

ICS 11.020
C 05

团 体 标 准

T/CPMA 028—2023

人呼吸道合胞病毒感染诊断

Diagnosis for human respiratory syncytial virus infection

2023 年 3 月 27 日发布

2023 年 3 月 27 日实施

中华预防医学会 发布

目 次

| | |
|------------------------------|----|
| 前言..... | I |
| 引言..... | II |
| 1 范围..... | 1 |
| 2 规范性引用文件..... | 1 |
| 3 术语和定义..... | 1 |
| 4 缩略语..... | 1 |
| 5 诊断依据..... | 1 |
| 6 诊断原则..... | 2 |
| 7 诊断..... | 2 |
| 8 鉴别诊断..... | 3 |
| 附录 A（规范性）实验室检测方法..... | 4 |
| 附录 B（资料性）病毒分离及其他实验室检测方法..... | 8 |
| 附录 C（资料性）流行特征及鉴别诊断..... | 12 |
| 参考文献..... | 14 |

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中华预防医学会提出并归口。

本文件起草单位：中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所、国家儿童医学中心（北京）/首都医科大学附属北京儿童医院、首都儿科研究所、温州医科大学附属育英儿童医院、国家儿童健康与疾病临床医学研究中心/重庆医科大学附属儿童医院、中国医学科学院病原生物学研究所、长春市儿童医院、河南省疾病预防控制中心、甘肃省疾病预防控制中心、深圳市儿童医院、中日友好医院。

本文件主要起草人：张燕、宋金华、谢正德、赵林清、张海邻、刘恩梅、任丽丽、孙利伟、徐瑾、于德山、张琪、钱渊、申昆玲、许文波。

引 言

人呼吸道合胞病毒是世界范围内引起 5 岁以下儿童、老年人及免疫低下人群急性下呼吸道感染最重要的病毒病原之一。人呼吸道合胞病毒感染后的临床表现与其他呼吸道病毒感染引起的临床表现难以区分，需要依据实验室检测对其进行确切诊断。为了规范人呼吸道合胞病毒感染诊断，指导临床诊疗和人群感染现状调查，本文件遵循科学性、可行性和实用性原则，对人呼吸道合胞病毒感染诊断所需的诊断依据、诊断原则、诊断和鉴别诊断进行明确规定。

人呼吸道合胞病毒感染诊断

1 范围

本文件规定了人呼吸道合胞病毒感染的诊断依据、诊断原则、诊断和鉴别诊断。
本文件适用于各级各类医疗卫生机构。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 人呼吸道合胞病毒 Human respiratory syncytial virus; HRSV

人正肺病毒 Human Orthopneumovirus

为肺炎病毒科，正肺病毒属的单股负链RNA病毒，基因组全长约15.2kb，编码11个蛋白质。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CPE: 细胞病变效应 (cytopathic effect)

Ct: 循环阈值 (cycle threshold)

DEPC: 焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate)

DFA: 直接免疫荧光法 (direct immunofluorescence assays)

DNA: 脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid)

FBS: 胎牛血清 (fetal bovine serum)

FITC: 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate)

HRSV: 人呼吸道合胞病毒 (human respiratory syncytial virus)

IFA: 间接免疫荧光法 (indirect immunofluorescence assays)

IgG: 免疫球蛋白G (immunoglobulin G)

PBS: 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline)

PBST: 含 0.1% Tween-20的磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline Tween)

RNA: 核糖核酸(ribonucleic acid)

RT-PCR: 逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction)

OD: 光密度值 (optical density)

5 诊断依据

5.1 临床表现

5.1.1 婴幼儿

发病初期以鼻塞、流涕为主要表现，随之出现咳嗽、喘息，可有低热，体格检查肺部听诊可闻及哮鸣音和湿啰音。严重者可出现喘憋、拒食、气促、胸廓凹陷、发绀和鼻翼扇动。部分婴幼儿可出现呼吸衰竭，并可累及呼吸系统以外的脏器，尤其是早产儿、6个月及以下的婴儿、2岁以下患有慢性肺病或先天性心脏病等患儿。

5.1.2 学龄前期儿童

以发热、鼻塞、流涕、咳嗽为主要表现，体格检查可见鼻黏膜和咽部充血、水肿。部分可进展为肺炎，表现为喘息、气促和呼吸困难，肺部听诊可闻及湿啰音及哮鸣音。

5.1.3 学龄期和青春期儿童

常见症状有鼻塞、流涕、咳嗽、声嘶、耳痛等，可伴发热，体格检查可见鼻黏膜、咽部、球结膜、鼓膜等处充血、水肿。部分可进展为肺炎，可诱发支气管哮喘急性发作，出现喘息、气促、呼吸困难等症状。

5.1.4 成人

以鼻塞、流涕、咽痛为主要表现，可伴乏力、厌食和低热，体格检查可见鼻黏膜、咽部等处充血、水肿。病情进展可表现为急性支气管炎、肺炎和慢性气道疾病（支气管哮喘和慢性阻塞性肺疾病等）急性发作，出现咳嗽、喘息、气促、呼吸困难等症状。

5.1.5 老年人及有基础疾病人群

发病初期以发热、咳嗽为主要表现，多数患者病情进展快，出现喘息、气促、呼吸困难等症状，可有发绀、胸廓凹陷，肺部听诊可闻及湿啰音及哮鸣音，严重者可发展为急性呼吸窘迫综合征或呼吸衰竭，部分可出现死亡。

5.2 实验室检测

5.2.1 呼吸道标本中检测HRSV特异性抗原阳性，详细实验流程按附录A的规定执行。

5.2.2 呼吸道标本中检测HRSV核酸阳性，详细实验流程按附录A的规定执行。

5.2.3 恢复期血标本HRSV IgG抗体滴度较急性期血标本HRSV IgG抗体滴度出现 ≥ 4 倍升高，或急性期抗体阴性而恢复期抗体阳性，详细实验流程按附录A的规定执行。

5.2.4 呼吸道标本中分离到HRSV，详细实验流程见附录B。

6 诊断原则

根据临床表现和实验室检测结果进行诊断。

7 诊断

7.1 疑似病例

符合5.1.1、5.1.2、5.1.3、5.1.4、5.1.5中任一项。

7.2 确诊病例

符合7.1，同时符合5.2.1、5.2.2、5.2.3、5.2.4中任一项。

8 鉴别诊断

临床应注意与流感病毒、鼻病毒、人偏肺病毒、副流感病毒、人腺病毒、新型冠状病毒、肺炎衣原体、肺炎支原体等引起的呼吸系统感染进行鉴别诊断，见附录C的C.2。

附 录 A
(规范性)
实验室检测方法

A.1 抗原检测

A.1.1 免疫层析法检测 HRSV 抗原

A.1.1.1 标本类型与处理

鼻咽拭子或咽拭子：将拭子放置于标本处理液中，将拭子在管壁挤压后取出，静置1 min~3 min。

鼻咽吸取物或支气管肺泡灌洗液：直接吸取300 μL至试管中，同时加入300 μL标本处理液，充分混匀后，静置1 min~3 min。

A.1.1.2 操作步骤

吸取适量A.1.1.1中处理后的待检标本处理液加入到标本检测孔中，水平放置；或将试纸条浸渍区（下端）浸入A.1.1.1中处理后的待检标本处理液中，注意不要超出箭头标示的浸渍线，观察液体浸润至结果区后，取出试纸条，水平放置。10 min~15 min内观察结果。

A.1.1.3 结果判定

只在质控区出现一条特定颜色的线，无其他线出现，判定为阴性；质控区出现一条特定颜色的线，同时标本检测位置也出现相同颜色的线，判定为阳性；质控线未出，或颜色异常，则此次检测无效，需重新检测。

A.1.2 直接免疫荧光法（DFA）检测 HRSV

A.1.2.1 标本类型与处理

将含有大量脱落呼吸道上皮细胞的标本（主要为鼻咽吸取物和支气管肺泡灌洗液）运输至实验室后，450×g (2000 r/min)，离心10 min，弃上清液，加入1 mL PBS清洗2次，450×g (2000 r/min)离心10 min，弃上清液，加入150 μL PBS吹打混匀，制备成浑浊细胞悬液。

A.1.2.2 操作步骤

在生物安全柜内，吸取15 μL A.1.2.1中细胞悬液滴加在洁净玻璃片上，冷风风干10 min~15 min；浸入4℃预冷的丙酮溶液中，固定细胞10 min；固定后的玻片可置于安全柜外操作，玻片风干后，在待检标本片和对照玻片的细胞点位滴加约20 μL荧光标记的抗HRSV抗体，37℃，湿盒内，孵育30 min；用PBST冲洗玻片1次，然后用PBST浸洗玻片2次（PBST不可重复使用）；除去多余液体，在细胞点位滴加约20 μL封闭液，覆上盖玻片；将玻片置于倒置荧光显微镜下观察结果。

A.1.2.3 结果判定

镜下观察细胞浆内显示相应荧光标记颜色的荧光（如FITC标记则为绿色），说明形成了抗原抗体复合物，提示细胞内存在HRSV抗原；如未呈现目的荧光不排除HRSV阳性。

A.1.3 间接免疫荧光法（IFA）检测 HRSV

A.1.3.1 标本类型与处理

步骤同 A1.2.1。

A. 1. 3. 2 操作步骤

在待检标本片和对照玻片的细胞点位滴加约20 μL 1: 500倍稀释（用含1/40000伊文斯蓝的母液和PBS新鲜配制）的抗HRSV的抗体（第一抗体，如鼠抗HRSV），37 $^{\circ}\text{C}$ ，湿盒内孵育30 min，先用PBST冲洗玻片1次，后用PBST浸洗玻片2次；在待检标本片和对照玻片的细胞点位滴加约20 μL 1:1000~10000倍用PBS稀释的荧光标记的抗第一抗体的抗体（第二抗体，如羊抗鼠IgG），37 $^{\circ}\text{C}$ ，湿盒内孵育30 min；先用PBST冲洗掉玻片液体，后用PBST浸洗玻片2次；除去多余液体，在细胞点位滴加约20 μL 封闭液，覆上盖玻片；将玻片置于倒置荧光显微镜下观察结果。

A. 1. 3. 3 结果判定

镜下观察细胞浆内显示相应荧光标记颜色的荧光（如FITC标记则为绿色），说明形成了抗原抗体复合物，提示细胞内存在HRSV抗原；如未呈现目的荧光不排除HRSV阳性。

A. 1. 4 注意事项

标本采集后应在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下运送至实验室进行检测，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存时间宜不超过48 h。

对于发病急性期采集的标本HRSV抗原检测阳性，说明病毒处于活跃的复制增殖状态，可确定为现症感染；HRSV抗原检测阴性，不排除HRSV感染，临床高度怀疑HRSV感染的，应使用核酸检测方法进行验证。

发病初期或病程较长的患者以及成人，不宜进行HRSV抗原检测；冻存过的标本不宜进行HRSV抗原检测。

标本细胞数不足或源自呼吸道其他部位的标本，不适合使用免疫荧光法进行抗原检测。

使用免疫荧光检测方法在抗体孵育步骤应保持玻片湿润，抗体需要选择合适的稀释度。实验需同时设置阳性对照和阴性对照，如阳性对照和阴性对照不满足条件，则本次实验失败。

标本检测步骤应在遵守质量控制和生物安全防护要求的条件下进行操作。应制定实验室质量保证计划和实验室内部质量控制制度。

使用国家食品药品监督管理总局注册批准的HRSV抗原检测商品化试剂盒，操作步骤和结果判读及注意事项等均应按照试剂盒说明书操作。

A. 2 核酸检测

A. 2. 1 标本的类型与处理

用于核酸检测的标本包括鼻咽拭子，鼻咽吸取物，咽拭子，鼻拭子，痰液，支气管肺泡灌洗液，气管内吸取物，肺组织活检标本等呼吸道标本，应置于含有非灭活病毒保存液中。在标本运送过程中注意低温条件运输，运送至实验室后，避免反复冻融，如24 h内无法检测的标本应置于-70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

A. 2. 2 核酸提取

使用国家食品药品监督管理总局注册批准的试剂盒或自动核酸提取仪进行核酸提取。严格按照试剂盒说明书和/或自动核酸提取仪仪器使用说明以及质量控制和实验室生物安全防护要求操作。

A. 2. 3 双通道荧光定量 RT-PCR 方法检测 HRSV 核酸（N 基因）

A. 2. 3. 1 引物探针序列

参考如下引物序列，送经评估技术成熟的生物合成公司进行合成。

HRSVA:

上游引物：5'-AGATCAACTTCTGTCATCCAGCAA-3'

下游引物：5'-GCACATCATAATTAGGAGTATCAAT-3'

探针：5'(FAM)-CACCATCCAACGGAGCACAGGAGAT-3'(BHQ1)

HRSVB:

上游引物：5'-AAGATGCAAATCATAAATTCACAGGA-3'

下游引物：5'-TGATATCCAGCATCTTTAAGTATCTTTATAGTG-3'

探针：5'(CY5)-AGGTATGTTATATGCTATGTCCAGGTTAGGAAGGGAA-3'(BHQ2)

A. 2. 3. 2 反应体系及反应条件

反应体系以25 μL 为例：反应缓冲液12.5 μL ，20 $\mu\text{mol/L}$ 的A亚型上下游引物各0.5 μL ，5 $\mu\text{mol/L}$ 的探针0.5 μL ，B亚型上下游引物各0.5 μL ，5 $\mu\text{mol/L}$ 的探针0.5 μL ，反转录/DNA聚合酶1 μL ，核酸模板5 μL ，加DEPC水3.5 μL 补齐25 μL 。反应条件：50 $^{\circ}\text{C}$ 逆转录30 min，95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 变性10 s，55 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s，收集荧光信号，40个循环。

A. 2. 3. 3 结果判定

在仪器正常，同一实验中阴性对照、阳性对照均正常的情况下进行结果分析：

——待测标本检测结果 $C_t \leq 35$ ，曲线呈S型且有明显指数增长期，判断为阳性。

——待测标本检测结果 $35 < C_t \leq 38$ ，此时应对标本进行重复检测，如重读结果 C_t 值仍然在35~38范围，曲线呈S型且有明显指数增长期，则判断为阳性，否则判断为阴性。

——待测标本检测结果 $C_t > 38$ 或未检出，此次结果判断为阴性。

A. 2. 4 注意事项

标本采集后应在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下运送至实验室进行检测，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存时间宜不超过24 h。如24 h内无法检测的标本应置于-70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存，标本不宜反复冻融。

阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照的荧光信号的最高点，结果显示阴性为准，或可根据仪器噪音情况进行调整。阴性对照为无典型S型扩增曲线显示；阳性对照呈典型S型扩增曲线且 CT 值 ≤ 30 ；阈值、阴性对照和阳性对照的要求需在同一实验中同时满足，否则本次实验无效。

应定期评估引物、探针序列，防止单核苷酸多态性和其他突变导致的假阴性结果。

检测步骤应在同时遵循质量控制和生物安全防护要求的条件下进行操作。

使用国家食品药品监督管理总局注册批准的HRSV核酸检测商品化试剂盒，操作步骤和结果分析及结果判读等均应按照试剂盒说明书操作。

A. 3 血清学检测

A. 3. 1 血清标本的采集与处理

用真空负压无抗凝剂的采血管采集血液标本3 mL~5 mL，室温静置30 min，250 \times g（1500 r/min）~450 \times g（2000 r/min）离心10 min，小心吸取血清，避免吸到红血球，在无菌条件下，移至带外螺旋盖的血清管中，在管壁上做好标记。

A. 3. 2 定量 ELISA 法检测 HRSV IgG 抗体

A. 3. 2. 1 应使用1000 μL 稀释缓冲液对10 μL 患者待测样品进行稀释，制成患者标本稀释液，最终标本稀释比例为1:100。

A. 3. 2. 2 将检测所需数目的微孔条放到微孔板框上并准备好一张标签。在微量孔内分别加入100 μL 的已稀释标本或立即可用的对照血清。留一个孔作为底物空白，示例见表1。将样品于湿盒内（ 37 ± 1 ） $^{\circ}\text{C}$ 孵育（ 60 ± 5 ）min。

表1 ELISA法检测 HRSV IgG抗体微量孔加样示例

| 定量的 IgG 抗原微量孔 | |
|---------------|-----------|
| 孔 A1 | 底物空白 |
| 孔 B1 | 阴性对照 |
| 孔 C1 | 标准血清 |
| 孔 D1 | 标准血清 |
| 孔 E1 | 标本 1..... |

A. 3. 2. 3 孵育后以洗液缓冲液洗涤板孔（使用自动洗板机或手工洗板）。先吸去或甩去洗液，然后每孔内加入300 μL 洗液，再吸去或甩去洗液，重复洗涤过程共4次。最后将微孔板翻转过来在纸巾上拍干，使微孔中不再含有液体。

A. 3. 2. 4 加入酶标记抗体：于相应孔内（底物空白孔除外）加入100 μL IgG酶标记抗体，湿盒内（ 37 ± 1 ） $^{\circ}\text{C}$ 孵育（ 30 ± 1 ）min。

A. 3. 2. 5 以洗液缓冲液洗涤板孔，操作步骤同A.3.2.3。

A. 3. 2. 6 于每孔内加入100 μL 底物溶液（包括底物空白孔），湿盒内（ 37 ± 1 ） $^{\circ}\text{C}$ 孵育（ 30 ± 1 ）min。

A. 3. 2. 7 每孔内加入100 μL 终止液，轻微振荡微孔板以混合溶液。

A. 3. 2. 8 读取OD值：以底物空白孔为空白对照，60 min内读取OD值。

A. 3. 3 结果判定

根据标准血清OD值计算CUT-OFF值上限和下限，根据试剂盒提供的标准曲线，计算标本中抗体活性值：

- 标本OD值 \geq CUT-OFF值上限，结果判定为阳性。
- 标本OD值 $<$ CUT-OFF值下限，结果判定为阴性。
- 在标本OD值在CUT-OFF值上限和下限之间，结果判定为可疑。

A. 3. 4 注意事项

血清标本在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下，存放时间宜不超过3 d，-20 $^{\circ}\text{C}$ 以下可长期保存，标本不宜反复冻融。

底物空白孔的OD值必须 <0.25 ；阴性对照必须为阴性；标准血清的平均OD值必须在有效范围内，此范围已在试剂盒专用的质量控制证书中给定（减去底物空白之后）；如果未达到以上标准，则此次实验无效且必须重做。

ELISA法检测HRSV IgG抗体主要用于定性和/或定量检测人血清或血浆中抗HRSV的IgG抗体，用于HRSV感染诊断或人群抗体水平调查。

特异性IgG抗体在急性期阴性而恢复期转为阳性，或恢复期特异性IgG抗体滴度较急性期IgG抗体滴度升高4倍及以上，提示疾病过程有HRSV感染。

应制定实验室质量保证计划和实验室内部质量控制制度。使用国家食品药品监督管理总局注册批准的HRSV血清学检测商品化试剂盒，操作步骤和结果分析以及结果判读等均应按照试剂盒说明书操作。

附 录 B

(资料性)

病毒分离及其他实验室检测方法

B.1 病毒分离

B.1.1 细胞系

敏感细胞系为异倍体细胞或二倍体细胞，如人喉癌上皮细胞Hep-2、人宫颈癌细胞Hela、人非小细胞肺癌细胞A549、恒河猴肾细胞RMK和非洲绿猴肾细胞Vero等，其中人喉癌上皮细胞Hep-2敏感性好，较为常用。

B.1.2 接种

HRSV病毒分离需使用新鲜标本，床旁接种。取传代后24 h~48 h内、细胞生长状态良好、50%贴壁细胞的斜面管，弃生长液，加入0.2 mL处理后的新鲜标本液，室温吸附1 h~2 h后弃液，加入1 mL维持液，置于37 °C，5% CO₂培养箱培养，次日观察有无细胞毒性，必要时换液；或取细胞传代后24 h~48 h内、细胞生长状态良好、约50%贴壁细胞的斜面管，弃生长液，加0.8 mL维持液，接种0.2 mL标本液后直接置于33 °C培养箱，旋转培养，次日换新鲜维持液。

B.1.3 观察 CPE

HRSV的CPE表现为细胞肿胀变圆变大发亮，细胞内颗粒性物质增多，细胞边界消失，细胞融合为多核巨细胞。

在光学显微镜下逐日观察细胞生长和病变情况。25%细胞出现融合标记为+，50%细胞出现融合记为++，75%细胞出现融合记为+++，100%细胞出现融合记为++++。

B.1.4 传代

显微镜下观察至第5 d~7 d，如无CPE出现，直接吸取上清（不应冻化）进行盲传，盲传步骤同B.1.2。盲传2代后无CPE出现，确定病毒分离结果为阴性。

B.1.5 毒株鉴定

在CPE达到++~+++时，吸管反复吹打，使细胞从管壁脱落，450×g（2000r/min），离心10 min，上清吸至无菌冻存管，使用核酸检测方法进行鉴定；细胞沉淀使用抗原检测方法进行鉴定。具体操作步骤按照附录A执行。

B.1.6 毒株保存

阳性毒株加入等体积50%的FBS或者50%的蔗糖冻存于-70 °C冰箱中。

B.1.7 注意事项

HRSV分离，需采集标本后床旁接种，冻存后的标本不宜进行病毒分离。

HRSV连续传代，中间不应冻化。复苏时，将加入保护剂即FBS或蔗糖的毒株，经20倍稀释后接种到新的24孔板或斜面管中，逐天观察病变。

HRSV阳性或观察到第5 d，需传下一代时，直接将细胞刮下，不经冻化，450×g（2000r/min），离心10 min，吸取上清接种下一代。

HRSV毒株或标本需要放置于-70 °C冰箱保存。

B. 2 中和试验（微量中和法）

B. 2.1 准备单层细胞

96孔细胞培养板中每孔加入0.1 mL Hep-2细胞悬液，细胞浓度为 2×10^5 个/mL，置于37 °C、5% CO₂培养箱静置培养至细胞密度达到90%，整个过程应无菌操作。

B. 2.2 病毒液准备

采用含2%FBS的新鲜维持液将原病毒液稀释成200 CCID₅₀/0.1mL的标准病毒液，置于4 °C保存备用。

B. 2.3 血清灭活

待检血清56 °C水浴30 min。

B. 2.4 血清稀释

基于倍比稀释的原则，以1份待检血清为例，吸取100 μL待检血清加入到含有900 μL新鲜维持液的无菌离心管中，涡旋震荡混匀，制备成第1管（稀释梯度为1:10）；吸取500 μL第1管中稀释后的血清加入到含有500 μL新鲜维持液的无菌离心管中，涡旋震荡混匀，制备成第2管（稀释梯度为1:20）；吸取500 μL第2管中稀释后的血清加入到含有500 μL新鲜维持液的无菌离心管中，制备成第3管（稀释梯度为1:40），此后均按照倍比进行稀释，直至吸取500 μL第7管中稀释后的血清加入到含有500 μL新鲜维持液的无菌离心管中，涡旋震荡混匀，弃掉500 μL，制备成第8管（稀释梯度为1:1280）。

B. 2.5 接种病毒

弃96孔细胞培养板内培养液，阴性对照每孔加入200 μL维持液，平行做4个副孔；病毒阳性对照每孔加入100 μL标准病毒液（200 CCID₅₀/0.1mL）和100 μL维持液，平行做4个副孔；B.2.4中稀释后的每管待检血清平行做4个副孔，每孔加入100 μL相应稀释梯度的待检血清和100 μL标准病毒液。

置37 °C，5% CO₂培养箱培养，逐天观察并记录CPE至第7 d。

B. 2.6 结果判定

用Karber法或Reed-Muench法计算待检血清的中和终点（即能够保护50%细胞不受100 CCID₅₀病毒感染的血清样品最高稀释度），为该血清样品的中和抗体滴度。中和试验阳性提示机体对HRSV具有一定的保护性，抗体滴度越高说明抗HRSV的能力越强。

B. 2.7 注意事项

中和试验应使用新鲜病毒液，不宜使用冻存后稀释的病毒液。

该方法仅用于HRSV相关科学研究工作。

B. 3 靶基因扩增及测序

B. 3.1 引物序列

参考如下引物序列，送经评估技术成熟的生物合成公司进行合成。

HRSVA（扩增片段长度为540 bp）：

上游引物 5'-GAAGTGTTCAACTTTGTACC-3'
下游引物 5'-CAACTCCATTGTTATTTGCC-3'
HRSVB (扩增片段长度为550 bp) :
上游引物 5'-AAGATGATTACCATTTTGAAGT-3'
下游引物 5'-CAACTCCATTGTTATTTGCC-3'

B. 3. 2 反应体系及反应条件

反应体系以25 μL为例：反应缓冲液12.5 μL，20 μmol/L的上下游引物各0.5 μL，反转录/DNA聚合酶1 μL，核酸模板5 μL，加DEPC水5.5 μL补齐25 μL。反应条件：50 °C逆转录30 min，94 °C预变性2 min；94 °C变性30 s，50 °C退火30 s，72 °C延伸45 s，35个循环；72 °C终末延伸10 min。

B. 3. 3 测序

PCR产物可送经评估技术成熟的生物测序公司进行序列测定。

B. 3. 4 序列整理和分析

从生物公司返回的序列资料，以标准的图形文件 (.ab1) 保存。序列整理使用相关序列分析软件分别对序列进行编辑和分析。

B. 3. 5 注意事项

制定实验室质量保证计划和实验室内部质量控制制度；注意定期评估引物序列，防止单核苷酸多态性和其他突变导致的假阴性结果；注意观察测序结果峰图的质量，保证每个碱基位点测序准确性。

该方法仅用于HRSV相关科学研究工作。

B. 4 宏基因组测序

B. 4. 1 试剂与操作

使用商品化试剂盒严格按照操作说明书以及生物安全防护进行核酸提取、标本前处理、文库构建等。

B. 4. 2 文库质检

文库完成后采用荧光染料法检测浓度，同时通过荧光PCR法检测文库中有效连接接头的片段浓度。建库后文库的浓度应不低于测序平台上机要求的最低浓度。

B. 4. 3 文库测序

上机前根据不同测序平台的要求对文库进行稀释。用高通量测序仪对构建的文库进行测序，操作符合测序仪生产企业的要求。建议单个标本测序数据量不低于20兆读序数。序列的单端读长不少于50 bp。

B. 4. 4 数据处理

将下机数据进行无效序列和重复序列的过滤，单个标本的数据拆分后，基于参比数据库开展病原分析，形成报告。

B. 4. 5 结果判定

应确认内部质控正常，宏基因组测序HRSV阳性结果可开展病毒基因组序列分析。阴性检测结果不能排除HRSV的感染。

B.4.6 注意事项

宏基因组实验的功能分区参照《基于高通量测序的病原体筛查通用准则》（T/CPMA 010-2020）进行。该方法仅用于HRSV相关科学研究工作。

附录 C (资料性) 流行特征及鉴别诊断

C.1 流行特征

HRSV呈全球广泛流行。寒/温带地区主要在冬春季流行；在热带和亚热带地区，雨季感染率出现明显增高。我国北方地区，流行高峰通常在10月中旬至次年5月中旬；我国南方地区，流行高峰常为冬季和潮湿雨季，其他时间也偶有检出。

可通过接触和呼吸道传播。主要通过接触含病毒的分泌物或污染物传播，飞沫和气溶胶也可引起传播。

高危人群主要集中在婴幼儿、老年人及有基础疾病人群，也可以引起其他年龄段人群急性呼吸道感染。

C.2 鉴别诊断

C.2.1 流感病毒感染

流感病毒按其核心蛋白可分为甲、乙、丙、丁四种类型，在人群中呈季节性流行的是甲型和乙型流感病毒。好发于冬春季节，临床表现以高热、乏力、头痛、全身肌肉酸痛等全身症状为主，而呼吸道症状较轻，抗菌药物治疗无效，早期应用抗流感病毒药物治疗有效。依据病原学检查可确诊。

C.2.2 鼻病毒感染

好发于夏秋季，相较于HRSV感染，鼻病毒感染患儿年龄偏大，多有喘息史和湿疹史，发热峰值高。不同种鼻病毒引起的毛细支气管炎临床表现略不同，A种和C种鼻病毒引起的毛细支气管炎病情较重，C种鼻病毒单一感染引起的毛细支气管炎可出现外周血嗜酸性粒细胞、血清IgE水平增高。过敏体质患儿感染鼻病毒可引起反复喘息甚至哮喘发生。依据病原学检查可确诊。

C.2.3 人偏肺病毒感染

好发于晚冬和春季，流行高峰与HRSV同步或稍后。相较于HRSV感染，人偏肺病毒感染患儿年龄偏大。男性多于女性，潜伏期3 d~5 d。人偏肺病毒肺炎临床表现差异较大，发病初期表现为上呼吸道感染症状，发热多在38℃以下。严重病例可以出现呼吸增快、喘息、三凹征和发绀等，肺部听诊可闻及细小或粗中湿啰音。依据病原学检查可确诊。

C.2.4 副流感病毒感染

全年均可发病，副流感病毒3型是引起婴幼儿下呼吸道感染常见病毒病原，多见于1岁内的婴儿，临床表现与HRSV感染类似，可出现肺炎或毛细支气管炎表现。依据病原学检查可确诊。

C.2.5 人腺病毒感染

好发于我国北方地区的冬春季，南方地区多见于夏秋季，常见于6个月至2岁的婴幼儿，可引起咽结合膜炎和肺炎。其中7型人腺病毒是引起婴幼儿重症肺炎的常见型别，临床表现为持续稽留热、全身感染中毒症状重、呼吸衰竭等，早期咽部可出现石灰点样分泌物。依据病原学检查可确诊。

C.2.6 新型冠状病毒感染

全年均可发病，传染性强，奥密克戎系列变异株潜伏期多为2 d~4 d。主要表现为发热、咽干、咽痛、咳嗽、乏力等，发热多为中低热，部分病例亦可表现为高热，热程多不超过5 d；部分患者可伴有肌肉酸痛、嗅觉味觉减退或丧失、鼻塞、流涕、结膜充血等；部分患者表现为呕吐、腹泻等消化道症状或仅表现为反应差、呼吸急促；少数可出现声音嘶哑、呼吸困难、喘息等，极少数患者出现严重呼吸窘迫、肺外器官受损甚至死亡。儿童感染后临床表现与成人相似，高热相对多见。依据病原学检查可确诊。

C. 2. 7 肺炎衣原体感染

常引起急性呼吸道感染，最常表现为肺炎，亦可引起支气管炎、咽炎及扁桃体炎等，可有发热、持续咳嗽、全身不适、咽痛及声音嘶哑等，病程可持续数周甚至数月。原有支气管哮喘的患者感染肺炎衣原体后，可加重病情。病情严重者可因原基础疾病加重或发生并发症如细菌感染而死亡。依据病原学检查可确诊。

C. 2. 8 肺炎支原体感染

容易在幼儿园、学校等人员密集的环境中发生，经飞沫和直接接触传播，潜伏期1~3周，潜伏期内至症状缓解数周均有传染性。起病可急可缓，以发热和咳嗽为主要表现。中、高度发热多见，也可低热或无热。病初大多呈阵发性干咳，少数有黏痰，偶有痰中带血丝，咳嗽会逐渐加剧，可出现百日咳样痉挛性咳嗽。病程可持续2周甚至更长。多数患儿精神状况良好，多无气促和呼吸困难。年长儿肺部体征出现较晚，可出现肺部实变体征。依据病原学检查可确诊。

参 考 文 献

- [1] T/CPMA 010—2020, 基于高通量测序的病原体筛查通用准则 [S] .
- [2] T/CPMA 018—2020, 老年健康与老年服务名词术语 [S] .
- [3] 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.
- [4] Xie Z, Qin Q, Shen K, et al. The burden of respiratory syncytial virus associated with acute lower respiratory tract infections in Chinese children: a meta-analysis[J]. *Transl Pediatr*. 2020;9(4):496-506.
- [5] 崔爱利,朱贞,毛乃颖,等. 2009—2021年中国九省份发热呼吸道症候群监测病例中常见病毒感染情况分析[J]. *中华预防医学杂志*,2022,07:912-918.
- [6] Song J, Zhu Z, Song J, et al. Circulation pattern and genetic variation of human respiratory syncytial virus in China during 2008-2021. *J Med Virol*. 2023;10.1002/jmv.28611.
- [7] Luo Q, Li M, Li A, et al. Genetic diversity and epidemiological features of respiratory syncytial virus, Beijing, 2015-2019: A multicenter and all-age groups study. *J Infect*. 2022 ;85(1):75-85.
- [8] 谢正德, 徐保平, 陈祥鹏, 等. 儿童呼吸道合胞病毒感染诊断、治疗和预防专家共识[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2020(4):241-250.
- [9] Chartrand C, Tremblay N, Renaud C, Papenburg J. Diagnostic accuracy of rapid antigen detection tests for respiratory syncytial virus infection: systematic review and Meta-analysis[J]. *J Clin Microbiol*. 2015, 53(12): 3738-4379.
- [10] Griffiths C, Drews SJ, Marchant DJ: Respiratory Syncytial Virus: Infection, Detection, and New Options for Prevention and Treatment[J]. *Clin Microbiol Rev*. 2017, 30:277-319.
- [11] van Elden LJ, van Loon AM, van der Beek A, et al. Applicability of a real-time quantitative PCR assay for diagnosis of respiratory syncytial virus infection in immunocompromised adults[J]. *J Clin Microbiol*. 2003;41(9):4378-4381.
- [12] Peret TC, Hall CB, Schnabel KC, Golub JA, Anderson LJ. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *J Gen Virol*. 1998;79 (Pt 9):2221-2229.
- [13] 《中华儿科杂志》编辑委员会, 中华医学会儿科学分会呼吸学组. 毛细支气管炎诊断、治疗与预防专家共识(2014年版)[J]. *中华儿科杂志*,2015,03:168-171.
- [14] 中华人民共和国国家健康委员会, 国家中医药局. 儿童社区获得性肺炎诊疗规范(2019年版)[J]. *中华临床感染病杂志*,2019,12(1):6-13.
-