

基于质谱的呼气分析在新型冠状病毒肺炎诊断中的潜力和前景

刘宜平 郭雷 李恩有
哈尔滨医科大学附属第一临床医学院麻醉科 150001
通信作者: 李恩有, Email: enyouli@sina.com

【摘要】 新型冠状病毒肺炎已成为全球流行性疾病, 其实验室诊断方法仍存在假阴性及假阳性。呼气分析作为肺部疾病的诊断和监测手段, 由于其无创、快捷简便的优点已经受到广泛关注。随着质谱技术不断进步, 越来越多的呼气分析被用于微生物鉴别以及呼气挥发性有机物诊断。这篇文章针对基于质谱技术的呼气分析及用于病毒诊断的研究进行综述, 以展望其用于诊断新型冠状病毒肺炎的可能性。

【关键词】 质谱法; 呼气分析; 新型冠状病毒肺炎; 无创诊断
DOI: 10.3760/cma.j.cn131368-20200310-00147

The potential and prospect of breath analysis based on mass spectrometry in the diagnosis of COVID-19
Liu Yiping, Guo Lei, Li Enyou
Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China
Corresponding author: Li Enyou, Email: enyouli@sina.com

【Abstract】 COVID-19 has become a global pandemic disease, and its laboratory diagnostic methods still have false negative and false positive results. Breath analysis, as a non-invasive, fast and simple method for lung diseases diagnosis, has been widespread attentioned. With the development of mass spectrometry technology, more and more breath analysis methods had been used for microbial identification and breath volatile organic compounds measurement. In this article a review is carried out on these methods to evaluate the possibility for diagnosis of COVID-19 based on mass spectrometry technology.

【Key words】 Mass spectrometry; Breath analysis; COVID-19; Non-invasive diagnosis
DOI: 10.3760/cma.j.cn131368-20200310-00147

新型冠状病毒肺炎 (COVID-19), 是严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 感染导致的肺炎, 全球感染病例已超过 640 万, 死亡病例超过了 38 万, 在世界范围内带来了巨大的社会和经济影响^[1]。对于引起 COVID-19 的 SARS-CoV-2 检测是 COVID-19 诊断的重要标准。然而目前应用的分子检测方法对采样技术要求很高, 而且具有较高的假阴性率和假阳性率, 这对 COVID-19 的诊断产生很大影响^[2-3]。

日前英国诺桑布利亚大学官网公布, 该学校的科研团队研发了一种呼吸检测仪器, 可以通过收集人们呼吸的气体来诊断是否感染 SARS-CoV-2。这种仪器不仅能用于 COVID-19 诊断, 还可以用于诊断其他肺部疾病。与传统的胸部 CT 相比, 呼吸诊断痛苦小, 耗时短, 易操作, 这种仪器一旦成功投入使用, 将大大革新全球 COVID-19 的

诊断流程。虽然目前呼气分析用于诊断 COVID-19 的技术尚未实现, 但是随着高分辨率质谱技术的不断进步, 以及代谢组学方法用于诊断呼吸道疾病的大量研究^[4-5], 本文拟对基于质谱的呼气检测技术用于呼吸道病毒的诊断作一综述, 以期对 COVID-19 的早期快速诊断提供一种新的研究思路。

1 呼气分析的样本类型

长期以来, 人的呼吸及尿液和血液一直是评估人体健康和环境暴露的 3 种主要生物介质。正如希波克拉底在公元前 400 年所描述的那样, 检测人类呼吸中的异味是第一个分析健康的评估工具。尽管与现代生物流体分析相比, 呼气检测不那么普遍, 但由于其采样是非侵入性的, 采样时间和样本量不受限制, 并且不需要临床专业技术人员, 呼气检测已成为一种有吸引力的诊断方法^[6]。呼气样本的类型包括气相呼气、呼气冷凝物 (exhaled breath

condensate, EBC) 和呼气气溶胶 (exhaled breath aerosol, EBA)。

1.1 气相呼气 传统的呼气检测样本大多数为气相呼气。人体吸入和暴露后,挥发性有机物 (volatile organic compounds, VOCs) 会保留在人体的不同部位,具体取决于它们的气体-血液-脂肪分配系数^[7]。VOCs 可以由吸入、口服或皮肤吸收 (例如汽油、食物、乳液) 引起的外源性环境暴露或来自体内的内源性代谢产物 (例如微生物代谢、恶性肿瘤) 产生^[8]。肺泡气仅由呼吸末的 350 ml 气体组成,目前已经有许多呼气采样技术可以仅收集肺泡气^[9]。

1.2 EBC 呼吸道的所有部位直至肺泡表面都被黏液层覆盖,该黏液层可以被雾化并携带各种非挥发性成分^[10],EBC 是将多次呼吸通过冷管后回收冷凝物,它提供了以前未知的全新化合物^[11]。通过 EBC 的酸碱度 (pH 值) 检测已开发了“在家”收集和监测的儿童支气管哮喘状态的方法^[12]。EBC 分析的另一个应用是对机械通气患者收集冷凝物,这对于不能多次采集血液或尿液的早产儿^[13]以及评估 ARDS 的机械通气患者^[14]都非常重要。

1.3 EBA EBA 代表总 EBC 的一部分,并针对较大的分子,例如脂肪酸和细胞因子,以及蛋白质,病毒和细菌^[15-17]。该技术具有采样方法简单的优势,受试者只需在给定的时间 (如 10 min) 内佩戴标准的医用口罩,即可将其运回实验室并进行各种目标化合物分析。除生物介质外,还可以使用 EBA 检测颗粒物和纳米颗粒,例如人们发现职业接触二氧化钛和氧化铁纳米颗粒的员工在 EBC 样品中显示出明显增加的钛和氧化应激标志物^[18]。EBA 还可用于识别疾病的特征性指纹谱,细菌、病毒和健康个体的指纹谱都可以通过分析 EBA 来区分^[19-20]。

2 常用的呼气检测质谱技术

质谱 (mass spectrometry, MS) 是一种测量离子质荷比的分析技术,适用于纯样品以及复杂的混合物分析。在经典的 MS 过程中,通过用电子轰击将固态、液态或气态样品电离,导致样品中的某些分子破裂成带电的片段,或者只是变得带电而没有碎裂。然后根据这些离子的质荷比将它们分离。常用的呼吸检测的质谱技术包括气相色谱-质谱 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)、液相色谱-质谱 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)、直接质谱及其他软电离质谱技术。

2.1 GC-MS 技术 GC-MS 是目前大部分呼气检测应用的技术,这种方法的优势在于可以同时分析多种呼出气 VOCs 的准确水平及在不同人群中的差异,快速确定疾病特异性的 VOCs 种类。气相色谱飞行时间质谱仪 (time of flight, TOF) 较传统的 GC-MS 更快,以其高分辨率和准确度获得数据^[21]。Peralbo-Molina 等^[22]最近开发了一种利用液-液萃取和气相色谱飞行时间质谱仪 (gas chromatography-time of flight-mass spectrometry, GC-TOF-MS) 进行代谢组学分析 EBC 样品的方法,并证实了 EBC 样本作为区分肺癌和危险因素组生物介质的潜力。Schnabel 等^[23]比较了疑似呼吸机相关性肺炎患者的呼吸样

品,鉴定出区分患病组和非患病组的 12 种 VOCs。GC-TOF-MS 也已用于分析嗜酸性粒细胞和嗜中性粒细胞的细胞顶空,以鉴定与炎症和氧化应激相关的 VOCs^[24]。二维气相色谱结合飞行时间质谱是一种更有效的高分辨率多维技术,它的应用增加了呼吸样品中可检测到的 VOCs 数量。多维气相色谱与一维气相色谱相比具有更大优势,因为它使用 2 个毛细管气相色谱色谱柱分离共洗脱的 VOCs,并将代谢组学中 VOCs 的覆盖范围增加了一个数量级^[25]。在 Philips 等^[26]的一项研究中,从健康志愿者的肺泡呼吸样品中鉴定出 2 000 种 VOCs,其中一些以前从未在呼吸中检测到。

2.2 LC-MS 技术 除了 GC-MS 外,LC-MS 经常被用于分析呼吸和 EBC 样品,尽管可以使用 GC-MS 仪器相对容易地分析呼吸样本,但 EBC 和 EBA 样品基质中组分的浓度较低,需要大量的制备程序,这使这些样品比呼气更难操作^[27]。EBC 和 EBA 样品均可以液体形式获得,因此适用于 LC-MS 分析。样品可以直接注入仪器中,也可以提取以进一步分析。由于保留时间漂移较大,LC/MS 数据的可变性较大^[28],具有高分辨率的 MS,例如四极杆飞行时间串联质谱或 Orbitrap 质谱,增加了呼气样品非靶向分析的可靠性。已有多项研究使用高分辨率 LC-MS 分析 EBC 样品的蛋白质谱^[29-30]。Muccilli 等^[29]从 9 名健康受试者中采集 EBC 样品,使用 Orbitrap-Elite 质谱仪对消化的蛋白质进行 LC-MS/MS 分析并鉴定出 163 种基因产物。Fumagalli 等^[30]使用线性离子阱静电轨道阱组合式高分辨质谱对来自非吸烟者、健康吸烟者以及患有 COPD 的 EBC 样本进行了区分。

2.3 直接质谱技术 质子转移反应质谱法直接质谱技术是一种快速直接的质谱方法,能够以呼吸到呼吸的分辨率进行实时分析。在直接质谱技术中,万亿分之一水平的检测限已经实现。某些直接质谱技术仪器包含四极质量分析仪,其已用于评估呼气 VOCs,以及来自糖代谢的碳酸醇和短链脂肪酸的 VOCs^[31]。选择离子流动管质谱使用正离子 (H_3O^+ 、 NO^+ 和 O_2^+) 或负离子 (O^- 、 OH^- 、 O_2^- 、 NO_2^- 和 NO_3^-) 试剂的化学电离提供呼吸中 VOC 的实时测量,检测限达到万亿分之一,使其成为快速分析的灵敏技术^[32]。离子迁移谱仪器结构紧凑,对于检测十亿分之一浓度以下的醛和酮有较大优势^[33]。由于其体积小和便携性的优势,使其更适合于现场检测^[34]。离子迁移谱还可以用于监测麻醉过程中使用丙泊酚镇静患者的呼出气痕量丙泊酚浓度^[35]。

2.4 其他软电离质谱技术 自 20 世纪 80 年代,随着电喷雾和基质辅助激光解析等“软电离”技术的出现,质谱开始用于分析高极性、难挥发和热不稳定样品,尤其适用于蛋白质序列分析和翻译后修饰分析。电喷雾电离技术由 Masamichi Yamashita 和 John Fenn 于 1984 年首次报道,这种用于生物大分子分析的技术获得了 2002 年诺贝尔化学奖^[36]。它解决了大分子在电离时易碎的问题,因此适合于大分子离子检测,并且溶液液相信息可以保留在气相中。

由于其 MS 中仅能获得非常少的结构信息, 因此常将电喷雾与串联质谱耦合以克服此缺点。基质辅助激光解吸/电离 (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) 与电喷雾电离的特征相似, 它的原理是使用激光能量吸收基质, 从具有最小碎片的大分子中产生离子。MALDI 最广泛使用的质谱仪类型是 TOF, 这是因为它检测的质量范围很大, 同时 TOF 检测程序也非常适合 MALDI 电离过程。

3 质谱技术用于呼吸道病毒的诊断

由于病毒能够影响宿主的代谢途径, 例如糖酵解、磷酸戊糖途径、谷氨酰胺分解及脂肪酸合成, 因此病毒感染后的 VOCs 可能发生变化^[37]。2010 年 Phillips 等^[38]首次报道了减毒活流感疫苗接种对呼吸中氧化应激产物的影响, 发现健康人的减毒活流感疫苗接种引起了氧化应激的呼吸生物标记物的持续增加。2014 年 Aksenov 等^[39]应用 GC-MS 研究了人鼻病毒感染的体外气道细胞的 VOCs, 随后 Abd 等^[40]研究了从 5 种病毒 [甲型流感病毒 (Influenza A virus, IAV) 甲型流感、乙型流感病毒、腺病毒、呼吸道合胞病毒和副流感病毒] 以及 3 种细菌 (卡他莫拉菌、流感嗜血杆菌和肺炎军团菌) 的培养物和菌落 VOCs 中, 鉴定出与感染细菌有关的 2 种重要的 VOCs, 即庚烷和甲基环己烷。2018 年 Purcaro 等^[41]应用顶空固相微萃取——全二维气相色谱飞行时间质谱法得到了病毒感染细胞的指纹图谱, 并评估了 2 种重要的呼吸道病毒, 即呼吸道合胞病毒和 IAV, 结果在呼吸道合胞病毒和感染的细胞培养物中均观察到碳氢化合物过量。这一发现与增加的氧化应激结果相一致, 因此断定氧化应激与呼吸道病毒感染有关。Traxler 等^[42]应用 GC-MS 分析了感染 IAV 的猪的呼出气 VOCs, 发现 6 种 VOCs 可能与疾病进展有关, 包括乙醛、丙醛、乙酸正丙酯、甲基丙烯酸甲酯、苯乙烯和 1,1-二氧基丙烷。随后其研究团队在 2019 年分析了 IAV 和化脓性链球菌共感染的细胞的 VOCs^[43], 认为乙醛和丙醛的排放增加反映出细菌感染, 乙酸正丙酯与病毒感染有关。Schultz 等^[44]应用 LC-MS/MS 检测 IAV 感染猪模型的免疫相关脂质组 (类花生酸) 学影响, 结果发现 IAV 感染会导致所分析的羟基二十碳三烯酸、羟基二十二碳六烯酸和环氧二十碳三烯酸的水平发生集体变化。

近日来几项研究先后报道了 LC-MS 用于检测 SARS-CoV-2 病毒相关蛋白。Gouveia 等^[45]应用串联质谱法在 SARS-CoV-2 病毒的体外研究中发现, 受感染 Vero 细胞存在 6 个病毒蛋白的 101 个肽段, 并提出 14 种肽的候选清单, 可用于靶向质谱检测的开发以及 SARS-CoV-2 的诊断。Gordon 等^[46]在人体细胞中克隆、标记、表达了 26 种 SARS-CoV-2 蛋白, 并应用组合型四极杆 Orbitrap 质谱鉴定了与每种蛋白物理相关的人类蛋白, 结果他们确定了 66 种可药物化的人类蛋白, 并筛选了两套具有抗病毒活性的药物, 这可能会研发出治疗 COVID-19 的有效方案。Shajahan 等^[47]应用高分辨率质谱对人细胞表达刺突蛋白亚基 S1 和 S2 的糖基化定位, 表征了棘突蛋白上的定量 N-糖基化谱并观察到 S1 受体结合域上意想不到的 O-糖基化修

饰, 这可能推动疫苗的研发。

电喷雾质谱技术也可以有效地用于检测病毒病原体^[48-50]。Sampath 等^[48]应用 PCR 结合电喷雾质谱技术对 9 种不同冠状病毒, 包括 SARS-CoV 进行检测。他们提出该方法可以在所有 3 种人类病毒的混合物中识别和区分 SARS 和其他已知冠状病毒, 包括人类 CoV 229E 和 OC43。Cordey 等^[49]开发了 RT-PCR/电喷雾电离质谱技术并对流感病毒进行检测和分型, 该方法针对 201 个 IAV 或乙型流感病毒感染的鼻咽拭子的分型进行了评估, 结果显示 RT-PCR/电喷雾电离质谱技术对所有样本检测率分别为 91.3% 和 95.3%, 在所有不可分型的标本中均显示出低病毒载量。随后 Mengelle 等^[50]应用此 PLEX-ID™ 系统对流感病毒及其亚型进行了检测, 并与 RespiFinder® 试剂盒鉴定的流感病毒进行比较, 结果显示 PLEX-ID™ 系统的敏感度、特异性、阳性和阴性预测值分别为 87.4%、96.5%、92.2% 和 94.1%。使用 Anyplex™ II RV16 检测试剂盒进一步对 13 个结果不一致的样品检测发现, 7 个与 RespiFinder® 一致, 而 6 个与 PLEX-ID™ 一致。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 已经成为微生物鉴定和诊断的潜在工具。许多研究人员已经证明了 MALDI-TOF-MS 用于诊断流感病毒、肠病毒、人乳头瘤病毒、疱疹病毒、肝炎病毒等临床传染性病毒样本的实用性^[51-53]。在大多数研究中, 采用了通过 PCR 扩增病毒遗传物质, 并通过 MALDI 分析/鉴定扩增子的方法。Sjöholm 等^[51]报道了一种基于 MALDI-TOF-MS 的高效筛选方法, 用于多重检测存在于不同档案生物学样品中的所有人类疱疹病毒, 他们证实 MALDI-TOF-MS 方法对病毒的敏感性和检出限很高, 可与寡核苷酸微阵列和多重 PCR 等参考方法相媲美。Yi 等^[52]报道了使用基于 PCR 的 MS 方法检测高危型人乳头瘤病毒, 他们表明该方法的高检出率和低成本效益使其适合于常规临床环境中的诊断和流行病学研究。Piao 等^[53]将多重 PCR 与 MALDI-TOF-MS 联合使用, 可同时检测出 8 种与人类肠道感染相关的病毒。Calderaro 等^[54]证实 MALDI-TOF-MS 是一种有效, 快速且廉价的工具, 可从不同的临床样品中鉴定出多种脊髓灰质炎病毒血清型。他们进一步研究发现, 通过 MALDI-TOF-MS 可以检测到特定的病毒生物标志物, 这些标志物有助于将病毒感染的细胞与健康细胞区分开^[55]。多篇文献报道了 MALDI-TOF-MS 可用于甲型流感、狂犬病毒以及克里米亚-刚果出血热病毒的诊断^[56-58]。北京协和医院金奇课题组应用多重 PCR 结合 MALDI-TOF-MS 技术在 241 个样本中快速检测与手足口病相关的病毒^[59], 随后又将其用于 21 种呼吸道病毒的诊断^[60]。该课题组在 2017 年应用其建立了通用冠状病毒筛选方法^[61]。由于分子检测方法往往针对一个基因, 而冠状病毒的基因型会发生变异, 导致检测的假阴性率, 该课题组建立的冠状病毒筛选方法能够靶向 2 个或 4 个基因, 从而提高冠状病毒的诊断率。不足是该方法基于已知的冠

病毒序列，仅使用该方法很难检测到未知的人冠状病毒。

4 前景展望

呼气分析是一种无创的、简便的反映机体健康或疾病的分析方法，呼气中的蛋白质和 VOCs 等生物标志物具有诊断病毒感染的潜力。近日来国际上已开展多项呼气分析用于 COVID-19 诊断的注册研究，例如美国梅奥医学中心 (NCT04341012) 及英国剑桥大学 (IRAS ID: 237557) 等，虽然尚未开发出快速诊断 COVID-19 的仪器，然而 MS 技术在诊断其他类型流感病毒以及 2003 年的 SARS-COV 方面都证明了其较高的敏感度，这为 COVID-19 病毒检测方法的研究提供了重要的研究基础和理论依据。随着高分辨质谱技术的不断发展以及科研人员的研究，呼出气 VOCs 检测有望成为诊断 COVID-19 的快速方法，然而在此之前还需要大量的基础研究。未来人们可以通过将体外研究病毒本身特征性 VOCs 与体内研究病毒感染后机体氧化应激等产生的 VOCs 相结合的方法，以鉴定 SARS-CoV-2 感染相关的呼出气 VOCs 并定性定量，进而实现非侵入性快速检测 SARS-CoV-2，尤其适用于机场等现场检测，这对于 COVID-19 的早期快速诊断具有十分重大的意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] World Health Organization. Coronavirus disease 2019 (COVID-19)-Situation Report-136 [R/OL]. Geneva: WHO, 2020 (2020-06-04). https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200604-covid-19-sitrep-136.pdf?sfvrsn=fd36550b_2.
- [2] Ai T, Yang Z, Hou H, et al. Correlation of chest CT and RT-PCR testing in coronavirus disease 2019 (COVID-19) in China: a report of 1014 cases [J]. *Radiology*, 2020 (2020-02-26). https://pubs.rsna.org/doi/10.1148/radiol.2020200642?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub0pubmed. DOI: 10.1148/radiol.2020200642. [published online ahead of print February 26, 2020].
- [3] Lan L, Xu D, Ye G, et al. Positive RT-PCR test results in patients recovered from COVID-19 [J]. *JAMA*, 2020, 323 (15):1502-1503. DOI:10.1001/jama.2020.2783.
- [4] 霍金海, 褚衍涛, 王伟明. 代谢组学在肺炎中的应用研究进展 [J]. *国际呼吸杂志*, 2015, 35(18):1424-1426. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2015.18.016.
Huo JH, Chu YT, Wang WM. Application of metabonomics approaches to study of pneumonia [J]. *Guo Ji Hu Xi Za Zhi*, 2015, 35 (18): 1424-1426. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2015.18.016.
- [5] 林弘光, 彭春红, 叶贤伟, 等. 人体呼出气分析在检测感染性疾病中的临床应用 [J]. *国际呼吸杂志*, 2019, 39(1): 69-73. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2019.01.015.
Lin HG, Peng CH, Ye XW, et al. Clinical application of exhaled breath analysis of human body in detecting infectious diseases [J]. *Guo Ji Hu Xi Za Zhi*, 2019, 39(1): 69-73. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2019.01.015.
- [6] Haick H, Broza YY, Mochalski P, et al. Assessment, origin, and implementation of breath volatile cancer markers [J]. *Chem Soc Rev*, 2014, 43 (5): 1423-1449. DOI: 10.1039/c3cs60329f.
- [7] Tang Z, Liu Y, Duan Y, et al. Breath analysis: technical developments and challenges in the monitoring of human exposure to volatile organic compounds [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2015, 1002: 285-299. DOI: 10.1016/j.jchromb.2015.08.041.
- [8] Bos LD, Sterk PJ, Fowler SJ. Breathomics in the setting of asthma and chronic obstructive pulmonary disease [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 138(4): 970-976. DOI:10.1016/j.jaci.2016.08.004.
- [9] Szabra D, Prokopiuk A, Mikołajczyk J, et al. Air sampling unit for breath analyzers [J]. *Rev Sci Instrum*, 2017, 88(11): 115006. DOI:10.1063/1.4995502.
- [10] Kubán P, Foret F. Exhaled breath condensate: determination of non-volatile compounds and their potential for clinical diagnosis and monitoring. A review [J]. *Anal Chim Acta*, 2013, 805:1-18. DOI:10.1016/j.aca.2013.07.049.
- [11] Ahmadzai H, Huang S, Hettiarachchi R, et al. Exhaled breath condensate: a comprehensive update [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2013, 51(7):1343-1361. DOI:10.1515/cclm-2012-0593.
- [12] Montuschi P. Analysis of exhaled breath condensate in respiratory medicine: methodological aspects and potential clinical applications [J]. *Ther Adv Respir Dis*, 2007, 1(1): 5-23. DOI:10.1177/1753465807082373.
- [13] Kononikhin AS, Starodubtseva NL, Chagovets VV, et al. Exhaled breath condensate analysis from intubated newborns by nano-HPLC coupled to high resolution MS [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017, 1047: 97-105. DOI:10.1016/j.jchromb.2016.12.036.
- [14] Fermier B, Blasco H, Godat E, et al. Specific metabolome profile of exhaled breath condensate in patients with shock and respiratory failure: a pilot study [J]. *Metabolites*, 2016, 6 (3):26. DOI:10.3390/metabo6030026.
- [15] Zhang B, Whiteaker JR, Hoofnagle AN, et al. Clinical potential of mass spectrometry-based proteogenomics [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019, 16(4): 256-268. DOI:10.1038/s41571-018-0135-7.
- [16] Tinglev ÅD, Ullah S, Ljungkvist G, et al. Characterization of exhaled breath particles collected by an electret filter technique [J]. *J Breath Res*, 2016, 10(2): 026001. DOI: 10.1088/1752-7155/10/2/026001.
- [17] Mitchell AB, Mourad B, Tovey E, et al. Spirometry filters can be used to detect exhaled respiratory viruses [J]. *J Breath Res*, 2016, 10(4): 046002. DOI: 10.1088/1752-7155/10/4/046002.
- [18] Pelclova D, Zdimal V, Fenclova Z, et al. Markers of oxidative damage of nucleic acids and proteins among workers exposed to TiO₂ (nano) particles [J]. *Occup Environ Med*, 2016, 73 (2):110-118. DOI:10.1136/oemed-2015-103161.

- [19] Pelcova D, Zdimal V, Kacer P, et al. Oxidative stress markers are elevated in exhaled breath condensate of workers exposed to nanoparticles during iron oxide pigment production[J]. *J Breath Res*, 2016, 10(1):016004. DOI: 10.1088/1752-7155/10/1/016004.
- [20] Zhu J, Bean HD, Wargo MJ, et al. Detecting bacterial lung infections: in vivo evaluation of in vitro volatile fingerprints[J]. *J Breath Res*, 2013, 7(1):016003. DOI: 10.1088/1752-7155/7/1/016003.
- [21] Calenic B, Amann A. Detection of volatile malodorous compounds in breath: current analytical techniques and implications in human disease[J]. *Bioanalysis*, 2014, 6(3): 357-376. DOI: 10.4155/bio.13.306.
- [22] Peralbo-Molina A, Calderón-Santiago M, Priego-Capote F, et al. Development of a method for metabolomic analysis of human exhaled breath condensate by gas chromatography-mass spectrometry in high resolution mode[J]. *Anal Chim Acta*, 2015, 887:118-126. DOI: 10.1016/j.aca.2015.07.008.
- [23] Schnabel R, Fijten R, Smolinska A, et al. Analysis of volatile organic compounds in exhaled breath to diagnose ventilator-associated pneumonia[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 17179. DOI: 10.1038/srep17179.
- [24] Schleich FN, Dallinga JW, Henket M et al. Volatile organic compounds discriminate between eosinophilic and neutrophilic inflammation in vitro[J]. *J Breath Res*, 2016, 10(1):016006. DOI: 10.1088/1752-7155/10/1/016006.
- [25] Peroni D, Janssen HG. Comprehensive two-dimensional gas chromatography under high outlet pressure conditions: a new approach to correct the flow-mismatch issue in the two dimensions[J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1332: 57-63. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.01.051.
- [26] Phillips M, Cataneo RN, Chaturvedi A, et al. Detection of an extended human volatome with comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75274. DOI: 10.1371/journal.pone.0075274.
- [27] Fernández-Peralbo MA, Calderón Santiago M, Priego-Capote F, et al. Study of exhaled breath condensate sample preparation for metabolomics analysis by LC-MS/MS in high resolution mode[J]. *Talanta*, 2015, 144: 1360-1369. DOI: 10.1016/j.talanta.2015.08.010.
- [28] Beale DJ, Jones OA, Karpe AV, et al. A review of analytical techniques and their application in disease diagnosis in breathomics and salivaomics research[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 18(1):24. DOI: 10.3390/ijms18010024.
- [29] Muccilli V, Saletti R, Cunsolo V, et al. Protein profile of exhaled breath condensate determined by high resolution mass spectrometry[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 105: 134-149. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.11.050.
- [30] Fumagalli M, Ferrari F, Luisetti M, et al. Profiling the proteome of exhaled breath condensate in healthy smokers and COPD patients by LC-MS/MS[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(11):13894-13910. DOI: 10.3390/ijms131113894.
- [31] Bikov A, Paschalaki K, Logan-Sinclair R, et al. Standardised exhaled breath collection for the measurement of exhaled volatile organic compounds by proton transfer reaction mass spectrometry[J]. *BMC Pulm Med*, 2013, 13: 43. DOI: 10.1186/1471-2466-13-43.
- [32] Shestivska V, Kolivoška V, Kubišta J, et al. Selected ion flow tube mass spectrometry analyses of isobaric compounds methanol and hydrazine in humid air[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2020, 34(10): e8744. DOI: 10.1002/rcm.8744.
- [33] Fink T, Baumbach JI, Kreuer S, et al. Ion mobility spectrometry in breath research[J]. *J Breath Res*, 2014, 8(2):027104. DOI: 10.1088/1752-7155/8/2/027104.
- [34] Brodrick E, Davies A, Neill P, et al. Breath analysis: translation into clinical practice[J]. *J Breath Res*, 2015, 9(2): 027109. DOI: 10.1088/1752-7155/9/2/027109.
- [35] Liu Y, Gong Y, Wang C, et al. Online breath analysis of propofol during anesthesia: clinical application of membrane inlet-ion mobility spectrometry[J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2015, 59(3): 319-328. DOI: 10.1111/aas.12448.
- [36] Grayson MA. John Bennett Fenn: a curious road to the prize[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2011, 22(8): 1301-1308. DOI: 10.1007/s13361-011-0136-6.
- [37] Thaker SK, Ch'ng J, Christofk HR, et al. Viral hijacking of cellular metabolism[J]. *BMC Biol*, 2019, 17(1): 59. DOI: 10.1186/s12915-019-0678-9.
- [38] Phillips M, Cataneo RN, Chaturvedi A, et al. Effect of influenza vaccination on oxidative stress products in breath[J]. *J Breath Res*, 2010, 4(2): 026001. DOI: 10.1088/1752-7155/4/2/026001.
- [39] Aksenov AA, Sandrock CE, Zhao W, et al. Cellular scent of influenza virus infection[J]. *Chembiochem*, 2014, 15(7): 1040-1048. DOI: 10.1002/cbic.201300695.
- [40] Abd El Qader A, Lieberman D, et al. Volatile organic compounds generated by cultures of bacteria and viruses associated with respiratory infections[J]. *Biomed Chromatogr*, 2015, 29(12): 1783-1790. DOI: 10.1002/bmc.3494.
- [41] Purcaro G, Stefanuto PH, Franchina FA, et al. SPME-GC×GC-TOF MS fingerprint of virally-infected cell culture: sample preparation optimization and data processing evaluation[J]. *Anal Chim Acta*, 2018, 1027: 158-167. DOI: 10.1016/j.aca.2018.03.037.
- [42] Traxler S, Bischoff AC, Saß R, et al. VOC breath profile in spontaneously breathing awake swine during Influenza A infection[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14857. DOI: 10.1038/s41598-018-33061-2.
- [43] Traxler S, Barkowsky G, Saß R, et al. Volatile scents of influenza A and *S. pyogenes* (co-)infected cells[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 18894. DOI: 10.1038/s41598-019-55334-0.
- [44] Schultz D, Methling K, KoInfekt Study Group, et al. Eicosanoid profile of influenza A virus infected pigs[J]. *Metabolites*, 2019, 9(7): 130. DOI: 10.3390/metabo9070130.

- [45] Gouveia D, Grenga L, Gaillard JC, et al. Shortlisting SARS-CoV-2 peptides for targeted studies from experimental data-dependent acquisition tandem mass spectrometry data [J]. *Proteomics*, 2020, 27: e2000107. DOI: 10. 1002/pmic. 202000107.
- [46] Gordon DE, Jang GM, Bouhaddou M, et al. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing [J/OL]. *Nature*, 2020 (2020-04-30). <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2286-9#article-info>. DOI:10. 1038/s41586-020-2286-9. [published online ahead of print April 30, 2020].
- [47] Shajahan A, Supekar NT, Gleinich AS, et al. Deducing the N- and O-glycosylation profile of the spike protein of novel coronavirus SARS-CoV-2 [J/OL]. *Glycobiology*, 2020 (2020-05-04). <https://academic.oup.com/glycob/advance-article/doi/10.1093/glycob/cwaa042/5826952>. DOI: 10. 1093/glycob/cwaa042. [published online ahead of print May 4, 2020].
- [48] Sampath R, Hofstadler SA, Blyn LB, et al. Rapid identification of emerging pathogens: coronavirus [J]. *Emerg Infect Dis*, 2005, 11 (3): 373-379. DOI: 10. 3201/eid1103. 040629.
- [49] Cordey S, Thomas Y, Suter P, et al. Pilot evaluation of RT-PCR/electrospray ionization mass spectrometry (PLEX-ID/Flu assay) on influenza-positive specimens [J]. *Open Virol J*, 2012, 6:64-76. DOI:10. 2174/1874357901206010064.
- [50] Mengelle C, Mansuy JM, Da Silva I, et al. Evaluation of a polymerase chain reaction-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry for the detection and subtyping of influenza viruses in respiratory specimens [J]. *J Clin Virol*, 2013, 57(3):222-226. DOI:10. 1016/j. jcv. 2013. 03. 004.
- [51] Sjöholm MI, Dillner J, Carlson J. Multiplex detection of human herpesviruses from archival specimens by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46 (2): 540-545. DOI:10. 1128/JCM. 01565-07.
- [52] Yi X, Li J, Yu S, et al. A new PCR-based mass spectrometry system for high-risk HPV, part I: methods [J]. *Am J Clin Pathol*, 2011, 136 (6): 913-919. DOI: 10. 1309/AJCPWTZDT0Q7DOVI.
- [53] Piao J, Jiang J, Xu B, et al. Simultaneous detection and identification of enteric viruses by PCR-mass assay [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (8): e42251. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0042251.
- [54] Calderaro A, Arcangeletti MC, Rodighiero I, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry applied to virus identification [J]. *Sci Rep*, 2014, 4:6803. DOI:10. 1038/srep06803.
- [55] Calderaro A, Arcangeletti MC, Rodighiero I, et al. Identification of different respiratory viruses, after a cell culture step, by matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:36082. DOI:10. 1038/srep36082.
- [56] Majchrzykiewicz-Koehorst JA, Heikens E, Trip H, et al. Rapid and generic identification of influenza A and other respiratory viruses with mass spectrometry [J]. *J Virol Methods*, 2015, 213: 75-83. DOI: 10. 1016/j. jviromet. 2014. 11. 014.
- [57] Reed M, Stuchlik O, Carson WC, et al. Novel mass spectrometry based detection and identification of variants of rabies virus nucleoprotein in infected brain tissues [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2018, 12 (12): e0006984. DOI: 10. 1371/journal. pntd. 0006984.
- [58] Schulz A, Karger A, Bettin B, et al. Molecular discrimination of Hyalomma tick species serving as reservoirs and vectors for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in sub-Saharan Africa [J]. *Ticks Tick Borne Dis*, 2020, 11(3): 101382. DOI: 10. 1016/j. ttdis. 2020. 101382.
- [59] Peng J, Yang F, Xiong Z, et al. Sensitive and rapid detection of viruses associated with hand foot and mouth disease using multiplexed MALDI-TOF analysis [J]. *J Clin Virol*, 2013, 56 (2): 170-174. DOI:10. 1016/j. jcv. 2012. 10. 020.
- [60] Zhang C, Xiao Y, Du J, et al. Application of multiplex PCR coupled with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight analysis for simultaneous detection of 21 common respiratory viruses [J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53 (8): 2549-2554. DOI:10. 1128/JCM. 00943-15.
- [61] Xiu L, Zhang C, Wu Z, et al. Establishment and application of a universal coronavirus screening method using MALDI-TOF mass spectrometry [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 1510. DOI: 10. 3389/fmicb. 2017. 01510.

(收稿日期:2020-03-10)