doi:10.11659/jjssx.04E022015

·临床研究·

三种检测方法在感染性心内膜炎病原学诊断中的作用

朱丽萍[1],赵金龙[2],付 亮[2],励 峰[2] (1.上海交通大学医学院附属第九人民医院检验科,上海 200011;2.上海交通大学附属第六人民医院心血管外科,上海 200233)

[摘 要] **目的** 比较血培养、赘生物培养、赘生物宏基因组二代测序(mNGS)在感染性心内膜炎病原学诊断中的作用。**方法** 回顾性分析上海交通大学附属第六人民医院67例行手术治疗的感染性心内膜炎患者的临床资料,并对血培养、赘生物培养、赘生物mNGS的病原微生物检出情况进行对比分析。根据血培养前是否进行抗感染治疗将患者分为抗感染组与非抗感染组,比较2组中三种方法病原微生物检出情况。**结果** 血培养、赘生物培养及赘生物mNGS均检出相同病原微生物,赘生物培养检出率为15.22%,血培养检出率为72.41%,mNGS检出率为96.77%;3组检出率比较差异有统计学意义($P<0.01$)。血培养前抗感染组中血培养、赘生物培养和赘生物mNGS三种方法的检出率分别为71.70%、16.28%、96.49%,三种方法病原微生物检出率比较差异有统计学意义($P<0.001$)。血培养前非抗感染组中血培养、赘生物培养、赘生物mNGS三种检测方法的病原微生物检出率分别为80.00%、0、100%,三种方法病原微生物检出率比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 无论血培养前是否应用抗生素治疗,mNGS对于感染性心内膜炎病原微生物检出率都高于血培养和赘生物培养,其检出率高、快速准确,可作为感染性心内膜炎微生物学诊断的重要辅助工具。

[关键词] 感染性心内膜炎;血培养;微生物技术;高通量基因测序;组织培养技术

[中图分类号] R446.5 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-04-06

Role of three methods in pathogenic microbiological diagnosis of infective endocarditis

ZHU Li-ping[1],ZHAO Jin-long[2],FU Liang[2],LI Feng[2] (1.Department of Laboratory Medicine,Shanghai Ninth People's Hospital,Shanghai JiaoTong University School of Medicine,Shanghai 200011,China;2.Department of Cardiovascular Surgery,Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai JiaoTong University,Shanghai 200233,China)

Abstract: Objective To compare the roles of the blood culture, vegetation culture and vegetation metagenomics next-generation sequencing (mNGS) in the etiological diagnosis of infective endocarditis. **Methods** The clinical data of 67 cases of infective endocarditis undergoing surgical treatment in Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai JiaoTong University were retrospectively analyzed, and the detection of pathogenic microorganisms in the blood culture, vegetation culture and vegetation mNGS were compared and analyzed. The patients were divided into the anti-infection group and the non-anti-infection group according to whether the anti-infective treatment was performed before blood culture, and the detection of pathogenic microorganisms by three methods in the two groups was compared. **Results** The same pathogenic microorganisms were detected in the blood culture, vegetation culture and vegetation mNGS. The detection rate of the vegetation culture was 15.22%, the blood culture was 72.41%, the vegetation mNGS was 96.77%, and there was statistically significant difference in the detection rate among the three groups ($P<0.01$). The detection rates of the three methods in the anti-infection group before blood culture were 71.70%, 16.28%, and 96.49%, respectively, and the differences in the detection rates of pathogenic microorganisms among the three methods were statistically significant ($P<0.001$). The detection rates of the three methods in the non-anti-infection group before blood culture were 80.00%, 0, and 100%, respectively, and the differences of pathogenic microorganisms among the three methods were also statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** The detection rate of mNGS for infective endocarditis pathogenic microorganisms was higher than those of the blood culture and vegetation culture, regardless of whether antibiotics are used before blood culture. Its high detection rate, rapidity and accuracy can be used as an important auxiliary tool for the microbiological diagnosis of infective endocarditis.

Keywords: infective endocarditis; blood culture; microbiological technique; high-throughput nucleotide sequencing; tissue culture techniques

近年来,随着诊断水平的提高,越来越多的感染性心内膜炎患者能够得到及时诊治,大部分患者能够通过正规有效的抗感染治疗获得痊愈[1-3]。但仍有部分患者因致病微生物种类及其致病性、机体免疫功能低

[基金项目] 上海市科学技术委员会科研计划项目(17411966600)

[通信作者] 励 峰,E-mail:cardiosh@aliyun.com

下等原因导致瓣膜功能受损,出现心衰或瓣膜赘生物脱落,从而引起栓塞等并发症,需要外科手术干预[4],且术后需要长期规律抗感染治疗[5]。由于术前应用抗生素等原因导致传统病原学检测手段不能准确检出病原体,故术后准确的病原学诊断结果是除手术外影响感染性心内膜炎患者预后的重要因素[6]。目前感染性心内膜炎病原学诊断有赖于血培养及赘生物培养,而宏基因组二代测序(metagenomics next-generation sequencing,mNGS)较多应用于中枢神经系统、骨关节、皮肤和软组织感染及呼吸道感染的病原学诊断,其在感染性心内膜炎病原学诊断中的作用正受到越来越多的关注。本研究通过回顾性分析感染性心内膜炎患者行手术治疗后的赘生物培养、赘生物 mNGS 及术前血培养的病原微生物检出情况,旨在评价三种病原学检测方法的诊断价值,以期提高感染性心内膜炎的诊断准确度。

1 资料与方法

1.1 临床资料

回顾性分析 2017 年 11 月 21 日至 2020 年 5 月 19 日上海市第六人民医院 67 例行手术治疗的感染性心内膜炎患者的临床资料。本组病例中男 49 例,女 18 例,年龄 18 ~ 78 岁,平均(47.2 ± 16.0)岁。所有患者入院前均有发热症状,体温高于 38.5 ℃,病程 9 d 至6 个月。其中 11 例患者伴有胸闷、咳嗽等症状,6 例患者合并脑梗死,1 例患者合并脾梗死。13 例(19.4%)既往有心脏病史或心脏手术史。术前实验室检查结果提示尿素(5.74 ± 3.72)mmol/L、白蛋白(31.26 ± 5.58)g/L、中性粒细胞(73.63 ± 9.75)%、降钙素原(0.75 ± 3.06)ng/mL、白细胞(8.24 ± 4.04)$\times 10^9$/L。所有患者术前超声心动图提示有瓣膜赘生物,其中二尖瓣 28 例,主动脉瓣 25 例,三尖瓣 7 例,二尖瓣合并主动脉瓣 5 例,右房 1 例,动脉导管未闭 1 例;赘生物长度最长为 30 mm,位于主动脉瓣;最短为 4 mm,为多发,位于二尖瓣并伴二尖瓣前叶穿孔。62 例患者血培养检查前有抗生素使用史,5 例检查前未使用抗生素。

所有患者均符合改良 Duke 诊断标准。主要标准:①血培养阳性,即 2 次不同的血培养结果均为感染性心内膜炎的典型致病菌,或非上述致病菌但与感染性心内膜炎一致的微生物持续性血培养阳性;②贝氏柯克斯体单次血培养阳性或第 1 阶段 IgG 滴度 > 1∶800;③超声心动图示感染性心内膜炎的阳性表现,如赘生物、脓肿、新发瓣膜穿孔或反流。次要标准:①易患因素,如基础心脏病或静脉吸毒成瘾;②体温高于 38 ℃;③血管损害征象;④免疫异常征象;⑤血培养阳性但未能达到主要标准要求,或与感染性心内膜炎一致的活动性细菌感染。确定诊断:符合 2 条主要标准,或 1 条主要标准 + 3 条次要标准,或 5 条次要标准。排除标准:虽诊断为感染性心内膜炎但单个赘生物长度不超过 10 mm 且无脓肿及新发瓣膜功能异常,经规律抗感染治疗后复查赘生物消失,血培养转阴性;疑似感染性心内膜炎,如术前有发热病史但不满足感染性心内膜炎诊断标准,由于瓣膜原发病变而行手术治疗;普通心脏瓣膜病需手术治疗。

患者在入院前或入院后均行至少 1 次血培养检查,术前完善相关检查,明确诊断,排除手术禁忌者,于体外循环辅助下行赘生物清除术,术中根据患者瓣膜毁损情况行瓣膜成形或瓣膜置换术,术中将切除的赘生物平均分为 3 份,1 份放置于无菌培养瓶送赘生物培养,1 份送病理,1 份放置于无菌培养管加 95% 酒精或生理盐水,4 ~ 8 ℃储存送 mNGS 检测。

由于大部分感染性心内膜炎患者在血培养前应用抗生素可能对细菌活性产生影响,从而降低血培养和赘生物培养的检出率,故将本组病例分为血培养前抗感染组与非抗感染组,分析血培养前应用抗生素与否对三种检测方法对病原微生物检出率的影响。

1.2 方法

1.2.1 血培养 所有患者入院后均至少行 1 次血培养,皮肤消毒处理后,从两个不同部位(主要为双侧上肢)采集 8 ~ 10 mL 静脉血,然后置于需氧菌、厌氧菌、真菌血培养瓶(法国生物梅里埃公司),采用全自动 BACTEC 血培养仪(美国 BD 公司)按说明书进行检测。血培养菌株主要采用 VITEK MS 细菌自动化鉴定系统(法国生物梅里埃公司)进行菌种鉴定及药敏分析。

1.2.2 赘生物培养 心脏瓣膜组织及赘生物在手术切除后立即使用无菌研磨器研磨成匀浆,转种于血平板、巧克力平板及科玛嘉真菌显色平板,培养 2 周以上,培养出的微生物采用 VITEK MS 细菌自动化鉴定系统鉴定菌种。

1.2.3 赘生物 mNGS 通过标准程序采集患者瓣膜及赘生物样本,利用天根磁珠法大体积核酸提取试剂盒提取样本中 DNA(不同样本核酸提取前处理有所不同)。然后用 Qubit dsDNA HS Assay Kit 检测 DNA 浓度,NanoDrop2000 检测 DNA 纯度,1% 琼脂糖凝胶

电泳检测 DNA 完整性。通过 Covaris 超声波破碎仪打断为 300 bp 左右的片段,使用 KAPA Biosystems 试剂盒制备 DNA 文库。利用 Agilent 2100 生物分析仪检测文库质量,通过 Qubit 2.0 检测文库浓度,q-PCR 定量下机测序数据量。按照 Illumina NexSeq 仪的使用说明书进行 75 bp 单端测序,由仪器自带的 NextSeq Control Software 读取序列信息。将获得的高质量去除宿主基因的序列与微生物基因组数据库进行比对,完成菌种鉴定过程。对于结核分枝杆菌、布鲁氏菌,mNGS 检测到的物种特异性序列为 1 条及以上不重叠区域序列,则为阳性;对于其他细菌(不包括以上细菌)、真菌、病毒和寄生虫,mNGS 检测到的物种特异性序列为 3 条及以上不重叠区域序列,则为阳性。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,计数资料以率(%)或构成比表示,组间采用 χ^2 检验。检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三种方法病原体检出情况

本研究血培养、赘生物培养、赘生物 mNGS 检出病原微生物的患者分别为 58 例、46 例、62 例。三种方法检出的病原微生物类型中以革兰氏阳性菌为主,其中以链球菌属最多,血培养检出 28 例,赘生物培养检出 3 例,mNGS 检出 39 例。血培养共检出 4 例革兰氏阴性菌(干燥奈瑟菌 1 例、流感嗜血杆菌 1 例、大肠埃希菌 2 例),其中 2 例患者术前 2 次血培养检出的细菌不同,第 1 次为粪肠球菌,第 2 次为大肠埃希菌。mNGS 检出 6 例革兰氏阴性菌,分别为奈瑟菌 2 例、流感嗜血杆菌 3 例及羊布鲁氏杆菌 1 例。血培养检出 2 例真菌,分别为白色念珠菌和光滑念珠菌,其中光滑念珠菌同样为赘生物培养检出;mNGS 除检出 2 例真菌外,另检出 1 例结核分枝杆菌、2 例贝纳柯克斯体(Q 热立克次体)。其中,mNGS 检出的病原微生物中,无乳链球菌(1 例)、停乳链球菌(1 例)、解没食子酸链球菌(1 例)、贝纳柯克斯体(2 例)、猪红斑丹毒丝菌(1 例)等都是临床引起感染性心内膜炎不常见的病原微生物。

血培养、赘生物培养及 mNGS 三种方法均一致检出相同病原微生物,但赘生物培养仅 7 例患者检出病原微生物,检出率为 15.22%;血培养 42 例患者(其中 2 例患者 2 次血培养结果回报不同细菌)检出病原微生物,检出率为 72.41%;相比前两种方法,mNGS 60 例患者检出病原微生物,检出率高达 96.77%。三种方法的病原微生物检出率比较,差异有统计学意义($P<0.01$),见表 1。

表 1 三种方法病原微生物检出情况(例)

病原微生物		血培养 ($n=58$)	赘生物培养 ($n=46$)	mNGS ($n=62$)
革兰氏阳性菌	链球菌	28	3	39
	葡萄球菌	4	1	4
	肠球菌	4	2	5
	杆菌(猪红斑丹毒丝菌)	1	0	1
革兰氏阴性菌		4	0	6
其他		3	1	5

2.2 血培养前抗感染组与非抗感染组中三种检测方法检出情况

血培养前抗感染组中血培养、赘生物培养和赘生物 mNGS 三种方法的检出率分别为 71.70%(38/53)、16.28%(7/43)、96.49%(55/57),三种方法病原微生物检出率比较差异有统计学意义($P<0.001$)。血培养前非抗感染组中血培养、赘生物培养、赘生物 mNGS 三种检测方法的病原微生物检出率分别为 80.00%(4/5)、0(0/3)、100%(5/5),三种方法病原微生物检出率比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。因此,无论血培养前是否应用抗生素治疗,mNGS 对于感染性心内膜炎病原微生物检出率都高于血培养和赘生物培养。

3 讨论

感染性心内膜炎为心脏内的感染,临床较为罕见,但对患者影响较大[7]。通常认为有心脏基础疾病或既往有瓣膜置换史的患者易患感染性心内膜炎,但有研究显示至少 50% 的感染性心内膜炎患者无心脏基础疾病[8]。本组患者中 13 例(19.4%)既往有心脏病史或心脏手术史,除了既往有心脏病史或心脏手术史,有创操作、静脉注射毒品、免疫力低下等也是感染性心内膜炎的易患因素[9]。据统计,感染性心内膜炎发病率为 0.03% ~ 0.10%,且其发病率呈逐年上升趋势[10]。随着临床治疗水平的提高,感染性心内膜炎患者的病死率有下降趋势,但患者术后 1 年病死率仍高达 30%[10]。发达国家感染性心内膜炎的病原微生物以金黄色葡萄球菌为主,而我国以链球菌属为主[11],故病原微生物的异质性、地域性也是感染性心内膜炎诊断及治疗中的一大挑战。

感染性心内膜炎的快速、准确诊断是临床追求的目标,一旦诊断延误,将错过最佳的治疗时间,导致各

种并发症的发生,造成患者预后不良[12]。2000 年修订的 Duke 标准[13]认为血培养阳性和超声心动图提示心脏内赘生物,并结合临床症状是目前诊断感染性心内膜炎的主要方法。但随着临床预防性使用抗生素的增加,30% 的感染性心内膜炎患者因血培养病原微生物检出率低且超声心动图不明确,被诊断为疑似,导致病情延误,进而影响预后[14]。新的检查手段(如四维 CT、FDG-PET、白细胞成像)可提高感染性心内膜炎的诊断率[15],但目前未普遍应用于临床。

目前血培养广泛应用于临床,其结果及药敏结果对临床疾病的诊断、治疗及指导临床抗生素使用具有重要的意义。但由于临床采血时机是否最佳(即使用抗菌药物前,在寒颤或发热初 30 min 至 1 h)、样本采集、处理不规范及预防性使用抗生素等原因,导致 10% ~ 20% 的感染性心内膜炎患者的血培养为阴性[16]。而本研究中血培养阴性率为 27.59%,说明血培养用于感染性心内膜炎的诊断存在准确性欠佳的问题。这可能是感染性心内膜炎患者血培养前使用抗生素、胞内细菌或真菌感染等原因引起。但质谱微生物鉴定系统的产生能够通过质谱直接鉴定细菌种类,较常规血培养更加快速准确[17]。准确地判断病原微生物种类有助于临床诊断感染性心内膜炎及排除其他需鉴别诊断的疾病,同时可根据病原微生物结果进行相应的治疗。

感染性心内膜炎赘生物是由于心内膜感染微生物(包括细菌、病毒、真菌等)在瓣叶上形成赘生物,并延伸至腱索、心房、心室、室间隔的内膜上,从而导致瓣膜和心血管内膜的结构发生炎症性病变。理论上直接进行赘生物培养或者 mNGS 的病原微生物检出率较血培养高,但本研究中赘生物培养阳性率较血培养低,仅为 15.22%,可能原因是患者血培养前使用抗生素导致赘生物中病原微生物活性降低或送检样本体积过小,难以达到足够的浓度。除此之外,赘生物培养的临床应用要求较高,感染性心内膜炎患者需要进行外科手术干预后才可取得样本,这也限制了其临床应用。但是,对于术前血培养阴性的感染性心内膜炎患者,若赘生物培养结果为阳性,其赘生物培养结果及药敏结果对患者术后抗感染治疗具有重要的指导意义。

微生物群中的病毒、细菌和部分真菌成员的基因组相对较小,因而能够测定其中某些高丰度成员甚至全部成员的完整基因构成[18]。通过数百万到数千万读数级别的深度测序,可直接对临床样本进行微生物基因组分析。这种对宿主、微生物和环境中全部 DNA 进行测序的方法,通常称为宏基因组测序。由于此种测序基于随机抽样,因此对于低丰度微生物类群的敏感度及所测基因组序列的完整性完全取决于测序的深度,得到的测序读数越多,对低丰度微生物类群的灵敏度就越高[19]。本研究中 mNGS 阳性病原微生物检出率高达 96.77% 即证明了这一点。近年来,mNGS 作为一种不依赖培养的方法,已被应用于感染性疾病的病因学诊断[20-22],其在中枢神经系统、骨关节、皮肤和软组织感染及呼吸道感染中已经得到广泛应用,mNGS 应用于感染性心内膜炎的病原学诊断也受到了越来越多的关注[23]。应用 mNGS 直接对赘生物进行分析可准确、快速地判断病原微生物,以指导临床疾病的诊治。由于宏基因组学并不需先检验可疑的病原微生物,因此在识别不常见或未知病原微生物方面非常有效,基于其丰富的基因库,mNGS 可检出一些罕见的病原微生物[24]。如本组病例中无乳链球菌、停乳链球菌、解没食子酸链球菌、贝纳柯克斯体、猪红斑丹毒丝菌、真菌都是临床引起感染性心内膜炎不常见的病原微生物。

与基于培养的诊断方法不同,mNGS 不依赖于目标微生物的分离或繁殖,检测微生物的范围更广泛。mNGS 相比一代测序大幅降低了成本,保持了较高的准确性,并且大幅缩短了测序时间(只需 48 ~ 72 h)[18,25],与血培养及赘生物培养的检测时间相比也明显缩短(尤其对于苛养以及慢生长病原体的检测),对于术前血培养阴性患者可根据赘生物 mNGS 结果早期进行抗感染治疗。且 mNGS 结果不受患者是否使用抗生素治疗的影响。本研究结果显示,无论血培养前是否应用抗生素治疗,mNGS 对于感染性心内膜炎病原微生物的检出率均高于血培养和赘生物培养。但 mNGS 的临床应用也存在一定的限制性,首先,其不能判断病原微生物的药敏情况,只能为诊断提供依据;其次,由于目前真菌的参考序列数据库尚未完善,分类方法也不统一,真菌 DNA 在环境中的广泛存在,以及所用试剂的多样性,使得 mNGS 鉴定真菌变得更加复杂。值得注意的是,当 mNGS 应用于临床诊断时,为确保结果的准确性、可重复性和可比性,对样本采集、核酸提取和数据分析等过程进行标准化操作非常关键[26]。以往研究证实了 mNGS 应用于临床诊断的价值,未来的科技进展有望促进其在临床诊断中的广泛应用[27]。

综上,赘生物 mNGS 凭借其高检出率、准确和快速

的特点可作为感染性心内膜炎病原学诊断的重要辅助手段,但由于其临床应用存在一定的限制性,需与血培养及赘生物培养等传统检测方法联合应用,实现感染性心内膜炎患者术后个体化、精准化抗感染治疗。

[参考文献]

[1] Ciurus M. Prevention of endocarditis in dentistry[J]. Pol Merkur Lekarski, 2021,49(289):88-89.

[2] Rutherford SJ, Glenny AM, Roberts G, et al. Antibiotic prophylaxis for preventing bacterial endocarditis following dental procedures [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2022, 5: CD003813. doi: 10.1002/14651858.CD003813.pub5.

[3] Bouza E, Munoz P, Burillo A. Gram-negative endocarditis: disease presentation, diagnosis and treatment [J]. Curr Opin Infect Dis, 2021, 34(6):672-680. doi:10.1097/QCO.0000000000000788.

[4] Kitai T, Masumoto A, Okada T, et al. Optimal timing of surgery for patients with active infective endocarditis [J]. Cardiol Clin, 2021, 39(2):197-209. doi:10.1016/j.ccl.2021.01.002.

[5] Luque Paz D, Lakbar I, Tattevin P. A review of current treatment strategies for infective endocarditis[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2021,19(3):297-307. doi:10.1080/14787210.2020.1822165.

[6] Firiana L, Siswanto BB, Yonas E, et al. Factors affecting mortality in patients with blood-culture negative infective endocarditis[J]. Int J Angiol,2020,29(1):12-18. doi:10.1055/s-0039-3402744.

[7] Cahill TJ, Prendergast BD. Infective endocarditis[J]. Lancet, 2016, 387(10021):882-893. doi:10.1016/S0140-6736(15)00067-7.

[8] Cahill TJ, Baddour LM, Habib G, et al. Challenges in infective endocarditis[J]. J Am Coll Cardiol,2017,69(3):325-344. doi:10.1016/j.jacc.2016.10.066.

[9] Rajani R, Klein JL. Infective endocarditis: a contemporary update[J]. Clin Med (Lond),2020,20(1):31-35. doi:10.7861/clinmed.cme.20.1.1.

[10] Desimone DC, Wilson WR, Baddour LM. Trends in infective endocarditis incidence, microbiology, and valve replacement in the United States from 2000 to 2011: the devil is in the details[J]. J Am Coll Cardiol, 2015,66(10):1201-1202. doi:10.1016/j.jacc.2015.05.079.

[11] Xu H, Cai S, Dai H. Characteristics of infective endocarditis in a tertiary hospital in East China[J]. PLoS One,2016,11(11):e0166764. doi:10.1371/journal.pone.0166764.

[12] Dickerman SA, Abrutyn E, Barsic B, et al. The relationship between the initiation of antimicrobial therapy and the incidence of stroke in infective endocarditis: an analysis from the ICE prospective cohort study (ICE-PCS)[J]. Am Heart J,2007,154(6):1086-1094. doi:10.1016/j.ahj.2007.07.023.

[13] Li JS, Sexton DJ, Mick N, et al. Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis[J]. Clin Infect Dis, 2000,30(4):633-638. doi:10.1086/313753.

[14] Vieira ML, Grinberg M, Pomerantzeff PM, et al. Repeated echocardiographic examinations of patients with suspected infective endocarditis [J]. Heart, 2004, 90(9): 1020-1024. doi: 10.1136/hrt.2003.025585.

[15] Mgbojikwe N, Jones SR, Leucker TM, et al. Infective endocarditis: beyond the usual tests[J]. Cleve Clin J Med,2019,86(8):559-567. doi:10.3949/ccjm.86a.18120.

[16] Suardi LR, De Alarcon A, Garcia MV, et al. Blood culture-negative infective endocarditis: a worse outcome? Results from a large multicentre retrospective Spanish cohort study[J]. Infect Dis (Lond), 2021, 53(10):755-763. doi:10.1080/23744235.2021.1925342.

[17] Seng P, Drancourt M, Gouriet F, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. Clin Infect Dis, 2009, 49(4):543-551. doi:10.1086/600885.

[18] Besser J, Carleton HA, Gerner-Smidt P, et al. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections[J]. Clin Microbiol Infect,2018,24(4):335-341. doi:10.1016/j.cmi.2017.10.013.

[19] Schlaberg 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.

[20] Gu W, Deng X, Lee M, et al. Rapid pathogen detection by metagenomic next-generation sequencing of infected body fluids[J]. Nat Med, 2021,27(1):115-124. doi:10.1038/s41591-020-1105-z.

[21] 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.

[22] 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. doi:10.3389/fcimb.2019.00351.

[23] Cai S, Yang Y, Pan J, et al. The clinical value of valve metagenomic next-generation sequencing when applied to the etiological diagnosis of infective endocarditis[J]. Ann Transl Med,2021,9(19):1490. doi:10.21037/atm-21-2488.

[24] Chiu CY, Miller SA. Clinical metagenomics[J]. Nat Rev Genet,2019, 20(6):341-355. doi:10.1038/s41576-019-0113-7.

[25] Han D, Li Z, Li R, et al. mNGS in clinical microbiology laboratories: on the road to maturity[J]. Crit Rev Microbiol,2019,45(5-6):668-685. doi:10.1080/1040841X.2019.1681933.

[26] Mattei V, Murugesan S, Al Hashmi M, et al. Evaluation of methods for the extraction of microbial DNA from vaginal swabs used for microbiome studies[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9: 197. doi: 10.3389/fcimb.2019.00197.

[27] Velasquez-Mejia EP, De La Cuesta-Zuluaga J, Escobar JS. Impact of DNA extraction, sample dilution, and reagent contamination on 16S rRNA gene sequencing of human feces[J]. Appl Microbiol Biotechnol,2018, 102(1):403-411. doi:10.1007/s00253-017-8583-z.

(编辑:龙小芬)