

呼吸道感染病原体检测技术新进展

董玉琳, 郭骏戈, 许丽虹, 王胜虎

昆明医科大学附属延安医院医学检验科, 云南 昆明 650051

摘要 : 呼吸道感染是全球范围内常见的健康问题, 其引发的疾病给人类健康和社会经济都带来了巨大负担。在这一领域, 病原体检测技术的不断创新和发展对于早期诊断、个体化治疗具有至关重要的意义。本文综述了近年来呼吸道感染及相关疾病病原体检测技术的新进展, 包括分子生物学方法、免疫学技术以及基于纳米技术、基因编辑技术的检测方法等, 并探讨了这些新技术在临床实践中的应用前景。

关键词 : 呼吸道感染; 病原体检测技术; 新进展

New progress in pathogen detection technology for respiratory tract infections

Dong Yulin, Guo Junge, Xu Lihong, Wang Shenghu

Medical Laboratory Department of Yan'an Hospital Affiliated to Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650051

Abstract : Respiratory tract infections are common health problems worldwide, and the diseases they cause impose a huge burden on both human health and socioeconomics. In this field, the continuous innovation and development of pathogen detection technology is of vital significance for early diagnosis and individualized treatment. This paper reviews the new advances in pathogen detection technologies for respiratory infections and related diseases in recent years, including molecular biology methods, immunological techniques, and detection methods based on nanotechnology and gene editing technology, and discusses the prospects for the application of these new technologies in clinical practice.

Key words : respiratory tract infections; pathogen detection technology; new advances

呼吸道感染是由多种不同的病原体引发的疾病, 包括病毒、细菌、真菌等。常见的包括流感、鼻炎、支气管炎等。呼吸道感染病原学复杂, 这些感染不仅对个体健康造成威胁, 还会引发传染性疾病的爆发。精准的病原学分析不仅是确诊依据, 也是合理选择治疗方案的基础。及早准确地检测呼吸道感染的病原体对于疾病的预防、控制和治疗至关重要。

一、检测方法在呼吸道感染病原体检测中的应用

(一) 分子生物学方法的应用:

1. 聚合酶链式反应 (PCR) 及其变种实时荧光定量 PCR (qPCR) 等分子生物学方法具有高灵敏度和特异性, 能够快速、准确地检测到呼吸道感染病原体的核酸序列。PCR 技术利用特定引物扩增目标 DNA 序列, 而 qPCR 则结合了 PCR 扩增与实时荧光检测, 可实现对扩增产物的实时定量分析。这两种方法在呼吸道病原体检测中具有高度的敏感性和特异性, 能够快速准确地检测多种病原体, 包括病毒、细菌和真菌等。其优势在于快速性、高效性和精确性, 有助于早期诊断和治疗的进行。此外, qPCR 还具有更高的定量能力, 能够准确测量目标 DNA 的数量, 有利于病原体负荷的监测和治疗效果的评估。因此, PCR 和 qPCR 技术在呼吸道病原体检测中被广泛应用, 并持续得到改进和优化, 以提高其检测的灵敏度、准确性和快速性^[1,2]。

2. 基于 PCR 的多重扩增技术 (Multiplex PCR) 能够同时检测多种病原体, 提高了检测效率和诊断准确性。该技术能同时检测多种病原体, 提高了检测效率和资源利用率。通过引入多个引

物对不同的病原体 DNA 进行扩增, Multiplex PCR 能够在单次反应中完成对多个目标的检测。这种方法具有快速、高效、节约样本和试剂的优势, 能够更快速地提供多种病原体的检测结果。然而, Multiplex PCR 也存在一些挑战, 如引物间的相互作用可能影响扩增效率, 引起交叉反应; 不同病原体的丰度差异可能导致信号强度不均。因此, 在设计和优化 Multiplex PCR 时, 需要考虑引物的选择、反应条件的优化以及结果解读的准确性, 以确保其在呼吸道病原体检测中的可靠性和稳定性^[3]。Zhao MC 等使用商业化试剂盒同时检测 572 份呼吸道样本中的 11 种常见呼吸道病毒、以及肺炎支原体和肺炎衣原体, 87.5% 的样本中至少有一种病原体的检出, 具有高灵敏度和特异性^[4]。多重荧光定量 PCR 的应用几乎涵盖了所有下呼吸道病原微生物的检测。N. J.Gadsby 等建立了利用多重荧光定量 PCR 同时检测并准确定量包括肺炎链球菌、流感嗜血杆菌等在内的 8 种常见下呼吸道病原微生物的方法, 对 249 株阳性对照样本的准确定量证实了此方法的有效检测^[5]。

3. 基因组测序技术的快速发展使得对呼吸道感染病原体的基因组学研究更加深入, 有助于了解其流行病学特征和耐药性等重要信息。随着分子诊断技术的发展, 新一代测序 (next-

基金项目: 院内课题, 研究者发起临床研究 (2023-16)

第一作者简介: 董玉琳, 女, 教授, 主要从事临床感染免疫及自身免疫检验研究。

通讯作者: 郭骏戈, Email: 1297041751@qq.com

generation sequencing, NGS) 技术开始应用于呼吸道病原体的检测, 相较于传统病原学检测方法具有灵敏度高的优势, 通常认为二代测序和三代测序均属于 NGS, 现临床 NGS 病原体检测主要应用基于二代测序平台的宏基因组二代测序 (metagenomic next-generation sequencing, mNGS), 三代纳米孔测序及靶向高通量测序 (targeted next generation sequencing, tNGS) 技术已经广泛应用在微生物组学的研究中, 并逐渐与临床病原学诊断相结合, 为检测呼吸道病原体提供了新的思路^[6,7]。该技术能够全面识别和分析呼吸道中存在的各种病原体, 包括病毒、细菌和真菌等。王桂祯等^[8]报道了 1 例多重真菌与细菌混合呼吸道感染, 传统镜检和血清学检查均为提示呼吸道真菌感染, 痰培养示白念珠菌, 但无法明确判断病原菌, 治疗效果欠佳, NGS 技术成功检出白念珠菌、曲霉菌、肺炎链球菌等多种病原体, 为调整治疗方案指明方向。基因组测序不仅能够检测已知的病原体, 还有助于发现新的病原体种类, 对于不明原因的呼吸道感染具有重要意义。其优势在于高度的分辨率和全面性, 能够提供关于病原体的详尽信息, 包括其基因型、亚型和耐药性等。Serpa 等^[9]对 mNGS 预测危重下呼吸道感染患者病原菌抗微生物药物耐药性的研究发现与药敏试验相比, 呼吸道病原菌 mNGS 预测耐药性的效果与病原菌、抗菌药物、核酸测序类型相关, 对于革兰阳性菌, RNA 联合 DNA mNGS 的灵敏度为 70%, 特异度为 95%, 对革兰阴性菌的灵敏度为 100%, 特异度为 64%。由于病原体可产生新的耐药基因突变, 且存在突变基因是否表达等问题, 因此通过 mNGS 预测病原体耐药性存在假阴性或假阳性的可能, 还需进一步与药敏试验结果相结合。研究^[10]证明: 基于 mNGS 技术诊断可以快速检测不同致病菌抗生素耐药基因及毒力因子, 发现了许多种类的抗生素耐药基因。基因组测序技术也面临一些挑战, 样本处理和数据分析的复杂性, 高昂的成本是其中主要的挑战之一; 对设备和专业技能的要求较高, 也增加了技术的门槛。在应用基因组测序技术进行呼吸道病原体检测时, 必须充分考虑实验设计、数据解读和结果验证等方面, 以确保其准确性和可靠性。

(二) 免疫学技术的突破:

1. 免疫层析技术 (Immunochromatography) 快速诊断试纸在呼吸道感染病原体检测中得到广泛应用, 适合于一线医疗机构的初步筛查和快速诊断使用。然而, 由于其对不同病原体的敏感性和特异性可能有所差异, 在选择试剂盒时需要进行评估。冯敏亚等报道了^[11], 使用胶体金免疫层析法检测呼吸道病原体抗原, 门诊患者较住院患者检出率高。可能与患者病程, 抗原存在时间短, 抗原存在易变性、抗原漂移等情况有关。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^[12]。

2. 抗原抗体标记检测技术: 间接免疫荧光法 (Indirect Immunofluorescence Assay, IFA)、直接荧光抗体试验 (direct fluorescent antibody test, DFA)、酶联免疫吸附法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)、以及化学发光法

(Chemiluminescence Assay, CLIA) 等免疫学方法能够检测体液中的特定抗原、抗体水平, 有助于对呼吸道感染的免疫学诊断和流行病学调查。这些方法通常基于机体对于呼吸道病原体的免疫应答, 进而诊断感染情况。

(1) 抗体检测方面: IFA 和 ELISA 等技术依赖于抗体与特定抗原之间的特异性结合。能够快速、有效地检测出病原体相关的抗体水平。这些技术具有较高的灵敏度和特异性, 能够可靠地进行疾病诊断和流行病学调查。这些方法适用于大规模筛查和临床诊断。具有较低的成本, 对于医疗资源匮乏地区尤其具有重要意义。同时, 这些技术可提供定量结果, 有助于监测感染的程度和治疗效果。IFA 和 ELISA 等技术也存在一些局限性。由于依赖于抗体水平, 在感染初期可能出现假阴性结果, 交叉反应和非特异性结合可能导致假阳性结果。这些方法也无法直接检测病原体本身, 而是通过检测宿主对病原体的免疫反应来间接推断感染情况。因此, 在应用 IFA 和 ELISA 等技术进行呼吸道病原体检测时, 需要综合考虑临床病史、症状和其他检测结果, 以确保最终的诊断准确性和可靠性。现已有多种商业化 ELISA 试剂盒, 可检测包括流感病毒、肺炎衣原体、肺炎支原体等多种常见下呼吸道病原体^[13]。IFA 法在呼吸道病原体检测中的应用于血清 IgM 抗体中, 可在病原体感染后约 1 周的时间检测到, 发病 3 周左右达峰值, 由于血清反应这种时间上的滞后性, 所以此法多采用患者发病时及发病后 2-4 周血清进行检测, 并动态监测血清抗体滴度进行诊断。该方法对早期诊断和早期临床用药指导等方面仍有一定的局限性^[14]。西班牙 VIRCELL 公司生产的呼吸道联合检测试剂盒 (IFA 法) 可检测包括嗜肺军团菌、肺炎衣原体等 9 种常见呼吸道病原体。莫伟平等利用此技术对 13240 例呼吸道感染患者血清进行检测和分析, 结果显示呼吸道感染的病原体主要为肺炎衣原体和病毒, 也证实了采用 IFA 法检测呼吸道病原体的 IgM 抗体可作为临床的诊断和治疗的重要依据^[15]。随着检验技术的发展, 全自动 CLIA 法检测呼吸道病原体抗体已越来越多地应用于临床检测。安图生物全自动免疫检验分析仪采用捕获法检测血清/血浆中的 IgM 抗体, 结果判读: S/CO 值 ≥ 1.0 判定为阳性, < 1.0 判定为阴性^[16,17]。CLIA 法在呼吸道病原体检测中有高灵敏度、高特异性和自动化程度高等优势, 适用于急诊科、临床实验室等需要快速、准确、高通量检测的场景。

(2) 抗原检测方面: DFA 具有特异性高、可视化结果的特点。但相对于其他方法时间较长, DFA 需要更长的操作时间和技术人员的专业经验。结果通常是半定量的, 需要有经验的技术人员进行解读和评估。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^[18]。ELISA 法有高灵敏度, 易于操作, 可量化结果。但可能会出现与其他相关病原体的交叉反应, 导致假阳性结果, 同时检测时间长。付晓蕊等对甲型流感病毒抗原 ELISA 法检测的研究, FluA 抗原检测 FluA 核蛋白抗原, 由于免疫学检验存在一定的局限性, 抗原筛查并不能确定感染时间和感染阶段, 故而应配合 FluA 核酸检测^[19]。CLIA 法具有高灵敏度和高特异性, 可以检测到低浓度的抗原, 并避免了与其他病原体的交叉反应。在短时间内提供快速的

检测结果。袁世超等^[20]建立了用于检测结核分枝杆菌特异性 γ -干扰素的CLIA,并对建立的化学发光体系进行评价,发现此方法最低检出限为0.66 pg/mL,与ELISA方法相对比,检测结果的总符合率达到99.01%,可用于结核病的临床快速检查。但CLIA法成本较高,设备费用较高,还需专业的操作技能和设备维护。

在选择适合的检测方法时,需要综合考虑实验室的设备和技术水平、病原体的特点、检测的灵敏度和特异性要求,以及实际应用中的成本效益等因素。

(三) 纳米技术在呼吸道感染检测中的应用:

纳米粒子具有独特的光学特性和很好的生物相容性。最常用用来制备纳米颗粒的原材料是金、硅和半导体(如CdSe, ZnS, CdS)等^[21]。

1. 纳米生物传感器的发展为呼吸道感染病原体的灵敏检测提供了新途径。比如病毒颗粒实际上就是生物纳米颗粒。在Weissleder小组的实验中,经磁场作用,一个10mL的血清样本中能检测到少至5个的病毒颗粒。该系统要比ELISA敏感,同时也比基于PCR扩增的检测方法有所改进^[22]。利用纳米材料的特殊性质,可以实现低浓度病原体的高灵敏度检测。纳米技术还可以提供快速的检测结果。此外,纳米技术还可以实现多重检测,即同时检测多个病原体,提高检测效率。

2. 纳米颗粒标记技术使得免疫学检测方法更加灵活,可结合传统的免疫学技术,提高呼吸道感染病原体的检测效率和准确性。Tan等^[23]提出了一项新的生物纳米技术。该技术是采用生物修饰的纳米颗粒,通过荧光信号为基础的免疫试验,快速、准确地检测出单个细菌。该研究中,纳米颗粒起到极强的信号放大作用,细菌众多的表面抗原可供抗体修饰的纳米颗粒识别与结合,所以每一个细菌表面将结合数以千计的纳米颗粒,从而提供极强的荧光信号。用针对不同细菌的特异性抗体来修饰纳米颗粒,这项纳米生物技术就能用来检测多种来源的细菌病原体。

3. 纳米技术在呼吸道感染检测中的应用也面临一些挑战。纳米技术的应用需要高度专业的知识和技能,对设备和实验条件要求较高。纳米材料的生物相容性也需要考虑,以确保其在临床应用中的安全性。纳米技术在呼吸道感染检测中的应用具有巨大潜力,有望提供更准确、高效的呼吸道感染检测方法,为临床诊疗提供更好的支持。纳米技术在医学领域仍处于发展阶段,尚需进一步验证和完善。

(四) 基因编辑技术在呼吸道感染检测与预防中的潜在应用:

1. 基因编辑技术是一种能够直接修改生物体基因组的工具,其应用范围包括基因修复、基因沉默和基因调控等方面。基因编辑技术根据核酸酶类型分为4种:(1)巨型核酸酶;(2)锌指核酸酶;(3)转录激活因子样效应核酸酶;(4)成簇规律间隔回文重复系统(the clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)^[24]。其中CRISPR来源于细菌和古细菌的天然获得性免疫系统。CRISPR/Cas9是一种由单一引导RNA(single guide RNA, sgRNA)介导、利用Cas9核酸酶对靶向基因进行编辑的技术,具有灵活、高效、方便、操作性强等特点,目前已广泛应用^[25]。CRISPR-Cas9等基因编辑技术的发展为呼吸道感染病原体的基因

组学研究和耐药性监测提供了新手段,有望在未来实现针对性的病原体基因修饰和治疗。有研究表明CRISPR-Cas9系统已用于肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌等的碱基编辑^[101-103]。简单、高效的CRISPR-Cas9系统基因编辑技术已用于预防革兰氏阴性菌耐药性的研究。科研人员利用CRISPR-Cas9系统来对革兰阳性菌SA的基因组进行编辑^[26,27],该技术有望缓解革兰阳性菌导致的感染。相比于CRISPR-Cas9,CRISPR-Cas12技术在体外病毒核酸检测方面应用更为广泛。2018年Doudna等提出了DETECTR(DNA endonuclease-targeted CRISPR transreporter)分子诊断平台^[28]。DETECTR将CRISPR-cas12和重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)相结合,在提高检测灵敏性的同时也避免了对昂贵仪器设备的需求。基因编辑技术在呼吸道感染防控中的潜在应用越来越受到关注。

2. 基因编辑技术在呼吸道感染检测与预防中的应用也面临一些挑战。基因编辑技术的精准性和安全性需要进一步验证和完善,以确保其在临床应用中的有效性。基因编辑技术的应用也涉及到伦理、法律和社会问题,需要进行充分的伦理审查和公众沟通。如Alvarez等^[29]的研究提示CRISPR基因编辑可能会导致细胞毒性和基因组不稳定,原因主要是基因编辑触发p53反应,导致的结果:(1)编辑的细胞易被机体“标记”为受损细胞而被免疫系统所清除;(2)基因编辑的细胞可能是存在p53功能缺陷的细胞,这类细胞群具有不稳定的基因组,容易积累和引发进一步基因突变的风险;CRISPR-Cas9系统可能导致非靶向基因位点的DNA意外改变,产生基因毒性和染色体易位。应用新型化合物抑制剂对特异化脓链球菌Cas9 (specificity Streptococcus pyogenes Cas9, SpCas9)进行可逆的、剂量可控的、相对稳定且温和的控制,对广泛应用的基因编辑、碱基编辑具有重要作用^[30]。此外,基因编辑技术的成本和技术门槛也是限制其应用的因素之一。尽管存在挑战,基因编辑技术在呼吸道感染检测中的应用具有重要意义。在实际应用中,需要考虑技术的安全性、可行性,确保其能够在医疗实践中得到有效应用。

(五) 其他呼吸道病原体检测方法

1. 拉曼光谱无需复杂的样品制备步骤和复杂的设备,依赖于光的非弹性散射来探测样品中的分子振动,能够识别样品中的分子、生物和非生物成分^[31]。表面增强拉曼散射和机器学习相结合,可快速准确检测唾液中的呼吸道病毒,对病毒毒株种类及变异株进行鉴别分类,并对病毒浓度进行定量^[32]。拉曼光谱也能用于检测病原菌的耐药性^[31],在呼吸道病原学诊断方面表现出一定潜力。基于深度学习区分荧光标记的不同病毒完整颗粒的显微镜图像以识别病毒的方法不需裂解、纯化和扩增步骤,可在5min内完成标记、成像和病毒鉴定,能够区分SARS-CoV-2、阴性样本、变异株以及其他常见呼吸道病原体,并可通过软件更新纳入更多病原体,为传统和基于测序的病毒诊断方法提供一种可能的替代^[33]。

2. 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^[34-36]。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。质谱检测技术也存在一些挑战,如设备和技术的高成本、需要专业的操作技能和数据分析经验等。随着技术的发展,质谱检测技术将在呼吸道病原体检测中发挥重要作用,并为临床诊疗提供准确、快速的信息。

二、未来展望

随着科技的不断进步,呼吸道感染病原体检测技术将变得更加快速、准确和便捷。纳米技术的发展也将为呼吸道感染病原体的检测和治疗带来更多创新。有望实现更高灵敏度的病原体检测。基因组学的应用将为呼吸道感染的个体化治疗提供更多可能性。

综上,呼吸道感染相关疾病病原体检测技术将为疾病的早期诊断、个体化治疗提供重要支持。随着科学技术的不断进步,呼吸道感染疾病病原体检测技术取得了长足的发展。未来可期待更多创新性技术的涌现,以提高呼吸道感染的早诊率、个体化治疗效果。同时应加强跨学科合作,加快新技术的临床转化和应用推广,为人类健康和社会福祉作出更大贡献。

参考文献

[1] Beck E T, Henrickson K J. Molecular diagnosis of respiratory viruses [J]. *Future Microbiol*, 2010, 5(6):901-916.

[2] 蒋露晰, 任红宇, 周海健, 等. 社区获得性肺炎病原体检测方法研究进展 [J]. *中华流行病学杂志*, 2016, 37(007):1051-1054. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.07.029

[3] 陆学东, 周一平, 杨来智, 等. 多种呼吸道病原微生物快速筛查技术的建立 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2008, 18(1): 140-143.

[4] Zhao M, Li G, Zhang D, et al. Clinical evaluation of a new single-tube multiplex reverse transcription PCR assay for simultaneous detection of 11 respiratory viruses, *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia* in hospitalized children with acute respiratory infections [J]. *Diagnostic Microbiol Infect Dis*, 2017, 88(2):115-119. DOI:10.1128/JCM.00517-16

[5] Gadsby NJ, McHugh MP, Russell CD, et al. Development of two real-time multiplex PCR assays for the detection and quantification of eight key bacterial pathogens in lower respiratory tract infections [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2015, 21(8):788.e1-788.e13. DOI:10.1016/j.cmi.2015.05.004

[6] 何静, 黄丹辉, 董航明, 蔡绍曦. 二代测序技术检测呼吸道非典型病原体应用进展 [J]. *实用医学杂志*, 2020, 36(18): 2598-2601

[7] 马鹏程, 陈瑜. 呼吸道病原体检测方法研究进展 [J]. *中国感染与化疗杂志*, 2024, 24(1): 118-121.

[8] 王桂祯, 吕迪, 庄育刚, 等. 高通量测序诊断多重真菌与细菌感染所致重症肺炎1例 [J]. *中国真菌学杂志*, 2019, 14(3): 171-173.

[9] SERPA P H, DENG X, ABDELGHANY M, et al. Metagenomic prediction of antimicrobial resistance in critically ill patients with lower respiratory tract infections [J]. *Genome Med*, 2022, 14(1): 74.

[10] GRUMAZ S, STEVENS P, GRUMAZ C, et al. Next generation sequencing diagnostics of bacteremia in septic patients [J]. *Genome Med*, 2016, 8(1): 73.

[11] 冯敏亚, 蒋丽娟, 张淑瑛, 等. 探讨胶体金免疫层析法检测呼吸道病原体抗原的意义 [J]. *医学检验与临床*, 2022, 33(3): 65-68.

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

[13] 李海珠, 吕波, 林志方, 等. 小儿急性下呼吸道感染病原体检测与临床分析 [J]. *中华检验医学杂志*, 2006, 29(5):433-434. DOI:10.3760/j.issn:1009-9158.2006.05.015

[14] 谢红梅, 胡必杰, 马艳, 等. 1647例呼吸道感染病原体的IgM抗体检测结果分析 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2012, 22(12):2696-2698.

[15] 莫伟平, 张泳仪. 13240例呼吸道感染患者9种呼吸道感染病原体IgM抗体检测结果分析 [J]. *国际检验医学杂志*, 2015, 36(17):2577-2579. DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.17.055

[16] 杨俊梅, 刘倩倩, 崔宁华, 孙红启, 等. 应用CLSI EP12-A2和EP15-A2评估腺病毒IgM抗体的磁微粒化学发光法检测试剂 [J]. *中华试验和临床病毒学杂志*, 2019, 33(4): 432-436.

[17] 崔宁华, 杨俊梅, 刘倩倩, 等. CLSI EP12-A2和EP15-A2在磁微粒化学发光法肺炎支原体IgM抗体检测试剂性能评估中的应用 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2019, 29(16):1921-1923,1931.

[18] 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.

[19] 付晓蕊, 康蓓佩, 徐修礼, 等. 快速病原体检测技术在甲型流感病毒检测中的应用 [J]. *检验医学*, 2020, 35(11): 1165-1168.

[20] 袁世超, 谢桂华, 侯维娟, 等. 结核分枝杆菌特异性 γ -干扰素化学发光免疫检测体系的建立 [J]. *国际检验医学杂志*, 2023, 44(8): 973-977.

[21] Niemeyer CM. *Angew Chem Int Ed*, 2001, 40: 4158.

[22] Perez JM, Simeone FJ, Saeki Y, et al. *J Am Chem Soc [J]*. 2003, 125: 10192-10193.

[23] He X, Wang K, Tan W, et al. *J Am Chem Soc [J]*. 2003, 125: 7168-7169.

[24] Kan MJ, Doudna JA. Treatment of genetic diseases with CRISPR genome editing [J]. *JAMA*, 2022, 328(10): 980.

[25] Liu GW, Lin QP, Jin S, et al. The CRISPR-Cas toolbox and gene editing technologies [J]. *Mol Cell*, 2022, 82(2): 333-347.

[26] Chen WZ, Ji QJ. Genetic manipulation of MRSA using CRISPR/Cas9 technology// Ji YD. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) protocols: cutting-edge technologies and advancements*. New York: Springer, 2020: 113-124.

[27] Chen WZ, Zhang YF, Yeo WS, Bae T, Ji QJ. Rapid and efficient genome editing in *Staphylococcus aureus* by using an engineered CRISPR/Cas9 system. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(10): 3790-3795.

[28] CHEN JS, MA E, HARRINGTON L B, et al. CRISPR-Cas12 a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity [J]. *Science*, 2018, 360(6387):436-439.

[29] Alvarez MM, Biayna J, Supek F. TP53-dependent toxicity of CRISPR/Cas9 cuts is differential across genomic loci and can confound genetic screening [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 4520.

[30] 李培思, 万鹏, 李小申, 崔世云, 曾振灵. CRISPR-Cas9技术在细菌耐药性防控研究进展 [J]. *微生物学报*. 2021, 61(8): 2161-2171.

[31] LISTER A P, HIGHMORE C J, HANRAHAN N, et al. Multi-excitation Raman spectroscopy for label-free, strain-level characterization of bacterial pathogens in artificial sputum media [J]. *Anal Chem*, 2022, 94(2):669-677.

[32] YANG Y, XU B, MURRAY J, et al. Rapid and quantitative detection of respiratory viruses using surface-enhanced Raman spectroscopy and machine learning [J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 217: 114721.

[33] SHIAELIS N, TOMHETZKI A, PETO L, et al. Virus detection and identification in minutes using single-particle imaging and deep learning [J]. *ACS Nano*, 2023, 17(1):697-710.

[34] Torres A, Lee N, Cilloniz C, et al. Laboratory diagnosis of pneumonia in the molecular age [J]. *Eur Respir J*, 2016, 48(6):1764-1768.

[35] 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.

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