

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2020.07.12

# 慢性阻塞性肺疾病急性加重期病原学检测研究进展\*

王一轩, 张爱萍, 魏琳, 钱志强, 李为春(南京中医药大学附属泰州市姜堰中医院呼吸内科, 江苏泰州 225500)

**摘要:** 细菌/病毒感染是慢性阻塞性肺疾病急性加重(acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease, AECOPD) 最重要的原因之一。如何快速准确地诊断 AECOPD 患者所感染的病原微生物种类, 对及时、针对性的临床用药具有指导意义。传统微生物检测方法具有诸多方面的局限; 而分子生物学检测技术发展方兴未艾。基于 PCR 的核酸分子扩增检测能够快速定量检测目标病原体基因, 其敏感性、特异性均较高。随着二代测序技术的发展, 为呼吸道微生物检测带来了重大变革, 该技术能同时测定多个病原体的保守基因序列, 致使对呼吸道微生物群落特点的研究达到前所未有的广度和深度。近年来, 传统检测方法持续改良, 分子检测技术不断创新, 并且通过多种检测手段的优化组合, 为 AECOPD 病原学诊断提供更全面准确的信息。同时, 对于下呼吸道微生物组学的研究有望揭示 AECOPD 反复发生的原因, 为其临床诊疗提供新的依据。

**关键词:** 病原学诊断; 分子诊断; 二代测序; 慢性阻塞性肺疾病急性加重

**中图分类号:** R446; R563

**文献标志码:** A

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种常见的呼吸系统慢性疾病, 其发病率和死亡率均较高。COPD 急性加重(AECOPD) 是导致患者反复住院及肺功能减退的重要原因, 感染是其反复加重的主要因素, 且随病情进展, 长期反复使用抗生素, 导致患者感染病原学种类改变, 耐药率增加, 故而明确诊断导致感染的病原微生物种类在 AECOPD 治疗中具有积极的意义, 可以缩短病程, 减少肺功能损伤程度, 提高生活质量。常规微生物学检验方法如微生物培养、尿病原体抗原检测等简便、普及性高, 但受到时效性、敏感性、标本运输处理、分离培养条件等影响, 其临床应用具有一定的局限性。近年来, 随着分子生物学检测技术的发展, 使得快速定量检测 AECOPD 相关病原体成为了可能, 将二者合理联合使用对改善 AECOPD 诊疗及预后具有重要的临床意义。

## 1 AECOPD 流行病学调查

一项针对我国 7 个不同地区共计 20 245 名成人的调查发现, 40 岁以上人群 COPD 患病率达 8.2%, COPD 患者平均每人/每年急性加重 0.5~3.5 次, AECOPD 及其并发症是患者医疗花费巨大以及死亡的主要原因<sup>[1]</sup>。AECOPD 对患者肺功能损害、生活质量下降和社会负担具有严重的负面影响。AECOPD 诱因众多, 上呼吸道感染及空气污染加重气道炎症为主要诱因, 进而继发下呼吸道及肺部的感染, 约 78% 的 AECOPD 患者可发现明确的细菌或病毒感染的证据, 此外, 还包括手术、气胸、肺栓塞、心力衰竭、心律失常、环境污染、吸烟、吸入性过敏原及使用镇静药等诱因<sup>[1]</sup>。

## 2 AECOPD 病原学诊断的临床价值

由于 AECOPD 患者反复发生急性加重, 且长期使用抗生素、激素及住院治疗, 甚至因严重气流受限和(或)使用机械通气, 导致多种细菌感染, 并出现抗菌药物耐药。研究表明, AECOPD 患者痰培养以革兰阴性菌为主, 前 3 位菌株依次为

大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌<sup>[2]</sup>。革兰阴性菌对呼吸黏膜的定植性较强, 极易出现耐药, 并易引起呼吸系统感染, 同时发现不同肺功能时期病原菌的分布不同, 肺功能越差的患者感染铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、真菌的几率越高<sup>[3-6]</sup>。因此, 对于 AECOPD 患者治疗的关键是如何快速找到致病菌, 恰当合理的应用抗生素, 使患者得到及时有效的治疗, 达到病情快速控制目标, 以及缩短病程, 减少肺功能损害, 改善预后的目的。

## 3 AECOPD 诊断常用检测方法

AECOPD 常用的微生物学检查方法包括痰涂片、痰及肺泡灌洗液培养、军团菌及肺炎链球菌尿抗原检测、直接免疫荧光抗体检测、非典型病原体血清抗体或核酸筛查等。分子生物学检测法包括: PCR、实时荧光定量 PCR(real time-PCR)、多重 PCR、多重 real time-PCR、基因芯片技术、液相芯片(微球体悬浮芯片)技术、标本 16S rRNA 基因 PCR 和测序检测技术等。目前, 多重病原学检测技术已成为该领域研究热点之一, 多重 PCR、多重 RT-PCR、基因芯片技术、液相芯片技术以及高通量测序技术等已成功应用于临床检测。因此, 快速病原体核酸分子检测有望为 AECOPD 抗感染治疗时抗生素的选择提供精确指导。

**3.1 传统病原学检测** AECOPD 传统的微生物检测包括痰涂片、痰培养、抗酸染色等, 仍是目前临床上 AECOPD 病原学检验的常规方法, 其具有费用少、易普及等优势, 且可作为其他病原学检测方法评价的标准。目前临床最易获得的样本是来自患者咳出的痰标本, 但痰中存在大量定植于上呼吸道的细菌, 因此如何避免标本污染对获得临床可信的结果至关重要<sup>[7]</sup>。临床医师应嘱托患者掌握留取标本方法, 晨起刷牙漱口后, 深咳留取深部痰液, 避免口水, 减少上呼吸道定植菌污染可能; 痰少者可行雾化浓盐水诱导痰培养, 并及时送检, 如超过 1 h 则可能由于细菌溶解死亡导致检出率下降。

**3.1.1 痰涂片** 该法为传统病原学检测中最经典的方法, 简

\* 基金项目: 泰州市第五期“311 高层次人才培养工程”项目。

作者简介: 王一轩, 1987 年生, 男, 硕士, 主治中医师, 主要从事呼吸系统疾病的分子生物学研究。

通信作者: 李为春, 主任医师, E-mail: chun188199@163.com。

单、方便、直接,对临床诊断及治疗具有指导意义。对采集至呼吸道的分泌物直接涂片,行革兰染色镜检,约半小时后即可报告结果,并能提示所感染的细菌性质为球菌或杆菌,是革兰氏阳性细菌或是革兰氏阴性细菌。通过获得细菌的形态学与染色特点,并结合临床症状及标本采集部位,初步判定是哪类细菌,可为临床在疾病早期合理用药提供依据,也为下一步选用培养基及细菌鉴定做准备。通过有针对性选用相应培养基接种标本,可缩短细菌鉴定时间,避免盲目选择培养基。此外,痰涂片标本是否合格对痰培养也有较好的预测作用,研究发现,合格的痰涂片结果与痰培养结果符合率约为 80%<sup>[8]</sup>。临床常用于评估痰标本质量的方法是分析镜下痰细胞成分的组成比例,一般合格的痰标本要求鳞状上皮细胞小于 10 个/低倍视野,白细胞大于 25 个/低倍视野;或二者比例小于 1:2.5,分离培养前行革兰氏染色,确定标本质量。

**3.1.2 培养法** AECOPD 可选择合格痰培养、诱导痰培养、气管内吸引痰培养、经纤维支气管镜下采集灌洗液培养、经纤维支气管镜采用带套管的防污染毛刷刷检等;呼吸道常见定植菌的半定量培养对于判断培养结果是否与临床相关是有利的,若是培养定量偏低,那么可能缺乏临床意义。不同类型标本培养菌落的诊断阈值一般不同:如合格痰分离致病菌培养 $\geq 10^7$  菌落形成单位(CFU/mL),支气管肺泡灌洗液培养 $\geq 10^5$  CFU/mL,气管插管内吸引物培养 $\geq 10^6$  CFU/mL<sup>[9]</sup>,超过相应诊断阈值可能与该种病原菌感染有关。研究显示,在发生肺炎时可能病原菌的增长量低于常规阈值量;尤其在某些特殊病原体感染,数量不论高低,一旦检出均认为是致病菌,如结核杆菌、鼠疫耶尔森菌、军团菌等<sup>[10]</sup>。另外,培养法可进行药敏试验,从而为临床针对性的合理用药提供依据。然而培养法操作相对复杂,且一些病原菌需要苛刻的培养条件,或使用特殊培养基进行培养;另有一些病原体培养困难、周期较长;且下呼吸道标本细菌的种类、数量、部位分布不均,取样易产生误差,从而使检测阳性率偏低;而口咽定植菌的污染也可出现假阳性的结果<sup>[11]</sup>。此外,由于目前抗生素仍存在滥用情况,而留取痰标本前的抗生素使用对培养检出率具有较大影响。

**3.1.3 针对结核杆菌的常规检测** AECOPD 患者由于长期使用激素及肺组织结构损伤改变,导致结核杆菌感染率逐年增加,因此,针对结核杆菌的检测显得尤为重要,目前主要检测手段有痰涂片抗酸染色、结核抗体试验、荧光 PCR、结核感染 T 细胞检测(T-SPOT.TB),检测敏感性分别为 11.46%、38.54%、44.80% 和 93.75%,特异性分别为 98.96%、94.64%、82.14%、91.10%,准确性分别为 43.42%、59.21%、58.55%、92.76%,每种方法均有各自的优缺点,综合评价结果表明,T-SPOT.TB 检测方法优于其他 3 种检测方法<sup>[12]</sup>。而临床工作中可将多种检测方法联合使用,以提高结核杆菌感染的诊断率。

**3.2 尿抗原检测** 主要对特定病原体如肺炎链球菌、军团菌 I 型等相应尿抗原检测,优势在于标本采集简便,诊断敏感性和特异性高,即使在抗菌药物治疗后,病原体仍可被检出。

**3.2.1 军团菌尿抗原检测** 军团菌感染诊断的金标准为培养出军团菌,但培养阳性偏低,且受前期使用抗生素影响较大。自 1979 年军团菌抗原从确诊的军团菌感染患者尿液中

被检出以来,军团菌尿抗原检测技术也日益改进,目前广泛使用的检测方法为酶免疫检测法及免疫层析法。军团菌尿抗原检测敏感性达 96%,特异性达 99.9%<sup>[13]</sup>,且不受先前使用抗生素的影响,可用于军团菌早期感染的快速检测。但该方法只能检测嗜肺军团菌血清型 I 型,不能检测其他类型的嗜肺军团菌及非嗜肺军团菌的感染。此外,由嗜肺军团菌引起的感染约占军团菌总感染的 90%,且 95% 以上为嗜肺军团菌血清型 I 型,因此该法仍有重要的临床价值<sup>[14]</sup>。

**3.2.2 肺炎链球菌尿抗原检测** 原理是通过免疫层析法检测肺炎链球菌荚膜多糖抗原,该抗原为可溶性抗原,可以随尿液排出,无论患者血液中是否有严重肺炎链球菌感染,均可检测。该方法简便,且敏感性高、特异性好。有学者证实,肺炎链球菌尿抗原检测肺炎链球菌感染的敏感性和特异性分别为 73.1% 和 91.9%<sup>[15]</sup>,但其敏感性与菌株血清型相关。此外,该法几乎不影响住院患者抗感染治疗方案的制定与选择<sup>[16]</sup>。

**3.3 血清学抗体检测法** 该法对于肺部感染的诊断具有重要意义,尤其在一些特殊情况,例如少痰、无痰或无法采集痰培养标本的 AECOPD 患者,以及传统培养基不易或不能培养的非典型致病菌的感染,采用该法具有明显的优越性。临床常用方法包括微量凝集法、补体结合试验、免疫色谱测定、间接免疫荧光法及酶联免疫法等。临床上已有可检测腺病毒、副流感病毒、甲流、乙流、呼吸道合胞病毒、嗜肺军团菌、衣原体、支原体、立克次体等病原体检测试剂盒<sup>[17]</sup>。该试剂盒采集发生肺部感染时和感染后 2~4 周内的患者血清,通过对比急性期与恢复期的血清抗体滴度变化进行诊断,可用于流行病学调查与回顾性研究。然而,血清抗体的检出可能出现时间上的延迟,如军团菌血清学快速检测中只有约 50% 的患者在最初 2 周内检测到抗体。因而,此法对疾病早期诊断及早期用药的指导价值存在一定局限性<sup>[18]</sup>。

**3.4 质谱技术** 该技术已在临床应用了几十年,但直到 1980 年才初步用于细菌检测,此后随着基质辅助激光解吸电离(MALDI)、电喷雾电离(ESI)等软电离技术的出现得到进一步发展,并组成了基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS),从而更适合微生物生物大分子的分析<sup>[19]</sup>。AECOPD 患者可选用痰液或肺泡灌洗液等标本进行微生物过夜分离培养后获得菌落,将其菌落进行 MALDI-TOF MS 分析,每个样本分析时间只需几秒钟;与传统方法相比,该法可实现对未知微生物的快速鉴定、分型及毒力检测,具有操作简便、快速、敏感性和特异性高、易于自动化等优点。然而,该技术目前还不够完善,如难以定量,对细菌耐药性及耐药机制检测的能力有限,无法鉴定混合菌,对于报告的结果亦缺乏统一的验证和解释。此外, MALDI-TOF MS 对一些进化比较接近、蛋白质表达相似的细菌辨别较困难,例如无法将志贺菌、O157 型大肠埃希菌与普通大肠埃希菌相鉴别,也不能将肺炎链球菌与轻型链球菌或口腔链球菌区分开。同时,目前该技术缺乏不常见微生物相应的数据库,且在不同环境下微生物蛋白质表达不同,丰度亦不同,所以需要对其程序进一步标化和再评价,以保证感染性疾病诊断中的实际应用。

**3.5 AECOPD 分子诊断技术**

**3.5.1 第一代测序技术** 该技术采用针对目标病原体的特



定引物进行扩增,继而通过 Sanger 测序获得序列信息对微生物进行鉴定,与传统培养法比较具有敏感性高,特异性好的特点,因其不受抗菌药物治疗的影响,对致病菌早期感染的诊断亦具有较高价值。此法可检测痰、鼻咽分泌物、胸水、肺泡灌洗液、肺组织活检等标本。理论上第一代测序技术可对所有呼吸道中存在的菌种进行检测,尤其对某些难以培养或需要特殊培养病原体的检测优势明显,相较于传统培养法,其敏感性及其特异性均较高。由于该技术属于定性检测,一般对于非正常呼吸道的定植菌,如嗜肺军团菌、结核杆菌等,若 PCR 结果阳性且排除污染可能,即可确诊为某病原菌感染。然而对于一些常见呼吸道的定植菌,如卡他莫拉菌、肺炎链球菌等,即使 PCR 检测结果为阳性,临床也无法确定是定植菌或是致病菌感染<sup>[20]</sup>。因此,该缺陷限制了第一代测序技术的临床普及与运用。实验操作中易出现污染导致结果假阳性,也是其难以推广的因素。另外,花费大,获得数据量少,不能满足未知样本测序的要求,用于含多种不同微生物的复杂临床标本时不可靠,这些缺点也影响了其进一步的临床应用。

**3.5.2 多重 PCR 及基因芯片技术** 该技术是在传统 PCR 技术基础上,在同一个反应体系中,通过采用多对特异性引物,对多种不同的 DNA 片段同时进行扩增。与传统 PCR 相比,该法可节约试剂与样本用量、降低检测成本;同时节省劳力、缩短检测时间、提高工作效率。而基因芯片技术与传统 PCR 技术相比,其一份标本仅需一次 PCR 反应即可获得多种病原体信息,具有通量高、速度快、特异性高的优势<sup>[21]</sup>。目前已研发可用于多种呼吸道微生物感染检测的基因芯片,包括链球菌、百日咳杆菌、肺炎衣原体、肺炎支原体及 9 种呼吸道感染相关病毒<sup>[22]</sup>。其优势是可针对常见致病菌快速检测,缺点是不能覆盖其他未制备基因芯片信息的少见致病菌感染,检测亦不能精确到耐药基因检测,对临床上使用药物指导有限<sup>[23]</sup>。

**3.5.3 16S rRNA 基因测序** 16S rRNA 具有细菌进化上序列保守性和特异性的特点,可作为微生物检测、鉴定与分类的标记基因。目前已有研究采用该技术进行包括 COPD 急性加重 (ECOPD) 等多种呼吸道感染性疾病的细菌鉴定<sup>[24]</sup>。结合 PCR 技术,16S rRNA 测序可用于估计呼吸道样本的微生物负荷,结果与传统的定量培养相一致<sup>[25]</sup>,亦可用于研究呼吸道微生物菌群的多样性以及构成。过去认为健康人下呼吸道为无菌环境,然而随着测序技术的发展,越来越多的证据表明,人类下呼吸道存在微生物定植,且下呼吸道微生物组学的变化与 COPD 的发生、发展具有密切的关系<sup>[26]</sup>。这改变了既往认为呼吸道感染仅由单一致病菌引起的认知,也对评估疾病的进展、治疗效果及指导合理使用抗生素具有重要意义。虽然与传统培养方法相比,16S rRNA 测序可检测到更广的多重病原菌谱,但其应用可能会受到 16S rDNA 扩增过程中所产生的竞争性抑制的影响,从而导致结果出现假阴性。此外,细菌 DNA 提取过程中,因溶菌酶溶液含有外源性细菌 DNA 或操作过程中的污染也可导致假阳性结果<sup>[27]</sup>。

**3.5.4 宏基因组二代测序技术** 该法可直接提取标本中所含全部核酸片段并进行检测,经生物信息学分析即可鉴定标本中所含核酸序列的种类,同时可获得病原体序列数、覆盖度等定量分析数据。使用二代测序技术时,标本无须在检测前

培养,避免了难以培养病原微生物的漏检;可直接非特异性的测定全部核酸片段序列,无须预先选定检测范围,最大程度避免漏检,并对患者感染状态进行评估及随访<sup>[28]</sup>。16S rRNA 基因测序虽然是非培养的检测手段,但因存在预先设计引物的弊端,难以发现潜在的病原体,不能全面评估病原体的组成。随着宏基因组二代测序技术的兴起,理论上可检测出标本中所有的病原体,特别是复杂感染性疾病中少见、不典型或新发的病原体,敏感性和准确性高,检测时间短。口腔作为某些下呼吸道感染病原体的定植场所,口腔分泌物吸入与 AECOPD 等肺部微生物的感染密切相关。口腔中可能定植厌氧菌,过去肺部感染中厌氧菌的培养与鉴定往往被忽视,宏基因组二代测序技术的使用使得人们对厌氧菌引起 AECOPD 等肺部感染有了新的认识<sup>[29]</sup>。与培养相比,该技术虽有多种优势,但也存在一定的局限性,如无法对检出的病原体进行药敏试验。另一个局限是检出结果难以区分感染或定植与污染的微生物<sup>[30]</sup>。此外,检测价格昂贵亦是限制二代测序技术推广的重要因素。

#### 4 小结及展望

AECOPD 长期反复使用抗生素、激素及机械通气等导致其感染的致病菌与普通社区获得性肺炎感染致病菌相差较大,其以肺炎克雷伯、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌等革兰氏阴性杆菌为主,存在少见菌株、混合菌感染甚至真菌感染可能,此类病原体生长速度缓慢以及苛刻的培养条件,导致传统培养阳性率低,造成患者治疗时机延误及住院时间延长,病死率也大大增加。因此核酸分子诊断作为有效补充,对常规检测阴性的标本具有重要的意义,而宏基因组二代测序技术较其他核酸检测方法具有速度快、敏感性高、特异性高、无偏性较好、价格相对低廉等特点。但是目前二代测序缺乏公认的判断标准、耐药基因难以检测以及测序结果与治疗关系尚不完全明确,也缺乏与传统方法之间大规模的比较验证。随着技术的发展,当宏基因组二代测序技术检出的病原体基因覆盖率足够高时,可进行耐药基因的检测。基于目前条件可通过二代测序技术迅速获得 AECOPD 患者感染的致病菌种,结合本院既往药敏,经验性选择抗生素,且能指导培养基选择,并通过培养进一步证实并明确药敏,必要时可针对性调整抗生素,随着基因测序发展,耐药基因亦能得到检测,届时其可更好地指导复杂感染性疾病的抗生素使用,弥补因传统阳性率低,培养时间长导致病情延误或进展,从而达到缩短病程,减少住院时间,使 COPD 患者更早的得到针对性治疗而获益。此外,随着第三、第四代测序技术的发展,未来几年中采用基因测序检测病原体的成本将大大降低,有助于推动其临床的广泛应用。

#### 5 参考文献

- [1]程黎,李福祥,于新玉,等.血清降钙素原水平对慢性阻塞性肺疾病的诊断价值[J].中国老年学杂志,2019,39(9):4742-4744.
- [2]裴琦,刘霄,刘敬禹,等.重度慢性阻塞性肺疾病患者下呼吸道多药耐药菌感染的临床特点及病原学分析[J].中华医院感染学杂志,2014,24(5):1152-1154.
- [3]陈丽,杜永亮,徐永红,等.慢性阻塞性肺疾病患者医院感染病原学特征与危险因素分析[J].中华医院感染学杂志,2015,25(10):2253-2255.

- [4] 贾晶晶, 唐西怀, 殷娟. 慢性阻塞性肺疾病患者肺部感染的病原学及危险因素研究[J]. 临床肺科杂志, 2019, 24(3): 477-480.
- [5] 赵美芳, 宋昱晨, 王月花. 慢性阻塞性肺疾病并发肺部感染的影响因素与病原学检测分析[J]. 中国预防医学杂志, 2017, 18(4): 303-306.
- [6] Sun Z, Zhu QL, Shen Y, *et al.* Dynamic changes of gut and lung microorganisms during chronic obstructive pulmonary disease exacerbations[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2020, 36(2): 107-113.
- [7] 赵文艳. 口腔内呼吸道需氧致病菌定植与老年院内获得性肺炎相关性的临床研究[D]. 北京: 首都医科大学, 2013.
- [8] Pagano L, Girmenia C, Mele L, *et al.* Infections caused by filamentous fungi in patients with hematologic malignancies. A report of 391 cases by GIMEMA Infection Program[J]. *Haematologica*, 2001, 86(8): 862-870.
- [9] 陈灏珠, 林果为, 王吉耀. 实用内科学[M]. 第14版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 1729-1730.
- [10] Niederman MS. The argument against using quantitative cultures in clinical trials and the management of ventilator-associated pneumonia[J]. *Clin Infect Dis*, 2010, 51: S93-S99.
- [11] 李筱妍, 许建英. 痰定量及定性细菌培养在慢性阻塞性肺疾病急性加重期病原学诊断中的价值[J]. 中国药物与临床, 2009, 9(10): 1012-1013.
- [12] 秦庆, 胡瑛, 吕永强. 痰涂片抗酸染色、结核抗体试验、荧光PCR、T-SPOT.TB在肺结核诊断中的临床意义[J]. 中国医药科学, 2017, 7(21): 130-133.
- [13] Chen DJ, Procop GW, Vogel S, *et al.* Utility of PCR, Culture, and Antigen Detection Methods for Diagnosis of Legionellosis[J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(11): 3474-3477.
- [14] 鲁曦, 李王平, 李春梦, 等. 嗜肺军团菌致病机制及快速检测最新研究进展[J]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2018, 11(1): 101-104.
- [15] 张昭勇, 杨宏伟, 张吉才. 尿抗原检测联合痰革兰染色诊断儿童肺炎链球菌肺炎[J]. 临床误诊误治, 2017, 30(12): 87-89.
- [16] Laijen W, Snijders D, Boersma WG. Pneumococcal urinary antigen test: diagnostic yield and impact on antibiotic treatment[J]. *Clin Respir J*, 2017, 11(6): 999-1005.
- [17] 王丽, 周光, 王磊利, 等. 2013-2016年14383例呼吸道感染患者9种病原体IgM抗体检测结果分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(17): 2579-2582.
- [18] Elverdal PL, Sværrer CW, Jørgensen CS, *et al.* Development and validation of ELISA for detection of antibodies to *Legionella pneumophila* serogroup 1, 3 and 6 in human sera[J]. *J Microbiol Methods*, 2011, 86(3): 298-303.
- [19] 杭亚平, 胡龙华, 王小中. 质谱技术在感染性疾病诊断中的应用进展[J]. 实验与检验医学, 2014, 32(1): 1-4.
- [20] Lodes MJ, Suci D, Wilmoth JL, *et al.* Identification of upper respiratory tract pathogens using electrochemical detection on an oligonucleotide microarray[J]. *PLoS One*, 2007, 2(9): e924.
- [21] Ko FW, Chan PK, Chan RWY, *et al.* Molecular detection of respiratory pathogens and typing of human rhinovirus of adults hospitalized for exacerbation of asthma and chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Respir Res*, 2019, 20(1): 210.
- [22] Naito K, Yamasaki K, Yatera K, *et al.* Bacteriological incidence in pneumonia patients with pulmonary emphysema; a bacterial floral analysis using the 16S ribosomal RNA gene in bronchoalveolar lavage fluid[J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2017, 12: 2111-2120.
- [23] Alotaibi NM, Chen V, Hollander Z, *et al.* Phenotyping and outcomes of hospitalized COPD patients using rapid molecular diagnostics on sputum samples[J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2019, 14: 311-319.
- [24] Abayasekara LM, Perera J, Chandrasekharan V, *et al.* Detection of bacterial pathogens from clinical specimens using conventional microbial culture and 16S metagenomics: a comparative study[J]. *BMC Infect Dis*, 2017, 17(1): 631.
- [25] Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, *et al.* Changes in the lung microbiome following lung transplantation include the emergence of two distinct *Pseudomonas* species with distinct clinical associations[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97214.
- [26] Chung KF. Airway microbial dysbiosis in asthmatic patients: A target for prevention and treatment[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 139(4): 1071-1081.
- [27] 刘东. 16S rDNA PCR-DGGE结合测序技术在新生儿肠道微生态及败血症病原检测中的应用[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2014.
- [28] 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.
- [29] 李冰, 缪青, 金文婷, 等. 宏基因组二代测序技术对厌氧菌感染精准化诊断的临床价值[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(13): 1927-1930.
- [30] Forbes JD, Knox NC, Peterson CL, *et al.* Highlighting clinical metagenomics for enhanced diagnostic decision-making: a step towards wider implementation[J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2018, 16: 108-120.

(收稿日期: 2020-04-07)

(本文编辑: 许晓蒙)