission electron microscopy improves the diagnostic sensitivity in nonbacterial etiology of severe pneumonia: a retrospective study [J]. *Am J Med Sci*, 2019, 357(4): 289-295.
- [4] 王卫平, 孙锐, 常立文, 等. 儿科学 [M]. 9 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 252.
- [5] 国家卫生健康委员会人才交流服务中心儿科呼吸内镜诊疗技术专家组. 中国儿科可弯曲支气管镜术指南 (2018 版) [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2018, 33(13): 983-989.
- [6] LI H N, GAO H, MENG H, et al. Detection of pulmonary infectious pathogens from lung biopsy tissues by metagenomic next-generation sequencing [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8(6): 205-215.
- [7] MIAO Q, MA Y, WANG Q, et al. Microbiological diagnostic performance of metagenomic next-generation sequencing when applied to clinical [J]. *Clin Infect Dis*, 2018, 67 (Suppl 2): S231-S240.
- [8] ALIOUAT-DENIS C M, CHABÉ M, DELHAES L, et al. Aerially transmitted human fungal pathogens: what can we learn from metagenomics and comparative genomics [J]. *Rev Iberoam Micol*, 2014, 31(1): 54-61.
- [9] 张金李, 冯翔. 高通量技术在重症肺炎患者呼吸道病原体快速检测中的应用 [J]. *检验医学与临床*, 2018, 15(16): 2439-2440.
- [10] 王珍妮, 龚唯鸣, 吴意, 等. 高通量二代测序对感染性新生儿胆红素血症病原菌的分析 [J]. *中国微生态学杂志*, 2019, 31(11): 1264-1268.
- [11] WILSON M R, SAMPLE H A, ZORN (下转第 2633 页)

性疾病进行迅速诊断和适当处理。

参考文献

[1] 孙井奎. 新生儿凝血功能异常的临床特征及影响因素研究[J]. 中国社区医师, 2019, 35(29): 49-50.

[2] PAL S, CURLEY A, STANWORTH S J. Interpretation of clotting tests in the neonate[J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2015, 100(3): F270-F274.

[3] 夏洪艳, 苏庸春, 温贤浩. 新生儿期纤维蛋白原降低研究进展[J]. 儿科药学杂志, 2019, 25(6): 63-64.

[4] 赵瑶. 新生儿抗凝系统及血栓性疾病的研究进展[J]. 国际儿科学杂志, 2019, 46(5): 323-326.

[5] 苗得雨, 王晓英. 检测凝血功能对早产新生儿的意义[J]. 山西中医学院学报, 2018, 19(6): 61-62.

[6] KENET G, BARG A A, NOWAK-GÖTTL U. Hemostasis in the very young[J]. Semin Thromb Hemost, 2018, 44(7): 617-623.

[7] ZHANG H F, LI J M, CHEN H C, et al. Establishing reference intervals of coagulation indices based on the ACL Top 700 system for children in Southwestern Fujian, China[J]. Clin Biochem, 2020, 75(1): 78-82.

[8] HALEY K M. Neonatal venous thromboembolism[J]. Front Pediatr, 2017, 5(5): 136-141.

[9] 陆红艳. 早产儿凝血功能状态及临床干预的分析[D]. 南宁: 广西医科大学, 2019.

[10] KENET G, COHEN O, BAJORAT T, et al. Insights into neonatal thrombosis[J]. Thromb Res, 2019, 181 (Suppl 1): S33-S36.

[11] 陈芳芳. 不同胎龄早产儿早期凝血四项水平及临床意义[J]. 河南医学研究, 2020, 29(7): 1304-1305.

[12] DUPPRÉ P, SAUER H, GIANNOPOULOU E Z, et al. Cellular and humoral coagulation profiles and occurrence of IVH in VLBW and ELBW infants[J]. Early Hum Dev, 2015, 91(12): 695-700.

[13] RAFFAELI G, TRIPODI A, CAVALLARO G, et al. Thromboelastographic profiles of healthy very low birth-weight infants serially during their first month[J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2020, 105(4): 412-418.

[14] 韩红卫, 丁盛, 陈红. 出生后 24 h 凝血功能异常新生儿临床表现及影响因素分析[J]. 临床儿科杂志, 2015, 33(2): 141-143.

[15] 崔照领, 李扬, 朱芳, 等. 妊娠期高血压疾病对新生儿凝血功能、NSE 及 PCT 水平的影响[J]. 河北医科大学学报, 2020, 41(3): 306-310.

[16] 杨介梅, 王模奎. 妊娠期高血压疾病母亲所娩新生儿凝血功能变化及临床意义[J]. 儿科药学杂志, 2019, 25(3): 1-4.

(收稿日期: 2020-09-21 修回日期: 2021-07-05)

(上接第 2628 页)

K C, et al. Clinical metagenomic sequencing for diagnosis of meningitis and encephalitis[J]. N Engl J Med, 2019, 380(24): 2327-2340.

[12] XIE Y, DU J, JIN W, et al. Comparison the pathogen diagnosis of severe pneumonia by using next generation sequencing and traditional detection methods, China, 2010—2018[J]. J Infect, 2019, 78(2): 158-169.

[13] PARIZE P, MUTH E, RICHAUD C, et al. Untargeted next-generation sequencing based first-line diagnosis of infection in immunocompromised adults: a multi centre, blinded, prospective study [J]. Clin Microbiol Infect, 2017, 23(8): 574e1-574e6.

[14] ZHU N, ZHANG D Y, WANG W L, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019[J]. N Engl J Med, 2020, 382(8): 727-733.

[15] 王盈红, 曹小彩, 宋文涛, 等. 细菌和病毒混合感染对儿童社区获得性肺炎的影响[J]. 临床儿科杂志, 2016, 34(5): 342-347.

[16] LONG Y, ZHANG Y X, GONG Y P, et al. Diagnosis of sepsis with cell-free dna by next-generation sequencing technology in ICU patients[J]. Arch Med Res, 2016, 47(5): 365-371.

[17] DING Y, CHU C, LI Y Q, et al. High expression of HMGB1 in children with refractory Mycoplasma pneumoniae pneumonia[J]. BMC Infect Dis, 2018, 18(1): 439-446.

[18] XUE G H, LI S L, ZHAO H Q, et al. Use of a rapid recombinase-aided amplification assay for Mycoplasma pneumoniae detection[J]. BMC Infect Dis, 2020, 20(79): 1-7.

[19] 李学青, 王丽娜, 张俐, 等. 肺泡灌洗液二代基因测序对儿童重症肺炎病原学诊断应用观察[J]. 中国实用儿科杂志, 2019, 34(6): 513-516.

[20] DECKER S O, SIGL A, GRUMAZ C, et al. Immune-response patterns and next generation sequencing diagnostics for the detection of mycoses in patients with septic shock—results of a combined clinical and experimental investigation[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(8): 1796-1827.

[21] RUAN L, WU D, LI X, et al. Analysis of microbial community composition and diversity in postoperative intracranial infection using high-throughput sequencing[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(4): 3938-3946.

(收稿日期: 2021-01-30 修回日期: 2021-06-21)