

# 呼吸道感染性疾病病原学诊断的挑战与解决策略

胡晏宁, 鲁炳怀

基金项目: 国家重点研发计划课题(编号:2018YFC1200100, 2018YFC1200102)

作者单位: 100871 北京, 北京大学中日友好临床医学院(胡晏宁, 鲁炳怀); 100029 北京, 中日友好医院呼吸中心临床微生物与感染实验室(鲁炳怀)

作者简介: 胡晏宁(1997-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 病原微生物检测方法学研究。E-mail: 1102640458@qq.com

通讯作者: 鲁炳怀(1972-), 男, 医学博士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 临床微生物与感染病原学诊断, 耐药机制。

E-mail: zs25041@126.com



鲁炳怀, 医学博士, 主任医师, 北大医学部教授, 北大医学部与北京协和医学院硕士研究生导师。兼任中华医学会检验分会微生物学组委员, 中华医学会热带病与寄生虫分会青年学组委员, 中国医促会临床微生物与感染分会常委, 欧洲临床微生物和感染病学药敏委员会第二届华人抗菌药物敏感性委员会委员(ChiCAST)。研究方向: 临床微生物与感染病原学诊断, 耐药机制, 呼吸道感染微生物的检测方法。近年来主要从事单核细胞增生李斯特菌与肺炎克雷伯菌的耐药机制与致病机制的研究。主持多项国家级与省部级科研项目。发表 SCI 收录文章近 30 篇。

**[摘要]** 呼吸道感染性疾病是全球成人和儿童发病和死亡的重要原因, 其病原体的诊断非常重要, 并且是难点问题。现行的临床病原学检测的方法中, 传统方法包括涂片染色镜检法、抗原检测法、培养法等。对于阳性的培养物还可以用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)进行菌种鉴定。最近几年发展较快的是分子生物学检测方法, 包括普通聚合酶链反应(PCR)、多重 PCR、实时定量 PCR 等和宏基因组测序(mNGS)技术。快速分子生物学检测技术, 有望成为帮助指导靶向治疗和抗生素合理应用的有效工具。

**[关键词]** 呼吸道感染; 抗原检测; 血清学检测; 聚合酶链反应; 基因组测序

**[中图分类号]** R 51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2021)01-0008-05

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2021.01.02

**Challenges and solution strategies for diagnosis of microbial pathogens of respiratory tract infections** HU Yan-ning, LU Bing-huai. Peking University China-Japan Friendship School of Clinical Medicine, Beijing 100871, China

**[Abstract]** Respiratory tract infections are the leading cause of morbidity and mortality in adults and children worldwide. The diagnosis of microbial pathogens of respiratory tract infections is very important and challenging. Among the current clinical pathogen detection methods, the traditional methods include smear staining and microscopic examination, antigen detection, culture, etc. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) can also be used for species identification of positive cultures. In recent years, molecular biological detection methods have developed rapidly, including common polymerase chain reaction (PCR), multiplex PCR, real-time quantitative PCR, and metagenomics next generation sequencing (mNGS) technology. Rapid and point-of-care testing (POCT) molecular methods are expected to be effective tools to help guide targeted therapy and appropriate use of antibiotics.

**[Key words]** Respiratory tract infection; Antigen identification; Serological identification; Polymerase chain reaction(PCR); Metagenomic sequencing

人体的呼吸道与外界相通, 感染病原学类别非常复杂, 涵盖细菌、真菌、病毒, 甚至寄生虫的感染。

下呼吸道感染(low respiratory tract infection, LRTI)是全球人类最常见的感染性疾病之一。呼吸道感染

所致的肺炎是人群发病和死亡的重要原因,通常对老年和免疫力功能低下群体影响较大<sup>[1,2]</sup>。尽管有多种实验室诊断方法可用,但仍有约40%需要住院治疗的社区获得性肺炎(community-acquired pneumonia, CAP)患者的致病病原体难以确诊,所以实验室诊断的准确性和有效性的提高有重要意义<sup>[3]</sup>。包括培养在内的传统检测方法在改良的同时依然被认为是病原体检测的“金标准”,分子生物学诊断技术的发展在近年来广泛用于呼吸道病原体微生物学诊断<sup>[4~7]</sup>。

## 1 呼吸道感染病原体检测技术的发展及临床应用现状

### 1.1 传统呼吸道病原体检测方法

1.1.1 涂片染色镜检法 (1)染色方法较多,常用的是革兰染色与抗酸染色。革兰染色可用于区分革兰阳性球菌和革兰阴性杆菌,易于操作。有报道称球菌性肺炎病例检测中革兰染色法的灵敏度仅约80%<sup>[8]</sup>,特别是CAP人群的肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌的感染。抗酸染色可以突出显示纤细的染成红色的杆状菌,对分枝杆菌的诊断特异性很高(90%~100%),但灵敏度有限<sup>[3,9,10]</sup>。其他染色法如墨汁染色法对隐球菌诊断特异性较高,特别适合脑脊液样本中隐球菌的染色,但是灵敏度差,应与隐球菌荚膜多糖抗原试验相结合。六胺银染色适合经典真菌、耶氏肺孢子菌的染色。对于真菌感染的痰与支气管肺泡灌洗液样本最常用的诊断方式是使用荧光素偶联单克隆抗体的荧光染色<sup>[3]</sup>。(2)显微镜检观察细胞病变效应是通过培养进行病毒鉴定的重要手段,如发现呼吸道样本细胞中污迹样嗜碱性包涵体可诊断为腺病毒感染<sup>[3]</sup>。感染细胞病变效应还有巨细胞、合胞体形成、胞内包涵体等。显微镜检对特定检测项目特异性较高,但较为费时耗力,近年来作为临床诊断实验,逐渐被分子生物学所取代。

1.1.2 抗原检测法 指用已知病原体抗体检测患者体内有无相应病原体抗原的方法,常用操作有乳胶凝集试验、胶体金免疫层析法、直接荧光抗体试验(direct fluorescent antibody test, DFA)等。如流感快速检测首选方法,可以检测甲型流感病毒、乙型流感病毒和呼吸道合胞病毒等,使用方便且特异性高(90%~95%),但灵敏度较低(40%~70%),这意味着阴性结果不能排除流感病毒感染<sup>[8]</sup>。DFA可以检测腺病毒、呼吸道合胞病毒等,特异性较高,但结果判读可能有主观性,对专业需求较高<sup>[11]</sup>。隐球菌感染的首选诊断方法为利用血清和脑脊液标本进行乳胶凝集试验或酶联免疫吸附测定(enzyme-

linked immunosorbent assay, ELISA)检测隐球菌荚膜多糖抗原试验。军团菌肺炎的检测可利用尿液军团菌抗原I型检测与痰样本琼脂培养相结合做出诊断<sup>[3]</sup>。尿液中肺炎链球菌抗原的新型免疫层析测定法,用于肺炎链球菌肺炎的诊断,值得注意的是鉴于很多患者在样本检测时已经开始了抗生素治疗,样本中很可能培养不出细菌但体内抗原尚存,因此抗原检测法在此方面弥补了染色镜检法和传统培养法的不足<sup>[3,12]</sup>。

1.1.3 培养法 痰样本和支气管灌洗液样本一般在血平板、巧克力平板、麦康凯平板等接种培养,如同时怀疑血流感染,采用血培养瓶中培养病原体。临床也可以针对不同病原微生物选用特殊培养基,利用BCYE选择性培养基培养呼吸道分泌物是军团菌感染检测的金标准,特异性很高,但灵敏度不高(50%~80%)<sup>[12]</sup>,此外,BCYE也可以用于诺卡菌的培养。对于诊断侵袭性曲霉病最明确的方法就是从正常无菌部位获得样本的阳性培养结果,一般选用沙氏培养基,但灵敏度较低。

1.1.4 血清学鉴定 指利用免疫学试验的方法和原理,用已知病原微生物的抗原检测患者体内有无该病原的抗体来诊断是否感染,临床常用操作有补体结合试验(complement fixation test, CFT)、ELISA、颗粒凝集试验、荧光抗体试验(fluorescent antibody, FA)等。病原体特异性抗体通常在初次感染后2周左右出现,即可通过血清学检测。在引入分子生物学检测之前,病毒性呼吸道感染的主要诊断方法主要是基于血清学,包括检测大量抗体升高与补体结合试验<sup>[4]</sup>。非典型微生物如支原体、衣原体等的鉴定,提示上述微生物之一感染最可靠的血清学证据需要急性期和恢复期血清样本之间的免疫球蛋白G抗体滴度增加4倍<sup>[12]</sup>。总体而言,对于呼吸道感染的病原学诊断,随着分子生物学的广泛开展,抗体检测的价值在不断弱化。

1.1.5 质谱分析法 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)主要用于临床培养阳性菌株的菌种鉴定,包括细菌与真菌,特别是生长缓慢的慢生长分枝杆菌与多种真菌,具有快速准确的优势<sup>[8,13,14]</sup>。但是MALDI-TOF MS灵敏度有限,一般不用来直接检测呼吸道原始样本中的病原微生物,无法缩短耗时的培养时间。

## 1.2 分子生物学检测方法

1.2.1 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)

检测 PCR 主要有普通 PCR、实时荧光定量 PCR (real-time PCR, RT-PCR) 与数字 PCR。RT-PCR 广泛用于临床, 了解的人较多。数字 PCR 中应用最为广泛的是微滴数字 PCR, 系统在 PCR 扩增前把测试样本分割为无数水包油微滴, 分割后每个微滴成为 1 个独立的 PCR 反应体系, 理论上可以实现病原微生物的绝对定量, 极大地提升了 PCR 灵敏度<sup>[15]</sup>。多数病原微生物 PCR 的临床应用价值均得到证实: (1) 当样本量 > 100 000 个微生物时, 结核分枝杆菌复合群的核酸探针的灵敏度和特异度可接近 100%<sup>[3]</sup>; (2) 流感病毒的检测, PCR 以其高灵敏度和特异度、更大的检测时间窗和快速周转时间, 目前取代抗原检测成为首选检测方法<sup>[3,8]</sup>; (3) PCR 对于呼吸机相关性肺炎患者支气管肺泡灌洗液标本中耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 与甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌 (methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, MSSA) 的检出具有极好的预测值<sup>[3]</sup>。

1.2.2 多重快速 PCR 检测 主要应用多重引物, 针对不同的病原体核酸或耐药基因进行特异性扩增, 可以同时检测同一样本中的细菌、病毒、支原体等临床常见病原体及其耐药基因<sup>[15]</sup>, 在欧美等发达国家应用较多, 例如 Curetis Unvero P50、Xpert、eSensor、FilmArray 等平台, 检测时间极短 (如 Xpert 检测呼吸道病毒可在 30 min 内完成), 操作简便, 但成本较高<sup>[11]</sup>。目前多重检测的优点是增加了识别呼吸道感染的微生物病原的机会, 并且当存在合并感染时, 可以在单个时间点检测一种以上的病原体。分子检测到病毒不一定意味着感染, 与受检者的状况以及病原类别有关<sup>[4,16]</sup>。多重 PCR 的技术难点: (1) 引物与探针的设计, 既要保持良好的灵敏性与特异性, 又要采用特殊的技术避免引物探针间的结合, 同时, 还需要在操作平台上全自动完成样本处理、核酸提取、扩增、结果判读等步骤, 对于生产厂家而言的确构成技术上的挑战。(2) 多重 PCR 的靶标设计也是重要的问题, 设置项目过多, 将临床罕见的病原纳入, 一方面增加了产品的设计难度, 另一方面也会增加医疗负担与患者承受能力。对于多重 PCR 的阳性结果, 应结合患者的具体情况、病原微生物的致病性等综合判断。如鼻病毒可在健康人鼻咽部定植, 而甲型流感病毒很少有这种情况。

1.2.3 基于高通量测序技术的病原体核酸检测 第二代测序技术 (next generation sequencing, NGS) 的发展, 为临床感染性疾病诊断带来了突破性变革。

针对临床病原微生物的 NGS 检测主要采用基于宏基因组二代测序技术 (metagenomics next generation sequencing, mNGS)<sup>[17-20]</sup>。mNGS 的主要原理是将提取的病原微生物基因组 DNA/RNA 进行逆转录和扩增, 然后随机打断为小片段 DNA, 再进行文库构建和上机测序等实验流程, 最终生成测序数据, 由专业人员进行数据分析和结果报告。对于临床而言, mNGS 可以精准地分析患者样本全部微生物, 这一点对于感染性疾病的病原体研究具有极高的应用价值。对于细菌检测, mNGS 技术不仅可以定量明确致病细菌, 还可以获取致病菌的基因分型、耐药基因、进化水平和感染途径等关键信息, 指导临床病原学诊断、疾病防治和疫苗研发<sup>[7]</sup>。对于病毒检测, 如新型冠状病毒, mNGS 可以准确获取病毒的亚型以及耐药进化等信息, 对于暴发性疫病的控制、检测与疫苗研发有重要意义; 对于真菌检测, 它弥补了传统培养方法检出慢、灵敏度低的不足, 为临床快速检出真菌提供了有力手段。因此 mNGS 为检测临床样本中存在的任何病原体、其抗生素耐药基因和新病原体发现提供了一种无偏倚的方法<sup>[1,15,19,21-23]</sup>。正是基于以上特点, mNGS 近年来越来越多地用于临床, 临床遇到疑难感染、多重感染时, 该技术的确解决了很多疑难问题。但是, mNGS 技术应用中也应注意一些问题: (1) mNGS 在核酸提取的过程中, 如果有很多破壁困难的微生物, 包括分枝杆菌, 诺卡菌, 真菌中曲霉菌、毛霉菌、隐球菌、双相真菌等, 破壁都比较困难。导致检测出序列数很低, 临床高度怀疑时, 要采取其他的方法进行相关验证。(2) mNGS 的灵敏度较好, 容易受环境微生物、工程菌、采集过程不当等因素的影响。因为对于 mNGS 的报告要合理解读, 不可将所有列出的微生物当作病原微生物处理<sup>[24,25]</sup>。

## 2 呼吸道感染病原体检测面临的挑战

呼吸道感染由许多病毒或细菌或真菌病原体引起, 目前国内的实验室对于常见细菌诊断而言可能技术相对比较成熟, 但对一些少见的细菌感染, 比如结核分枝杆菌、诺卡菌、非结核分枝杆菌、厌氧菌, 诊断能力尚有不足<sup>[9,26]</sup>。此外, 在真菌方面, 除了传统真菌培养, 隐球菌采用隐球菌荚膜多糖抗原试验<sup>[27,28]</sup>、曲霉菌采用半乳甘露聚糖 (galactomannan, GM) 试验等提高了诊断率<sup>[29]</sup>, 但是在分子生物学诊断方面, 目前国内尚缺乏更好的手段。新冠肺炎疫情之前, 国内很多医院对呼吸道病毒的检测能力较弱, 常常应用抗原快检方法, 甚至选择价值不大但操作相对

方便的抗体检测方案。疫情之后,国内很多二级及以上医院均建立分子生物学实验室,这使得感染病原通过分子生物学鉴定在未来成为可能。同时,由于呼吸道感染诊断的耗时长、手段落后,临床医师通常根据经验处方使用广谱抗生素用于治疗感染,导致患者对抗菌药物耐药性的出现和传播<sup>[4]</sup>。如肺炎链球菌引起CAP,发病急,进展快,可致患者死亡,特别是儿科患者,传统的细菌涂片假阴性多见,而培养、鉴定耗时长,且肺炎链球菌采集、转运、培养过程中易死亡,培养阳性率低。因此只有快速准确诊断呼吸道感染的病原微生物,才能减少抗生素过度使用并防止耐药率进一步增加,以达到最佳临床管控结果。

### 3 总结及展望

显微镜检与培养手段在呼吸道感染尤其是免疫功能低下呼吸道感染者样本诊断中发挥很重要的作用,代表着传统病原体检测方法依然保持金标准的水平,各方面性能也在不断改良;同时分子生物学检测技术的进步展示了巨大前景,有望多方位弥补传统检测方法在灵敏性、特异性及检测时间等各方面的不足而成为新一代金标准。新旧技术的结合将提高我们更精确、更快速地检测引起肺炎的微生物的能力。可以预见,分子生物学检测技术推动下的呼吸道病原体感染检测技术未来必然朝着高通量、自动化的方向发展,成为感染性疾病诊断的主要方法。就目前的技术来看,mNGS尚不能解决快速病原诊断的问题,多数需要24h甚至以上的时间,快速多重PCR多数在2h内出结果,应用前景广泛。但是,多重PCR毕竟靶病原有限,对于临床疑难感染,mNGS有更广阔的应用空间<sup>[30,31]</sup>。

#### 参考文献

[1] Zinter MS, Dvorak CC, Mayday MY, et al. Pulmonary metagenomic sequencing suggests missed infections in immunocompromised children[J]. *Clin Infect Dis*, 2019, 68(11):1847-1855.

[2] Di Pasquale MF, Sotgiu G, Gramegna A, et al. Prevalence and etiology of community-acquired pneumonia in immunocompromised patients [J]. *Clin Infect Dis*, 2019, 68(9):1482-1493.

[3] Baldassarri RJ, Kumar D, Baldassarri S, et al. Diagnosis of infectious diseases in the lower respiratory tract: a cytopathologist's perspective[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2019, 143(6):683-694.

[4] Zumla A, Al-Tawfiq JA, Enne VI, et al. Rapid point of care diagnostic tests for viral and bacterial respiratory tract infections—needs, advances, and future prospects[J]. *Lancet Infect Dis*, 2014, 14(11): 1123-1135.

[5] Kakhki RK, Najafzadeh MJ, Kachuei R, et al. Targeting novel genes for simultaneous detection of five fungal and bacterial agents from

BAL samples using multiplex PCR assay[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2020, 39(8):1535-1542.

[6] Leber AL, Lisby JG, Hansen G, et al. Multicenter evaluation of the QIAstat-Dx respiratory panel for detection of viruses and bacteria in nasopharyngeal swab specimens[J]. *J Clin Microbiol*, 2020, 58(5):e00155-20.

[7] Schlager R, Chiu CY, Miller S, et al. Validation of metagenomic next-generation sequencing tests for universal pathogen detection[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2017, 141(6):776-786.

[8] Torres A, Lee N, Cilloniz C, et al. Laboratory diagnosis of pneumonia in the molecular age[J]. *Eur Respir J*, 2016, 48(6):1764-1778.

[9] Perez-Risco D, Rodriguez-Temporal D, Valledor-Sanchez I, et al. Evaluation of the Xpert MTB/RIF ultra assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in smear-negative extrapulmonary samples[J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56(9):e00659-18.

[10] Hillemann D, Richter E, Rüschi-Gerdes S. Use of the BACTEC Mycobacteria growth indicator tube 960 automated system for recovery of mycobacteria from 9,558 extrapulmonary specimens, including urine samples[J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(11):4014-4017.

[11] Das S, Dunbar S, Tang YW. Laboratory diagnosis of respiratory tract infections in children—the state of the art[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9:2478.

[12] Carroll KC. Laboratory diagnosis of lower respiratory tract infections: controversy and conundrums[J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(9): 3115-3120.

[13] Siqueira LPM, Gimenes VMF, de Freitas RS, et al. Evaluation of Vitek MS for differentiation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* genotypes[J]. *J Clin Microbiol*, 2019, 57(1): e01282-18.

[14] Paściak M, Dacko W, Sikora J, et al. Creation of an in-house matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry *Corynebacterineae* database overcomes difficulties in identification of *Nocardia farcinica* clinical isolates[J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(8):2611-2621.

[15] 李伟,陶然,尚世强. 病原体核酸技术在儿童感染性疾病检测中的发展及应用[J]. *中华检验医学杂志*, 2019, 42(7): 489-492.

[16] Self WH, Williams DJ, Zhu Y, et al. Respiratory viral detection in children and adults: comparing asymptomatic controls and patients with community-acquired pneumonia[J]. *J Infect Dis*, 2016, 213(4):584-591.

[17] Han D, Li Z, Li R, et al. mNGS in clinical microbiology laboratories: on the road to maturity[J]. *Crit Rev Microbiol*, 2019, 45(5-6):668-685.

[18] Huang Z, Li W, Lee GC, et al. Metagenomic next-generation sequencing of synovial fluid demonstrates high accuracy in prosthetic joint infection diagnostics: mNGS for diagnosing PJI[J]. *Bone Joint Res*, 2020, 9(7):440-449.

[19] 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-S240.

- [20] Muller WJ, Chaudhury S. Utility of metagenomic next generation sequencing(mNGS) of plasma for infectious pathogens[J]. Clin Infect Dis, 2020. [Online ahead of print]
- [21] Chen P, Sun W, He Y. Comparison of metagenomic next-generation sequencing technology, culture and GeneXpert MTB/RIF assay in the diagnosis of tuberculosis[J]. J Thorac Dis, 2020, 12(8): 4014 - 4024.
- [22] Dai Y, Chen L, Chang W, et al. Culture-negative Streptococcus suis infection diagnosed by metagenomic next-generation sequencing [J]. Front Public Health, 2019, 7:379.
- [23] Enkirch T, Werngren J, Groenheit R, et al. Systematic review of whole-genome sequencing data to predict phenotypic drug resistance and susceptibility in Swedish Mycobacterium tuberculosis isolates, 2016 to 2018[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2020, 64(5): e02550 - 19.
- [24] Simner PJ, Miller S, Carroll KC. Understanding the promises and hurdles of metagenomic next-generation sequencing as a diagnostic tool for infectious diseases[J]. Clin Infect Dis, 2018, 66(5): 778 - 788.
- [25] Bittinger K, Charlson ES, Loy E, et al. Improved characterization of medically relevant fungi in the human respiratory tract using next-generation sequencing[J]. Genome Biol, 2014, 15(10): 487.
- [26] Kandi V. Human Nocardia infections: a review of pulmonary nocardiosis[J]. Cureus, 2015, 7(8): e304.
- [27] Li Y, Zou M, Yin J, et al. Microbiological, epidemiological, and clinical characteristics of patients with Cryptococcal meningitis at a tertiary hospital in China: a 6-year retrospective analysis[J]. Front Microbiol, 2020, 11: 1837.
- [28] Dizon E, Seo W, Butler-Wu SM, et al. Clinical significance of low serum cryptococcal antigen titers by lateral flow assay in immunocompromised patients: a retrospective case-control study [J]. J Clin Microbiol, 2020, 58(2): e01648 - 19.
- [29] Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdagli S, et al. Diagnosis and management of Aspergillus diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline[J]. Clin Microbiol Infect, 2018, 24 Suppl 1: e1 - e38.
- [30] Langelier C, Zinter MS, Kalantar K, et al. Metagenomic sequencing detects respiratory pathogens in hematopoietic cellular transplant patients[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2018, 197(4): 524 - 528.
- [31] Gu W, Miller S, Chiu CY. Clinical metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection[J]. Annu Rev Pathol, 2019, 14: 319 - 338.
- [收稿日期 2021 - 01 - 12][本文编辑 吕文娟 余 军]

#### 本文引用格式

胡晏宁, 鲁炳怀. 呼吸道感染性疾病病原学诊断的挑战与解决策略 [J]. 中国临床新医学, 2021, 14(1): 8 - 12.