

中国宏基因组学第二代测序技术检测感染病原体的临床应用专家共识

《中华传染病杂志》编辑委员会

通信作者:张文宏,复旦大学附属华山医院感染科,上海 200040,Email:zhangwenhong@fudan.edu.cn,电话:021-52887961

【摘要】 病原学的精准诊断对感染性疾病的诊断非常重要。宏基因组学第二代测序技术检测具有无偏倚性、广覆盖、快速等优点,能覆盖更广范围的病原体。本专家共识就第二代测序技术的临床应用范围、样本采集、分析解读和诊断效能等方面进行证据总结和意见推荐,建立中国感染病原体宏基因组学检测的标准规范。

【关键词】 二代测序;临床应用;标本采集;精准诊断;生物信息分析

DOI:10.3760/cma.j.cn311365-20200731-00732 中图分类号:R51

病原学诊断始终是感染性疾病诊断中最重要的环节。传统的病原学诊断是临床医师根据患者的临床表现做出系列鉴别诊断,然后针对这些进行检测,通常一项检测只能对应一种病原体,而宏基因组学第二代测序(metagenomics next generation sequencing,以下简称二代测序)技术检测能覆盖更广范围的病原体。本专家共识就二代测序的临床应用范围、样本采集、分析解读和诊断效能等方面进行证据总结和意见推荐。

一、证据强度和证据质量的分级定义

证据强度:A为强烈推荐;B为推荐,但其他替代方案也可接受;C为推荐强度低,寻求替代方案;D为从不推荐。证据质量:I为证据来自随机对照试验,II为证据来自非随机对照试验,III为证据仅来自专家意见。

二、二代测序的临床需求与应用范围

(一)背景及概述

推荐意见 1:若怀疑细菌、真菌、DNA 病毒、寄生虫、不典型病原体感染且需进行二代测序检测时,建议采用 DNA 检测;若怀疑 RNA 病毒感染时,则建议采用 RNA 检测(A, II)。

推荐意见 2:对于临床疑似感染的病重、病危或免疫抑制、免疫缺陷患者,建议在完善传统实验室及分子生物学检测的同时,采集疑似感染部位的标本进行二代测序(B, II)。

二代测序检测能覆盖较大范围的病原体,病毒、细菌、真菌、寄生虫都能被同时检测,不论临床样本

培养成功与否,只要含有可检测到的 DNA 或 RNA 即可^[1-6]。从接收样本至完成数据分析,二代测序的周转时间根据测序技术、方法和生物信息学分析方法的不同而不同,已有报道为 6 h 至 7 d 不等(平均 48 h)^[7-8]。

二代测序在感染性疾病诊断领域中的优势在于其能检测到其他传统手段无法检测到的病原体。因此,二代测序可能在应用于临床疑难杂症或免疫抑制患者时有更大意义。另外,二代测序也被报道可用于“排除”检测,即检测阴性有助于排除感染性疾病的诊断,但前提条件是测序覆盖度足够高,能确保样本中存在的病原微生物被检测出来^[1]。二代测序的其他潜在应用还包括病原体的耐药基因检测、医院感染控制的监测,以及社区传染性疾病的监测,但这些应用通常需要极高的覆盖深度^[9]。

从传统培养转向分子生物学诊断需要临床医师及临床微生物学家的思维转变。传统的微生物学是建立在体外分离培养的基础上,而实际上许多环境中或人体的致病微生物难以被培养,或许只能通过二代测序才能被发现^[4]。所以临床医师及临床微生物学家很有必要熟悉这个新工具,知晓其优势和局限性。

目前,尚鲜见针对二代测序结果解读的规范,包括序列数阈值,以及灵敏性、特异性评估的统一临床标准等。就像所有其他新技术,在解释数据和报告数据方面仍有很大的困难与挑战^[10]。如能进一步规范二代测序在临床感染性疾病中的应用,就可给予临床实践非常重要的线索和信息,协助临床诊断。

(二) 二代测序的适用范围

1. 二代测序在临床疑似中枢神经系统感染中的适用范围

推荐意见 3:对于怀疑中枢神经系统急性感染的患者,如有条件,推荐在抽取脑脊液时同步留取 2 mL 脑脊液标本保存于 $-16 \sim 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。在完成常规生物化学检查和培养之后,若 3 d 内未获得明确的病原学依据且经验性抗感染治疗无效,推荐对留存的脑脊液标本进行二代测序检测。若未留存标本,可重新采集标本(A, II)。

推荐意见 4:对于疑似中枢神经系统病毒感染的患者,如有条件,推荐在抽取脑脊液时同步留取 2 mL 脑脊液标本保存于 $-16 \sim 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。在传统 PCR 分子检测(包括多重探针分子 PCR 方法)后若未能获得明确的病原学依据,推荐对留存的脑脊液标本进行二代测序检测。若未留存标本,可重新采集标本(A, II)。

推荐意见 5:对于慢性中枢神经系统感染及需要随访病原学证据的患者,可首选二代测序进行检测(A, II)。

中枢神经系统感染的临床表现和实验室检查包括以下一种或多种:发热(体温 $>38\text{ }^{\circ}\text{C}$)、头痛、脑膜刺激征、呕吐、抽搐、局灶性神经功能障碍、意识改变或嗜睡、脑脊液中白细胞数量增加、脑脊液中蛋白质水平升高和(或)葡萄糖水平降低、脑成像显示感染的改变。

目前,在常见病原体之外,二代测序在中枢神经系统感染中已成功检测到多种新发及少见病原体,如羊布鲁菌、星状病毒、热带假丝酵母、狒狒巴拉姆希阿米巴等^[8]。对于慢性中枢神经系统感染的患者,二代测序检测罕见、少见病原体的能力可显著提高患者病原学确诊的概率。在一项针对结核性脑膜炎患者的队列研究中,二代测序被证实可提高患者的病原体检出率^[11]。

对于中枢神经系统感染进展的临床动态监测,主要以临床表现、脑脊液常规实验室检查结果和脑脊液培养为指导。在某些情况下的特异性免疫试验如隐球菌乳胶凝集试验,可间接监测病原体的载量情况。由于二代测序可检测病原体及其匹配的序列数,所以能直接并结合宿主内标背景值半定量地显示病原菌载量的动态变化^[12]。

对于急性中枢神经系统感染的患者,在完成常规生物化学检查和培养之后,若仍未获得明确的病原学依据,建议将二代测序作为二线首选检测手段。对于疑似中枢神经系统病毒感染的患者,在传统

PCR 检测后若未能获得明确的病原学依据,建议将二代测序作为二线首选检测手段。对于慢性中枢神经系统感染及需要随访病原学证据的患者,可首选二代测序进行检测。

2. 二代测序在临床疑似血流感染中的适用范围

推荐意见 6:对于怀疑血流感染的患者,如有条件,推荐在抽取血培养标本时同步留取 2 mL 血标本,分离血浆后保存于 $-16 \sim 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,血培养 3 d 未报阳且经验性抗感染治疗无效时,推荐对留存血标本进行二代测序检测。若未留存标本,可重新采集标本(A, II)。

推荐意见 7:对于怀疑继发性血流感染的患者,在原发感染灶的病原学检测为阴性或因各种因素无法送检合适标本的情况下,可考虑将血标本的二代测序检测作为二线检测方法(B, III)。

血流感染包括各种病原微生物(包括细菌、真菌、病毒、寄生虫等)入侵血流所引起的感染。除单纯性血流感染外,血流感染还包括感染性心内膜炎、导管相关性血流感染等复杂性感染。血流感染可为原发性,亦可继发于局灶性感染。应注意的是,只要患者具有器官功能障碍且合并任何类型的感染均可诊断为脓毒症,因而脓症患者并不一定存在血流感染。血流感染的典型症状主要为畏寒、寒战、发热和毒血症的症状,此外尚包括原发感染灶及迁徙性感染灶的临床表现。部分血流感染患者还具有某些危险因素,包括近期的有创操作史、血管内植入物和吸毒史等。血流感染患者常有外周血白细胞及中性粒细胞计数异常、CRP 及 ESR 升高等实验室检查异常现象,但此类异常缺乏特异性。细菌性血流感染患者还常有降钙素原水平显著升高的现象。

血流感染的非选择性二代测序检测范围涵盖细菌、真菌、病毒(鼻病毒、腺病毒、CMV 等)、不典型病原体(柯克斯体、巴尔通体等)。由于大部分血流感染的病原体[包括细菌、真菌、寄生虫(如疟原虫)、部分病毒(如疱疹病毒)]均以 DNA 作为遗传物质,所以推荐将 DNA 二代测序作为血流感染的首选检测方法,仅在不能排除 RNA 病毒感染(如肾综合征出血热、登革热、病毒性肺炎等)时推荐进行 RNA 测序^[13]。

目前,由于缺乏抗感染治疗对二代测序诊断性能影响的高等级研究,所以在血流感染中二代测序检测的最佳时间窗仍未确定。研究提示,二代测序在患者起病后 1~2 周的时间内仍可保持高于培养的阳性率,但其仍可随时间推移下降^[13]。此外,血培养与血二代测序存在优势互补的情况。故目前推

荐在患者起病后尽快进行二代测序检测,如有条件,可在采取血培养标本的同时留取血液标本保存于 $-16 \sim 20^{\circ}\text{C}$ 环境,以备后续的二代测序检测。在已经接受治疗的患者中进行血二代测序作为补充检测仍有较大价值。

3. 二代测序在临床疑似局灶性感染中的适用范围

推荐意见 8:对于怀疑局灶性感染的患者,在对局灶部位完成常规的生物化学、培养或 PCR 检测后,若未能获取病原学诊断结果,推荐将二代测序作为二线首选检测手段 (B, II)。

局灶性感染是除血流感染、中枢神经系统感染、呼吸道感染外,以局部组织出现感染性症状如红、肿、热、痛、扪及波动感、有脓液渗出为表现的一类疾病。部分局灶性感染可通过辅助检查手段,如超声检查、影像学检查、侵袭性检查(内镜、穿刺等),发现疑似感染性病灶(组织或积液),伴或不伴炎症相关指标升高^[14]。

局灶性感染的主要特点为临床表现多样,可伴有不典型的临床症状如疲劳、体质量减轻、胃肠道症状等。特定感染可有其特征性的临床表现,如皮肤软组织感染可表现为红、肿、热、痛,严重者可见脓液渗出;关节腔感染可表现为局部疼痛、肿胀,关节腔内积聚大量浆液性、纤维素性或脓性渗出液,关节囊膨胀、按压有波动感、运动障碍等;尿路感染可有较为明显的尿路刺激症状;眼部感染可表现为不同程度的疼痛、畏光、流泪、视力下降、眼睑痉挛,结膜水肿、充血,结膜囊的黄色分泌物增多、玻璃体混浊等。严重者或伴全身毒血症的症状,如发热、寒战,甚至休克等。

目前,已有多项研究报道二代测序可提高皮肤软组织感染、骨关节感染、眼内感染、尿路感染、浆膜腔感染、其他组织感染中的病原学检测能力^[15-17],二代测序在局灶性感染标本中的较高灵敏性可能与局灶性感染标本中的致病病原体相对载量较高有关。在组织感染方面,对创伤弧菌、非结核分枝杆菌、结核分枝杆菌等均有较强的诊断价值^[18-19]。在眼部感染中,除了对常见的病毒、细菌、真菌性眼内炎有诊断价值以外,还对不常见的病原体如弓形虫、棘阿米巴、风疹病毒、隐球菌等感染有较强的提示作用^[20-22]。在尿路感染中,研究显示其可用于耐药细菌的检测^[23]。

4. 二代测序在临床疑似呼吸道感染中的适用范围

推荐意见 9:对于呼吸道感染患者,若 3 d 内未通过传统实验室检查获得明确的病原学依据且经验性抗感染治疗无效,推荐留取呼吸道标本进行二代测序检测 (A, II)。

推荐意见 10:对于高度怀疑病毒性肺炎且病情持续进展的患者,可先完善呼吸道病毒多重 PCR 检测,若为阴性,再行二代测序检测,并应同时进行核酸 RNA 反转录 (A, II)。

临床上当患者出现典型的呼吸道感染症状:上呼吸道症状,如鼻塞、流泪、流涕等鼻咽部卡他症状,以及咽痛等;下呼吸道症状,如咳嗽、发热、咳痰、气急、哮鸣、胸部不适、胸痛、咯血等;全身症状,如畏寒、发热、寒战等;体征上存在氧饱和度下降、呼吸急促、发绀、咽部黏膜红肿、口腔疱疹、溃疡、扁桃体肿大、有肺实变体征或听诊发现双肺有干湿啰音等;实验室检查见血白细胞计数偏高、炎症因子偏高;影像学检查见肺部炎症表现。在排除其他疾病后,均需考虑呼吸道感染。当免疫抑制人群或住院患者出现相关症状时,更需考虑呼吸道感染,尤其是肺部感染的可能。当有肺部慢性疾病如慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD)、支气管扩张的患者出现病情急性加重时,也应考虑是否存在感染诱发因素。

根据二代测序原理,可对包括呼吸道定植菌群和引起感染的病原体同时进行检测。可在 24 ~ 72 h 内鉴定标本中可能存在的常规方法无法鉴定的罕见病原体、病毒等。并可对多重感染进行鉴定^[1,24]。

目前,二代测序成本仍较高,商业化的二代测序检测产品基于成本的考虑,其相对固定的数据覆盖度(如 20 M 特异性序列)对不同类型呼吸道临床样本的灵敏度低于荧光 PCR 等传统分子检测方法。因此,其不能替代传统检测方法(除非加大测序覆盖度使其灵敏度大于传统分子检测方法),而是应作为传统方法无法明确感染病原体时的补充。对于普通呼吸道感染,先完善传统方法的检测;若无法明确且患者病情迁延不愈时,可将二代测序作为首选检测手段。对于高度怀疑病毒性肺炎的患者,如在病毒高发季节急性起病、血白细胞计数正常或偏低、病情进展快,可先完善呼吸道病毒多重 PCR 检测以及培养等;若为阴性,再行二代测序检测,并应同时进行核酸 RNA 反转录。对于免疫抑制患者出现呼吸道感染或病情危重,在送检传统病原学检测方法

的同时,应尽快行呼吸道标本(尽量靠近病灶)二代测序检测,以尽早明确罕见病原体或混合感染。

三、二代测序的流程与质量控制

推荐意见 11: 采集样本送检二代测序必须严格遵守无菌原则(A, II)。

推荐意见 12: 样本应直接从患者感染部位的体液或组织中进行采集(A, II)。

推荐意见 13: 当患者存在感染表现但病情危重或不能耐受有创操作时,可考虑采集患者的血液标本送检(B, II)。

推荐意见 14: 实验室在充分保障生物安全性的前提下,应建立完整的核酸检测流程(样本采集,样本前处理/核酸抽提及文库建立,质量控制及生物信息分析,二代测序结果的实验室判读)(A, III)。

推荐意见 15: 每批次实验中都应包括内参照、阴性对照品和阳性对照品。每批次实验均需严格评估是否存在操作或环境带来的污染。单个样本测序数据量特异性序列片段数建议不低于 2×10^7 条(即 20 M 特异性序列数),此外建议测序序列读长不少于单端 50 bp(A, III)。

推荐意见 16: 对数据进行分析时,建议采用临床应用级别的数据库,审慎使用公共数据库(A, III)。

推荐意见 17: 建议二代测序检测病原体的报告应涵盖该批次实验中的内参照、阴性对照品和阳性对照品结果,并记录相关质量控制标准,如单个样本数据量、序列读长,以及相关的质控参数(A, III)。

(一) 样本采集

针对患者感染部位的不同,采集的样本类型主要包括静脉血、脑脊液、痰液、肺泡灌洗液、胸腔积液、腹水、组织、咽拭子、局灶穿刺物等多种类型。不同类型的样本采集需遵循以下原则:① 对于无菌体液,如静脉血、脑脊液、胸腔积液、腹水等,需按照严格的无菌操作采集样本,采集前对局部或周围皮肤进行消毒处理,消毒液需与皮肤作用一定时间,待皮肤干燥后再取样,一般收集第 2 管标本送检。采集的样本须置于无菌容器内。② 对于有菌部位的样本,如痰液、肺泡灌洗液、咽拭子等,应标明样本的采集部位,在样本采集过程中应尽量避免引入该部位的正常菌群,以免干扰后续检测结果。

采集的样本应尽量选取感染部位的体液或组织,可提高检测结果的可信度。若感染部位的样本采集难度较大,可选择外周血液标本,但有可能会降低检测结果的准确性^[25]。

所有采集的感染部位样本均应及时送检。标本远距离运输需采用冷链运输,并保证无菌原则。应

严格遵守相应测序厂商的运输标准作业程序(standard operation procedure, SOP),尽可能避免冻融环节。对于不能及时送检的样本,应按照前述各个标本的相应要求进行保存^[26]。

(二) 样本前处理/核酸抽提及文库建立

不同样本类型均来源于疑似感染部位,具有潜在的感染性,在样本处理前需进行灭活处理。对于痰液样本,由于本身黏性较高,为方便后续实验操作,灭活后还需进行液化处理;对于血液样本,需根据实际检测需求决定是否离心进行血浆分离;对于组织样本,为提高核酸提取效率,需预先将其切碎后进行操作。

所有的检测样本均来自人体的不同部位,因此在样本中本身就包含了大量人源细胞(或人源基因组/转录组成分),而且不同类型的样本中人源细胞(或人源基因组/转录组成分)含量也不一致,为提高检测结果的灵敏性,在不影响样本中病原体含量的前提下,可通过差异离心法或过滤等选择性地去除部分人源细胞(或人源基因组/转录组成分)。

不同部位的样本经过处理后都要进行核酸提取,核酸的质量是决定二代测序成功的关键,因此不同实验室应建立完整的核酸检测流程,通过测定核酸的完整性或降解程度,制订合格样本的标准。此外,文库制备流程对核酸样本有严格要求,需对每次提取的核酸样本进行定量检测,以确保核酸量满足后续实验要求。针对不同样本类型对提取的核酸进行文库制备,文库制备流程一般包括核酸片段化、末端修复、标签接头连接和 PCR 文库等。

提取试剂盒及全流程中各种试剂的选择,都应考虑生产过程中的工程菌和环境污染微生物的核酸残留信息,以及对检测所造成的影响。在操作过程中应严格采取无菌流程,污染防控对标本结果的质量控制至关重要。每批次实验中都应包括内参照、阴性对照品和阳性对照品,以评估每批次样本中是否存在操作或环境带来的污染以及检测流程是否存在异常。

(三) 质量控制及生物信息分析

质量控制体系应包含多个质量控制点,依次为样本运输温控、提取浓度与纯度、出库浓度、文库片段分布、下机总数据量、测序质量(Q20、Q30 比率)等,分别监控运输温度、核酸提取、文库构建、下机数据可靠性等方面,任何不符合质量控制标准的检测都应及时终止,重新检测,或在无法重新检测的情况下可提供预警,以供临床参考。

全流程的质量控制标准应包含但不限于如下几

项:① 每批次实验中都应包括内参照、阴性对照品和阳性对照品。② 在缺乏有效的人源宿主去除步骤的情况下,建议单个标本测序数据量特异性序列片段数不低于 2×10^7 条(即 20 M 特异性序列数)。③ 为确保序列比对的准确性,避免因同源错配导致的序列比对错误,建议测序序列单端读长不少于 50 bp。目前,国际上采用的二代测序仪也可进行双端测序,但双端测序所花费的经济成本及时间均高于单端测序,所以不在临床标本感染病原体检测中作为首要推荐。推荐采用临床应用级别的数据库,对临床病原体的不同种、不同型别有满足需求的区分度。生物信息分析流程应有统一标准,以自动化为主,以人工纠错为辅,不应带有过多的人工判读成分。建议二代测序检测报告应涵盖该批次实验中的内参照、阴性对照品和阳性对照品结果,并记录相关质量控制标准,如测序质量、单个样本数据量、序列读长、检出病原微生物序列数、相对丰度等。

(四)二代测序结果的实验室判读推荐

目前,不同的测序平台其二代测序病原体检测的判读阈值可能不同,但是应建议将下列标准用于所有二代测序病原体检测流程。满足“(三)质量控制及生物信息分析”中质量控制标准的下机数据,在进入分析解读流程后应遵循以下原则:① 剔除试剂、环境、测序和生物信息分析流程中引入的假阳性病原体信息,将样本中含有的病原体核酸信息真实地呈现给临床。② 原则上报告病原体信息应准确到种(检出序列数极少或极高相似度的病原体复合群除外),同时应包含相应的属信息。③ 建议根据病原体出现的频度和临床致病性等信息,将临床高度关注、健康人样本中极少出现的病原体核酸信息单独呈现(即高度致病可能性),同时将某些部位(如呼吸道、皮肤、肠道等)的常见、低(或无)致病性病原体(定植菌等)单独呈现。④ 建议对报告中呈现的所有病原体引用权威文献进行关键信息的注释,以便临床能快速做出判断。报告中应有适度的微生物相关信息及相关文献帮助临床医师理解报告结果。

四、二代测序结果的临床应用建议及其临床判读、验证

已有的报道和研究均提示,二代测序对包括中枢神经系统感染、血流感染和呼吸道感染在内的各部位感染均有一定的临床应用价值。在某些临床场景中,二代测序不仅有助于进行快速、精准的诊断,而且也对制订抗感染治疗方案及后续疗效评估具有指导作用。2016 年,美国食品与药品监督管理局

(Food and Drug Administration, FDA) 发布了二代测序体外诊断产品的指南草案;2018 年,二代测序被写入《中国成人医院获得性肺炎与呼吸机相关性肺炎诊断和治疗指南(2018 年版)》^[27];2019 年,关于二代测序的《宏基因组分析和诊断技术在急危重症感染应用的专家共识》发布^[25]。

推荐意见 18:二代测序结果应在与患者临床表现及实验室检查密切结合的前提下进行解读和验证(B, III)。

推荐意见 19:对于疑似中枢神经系统、血流、呼吸道感染或需排除感染性疾病的患者,根据推荐意见 1 至 13 采集合适的样本进行二代测序,根据送检样本类型结合患者的临床表现及其他结果辅助判断或排除诊断,同时应注意排除检出病原体定植的情况(B, II)。

2014 年,有基于二代测序对 1 例中枢神经系统钩端螺旋体感染病例进行临床诊断的报道^[6]。随后全球范围内陆续报道了通过对脑脊液及脑组织进行二代测序检测而确诊的中枢神经系统感染病例,其病原谱包括病毒、细菌、真菌、寄生虫等^[28-30]。一项前瞻性研究纳入 10 例中枢神经系统神经炎症患者,对其脑组织进行二代测序检测,除了协助 3 例明确病原学诊断外,还提示二代测序阴性结果有助于排除感染性疾病的诊断^[31]。另一项系统综述通过检索 25 篇论文共对 44 例以二代测序为诊断方法的疑似脑炎患者进行综合分析,其中 16 例同时可通过 PCR 等方式确诊,另外 28 例则为其他检测方法难以明确诊断的新发或少见/罕见病原菌感染病例,提示二代测序可协助临床疑难感染的诊断^[8]。

还有一项研究以健康志愿者为阴性对照,对 78 例脓毒症患者的血浆进行二代测序检测,检出病毒阳性 15 例,细菌及真菌阳性 17 例;提示二代测序联合血培养较单用血培养可显著提高病原体的检出率^[32]。而对于呼吸道感染,相关研究主要集中在病毒所致感染。2015 年,研究发现低覆盖度(< 1 M 特异性序列数)二代测序对鼻咽拭子的病毒检出率虽然低于反转录 PCR,但其有助于确定病毒亚型和血清型,也说明了测序数据覆盖度的重要性^[33]。二代测序在缩短诊断周转时间方面也具有一定优势^[34]。我国一项对 178 例重症肺炎患者的回顾性研究结果提示,二代测序可帮助进行早期病原学诊断,指导抗菌药物的应用,从而降低患者的病死率^[35]。

推荐意见 20:对于二代测序结果为阴性,但根据其他辅助检查结果(如培养结果)高度提示感染可能的尚不能排除感染的患者,建议必要时再次取样重复二代测序检测(B, II)。

若二代测序结果符合患者的临床表现和其他实验室检查,推荐根据二代测序结果指导临床决策。若患者二代测序结果阳性且符合临床表现,但缺乏除二代测序结果外的其他实验室支持证据,应进行 PCR 验证(在具有合适引物的条件下),并建议临床进一步完善可获得的传统实验室检查加以验证。若患者二代测序结果阳性,但临床表现或实验室检查结果不支持该结果,则不能仅根据二代测序结果进行诊断,而应以传统实验室检查结果为首要临床参考依据。对于二代测序结果为阴性,但根据其他辅助检查结果(如培养结果)高度提示感染可能的尚不能排除感染的患者,建议必要时再次取样重复二代测序检测。

五、二代测序在临床感染性疾病中针对不同病原体类型的诊断效能

推荐意见 21:在中枢神经系统感染中,目前证据提示二代测序检测细菌、寄生虫、病毒的效果较好,而中枢神经系统真菌感染仍需更大样本量的临床试验来检验其检测效能(B, II)。

由于二代测序在中枢神经系统感染中的应用仍以病例报道为主,所以可参考的大型研究较少。脑脊液通常含有较低的病原体量,故病原体检测更具挑战性。在 5 项关于脑脊液的二代测序研究中,诊断率分别为 0(0/36)、1.6%(2/125)、6%(4/62)、19%(3/16)和 30%(3/10)^[36-40],在无细胞的脑脊液上清液中只能检测到无细胞病毒或无细胞微生物核酸,会导致较低的检出率,提示临床应采用脑脊液而非上清液作为二代测序标本^[8]。

国外一项研究显示,与传统临床实验室检查结果比较,二代测序的灵敏度为 73%,特异度为 99%,阳性预测值为 81%,阴性预测值为 99%^[2]。另一项前瞻性研究对脑膜炎、脑炎和(或)脊髓炎患儿中收集到的 20 份脑脊液阳性样本进行二代测序检测,与传统的脑脊液微生物检测相比,二代测序检测诊断致病病原体的灵敏度为 92%,特异度为 96%^[9]。我国患儿的脑脊液测序数据显示,55.56%的二代测序检测结果与临床传统方法学一致,其中主要的病原体为细菌^[30]。另一项研究发现在疑似中枢神经系统感染的初治患者中,与培养相比,二代测序具有 90%的灵敏度,其检出率较培养提高了约 25%^[41]。已有的研究结果提示二代测序检测细菌、寄生虫、病毒的效果较好,而中枢神经系统真菌感染仍需更大样本量的临床试验来验证其检测效能。

推荐意见 22:对于脓毒症患者,推荐联合采用传统实验室培养和二代测序来提高病原学的检出率(B, II)。

血流感染的异质性较大,目前尚缺乏针对血流感染者的二代测序诊断效能研究。现有的研究结果提示,血液样本二代测序与血培养保持了高度的一致性,是可靠的病原学检测方法。一项中国的研究显示,以培养为金标准,二代测序的灵敏度和特异度分别为 72.7% 和 89.6%;此外,二代测序还表现出了比血培养更高的额外检测效能,成为血培养的有力补充^[32]。若以培养联合二代测序、桑格法测序验证作为金标准,则二代测序的阳性率较单用血培养有显著提升(23.08% 比 12.82%)^[32]。另一项关于脓毒症休克的研究中,二代测序的阳性率在起病前 3 周内波动于 71% 左右,而血培养阳性率仅在起病时达 33%,此后波动于 10%~20%^[42]。

推荐意见 23:对于局灶脓肿或组织感染患者,二代测序的总体灵敏性和特异性均较好,其中对细菌检测的灵敏性优于真菌(A, II)。

在关于局灶性感染的病原体检测报道中,个案报道较多。但已有研究证实,二代测序在包括局灶脓液、感染部位组织、感染性的体液标本中的灵敏性均优于传统实验室检测。在骨关节感染中,二代测序与临床培养阳性标本的一致率可达 83%~94.8%,在培养阴性的标本中可额外检出 49.3%~93%的病原体^[43-44]。肺组织二代测序对细菌感染的灵敏度可达 100%,特异度为 76.5%;对真菌感染的灵敏度为 57.1%,特异度为 61.5%;对细菌和真菌的阳性预测值分别为 42.9% 和 44.4%,阴性预测值分别为 100% 和 72.7%^[45]。

推荐意见 24:对于呼吸道感染,二代测序在病毒及少见病原体的检测中体现出较好的检测效能;但在细菌、真菌等病原体的检测中,二代测序尚不能准确判断菌群定植或感染状态,仍需依赖临床医师结合患者病情进行进一步分析(A, II)。

推荐意见 25:对于结核分枝杆菌、伤寒沙门菌、布鲁菌等胞内菌,以及具有细胞壁的真菌,二代测序的检测效能会相对降低,应对上述菌群设置特定的序列数阈值(A, III)。

在二代测序检测呼吸道病原体的研究中,一项研究对 67 份儿科呼吸道感染患者的鼻咽拭子标本同时进行了多重 PCR 和二代测序检测,两者的一致率为 93%;二代测序漏诊了其中 3 例,但多重 PCR 同样未检测到其中 2 例患者感染的病毒;同时,二代测序检测到了 PCR 靶向范围外的 11 株病毒^[46]。在成人上呼吸道感染领域,一项研究探索了二代测序在 89 份成人急性上呼吸道感染鼻咽拭子标本中的应用,发现二代测序的灵敏度为 77.55%,特异度

为 80.49%~100.00%;在二代测序漏诊的标本中,相应病原体的实时 PCR 循环阈值显著更高,提示病原体载量低,在低数据量覆盖度的情况下可能影响二代测序的检出率^[33]。另一项研究评估了二代测序在 24 份流行性感冒病毒阳性的呼吸道标本(包括肺泡灌洗液、痰液和咽拭子)中的检测性能;24 份标本中,18 份的二代测序结果与 PCR 完全一致,另外 6 份不一致的标本中,病毒实时 PCR 循环阈值均高于 35^[47]。还有研究将二代测序应用于 16 例急性下呼吸道感染患者的鼻咽抽取物标本,其中 15 份标本中都检出了病毒,结果与 PCR 完全一致^[48]。在重症肺炎患者中,培养和二代测序的一致性达 55.5%,且二代测序有更高的灵敏度^[35]。综上所述,目前已发表的关于二代测序应用于临床标本的检测效能研究发现,当样本中病原微生物含量较高时,二代测序的总体检测效能与 PCR 差距不大;但当病毒载量较低时,当前二代测序(20 M 左右特异性序列数)会出现假阴性,在灵敏度方面不如 PCR,需要通过进一步增加数据量来提高检测灵敏度。

二代测序可对不明、少见、不典型病原体进行检测。一项中国的研究对 561 例患者(其中呼吸道感染 255 例)的各种标本行二代测序检测(其中肺泡灌洗液+痰标本共 292 份);结果提示与培养相比,二代测序对结核分枝杆菌、厌氧菌、真菌的检出率均显著高于培养;以临床诊断为金标准,二代测序比培养显著提高了灵敏度(50.7%比 35.2%),而特异度无显著区别^[24]。另一项研究对 13 例诊断为社区获得性肺炎的免疫抑制患者进行二代测序检测,结果二代测序和培养都检测到 5 株阳性细菌;但是在真菌检测方面,二代测序对肺孢子菌的灵敏度明显高于培养^[49]。在临床应用中,对于结核分枝杆菌、伤寒沙门菌、布鲁菌等胞内菌,以及具有细胞壁的真菌,二代测序的检出效能会相对降低,应对上述菌群设置特定的序列数阈值或结合捕获技术以提高测序数据的覆盖度^[24,50]。

综上,在呼吸道有菌环境下的二代测序结果的判读尚无统一标准。关于二代测序应用于细菌、真菌检验效能的研究尚不多。目前的数据提示与培养相比,二代测序能显著提高灵敏度。但对于结核分枝杆菌等病原体,与临床诊断相比,二代测序的诊断还需更多探索。

推荐意见 26: 对于新发、罕见、疑难感染性疾病,以及免疫缺陷患者,二代测序能显著提高病原体的检出率,可作为上述疾病的一线检测手段(A,III)。

虽然二代测序检测成本高,但其在免疫缺陷患

者和重症患者的病原学诊断中体现出较高的临床应用价值^[51]。在使用糖皮质激素合并感染的人群中,二代测序指导下的抗感染治疗方案的成功率为 81.8%,显著高于经验性抗感染治疗的 52.6%^[52]。对于新发、罕见或疑难感染性疾病,更具有传统培养及其他靶标分子诊断技术所不具备的优势。如 2015 年报道的首例杂色松鼠 1 博尔纳病毒(variegated squirrel Bornavirus-1, VSBV-1)所致的脑炎病例和 2018 年报道的首例人感染猪疱疹病毒眼内炎病例^[53-54],二代测序均在诊断过程中起到了不可替代的作用。因此建议对于上述疾病,二代测序可作为一线检测手段。

六、二代测序在成本经济效益分析下的临床应用推荐

推荐意见 27: 目前,开展二代测序的成本仍较高,尚不能作为轻症感染性疾病的一线检测手段(A,III)。

自 2014 年二代测序首次被用于临床感染病例的病原学诊断以来,其正越来越广泛地被应用于临床实践。但目前二代测序检测的成本仍显著高于传统实验室检测方法。在国内,完成 1 次二代测序检测的费用仍较高;在美国,也需花费上千美元。与之相比,完成 1 次血培养约 40 元人民币,完成 1 次 16 S PCR 检测则需约 50 元人民币。高成本仍是制约二代测序在国内广泛开展的主要因素之一。

随着技术的进一步成熟,未来二代测序病原体检测应进一步在成本下降、诊断标准完善、质量控制提升等方面进行完善。同时应进一步增加大样本量的研究,以建立中国感染病原体宏基因组学检测的标准规范。

编写专家(按姓氏拼音排序):曹清(上海儿童医学中心感染科)、陈佰义(中国医科大学附属第一医院感染科)、陈力(复旦大学附属华山医院皮肤与性病科)、陈澍(复旦大学附属华山医院感染科)、胡必杰(复旦大学附属中山医院感染科)、黄丽素(上海交通大学医学院附属新华医院儿内科)、黄文祥(重庆医科大学附属第一医院感染科)、黄燕(中南大学湘雅医院感染科)、李敏(上海交通大学医学院附属仁济医院检验科)、连建奇(第四军医大学附属唐都医院感染科)、刘晓清(北京协和医院感染科)、刘正印(北京协和医院感染科)、罗艳萍(厦门市集美区妇幼保健院儿内科)、马小军(北京协和医院感染科)、马筱玲(中国科学技术大学附属第一医院检验科)、缪晓辉(上海长征医院感染科)、王明贵(复旦大学附属华山医院抗生素研究所)、肖永红(浙江大学医学院附属第一医院感染科)、臧国庆(上海市第六人民医院感染科)、张文宏(复旦大学附属华山医院感染科)、张欣欣(上海交通大学医学院附属瑞金医院感染科)、周惠娟(上海交通大学医学院附属瑞金医院感染科)

执笔秘书:艾静文(复旦大学附属华山医院感染科)

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Chiu CY, Miller SA. Clinical metagenomics [J]. Nat Rev Genet, 2019,20(6):341-355. DOI:10.1038/s41576-019-0113-7.
- [2] Miller S, Naccache SN, Samayoa E, et al. Laboratory validation of a clinical metagenomic sequencing assay for pathogen detection in cerebrospinal fluid [J]. Genome Res, 2019,29(5):831-842. DOI:10.1101/gr.238170.118.
- [3] Capobianchi MR, Giombini E, Rozera G. Next-generation sequencing technology in clinical virology [J]. Clin Microbiol Infect, 2013,19(1):15-22. DOI:10.1111/1469-0691.12056.
- [4] Goldberg B, Sichtig H, Geyer C, et al. Making the leap from research laboratory to clinic: challenges and opportunities for next-generation sequencing in infectious disease diagnostics [J/OL]. mBio, 2015,6(6):e01888-15(2015-12-08)[2020-07-31]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4669390/. DOI:10.1128/mBio.01888-15.
- [5] Wilson MR, Sample HA, Zorn KC, et al. Clinical metagenomic sequencing for diagnosis of meningitis and encephalitis [J]. N Engl J Med, 2019,380(24):2327-2340. DOI:10.1056/NEJMoa1803396.
- [6] 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. DOI:10.1056/NEJMoa1401268.
- [7] Simmer PJ, Miller S, Carroll KC. Understanding the promises and hurdles of metagenomic next-generation sequencing as a diagnostic tool for infectious diseases [J]. Clin Infect Dis, 2018,66(5):778-788. DOI:10.1093/cid/cix881.
- [8] Brown JR, Bharucha T, Breuer J. Encephalitis diagnosis using metagenomics: application of next generation sequencing for undiagnosed cases [J]. J Infect, 2018,76(3):225-240. DOI:10.1016/j.jinf.2017.12.014.
- [9] Miller RR, Montoya V, Gardy JL, et al. Metagenomics for pathogen detection in public health [J/OL]. Genome Med, 2013,5(9):81(2013-09-20)[2020-07-31]. https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/gm485. DOI:10.1186/gm485.
- [10] Dulanto Chiang A, Dekker JP. From the pipeline to the bedside: advances and challenges in clinical metagenomics [J]. J Infect Dis, 2020,221 Suppl 3:S331-S340. DOI:10.1093/infdis/jiz151.
- [11] Wang S, Chen Y, Wang D, et al. The feasibility of metagenomic next-generation sequencing to identify pathogens causing tuberculous meningitis in cerebrospinal fluid [J/OL]. Front Microbiol, 2019,10:1993(2019-09-03)[2020-07-31]. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01993.
- [12] Ai JW, Zhang HC, Cui P, et al. Dynamic and direct pathogen load surveillance to monitor disease progression and therapeutic efficacy in central nervous system infection using a novel semi-quantitative sequencing platform [J]. J Infect, 2018,76(3):307-310. DOI:10.1016/j.jinf.2017.11.002.
- [13] Brenner T, Decker SO, Grumaz S, et al. Next-generation sequencing diagnostics of bacteremia in sepsis (Next GeneSiS-Trial): study protocol of a prospective, observational, noninterventive, multicenter, clinical trial [J/OL]. Medicine (Baltimore), 2018,97(6):e9868(2018-02-09)[2020-07-31]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5944698/. DOI:10.1097/MD.00000000000009868.
- [14] Braunwald Fauci, Kasper Hauser, Longo Jameson. 哈里森内科学 [M]. 王德炳,译.15版.北京:人民卫生出版社,2003:222.
- [15] Goswami K, Parvizi J, Maxwell Courtney P. Current recommendations for the diagnosis of acute and chronic PJI for hip and knee-cell counts, alpha-defensin, leukocyte esterase, next-generation sequencing [J]. Curr Rev Musculoskelet Med, 2018,11(3):428-438. DOI:10.1007/s12178-018-9513-0.
- [16] Li M, Zeng Y, Wu Y, et al. Performance of sequencing assays in diagnosis of prosthetic joint infection: a systematic review and meta-analysis [J]. J Arthroplasty, 2019,34(7):1514-1522. e4. DOI:10.1016/j.arth.2019.02.044.
- [17] Zhang HC, Ai JW, Cui P, et al. Incremental value of metagenomic next generation sequencing for the diagnosis of suspected focal infection in adults [J]. J Infect, 2019,79(5):419-425. DOI:10.1016/j.jinf.2019.08.012.
- [18] Chen ZQ, Huang JF, Ma LL, et al. Usefulness of metagenomic analysis in differential diagnosis of pyoderma gangrenosum [J]. J Int Med Res, 2018,46(8):3468-3473. DOI:10.1177/0300060518780124.
- [19] Li L, Wang L, Zhang C, et al. A case of *Vibrio vulnificus* related wound infection diagnosed by next-generation sequencing [J/OL]. IDCases, 2019,15:e00497(2019-01-24)[2020-07-31]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6389543/. DOI:10.1016/j.idcr.2019.e00497.
- [20] Doan T, Acharya NR, Pinsky BA, et al. Metagenomic DNA sequencing for the diagnosis of intraocular infections [J]. Ophthalmology, 2017,124(8):1247-1248. DOI:10.1016/j.optha.2017.03.045.
- [21] Doan T, Wilson MR, Crawford ED, et al. Illuminating uveitis: metagenomic deep sequencing identifies common and rare pathogens [J/OL]. Genome Med, 2016,8(1):90(2016-08-25)[2020-07-31]. https://doi.org/10.1186/s13073-016-0344-6.
- [22] Li Z, Breitwieser FP, Lu J, et al. Identifying corneal infections in formalin-fixed specimens using next generation sequencing [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2018,59(1):280-288. DOI:10.1167/iov.17-21617.
- [23] Mouraviev V, McDonald M. An implementation of next generation sequencing for prevention and diagnosis of urinary tract infection in urology [J]. Can J Urol, 2018,25(3):9349-9356.
- [24] Miao Q, Ma Y, Wang Q, et al. Microbiological diagnostic performance of metagenomic next-generation sequencing when applied to clinical practice [J]. Clin Infect Dis, 2018,67 Suppl 2:S231-S240. DOI:10.1093/cid/ciy693.
- [25] 宏基因组分析和诊断技术在急危重症感染应用专家共识组. 宏基因组分析和诊断技术在急危重症感染应用的专家共识 [J]. 中华急诊医学杂志, 2019,28(2):151-155. DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2019.02.005.
- [26] Center for Devices and Radiological Health. Infectious disease next generation sequencing based diagnostic devices: microbial identification and detection of antimicrobial resistance and virulence markers [EB/OL]. (2016-05-13)[2020-07-31]. https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/infectious-disease-next-generation-sequencing-based-diagnostic-devices-microbial-identification-and.
- [27] 中华医学会呼吸病学分会感染学组. 中国成人医院获得性肺炎与呼吸机相关性肺炎诊断和治疗指南(2018年版) [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2018,41(4):255-280. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2018.04.006.
- [28] Wilson MR, Suan D, Duggins A, et al. A novel cause of chronic viral meningoencephalitis: Cache Valley virus [J]. Ann Neurol,

- 2017, 82(1):105-114. DOI:10.1002/ana.24982.
- [29] Gu W, Miller S, Chiu CY. Clinical metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection [J]. *Annu Rev Pathol*, 2019, 14:319-338. DOI:10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012751.
- [30] Guo LY, Li YJ, Liu LL, et al. Detection of pediatric bacterial meningitis pathogens from cerebrospinal fluid by next-generation sequencing technology [J]. *J Infect*, 2019, 78(4):323-337. DOI:10.1016/j.jinf.2018.12.001.
- [31] Salzberg SL, Breitwieser FP, Kumar A, et al. Next-generation sequencing in neuropathologic diagnosis of infections of the nervous system [J/OL]. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2016, 3(4):e251 (2016-06-13) [2020-07-31]. <https://nn.neurology.org/content/3/4/e251>. DOI:10.1212/NXI.0000000000000251.
- [32] Long Y, Zhang Y, Gong Y, et al. Diagnosis of sepsis with cell-free DNA by next-generation sequencing technology in ICU patients [J]. *Arch Med Res*, 2016, 47(5):365-371. DOI:10.1016/j.arcmed.2016.08.004.
- [33] Thorburn F, Bennett S, Modha S, et al. The use of next generation sequencing in the diagnosis and typing of respiratory infections [J]. *J Clin Virol*, 2015, 69:96-100. DOI:10.1016/j.jcv.2015.06.082.
- [34] Pendleton KM, Erb-Downward JR, Bao Y, et al. Rapid pathogen identification in bacterial pneumonia using real-time metagenomics [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017, 196(12):1610-1612. DOI:10.1164/rccm.201703-0537LE.
- [35] Xie Y, Du J, Jin W, et al. Next generation sequencing for diagnosis of severe pneumonia: China, 2010-2018 [J]. *J Infect*, 2019, 78(2):158-169. DOI:10.1016/j.jinf.2018.09.004.
- [36] Ambrose HE, Granerod J, Clewley JP, et al. Diagnostic strategy used to establish etiologies of encephalitis in a prospective cohort of patients in England [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(10):3576-3583. DOI:10.1128/JCM.00862-11.
- [37] Tan le V, van Doorn HR, Nghia HD, et al. Identification of a new cyclovirus in cerebrospinal fluid of patients with acute central nervous system infections [J/OL]. *mBio*, 2013, 4(3):e00231-13 (2013-06-18) [2020-07-31]. <https://mbio.asm.org/content/4/3/e00231-13.long>. DOI:10.1128/mBio.00231-13.
- [38] Phan TG, Mori D, Deng X, et al. Small circular single stranded DNA viral genomes in unexplained cases of human encephalitis, diarrhea, and in untreated sewage [J]. *Virology*, 2015, 482:98-104. DOI:10.1016/j.virol.2015.03.011.
- [39] Kawada J, Okuno Y, Torii Y, et al. Identification of viruses in cases of pediatric acute encephalitis and encephalopathy using next-generation sequencing [J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6:33452 (2016-09-14) [2020-07-31]. <https://www.nature.com/articles/srep33452>. DOI:10.1038/srep33452.
- [40] Salzberg SL, Breitwieser FP, Kumar A, et al. Next-generation sequencing in neuropathologic diagnosis of infections of the nervous system [J/OL]. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2016, 3(4):e251 (2016-06-13) [2020-07-31]. <https://nn.neurology.org/content/3/4/e251>. DOI:10.1212/NXI.0000000000000251.
- [41] Zhang Y, Cui P, Zhang HC, et al. Clinical application and evaluation of metagenomic next-generation sequencing in suspected adult central nervous system infection [J/OL]. *J Transl Med*, 2020, 18(1):199 (2020-05-13) [2020-07-31]. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02360-6>.
- [42] Grumaz S, Grumaz C, Vainshtein Y, et al. Enhanced performance of next-generation sequencing diagnostics compared with standard of care microbiological diagnostics in patients suffering from septic shock [J]. *Crit Care Med*, 2019, 47(5):e394-e402. DOI:10.1097/CCM.0000000000003658.
- [43] Ivy MI, Thoendel MJ, Jeraldo PR, et al. Direct detection and identification of prosthetic joint infection pathogens in synovial fluid by metagenomic shotgun sequencing [J/OL]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56(9):e00402-18 (2018-08-27) [2020-07-31]. <https://jcm.asm.org/content/56/9/e00402-18.long>. DOI:10.1128/JCM.00402-18.
- [44] Thoendel MJ, Jeraldo PR, Greenwood-Quaintance KE, et al. Identification of prosthetic joint infection pathogens using a shotgun metagenomics approach [J]. *Clin Infect Dis*, 2018, 67(9):1333-1338. DOI:10.1093/cid/ciy303.
- [45] Li H, Gao H, Meng H, et al. Detection of pulmonary infectious pathogens from lung biopsy tissues by metagenomic next-generation sequencing [J/OL]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8:205 (2018-06-25) [2020-07-31]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6026637/>. DOI:10.3389/fcimb.2018.00205.
- [46] Graf EH, Simmon KE, Tardif KD, et al. Unbiased detection of respiratory viruses by use of RNA sequencing-based metagenomics: a systematic comparison to a commercial PCR panel [J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54(4):1000-1007. DOI:10.1128/JCM.03060-15.
- [47] Fischer N, Indenbirken D, Meyer T, et al. Evaluation of unbiased next-generation sequencing of RNA (RNA-seq) as a diagnostic method in influenza virus-positive respiratory samples [J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(7):2238-2250. DOI:10.1128/JCM.02495-14.
- [48] Yang J, Yang F, Ren L, et al. Unbiased parallel detection of viral pathogens in clinical samples by use of a metagenomic approach [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(10):3463-3469. DOI:10.1128/JCM.00273-11.
- [49] Pan T, Tan R, Qu H, et al. Next-generation sequencing of the BALF in the diagnosis of community-acquired pneumonia in immunocompromised patients [J]. *J Infect*, 2019, 79(1):61-74. DOI:10.1016/j.jinf.2018.11.005.
- [50] Zhou X, Wu H, Ruan Q, et al. Clinical evaluation of diagnosis efficacy of active *Mycobacterium tuberculosis* complex infection via metagenomic next-generation sequencing of direct clinical samples [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, 9:351 (2019-10-18) [2020-07-31]. DOI:10.3389/fcimb.2019.00351.
- [51] Parize P, Muth E, Richaud C, et al. Untargeted next-generation sequencing-based first-line diagnosis of infection in immunocompromised adults: a multicentre, blinded, prospective study [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2017, 23(8):574.e1-574.e6. DOI:10.1016/j.cmi.2017.02.006.
- [52] Wang S, Ai J, Cui P, et al. Diagnostic value and clinical application of next-generation sequencing for infections in immunosuppressed patients with corticosteroid therapy [J/OL]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(5):227 (2019-12-24) [2020-07-31]. <http://atm.amegroups.com/article/view/37405/html>. DOI:10.21037/atm.2020.01.30.
- [53] Hoffmann B, Tappe D, Höper D, et al. A variegated squirrel bornavirus associated with fatal human encephalitis [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(2):154-162. DOI:10.1056/NEJMoa1415627.
- [54] Ai JW, Weng SS, Cheng Q, et al. Human endophthalmitis caused by pseudorabies virus infection, China, 2017 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2018, 24(6):1087-1090. DOI:10.3201/eid2406.171612.

(收稿日期:2020-07-31)

(本文编辑:沈漱瑜)

