

· 专家共识 ·

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

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

通信作者: 童朝阳, Email: tong.chaoyang@zs-hospital.sh.cn

基金项目: 国家自然科学基金(81471840, 81171837); 上海市卫计委重要薄弱学科建设项目(2016ZB0202)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2019.02.005

感染是急危重症患者死亡的主要原因之一。近年来,随着新发病原微生物的出现、耐药病原微生物的增多以及免疫抑制宿主的增加,感染的发病率和死亡率仍居高不下,脓毒症(严重感染)患者病死率高达 50%^[1-3]。最新调查研究发现,中国脓毒症相关性标准化死亡率为 66.7 例/10 万人口,全国每年共有脓毒症相关性死亡病例近 103 万例^[3]。重症感染起病急、进展快、病原体复杂,短时间内能否明确致病病原微生物至关重要。

传统的病原微生物检测方法主要包括形态学检测、培养分离、生化检测、免疫学和核酸检测。因操作简单、快速、技术要求不高,同时具有一定的诊断敏感性和特异性,目前仍在临床上广泛使用。但传统的检测方法在敏感性、特异性、时效性、信息量等方面存在局限,而且对于未知或者罕见的病原微生物,无法快速识别。

基于宏基因组新一代测序技术(metagenomics next-generation sequencing, mNGS)不依赖于传统的微生物培养,直接对临床样本中的核酸进行高通量测序,然后与数据库进行比对分析,根据比对到的序列信息来判断样本包含的病原微生物种类,能够快速、客观地检测临床样本中的较多病原微生物(包括病毒、细菌、真菌、寄生虫),且无需特异性扩增^[4-8],尤其适用于急危重症和疑难感染的诊断。

为了规范运用 mNGS 进行病原微生物的诊断、正确解读检测结果和指导治疗,我们组织了急危重病、感染病学和病原微生物学相关领域的专家,制定了本共识。

1 mNGS 分析和诊断技术是急危重症感染快速、精准诊疗的发展方向

新一代测序技术是一个开放的分析和诊断系统,目前已经纳入的病原体有 8 000 多种,其中包括 3 000 余种细菌、4 000 余种病毒、200 余种真菌和 140 种寄生虫,为疑难危重症及罕见病原微生物感染的诊断提供了有效的技术手段。

自 2008 年成功应用于临床诊断新发病原体感染以

来^[9-10],目前 mNGS 技术已经逐步用于临床疑难感染诊断,如华山医院张文宏团队^[11]用 mNGS 协助确诊猪疱疹病毒的跨物种传播,并给予针对性治疗使患者痊愈,深圳市第三人民医院用 mNGS 确诊了一例罕见阿米巴脑炎^[11-12]。

mNGS 对脓毒症、免疫抑制宿主并发严重感染、重症肺部感染等疾病具有较高的临床应用价值,能够快速、精准地找到病原体;另外对于抗菌药物治疗方案的制定和治疗效果的评估具有一定的指导作用^[9-16]。Long 等^[17]研究发现血培养联合 mNGS 诊断细菌或真菌感染,阳性率较单用血培养显著升高。以健康人群为基线,建立每种微生物在正常人群中的分布情况模型,进而计算脓毒症指数来评估检出微生物的核酸数量,Crumaz 等^[18]发现在脓毒症患者血液标本中病原菌的脓毒症指数绝对值、丰度显著升高,而且其变化与临床治疗效果密切相关。通过对比健康志愿者与脓毒症患者的测序结果,Gosiewski 等^[18]发现健康人群中主要以厌氧菌、双歧杆菌等非致病菌为主,而脓毒症患者以需氧菌或微量需氧菌为主。Xie 等^[19]研究发现,mNGS 技术可以早期确定重症肺炎患者的病原体,指导抗菌药物的应用,改善重症肺炎患者的病死率。

近期胡必杰团队开展了关于 mNGS 应用感染性疾病诊治的全国最大规模的样本研究^[20],发现 mNGS 敏感性高于传统培养、在结核/真菌/病毒和厌氧菌诊断方面优势更明显、抗菌药物使用对 mNGS 的影响小于传统培养,根据检测结果可以调整抗菌药物的治疗方案。研究发现 mNGS 对免疫抑制宿主感染的病原体诊断具有重要的参考价值,在病毒和细菌诊断方面 mNGS 阳性率高于传统方法 3 倍以上,同时 mNGS 比传统方法具有更高的阴性预测值^[21]。

随着 mNGS 技术平台的完善和临床研究的增多,mNGS 为急危重症严重感染和罕见病原体感染的病原体检测等方面提供了一种新方法和新平台,在临床上的运用将越来越广泛。

2 mNGS 在急危重症感染患者应用的适应证

对于急危重症患者要掌握 mNGS 的适应证。有关急危重症感染患者 mNGS 的应用原则、注意事项、操作流程和临床解读见图 1。根据目前的临床经验、研究结果和 mNGS 技术的优势,推荐 mNGS 在急危重症感染患者中应用的主要适应证:①病情危重需要尽快明确病原体;②特殊病患者如免疫抑制宿主、合并基础疾病、反复住院的重症感染患者需要尽快明确病原体;③传统微生物检测技术反复阴性且治疗效果不佳;④疑似新发病原体、临床上提示可能有一定的传染性;⑤疑似特殊病原体感染;⑥长期发热和(或)伴有其他临床症状、病因不明的感染。符合以上适应证的患者,应尽快送标本进行检测。

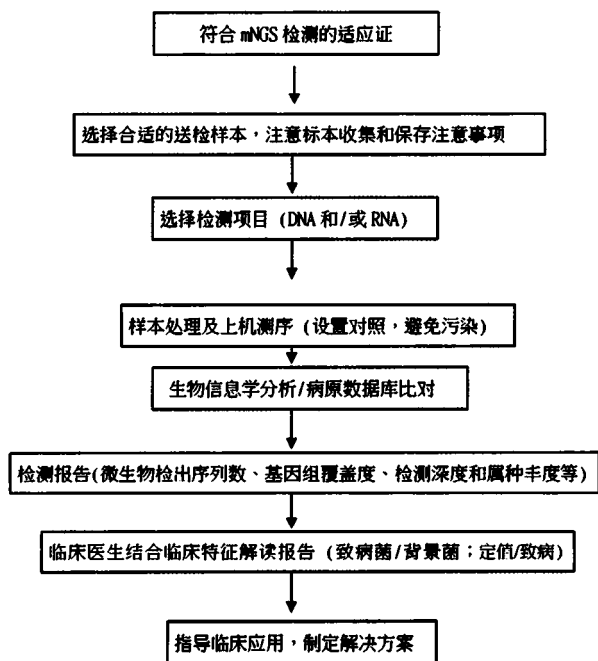


图 1 急危重症感染患者 mNGS 的应用原则、注意事项和报告解读流程

3 mNGS 检测的基本流程和质量控制

3.1 实验流程

(1) 样本采集及采集原则:对于感染患者或有不明原因发热患者,采集感染部位样本进行 mNGS 检测。样本类型主要有静脉血、脑脊液、肺泡灌洗液、痰液、胸水和腹水、咽分泌物、局灶穿刺物、组织等多种类型,见表 1。

为减少样本污染,标本收集需要注意以下原则。

①严格无菌操作:采集无菌标本时应注意对局部及周围皮肤的消毒。如使用消毒液消毒皮肤,需要作用一定时间,待其干燥后采样,第一管标本最好不要收集,收集第二管标本送检。采集后的标本须用无菌容器盛装。

②无菌部位的标本具有更高的临床价值,应尽量送检

表 1 样本采集注意事项表

样本类型	体积	采集管	储存条件	运输条件
静脉血	成人: 3 mL 以上	K/G 管 (DNA/RNA)	6~35℃	6~35℃
	幼儿: 1.5 mL 以上			
脑脊液	1.2 mL 以上		DNA 检测: -20℃保存 1 周, -80℃长期保存	
肺泡灌洗液	3 mL 以上		保存避免反复冻融;	干冰
痰液		无菌、干燥	RNA 检测: 仅限 -80℃以下保存, 避免反复冻融。	
其他无菌体液		洁净冻存管		
咽拭子				
实体组织				

无菌部位的标本。有菌部位采集的标本应标明采集部位,采集过程应尽可能的减少“有菌部位正常菌群导致标本的污染”,为后续检测结果中的定植菌群的判读提供基础信息。

③标本的种类。原则上,送检感染部位的体液或者组织标本敏感性、特异性和可信度更高。如果感染部位的体液或者分泌物不易采集或者标本不理想,可以选择血液标本。目前有研究发现,对于重症肺部感染患者,痰液/肺泡灌洗液和血液标本检测病原体的一致性仅仅为 40%~50%。

④及时送检。对于短时间内不能送检的标本,按照表 1 的注意事项对样本进行保存。

(2) 样本处理:由于采集到的样本本身大多含有致病性病原菌,在核酸提取前往往需要对样本进行灭活处理。除此之外,痰液样本在灭活后需要进行去粘度处理,血液样本根据实际情况决定是否需要进行离心进行血浆、白细胞分离。

(3) 提取核酸:核酸质量是 mNGS 检测成功的关键因素。提取后的核酸因保存环境及时间不同,可能存在一定程度的降解,因此各实验室应具有相应的方法检测核酸的完整性或降解程度,并设立明确的合格样本标准。同时由于文库制备过程对于核酸初始投入量有一定的要求,应在每次提取完成后对核酸进行定量。

(4) 文库制备及上机测序:文库制备过程包括 DNA 打断、接头连接、PCR 扩增等过程,在测序之前推荐使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 或其他方法对文库进行质控,每个检测项目应设定其文库质量的要求,并设立明确的合格文库标准。然后对合格文库进行上机测序,由于病原检测有较高的时效性,所以一定要选取合格的测序平台(比如 BGISEQ-50/MGISEQ-200/MGISEQ-2000, Miniseq, IonProton 等)。

(5) 内参及对照品:每次实验都应包括内参、阴性和阳性对照。内参可以帮助识别分析失败或异常的样本^[19],达到质控作用。

实验室可以选择含有一种或多种病原微生物的模拟样

本作为阳性对照。阴性对照对于识别样本间交叉污染以及试剂污染至关重要^[7,22-23]。需要注意的是,阴性对照需要模拟与患者样本相同的基质,通常具有低背景,且能最大程度检测到实验过程的污染物。

3.2 生物信息分析

①质量控制:在对测序结果进行具体的生物信息学分析之前,要先对下机数据进行质量评估,以保证测序结果的可用性。同时,由于病原样本中大多数核酸来自人源背景本身,测序有效数据中一般 90% 以上为人源序列,故测序数据量也要作为质控标准,考虑到微生物序列同源性较高,所以对于检出序列数 (reads) 读长要求 50 bp 以上,考虑到人源基因组的干扰及检测的灵敏度,在没有进行去除人源化基因组成份的前提下,建议有效测序数据量不低于 20 M。

②数据过滤:下机质控合格的数据,需要通过生物信息学分析方法进一步过滤,去除低质量的序列,以获得高质量的序列数据。高质量的序列再进行人源宿主序列去除,目前普遍参考的宿主序列库主要为人类基因组参考序列。

不同的比对方法根据不同的比对策略设计了不同的算法^[24-25],实验室应当选取合适的比对软件,建立完善的实验室比对流程。

③序列比对:经过上述过滤后的序列与病原数据库中的参考序列进行比对,病原数据库涵盖细菌、真菌、病毒、寄生虫等多种病原微生物。

比对成功的序列需要进一步去除高覆盖重复序列和低质量比对序列,并尽可能排除多比对等情况,得到最终病原比对结果。针对最终病原比对结果,计算所有检出病原的参数,包括比对序列数、相对丰度、基因组覆盖度和深度等。

④报告生成:报告生成过程中会参考疑似背景微生物库及阴性对照检测结果,并结合所提供临床信息,最终给出检测报告。

3.3 检测报告内容

以科研为目的的基因扩增检验项目不得向临床出具临床报告^[26]。只有具有资质的检验方,使用获得体外诊断认证的检测试剂盒得到的数据才有资格出具临床报告。

报告应包括:检测病原微生物列表、检出病原序列数量、所检测病原范围、检测方法及检测技术说明;同时对相关专业术语进行解释说明,并注明检测方法的局限性、检测灵敏度和特异性等^[27-30]。

病原微生物列表应包含除背景微生物外,满足判读规则的所有病原微生物。病原微生物种类包括细菌、病毒、真菌和寄生虫,背景微生物应在附录中一并列出。推荐写

明所检出的病原微生物种属情况及相应检出数量。

3.4 mNGS 检测报告和临床解读常用的概念

mNGS 检测常用的几个概念:检出序列数 (reads)、深度、离散度、基因组覆盖度和微生物丰度。Reads 指的是匹配到该病原体的序列数目,其多少与标本中病原体本身载量负荷、核酸提取量、人源序列比例有关。Reads 数越高,表示标本中检测到该病原体的可信度越高。基因组的覆盖度表示检测到的该微生物核酸序列覆盖到该微生物整个基因序列的比值,覆盖度高表示该微生物全基因组测到的比率高。检测离散度指检测到某病原微生物的序列在该病原微生物基因组上分布的随机性,随机性越高,检测的可信度越高。检测深度是指该微生物基因组上某段序列被检测到的次数,深度参数越大表示该微生物被检测到的可靠性越高。微生物丰度指的是该微生物在整个标本中检测到的相同类型微生物中所占的比重,丰度越高表示其在相同类型微生物中所占的比例越高。通常情况下,某微生物的检出序列数、检测深度、检测离散度和基因组覆盖度越高,表示检测到该微生物的可靠性越高。在解读报告时,要充分掌握以上概念,结合临床特征综合判断。

4 临床应用和结果解读原则

与传统病原微生物检测相比,mNGS 敏感性高、信息量大,但也存在一定的局限性。因此,临床医生要正确解读结果、合理指导临床使用,需要注意以下原则:

(1) mNGS 具有比传统病原微生物检测技术更强大的效能,但目前应用方面还存在一些需要改进的地方,不能完全取代常规的检测技术,与传统方法联合使用可以提高病原体诊断的敏感性和特异性。

(2) mNGS 检测报告中提示某种/某些微生物检出序列数较高、基因组覆盖度高,表示检测到该病原微生物;在排除背景菌、污染菌和定植菌的情况下,可以考虑该微生物是致病病原体。

(3) mNGS 对胞内菌和厚壁微生物检出率低,因此即使在检测报告中某种/某些胞内菌/厚壁菌检出序列数不高,也要考虑其为致病病原体的可能。

(4) mNGS 信息量大,不可能在报告中列举出所有检测到的病原体,对于罕见病原体、胞内菌等,可能因检出序列数少、微生物丰度低,在报告中未能列举,如果临床有疑似特殊病原体的感染,可以追溯原始数据库进行查询。

(5) RNA 极易降解,检测要求条件较高,解读 RNA 病原体报告时,要结合标本运输和实验室条件等考虑。

(6) 对于严重感染、生命体征不稳定的患者,在早期病原体不明确的情况下,进行经验性的广谱抗菌药物治疗,

一旦 mNGS 或者传统病原学获得致病病原体后, 针对病原体进行精准治疗, 但要密切随访患者的临床表现和治疗效果。

(7) mNGS 可以早期发现病原体, 指导抗菌药物的精准选择, 减少抗菌药物的使用, 降低患者的病死率, 但尚需要大样本的研究证实。

(8) 当前的 mNGS 尚不能完全指导耐药菌抗感染药物的选择。但如果得到微生物的信息, 可以结合患者的临床特征、当地细菌耐药的流行病学资料协助指导抗菌药物的选择。

5 mNGS 在急危重症感染性疾病应用中尚存在的问题

(1) 背景菌: 在阅读报告时, 要结合采集样本类型、微生物背景、患者的临床特征、传统的病原体检测报告和辅助检查等判断是定植菌、背景菌还是致病菌。

对于 mNGS 的检测报告, 检测机构必须尽可能提供检测列表, 而不是做出判断, 由临床医生结合检测结果和临床病史做出判断。

(2) 胞内菌 / 真菌检出率低: 对于胞内感染菌因释放到体液中含量较少而导致检测敏感性偏低, 比如结核分枝杆菌、军团菌、布鲁菌等。但是随着检测技术的优化与样本类型选择的逐渐完善, mNGS 诊断胞内菌感染的敏感性越来越高^[31]。另外, mNGS 对具有较厚细胞壁的病原微生物如真菌感染, 其核酸提取效率较低, 导致临床检出率和敏感性较低。

(3) RNA 病原体的检测: 由于人体 RNA 转录本身具有比基因组更高的丰度和复杂度, 另外 RNA 容易降解, 对运输和保存的要求较高, 因此 RNA 病毒的临床检测还存在一定的困难, 尚需要不断优化 RNA 病毒的送检流程。

(4) 耐药检测: 目前使用 mNGS 进行药敏检测还存在一定的困难, 一是目前报道的耐药基因型与耐药表型的关联程度还存在一些差距; 二是现有检测方法因成本考虑导致耐药相关基因覆盖度较低, 难以高灵敏度地检测出相关耐药基因。随着技术进步, 耐药基因高覆盖度的 mNGS 检测技术将会形成。

总之, 对感染样本直接进行高通量测序, 通过病原微生物专用数据库比对和智能化分析, 获得疑似感染病原微生物的信息, 并提供全面深入的报告, 可以为急危重症感染患者提供快速精准的诊断依据, 从而精准地抗感染治疗。

执笔: 宋振举

共识专家组成员(按拼音排序): 蔡洪流 曹钰 柴

湘平 陈力 陈立波 陈晓辉 范西真 方邦江 高艳霞 郭伟 韩继媛 何小军 洪玉才 胡必杰 黄曼 蒋龙元 李小刚 林兆奋 陆远强 马青变 马岳峰 毛恩强 孟庆义 潘曙明 裴红红 彭沪 彭再梅 钱欣 施东伟 石松菁 宋振举 苏建荣 孙同文 孙雪莲 童朝阳 王瑞兰 王选铨 王振杰 魏捷 熊辉 徐军 燕亮 杨毅 姚晨玲 于荣国 曾红科 詹红 张根生 张国强 赵斌 赵刻 周平 朱长清 朱海燕 朱华栋 朱继红 朱建军

参考文献

- [1] Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016 [J]. Intensive Care Med, 2017,43(3):304-377. DOI: 10.1007/s00134-017-4683-6.
- [2] 张翠云, 柴舟, 杨芳. 急诊科患者医院感染的易感因素及病原菌分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(2): 380-382. DOI: 10.11816/cn.ni.2014-132079.
- [3] Weng L, Zeng XY, Yin P, et al.; China Critical Care Clinical Trials Group (CCCCCTG). Sepsis-related mortality in China: a descriptive analysis [J]. Intensive Care Med, 2018,44(7):1071-1080. DOI: 10.1007/s00134-018-5203-z.
- [4] 张晖, 弓孟春, 徐军, 等. 中国精准急诊医学的应用体系规划探索 [J]. 中华急诊医学杂志, 2016, 25(10):1219-1223. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2016.10.001.
- [5] 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]. Mbio, 2015,6(6): e01888-15. DOI: 10.1128/mBio.01888-15.
- [6] Westblade LF, Van Belkum A, Grundhoff A, et al. Role of clinicogenomics in infectious disease diagnostics and public health microbiology [J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(7): 1686-1693. DOI: 10.1128/JCM.02664-15.
- [7] Lusk RW. Diverse and widespread contamination evident in the unmapped depths of high throughput sequencing data [J]. PLoS One, 2014, 9(10):e110808. DOI: 10.1371/journal.pone.0110808.
- [8] 周永召, 李亚伦, 范红, 等. 临床宏基因组学在呼吸感染性疾病精准诊疗中的疑问解析 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2018, 17(6):539-543. DOI: 10.7507/1671-6205.201804048.
- [9] 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.
- [10] 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.

- [11] 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.
- [12] Wang Q, Li J, Ji J, et al. A case of *Naegleria fowleri* related primary amoebic meningoencephalitis in China diagnosed by next-generation sequencing[J]. *BMC infectious diseases*,2018,18(1), 349. DOI: 10.1186/s12879-018-3261-z.
- [13] Fan S, Qiao X, Liu L, et al. Next-generation sequencing of cerebrospinal fluid for the diagnosis of neurocysticercosis [J]. *Front Neurol*, 2018, 9:471. DOI: 10.3389/fneur.2018.00471.
- [14] Liu P, Weng X, Zhou J, et al. Next generation sequencing based pathogen analysis in a patient with neurocysticercosis: a case report [J]. *BMC Infect Dis*, 2018, 18(1):113. DOI: 10.1186/s12879-018-3015-y.
- [15] Schlager R, Chiu CY, Miller S, et al. Validation of metagenomic next-generation sequencing tests for universal pathogen detection[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2017,141(6): 776-786. DOI: 10.5858/arpa.2016-0539-RA.
- [16] Gosiewski T, Ludwig-Galezowska AH, Huminska K, et al. Comprehensive detection and identification of bacterial DNA in the blood of patients with sepsis and healthy volunteers using next-generation sequencing method- the observation of DNAemia [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2017,36(2):329-336. DOI: 10.1007/s10096-016-2805-7.
- [17] 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.
- [18] Grumaz S, Stevens P, Grumaz C, et al. Next-generation sequencing diagnostics of bacteremia in septic patients [J]. *Genome Med*, 2016,8(1):73. DOI: 10.1186/s13073-016-0326-8.
- [19] Xie Y, Du J, Jin W, et al. Next generation sequencing for diagnosis of severe pneumonia: China, 2010-2018 [J]. *J Infect*,2018: S0163-4453(18)30277-9. DOI: 10.1016/j.jinf.2018.09.004.
- [20] 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):S231-240. DOI: 10.1093/cid/ciy693.
- [21] 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.
- [22] Strong MJ, Xu G, Morici L, et al. Microbial contamination in next generation sequencing: implications for sequence-based analysis of clinical samples [J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(11): e1004437. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004437.
- [23] Naccache SN, Greninger AL, Lee D, et al. The perils of pathogen discovery: origin of a novel parvovirus-like hybrid genome traced to nucleic acid extraction spin columns [J]. *J Virol*, 2013, 87(22): 11966-11977. DOI: 10.1128/JVI.02323-13.
- [24] Naccache SN, Federman S, Veeraraghavan N, et al. A cloud-compatible bioinformatics pipeline for ultrarapid pathogen identification from next-generation sequencing of clinical samples [J]. *Genome Research*, 2014,24(7): 1180-1192. DOI: 10.1101/gr.171934.113.
- [25] Ounit R, Wanamaker S, Close TJ, et al. CLARK: fast and accurate classification of metagenomic and genomic sequences using discriminative k-mers [J]. *BMC Genomics*,2015,16: 236. DOI: 10.1186/s12864-015-1419-2.
- [26] 中华人民共和国卫生部. 医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法 [S]. 2010-12-06.
- [27] 中国医师协会检验医师分会分子诊断专家委员会. 临床基因检验诊断报告模式专家共识 [J]. *中华医学杂志*, 2016,96(14): 1087-1090. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2016.14.005.
- [28] 黄辉, 沈亦平, 顾红卫, 等. 临床基因检测报告规范与基因检测行业共识探讨 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2018,35(1):1-8. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2018.01.001.
- [29] 中国抗癌协会肿瘤病理专业委员会、国家卫生和计划生育委员会病理质量控制与评价中心、全国分子病理指导委员会. 分子病理诊断实验室建设指南(试行) [J]. *中华病理学杂志*, 2015,44(6):369-371. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2015.06.001.
- [30] Bukowska-Ośko I, Perlejewski K, Nakamura S, et al. Sensitivity of next-generation sequencing metagenomic analysis for detection of RNA and DNA viruses in cerebrospinal fluid: The confounding effect of background contamination [J]. *Adv Exp Med Biol*,2016,944(6):53-62. DOI: 10.1007/5584_2016_42.
- [31] 周呢, 艾静文, 崔鹏, 等. 二代测序技术对活动性结核患者的诊断价值 [J]. *中国防痨杂志*, 2018,40(2):153-156. DOI: 10.3969/j.issn.1000-6621.2018.02.008.

(收稿日期: 2019-01-10)

(本文编辑: 何小军)