

· 论 著 ·

环介导恒温扩增芯片技术在医院获得性肺炎病原菌检测中的应用

崔立慧^{1,2}, 姚欣¹, 陈名霞³

1. 南京医科大学第一附属医院呼吸与危重症医学科, 江苏 南京 210029;
2. 东南大学附属中大医院呼吸内科, 江苏 南京 210044;
3. 东南大学附属中大医院检验科, 江苏 南京 210044

摘要: **目的** 探讨采用环介导恒温扩增(LAMP)芯片法分析支气管肺泡灌洗液(BALF)病原学在医院获得性肺炎(HAP)患者诊断中的价值。**方法** 回顾性收集2018年12月至2019年12月东南大学附属中大医院457例HAP中同时用LAMP芯片法及常规细菌学培养检测BALF标本的患者82例(男44例,女38例),分析两种方法之间的差异。**结果** 82例患者中,LAMP芯片技术病原体测定阳性有31例,阳性率为37.80%,常规细菌培养阳性27例,阳性率为32.93%。对两种检测方法均可检测的病原体,两种检测方法检测结果一致性较好(Kappa=0.756, $P<0.05$),其中LAMP芯片法与常规细菌培养一致性最高的是鲍曼不动杆菌(18.29% vs 14.63%, Kappa=0.779),铜绿假单胞菌次之(17.07% vs 10.98%, Kappa=0.749),之后为肺炎克雷伯菌(9.76% vs 3.66%, Kappa=0.520);LAMP芯片法对13种病原体检测整体阳性率高于常规细菌培养(74.39% vs 31.71%, $P<0.01$),其中LAMP芯片法对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(8.54% vs 0, $P<0.05$)有更好的检出作用,还能检出普通细菌培养无法明确的结核、军团菌、支原体和衣原体等呼吸道常见病原体。**结论** LAMP芯片方法能够快速检出HAP患者BALF中的常见呼吸道病原体,有助于HAP病原体早期明确,为目标性治疗提供快速可靠的实验室依据。

关键词: 医院获得性肺炎; 支气管肺泡灌洗液; 环介导恒温扩增芯片法; 细菌培养

中图分类号: R446.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2022)04-0451-05

Loop-mediated isothermal amplification chip in the detection of pathogens in hospital acquired pneumonia

CUI Li-hui*, YAO Xin, CHEN Ming-xia

* Department of Respiratory and Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China

Corresponding author: YAO Xin, E-mail: yaoxin@njmu.edu.cn

Abstract: Objective To explore the value of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) chip in analyzing the etiology of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) for diagnosing hospital acquired pneumonia (HAP). **Methods** Of 457 patients with HAP in Zhongda Hospital of Southeast University from December 2018 to December 2019, 82 patients (44 males and 38 females) were selected to take BALF specimens for simultaneous detection of pathogens by LAMP chip and routine bacterial culture. **Results** The positive rates of pathogens were 37.80% (31 cases) detected by LAMP chip and 32.93% (27 cases) detected by routine bacterial culture. There was a good agreement in detecting the pathogens by LAMP chip and conventional bacterial culture (Kappa=0.756, $P<0.05$), especially in *Acinetobacter baumannii* (18.29% vs 14.63%, Kappa=0.779), followed by *Pseudomonas aeruginosa* (17.07% vs 10.98%, Kappa=0.749) and *Klebsiella pneumoniae* (9.76% vs 3.66%, Kappa=0.520). The overall positive rate for 13 pathogens detection by LAMP chip was

DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2022.04.002

基金项目: 江苏省医学重点人才项目(ZDRCA2016020)

通信作者: 姚欣, E-mail: yaoxin@njmu.edu.cn

出版日期: 2022-04-20

statistically higher than that by bacterial culture (74.39% vs 31.71%, $P < 0.01$). LAMP chip method had the better detection effect on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (8.54% vs 0, $P < 0.05$) and common respiratory pathogens, such as *Tubercle bacilli*, *Legionella*, *Mycoplasma* and *Chlamydia*, which weren't determined by ordinary bacterial culture.

Conclusion LAMP chip can quickly detect common respiratory pathogens in BALF of HAP patients, which is helpful for the early identification of HAP pathogens and provides rapid and reliable laboratory evidence for targeted treatment.

Keywords: Hospital acquired pneumonia; Bronchoalveolar lavage fluid; Loop-mediated isothermal amplification; Bacterial culture

Fund program: Key Medical Talents Program of Jiangsu Province(ZDRCA2016020)

病原学信息的及时获取及开展目标性治疗是改善医院获得性肺炎(hospital acquired pneumonia, HAP)患者预后的关键。细菌分离培养是目前常用的明确病原体的方法,但存在培养时间长、往往需要不同培养条件,以及部分病原体无法覆盖等不足,不能满足临床需求^[1-3];此外,尽管近年来病原学二代测序开始在临床上应用,为病原学识别提供了新思路,但检测所涉及的样本制备要求、检测时间、报告解读,以及医院对检测设施的可达性等因素,使其在临床的应用受到很大限制^[4]。

近年来出现的环介导恒温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)芯片技术,其检测耗时短,能够对多种常见病原体基因进行同时检测^[5-8],使迅速明确呼吸道病原学信息成为可能。国内有研究者近年采用该方法开展了下呼吸道感染患者痰液病原微生物的检测和分析,初步证实了其临床应用价值^[9-11]。由于支气管肺泡灌洗液(BALF)与痰液相比,几乎很少受到口腔细菌的污染,能更好体现下呼吸道病原学信息,可能有较好的诊断价值。笔者对近年来采用LAMP芯片法开展HAP患者BALF病原学检测的数据进行系统分析,并对照患者同期进行的常规细菌学培养数据,探讨LAMP芯片法在HAP诊治中的临床应用价值。

1 对象与方法

1.1 研究对象 收集2018年12月1日至2019年12月31日东南大学附属中大医院所有HAP患者的相关临床信息及辅助检查结果,包括BALF的LAMP芯片法和常规细菌学培养等;入组患者皆与2018版《中国成人HAP与呼吸机相关性肺炎(VAP)诊断和治疗指南》诊断标准相符。研究获东南大学附属中大医院伦理委员会批准,批件号020ZDSYLL197-P01。共457例HAP患者,选取其中82例患者(男44例,女38例),取BALF的同时开展LAMP芯片法和常规细菌培养。

1.2 试剂及仪器 LAMP芯片法试剂盒及晶芯RTis-

ochip™-A恒温扩增微流控芯片核酸分析仪(cat:170010-0315)均购自北京博奥晶典生物技术;病原体分离培养所用试剂(哥伦比亚血琼脂培养基、巧克力血琼脂平板嗜血型、MH琼脂平板、念珠菌鉴别琼脂)及MicroScan WalkAway 96 PLUS全自动细菌鉴定仪(cat:WalkAway968509)皆为德国西门子品牌。

1.3 检测方法

1.3.1 LAMP芯片法 步骤参考试剂盒说明书。自BALF标本内将病原体DNA提取出来,通过具备链置换作用的聚合酶于65℃恒温时实施靶基因扩增,同时借助荧光染料掺入技术开展实时荧光测定,应用恒温扩增+微流控碟式芯片技术,整个测定工作于恒温扩增微流控芯片核酸分析仪(RTisochip™-A)中实施,并测定以下13类下呼吸道病原体:肺炎链球菌(Spn)、金黄色葡萄球菌(Sau)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MecA)、大肠埃希菌(Eco)、肺炎克雷伯菌(Kpn)、铜绿假单胞菌(Pae)、鲍曼不动杆菌(Aba)、嗜麦芽窄食单胞菌(Sma)、流感嗜血杆菌(Hin)、嗜肺军团菌(Lpn)、肺炎支原体(Mpn)、肺炎衣原体(Cpn)、结核分枝杆菌复合群(Mtb)。每次检测分别设置阴性和阳性对照,检验结果以荧光曲线形式体现,扩增曲线呈“S”型即判定为阳性,扩增曲线呈水平直线即判定为阴性。

1.3.2 普通细菌培养法 用无菌拭子挑取适量(足够接种平板和涂片)BALF标本,分别接种于哥伦比亚血琼脂培养基、巧克力血琼脂平板嗜血型、MH琼脂平板、念珠菌鉴别琼脂,分区划线后立即培养。将接种的哥伦比亚血琼脂培养基、巧克力血琼脂平板嗜血型、MH琼脂平板、念珠菌鉴别琼脂放二氧化碳培养箱(CO₂ 5%)35℃条件下培养24h,隔天取出观察平板菌落形态。借助全自动细菌鉴定仪(MicroScan WalkAway 96 PLUS),对可疑菌落实施鉴定。

1.4 统计学方法 分析工具为SAS软件。计数资料采用例数或率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验和校正 χ^2 检验;对痰培养和LAMP法均检出的常见病原菌,两组间的整体阳性率比较采用CMH检验;LAMP

芯片法和普通细菌培养法检测结果之间一致性通过 Kappa 系数进行评价。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LAMP 芯片法与普通细菌培养法阳性率 82 例患者中, LAMP 芯片法检测呈阳性者 31 例 (37.80%), 普通细菌培养法阳性 27 例 (32.93%)。

2.2 LAMP 芯片法与普通细菌培养法各病原体分布情况 两种技术测定所得病原体分布状况见表 1、表 2(因同一患者可发生不同病原体感染,故表 1 病原体阳性例数合计值 61 例大于所测阳性患者 31 例;因同样原因,且未纳入不在 LAMP 芯片法检测范围的病例,故表 2 病原体阳性例数合计值 26 例不等于所测阳性患者 27 例)。另外,通过普通细菌培养方法检测出黏质沙雷菌、臭鼻克雷伯菌、污染伯克霍尔德菌各 1 例,超出 LAMP 芯片法检测范围;相反通过 LAMP 芯片法检测出 1 例普通细菌培养难以明确的结核分枝杆菌。

2.3 LAMP 芯片法和普通细菌培养法检测结果的一致性分析 在 82 例样本中,LAMP 芯片法检测有 31 例阳性结果,这 31 例样本的普通细菌培养结果显示 23 例阳性,8 例阴性。LAMP 检测有 51 例阴性结果,这 51 例样本的普通细菌培养结果显示 50 例阴性,1 例阳性。普通细菌培养法检测阳性 27 例,在表 3 中,将不在 LAMP 芯片法检测范围的 3 例归为阴性,则该法阳性为 24 例,阴性为 58 例。剔除了普通细菌培养检测出来的 3 例不在 LAMP 芯片法检测范围内的病例及普通细菌培养难以检测出来的结核、军团菌、支原体和衣原体,利用 95% CI 的 Kappa 系数进一步分析总的一致性及各病原体的测定一致性(表 3、表 4)。LAMP 芯片法与普通细菌培养法符合率较高 (Kappa = 0.756, 95% CI: 0.608~0.903, $P < 0.05$), 一致性最高的细菌是 Aba (Kappa = 0.779, 95% CI: 0.594~0.964, $P < 0.05$), 其次为 Pae (Kappa = 0.749, 95% CI: 0.543~0.955, $P < 0.05$), 以及 Kpn (Kappa = 0.520, 95% CI: 0.162~0.878, $P < 0.05$)。一致性表现不佳的是 Sau 与 MecA, 普通细菌培养技术没有检出。

2.4 普通细菌培养法、LAMP 芯片法对各病原体测定的阳性率 对两种检测方法都可检测的病原体,两组间的整体阳性率比较结果:LAMP 芯片法检测的 13 种病原体整体阳性率高于普通细菌常规培养 ($P < 0.01$),其中 LAMP 芯片法 MecA 的检出率高于普通细菌培养法 ($P < 0.05$)。见表 5。

表 1 LAMP 芯片法病原体分布 (n=82)

Tab. 1 Pathogen distribution of LAMP chip (n=82)

病原体	感染例数	阳性率 (%)	病原体	感染例数	阳性率 (%)
Spn	3	3.66	Sma	2	2.44
Sau	5	6.10	Hin	4	4.88
MecA	7	8.54	Lpn	0	0
Eco	3	3.66	Mpn	0	0
Kpn	8	9.76	Cpn	0	0
Pae	14	17.07	Mtb	1	1.22
Aba	15	18.29			

表 2 普通细菌培养法病原体分布 (n=82)

Tab. 2 Pathogen distribution of common bacterial culture (n=82)

病原体	感染例数	阳性率 (%)	病原体	感染例数	阳性率 (%)
Spn	0	0	Sma	0	0
Sau	0	0	Hin	1	1.22
MecA	0	0	Lpn	0	0
Eco	1	1.22	Mpn	0	0
Kpn	3	3.66	Cpn	0	0
Pae	9	10.98	Mtb	0	0
Aba	12	14.63			

表 3 LAMP 芯片法与普通细菌培养法的检测符合率比较 (例)

Tab. 3 Comparison of detection coincidence rate between LAMP and common bacterial culture (case)

LAMP 芯片法	普通细菌培养法		合计	Kappa 值	95% CI	P 值
	+	-				
+	23	8	31	0.756	0.608~0.903	<0.05
-	1	50	51			
合计	24	58	82			

表 4 LAMP 芯片法与普通细菌培养法对 13 种病原体检测的一致性比较 (n=82, 例)

Tab. 4 Comparison of the consistency in detection of 13 pathogens between LAMP and common bacterial culture (n=82, case)

病原体		LAMP (+)	LAMP (-)	Kappa 值	95% CI	P 值
Spn	培养 (+)	0	0	-	-	-
	培养 (-)	3	79			
Sau	培养 (+)	0	0	-	-	-
	培养 (-)	5	77			
MecA	培养 (+)	0	0	-	-	-
	培养 (-)	7	75			
Eco	培养 (+)	0	1	-0.019	-0.047~0.009	0.845
	培养 (-)	3	78			
Kpn	培养 (+)	3	0	0.520	0.162~0.878	<0.05
	培养 (-)	5	74			
Pae	培养 (+)	9	0	0.749	0.543~0.955	<0.05
	培养 (-)	5	68			
Aba	培养 (+)	11	1	0.779	0.594~0.964	<0.05
	培养 (-)	4	66			
Sma	培养 (+)	0	0	-	-	-
	培养 (-)	2	80			
Hin	培养 (+)	1	0	0.388	-0.150~0.926	<0.05
	培养 (-)	3	78			

注: Mpn、Cpn、Mtb 未列入。

表 5 LAMP 芯片法与普通细菌培养法对 13 种病原体检测阳性率比较 [n=82,例(%)]

Tab. 5 Comparison of positive rates of 13 pathogens between LAMP and common bacterial culture [n=82,case(%)]

病原体	LAMP 芯片法	普通细菌培养法	χ^2 值	P 值
Spn	3(3.66)	0	1.358	0.244
Sau	5(6.10)	0	3.301	0.069
MecA	7(8.54)	0	5.372	0.020
Eco	3(3.66)	1(1.22)	0.256	0.613
Kpn	8(9.76)	3(3.66)	2.436	0.119
Pae	14(17.07)	9(10.98)	1.264	0.261
Aba	15(18.29)	12(14.63)	0.399	0.528
Sma	2(2.44)	0	0.506	0.477
Hin	4(4.88)	1(1.22)	0.825	0.364
合计	61(74.39)	26(31.71)	29.990	<0.001

注:Mpn、Cpn、Mtb 未列入。

3 讨论

本研究首次就 HAP 患者 BALF 通过 LAMP 芯片法进行病原学检测,并与普通细菌培养结果进行对比分析,结果表明这两种检测方法存在高度一致性,Kappa 值为 0.756,其中一致性最高的是 Aba,其次是 Pae、Kpn、Hin。与普通细菌培养法相比,LAMP 芯片法检测的 13 种病原体整体阳性率高于普通细菌常规培养法,尤其是 LAMP 芯片法对 MecA 病原体的阳性检出率显著高于常规细菌培养法;此外,LAMP 芯片法检测范围中,除常见 HAP 病原体外,还能检出普通细菌培养无法明确的结核、军团菌、支原体和衣原体等呼吸道常见病原体。

作为一类对死亡造成威胁的疾病^[12],HAP 可导致患者与社会承受巨大的经济压力^[13-14],严重浪费医疗卫生资源,及时明确 HAP 病原学对疾病的处理十分关键。Liu 等^[15]通过回顾性研究得出,即使在 6 h 内就接受抗微生物药物治疗的患者中,每延迟 1 h 使用抗微生物药物都会增加医院死亡率的风险。痰液是常用检测标本,但其途经口咽部易受到污染,BALF 通过气管镜直接到达感染部位,通过肺泡灌洗的方式直接取得标本,则被污染可能性减小,对明确病原体更具有临床意义^[16]。因此,多个指南中指出,获取 BALF 进行检测是侵入性诊断肺炎的首选技术^[17]。

LAMP 芯片法是 2000 年由 Notomi 等^[18]研发的一种技术,目前已经逐渐进入临床应用阶段。该方法采用具有链置换 DNA 聚合酶和一组特异引物,能够同时完成多种病原微生物的特征基因扩增,因此可放大标本中的微量病原体信息,具有较好敏感性。本研究 LAMP 芯片法检测病原体总阳性率高于普通培养

法,特别是表现在 MecA 病原菌。LAMP 芯片法较普通培养法 MecA 检出率增高的原因可能是:(1) LAMP 芯片法敏感性较高;(2) 葡萄球菌属对普通培养的技术要求比较高,按照操作指南^[19],仅当培养生长的葡萄球菌是优势菌,且涂片提示这些细菌与感染相关时才报告。此外,LAMP 芯片法对 Hin、Spn 检出率高的原因,一方面与 LAMP 芯片法敏感性高有关,另一方面与这两种细菌是苛养菌有关^[20],由于苛养菌是最常见的肺部感染病原体,标本盒里细菌于室温条件极易发生自溶死亡,若无法于样本采集 2 h 内进行接种,可使检出率下降,故在常规培养基上生长难度大和上述现象相关,易发生漏诊。

与普通培养法比较,LAMP 芯片法在检测支原体、军团菌等非典型病原体以及结核分枝杆菌群方面具有较大优势^[21-24],因为上述病原体培养除需要特殊培养基外,有时需要用聚合酶链反应(PCR)或血清学检测等方法来辅助诊断^[25-27];特别是结核分枝杆菌群检测,现阶段主要依靠涂片抗酸染色,该技术无法有效鉴别结核分枝杆菌和其它抗酸杆菌,灵敏性不佳,且对痰中细菌含量要求高(>5 000~10 000 CFU/ml),而结核杆菌的培养方法需要 2 周以上才能得到初步结果,容易出现漏诊而延误治疗时机^[28]。LAMP 芯片法检测耗时较短,系列反应在 2 h 内即可完成多个病原体的检测,大大缩短确诊所需时间。

但 LAMP 芯片法检测也有一定局限性,如仅主要针对常见呼吸系统感染性疾病(包括社区获得性肺炎、HAP、慢性支气管炎急性发作、支气管扩张合并感染、肺结核病)常见的 13 种病原体,而普通细菌培养法可以培养出 LAMP 芯片法检测范围之外的其他可能的少见致病菌。比如本研究通过普通细菌培养法在各 1 例 BALF 中检测出黏质沙雷菌、臭鼻克雷伯菌、污染伯克霍尔德菌,而 LAMP 芯片法无法检测。

综上所述,对 HAP 患者的 BALF 使用 LAMP 芯片法进行病原体检测,与普通细菌培养法相比,检测结果具有较好的准确性,且具有快速、敏感、操作便捷的优点;在 HAP 患者病程的早期,即可快速地获得常见呼吸道病原体相关信息,以便针对性使用抗菌药物。

参考文献

- [1] Mandell LA. Community-acquired pneumonia: an overview [J]. Postgrad Med, 2015, 127(6): 607-615.
- [2] 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-S99.
- [3] Chi SY, Kim TO, Park CW, et al. Bacterial pathogens of ventilator associated pneumonia in a tertiary referral hospital [J]. Tuberc Respir Dis (Seoul), 2012, 73(1): 32-37.
- [4] Li Y, Sun B, Tang X, et al. Application of metagenomic next-generation sequencing for bronchoalveolar lavage diagnostics in critically ill patients[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2020, 39(2): 369-374.
- [5] Wong YP, Othman S, Lau YL, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of microorganisms[J]. J Appl Microbiol, 2018, 124(3): 626-643.
- [6] Dehghan Esmatabadi MJ, Bozorgmehr A, Motalebzadeh H, et al. Techniques for evaluation of LAMP amplicons and their applications in molecular biology[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(17): 7409-7414.
- [7] Dhama K, Karthik K, Chakraborty S, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP): a new diagnostic tool lights the world of diagnosis of animal and human pathogens; a review[J]. Pak J Biol Sci, 2014, 17(2): 151-166.
- [8] Obande GA, Banga Singh KK. Current and future perspectives on isothermal nucleic acid amplification technologies for diagnosing infections[J]. Infect Drug Resist, 2020, 13: 455-483.
- [9] Mauk M, Song JZ, Liu CC, et al. Simple approaches to minimally-instrumented, microfluidic-based point-of-care nucleic acid amplification tests[J]. Biosensors, 2018, 8(1): 17.
- [10] Etchebarne BE, Li Z, Stedtfeld RD, et al. Evaluation of nucleic acid isothermal amplification methods for human clinical microbial infection detection[J]. Front Microbiol, 2017, 8: 2211.
- [11] Ahmad F, Hashsham SA. Miniaturized nucleic acid amplification systems for rapid and point-of-care diagnostics: a review[J]. Anal Chimica Acta, 2012, 733: 1-15.
- [12] Society AT, America IDSO. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 171(4): 388-416.
- [13] Vincent JL. Nosocomial infections in adult intensive-care units[J]. Lancet, 2003, 361(9374): 2068-2077.
- [14] Diaz E, Rodríguez AH, Rello J. Ventilator-associated pneumonia; issues related to the artificial airway[J]. Respir Care, 2005, 50(7): 900-906.
- [15] Liu VX, Fielding-Singh V, Greene JD, et al. The timing of early antibiotics and hospital mortality in Sepsis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2017, 196(7): 856-863.
- [16] Cabrera-Rubio R, Garcia-Núñez M, Setó L, et al. Microbiome diversity in the bronchial tracts of patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(11): 3562-3568.
- [17] Woodhead M, Blasi F, Ewig S, et al. Guidelines for the management of adult lower respiratory tract infections--full version [J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17 Suppl 6: E1-59.
- [18] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): E63.
- [19] 国家卫生和计划生育委员会. 下呼吸道感染细菌培养操作指南: WS/T 499—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017. National Health and Family Planning Commission. Guide for bacterial culture of lower respiratory tract infection: WS/T 499—2017[S]. Beijing: China Standard Press, 2017.
- [20] 中华预防医学会医院感染控制分会. 临床微生物标本采集和送检指南[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(20): 3192-3200. Hospital Infection Control Branch of Chinese Society for Preventive Medicine. Guide for collection and examination of clinical microbiological specimens [J]. Chin J Nosocomiol, 2018, 28(20): 3192-3200.
- [21] Cai ZH, Dai YY, Huang LY, et al. Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* by loop-mediated isothermal amplification: systematic review and meta-analysis[J]. BMC Infect Dis, 2019, 19(1): 173.
- [22] Sharma G, Tewari R, Dhatwalia SK, et al. A loop-mediated isothermal amplification assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis [J]. Lett Appl Microbiol, 2019, 68(3): 219-225.
- [23] Kim CK, Cho EA, Shin DM, et al. Comparative evaluation of the loop-mediated isothermal amplification assay for detecting pulmonary tuberculosis[J]. Ann Lab Med, 2018, 38(2): 119-124.
- [24] 刘权贤, 郭定涛, 陈玲, 等. 环介导等温扩增技术在结核性脑膜炎早期诊断中的应用价值[J]. 中国临床研究, 2021, 34(12): 1626-1629. Liu QX, Guo DT, Chen L, et al. Loop-mediated isothermal amplification in the early diagnosis of tuberculous meningitis[J]. Chin J Clin Res, 2021, 34(12): 1626-1629.
- [25] Meyer Sauter PM, Unger WWJ, Nadal D, et al. Infection with and carriage of *Mycoplasma pneumoniae* in children[J]. Front Microbiol, 2016, 7: 329.
- [26] Avni T, Bieber A, Green H, et al. Diagnostic accuracy of PCR alone and compared to urinary antigen testing for detection of *Legionella* spp.: a systematic review [J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(2): 401-411.
- [27] Sharma L, Losier A, Tolbert T, et al. Atypical pneumonia: updates on *Legionella*, *Chlamydia*, and *Mycoplasma pneumoniae* [J]. Clin Chest Med, 2017, 38(1): 45-58.
- [28] Acharya B, Acharya A, Gautam S, et al. Advances in diagnosis of Tuberculosis: an update into molecular diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(5): 4065-4075.