

支气管肺泡灌洗液二代测序在检测肺部感染病原体中的应用*

吴媛媛 黄宏*

华中科技大学同济医学院附属同济医院呼吸与危重症医学科,湖北武汉 430030

摘要 目的:探讨支气管肺泡灌洗液(BALF)二代测序(NGS)在肺部感染病原体检测中的应用。方法:回顾性收集412例肺部感染患者的临床病历资料,包括常规呼吸道病原学、NGS及实验室检测结果。结果:412例患者中,有肺部基础病患者222例,无肺部基础疾病患者190例。2组患者NGS检测BALF中前3位病原体均为流感嗜血杆菌、肺炎链球菌和EB病毒。有肺部基础疾病组铜绿假单胞菌检出率高于无肺部基础疾病组(11.3% vs 3.2%, $P=0.002$),而金黄色葡萄球菌低于无肺部基础疾病组(1.8% vs 6.8%, $P=0.01$)。NGS的检出率高于常规病原学检测(70.1% vs 38.3%, $\chi^2=9.843$, $P=0.002$)。且NGS还检出18例少见病原体。412例NGS中,68例行宏基因组二代测序(mNGS),344例行靶基因组二代测序(tNGS)。mNGS在金黄色葡萄球菌(8.8% vs 2.9%, $P<0.05$)、耶氏肺孢子菌(4.4% vs 0.3%, $P=0.015$)、群集裂褶菌(2.9% vs 0%, $P=0.027$)、人类疱疹病毒1型(17.6% vs 5.2%, $P<0.001$)、人类疱疹病毒7型(7.4% vs 1.5%, $P=0.014$)及细环病毒(4.4% vs 0%, $P=0.004$)的阳性率高于tNGS,而流感嗜血杆菌(11.8% vs 36.9%, $P<0.001$)检出率低于tNGS。结论:NGS是肺部感染尤其是混合感染及少见病原体感染的重要补充诊断方法。不同的二代测序方法对病原体的检出率存在差异,需结合临床资料和实验室结果综合评估。

关键词 二代测序;支气管肺泡灌洗液;肺部感染

中图分类号 R563.1 文献标识码 A DOI 10.11768/nkjwzzzz20230405

Application of next-generation sequencing on bronchoalveolar lavage fluid in the detection of pathogens of pulmonary infection WU Yuan-yuan, HUANG Hong*. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei Wuhan 430030, China
Corresponding author: HUANG Hong, E-mail: huanghong@hust.edu.cn

Abstract Objective: To investigate the applied value of next-generation sequencing (NGS) on bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in the detection of pathogens of pulmonary infection. Methods: The clinical data of 412 pulmonary infection patients were retrospectively collected, including conventional microbiological tests, NGS, and laboratory tests. Results: There were 222 patients with underlying pulmonary diseases and 190 with non-underlying pulmonary diseases. The top three pathogens detected by BALF NGS in the two groups were *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, and Epstein-Barr virus (EBV). The patients with underlying pulmonary diseases had a higher positive rate in *Pseudomonas aeruginosa* (11.3% vs 3.2%, $P=0.002$), while a lower positive rate in *Staphylococcus aureus* (1.8% vs 6.8%, $P=0.01$) than in the non-underlying pulmonary diseases group. BALF NGS had a higher detection rate than the conventional microbiological tests (70.1% vs 38.3%, $\chi^2=9.843$, $P=0.002$). A total of 18 cases of rare pathogens were detected by NGS. There were 68 patients in mNGS (metagenomic NGS) and 344 patients in tNGS (targeted NGS) among the total 412 patients. The mNGS had significantly higher detection rates in *Staphylococcus aureus* (8.8% vs 2.9%, $P<0.05$), *Pneumocystis jirovecii* (4.4% vs 0.3%, $P=0.015$), *Schizophyllum commune* (2.9% vs 0%, $P=0.027$), human alphaherpesvirus 1 (HSV1, 17.6% vs 5.2%, $P<0.001$), human betaherpesvirus 7 (HHV7, 7.4% vs 1.5%, $P=0.014$), and Torque teno virus (4.4% vs 0%, $P=0.004$), while lower in *Haemophilus influenzae* (11.8% vs 36.9%, $P<0.001$) than tNGS. Conclusions: NGS is an important supplementary method for the diagnosis of pulmonary infection, especially for mixed infection and uncommon pathogen infection. There are differences in the detection rate of pathogens by different NGS methods, which needs to be comprehensively evaluated by combining clinical data with laboratory results.

Key words Next-generation sequencing; Bronchoalveolar lavage fluid; Pulmonary infection

*基金项目:十三五国家重点研发计划项目(No:2016YFC1304103)

*通信作者:黄宏,E-mail:huanghong@hust.edu.cn,湖北省武汉市硚口区解放大道1095号

肺部感染常由细菌、真菌、病毒、寄生虫单一或混合感染导致^[1],是全球十大死亡原因之一^[2]。二代测序(next-generation sequencing, NGS)具有无需假设、不依赖培养的优点,能无偏倚地检测临床样本中所有病原体^[3],已广泛应用于多种感染性疾病^[4~7]。NGS 主要包括宏基因组二代测序(metagenomic NGS, mNGS)和靶基因二代测序(targeted NGS, tNGS)^[8]。mNGS 是对所有可能存在的遗传物质进行测序,而 tNGS 集中在特定病原体及耐药基因^[9]。对于呼吸道感染,NGS 尚不能准确判断检出细菌和真菌的定植或感染状态^[10]。本研究旨在协助临床医师正确解读支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)的 NGS 报告,有助于早期精准治疗肺部感染,缩短患者住院时间,改善预后。

资料与方法

一般资料 本研究回顾性收集 2021 年 1 月 1 日-2022 年 4 月 1 日华中科技大学同济医学院附属同济医院呼吸与危重症医学科收治的 412 例肺部感染患者,多数患者收集标本前已接受抗生素治疗。根据有无肺部基础疾病分为 2 组,其中 222 例有肺部基础疾病,包括 24 例慢性阻塞性肺疾病、22 例哮喘、77 例支气管扩张、44 例间质性肺炎、34 例肺癌及 21 例复合肺部基础疾病。所有患者进行支气管镜检查及肺泡灌洗,获取 BALF 送检常规病原学检测及 mNGS/tNGS。肺部感染患者诊断标准为胸部 CT 出现新发或恶化的局灶或弥漫浸润性病变,并伴有以下 4 项肺炎相关临床表现中至少 1 项:①新近出现的咳嗽、咳痰或原有呼吸道症状加重,伴或不伴脓痰、胸痛、呼吸困难及咯血;②发热, $T \geq 38.0^{\circ}\text{C}$;③肺实变体征和/或闻及湿啰音;④外周血白细胞计数 $> 10 \times 10^9/\text{L}$ 或 $< 4 \times 10^9/\text{L}$ ^[11]。排除标准:①患者未进行支气管镜检查;②缺失临床或实验室数据。本研究经医院伦理委员会审批,并豁免知情同意。

常规病原学检测方法 送检标本类型包括 BALF、血、痰及胸水。根据临床诊治需要进行不同的常规病原学检测方法,包括培养、gene-Xpert、T-SPOT、真菌-D 葡聚糖试验(G 试验)、曲霉菌半乳糖苷酶(GM 试验)、9 项呼吸道病原体抗体(嗜肺军团菌、肺炎支原体、肺炎衣原体、呼吸道合胞病毒、腺病毒、立克次体、甲/乙型流感病毒、副流感病毒)、各类病原体 DNA(肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯杆菌、鲍曼不动杆菌、嗜麦芽寡食单胞菌、流感嗜血杆

菌、结核分枝杆菌复合体)及耶氏肺孢子菌核酸检测。

宏基因组二代测序 取 500 μL BALF,按照试剂盒说明书提取核酸^[12]。通过片段化、末端修复、连接适配器和聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增来构建 DNA 文库^[1]。Agilent 2100 评价 DNA 文库的质量,BCISEQ-50 测序^[13]。去除低于 35bp 的序列及 Burrows-Wheeler 比对映射到人类参考基因组(hg19)的人类宿主序列^[14],并与细菌、真菌、病毒和寄生虫微生物基因组数据库进行分类比对^[15]。阳性标准如下^[16]:细菌、支原体、衣原体、DNA 病毒、真菌:标准化的严格映射到病原体种的序列数(the standardized stringent mapped read-number of pathogen species, SDSMRN) ≥ 3 , RNA 病毒:SDSMRN ≥ 1 ,寄生虫:SDSMRN ≥ 100 ,结核分枝杆菌复合群:标准化的严格映射到病原体属的序列数(the standardized stringent mapped reads number of pathogen genus, SDSMRNG) ≥ 1 。

tNGS 按照试剂盒说明书提取核酸^[17],进行目标基因序列扩增富集和测序接头连接^[18]。通过接头 index 和计数 MiSeq 系统生成的离线数据,删除序列数小于 60 bp、引物单端识别或引物非特异性结合的序列。与 NCBI RefSeq 基因组数据库进行比对,获得微生物序列数。再与已知浓度的参考对照比较,计算出浓度(copies/mL)。如果浓度低于 100 copies/mL,认为是阴性^[19]。

统计学分析 采用 SPSS 25.0 统计学软件。正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,非正态分布的计量数资料以 M(P25, P75)表示,使用 t 检验或 Mann-Whitney 检验。计数资料以例数(百分数)表示,进行 χ^2 检验、Fisher 精确检验或 McNemar 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

临床特征及病原体 2 组的临床基线资料比较,仅年龄($Z = -2.925, P = 0.003$)及结核病史($\chi^2 = 5.014, P = 0.025$)差异有统计学意义,见表 1。有肺部基础疾病组最常见的病原体为流感嗜血杆菌,其次为肺炎链球菌、EB 病毒、铜绿假单胞菌和巨细胞病毒,见图 1。无肺部基础疾病组最常见的病原体是流感嗜血杆菌,其次是肺炎链球菌、EB 病毒、肺炎克雷伯菌和金黄色葡萄球菌,见图 2。铜绿假单胞菌在肺部基础疾病组的阳性率高于无肺部基础疾病组(11.3% vs. 3.2%, $P = 0.002$),金黄色葡萄球菌阳性率低于无肺部基础疾病组(1.8% vs. 6.8%, $P = 0.01$)。

表 1 2 组的临床基线资料[例(%)/M(P25,P75)]

项目	有肺部基础疾病组(<i>n</i> = 222)	无肺部基础疾病组(<i>n</i> = 190)	<i>t</i> / <i>Z</i> 值	<i>P</i> 值
男性	105(47.3)	93(48.9)	0.112	0.738
年龄(岁)	56(50,63)	53(44,60)	-2.925	0.003
吸烟史	55(24.8)	44(23.2)	0.147	0.702
高血压	44(19.8)	32(16.8)	0.603	0.437
糖尿病	23(10.4)	17(8.9)	0.233	0.629
心脏病	11(5.0)	7(3.7)	0.396	0.529
结核病史	13(5.9)	23(12.1)	5.014	0.025
肺外肿瘤史	4(1.8)	9(4.7)	2.886	0.089
NGS 检出病原体分类				
细菌	138(62.2)	113(59.5)	0.311	0.577
真菌	18(8.1)	15(7.9)	0.006	0.937
病毒	51(23.0)	39(20.5)	0.329	0.549
其他 ^a	0	6(3.2)	5.084	0.024
白细胞计数(×10 ⁹ /L)	6.42(5.18,7.55)	6.35(5.21,7.76)	-0.020	0.984
中性粒细胞计数(×10 ⁹ /L)	3.95(3.11,4.98)	3.89(3.02,5.30)	-0.121	0.904
淋巴细胞计数(×10 ⁹ /L)	1.55(1.20,1.92)	1.62(1.18,2.14)	-1.251	0.211
炎症指标 ^b 升高	38(17.1)	36(18.9)	0.233	0.629

注:^a 人型支原体、肺炎支原体、鹦鹉衣原体、沙眼衣原体;^b 超敏 C 反应蛋白、降钙素原及血沉

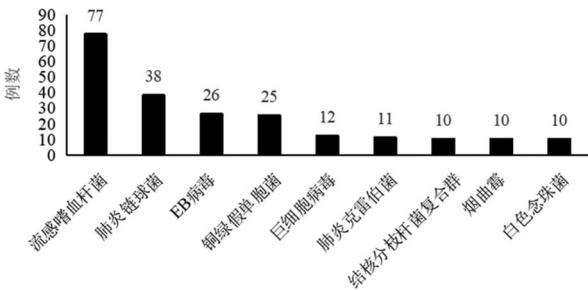


图 1 有肺部基础疾病组常见病原体分布

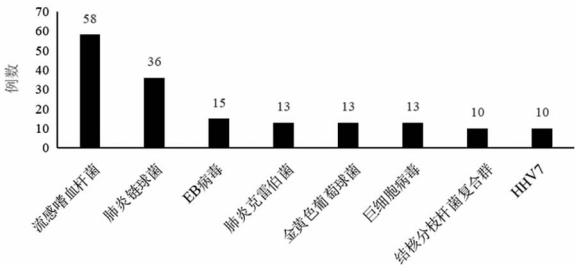


图 2 无肺部基础疾病组常见病原体分布

BALF 的 NGS 与常规病原学 所有患者均进行 BALF 的 NGS 及培养检查,其中 201 例仅 NGS 阳性,22 例仅培养阳性,68 例双阳性(15 例完全一致,29 例部分相同,24 例完全不一致),121 例双阴性,见图 3。BALF 的 NGS 及 BALF 的培养在细菌、真菌的检出率的比较见图 4、5,NGS 检出的病毒及其他病原体见图 6、7。NGS 的细菌检出率高于培养

(62.9% vs 12.1%,*P* < 0.001),有统计学意义的病原体为流感嗜血杆菌(*P* < 0.001)、铜绿假单胞菌(*P* < 0.001)、肺炎克雷伯菌(*P* = 0.008)及金黄色葡萄球菌(*P* = 0.001)。而 NGS 和培养对真菌的检出率无差异。NGS 检出 18 例少见病原体,包括 7 例非结核分枝杆菌、4 例耶氏肺孢子菌、2 例鹦鹉热衣原体、3 例支原体及 2 例诺卡菌。而培养仅查出 3 例非结核分枝杆菌和 2 例诺卡菌。使用 BALF 培养作为标准,计算 NGS 的灵敏度、特异性、阳性预测值、阴性预测值依次为细菌 82% (95% *CI*: 0.681 ~ 0.910)、39.8% (95% *CI*: 0.347 ~ 0.450)、15.8% (95% *CI*: 0.117 ~ 0.210)、94.1% (95% *CI*: 0.888 ~ 0.971);真菌 40.4% (95% *CI*: 0.267 ~ 0.557)、95.9% (95% *CI*: 0.932 ~ 0.976)、55.9% (95% *CI*: 0.381 ~ 0.724)、92.6% (95% *CI*: 0.894 ~ 0.949)。常规病原学检测包括培养、gene-Xpert、T-SPOT、G 试验、GM 试验、9 项呼吸道病原体抗体、各类病原体 DNA 及耶氏肺孢子菌核酸检测。NGS 的检出率高于常规病原学检测(70.1% vs 38.3%, $\chi^2 = 9.843$,*P* = 0.002)。NGS 检出混合感染 166 例,前 3 种类型为细菌混合感染 80 例、细菌 + 病毒混合感染 50 例、细菌 + 真菌混合感染 15 例。常规病原学方法检出 18 例混合感染,前 3 种类型为细菌 + 真菌混合感染 9 例、细菌混合感染 4 例、真菌 + 病毒混合感染 4 例。

NGS 和 tNGS 412 例患者中,68 例进行 mNGS

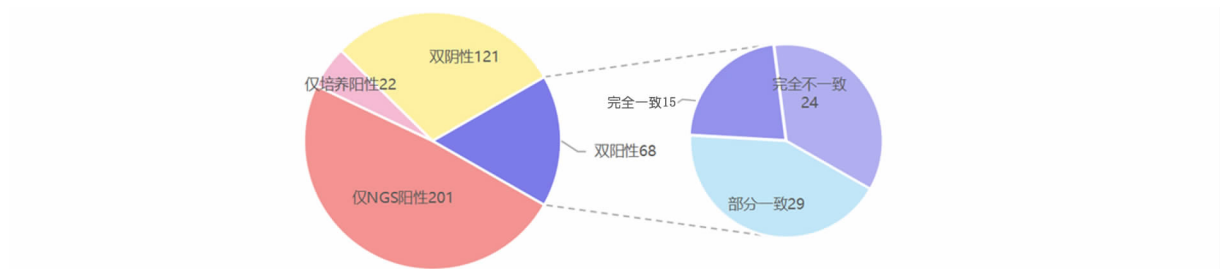
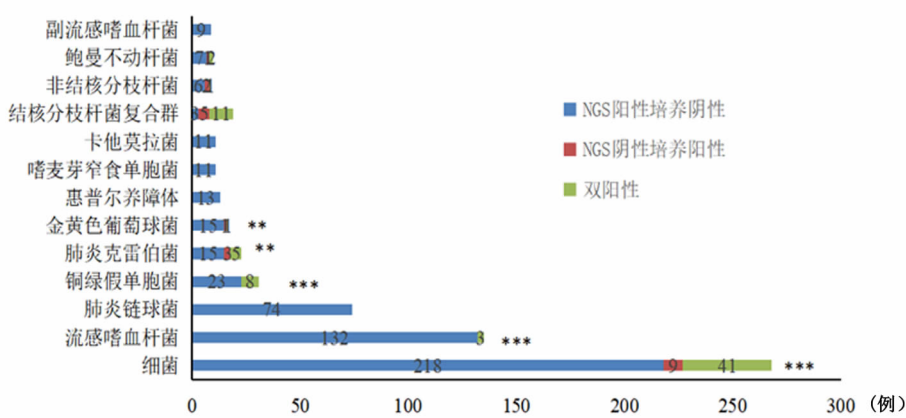
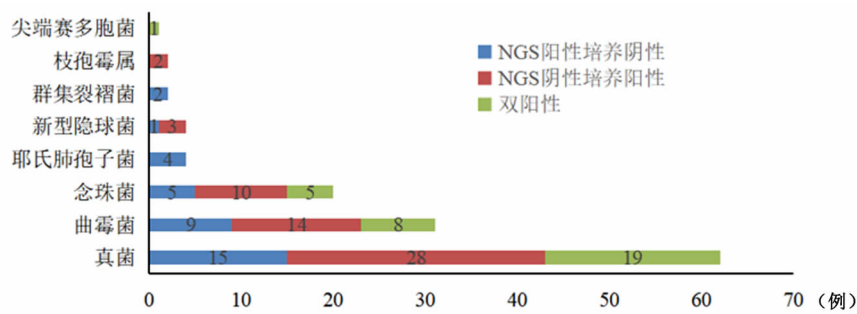


图 3 二代测序与培养结果的一致性比较



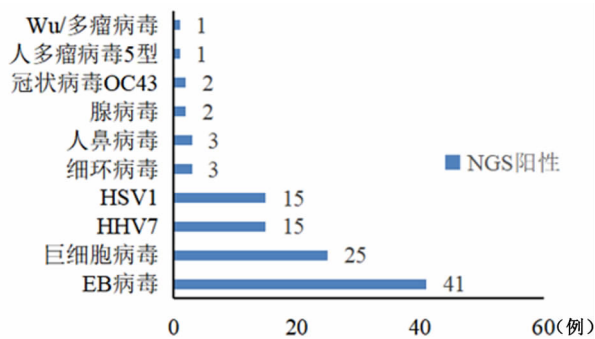
注：非结核分枝杆菌包括胞内分枝杆菌、鸟分枝杆菌、脓肿分枝杆菌、产粘液分枝杆菌、偶然分枝杆菌及马赛分枝杆菌，
* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$

图 4 NGS 与培养的细菌检出率的比较



注：曲霉包括烟曲霉、黄曲霉、黑曲霉、杂色曲霉；念珠菌包括白色念珠菌、光滑念珠菌、热带念珠菌和近平滑念珠菌

图 5 NGS 与培养的真菌检出率的比较



注：HSV1，人类疱疹病毒 1 型；HHV7，人类疱疹病毒 7 型

图 6 NGS 检出病毒类型

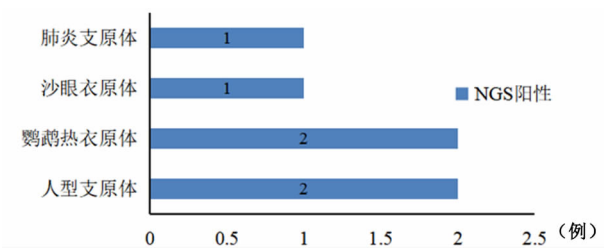


图 7 NGS 检出其他病原体的类型

检查,344 例进行 tNGS 检查。2 组的年龄、性别及既往史比较,差异无统计学意义,见表 2。mNGS 在真菌(23.5% vs 4.9%, $P<0.001$)、病毒(42.6% vs 17.7%, $P<0.001$)的检出率高于 tNGS。mNGS 在金黄色葡萄球菌(8.8% vs 2.9%, $P<0.05$)、耶氏肺孢子菌(4.4% vs 0.3%, $P=0.015$)、群集裂褶菌(2.9% vs 0%, $P=0.027$)、人类疱疹病毒 1 型(human alphaherpesvirus 1, HSV1, 17.6% vs 5.2%, $P<0.001$)、人类疱疹病毒 7 型(human betaherpesvirus 7, HHV7, 7.4% vs 1.5%, $P=0.014$)及细环病毒(4.4% vs 0%, $P=0.004$)的阳性率高于 tNGS 组,而流感嗜血杆菌(11.8% vs 36.9%, $P<0.001$)低于 tNGS 组,见图 8。

讨 论

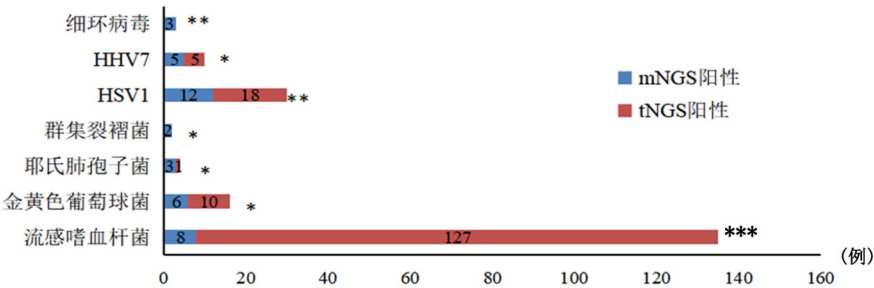
本研究发现 43 例 BALF 的 NGS 和 BALF 的培

养检出相同病原体(其中 15 例完全相同,29 例部分相同),201 例 NGS 检出但培养未检出,并且 NGS 较常规病原学检测检出更多的混合感染及少见病原体,这些结果支持 NGS 作为诊断感染的重要辅助方法^[20, 21]。本研究中 BALF NGS 特异性不高,可能的原因:①培养受病原体活性、数量、培养环境等多种因素影响。某些原体的存在能影响其他病原体的生长和生存^[22],例如,铜绿假单胞菌的存在影响烟曲霉的阳性培养^[23];②大多数患者采集 BALF 前进行经验性抗感染治疗,可能导致培养出现假阴性结果;③NGS 检测的是病原体的核酸片段,而胞内菌及具有细胞壁的真菌较难提取核酸,导致 NGS 的检出效能相应降低^[10]。④BALF 并非无菌性液体,存在定植菌。虽然国内有 mNGS 检测感染性病原体的专家共识,但不同病原体的阈值范围仍无统一标准,难以区分慢性定植及急性感染^[10]。综合考虑患者

表 2 mNGS 和 tNGS2 组的临床基线资料比较[例(%)/M(P25,P75)]

	mNGS(<i>n</i> = 68)	tNGS(<i>n</i> = 344)	统计值	<i>P</i> 值
男性	34(50)	180(52.3)	0.123	0.726
年龄(岁)	54(44.75,63.5)	55(47.25,61.75)	-0.032	0.974
吸烟史	20(29.4)	79(23.0)	1.293	0.256
高血压	14(20.6)	62(18.0)	0.248	0.618
糖尿病	4(5.9)	36(10.5)	1.36	0.243
心脏病	3(4.4)	15(4.4)	Fisher	1
结核病史	2(2.9)	21(6.1)	Fisher	0.396
肺外肿瘤史	1(1.5)	12(3.5)	Fisher	0.703
检出病原体分类				
细菌	45(66.2)	206(59.9)	0.944	0.331
真菌	16(23.5)	17(4.9)	26.623	<0.001
病毒	29(42.6)	61(17.7)	20.641	<0.001
其他 ^a	1(1.5)	5(1.5)	Fisher	1
白细胞计数($\times 10^9/L$)	6.41(5.15,7.60)	6.36(5.2,7.7)	-0.032	0.974
中性粒细胞计数($\times 10^9/L$)	4.21(3.19,5.30)	3.91(3.04,5.16)	-0.911	0.363
淋巴细胞计数($\times 10^9/L$)	1.45(1,1.98)	1.59(1.23,2.01)	-2.099	0.036
炎症指标 ^b 升高	15(22.1)	59(17.2)	0.928	0.335

注:^a 包括人型支原体,肺炎支原体,鹦鹉衣原体,沙眼衣原体;^b 包括超敏 C 反应蛋白、降钙素原及血沉



注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

图 8 mNGS 与 tNGS 检出率存在显著差异的病原体

临床症状、影像学的变化、炎症指标及本地区病原体的流行病学特征,有助于区分定植菌和致病菌。NGS 的假阳性能减少但很难完全避免。

BALF NGS 检出的前 3 位常见病原体为流感嗜血杆菌、肺炎链球菌及 EB 病毒,这与中国社区获得性肺炎指南的常见病原体相似^[24]。本研究发现铜绿假单胞菌在有肺部基础疾病组检出率更高。铜绿假单胞菌是支气管扩张患者的重要机会性致病菌^[25]。金黄色葡萄球菌为囊性纤维化患者呼吸道样本中培养出的最常见病原体^[26]。本研究中无肺部基础疾病组的金黄色葡萄球菌检出率更高。因此,BALF 的 NGS 有助于发现有无肺部基础疾病患者并发肺部感染时感染病原体的差异。

mNGS 和 tNGS 对部分病原体的检出率存在差异,可能原因如下:①tNGS 测序特定的基因靶点,可能遗漏非靶向序列^[9],从而造成检出率低于 mNGS,但 tNGS 能检测耐药基因。②由于 mNGS 序列信息更多,报告更难解读,更容易得出假阳性结果^[9]。临床医生应考虑肺部感染可能的病原菌和药物耐药选择合适的二代测序方法。

综上所述,BALF NGS 是常规病原学检测的重要补充,有助于早期诊断少见病原体和混合病原体导致的肺部感染。mNGS 和 tNGS 对某些病原体的检测灵敏度存在差异,提醒临床医生送检 NGS 要有一定的针对性。

参考文献

- 1 Qian YY,Wang HY,Zhou Y,et al. Improving pulmonary infection diagnosis with metagenomic next generation sequencing[J]. Front Cell Infect Microbiol,2020,10: 567615.
- 2 Langelier C,Kalantar KL,Moazed F,et al. Integrating host response and unbiased microbe detection for lower respiratory tract infection diagnosis in critically ill adults[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2018,115(52): E12353-e12362.
- 3 Shi CL,Han P,Tang PJ,et al. Clinical metagenomic sequencing for diagnosis of pulmonary tuberculosis[J]. J Infect,2020,81(4):567-574.
- 4 Yan L,Sun W,Lu Z,et al. Metagenomic Next-Generation Sequencing (mNGS) in cerebrospinal fluid for rapid diagnosis of tuberculosis meningitis in HIV-negative population[J]. Int J Infect Dis,2020,96: 270-275.
- 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.
- 6 Fida M,Wolf MJ,Hamdi A,et al. Detection of pathogenic bacteria from septic patients using 16S ribosomal RNA Gene-Targeted metagenomic sequencing[J]. Clin Infect Dis,2021,73(7): 1165-1172.
- 7 Huang J,Jiang E,Yang D,et al. Metagenomic next-generation sequencing versus traditional pathogen detection in the diagnosis of peripheral pulmonary infectious lesions[J]. Infect Drug Resist,2020,13:567-

- 576.
- 8 Chiu CY,Miller SA. Clinical metagenomics[J]. Nat Rev Genet,2019,20(6):341-355.
- 9 Gaston DC,Miller HB,Fissel JA,et al. Evaluation of metagenomic and targeted next-generation sequencing workflows for detection of respiratory pathogens from bronchoalveolar Lavage Fluid Specimens[J]. J Clin Microbiol,2022,60(7): e0052622.
- 10 《中华传染病杂志》编辑委员会. 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[J]. 中华传染病杂志,2020,38(11): 681-689.
- 11 中华医学会,中华医学会临床药学会,中华医学会杂志社,等. 成人社区获得性肺炎基层合理用药指南[J]. 中华全科医师杂志,2020,19(9): 783-791.
- 12 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.
- 13 Jeon YJ,Zhou Y,Li Y,et al. The feasibility study of non-invasive fetal trisomy 18 and 21 detection with semiconductor sequencing platform[J]. PLoS One,2014,9(10): e110240.
- 14 Li H,Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform[J]. Bioinformatics,2009,25(14): 1754-1760.
- 15 Peng JM,Du B,Qin HY,et al. Metagenomic next-generation sequencing for the diagnosis of suspected pneumonia in immunocompromised patients[J]. J Infect,2021,82(4): 22-27.
- 16 Wang H,Lu Z,Bao Y,et al. Clinical diagnostic application of metagenomic next-generation sequencing in children with severe nonresponding pneumonia[J]. PLoS One,2020,15(6): e0232610.
- 17 Huang C,Chen H,Ding Y,et al. A Microbial world: could metagenomic next-generation sequencing be involved in acute respiratory failure? [J]. Front Cell Infect Microbiol,2021,11: 738074.
- 18 Li B,Xu L,Guo Q,et al. GenSeizer: a Multiplex PCR-Based targeted gene sequencing platform for rapid and accurate identification of major mycobacterium species[J]. J Clin Microbiol,2021,59(2).
- 19 Chao L,Li J,Zhang Y,et al. Application of next generation sequencing-based rapid detection platform for microbiological diagnosis and drug resistance prediction in acute lower respiratory infection[J]. Ann Transl Med,2020,8(24): 1644.
- 20 Jin X,Li J,Shao M,et al. Improving suspected pulmonary infection diagnosis by bronchoalveolar lavage fluid metagenomic next-generation sequencing: a multicenter retrospective study[J]. Microbiol Spectr,2022,10(4): e0247321.
- 21 Wang D,Wang W,Ding Y,et al. Metagenomic next-generation sequencing successfully detects pulmonary infectious pathogens in children with hematologic malignancy[J]. Front Cell Infect Microbiol,2022,12: 899028.
- 22 Kumar RK,Singh NK,Balakrishnan S,et al. Metabolic modeling of the International Space Station microbiome reveals key microbial interactions[J]. Microbiome,2022,10(1): 102.
- 23 Hughes DA,Rosenthal M,Cuthbertson L,et al. An invisible threat? aspergillus positive cultures and co-infecting bacteria in airway samples[J]. J Cyst Fibros,2022. doi:10. 1016/j. jcf. 2022. 07. 009.
- 24 中华医学会,中华医学会杂志社,中华医学会全科医学分会,等. 成人社区获得性肺炎基层诊疗指南(实践版·2018)[J]. 中华全科医师杂志,2019,18(2): 127-133.
- 25 Li H,Gao H,Meng H,et al. Detection of pulmonary infectious pathogens from lung biopsy tissues by metagenomic next-generation sequencing[J]. Front Cell Infect Microbiol,2018,8:205.
- 26 Long DR,Wolter DJ,Lee M,et al. Polyclonality shared strains and convergent evolution in chronic cystic fibrosis staphylococcus aureus airway infection[J]. Am J Respir Crit Care Med,2021,203(9): 1127-1137.

(2023-04-04 收稿 2023-06-20 修回)