

· 标准 · 方案 · 指南 ·

宏基因组二代测序技术在新生儿感染性疾病中的临床应用专家共识

中华医学会儿科学分会新生儿学组

中华儿科杂志编辑委员会

通信作者:周文浩,国家儿童医学中心 复旦大学附属儿科医院新生儿科,上海 201102,

Email:zhouwenhao@fudan.edu.cn

【摘要】 近年来基于高通量测序平台的宏基因组二代测序(mNGS)技术在新生儿感染性疾病领域得到了广泛应用。为了更加规范 mNGS 技术在新生儿重症监护病房的应用,中华医学会儿科学分会新生儿学组和中华儿科杂志编辑委员会组织专家以国内外循证医学证据和最新进展为基础,从 mNGS 技术的临床适应证、标本采集与转运、报告解读等方面给出建议。

Expert consensus on the application of metagenomics next-generation sequencing in neonatal infectious diseases

The Subspecialty Group of Neonatology, the Society of Pediatrics, Chinese Medical Association; the Editorial Board, Chinese Journal of Pediatrics

Corresponding author: Zhou Wenhao, Department of Neonatology, Children's Hospital of Fudan University, National Children's Medical Center, Shanghai 201102, China, Email: zhouwenhao@fudan.edu.cn

宏基因组二代测序(metagenomics next-generation sequencing, mNGS)平台是基于高通量测序技术对各种临床样本中的全部生物基因组进行测序的实验室诊断技术,近年来已逐渐被认识并应用于各种感染性疾病的诊断^[1-2]。mNGS 可以同时测定某一临床样本中数千万条核酸序列,然后通过强大的生物信息学平台将测序数据与病原体数据库进行比对,获得病原体的分类信息,以鉴定可能的致病病原体。此外,mNGS 还可以直接从临床样本分析耐药基因,辅助临床诊断以及分析人类宿主反应(转录组)数据以预测感染原因和评估疾病风险^[3-5]。mNGS 技术的成功开展对部分感染性疾病患者尤其是免疫抑制人群及重症感染人群的病原学诊断起到了突破性作用^[6-8]。长期以来新生

儿感染一直是儿科医生面临的重大挑战,新生儿的免疫系统不成熟,易感因素多,在接触病原体时防御功能较为脆弱,导致相对高的发病率和病死率。由于新生儿感染的临床表现往往不典型,病情较为隐匿、进展迅速,快速明确病原体对疾病的诊治及转归十分重要。基于 mNGS 具有无偏倚性、覆盖广、敏感性高,用时相对较短等优点,尤其可在混合感染或病毒感染方面展现其优势,因此 mNGS 在新生儿感染性疾病中具有广阔的应用前景,但现阶段在新生儿重症监护病房(neonatal intensive care unit, NICU)实践中仍存在一定的局限性及问题:成本相对昂贵;对新生儿的临床适应证认识不足,送检存在较大的盲目性和随意性;样本类型的选择以及对样本送检的流程及注意事项不清楚;实验检测

DOI: 10.3760/cma.j.cn112140-20220113-00046

收稿日期 2022-01-13 本文编辑 李伟

引用本文:中华医学会儿科学分会新生儿学组,中华儿科杂志编辑委员会.宏基因组二代测序技术在新生儿感染性疾病中的临床应用专家共识[J].中华儿科杂志,2022,60(6):516-521. DOI: 10.3760/cma.j.cn112140-20220113-00046.



中华医学会儿科学分会
Chinese Medical Association Publishing House

版权所有 违者必究



流程操作复杂,缺乏统一标准;测序结果复杂,可能出现假阳性结果误导临床等。以上问题均限制了 mNGS 在 NICU 中的临床应用和推广。为了提高 mNGS 的诊断质量,规范其在新生儿感染性疾病领域的临床应用,中华医学会儿科学分会新生儿学组和中华儿科杂志编辑委员会成立专家组,广泛征求意见和建议,基于国内外临床证据,结合临床经验,于 2021 年 7—12 月经过专家反复讨论,制定了“宏基因组二代测序技术在新生儿感染性疾病中的临床应用专家共识”(简称本共识)。本共识主要目标读者为儿科尤其是新生儿科专业医生。

一、mNGS 在 NICU 感染性疾病中的应用

共识 1: 患儿具有急危重症表现,不除外感染,或有继发或并发危及生命的严重感染,需要尽快明确病原体,建议常规检测的同时送检 mNGS。

急危重症指多器官功能衰竭,由新生儿败血症、脑膜炎、重症肺炎、腹腔感染等引起者应及时明确致病微生物,这对于制定有效的治疗方案具有重要作用。但由于其致病微生物复杂,常规方法易遗漏部分病原微生物,因此建议常规检测的同时送检 mNGS。多项研究表明 mNGS 对败血症的检测灵敏度远远高于传统培养^[9-11]。亦有研究通过检测败血症患者血浆样本的细胞游离 DNA,表明基于 mNGS 的检测结果显示有 53% 的患者治疗方案进行了调整^[11]。

共识 2: 高度怀疑患儿存在新生儿血流感染甚至败血症时,若经验治疗 3 d 效果不佳且常规微生物学检查送检阴性,建议调整经验抗微生物治疗方案的同时采集血液样本送检 mNGS。推荐 DNA 测序作为血流感染的首选检测方法,在高度怀疑 RNA 病毒感染的情况下可同时进行 RNA 测序。

Yan 等^[12]的回顾性研究是应用 mNGS 检测儿科重症监护病房中疑似败血症患儿的血液微生物组,在血液样本中的游离循环 DNA 检测出了潜在的致病微生物。由于大部分血流感染的病原体(包括细菌、真菌、寄生虫、DNA 病毒)均以 DNA 作为遗传物质,如果根据适应证送检 mNGS,推荐 DNA 测序作为血流感染的首选检测方法。但也应根据临床流行病学,如发病季节、母亲疾病史、生后时间及临床表现共同判断,选择进行 DNA 或 RNA 测序。

共识 3: 对于疑似中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 感染的患儿,条件允许的情况下建议留取常规、生化及微生物检查所需脑脊液的同时留取 mNGS 所需脑脊液,若脑脊液检查结果提示常规和(或)生化指标异常且常规微生物检

测阴性且经验性抗感染治疗 3 d 无效,建议立即送检 mNGS。

mNGS 应用于新生儿 CNS 感染方面的研究较少,多为病例报告^[13-14],揭示了 mNGS 在疑难病例中的应用价值;以 mNGS 为基础检测 CNS 感染病原以病毒感染多见,细菌检测的研究较少,同时经验性抗菌药物在 NICU 中应用较为广泛,因此 mNGS 在 CNS 感染中的应用更倾向于病毒、非典型病原体或已应用抗菌药物的细菌感染病例^[15]。Guo 等^[16]应用 mNGS 技术对北京儿童医院 99 例细菌性脑膜炎患儿的脑脊液标本进行检测,发现 mNGS 将病原体检测阳性率提高了 13.1%;Li 等^[15]在 22.1% 的疑似 CNS 感染病例中发现了潜在的致病病原体,而这些病例多是常规微生物检测方法阴性情况下才送检 mNGS 的。此外,有报道称通过 mNGS 检测细菌性脑膜炎患儿的脑脊液和血液标本,分析其不同的微生物组特征有助于临床分析及诊疗过程^[17]。Ge 等^[18]提出对于疑似 CNS 感染的患儿,mNGS 联合全外显子测序可显著提高病因诊断率。考虑到脑脊液常规微生物检查的阳性率较其他类型样本低且脑脊液样本所含核酸含量较低,因此脑脊液较适合开展 mNGS 检测。在测序方法的选择上,若临床排除病毒感染的可能,优先进行 DNA 测序。当脑脊液常规、生化无明显异常且脑脊液微生物学检查阴性,临床上仍高度怀疑 CNS 感染,或临床表现复杂、无特定怀疑方向送检 mNGS 时,推荐对脑脊液样本中的 DNA 和 RNA 同时进行测序。

共识 4: 对于疑似呼吸道感染的重症患儿,常规微生物检查(培养或核酸检测)阴性且治疗 3 d 无效,可送检 mNGS,应同时进行 DNA 及 RNA 测序。样本类型优先选择肺泡灌洗液,其次考虑气管插管下获得痰液及鼻咽拭子样本。

mNGS 可对包括呼吸道定植菌群和引起感染的病原菌同时进行检测,同时对于多重感染的鉴定具有极大优势。已有多篇报道应用 mNGS 技术诊断儿童呼吸道感染性疾病的病原体^[6, 19],mNGS 技术在传统病原微生物检测(包括培养、PCR 等)阴性及免疫功能抑制的患儿中应用价值更高。新生儿肺部存在的定植微生物参与其出生后的免疫系统发育和成熟^[20],因此关注呼吸道微生物的构成对于评估患儿病情也很重要。

共识 5: 疑似新发病原体、临床上提示可能有一定的传染性,或者疑似特殊病原体或罕见病原感染,常规微生物检测方法阴性,建议尽快完善



mNGS。

mNGS 检测无需提前设定目标病原体,其直接对样本中所有核酸进行测序,具有检测新发病原和罕见病原的能力^[21]。新发病原体指引起人群中出现某种新的临床表型的病原,或过去存在但其引起的发病率或地理分布明显增加的病原。但对于新发病原,由于缺乏参考基因组,完整的鉴定种属以及和已知种属的进化关系,需要较高的测序序列数,建议优先采集病灶标本或进行富集。

共识 6:疑似存在混合感染,常规微生物检查结果不能解释临床表现的全貌或抗感染治疗的反应,经验性治疗 3 d 无效时,建议进一步完善常规检测的基础上,开展 mNGS。

相比于常规方法有限的检测范围,mNGS 的原理使得其具有更广泛的检测范围,理论上可以检测任意病原微生物。这一特点使得其更易检出混合感染。Wang 等^[22]的研究表明对于肺部混合感染的检测,mNGS 的灵敏度达到 97.2%,而常规方法仅为 13.9%。

共识 7:出现某种感染性疾病的聚集性发病或者疑似院内感染暴发,在常规快速检测不能明确病原时,建议开展 mNGS。

mNGS 能够通过重构病原微生物间的亲缘关系,并结合流行病学信息,鉴定传播簇以及传播链,具有鉴定、监控传染性疾病的暴发和院内感染的能力。Casto 等^[23]通过 mNGS 实现了对儿童诺如病毒院内感染暴发的实时监控,在 13 例患儿中鉴定到 3 个不同的传播簇,并发现 4 例社区传播的病毒毒株和院内感染病毒毒株成簇,提示两者之间具有潜在的传播关系。Xu 等^[24]利用 mNGS 对 25 例呼吸道样本的测序,发现 8 例偏肺病毒毒株均来源于血液科病房,提示存在院内传播。由于病毒的基因组较小,对全基因组范围遗传多样性的刻画所需的测序数据量较小,因此利用 mNGS 对传染性疾病的推断主要集中于病毒。亦有研究利用 mNGS 对粪便样本进行测序,通过将测序序列和地区流行的肺炎克雷伯成簇代表性菌株进行比对的方式,鉴定可能的传播来源^[25]。

共识 8:疑似局部感染,如眼部(角膜炎或溃疡、眼内炎、急性视网膜坏死等)、鼻部、耳部或局部蜂窝织炎等,在常规微生物检测未能明确病原情况下,可开展 mNGS。

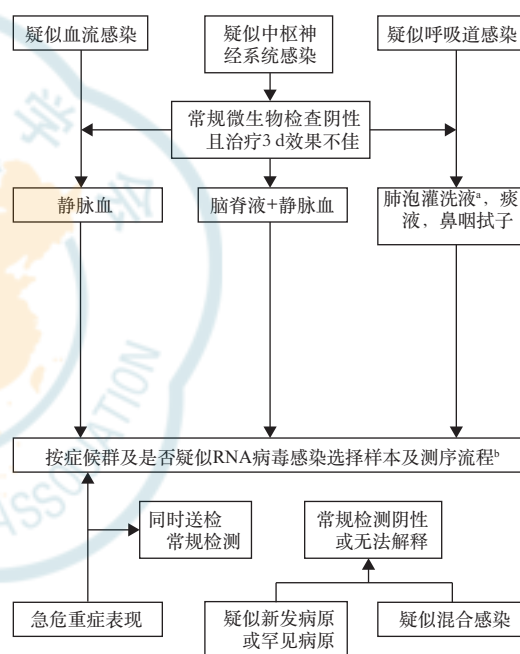
共识 9:由于各种原因导致的胸腔积液及腹腔积液,在送检常规生化及培养的同时留取胸、腹腔

积液样本,若常规、培养阴性或经验性抗感染治疗 3 d 无效,仍怀疑感染所致者,建议立即送检 mNGS。

共识 10:对于 mNGS 检测阴性但临床高度怀疑感染的患儿,必要时再次取样复查 mNGS。

共识 11:对常规微生物学检查容易明确病原体且经验治疗通常有效的感染,不建议常规进行 mNGS 检测。不建议应用 mNGS 评估抗感染治疗效果。

图 1 为新生儿感染性疾病送检 mNGS 的流程图,以便临床医生快速查阅。



注:*呼吸道感染优先选择肺泡灌洗液,再考虑痰液和鼻咽拭子样本;^b推荐 DNA 测序作为血流感染的首选检测方法, RNA 病毒感染不排除的情况推荐 RNA 测序;对于呼吸道感染,同时进行 RNA 和 DNA 测序;对于中枢神经系统感染,在排除病毒感染的情况下,优先进行 DNA 测序;当怀疑病毒感染或临床表现复杂,无特定怀疑方向时,可同时进行 RNA 和 DNA 测序

图 1 新生儿重症监护病房感染性疾病患儿送检宏基因组二代测序流程

二、标本采集和转运

临床上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、腹腔积液、组织、咽拭子、局灶穿刺物等。不同类型的样本采集需遵循以下原则。

1. 从无菌部位(如静脉血、脑脊液、胸腔积液、腹腔积液等)采集标本时,应严格无菌操作,采集前对局部及周围皮肤的消毒,消毒液与皮肤需要作用

一定时间,待其干燥后采样。采集后的标本须用无菌容器盛装。血液标本建议取 1~3 ml(不同实验室要求不同,最低限为 0.5 ml),采用专用采血管,即游离 DNA 样本保存管,其内由乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)和保护剂组成,可抑制血浆中核酸酶及有核细胞中 DNA 的释放,采血后上下颠倒混匀 5~10 次;脑脊液样本常规建议应为 1 ml 以上(新生儿因脑脊液样本较难获得,最低样本量为 600 μ l),采用专用采血管或无菌冻存管;胸、腹腔积液需富集后提取核酸,至少采集 5 ml,避免经引流管采集。若增加 RNA 测序时,需提前联系实验室提供添加 RNA 稳定剂的采血管或无菌冻存管,在采集样本时须同时采 2 管;若样本同时进行 DNA 及 RNA 测序,1 管样本量为单独 DNA 测序的 2 倍,同时向检测实验室特殊说明需立即进行核酸提取^[26-27]。

2. 从有菌部位(如痰液、肺泡灌洗液、咽拭子等)采集标本时,应采取必要措施,严格无菌操作等,尽量减少污染,以免干扰后续检测结果;同时标明样本的采集部位。肺泡灌洗液样本应为 3 ml 以上,采用无菌冻存管;痰液样本应为 3 ml 以上,采用无菌冻存管;咽拭子只适用于呼吸道病毒检测^[27]。

共识 12:各类型样本采集需要无菌操作,血液、高凝状态的胸腔积液、腹腔积液、脑脊液样本,采集后需上下颠倒混匀 5~10 次。非血液标本采集通常采用带螺旋盖的无菌冻存管,但预期可能凝集的标本及血液样本需采用专用采血管。所有样本采集完成后,均需要封口膜密封,条码标记。

共识 13:推荐直接从患儿感染部位的体液或组织中采集样本。

共识 14:患儿存在感染表现但病情危重或不能耐受有创操作时,可考虑采集患儿的血液标本进行常规微生物方法检测的同时送检 mNGS。

原则上,送检感染部位的体液或者组织标本灵敏度、特异度和可信度更高。有创操作不耐受时,可送检血液标本,但可能会降低检测结果的准确性。有研究发现,对于重症肺部感染患者,痰液或肺泡灌洗液和血液标本检测病原体的一致性为 40%~50%^[1, 28]。

标本转运:所有样本均应及时送检。若样本在 24 h 内到达实验室并开始检测,可考虑冰袋低温运输;若运输时间 24~72 h,应干冰运输(血液样本应先分离血浆后保存运输)。不能及时送检样本长期保存原则^[26-27]:(1)DNA 测序为 -20 $^{\circ}$ C 保存不超过

7 d;(2)RNA 测序应置 -80 $^{\circ}$ C 理论上可长期保存;(3)避免样本反复冻融,一般不得超过 3 次;(4)若怀疑高致病性或突发传染病,严格按照国内传染病法等相关法律要求包装及转运。尽可能在医院生物安全防护条件下抽提核酸后再送测序。

三、报告解读

共识 15:解读 mNGS 检测报告应参考检测方法的数据和检出病原序列数量、基因组覆盖度、微生物丰度等指标,结合标本采集部位、检出病原的致病特性以及患儿临床资料进行个体化解读。

mNGS 由于检出结果丰富,虽然提高了病原微生物检测敏感性,也对正确判读致病微生物造成了困难。尤其是有菌区的样本,由于定植微生物和致病微生物的混杂以及不同微生物基因组大小和核酸提取效率的差异,单纯依靠检出序列数判读并不准确。建议由临床感染或临床微生物学从业人员在相关的生物信息学培训后进行解读。通常, mNGS 报告通过测序短序列的数量、基因组覆盖度及微生物丰度进行病原体鉴定,即指示某个潜在病原体的碱基序列片段数量越多,基因组覆盖率及微生物丰度越高,表明该物种在样本中存在的可能性越高,可信度越大。阳性的判读通过建立阈值实现,阈值往往包含以上 3 个指标及内参对照的检出等情况,不同实验室采取的阈值标准往往不同。在阳性报告中,达到阳性阈值的微生物检测结果即可信,但如果有多种微生物存在,则应结合样本类型考虑定植微生物相关假阳性结果;在阴性报告中,需判断阴性结果原因,是因为病原体载量未达到阳性阈值标准还是因为确实不存在病原体,需结合患儿具体临床信息。此外,阴性结果标本如仅进行 DNA 测序,建议进一步进行 RNA 测序以防 RNA 病毒作为病原体引起假阴性结果。

结果报告信息:(1)患儿姓名、出生日期和性别;(2)送检单位名称及实验室的名称、地址及联系方式;(3)样本采集日期和时间、验收日期和测试日期;(4)报告发布日期;(5)实验操作分析人员及审核人员;(6)检测方法相关指标包括测序质量、读长(测序仪单个测序反应所得到的碱基序列)等,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、检测灵敏度和特异度等;(7)检测病原微生物列表、检出病原序列数量、深度、离散度、基因组覆盖度或综合以上多个指标计算而得的鉴定置信度和相对丰度等;(8)结论及建议。

结果报告常用术语解释:(1)深度为该微生物



基因组上某段序列被检测到的次数;(2)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;(3)基因组覆盖度指达到给定深度的测序碱基占整个基因组或目标区域的百分比;(4)微生物丰度指除去宿主序列之后,某微生物物种序列在相应大类物种中的分布比例;(5)鉴定置信度指综合离散度、基因组覆盖度、深度等多个参数计算所得的简化参数,用于判断样本是否存在疑似致病微生物核酸序列。

共识 16:源于微生物正常定植部位的标本(例如支气管肺泡灌洗液),鉴别检出序列是属于致病微生物、污染物,还是定植菌群较为困难,应综合患儿临床表现及辅助检查综合判断。

微生物和宿主因素复杂的相互作用影响患儿健康,例如微生物组在调节宿主免疫反应中的作用,或者难以区分检测到的微生物是污染物、定植者还是真正的病原体。因此建议在出具检测报告时,结合不同标本类型与检出病原微生物的种类进行解读,关注疑似病原体,区分呈现无菌部位与正常有菌部位的微生态菌群以及排除因提取、建库等试剂耗材引入的试剂工程菌;确认致病微生物时,应考虑检出微生物是否为感染部位的潜在病原或经过充分验证判断致病可能性^[29]。

对于在核酸提取过程中破壁困难的微生物,如分枝杆菌属、诺卡菌属、真菌等,即使在检测报告中读长数较低,建议也要考虑其为致病微生物的可能,并采用其他方法验证如特异引物的 PCR 或一代测序等分子生物学检测, G 试验、GM 试验、曲霉菌 IgG 抗体或隐球菌荚膜多糖抗原等血清学方法检测。

共识 17:在新生儿群体中谨慎应用 mNGS 进行耐药基因检测。只有标本来源于无菌区(如血液、脑脊液)且标本采集过程污染概率极低时,可考虑检测耐药基因。建议检测单位选择筛选具有重要临床意义的耐药基因进行报告,意义不明确、干扰临床解读的耐药基因应慎重报告;建议临床对报告的耐药基因慎重解读,综合报告病原菌、患儿基本情况、临床药敏结果等多个因素进行判断。

mNGS 在 NICU 的院内感染防控方面具有独特的优势,在医院多重耐药病原体感染暴发的监测和预防中,利用 mNGS 平台对病原体进行鉴定、分型以及潜在的抗菌药物耐药基因检测对控制感染扩散大有裨益^[30]。但目前,由于 mNGS 无法确定耐药基因的来源物种且检测结果存在较高的假阳性

和假阴性,在临床应用中应谨慎使用。通过 mNGS 检测病原体核酸也并不能证明已鉴定的微生物是引发疾病的病原体,因此必须在临床背景下解释这些结果,特别是在临床样本中发现非典型或不常见的微生物时,应予以特殊关注,建议随后进行验证性调查,如组织活检样本的正交试验和血清转化证明,或通过使用细胞培养等方法(视情况而定),以确定其真正的致病潜力。

(武辉 周文浩 母得志 冯星
富建华 史源 执笔)

参与本专家共识讨论和修改的专家名单(按单位和姓名拼音排序):北京大学第三医院(童笑梅);重庆医科大学附属儿童医院(贺雨、史源);复旦大学附属儿科医院(甘明宇、胡黎园、蒋思远、王瑾、王来栓、吴冰冰、周文浩);福建省妇幼保健院(杨长仪);福建医科大学附属福州儿童医院(章丽燕);甘肃省妇幼保健院(易彬);广东省妇幼保健院(杨杰);广西医科大学第二附属医院(陈玉君);广州市妇女儿童医疗中心(周伟);哈尔滨市儿童医院(董力杰);河北省儿童医院(马莉);华中科技大学同济医学院附属湖北妇幼保健院(祝华平);华中科技大学同济医学院附属同济医院(李文斌);吉林大学第一医院(武辉、严超英);江西省儿童医院(陈丽萍);解放军总医院第七医学中心儿科医学部(尹晓娟);昆明医科大学第一附属医院(梁琨);南方医科大学深圳市妇幼保健院(杨传忠);南京医科大学附属儿童医院(周晓光);内蒙古医科大学附属医院(梅花);宁夏医科大学总医院(李怀玉);青岛大学附属医院(姜红);青海省妇女儿童医院(刘充德);山东大学齐鲁儿童医院(李晓莺);山西省儿童医院 山西省妇幼保健院(秦桂秀);上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心(孙建华);上海交通大学医学院附属新华医院(张拥军);首都儿科研究所附属儿童医院(李莉);首都医科大学附属北京儿童医院(黑明燕);四川大学华西第二医院(母得志、王华);苏州大学附属儿童医院(丁欣、冯星);天津市中心妇产科医院(郑军);温州医科大学附属第二医院(陈尚勤);西北妇女儿童医院(李占魁);西南医科大学附属医院(董文斌);新疆维吾尔自治区儿童医院(李龙);浙江大学医学院附属儿童医院(陈正、杜立中、马晓路);郑州大学第三附属医院(徐发林);郑州大学附属儿童医院 河南省儿童医院(康文清);中国科技大学附属第一医院 安徽省立医院(周晓丽);中国医科大学附属盛京医院(富建华);中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院(王丹华);中南大学湘雅医院(王铭杰);遵义医科大学附属医院(曹云涛)

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

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] 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.
- [3] Charalampous T, Kay GL, Richardson H, et al. Nanopore metagenomics enables rapid clinical diagnosis of bacterial lower respiratory infection[J]. Nat Biotechnol, 2019, 37(7):783-792. DOI: 10.1038/s41587-019-0156-5.



- [4] 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 U S A*, 2018, 115(52): E12353-E12362. DOI: 10.1073/pnas.1809700115.
- [5] Zhang H, Ai JW, Yang W, et al. Metatranscriptomic characterization of coronavirus disease 2019 identified a host transcriptional classifier associated with immune signaling[J]. *Clin Infect Dis*, 2021, 73(3): 376-385. DOI: 10.1093/cid/ciaa663.
- [6] Zinter MS, Dvorak CC, Mayday MY, et al. Pulmonary metagenomic sequencing suggests missed infections in immunocompromised children[J]. *Clin Infect Dis*, 2019, 68(11):1847-1855. DOI: 10.1093/cid/ciy802.
- [7] Langelier C, Zinter MS, Kalantar K, et al. Metagenomic sequencing detects respiratory pathogens in hematopoietic cellular transplant patients[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018, 197(4): 524-528. DOI: 10.1164/rccm.201706-1097LE.
- [8] Goggin KP, Gonzalez-Pena V, Inaba Y, et al. Evaluation of plasma microbial cell-free DNA sequencing to predict bloodstream infection in pediatric patients with relapsed or refractory cancer[J]. *JAMA Oncol*, 2020, 6(4):552-556. DOI: 10.1001/jamaoncol.2019.4120.
- [9] Blauwkamp TA, Thair S, Rosen MJ, et al. Analytical and clinical validation of a microbial cell-free DNA sequencing test for infectious disease[J]. *Nat Microbiol*, 2019, 4(4): 663-674. DOI: 10.1038/s41564-018-0349-6.
- [10] 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.
- [11] 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
- [12] Yan G, Liu J, Chen W, et al. Metagenomic next-generation sequencing of bloodstream microbial cell-free nucleic acid in children with suspected sepsis in pediatric intensive care unit[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11:665226. DOI: 10.3389/fcimb.2021.665226.
- [13] Zhan C, Chen L, Hu L. Neonatal *Ureaplasma parvum* meningitis complicated with subdural hematoma: a case report and literature review[J]. *BMC Infect Dis*, 2021, 21(1):268. DOI: 10.1186/s12879-021-05968-1.
- [14] Wang Q, Wang K, Zhang Y, et al. Neonatal *Ureaplasma parvum* meningitis: a case report and literature review[J]. *Transl Pediatr*, 2020, 9(2): 174-179. DOI: 10.21037/tp.2020.02.04.
- [15] Li ZY, Dang D, Wu H. Next-generation sequencing of cerebrospinal fluid for the diagnosis of unexplained central nervous system infections[J]. *Pediatr Neurol*, 2021, 115: 10-20. DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2020.10.011.
- [16] 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.
- [17] Liao H, Zhang Y, Guo W, et al. Characterization of the blood and cerebrospinal fluid microbiome in children with bacterial meningitis and its potential correlation with inflammation[J]. *mSystems*, 2021, 6(3): e0004921. DOI: 10.1128/mSystems.00049-21.
- [18] Ge M, Gan M, Yan K, et al. Combining metagenomic sequencing with whole exome sequencing to optimize clinical strategies in neonates with a suspected central nervous system infection[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11:671109. DOI: 10.3389/fcimb.2021.671109.
- [19] Atkinson KV, Bishop LA, Rhodes G, et al. Influenza C in Lancaster, UK, in the winter of 2014-2015[J]. *Sci Rep*, 2017, 7:46578. DOI: 10.1038/srep46578.
- [20] Man WH, Clerc M, de Steenhuijsen P, et al. Loss of microbial topography between oral and nasopharyngeal microbiota and development of respiratory infections early in life[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019, 200(6): 760-770. DOI: 10.1164/rccm.201810-1993OC.
- [21] Wu F, Zhao S, Yu B, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China[J]. *Nature*, 2020, 579(7798):265-269. DOI: 10.1038/s41586-020-2008-3.
- [22] Wang J, Han Y, Feng J. Metagenomic next-generation sequencing for mixed pulmonary infection diagnosis[J]. *BMC Pulm Med*, 2019, 19(1): 252. DOI: 10.1186/s12890-019-1022-4.
- [23] Casto AM, Adler AL, Makhsous N, et al. Prospective, real-time metagenomic sequencing during norovirus outbreak reveals discrete transmission clusters[J]. *Clin Infect Dis*, 2019, 69(6): 941-948. DOI: 10.1093/cid/ciy1020.
- [24] Xu Y, Lewandowski K, Jeffery K, et al. Nanopore metagenomic sequencing to investigate nosocomial transmission of human metapneumovirus from a unique genetic group among haematology patients in the United Kingdom[J]. *J Infect*, 2020, 80(5):571-577. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.02.003.
- [25] Mu A, Kwong JC, Isles NS, et al. Reconstruction of the genomes of drug-resistant pathogens for outbreak investigation through metagenomic sequencing[J]. *mSphere*, 2019, 4(1): e00529-18. DOI: 10.1128/mSphere.00529-18.
- [26] Binda K, Callendrello A, Ma KC, et al. Rapid inference of antibiotic resistance and susceptibility by genomic neighbour typing[J]. *Nat Microbiol*, 2020, 5(3): 455-464. DOI: 10.1038/s41564-019-0656-6.
- [27] 中华医学会检验医学分会临床微生物学组, 中华医学会微生物学与免疫学分会临床微生物学组, 中国医疗保健国际交流促进会临床微生物与感染分会. 宏基因组高通量测序技术应用于感染性疾病病原检测中国专家共识[J]. *中华检验医学杂志*, 2021, 44(2): 107-120. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20201026-00794.
- [28] 中华医学会检验医学分会. 高通量宏基因组测序技术检测病原微生物的临床应用规范化专家共识[J]. *中华检验医学杂志*, 2020, 43(12): 1181-1195. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20200903-00704.
- [29] Langelier C, Fung M, Caldera S, et al. Detection of pneumonia pathogens from plasma cell-free DNA[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2020, 201(4): 491-495. DOI: 10.1164/rccm.201904-0905LE.
- [30] Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies[J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(6): 333-351. DOI: 10.1038/nrg.2016.49.

