

本文引文格式:黄晨,叶雨,罗海凤,等.宏基因组二代测序技术在肾移植术后肺部感染中的应用价值[J].右江民族医学院学报,2022,44(4):540-544.

【论著与临床报道】

宏基因组二代测序技术在肾移植术后肺部感染中的应用价值

黄晨¹,叶雨²,罗海凤¹,聂峰¹,孙煦勇²,秦科²,董建辉²,李壮江¹,王洪良¹

(1. 中国人民解放军联勤保障部队第九二三医院,广西南宁 530021;

2. 广西医科大学第二附属医院,广西南宁 530005)

摘要:目的 探讨宏基因组二代测序技术(mNGS)在肾移植术后肺部感染中的应用价值。方法 回顾性分析2016年1月—2020年1月在中国人民解放军联勤保障部队第九二三医院器官移植中心因肺部感染入治疗的肾移植受者58例的病史资料,分为传统病原体检测组(对照组)和mNGS组。通过比较两种不同的病原学检测方法的结果以及治疗前后各组的临床指标进行分析。结果 mNGS组检测需要时间和阳性检出率明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);mNGS组抗菌药物使用强度明显少于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);在治疗后CD4、CD4/CD8和谷丙转氨酶值明显少于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);治疗后mNGS组患者的住院时间明显短于对照组($P < 0.05$)。两组的住院费用、治疗后两组CD4、CD8,血糖值3项指标间的差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 与传统检测方法相比,mNGS可明显提高病原菌检出率和缩短检测时间,在肾移植术后肺部感染的治疗中应用价值高,值得在临床上推广应用。

关键词:肾移植;肺部感染;宏基因组学

中图分类号:R617;R619.3

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2022)04-0540-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2022.04.013

Application of metagenomic next-generation sequencing in pulmonary infection after renal transplantation

Huang Chen¹, Ye Yu², Luo Haifeng¹, Nie Feng¹, Sun Xuyong²,
Qin Ke², Dong Jianhui², Li Zhuangjiang¹, Wang Hongliang¹

(1. The 923rd Hospital of Joint Logistic Support Force of the People's Liberation Army, Nanning 530021, Guangxi, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530005, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To explore the application value of metagenomic next-generation sequencing (mNGS) in pulmonary infection after renal transplantation. **Methods** This study carried out a retrospective analysis of the medical history of 58 kidney transplant recipients who were hospitalized for pulmonary infection in the Organ Transplant Center of The 923rd Hospital of the Joint Logistic Support Force of the Chinese Peoples' Liberation Army from January 2016 to January 2020. They were divided into a conventional pathogen detection group (control group) and a mNGS group. It moved on to compare and analyze the results of the above two pathogenic detection methods and the clinical indicators of each group before and after treatment. **Results** The mNGS group needed shorter detection time and had higher positive detection rate than the control

基金项目:中国人体器官捐献专项研究课题(CODMP2017015)

第一作者简介:黄晨(1985—),男,硕士,主治医师,研究方向:重症医学、麻醉及器官移植,E-mail:415802290@qq.com

通讯作者简介:董建辉(1980—),男,硕士,副主任医师,研究方向:器官移植基础与临床研究、器官捐献管理研究,E-mail:dongjianhui303@163.com

group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The mNGS group used less antibiotics than the control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). After treatment, the values of CD4, CD4/CD8 and glutamic-pyruvic transaminase in the mNGS group were significantly lower than those in the control group, indicating significant statistical differences ($P < 0.05$). After treatment, the length of hospitalization in the mNGS group was significantly shorter than that in the control group ($P < 0.05$). There were no significant differences in hospitalization expenses, CD4 level, CD8 level and blood glucose between two groups after treatment ($P > 0.05$). **Conclusion** Compared with conventional detection methods, mNGS can significantly improve the detection rate of pathogenic bacteria and shorten the detection time. It is of high application value in the treatment of pulmonary infection after kidney transplantation and worthy of clinical application.

Key words: kidney transplantation; pulmonary infection; metagenomics

肾移植治疗是终末期肾病的有效治疗方法之一^[1]。肾移植术受者需要长期口服免疫抑制剂,术后免疫功能低下,部分患者还常合并糖尿病、贫血、粒细胞减少等并发症,因而感染成为肾移植术后的主要并发症之一,尤其是肺部感染,其发病率在 5%~14.96%^[2-4]。往往病势凶险,迅速进展为重症肺炎,并可能继发排斥反应、胰腺炎、多器官功能不全,继而危及患者生命。因此治疗上需要尽快采用敏感药物控制感染,而明确病原体则是关键一环。近年来宏基因组二代测序技术(metagenomics nextgeneration sequencing, mNGS)逐渐发展成为检测病原体的新手段,此方法快速精准,阳性率高,可准确客观且快速高效地检测多种病原微生物^[5-6],本中心运用该法对肾移植术后肺部感染患者进行病原学检测,治疗效果显著提高,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 1 月—2020 年 1 月在中国人民解放军联勤保障部队第九二三医院器官移植中心因肺部感染入院治疗的肾移植受者 58 例进行回顾性对照研究。(1)病例纳入标准:胸部影像学检查可见浸润影、实变影或磨玻璃影出现或进展,并兼含下列 3 项中 2 项以上:①发热,体温 $> 38\text{ }^{\circ}\text{C}$;②脓性气道分泌物;③白细胞 $> 10 \times 10^9/\text{L}$ 或 $< 4 \times 10^9/\text{L}$,并除外肺水肿、结核、栓塞、肿瘤、间质非感染性疾病、肺不张、嗜酸性粒细胞浸润症及肺血管炎等^[7-8]。(2)排除标准:①临床资料欠完整致影响研究评估的准确性;②因死亡或转院住院不足 24 h 的患者及病情未愈出院或转院者;③合并自身免疫性疾病、其他免疫功能缺陷疾病的患者;④多器官联合移植受者。(3)分组:2016 年 1 月—2018 年 5 月为对照组,共 31 例,年龄 16~57 岁;男 27 例,女 4 例;感染发生时间距手术 1 个月~12 年,采用传统病原检测方法。2018 年 6 月—2020 年 1 月为 mNGS 组,共 27 例,年龄 18~62 岁,均为男性,感染发生时间距手术 27 d~9 年,均采用 mNGS 检测

结合传统病原检测。

1.2 研究方法

1.2.1 检测方法 对照组于入院后尽早进行病原体检测及培养,重症患者行纤维支气管镜收集肺泡灌洗液送检,主要方法有:血清学反应、生化反应、直接涂片显微镜、分离培养、核酸分子杂交、PCR 等。mNGS 组在进行传统检测的同时,留取肺泡灌洗液及外周血送深圳华大基因股份有限公司做宏基因组二代基因检测,灭活样本后,提取核酸并与已有基因数据库进行比较,获得报告结果序列号,过程符合生物安全条例。

1.2.2 结果判读 根据检测结果,对照组如能发现明确病原体,排除定植及污染的可能后,同时与临床特征相符,综合考虑后则判定结果为阳性,并据此结果调整抗感染方案,如不能明确病原微生物,则判定为阴性。mNGS 组则以结果中某类病原微生物序列数个数作为评价指标,检出序列号在 100 以上的病原体,同时与临床特征相符,综合考虑后则判定检测结果为阳性;或如果同时进行的任何传统试验为阳性,并且符合临床特征,则试验结果为阳性;如果检测结果为阳性,且没有临床相关感染或实验室细菌,则视为假阳性,如果检测结果为阴性,并且患者在经过抗感染治疗后明确表明感染有所改善,则定义为假阴性,需排除污染、定植等可能。

1.2.3 观察指标 观察两组患者年龄、性别比例、移植术后时间、免疫抑制剂方案、病原学检出率、检测结果回报时间、住院时间、住院费用、抗生素强度、治疗前后肝肾功能、空腹血糖、免疫抑制剂浓度、T 细胞亚群等指标。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件对数据进行分析,计量资料呈正态分析以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 t 检验,明显偏态采用中位数 [$M(P_{25} \sim P_{75})$] 表示,采用秩和检验;计数资料采用频数(n)或者百分率(%)表示,采用 χ^2 或校正 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料的对比 两组在年龄、性别、治疗前 CD4、CD8、D4/CD8、肌酐、ALT、血糖等基线资料比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。mNGS 组住院时间明显短于对照组, 治疗后 mNGS 组

CD4/CD8、ALT 值明显少于对照组, 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。两组之间住院费用差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。治疗后两组 CD8、血糖值、血肌酐差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 两组一般资料对比

项目	mNGS 组 ($n=27$)	对照组 ($n=31$)	t/χ^2	P
年龄	40.30±11.94	36.10±9.01	1.523	0.133
性别(男/女)	27/0	27/4	2.002	0.157
住院时间/d	24.70±15.01	32.91±11.26	-2.372	0.021
住院费用/元	120651.56±101545.65	132527.49±62498.71	-0.544	0.589
治疗前 CD4/(cells· μL^{-1})	317.07±269.19	344.29±219.58	-0.424	0.673
治疗前 CD8/(cells· μL^{-1})	223.52±150.72	233.52±160.10	-0.244	0.808
治疗前 CD4/CD8	1.38±0.76	1.62±0.94	-1.099	0.277
治疗后 CD4/(cells· μL^{-1})	541.93±453.57 ^a	841.74±558.28 ^b	-2.223	0.030
治疗后 CD8/(cells· μL^{-1})	450.41±410.12 ^b	434.90±294.12 ^b	0.167	0.868
治疗后 CD4/CD8	1.42±0.76	1.95±0.87 ^a	-2.456	0.017
治疗前肌酐/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	194.78±84.15	154.45±67.48	1.994	0.052
治疗后肌酐/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	188.42±62.42	153.74±81.37	1.799	0.077
治疗前 ALT/(U· L^{-1})	17.00(11.00~23.00)	18.00(13.00~27.00)	-0.656	0.512
治疗后 ALT/(U· L^{-1})	18.00(11.00~32.00)	29.00(17.00~49.00) ^a	-2.370	0.018
治疗前血糖/(mmol· L^{-1})	8.06±3.76	8.49±3.46	-0.446	0.657
治疗后血糖/(mmol· L^{-1})	5.06±0.97	5.58±2.16	-1.159	0.251
术后时间/月	4.00(10.00~14.00)	8.00(6.00~11.00)	-0.485	0.628

注:①表内正态分布计量资料数据以($\bar{x}\pm s$)表示,非正态分布计量资料数据以 $M(P_{25}\sim P_{75})$ 表示;②组内治疗前后比较,a: $P < 0.05$,b: $P < 0.01$ 。

2.2 两组病原菌检验需要时间及检出率结果对比

mNGS 组送检标本通过纤维支气管镜留取的肺部灌洗液为 24 例,外周血 3 例。检测需要时间明显短于对照组,阳性检出率明显高于对照组,两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。对于 mNGS 组的病例,既采用宏基因组二代测序法检测菌群和病毒,又采用传统检验病原菌法,统计结果显示两种方法差异有统计学意义 ($P < 0.05$),高通量测序法检测需要时间明显减少,阳性检出率明显高于传统检验法。见表 3。

表 3 mNGS 组两种检测方法结果对比

检测方法	n	检测需要时间/d	阳性检出率/%
宏基因组二代测序法	27	3.84±1.14	27(100.00)
传统检测法	27	6.85±0.53	6(22.22)
t/χ^2		-11.680	-34.360
P		<0.001	<0.001

注:表内计量资料数据以($\bar{x}\pm s$)表示,计数资料数据用 [n (%)]表示。

表 2 两组病原菌检验需要时间及检出率结果对比

组别	n	检测需要时间/d	阳性检出率/%
mNGS 组	27	3.84±1.14	27(100.00)
对照组	31	8.61±5.97	9(29.03)
t/χ^2		-4.363	30.871
P		<0.001	<0.001

注:表内计量资料数据以($\bar{x}\pm s$)表示,计数资料数据用 [n (%)]表示。

2.3 mNGS 组检测病原菌结果

2.3.1 mNGS 组检测结果 检出的病原菌包括细菌、病毒、真菌、放线菌,其中细菌包括:革兰阳性菌(副链球菌、婴儿链球菌、假肺炎链球菌、口腔链球菌、人葡萄球菌)、革兰阴性菌(浅黄奈瑟菌、长奈瑟菌、殊异韦荣球菌、痰二氧化碳噬纤维菌、流感嗜血杆菌、埃及嗜血杆菌、坦纳拟普雷沃菌、产黑色普雷沃菌、苍白普雷沃菌、毗邻颗粒链菌)。病毒包括:人类疱疹病毒 5 型、人类疱疹病毒 4 型、人类 β 疱疹病毒 5 型。真菌包括:耶氏肺孢子虫、限制马拉色菌。放线菌包括:龋齿放线

菌、黏液罗氏菌、奇异劳特罗普菌。该组病例按照传统方法检测,仅检测出革兰阴性菌:肺雷克雷伯菌、芳香杆菌、居泉沙雷菌,检测出真菌:曲霉菌、热带念珠菌、热带假丝酵母菌。

2.3.2 对照组检测结果 检出革兰阳性菌(表皮葡萄球菌 1 例),检测出真菌(白色念珠菌、热带念珠菌、光滑念珠菌、近平滑念珠菌、都柏林假丝酵母菌各 1 例),肺炎支原体和 Q 热立克次体各 1 例。

2.3.3 两线检测病原体结果对比 mNGS 组中用宏基因组二代测序检测了单个病原体排列最多的为耶氏肺孢子虫,而 mNGS 组采用传统检验病原体方法及对照组未能检测到耶氏肺孢子虫、人类疱疹病毒、奇异劳特罗普菌、普雷沃菌、链球菌、放线菌属,见表 4。

表 4 两组检测病原体结果对比

组别	n	耶氏肺孢子虫	人类疱疹病毒	奇异劳特罗普菌	普雷沃菌	链球菌	放线菌属
mNGS 组							
宏基因组二代测序法	27	14	6	2	3	4	4
传统检测法	27	0	0	0	0	0	0
对照组	31	0	0	0	0	0	0

2.4 两组抗菌药物使用强度对比 抗菌药物使用强度计算公式,抗菌药物消耗量(累积 DDD 数)=抗菌药物消耗量(g)÷DDD 值,单个患者抗菌药物使用强度=(抗菌药物消耗量×100)÷(1×住院天数),排除了抗病毒药物及抗结核药物的使用强度。抗菌药物 DDD 值见表 5。mNGS 组抗菌药物使用强度明显少于对照组,mNGS 组与对照组之间比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 6。

表 5 抗菌药物 DDD 值

抗菌药物	DDD 值/g	抗菌药物	DDD 值/g
舒普深	4	卡泊芬净	0.05
左氧氟沙星	0.5	复方磺胺甲噁唑	0.6(口服)
两性霉素 B	0.035	替考拉宁	0.4
泰能	2	伏立康唑	0.4
特治星	14	莫西沙星	0.4
氟康唑	0.2	米卡芬净	0.1
利奈唑胺	1.2	比阿培南	1.2
美罗培南	2	阿奇霉素	0.5
哌拉西林	14	拉氧头孢	4
替加霉素	0.1	万古霉素	2

表 6 两组抗菌药物使用强度对比

组别	n	抗菌药物使用强度
mNGS 组	27	348.90(263.40~657.00)
对照组	31	594.91(298.40~951.58)
Z		-2.065
P		0.039

注:表内计量资料数据以 $M(P_{25} \sim P_{75})$ 表示。

3 讨论

临床肾移植中心在肾移植围手术期会使用生物制剂的免疫诱导治疗,使受者免疫力短期内显著下降。另外,他克莫司等强效免疫抑制剂的广泛使用,也使得围手术期后的受者机体免疫缺陷状况持续维持,与正常人相比更易发生各种严重的细菌、真菌、病毒、结核等感染,且多为复合性感染。另一方面,供者来源性感染也不少见,文献报道发生率为 0.2%~1.7%,多数发生在移植术后 1 个月内^{[9]352}。同时由于抗生素的不合理使用,耐药病原微生物感染病例逐渐增多。在此背景下肾移植术后感染往往起病急、进展快、病死率高。一旦发生多重耐药细菌感染,病死率高达 40.4%^{[9]352}。因此,尽快明确感染源有效指导治疗是治愈感染、降低受者死亡率并尽可能避免移植肾失功能的关键。

本研究通过比较分析发现,与传统的微生物培养检测手段不同,mNGS 直接从临床标本(肺组织、支气管肺泡灌洗液、血清、深痰等)中提取核酸并进行序列分析。根据与现有基因文库比较的序列信息,可以快速、客观地获得样本的结果。本研究中,mNGS 组检测报告时间明显低于对照组,最短的从送检到获取报告仅 2 d;总体病原体检出率达到 100%,不仅明显高于对照组,而且检出比较罕见病原体如:灰黄色普氏菌 1 例、人类 β 疱疹病毒 5 型 1 例和坦纳拟普雷沃菌 1 例等,而常规培养方法不仅耗时间长,且只检出有限种类的常见微生物。在时效性比较方面,mNGS 法优势明显,为及时调整抗感染方案赢得了时间。尽早明确病原微生物,可避免传统的“大包围”抗感染策略,降低了抗生素使用强度,减少药物不良反应和耐药菌的产生,同时减少住院天数;相对对照组,mNGS 组在器官功能保护上具有较大的优势,临床数据对比显示肝功能损害明显减少,且 mNGS 组 CD4/CD8 比值更低,意味着急性排斥反应发生的风险比对照组更低,不需要大幅调整免疫抑制剂方案,从而保证受者的肾功能稳定和长期生存。本研究两组资料中的移植肾功能方面差异不大,考虑与本中心在器官功能的维护方面有丰富的经验且尽量控制或减少具有肾功能损害副作用的抗生素有关^[10]。

在灵敏度高,阳性病原种类多的情况下,检测结果的特异性如何是临床医生进行针对性治疗关切的问题。在本研究中 mNGS 组 27 例同时进行了 mNGS 和传统检测,其中 21 例传统检测阴性的病例 mNGS 检测呈阳性,充分表明了 mNGS 在灵敏度上具有巨大的优势,与文献报告结果相符^[11]。文献报道肾移植术后重症肺炎受者行 mNGS 检测在提高病原学检测阳性率的同时,其结果也更容易被临床医生采信^[12]。检出序列数是指与该病原体序列相匹配的序列数目,其数

目与标本所含病原体载量、核酸提取量等有关。检出序列数值与标本中含有该病原体的可信度成正比,一般而言,某病原体检测深度、离散度越高,检出其序列数、基因组覆盖度越高,则检测到该病原体可靠性越高^[13]。文献报道^[14]通过 mNGS 辅助诊断非 HIV 相关耶氏肺孢子菌合并巨细胞病毒肺炎 1 例,该病例提示在免疫功能不全的重症肺炎患者中,通过进行 mNGS 病原体检测可及时指导临床医生选择正确的抗感染治疗方案,改善患者预后。本研究考虑序列数在 100 以上的病原体,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,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。本研究两组病例对照中,mNGS 组根据结果判读后采取的抗感染治疗,在抗菌药物强度低的同时,缩短了住院时间,也证明 mNGS 检测结果具有较好的特异性。

本研究中,mNGS 组阳性率最高的病原体为耶氏肺孢子菌(14/27,51.85%),而传统检测手段则无论在 mNGS 组还是对照组均未能检测出肺孢子菌。事实上,肺孢子菌肺炎是一种机会性真菌感染,主要发生在器官移植受者,包括获得性免疫缺陷综合征等免疫缺陷患者,文献报道其在危险人群中发病率并不低^[15]。但目前国内肺孢子菌肺炎获得的病原学证据较少,以经验性诊断为主,缺乏精准有效的治疗手段,常常导致病情延误,有报道称肺孢子菌肺炎早期如果得不到及时有效的治疗,其病死率可达 90%~100%^[16]。本研究在病情允许下入院 3 d 内进行肺泡灌洗液的 mNGS 检测,结果表明对耶氏肺孢子菌的检测具有较高的敏感度,结合临床表现、影像和实验室检测等资料,进行精准治疗,从而获得良好疗效。

综上所述,本研究发现 mNGS 作为一种病原微生物的新型检测方法,可提高病原体的检出率,从而提高治疗效率,包括减少抗感染药物使用强度,治疗更加合理、有针对性,减少药物不良反应,缩短住院天数。尽管该技术在临床应用中仍有不足之处,如费用较高、无法提供药敏结果、无法区分阳性病原体究竟是定植菌还是病原体等。但应用 mNGS 技术可为疾病的治疗提供“快、精且准”的指向,与传统病原学诊断方法相辅相成,为肾移植术后肺部感染的能够早期检测感染源,指导临床用药提供了科学依据,值得在临床上推广应用。

参考文献:

[1] VON DER LIPPE N, WALDUM B, BREKKE F B, et al. From dialysis to transplantation: a 5-year longitudinal study on self-reported quality of life[J]. *BMC Nephrol*, 2014, 15: 191. doi:10.1186/1471-2369v15-191.

- [2] 王嘉漫,包红,凤伟.肾移植术后慢性期不同病原肺部感染的临床表现及预后[J].*实用临床医学*,2007,8(6):31-33.
- [3] 罗晓辉,薛武军,田普训,等.98 例肾移植受者术后肺部感染的临床分析[J].*现代泌尿外科杂志*,2011,16(6):490-492.
- [4] HOYO I, LINARES L, CERVERA C, et al. Epidemiology of Pneumonia in Kidney Transplantation[J]. *Transplanta Proc*, 2010, 42(8): 2938-2940.
- [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): e1888-e1815.
- [6] WESTBLADE L F, 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.
- [7] 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.
- [8] METLAY J P, WATERER G W, LONG A C, et al. Diagnosis and treatment of adults with community-acquired pneumonia. an official clinical practice guideline of the american thoracic society and infectious diseases society of america[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019, 200(7): e45-e67.
- [9] 中华医学会器官移植学分会.器官移植术后耐药菌感染诊疗技术规范(2019 版)[J].*器官移植*, 2019, 10(4): 352-358.
- [10] 孙煦勇,秦科.中国公民逝世后捐献供器官功能评估和维护专家共识(2016 版)[J].*中华移植杂志(电子版)*, 2016, 10(4): 145-153.
- [11] 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): 571-574.
- [12] LI Y, SUN B, TANG X, et al. Application of metagenomic next-generation sequencing for bronchoalveolar lavage diagnostics in critically ill patients[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2020, 39(2): 369-374.
- [13] WYPYCH T P, WICKRAMASINGHE L C, MARS-LAND B J. The influence of the microbiome on respiratory health[J]. *Nat Immunol*, 2019, 20(10): 1279-1290.
- [14] 徐钰源,徐旭雯,梁广宇,等.通过宏基因组二代测序技术辅助诊断非 HIV 相关耶氏肺孢子菌合并巨细胞病毒肺炎 1 例并文献复习[J].*右江民族医学院学报*, 2020, 42(5): 635-639, 649.
- [15] MCLAREN M R, WILLIS A D, CALLAHAN B J. Consistent and correctable bias in metagenomic sequencing experiments[J]. *Elife*, 2019, 8: e46923. doi: 10.7554/eLife.46923.
- [16] CHARALAMPOUS T, KAY G L, RICHARDSON H, et al. Nanopore metagenomics enables rapid clinical diagnosis of bacterial lower respiratory infection[J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(7): 783-792.

收稿日期:2022-03-20;修回日期:2022-04-05