

## 社区获得性肺炎病原体检测方法研究进展

蒋露晰 任红宇 周海健 陈愉 邵祝军 秦天

102206 北京, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所呼吸道传染病室 传染病预防控制国家重点实验室(蒋露晰、任红宇、周海健、邵祝军、秦天); 110004 沈阳, 中国医科大学附属盛京医院呼吸科(蒋露晰、陈愉)

通信作者: 陈愉, Email: chenysy@hotmail.com; 秦天, Email: qintian@icdc.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.07.029

**【摘要】** 社区获得性肺炎(CAP)是常见的呼吸道感染性疾病, 目前对CAP病原体的检测仍是难点。早期确诊CAP病原体, 明确病因, 进而早期进行有效治疗, 对预后至关重要。采取灵敏有效的检测方法是病原学诊断的关键。本文对CAP病原体检测方法的研究进展进行综述。

**【关键词】** 社区获得性肺炎; 病原体; 检测方法

**基金项目:** 国家自然科学基金(81201251); 传染病预防控制国家重点实验室青年创新人才基金(2015SKLID508); 国家科技重大专项(2012ZX10004215, 2013ZX10004610)

### Progress in research of detection assay for pathogens causing community acquired pneumonia

Jiang Luxi, Ren Hongyu, Zhou Haijian, Chen Yu, Shao Zhujun, Qin Tian

National Institute for Communicable Disease Prevention and Control, State Key Laboratory for Communicable Disease Prevention and Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China (Jiang LX, Ren HY, Zhou HJ, Shao ZJ, Qin T); Department of Respiratory Medicine, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China (Jiang LX, Chen Y)

Corresponding authors: Chen Yu, Email: chenysy@hotmail.com; Qin Tian, Email: qintian@icdc.cn

**【Abstract】** Community-acquired pneumonia (CAP) is a common respiratory infectious disease. The etiologic diagnosis of CAP remains an uneasy task. Early etiologic diagnosis is critical for proper treatment and might improve the prognosis. So, it is important to identify pathogens causing CAP in early time and accurate way with sensitive and effective method. This paper summarizes the recent progress in the research of the detection assay for CAP.

**【Key words】** Community-acquired pneumonia; Pathogen; Detection assay

**Fund programs:** National Natural Science Foundation of China (81201251); Science Foundation for the State Key Laboratory for the Infectious Disease Prevention and Control from China (2015SKLID508); National Science and Technology Major Project of China (2012ZX10004215, 2013ZX10004610)

社区获得性肺炎(CAP)是指在医院外罹患的感染性肺实质(含肺泡壁, 即广义上的肺间质)炎症, 包括具有明确潜伏期的病原体感染而在入院后潜伏期内发病的肺炎<sup>[1]</sup>。CAP是常见的呼吸道感染性疾病, 其病原体的构成与耐药特点在不同地区存在明显差异, 随着人群和季节因素的变化而变化, 亦与当地CAP诊疗方案密切相关<sup>[2]</sup>。对CAP进行具体病原体检测仍是一项艰巨的任务, 目前为止仅有50%的病原体能被检出<sup>[3]</sup>。对于细菌及非典型病原体引起的CAP, 目前临床医生仍以经验治疗为主, 若早期抗生素使用不准确将导致治疗失败, 甚至引起病原体耐药率上升。早期确诊CAP病原体, 明确病因, 进而早期有效治疗, 对预后至关重要。采取灵敏有效的检测方法则是病原学诊断的关键。为此本文对CAP病原体检测方法的研究进展进行综述。

1. 下呼吸道标本直接涂片镜检法: 系病原学诊断的经典

方法, 也是最直接、最简便的方法。认真规范的标本涂片报告对临床诊治意义重大。呼吸道分泌物可以直接涂片通过革兰染色镜检, 此方法直接迅速, 仅需30 min就可获得结果, 并提示是否存在革兰阳/阴性菌或球/杆菌感染, 为临床早期合理用药提供参考。合格痰标本涂片对培养结果有很好的预测效果, 有研究表明合格的痰标本涂片与细菌培养结果的符合率达80.2%<sup>[4]</sup>。故注重痰标本培养前的质量评价可大大提高培养阳性率及结果的可靠性。此外通过细菌培养前标本涂片染色观察细菌的形态染色特点, 结合标本留取部位和临床表现, 可以初步诊断是哪一类细菌, 并采取针对性培养与鉴定。可直接选用鉴别培养基和专用分离培养基接种分离培养, 可大大缩短检测时间, 避免培养的盲目性。Tramontana和Sinickas<sup>[5]</sup>发现CAP患者发病8 h内送检合格痰标本, 肺炎链球菌检出率最高(47.1%), 同样提示涂片镜检

法在 CAP 诊疗中有着重要的作用。

2. 病原菌分离培养法: 目前仍为主要的传统方法, 被认为是确诊 CAP 致病菌的“金标准”<sup>[6]</sup>。培养法可以计算出细菌菌落数, 对病原菌标本进行量化, 从而区分是呼吸道定植菌感染还是来自口腔的污染。使用样本刷采样时, 病原菌生长浓度  $\geq 10^3$  CFU/ml; 肺泡灌洗液采样时, 病原菌生长浓度  $\geq 10^4$  CFU/ml, 气管吸痰术采样时, 病原菌生长浓度  $\geq 10^5$  CFU/ml, 则提示可能是该种病原菌感染。但有研究表明, 即使病原菌的增长量低于该阈值, 也不能排除肺炎<sup>[7]</sup>。此外培养法是药敏试验的基础, 通过药敏试验可以得出细菌的具体耐药性, 从而为临床治疗提供指导。但培养法操作过程复杂, 一些病原菌对培养条件要求苛刻, 需特殊的培养基才能生长, 一些病原菌培养困难, 培养时间长, 临床多用下呼吸道标本进行培养, 敏感性不高, 而血尿培养法的敏感性更低。此外部分患者在留取标本前已经使用了抗生素, 影响培养法的检出率。下呼吸道标本中细菌数量和种类分布不均, 取样产生的误差亦导致阳性率降低, 由于口咽部的污染, 痰培养可能出现假阳性培养结果, 因此临床实践中应规范操作, 在抗生素使用前取样应避免污染。目前培养法在临床实践中作用巨大, 是临床检验科进行呼吸道分泌物检测的常规方法, 此方法也是目前我国多个多中心 CAP 病原谱调查研究的重要检测方法之一<sup>[2]</sup>, 同时该法对流行病学调查、疑难病例鉴定及公共卫生环境检测亦有不容忽视的作用。

3. 直接免疫荧光抗体法 (DFA): 该法是将荧光素标记在已知抗体上, 直接与相应抗原反应的方法, 通过检测呼吸道分泌物如痰液、支气管肺泡灌洗液、胸水及肺组织等标本的病原体抗原发现病原体。此法可快速 (2~4 h) 从临床标本中检测病原体获得检测结果, 即使已经应用抗生素治疗的患者仍可检出病原菌<sup>[8]</sup>。如从临床标本中检测嗜肺军团菌, 特异性高达 95%~100%<sup>[9]</sup>, 但其敏感性却 25%~75%<sup>[8]</sup>, 且需专业人员操作<sup>[9]</sup>, 由于交叉反应可能引起假阳性, 因而在临床诊断中的应用价值有限。临床上常用于细菌、病毒等微生物的快速检查和肾、皮肤活检的免疫病理检测。

4. 血清学抗体检测法: 血清学检测是诊断呼吸道病原体感染的重要方法之一, 对于无痰无法进行培养及镜检的患者, 以及不能或者不易在传统培养基中生长的非典型病原体感染, 该法具有优越性。常用的方法包括补体结合试验 (complement fixation)、间接免疫荧光法 (indirect immunofluorescent assay)、酶联免疫法 (enzyme immunoassay)、微量凝集法 (microagglutination assay) 以及免疫色谱测定 (immunochromatographic test) 等。目前能同时检测嗜肺军团菌 1 型 (LP1 型)、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、副流感病毒 9 项病原体 IgM 抗体的间接免疫荧光试剂已在临床上广泛使用<sup>[10]</sup>。因该法多采用患者发病时及病后 2~4 周血清作为检测标本, 通过对急性期及恢复期血清抗体滴度的动态监测进行诊断, 因此多用于回顾性研究和流行病学调查。由于血清反应有一定的时间滞后性, 如在

大部分军团菌血清学快速诊断中, 仅有不足 50% 的患者在最初 2 周能检测出血清抗体<sup>[11]</sup>。因此该方法对早期诊断及早期临床用药指导仍有一定的局限性。

5. 尿抗原检测法: 肺炎链球菌感染者及军团病患者的尿液中可分别检测到肺炎链球菌及军团菌抗原, 此类抗原是相应细菌细胞壁多糖的一种成分。在发病后的 24 h 至数月内, 患者尿中均可检测到此抗原, 且不受用药的影响<sup>[12]</sup>。尿抗原检测方法包括放射免疫检测法 (radioimmunoassay)、免疫色谱测定 (immunochromatographic test)、酶免疫分析 (enzyme immunoassay) 等。放射免疫检测法存在放射性危害, 目前临床已很少应用, 而多应用后两方法<sup>[13]</sup>。特别是免疫色谱测定其操作简便, 15 min 即可得出检测结果, 近来大量研究均予采用。肺炎链球菌尿抗原试剂盒敏感性为 50%~80%, 特异性为 >90%<sup>[14]</sup>。军团菌尿抗原试剂盒的敏感性为 96%, 特异性为 99.9%<sup>[15]</sup>。

尿抗原检测是早期快速诊断的有效方法。一项来自欧洲地区的调查显示约 82% 的军团菌病临床病例通过尿抗原检测法诊断<sup>[16]</sup>。2012 年荷兰临床检测指南甚至建议所有重症 CAP 患者在入院后均应检测尿抗原<sup>[17]</sup>。但该法仅能检测 LP1 型, 而不能检测其他血清型的嗜肺军团菌以及非嗜肺军团菌引起的感染。据报道 90% 的军团菌病是由嗜肺军团菌引起, 且 LP1 作为致病菌占 84%<sup>[18]</sup>, 因此该方法仍具有重要的临床意义。

#### 6. 分子生物学检测法:

(1) PCR: 为在体外模拟体内 DNA 复制的核酸扩增技术, 是近年来广泛用于临床病原体检测的重要分子检测方法。与传统检测方法相比, 此法敏感性高, 特异性好, 检测快速, 亦不受抗菌药物的影响, 对于病原菌的早期临床诊断有巨大的作用。此法可用于鼻咽和口咽分泌物、痰液、胸水、肺泡灌洗液、活检肺组织等多种标本的检测。理论上此法可检测所有呼吸道菌种, 对于不能培养或难以培养的病原体的检测更为重要, 其敏感性及特异性均高于培养法。由于是定性检测, 对于非呼吸道定植菌, 如结核菌和军团菌等<sup>[19]</sup>, 若 PCR 检测结果在排除了污染因素后结果为阳性者, 可以确诊该种病原菌感染。但对于肺炎链球菌、卡他莫拉菌等呼吸道定植菌, 即使检测结果为阳性, 也不能确定是定植还是感染, 这一缺点限制了此方法的临床应用。此外, 在实验操作过程中易引起污染, 出现假阳性结果。因此对操作人员有较高的专业要求, 操作过程尚需标准化和规范化。

(2) 实时荧光定量 PCR (real time-PCR): 该法是利用荧光信号对扩增反应进行实时监测, 可对初始模板量进行定量分析, 说明细菌和感染的关系, 进而区分原发病灶和继发病灶<sup>[20]</sup>。大部分呼吸道细菌的 real time-PCR 已建立, 如 2 h 即可从临床标本中检出肺炎链球菌<sup>[21]</sup>, 敏感性及特异性均为 100%; 同样检出肺炎支原体的敏感度和特异度分别为 100% 和 95.4%<sup>[22]</sup>等。在临床实践中, 如果 8 h 内未能提供有效抗生素, CAP 患者入院治疗后的 30 d 内死亡率将提高<sup>[23]</sup>, 该方法最大的优点是大多数情况下可在 2 h 内完成, 因此可以指导

临床遵循当前CAP诊断和治疗指南推荐的4 h内运用抗生素的有效剂量的要求<sup>[1]</sup>。另外,发生CAP暴发疫情时,及早明确疫情性质对及时有效控制疫情至关重要。但此法由于运用了封闭式检测,减少了扩增后电泳的步骤,因此不能检测扩增产物的具体大小;此外由于荧光种类以及检测光源的限制,相对限制了其多重检测的应用<sup>[24]</sup>。

7. 多种病原体联合检测技术:传统方法多用于每次检测一种病原体,然而部分CAP患者为多种病原微生物合并感染。且这些病原体引起的感染症状特征相似,仅靠临床症状及常规检测难以鉴别诊断,因此临床亟需可同时检测多种病原体的高敏感性和特异性的快速、高通量的检测技术。多重检测技术不仅能检测出临床中的多重感染,还能快速高通量的筛查感染的病原菌,对疾病的诊疗和预后至关重要。

(1)多重PCR:是在传统PCR基础上发展的技术,系在同一反应体系中采用多对特异性引物同时扩增几个不同DNA片段的方法。与传统PCR相比,多重PCR可以节约实验样本,节省劳动力,提高检测效率,缩短检测周期,降低检测成本。一个理想的多重PCR检测方法,并不是多个单重PCR的简单组合,而应对所有目标产物进行分析、反复优化,建立最优的反应条件和体系。然而由于多重PCR同时涉及到多个模板和多个引物,仍然存在一些问题,如特异性和敏感性较传统PCR低,容易形成引物二聚体,因此,对反应条件进行优化至关重要。目前Benson等<sup>[25]</sup>建立了用于检测军团菌、肺炎支原体、肺炎衣原体、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌等病原体的多重PCR检测方法。Thong等<sup>[26]</sup>建立了能同时检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌的多重PCR检测方法,其灵敏度和特异度可达100%。

(2)多重real time-PCR:该法不仅能区分病原体的类型还能检测出不同病原体的具体数量,且在荧光的作用下对目的序列的扩增进行实时监测,优于多重PCR检测<sup>[25]</sup>。目前Ling和McHugh<sup>[27]</sup>、Lassaunière等<sup>[28]</sup>已经建立了针对于呼吸道支原体、衣原体、军团菌3种非典型病原体和13种病毒(呼吸道合胞病毒,流感病毒A、B型,人副流感病毒1~3型,腺病毒,冠状病毒NL63、HKU1、229E、OC43,人博卡病毒和人偏肺病毒)的多重real time-PCR检测方法。

(3)基因芯片技术:与传统的分子生物学技术相比,该方法的优势在于一次反应即能获得样品中多种病原体的检测结果,特异性强、速度快、通量高。目前已研发了应用于呼吸道病原体检测的基因芯片,可用于检测化脓性链球菌、百日咳杆菌、肺炎支原体、肺炎衣原体以及9种呼吸道病毒(腺病毒4型,冠状病毒OC43、229E、HK,流感病毒A、B型,副流感病毒1~3型,呼吸道合胞病毒)<sup>[29]</sup>。

(4)液相芯片(微球体悬浮芯片)技术:是继基因芯片之后发展的新一代高通量分子检测技术。该技术基于美国Luminex公司的xMAP技术平台<sup>[30]</sup>,是在不同荧光编码的微球上进行抗原-抗体、酶-底物、配体-受体的结合反应及核酸杂交反应,通过红、绿两束激光分别检测微球编码和报告荧光来达到定性和定量的目的,一个反应孔内可以完成多达

100种不同的生物学反应,是以荧光编码微球为基础,集流式细胞技术、荧光微球技术、激光分析技术、生物信息技术为一体的新平台。与传统基因芯片技术相比,液相芯片将流式检测与芯片技术有机结合在一起,把原来体系由液相-固相反应改变为液相-液相反应,这种反应方式更接近生物系统内部液相环境,增加了反应的灵敏、准确性,亦具有高通量、样本用量少、操作简单快速、灵敏度高、特异性强、重复性好、检测范围广、杂交动力学快等优点。目前已建立了应用此方法检测常见呼吸道病原微生物(包括肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、肺炎支原体、肺炎衣原体、嗜肺军团菌、鲍氏不动杆菌、脑膜炎奈瑟菌、结核分枝杆菌、腺病毒、流感病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒、鼻病毒、人类偏肺病毒)的方法<sup>[30]</sup>。

8. 标本16S rRNA基因PCR和测序检测技术:是以细菌16S rRNA基因序列为基础建立的PCR和测序方法。16S rRNA编码基因是指细菌染色体上编码rRNA相对应的DNA序列,存在于所有细菌的染色体基因组中,也存在于支原体、衣原体和立克次体等原核生物中,具有长度适中(1 500 bp)且多信息特征(16S rRNA编码基因内部结构由可变区和保守区组成,保守区为所有病原菌共有,病原菌间无差异,有“分子化石”之称<sup>[31]</sup>,可变区在不同病原菌间存在有不同程度的差异,具有种属特异性,可根据保守区设计各种病原菌的通用引物)。依据这些特征可通过通用引物对各种病原体的16S rRNA基因扩增,测定扩增产物的序列,进行序列对比,从而鉴定细菌的种类。该方法不受抗菌药物治疗影响,亦毋需体外培养,可直接检测,缩短了检测时间,具有快速、高效、准确、特异性强的优点。目前该方法已用于支原体、衣原体、军团菌等病原检测<sup>[32-34]</sup>。

9. 总结:目前直接镜检法和培养法是临床医生应用抗生素治疗CAP的重要参考依据;抗体检测法不利于早期诊断,但能检出培养法无法检出的非典型病原体;尿抗原检测法费用昂贵,不适宜在我国临床应用,仍仅限用于科研;分子生物学方法,尤其是荧光定量PCR在临床应用正在逐渐普及,对我国完善CAP病原谱起到重要作用。随着社会发展与科技进步,突发公共卫生事件、临床感染诊断、个性化治疗等领域均对多重病原体检测能力提出了更高的要求。多种呼吸道病原体联合检测方法具有操作简单、特异性强、速度快、通量高等优点,不仅能检测出临床中的多重感染,还能快速高通量的筛查感染的病原菌,可满足临床大量标本的检测需求,能够为临床医生及时提供可靠的检测结果,对疾病的早期诊断、合理治疗以及预后意义重大。在发生CAP暴发疫情时,能及早明确疫情性质,对指导暴发疫情的流行病学调查和处置也是至关重要。目前多病原检测技术已经成为CAP检测方法研究的热点,多重PCR和多重RT-PCR、基因芯片技术和液相芯片技术等方便、快捷的高通量检测技术有望用于CAP病原体的检测。

利益冲突 无

## 参 考 文 献

- [1] 中华医学会呼吸病学分会. 社区获得性肺炎诊断和治疗指南[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2006, 29(10): 651-655. DOI:

- 10.3760/j.issn.1001-0939.2006.10.002.  
Chinese Thoracic Society, China Medical Association. Guidelines for the diagnosis and treatment of community-acquired pneumonia [J]. Chin J Tuberc Respir Dis, 2006, 29 (10): 651-655. DOI: 10.3760/j.issn.1001-0939.2006.10.002.
- [2] 刘又宁, 陈民钧, 赵铁梅, 等. 中国城市成人社区获得性肺炎 665 例病原学多中心调查 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2006, 29 (1): 3-8. DOI: 10.3760/j.issn.1001-0939.2006.01.003.  
Liu YN, Chen MJ, Zhao TM, et al. A multicentre study on the pathogenic agents in 665 adult patients with community-acquired pneumonia in cities of China [J]. Chin J Tuberc Respir Dis, 2006, 29 (1): 3-8. DOI: 10.3760/j.issn.1001-0939.2006.01.003.
- [3] Al-Marzooq F, Imad MAM, How SH, et al. Development of multiplex real-time PCR for the rapid detection of five bacterial causes of community acquired pneumonia [J]. Trop Biomed, 2011, 28 (3): 545-556.
- [4] Pagano L, Girmenia C, Melel 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.
- [5] Tramontana AR, Sinickas V. Microbiological diagnostic tests for community-acquired pneumonia are useful [J]. Med J Aust, 2010, 192 (4): 235-236.
- [6] Bousbia S, Raoult D, La Scola B. Pneumonia pathogen detection and microbial interactions in polymicrobial episodes [J]. Future Microbiol, 2013, 8 (5): 633-660. DOI: 10.2217/fmb.13.26.
- [7] Niederman MS. The argument against using quantitative cultures in clinical trials and for the management of ventilator-associated pneumonia [J]. Clin Infect Dis, 2010, 51 Suppl 1: S93-99. DOI: 10.1086/653055.
- [8] Jespersen S, Søgaard OS, Fine MJ, et al. The relationship between diagnostic tests and case characteristics in legionnaires' disease [J]. Scand J Infect Dis, 2009, 41 (6/7): 425-432. DOI: 10.1080/00365540902946536.
- [9] Faria-Ramos I, Costa-de-Oliveira S, Barbosa J, et al. Detection of *Legionella pneumophila* on clinical samples and susceptibility assessment by flow cytometry [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012, 31 (12): 3351-3357. DOI: 10.1007/s10096-012-1702-y.
- [10] 谢红梅, 胡必杰, 马燕, 等. 1 647 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.  
Xie HM, Hu BJ, Ma Y, et al. Detection of IgM of pathogens causing respiratory tract infections in 1 647 patients [J]. Chin J Nosocomiol, 2012, 22 (12): 2696-2698.
- [11] Elverdel PL, Svarrer 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. DOI: 10.1016/j.mimet.2011.05.022.
- [12] Grottoia A, Forghieri F, Meacci M, et al. Severe pneumonia caused by *Legionella pneumophila* serogroup 11, Italy [J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18 (11): 1911-1913. DOI: 10.3201/eid1811.120216.
- [13] Jarraud S, Descours G, Ginevra C, et al. Identification of *Legionella* in clinical samples [J]. Methods Mol Biol, 2013, 954: 27-56. DOI: 10.1007/978-1-62703-161-5\_2.
- [14] Izumikawa K, Akamatsu S, Kageyama A, et al. Evaluation of a rapid immunochromatographic ODK0501 assay for detecting *Streptococcus pneumoniae* antigen in sputum samples from patients with lower respiratory tract infection [J]. Clin Vaccine Immunol, 2009, 16 (5): 672-678. DOI: 10.1128/CVI.00308-08.
- [15] 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. DOI: 10.1128/JCM.01808-15.
- [16] Beauté J, Zucs P, de Jong B, et al. Legionnaires disease in Europe, 2009-2010 [J]. Euro Surveill, 2013, 18 (10): 20417.
- [17] Wiersinga WJ, Bonten MJ, Boersma WG, et al. SWAB/NVALT (Dutch Working Party on Antibiotic Policy and Dutch Association of Chest Physicians) guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults [J]. Neth J Med, 2012, 70 (2): 90-101.
- [18] Benitez AJ, Winchell JM. Clinical application of a multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Legionella species*, *Legionella pneumophila*, and *Legionella pneumophila* serogroup 1 [J]. J Clin Microbiol, 2013, 51 (1): 348-451. DOI: 10.1128/JCM.02510-12.
- [19] Strålin K. Usefulness of aetiological tests for guiding antibiotic therapy in community-acquired pneumonia [J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 31 (1): 3-11. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2007.06.037.
- [20] Butler JC, Bosshardt SC, Phelan M, et al. Classical and latent class analysis evaluation of sputum polymerase chain reaction and urine antigen testing for diagnosis of pneumococcal pneumonia in adults [J]. J Infect Dis, 2003, 187 (9): 1416-1423. DOI: 10.1086/374623.
- [21] McAvin JC, Reilly PA, Roudabush RM, et al. Sensitive and specific method for rapid identification of *Streptococcus pneumoniae* using real-time fluorescence PCR [J]. J Clin Microbiol, 2001, 39 (10): 3446-3451. DOI: 10.1128/JCM.39.10.3446-3451.2001.
- [22] Morozumi M, Nakayama E, Iwata S, et al. Simultaneous detection of pathogens in clinical samples from patients with community-acquired pneumonia by real-time PCR with pathogen-specific molecular beacon probes [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44 (4): 1440-1446. DOI: 10.1128/JCM.44.4.1440.
- [23] Pimentel L, McPherson SJ. Community-acquired pneumonia in the emergency department: a practical approach to diagnosis and management [J]. Emerg Med Clin North Am, 2003, 21 (2): 395-420. DOI: 10.1016/S0733-8627(03)00019-1.
- [24] 陈旭, 肖淑珍, 董丹凤, 等. 实时荧光定量 PCR 在快速检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌中的应用评估 [J]. 检验医学, 2012, 27 (12): 1035-1039.  
Chen X, Xiao SZ, Dong DF, et al. Application evaluation of the real-time fluorescence quantitative PCR in the rapid identification of MRSA [J]. Lab Med, 2012, 27 (12): 1035-1039.
- [25] Benson R, Tondella ML, Bhatnagar J, et al. Development and evaluation of a novel multiplex PCR technology for molecular differential detection of bacterial respiratory disease pathogens [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46 (6): 2074-2077. DOI: 10.1128/JCM.01858-07.
- [26] Thong KL, Lai MY, Teh CSJ, et al. Simultaneous detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* by multiplex PCR [J]. Trop Biomed, 2011, 28 (1): 21-31.
- [27] Ling CL, McHugh TD. Rapid detection of atypical respiratory bacterial pathogens by real-time PCR [J]. Methods Mol Biol, 2013, 943: 125-133. DOI: 10.1007/978-1-60327-353-4\_8.
- [28] Lassaunière R, Kresfelder T, Venter M. A novel multiplex real-time RT-PCR assay with FRET hybridization probes for the detection and quantitation of 13 respiratory viruses [J]. J Virol Methods, 2010, 165 (2): 254-260. DOI: 10.1016/j.jviromet.2010.02.005.
- [29] 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. DOI: 10.1371/journal.pone.0000924.
- [30] 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]. 中国医院感染学杂志, 2008, 18 (1): 140-143. DOI: 10.3321/j.issn.1005-4529.2008.01.048.  
Lu XD, Zhou YP, Yang LZ, et al. Detection technology of multiple respiratory pathogens in clinical specimens [J]. Chin J Nosocomiol, 2008, 18 (1): 140-143. DOI: 10.3321/j.issn.1005-4529.2008.01.048.
- [31] Hoffman n M, Brown EW, Feng PC, et al. PCR-based method for targeting 16S-23S rRNA intergenic spacer regions among *Vibrio species* [J]. BMC Microbiol, 2010, 10 (1): 90. DOI: 10.1186/1471-2180-10-90.
- [32] Zhou Z, Li X, Chen X, et al. Comparison of P1 and 16S rRNA genes for detection of *Mycoplasma pneumoniae* by nested PCR in adults in Zhejiang, China [J]. J Infect Dev Ctries, 2015, 9 (3): 244-253. DOI: 10.3855/jidc.5149.
- [33] Lienard J, Croxatto A, Aeby S, et al. Development of a new *chlamydiales*-specific real-time PCR and its application to respiratory clinical samples [J]. J Clin Microbiol, 2011, 49 (7): 2637-2642. DOI: 10.1128/JCM.00114-11.
- [34] Kawanami T, Yatera K, Fukuda K, et al. Diagnosis of fulminant pneumonia caused by *Legionella pneumophila* serogroup 8 with the sequence analysis of the 16S rRNA gene [J]. Tohoku J Exp Med, 2011, 225 (1): 65-69. DOI: 10.1620/tjem.225.65.