

呼吸道感染病原体检测技术与发展趋势

陈舒影, 余方友

作者单位: 325000 浙江,温州医科大学附属第一医院检验科(陈舒影); 200090 上海,同济大学附属上海市肺科医院检验科(余方友)

作者简介: 陈舒影,医学硕士,主管技师,研究方向:临床微生物学。E-mail:wyyycsy@163.com

通信作者: 余方友,医学博士,主任技师,教授,博士研究生导师,研究方向:临床微生物学。E-mail:wjxyfy@163.com



余方友,医学博士,教授,博/硕士研究生导师,现任同济大学附属上海市肺科医院检验科主任,担任中国医促会临床微生物学与感染分会常委,中国防痨协会结核病基础分会副主任委员,中国防痨协会人兽共患结核病分会副主任委员。主要从事细菌耐药机制方面的研究,曾先后主持课题 18 项,并于 2009 年、2012 年、2014 年、2016 年、2018 年、2020 年和 2022 年先后 7 次获得国家自然科学基金面上项目。以通信作者或第一作者发表论文 180 余篇,其中 SCI 收录论文 80 余篇。曾获得中华医学科技奖一等奖和浙江省科学技术奖一等奖各 1 次,其他厅市级科技奖 7 次。

[摘要] 由于传统呼吸道病原体检测手段的限制,导致临床诊断难、治疗用药难。呼吸道感染多联检产品时效性高,可及早识别感染,并指导抗感染药物的合理使用。各种便携式(快速)诊断技术产品发展迅速,临床应用前景广阔。宏基因组二代测序技术(mNGS)对呼吸道感染病原体的检测覆盖面广、信息量大,对呼吸道病原体的早期发现,特别是新发传染病的病原体快速诊断,起到非常重要的作用。基于规律间隔成簇短回文重复序列(CRISPR)的核酸检测技术、三代测序技术及基因芯片技术等快速检测新技术为呼吸道病原体的诊断开辟了新的方向。

[关键词] 呼吸道感染病原体; 宏基因组二代测序技术; 规律间隔成簇短回文重复序列/规律间隔成簇短回文重复序列相关蛋白检测技术; 三代测序技术; 基因芯片

[中图分类号] R 56; R 446 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2022)10-0894-06

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2022.10.02

Detection technologies of pathogens in respiratory tract infection and their development trend CHEN Shu-ying, YU Fang-you. Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China

[Abstract] The limitations of traditional detection means of respiratory pathogens make clinical diagnosis and therapeutic medication difficult. The multiple joint detection products have high timeliness for respiratory tract infection. They can identify infections as soon as possible, and guide the rational use of anti-infective drugs. A variety of portable(rapid) diagnostic technology products are developing rapidly and have broad prospects for clinical application. The detection of pathogens in respiratory tract infection by metagenomics next-generation sequencing(mNGS) is extensive and informative, which plays a very important role in the early detection of respiratory pathogens, especially in the rapid diagnosis of a novel infectious disease. New rapid detection technologies such as clustered regularly interspaced short palindromic repeats(CRISPR)-based nucleic acid assay, third-generation sequencing technology and gene chip test have showed new detection directions for the diagnosis of respiratory pathogens.

[Key words] Respiratory pathogen; Metagenomics next-generation sequencing(mNGS); Clustered regularly interspaced short palindromic repeats(CRISPR)/CRISPR associated protein(CRISPR/Cas) assay; Third-generation sequencing technology; Gene chip

呼吸道感染是指由多种病原微生物包括病毒、细菌、真菌、支原体、衣原体、立克次体、寄生虫等引起的感染性疾病。呼吸道感染分为上呼吸道感染和下呼吸道感染。上呼吸道感染主要由病毒引起,占70%~80%,包括鼻病毒、冠状病毒、腺病毒、流感和副流感病毒、呼吸道合胞病毒、埃可病毒、柯萨奇病毒等。上呼吸道感染一般起病急、病程短,通常自限且预后良好。下呼吸道感染包括社区获得性肺炎(community-acquired pneumonia, CAP)、医院获得性肺炎(hospital-acquired pneumonia, HAP)、支气管炎、毛细支气管炎和气管炎,病原体主要为细菌、支原体、衣原体、病毒。下呼吸道感染多表现为重症,死亡率高、预后差。2019年世界卫生组织(World Health Organization, WHO)公布的全球主要死亡原因中就包括了呼吸道感染,下呼吸道感染仍然是世界上病死率最高的感染性疾病之一,排在主要死亡原因的第四位^[1]。美国的一项研究表明,尽管进行了全面的诊断工作,但高达62%的CAP的病因仍未得到明确^[2]。在没有明确的病原微生物学诊断情况下,对严重的下呼吸道感染患者通常在最初的治疗中会使用经验性的广谱抗菌药物来缓解症状。一旦确定病原体,临床医师应调整或停止这种经验性治疗^[3-4]。但是,在患者反应良好或没有检测到导致感染的病原体时,临床医师通常会继续进行经验性治疗,最终导致广谱抗菌药物的滥用。此外,在没有微生物病原学检查的情况下,临床医师可能会错误地将症状归类为非感染性炎症反应,并经验性使用激素类药物,这可能会导致再次感染^[5]。在我国,与医院相关的感染中,呼吸道感染,特别是下呼吸道感染是院内感染的主要类型^[6]。因此,快速、准确地识别病原体可以进行精准治疗,减少广谱抗菌药物的滥用和院内感染的传播,并促进患者康复。

1 传统的检测方法

病原体的培养作为呼吸道病原体检测的金标准,特异性高、成本低,但对于一些难以培养的病原体(如病毒、衣原体)来说,时效性和敏感性较差^[7]。因此这些病原体的分离培养不适用于常规检测。涂片检测的优点是快速、直观、成本低,临床易于开展,但缺点是敏感性偏低,并且非常依赖于检验工作人员的经验。免疫学检测是通过血清学来检测抗原和(或)抗体的检测方法。在疾病早期,抗原检测的诊断价值较好,可以通过直接免疫荧光法或间接免疫荧光法(indirect immunofluorescence assay, IFA)、免疫层析法检测病原体的抗原蛋白。病原体抗原检测的特异性强,但敏感

性偏低。在疾病的中后期,随着特异性抗体[免疫球蛋白M(immunoglobulin M, IgM)和免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG)]的产生,抗体的检测为疾病的发展和预后提供了重要的线索。临床上已开展9项呼吸道病原体抗体联检项目,其原理是用IFA检测9种呼吸道感染常见病原体的IgM抗体,包括嗜肺军团菌、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。免疫学检测操作简便、成本低,缺点是敏感性低、易漏检,存在窗口期。

2 分子生物学技术

分子生物学技术可快速、准确地识别病原体并及时诊断感染性疾病,与传统的分离培养、涂片检测和免疫学检测等方法学相比有着明显的优势。对于难以分离培养的病毒,可以培养但是生长缓慢的结核分枝杆菌、军团菌以及一些不能常规培养的呼吸道病原体来说,分子生物学技术具有绝对的优势。基于聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)的核酸检测方法多样,其中实时荧光定量PCR法因其可靠性和重复性好,已广泛用于流感、结核病等呼吸系统疾病的诊断。此外,基于等温扩增的快速核酸检测技术以及可以同时检测所有病原体的宏基因组二代测序技术(metagenomics next-generation sequencing, mNGS)近年来发展迅速,革新了呼吸道感染病原体的检测时代。由于临床对核酸检测的要求越来越高,即快速(越快越好)、现场检验(point-of-care testing, POCT)和便携式,近年来一些便携式(快速)微生物分子诊断技术和平台发展迅速。目前,便携式(快速)分子诊断产品已应用于病毒检测,包括呼吸道病毒[流感病毒A/B、呼吸道合胞病毒、新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)]及人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)等;同时也应用于细菌及耐药性检测方面,包括结核分枝杆菌及利福平耐药、常见多重耐药菌、胃肠道病原体A/B群链球菌等。便携式(快速)分子诊断仪器在呼吸道感染病原体中的应用介绍如下。

2.1 基于单个靶标的分子检测平台 首先介绍的是基于GeneXpert快速分子检测平台。GeneXpert MTB/RIF是WHO于2010年批准并推荐的一种用于快速诊断结核病和利福平耐药性的分子检测方法^[8]。然而GeneXpert需要实验室基础设施,包括电力供应,因此不能用于床旁检测。GeneXpert Edge/Omni是新一代的检测平台,可用于床旁检测,旨在供基础设施有限的医疗服

务中心使用。GeneXpert Edge/Omni的特点是单模块设计、触摸平板操作、体积小、重量轻、电池供电,单个样本检测只需 80 min。GeneXpert 平台不仅可以检测结核分枝杆菌,还可以检测艰难梭菌、HIV、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、甲型流感病毒、乙型流感病毒等^[9]。罗氏的 Cobas Liat 平台基于实时 PCR 以及实时逆转录 PCR 检测 DNA 或 RNA 靶标,使用特殊的气压微流控芯片结构,通过空间温控大大加快 PCR 扩增过程,检测时间仅为 15~20 min。Cobas Liat 平台可用于 A 群链球菌、甲型流感病毒、乙型流感病毒、呼吸道合胞病毒的快速检测。尽管在一些技术方面和可移动性上存在一些限制,但 Cobas Liat 仍是得到广泛验证的便携式分子仪器^[9]。还有雅培的 ID Now 平台,与罗氏的 Cobas Liat 平台相似,早期也是用于流感的检测,也可以同时检测呼吸道合胞病毒和 A 群链球菌。其原理基于 Nicking 酶扩增反应技术和恒温扩增技术,不需要复杂的热循环进行 DNA 扩增,可在很窄的温度范围内进行靶标的迅速放大,检测时间仅需 5~13 min。ID Now 平台重量轻,体积小,便于携带,适用于诊所、医院急诊等多种医疗场景^[10]。POCT 快速分子检测平台在减少流感的院内传播中起到了很大的作用^[11]。同样,在当前全球新型冠状病毒肺炎(简称新冠肺炎)疫情的背景下,一些快速的检测平台在疫情防控中也发挥了巨大的作用。出于对疫情防控的要求,多个快速核酸检测试剂盒通过国家应急审批,极大推动了国内分子诊断 POCT 的开发及应用^[12]。如优思达 Easy NET 平台,最初主要用于检测结核分枝杆菌,在新冠肺炎疫情发生以来,该平台增加了 SARS-CoV-2 的检测功能。采用独特的交叉引物恒温扩增实时荧光技术,检测时间为 80~90 min。另外还有圣湘 iPonatic 平台、遂真 LifeReady 1000 系统等,均可用于 SARS-CoV-2 的快速检测,并已在多个医疗机构进行临床比对验证并投入使用。

2.2 呼吸道感染多靶标检测系统 多靶标检测系统可以联合检测多项呼吸道病原体,从而提升呼吸道病原精准鉴别,优化和改进感染性疾病的精准治疗。临床上已注册的联合检测试剂盒有呼吸道病原菌核酸检测试剂盒、六项呼吸道病原体核酸检测试剂盒、七项呼吸道病毒核酸检测试剂盒、三项呼吸道病毒核酸检测试剂盒、13 种呼吸道病原体多重检测等。FilmArray 系统是生物梅里埃公司旗下 Biofire 公司的旗舰产品,与 GeneXpert 类似,FilmArray 多重 PCR 系统也集样品制备、扩增、检测和分析功能于一体,FilmArray 检测

系统是真正的 POCT 产品,并且是美国食品及药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的呼吸道病原体的多重检测系统。FilmArray 检测系统可以同时检测引发呼吸道感染的 20 余种病原靶标,包括冠状病毒、流感病毒、副流感病毒、偏肺病毒、鼻病毒、百日咳杆菌、肺炎衣原体、肺炎支原体等,为准确判断疾病和及时控制疫情争取了时间^[13]。另外一款 FDA 批准的呼吸道病原体的多重检测系统是 eSensor RVP 呼吸道病毒检测系统,可检测甲型流感病毒的不同亚型、乙型流感病毒、呼吸道合胞病毒、偏肺病毒、鼻病毒、腺病毒等 14 个靶标^[14]。而 GenMark 公司的 ePlex RPP 呼吸道病毒检测系统检测的病毒靶标与 eSensor RVP 检测系统相似,可以检测包括肺炎衣原体、肺炎支原体在内的 17 个病原体靶标^[15]。2020 年 GenMark 公司推出了 RP2 Panel(The ePlex® SARS-CoV-2 Test),增加了检测靶标“SARS-CoV-2”。虽未获 FDA 批准,但 FDA 授权其可用于紧急使用。VERIGENE 系统通过 PCR 扩增结合纳米金颗粒标记的探针,与排列在载玻片上的寡核苷酸靶序列进行杂交。探针捕获目标片段后,信号随即放大,从而可用于超灵敏的 DNA 检测。该系统已开发出用于检测 13 种病毒和 3 种细菌靶标的多重呼吸道检测组合且正在申请 FDA 的认证。现有的便携式诊断技术产品各自具有不同的优点和不足,或注重可移动性和环境适应性,或强调快速、短时间获得结果,或侧重高通量多靶标检测。不同特性的产品适合不同的场景。然而需要意识到,在成本控制和质量控制方面仍存在诸多挑战,未来需要更多的性能验证、临床应用评价以及卫生经济学评估,支持便携式分子诊断技术产品性能的持续创新和持续优化。

3 呼吸道传染病病原体快速检测新技术

3.1 mNGS mNGS 能够不依赖于传统的微生物培养,无偏倚性提取标本中全部的核酸进行高通量测序,通过生物信息分析,去除人源序列后,其余序列与病原数据库进行比对,获得疑似致病微生物的种属信息,因而在急危重症、疑难及混合感染诊断方面具有明显的优势^[16]。近年来,在呼吸系统感染诊断方面,mNGS 愈加广泛地应用于病原体物种的鉴定、呼吸道微生物群分析、人类宿主反应分析、耐药基因研究等^[17]。mNGS 对呼吸道感染病原体的检测覆盖面广、信息量大,对呼吸道病原体的早期发现,特别是新发传染病病原体的快速诊断中,起到非常重要的作用,如对 SARS-CoV-2 的认知和检测^[18]。支气管肺泡灌洗液样本的 mNGS 可为肺部感染提供更

准确的诊断信息,并显示不同基础疾病中呼吸道微生物群的变化^[19]。mNGS具有准确性和可靠性高、可提供大量的生物信息、对未知病原确认快、周转时间短等优点,因此,mNGS是解决呼吸道感染问题的重要手段,在临床实践中被广泛接受^[20]。但是由于mNGS检测费用高、人类及外源微生物核酸序列的干扰以及潜在的新耐药基因或突变,故不能取代表型药敏试验。此外,高通量测序结果的分析至关重要,虽然国内已有mNGS用于检测呼吸道病原体的专家共识^[21],但mNGS结果与临床相关性的解释仍然是难点。mNGS往往检出多种微生物,如何判断病原菌与定植菌以及是否为混合感染,需要结合mNGS参数、临床表现、炎症指标、微生物特点、常规培养等综合考虑。

3.2 基于规律间隔成簇短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 的核酸检测技术 CRISPR/CRISPR相关蛋白(CRISPR associated protein, Cas)能够识别高度特异的核酸序列,通过联合高灵敏小型生物传感器运用于感染性疾病中。基于CRISPR/Cas技术发展的分子检测方法具有快速、灵敏、特异、经济等特点,在病原体检测领域发展迅速。目前用于呼吸道病原体检测的主要有CRISPR/Cas9、CRISPR/Cas12和CRISPR/Cas13等系统。张锋团队开发了一种基于CRISPR/Cas13的SHERLOCK技术,为SARS-CoV-2提供了快速准确的诊断方法^[22]。其原理是当Cas13酶与设计合成的SARS-CoV-2靶病毒RNA结合时,Cas13酶激活RNA酶切割活性,导致RNA传感器降解,并产生荧光信号,从而能够检测到该病毒。该技术最后需要将试纸条浸入反应体系中,通过辨识条带位置的不同来确认是否感染SARS-CoV-2^[23]。另外,一项包括肺结核病和肺外结核病病例的队列研究显示,在结核病诊断应用中,CRISPR-MTB检测比培养和GeneXpert MTB/RIF具有更好的诊断性能,成为一种新的肺结核病和肺外结核病诊断技术^[24]。CRISPR的核酸检测技术的缺点包括:(1)离子水平、温度、pH值等诸多因素可能会干扰系统中Cas效应蛋白的切割活性,影响检测结果的可靠性;(2)难以进行病原体的核酸定量分析,适合病原体的核酸定性分析;(3)采集信号的方法受限,且多个检测步骤之间可能存在互相干扰和交叉反应;(4)受到待测样本中病原体靶标浓度的限制,通常CRISPR检测方法仍需结合核酸扩增技术。

3.3 三代测序技术[基于纳米孔(nanopore)] 又称

纳米孔单分子测序技术,核心就是利用一个纳米孔,孔内共价结合有分子接头,将纳米孔蛋白固定在电阻膜上后,再利用动力蛋白牵引核酸穿过纳米孔。由于纳米孔的直径非常细小,仅允许单个碱基通过。4种碱基(A/T/C/G)带电性质不一样,因此不同碱基通过蛋白纳米孔时对电流产生的干扰不同,通过实时监测并解码这些电流信号便可确定碱基序列,从而实现测序^[25]。纳米孔测序技术可实现细菌性下呼吸道感染的快速临床诊断,在6h内即可鉴定出病原菌和耐药基因,有助于减少广谱抗生素的使用^[26]。纳米孔测序还可以同时检测甲型流感和其他呼吸道病毒,识别耐药突变、表征遗传多样性以及发现潜在的院内传播事件^[27]。英国牛津纳米孔技术公司(Oxford Nanopore Technology, ONT)的Minion测序仪依靠使用纳米孔进行测序,是一种手持便携式设备,无需ONT技术人员即可在任何地方安装。因此,Minion手持测序仪是一种有吸引力的快速和现场检测的替代技术。此外,ARTIC与ONT公司携手合作,利用纳米孔实时传递数据的优势,共同开发出8h端到端的快速 workflow,利用这项技术对包括埃博拉、流感和SARS-CoV-2在内的RNA病毒进行测序^[28]。该技术的缺点是存在等位基因变异体难以区分、基因型与表型不一致等弊端,正在研发和完善中。

3.4 基因芯片技术 又称DNA微阵列,基因芯片技术的核心是杂交测序,原理是将一组已知序列的核酸探针固定于基质材料(如玻片、硅片、尼龙膜、微型磁珠等),然后与待分析标记的样品杂交,标记的样品通过与基因芯片上已知碱基序列的核酸片段互补杂交,通过分析荧光强度从而得到样品的遗传信息,确定样品的核酸序列,或对基因表达量及其特性进行分析。基因芯片技术是多种学科交叉的产物,是生物芯片的一种,也是生物芯片技术中发展最成熟、最先进入应用和实现商品化的技术。一项基因芯片技术在基层结核病实验室的大规模评估研究表明,基因芯片检测技术对结核分枝杆菌利福平耐药和异烟肼耐药具有较高的敏感性和特异性。笔者推荐在实验室条件允许的情况下,基因芯片技术可作为利福平和异烟肼常规传统药敏试验的一种更有效、快速、安全和经济的替代方法,是一种值得在我国基层实验室推广使用的方法^[29]。传统的基因芯片技术存在检测灵敏度低、操作步骤繁琐、易污染等缺点,我国研究者研制出了一种新的纳米金复合底物Nanogold-DAB,辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)能够直接催化此

复合底物反应导致大量纳米金颗粒特异沉积,从而建立了一种基于生物芯片的纳米金复合底物的高灵敏、可视化检测方法。同时,创新设计全封闭防污染芯片结构,成功研制了全新的自动化生物芯片检测仪,实现了扩增、杂交、检测和分析一体化。基于可视化生物芯片技术研制的流感病毒分型基因芯片获得了首个可视化生物芯片产品的注册证书。此外,有研究展示了一种全印刷纳米光子生物芯片,该技术结合集成芯片和光子晶体纳米结构增强荧光的特点,可以在 10 min 内对 SARS-CoV-2 的 N 蛋白进行快速床旁检测。随着纳米光子结构和理论的进一步探索,以及印刷技术的不断改进,纳米光子生物芯片将发展成为一种便携式、低成本、高效的检测方法,用于微量样品中生物标志物的 POCT 检测^[30]。

4 总结与展望

传统呼吸道病原体检测手段如培养、涂片因敏感性和时效性差,常导致临床诊断和治疗用药难。呼吸道感染多联检产品时效性高,可及早识别感染,并指导抗感染药物的合理使用。各种便携式(快速)诊断技术产品发展迅速,临床应用前景广阔,适用于诊所、医院急诊等多种医疗场所,但是仍需进行一系列的性能验证、临床应用评价以及卫生经济学评估。mNGS 对呼吸道感染病原体的检测覆盖面广、信息量大,已广泛应用于临床。mNGS 对呼吸道病原体的早期发现,特别是新发传染病的病原体快速诊断以及急危重症、疑难及混合感染诊断方面具有明显的优势,但 mNGS 的测序结果与临床相关性的解释仍然是难点。在未来,一些新的快速检测技术,如基于 CRISPR 的核酸检测技术、三代测序技术及基因芯片技术是趋势,也是挑战。只有将传统的培养、涂片等方法与各种分子生物学方法相结合,才能优势互补,从而达到快速而准确地识别呼吸道病原体的临床目标。

参考文献

[1] The top 10 causes of death. 2020[EB/OL]. [2020-12-09]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.

[2] Jain S, Self WH, Wunderink RG, et al. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U. S. adults[J]. *N Engl J Med*, 2015,373(5):415-427.

[3] Garcin F, Leone M, Antonini F, et al. Non-adherence to guidelines: an avoidable cause of failure of empirical antimicrobial therapy in the presence of difficult-to-treat bacteria[J]. *Intensive Care Med*, 2010, 36(1):75-82.

[4] Lim WS, Baudouin SV, George RC, et al. BTS guidelines for the management of community acquired pneumonia in adults; update 2009[J]. *Thorax*, 2009,64 Suppl 3:iii1-iii55.

[5] Wilson MR, Naccache SN, Samayoa E, et al. Actionable diagnosis of neuroleptospirosis by next-generation sequencing[J]. *N Engl J Med*, 2014,370(25):2408-2417.

[6] Wang J, Liu F, Tartari E, et al. The prevalence of healthcare-associated infections in mainland China: a systematic review and meta-analysis [J]. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2018,39(6):701-709.

[7] Chen X, Cao K, Wei Y, et al. Metagenomic next-generation sequencing in the diagnosis of severe pneumonias caused by *Chlamydia psittaci* [J]. *Infection*, 2020,48(4):535-542.

[8] Release N. WHO endorses new rapid tuberculosis test. 2010[EB/OL]. [2010-12-13]. <https://www.who.int/news/item/13-12-2010-who-endorses-new-rapid-tuberculosis-test>.

[9] Zidovec Lepej S, Poljak M. Portable molecular diagnostic instruments in microbiology: current status[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2020,26(4):411-420.

[10] ID NOW™[EB/OL]. <https://www.alere.com/en/home/product-details/idnow.html>.

[11] Youngs J, Marshall B, Farragher M, et al. Implementation of influenza point-of-care testing and patient cohorting during a high-incidence season: a retrospective analysis of impact on infection prevention and control and clinical outcomes[J]. *J Hosp Infect*, 2019,101(3):276-284.

[12] Loeffelholz MJ, Tang YW. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections—the state of the art[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020,9(1):747-756.

[13] Poritz MA, Blaschke AJ, Byington CL, et al. FilmArray, an automated nested multiplex PCR system for multi-pathogen detection: development and application to respiratory tract infection[J]. *PLoS One*, 2011,6(10):e26047.

[14] Pierce VM, Hodinka RL. Comparison of the GenMark Diagnostics eSensor respiratory viral panel to real-time PCR for detection of respiratory viruses in children[J]. *J Clin Microbiol*, 2012,50(11):3458-3465.

[15] Steiner F, Schmutz S, Gosert R, et al. Usefulness of the GenMark ePlex RPP assay for the detection of respiratory viruses compared to the FTD21 multiplex RT-PCR[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2021, 101(1):115424.

[16] Wang J, Han Y, Feng J. Metagenomic next-generation sequencing for mixed pulmonary infection diagnosis[J]. *BMC Pulm Med*, 2019, 19(1):252.

[17] Diao Z, Han D, Zhang R, et al. Metagenomics next-generation sequencing tests take the stage in the diagnosis of lower respiratory tract infections[J]. *J Adv Res*, 2021,38:201-212.

[18] Mostafa HH, Fissel JA, Fanelli B, et al. Metagenomic next-generation sequencing of nasopharyngeal specimens collected from confirmed and suspect COVID-19 patients[J]. *mBio*, 2020,11(6):e01969-20.

[19] Chen Y, Feng W, Ye K, et al. Application of metagenomic next-generation sequencing in the diagnosis of pulmonary infectious pathogens from bronchoalveolar lavage samples [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021,11:541092.

[20] 孙波,郑光辉,高阳,等.宏基因组技术在感染性疾病中的应用[J]. *中国临床新医学*, 2021,14(1):19-22.

- [21] 瞿介明,施毅.中国成人医院获得性肺炎与呼吸机相关性肺炎诊断和治疗指南(2018年版)的更新与解读[J].中华结核和呼吸杂志,2018,41(4):244-246.
- [22] Kellner MJ, Koob JG, Gootenberg JS, et al. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases[J]. Nat Protoc, 2019,14(10):2986-3012.
- [23] Verma MK, Roychowdhury S, Sahu BD, et al. CRISPR-based point-of-care diagnostics incorporating Cas9, Cas12, and Cas13 enzymes advanced for SARS-CoV-2 detection[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2022,36(8):e23113.
- [24] Ai JW, Zhou X, Xu T, et al. CRISPR-based rapid and ultra-sensitive diagnostic test for Mycobacterium tuberculosis[J]. Emerg Microbes Infect, 2019,8(1):1361-1369.
- [25] Jain M, Olsen HE, Paten B, et al. The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community[J]. Genome Biol, 2016,17(1):239.
- [26] Charalampous T, Kay GL, Richardson H, et al. Nanopore metagenomics enables rapid clinical diagnosis of bacterial lower respiratory infection[J]. Nat Biotechnol, 2019,37(7):783-792.
- [27] Xu Y, Lewandowski K, Downs LO, et al. Nanopore metagenomic sequencing of influenza virus directly from respiratory samples: diagnosis, drug resistance and nosocomial transmission, United Kingdom, 2018/19 influenza season[J]. Euro Surveill, 2021,26(27):2000004.
- [28] Arévalo MT, Karavis MA, Katoski SE, et al. A rapid, whole genome sequencing assay for detection and characterization of novel coronavirus(SARS-CoV-2) clinical specimens using nanopore sequencing[J]. Front Microbiol, 2022,13:910955.
- [29] Pang Y, Xia H, Zhang Z, et al. Multicenter evaluation of genechip for detection of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis[J]. J Clin Microbiol, 2013,51(6):1707-1713.
- [30] Chi J, Wu D, Su M, et al. All-printed nanophotonic biochip for point-of-care testing of biomarkers[J]. Sci Bull(Beijing), 2022,67(12):1191-1193.

[收稿日期 2022-08-16][本文编辑 吕文娟 余军]

本文引用格式

陈舒影,余方友.呼吸道感染病原体检测技术与发展趋势[J].中国临床新医学,2022,15(10):894-899.