

## 呼吸道感染病原学诊断年度进展 2021

邹晓辉 曹彬

中日友好医院呼吸中心呼吸与危重症医学科 国家呼吸医学中心 国家呼吸疾病临床医学研究中心 中国医学科学院呼吸病学研究院, 北京 100029

通信作者: 曹彬, Email: caobin\_ben@163.com

**【摘要】** 呼吸道感染是人群的常见和高发疾病, 严重时可发展为 ARDS。各类病原微生物如细菌、真菌、病毒, 均可引起呼吸道感染, 快速准确的病原检测是实现呼吸道感染疾病有效诊治的关键, 但超过 50% 的患者未能诊断出明确的致病微生物。近年来, 以临床宏基因组学、CRISPR(成簇规律间隔的短回文重复序列)为代表的新型检测技术在病原诊断领域取得了迅速发展, 在提高病原检出率的同时, 也带来了新的挑战。本文综述了过去 1 年来呼吸道感染病原诊断领域的进展和成果, 为呼吸道感染的病原诊断提供临床视角的思考。

**基金项目:** 国家自然科学基金(81900009, 82041011, 82030002); 北京市科学技术委员会(Z191100006619101); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程新型冠状病毒肺炎科研攻关专项(2020-I2M-CoV19-005)

### Advances in pathogen diagnosis of respiratory infection diseases in 2021

Zou Xiaohui, Cao Bin

Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, China-Japan Friendship Hospital; National Center for Respiratory Diseases; National Clinical Research Center for Respiratory Diseases; Institute of Respiratory Medicine, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100029, China

Corresponding author: Cao Bin, Email: caobin\_ben@163.com

**【Abstract】** Respiratory tract infections (RTI) are a common and highly prevalent disease in the population, which can develop into acute respiratory distress syndrome (ARDS) in severe cases. A large variety of microorganisms can cause RTI, including bacteria, respiratory viruses, and fungi. The timely and accurate detection of these pathogens is the prerequisites of effective treatment of RTI. However, more than 50% of RTI patients failed to diagnosis of causative agents due to unavailability of qualified samples, antimicrobial treatment prior to sample collection, high variety of respiratory pathogens, and influence of the normal flora in respiratory tract. In recent years, progress on molecular diagnosis, especially the novel approaches such as clinical metagenomics and CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats), has not only improved our capacity for RTI pathogen detection but also brought new challenges. In this review, we summed up the advances in RTI pathogen diagnosis in 2021 and discussed the clinical benefits and challenges from novel approaches, which provided a clinical perspective on the development and application of these diagnostic tools in the real world.

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81900009, 82041011, 82030002); Beijing Municipal Science & Technology Commission (Z191100006619101); Chinese Academy of Medical Sciences Innovation Fund for Medical Sciences (2020-I2M-CoV19-005)

呼吸道感染可分为上呼吸道感染和下呼吸道感染。上呼吸道感染包括普通感冒、流行性感、鼻咽炎、扁桃腺炎、

咽喉炎等。下呼吸道感染指的是肺组织或者喉以下的气管支气管发生的感染, 常来自自口腔和上呼吸道病毒或细菌

DOI: 10.3760/cma.j.cn112147-20211116-00809

收稿日期 2021-11-16 本文编辑 吕小东

引用本文: 邹晓辉, 曹彬. 呼吸道感染病原学诊断年度进展 2021[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2022, 45(1):

78-82. DOI: 10.3760/cma.j.cn112147-20211116-00809.



微生物向下呼吸道蔓延引起<sup>[1]</sup>。

传统的微生物培养和涂片依然是细菌和真菌诊断的“金标准”<sup>[2]</sup>。近 10 年来,基于多重 PCR (polymerase chain reaction, PCR) 技术的多重病原检测技术得到了较快发展, 单次反应可以检测 10~30 种病原。自 2008 年基于新一代测序技术 (next generation sequencing, NGS) 的临床宏基因组学 (metagenomics NGS, mNGS) 技术得到了迅速发展和临床推广, 在少见/罕见病原及新发突发呼吸道传染病病原鉴定方面取得了优势。新冠肺炎疫情的出现还促使基于 CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, 成簇规律间隔的短回文重复序列) 技术的病原检测方法得到了美国食品药品监督管理局 (FDA) 的授权紧急使用。质谱直接用于临床样本中病原检测已经取得了初步成果, 在严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 检测上已经过验证。本文对过去 1 年内 (2020 年 10 月 1 日至 2021 年 9 月 30 日) 国内外呼吸道感染病原学诊断领域的重要研究进行回顾和综述, 启发读者今后对技术开发和临床使用进行思考。

#### 一、标本种类和质量对呼吸道病原检测的影响

近年来, 支气管镜技术在多种呼吸系统疾病的诊断和治疗领域广泛应用。在重症肺炎患者的临床诊断中, 支气管镜检查表现出比 CT 检查更好的敏感度和特异度<sup>[3]</sup>, 支气管镜联合快速现场评价 (rapid on-site evaluation, ROSE) 比单纯支气管镜检查首次检查时间较长, 但首次检查未明确诊断需选择二次检查的患者比例更低<sup>[4]</sup>。支气管镜联合 ROSE 可能提高了样本采集质量进而提高了诊断率。

肺泡灌洗液多重 PCR 对社区获得性肺炎 (community-acquired pneumonia, CAP) 患儿细菌检出率高于痰培养和肺泡灌洗液培养<sup>[5]</sup>, 低灌注组患者 (60 ml) 病原学检测阳性率似乎高于高灌注组 (120 ml), 但该研究样本量偏低, 结果还需要更大样本量研究的验证<sup>[6]</sup>。

除了肺泡灌洗液, 唾液也可以作为呼吸道病毒检测的候选样本<sup>[7]</sup>。在对新冠肺炎住院患者的 183 份样本进行数字 PCR 检测发现, 鼻咽拭子 (28 份) 的阳性率最高, 其次为唾液 (36 份), 高于痰液 (24 份), 肛拭子 (35 份) 和粪便样本 (14 份), 且唾液中病毒载量的中位数高于其他样本<sup>[8]</sup>; 另一项研究对 12 项唾液检测 SARS-CoV-2 的研究进行荟萃分析, 结果显示唾液样本检测 SARS-CoV-2 的敏感度为 87%, 特异度为 98%<sup>[9]</sup>。对于其他病原, 如流感病毒和肺炎链球菌等细菌病原体, 唾液的诊断意义还需要进一步的研究。

#### 二、全自动集成式多重 PCR 技术的进展

1. GeneXpert 快速诊断平台: GeneXpert 平台是一种能同时检测 4~7 个靶点的自动化多重 PCR 平台。GeneXpert 结核分支杆菌检测平台在国内应用较早, 冯菁楠等<sup>[10]</sup>的 meta 分析显示, GeneXpert 平台对我国人群活动性肺结核检测的敏感度为 94%, 特异度为 87%; 不同类型样本敏感度无明显差异, 但痰液的特异度高于支气管灌洗液。对利福平耐药的肺结核敏感度为 92%, 特异度为 98%, 证明

GeneXpert 平台在活动性结核病诊断方面较好的临床应用前景。

Xpert<sup>®</sup>Xpress Flu/RSV 模块可以同时检测甲型流感病毒 (FluA)、乙型流感病毒 (FluB) 和呼吸道合胞体病毒 (RSV) 等三种常见呼吸道病毒, 可在 30 min 内报告检测结果, 与一代测序方法具有很高的一致性: FluA 为 93.81%, FluB 为 94.85%, RSV 为 91.75%, 对三种病毒检测的敏感度高于测序方法, 但特异度略微低于测序的方法<sup>[11]</sup>; 英国 642 例患者中的研究显示该试剂盒对 FluA 的敏感度和特异性分别为 96.6% 和 98.1%, 对 RSV 的敏感度为 86.0%<sup>[12]</sup>。新冠肺炎疫情发生后, 该试剂盒还加入 SARS-CoV-2 的检测通道, 使一次反应可检测 4 种呼吸道病毒。

2. FilmArray 巢式 PCR 系统: FilmArray 平台整合了巢式 PCR 技术和微流控芯片的技术优势, 其上呼吸道病原模块 (respiratory Panel) 可在 1 次反应中检测 16 种呼吸道病毒和 3 种非典型呼吸道病原体, 在儿童呼吸道感染 (鼻咽分泌物, 鼻咽拭子或痰标本) 中的病原检出率高达 84.83%~86.88%<sup>[13-14]</sup>, FilmArray 组患者比对照组抗菌药物使用更少、住院时间更短<sup>[14]</sup>。尽管国内这些研究均显示 FilmArray 平台在呼吸道病原检出率上的优势, 但这些研究大部分为回顾性研究, 缺乏严格的对照组, 对临床诊疗效果的影响还需要前瞻性的随机对照研究证实。

Brottons 等<sup>[15]</sup>前瞻性入组了 130 例重症儿童患者同时进行 FilmArray 和传统微生物检测, 在 FilmArray 检测组中有 123 例 (94.6%) 患者病原阳性, 而常规方法只在 87 例 (66.9%) 患者中检出病原, 但 FilmArray 细菌检出人数低于培养的方法, 说明 FilmArray 的高检出率主要是由于呼吸道病毒检出率高所致。FilmArray 从样本接收到报告的时间为 2.9 h, 65.4% 的患者可以在出 PICU 之前获得病原检测结果, 而传统方法这个比例为 38.5%。此外, FilmArray 平台对 11 例 (8.4%) 的抗菌药物治疗产生了影响。该研究显示出 FilmArray 平台在儿童患者呼吸道病原快速诊断和抗菌药物合理应用方面的潜力, 但该研究纳入患者数目较少, 不是随机双盲实验, 影响了其证据等级<sup>[15]</sup>。FilmArray 肺炎模块 (pneumonia FilmArray) 是 FilmArray 上呼吸道模块的升级版<sup>[16]</sup>, 将细菌病原的检测种类从 6 种提高到 18 种, 使病原检出率从原来的 40.5% 提高到 60.9%, 其中细菌病原检出率从 66.4% 提高到 75.5%, 对 15 种细菌的检测敏感度为 75%~100%, 特异度为 97%~100%<sup>[16]</sup>。但细菌检出率提高对临床抗菌药物使用和临床预后效果的影响需要进一步的研究<sup>[17]</sup>。

另外一种全自动多重 PCR 检测系统 Unyvero 专注于呼吸道细菌和耐药基因检测, 可实现在 4~5 h 内同时检测 21 种呼吸道细菌和 19 种耐药基因, 在 84 份肺泡灌洗液的检测中显示与培养方法 82.1% 的一致性, 但 Unyvero 比培养方法检测出了更多病原微生物 (38.1% vs 27.4%) 和更多的混合感染 (10.7% vs 2.4%), 其总体敏感度和特异度分别为 84% 和 98%<sup>[18]</sup>。全自动多重 PCR 系统将检测靶点提升至数

十种,大大提高了呼吸道感染病原学检出率,但这类平台检测的病原种类大都在出厂时已固定,临床医生无法根据患者临床表现来选择特定的组合,从而导致在只需检测部分靶点时也必须检测组合中所有病原种类,导致医疗资源浪费。开发可自由组合的模块式自动化平台是未来的一个发展方向。

### 三、宏基因组病原检测方法的进展和挑战

基于二代测序的 mNGS 方法在近年来以医学诊断服务的方式得到了较多应用。该方法对样本中所有微生物核酸进行测序和鉴定,理论上可一次性检测出样本中所有致病微生物,在病原检出率上具有优势<sup>[19-20]</sup>。针对 PICU 患者的回顾性分析研究显示, mNGS 病原检出率高于培养,低于荧光定量 PCR (quantitative polymerase chain reaction, qPCR), 但该研究样本量较少 (50 例)<sup>[21]</sup>。另一项研究入组了 99 例重症儿童肺炎患者, mNGS 对病原体 (细菌+病毒) 检出率为 97.8%, 而传统方法 (培养+4 种呼吸道病毒 qPCR+肺炎支原体抗体检测) 检出率仅为 66.7%<sup>[22]</sup>。mNGS 在检测细菌和真菌方面优于传统培养的方法 (95% vs 54%), 但与 qPCR 方法相比, 病毒检出率要低<sup>[23]</sup>; mNGS 方法可以检出更多的厌氧菌和苛氧菌, 这可能是 mNGS 方法细菌检出率较高的原因之一<sup>[24]</sup>; 相比较传统微生物培养方法<sup>[25]</sup>, 三代 nanopore 测序的时效性更好, 最快可在 6 h 内报告结果。另一项国内多中心回顾性观察研究纳入了 159 例肺炎患者, 采集患者的肺泡灌洗液进行传统检测和 mNGS 检测。相比较传统培养+涂片+qPCR 的病原检测方法, mNGS 检出病原种类更多 (117 vs 72), 其中 40.3% 的患者根据 mNGS 结果调整了治疗方案<sup>[26]</sup>。但需要注意的是, 这些研究未排除患者使用抗菌药物的影响, 这可能造成了传统方法细菌检出率低于 mNGS。在免疫抑制合并重症肺炎患者的经验性抗菌药物治疗基础上, 对肺泡灌洗液进行 mNGS 联合质谱检测病原学并指导抗菌药物使用, 可以提升患者的治疗效果, 减少并发症, 但该研究入组患者少 (每组仅入组 25 例), 治疗效果评价标准不明确<sup>[27]</sup>。整体而言, 国内大部分研究主要集中在单中心回顾性分析上, 简单的比较 mNGS 方法与传统方法的敏感度、特异度差异, 缺乏严格的随机对照试验, 大部分研究未能明确 mNGS 是否改善了患者的临床预后。

Azar 等<sup>[28]</sup>回顾性分析了 30 例免疫抑制患者 mNGS 和传统病原检测方法的报告结果, 针对 mNGS 报告的病原微生物, 2 名医生根据既往文献报道、患者临床症状、影像学和实验室指标, 分别独立地判断该病原是否能解释患者的临床表现, 结果显示, 在常规方法上加入 mNGS 检测, 可以使病原检出率从 35% 提高到 58%。尽管该研究纳入患者较少, 但该研究整合患者的临床表现来判定病原的解释程度, 并采用两位临床医生独立判断的方式, 其结果仍具备一定的参考意义。

除了呼吸道样本, 体液中的无细胞 DNA (cell-free DNA, cfDNA) 也具备病原检测意义<sup>[29]</sup>。与金标准相比, illumina 平台 cfDNA 的检测方法针对细菌的敏感度和特异

度分别为 79% 和 91%, 针对真菌敏感度和特异度为 91% 和 89%; 在三代测序 nanopore 平台上, 针对细菌的敏感度和特异度分别为 75% 和 81%, 针对真菌为 91% 和 100%<sup>[30]</sup>。该研究显示 cfDNA 作为 mNGS 检测样本的可行性, 但另外一项研究纳入 82 例儿童患者采用 mNGS 方法检测血浆 cfDNA, 其结果显示 cfDNA 的 mNGS 检测对临床影响有限<sup>[31]</sup>。cfDNA 作为病原检测靶点仍需更多的研究支持。

尽管 mNGS 技术在呼吸道感染病原检测方面已经取得了很大进展, 但 mNGS 方法检测流程复杂, 对检测试剂、仪器运行环境及人员素质均有较高的要求。检测步骤涉及样本核酸提取、文库构建、生物信息学分析等多个流程, 所有过程必须严格质控才能确保最终结果的可靠性。此外, 呼吸道正常菌群的存在增加了 mNGS 报告的解释难度; 对于免疫抑制患者等特殊人群, 其致病微生物的判定标准应与免疫正常人群有所差异, 建立特殊人群特异性的病原数据库和判定标准是一个可行的解决办法。对于特殊病原体, mNGS 方法也应该设置相应的样本处理方法, 如厚壁微生物和结核分枝杆菌等, 这些病原破壁难度高, 核酸提取效率低, 可能会导致其检出率降低。针对不同患者人群不同疾病症候建立针对性的 mNGS 检测流程, 是 mNGS 在临床发挥更大效应的重要途径。

### 四、CRISPR 技术在呼吸道感染领域的应用

CRISPR 技术是利用向导 RNA (guide RNA) 来引导 Cas 酶切割目标序列的技术, 特异度好, 结合等温扩增和试纸条显色, 无需复杂设备, 可以实现床旁检测和野外检测<sup>[32]</sup>。CRISPR 根据采用的 Cas 酶不同主要分为 Cas13-和 Cas12-两类, 代表性方法分别是 SHERLOCK (specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking) 和 DETECTR (DNA endonuclease targeted CRISPR trans reporter)<sup>[33]</sup>。Joung 等<sup>[34]</sup>将 SHERLOCK 中原来的 Cas13 换成了 Cas12b, 利用环介导扩增, 可以在一管反应检测 SARS-CoV-2, 敏感度同 qPCR 方法相近。在一项包括 378 例新冠肺炎患者的 SARS-CoV-2 检测研究中, DETECTR 方法显示出和 qPCR 一样的敏感度, 并且能 100% 区分其他冠病毒病毒型别<sup>[35]</sup>。美国 FDA 在 2021 年 1 月和 7 月分别批准了 SHERLOCK 和 DETECTR 在临床 SARS-CoV-2 检测上的紧急授权使用<sup>[36-37]</sup>, 使得 CRISPR 检测技术第一次从实验室走向临床。相比其他比较成熟的病原检测方法, CRISPR 技术在呼吸道病原检测方面还处于早期应用阶段, 其可靠性和易用性还需要时间来证明。

### 五、质谱在呼吸道病原快速诊断方面的潜力

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) 在临床微生物实验室广泛用于细菌和真菌培养物鉴定<sup>[38-39]</sup>。新冠肺炎疫情暴发后, MALDI-TOF-MS 被用于 SARS-CoV-2 的临床检测<sup>[40]</sup>, 在某些疑似病例中表现出比 qPCR 更好的检测效果<sup>[41]</sup>。但这些方法均需要利用 PCR 的方法扩增病毒序列然后进行质谱分析, 相比 qPCR 的

方法在可操作性和时效性上没有优势。直接对呼吸道样本进行质谱分析来鉴定病原是质谱在呼吸道病原诊断领域的发展方向。利用 qPCR 验证的 SARS-CoV-2 阳性和阴性咽拭子样本直接进行质谱分析和机器学习模型构建, 可以实现 93.9% 的检测准确性<sup>[42]</sup>, 显示出质谱直接鉴定原始样本中病毒的巨大潜力。质谱直接检测支气管抽提物来鉴定呼吸道细菌感染在呼吸机相关性肺炎患者中已经得到概念性验证 (proof of concept)<sup>[43]</sup>。目前, 质谱直接作用于临床样本来检测呼吸道病原还处于探索阶段, 这个过程涉及数据库构建、样本处理方法、病原富集等一系列技术挑战, 整合临床微生物、基础研究、机器学习方法是实现质谱快速病原诊断的重要手段。

总之, 在新兴病原检测技术不断取得进展的同时, 传统的呼吸道病原检测方法不应被取代和忽视。传统的培养、血清学、PCR 方法在临床应用时间较长, 形成了完备的技术体系和质量控制方案, 是呼吸道感染病原诊断的基础。传统方法一般是病原检测的金标准, 其敏感度和特异度不容忽视。但传统的方法存在检测时间长、样本要求严格、无法对混合感染及未知病原检测等不足, 而多重 PCR 和 mNGS 等新技术在检测病原的种类和时效性上具有明显优势, 在实际临床应用中与传统方法相互补充可以更好地服务临床。

病原诊断技术的进步只是提高了临床医生在呼吸道标本中发现病原的机会, 能否根据病原检测的结果确定呼吸道感染的病因, 并提高抗感染药物应用的合理性, 改善患者预后才是其终极目的。因此, 还需要更严格的前瞻性随机对照临床试验来为呼吸道感染病原诊断新技术的临床应用提供高水平循证医学证据, 任重而道远。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

## 参 考 文 献

- Torres A, Cilloniz C, Niederman MS, et al. Pneumonia[J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7(1): 25. DOI: 10.1038/s41572-021-00259-0.
- 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.
- 邹晓光, 杨兆辉. 纤维支气管镜检查诊断技术在重症肺炎中的应用及疾病病原学[J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(19): 4116-4119. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2020.19.028.
- 陈余思, 胡强, 江平飞, 等. 纤维支气管镜联合快速现场评价对肺部感染的诊断价值[J]. 中国感染控制杂志, 2021, 20(4): 351-356.
- 黄光举, 张慧玉, 李娟, 等. 肺泡灌洗液多重 PCR 检测对儿童社区获得性肺炎病原学的诊断价值[J]. 现代临床医学, 2021, 47(4): 241-243, 246.
- 高春, 高丽华, 赵军, 等. 不同纤维支气管镜肺泡灌洗液量对重症肺炎的疗效和病原学检测结果的影响[J]. 临床内科杂志, 2021, 38(7): 489-490. DOI: 10.3969/j.issn.1001-9057.2021.07.016.
- de Koff EM, Euser SM, Badoux P, et al. Respiratory pathogen detection in children: saliva as a diagnostic specimen[J]. Pediatr Infect Dis J, 2021, 40(9): e351-e353. DOI: 10.1097/INF.0000000000003191.
- Sui Z, Zhang Y, Tu S, et al. Evaluation of saliva as an alternative diagnostic specimen source for SARS-CoV-2 detection by RT-dPCR[J]. J Infect, 2021, 82(1): e38-e40. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.11.023.
- Warsi I, Khurshid Z, Shazam H, et al. Saliva exhibits high sensitivity and specificity for the detection of SARS-CoV-2[J]. Diseases, 2021, 9(2): 38. DOI: 10.3390/diseases9020038.
- 冯菁楠, 高乐, 孙一鑫, 等. Xpert(R)MTB/RIF 对我国人群活动性肺结核和利福平耐药肺结核诊断准确性的 meta 分析[J]. 北京大学学报(医学版), 2021, 53(2): 320-326. DOI: 10.19723/j.issn.1671-167X.2021.02.015.
- 关晓蕾, 段亚丽, 王巍, 等. 赛沛 Xpert Xpress Flu/RSV Assay 在儿童急性呼吸道感染病原学检测中的应用评价[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2021, 35(1): 62-67. DOI: 10.3760/cma.j.cn112866-20200922-00250.
- Morris TC, Bird PW, Horvath-Papp E, et al. Xpert Xpress Flu/RSV: Validation and impact evaluation at a large UK hospital trust[J]. J Med Virol, 2021, 93(8): 5146-5151. DOI: 10.1002/jmv.26860.
- 陈晓倩, 蒋苏华, 黄葆莹, 等. 运用自动巢式多重 PCR 系统对儿童重症社区获得性肺炎病原体的检测分析[J]. 中国小儿急救医学, 2020, 27(11): 834-837. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4912.2020.11.008.
- 周雅娟, 曹清, 卜丽君, 等. FilmArray 检测在儿童急性下呼吸道感染中的应用价值及卫生经济学分析[J]. 中国小儿急救医学, 2020, 27(11): 826-829. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4912.2020.11.006.
- Brotans P, Villaronga M, Henares D, et al. Clinical impact of rapid viral respiratory panel testing on pediatric critical care of patients with acute lower respiratory infection[J]. Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed), 2020, DOI: 10.1016/j.eimc.2020.08.017.
- Caméléna F, Moy AC, Dudoignon E, et al. Performance of a multiplex polymerase chain reaction panel for identifying bacterial pathogens causing pneumonia in critically ill patients with COVID-19[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2021, 99(1): 115183. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2020.115183.
- Gilbert DN, Leggett JE, Wang L, et al. Enhanced detection of community-acquired pneumonia pathogens with the BioFire® Pneumonia FilmArray® Panel[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2021, 99(3): 115246. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2020.115246.
- Sun L, Li L, Du S, et al. An evaluation of the Unyvero pneumonia system for rapid detection of microorganisms and resistance markers of lower respiratory infections—a multicenter prospective study on ICU patients[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2021, 40(10): 2113-2121. DOI: 10.1007/s10096-021-04259-6.
- Xie F, Duan Z, Zeng W, et al. Clinical metagenomics assessments improve diagnosis and outcomes in community-acquired pneumonia[J]. BMC Infect Dis, 2021, 21(1): 352. DOI: 10.1186/s12879-021-06039-1.
- Wu X, Li Y, Zhang M, et al. Etiology of severe community-acquired pneumonia in adults based on metagenomic next-generation sequencing: a prospective multicenter study[J]. Infect Dis Ther, 2020, 9(4): 1003-1015. DOI: 10.1007/s40121-020-00353-y.
- 杨伟健, 唐远平, 朱欢欢, 等. 宏基因组二代测序

- 技术对重症监护儿童支气管肺炎的病原学研究[J]. 临床肺科杂志, 2021, 26(6):863-868. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6663.2021.06.011.
- [22] 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, 2633.
- [23] Qian YY, Wang HY, Zhou Y, et al. Improving pulmonary infection diagnosis with metagenomic next generation sequencing[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 567615. DOI: 10.3389/fcimb.2020.567615.
- [24] Mu S, Hu L, Zhang Y, et al. Prospective evaluation of a rapid clinical metagenomics test for bacterial pneumonia [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 684965. DOI: 10.3389/fcimb.2021.684965.
- [25] MacVane SH, Oppermann N, Humphries RM. Time to result for pathogen identification and antimicrobial susceptibility testing of bronchoalveolar lavage and endotracheal aspirate specimens in U. S. Acute care hospitals[J]. *J Clin Microbiol*, 2020, 58(11): e01468-20. DOI: 10.1128/JCM.01468-20.
- [26] Zhou H, Larkin P, Zhao D, et al. Clinical impact of metagenomic next-generation sequencing of bronchoalveolar lavage in the diagnosis and management of pneumonia: a multicenter prospective observational study[J]. *J Mol Diagn*, 2021, 23(10): 1259-1268. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2021.06.007.
- [27] 周佳琦, 马肖龙. 高通量基因序列在免疫抑制合并肺炎患者肺泡灌洗液感染病原中的应用[J]. 中国现代医生, 2021, 59(6):38-41.
- [28] Azar MM, Schlager R, Malinis MF, et al. Added diagnostic utility of clinical metagenomics for the diagnosis of pneumonia in immunocompromised adults[J]. *Chest*, 2021, 159(4):1356-1371. DOI: 10.1016/j.chest.2020.11.008.
- [29] Wang L, Guo W, Shen H, et al. Plasma microbial cell-free DNA sequencing technology for the diagnosis of sepsis in the ICU[J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 659390. DOI: 10.3389/fmolb.2021.659390.
- [30] Gu W, Deng X, Lee M, et al. Rapid pathogen detection by metagenomic next-generation sequencing of infected body fluids[J]. *Nat Med*, 2021, 27(1): 115-124. DOI: 10.1038/s41591-020-1105-z.
- [31] Hogan CA, Yang S, Garner OB, et al. Clinical Impact of metagenomic next-generation sequencing of plasma cell-free DNA for the diagnosis of infectious diseases: a multicenter retrospective cohort study[J]. *Clin Infect Dis*, 2021, 72(2):239-245. DOI: 10.1093/cid/ciaa035.
- [32] Safari F, Afarid M, Rastegari B, et al. CRISPR systems: novel approaches for detection and combating COVID-19[J]. *Virus Res*, 2021, 294:198282. DOI: 10.1016/j.virusres.2020.198282.
- [33] Freije CA, Sabeti PC. Detect and destroy: CRISPR-based technologies for the response against viruses[J]. *Cell Host Microbe*, 2021, 29(5): 689-703. DOI: 10.1016/j.chom.2021.04.003.
- [34] Joung J, Ladha A, Saito M, et al. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK one-pot testing[J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(15):1492-1494. DOI: 10.1056/NEJMc2026172.
- [35] Brandsma E, Verhagen H, van de Laar T, et al. Rapid, sensitive, and specific severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 detection: a multicenter comparison between standard quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction and CRISPR-based detectr[J]. *J Infect Dis*, 2021, 223(2): 206-213. DOI: 10.1093/infdis/jiaa641.
- [36] FDA. Sherlock crispr SARS-CoV-2 kit[EB/OL]. [2021-01-14]. <https://www.fda.gov/media/137746/download>.
- [37] FDA. SARS-CoV-2 RNA DETECTR assay[EB/OL]. [2020-07-09]. <https://www.fda.gov/media/139937/download>.
- [38] Torres-Sangiao E, Leal Rodriguez C, García-Riestra C. Application and perspectives of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology laboratories[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(7): 1539. DOI: 10.3390/microorganisms9071539.
- [39] Teke L, Barış A, Bayraktar B. Comparative evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for non-albicans *Candida* and uncommon yeast isolates[J]. *J Microbiol Methods*, 2021, 185:106232. DOI: 10.1016/j.mimet.2021.106232.
- [40] Hernandez MM, Banu R, Shrestha P, et al. RT-PCR/MALDI-TOF mass spectrometry-based detection of SARS-CoV-2 in saliva specimens[J]. *J Med Virol*, 2021, 93(9):5481-5486. DOI: 10.1002/jmv.27069.
- [41] Rybicka M, Miłosz E, Bielawski KP. Superiority of MALDI-TOF mass spectrometry over real-time PCR for SARS-CoV-2 RNA detection[J]. *Viruses*, 2021, 13(5): 730. DOI: 10.3390/v13050730.
- [42] Nachtigall FM, Pereira A, Trofymchuk OS, et al. Detection of SARS-CoV-2 in nasal swabs using MALDI-MS[J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(10): 1168-1173. DOI: 10.1038/s41587-020-0644-7.
- [43] Bardet C, Barraud O, Clavel M, et al. Early and specific targeted mass spectrometry-based identification of bacteria in endotracheal aspirates of patients suspected with ventilator-associated pneumonia[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2021, 40(6): 1291-1301. DOI: 10.1007/s10096-020-04132-y.