

# 宏基因组测序在传染病检测中的应用

邓炜<sup>1,2</sup> 综述 何建安<sup>2</sup>,朱丽<sup>2</sup>,张然<sup>2</sup>,田羽彤<sup>1</sup>,刘国平<sup>1</sup> 审校

1.长江大学动物科学技术学院,湖北 荆州 434025;

2.深圳国际旅行卫生保健中心(深圳海关口岸门诊部),广东 深圳 518000

**【摘要】** 近年来,随着宏基因组测序技术在分子生物学领域的快速发展,宏基因组测序为传染病致病病原体尤其是未知病原的分型溯源和生物学特性研究提供了更加便捷、高效的手段。该技术相较于传统检测手段具有明显的时效性、灵敏度高、广谱鉴定出病原体,有助于采用针对性的防控措施,是各种传染病预防控制的关键。本综述主要以高通量测序技术进展为基础,探讨宏基因组测序技术在细菌、病毒、真菌以及寄生虫等传染性疾病中的实际运用情况,并讨论了该技术可能面临的挑战和前景。

**【关键词】** 宏基因组测序;高通量测序;传染病

**【中图分类号】** R51 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2024)10-1504-05

**Application of metagenomic sequencing in the detection of infectious diseases.** DENG Wei<sup>1,2</sup>, HE Jian-an<sup>2</sup>, ZHU Li<sup>2</sup>, ZHANG Ran<sup>2</sup>, TIAN Yu-tong<sup>1</sup>, LIU Guo-ping<sup>1</sup>. 1. College of Animal Science and Technology, Yangtze University, Jingzhou 434025, Hubei, CHINA; 2. Shenzhen International Travel Healthcare Center (Shenzhen Customs Port Clinic), Shenzhen 518000, Guangdong, CHINA

**【Abstract】** In recent years, with the rapid development of metagenomic sequencing technology in the field of molecular biology, metagenomic sequencing provides a more convenient and efficient means for the type tracing and biological characteristics research of pathogenic pathogens of infectious disease, especially unknown pathogens. Compared with traditional detection methods, this technology has obvious advantages of timeliness and high sensitivity. Rapid, accurate, and broad-spectrum identification of pathogens is conducive to the adoption of targeted prevention and control measures and is the key to the prevention and control of various infectious diseases. Based on the progress of high-throughput sequencing technology, this review mainly discusses the practical application of metagenomic sequencing technology in infectious diseases such as bacteria, viruses, fungi and parasites, and the possible challenges and application prospects of this technology.

**【Key words】** Metagenomic sequencing; High-throughput sequencing; Infectious disease

宏基因组(metagenomics)也称元基因组,于1998年由Handelsman等<sup>[1]</sup>在一篇研究土壤微生物的文章中首次提出,宏基因组学研究与传统微生物研究方式的最大区别在于前者把微生物看成一个整体,摆脱了对单个微生物培养和分离的步骤,直接对环境中的所有微生物基因组进行研究,进而可以全面地对所有微生物基因组进行分析<sup>[2]</sup>。与传统微生物研究方法相比,宏基因组学研究克服了绝大部分微生物不能培养、痕量菌无法检测的技术难点,因此近年来在环境微生物学研究中得到了广泛应用。新一代测序技术的出现又给宏基因组学的研究带来了新的机遇。

宏基因组测序技术现已成为临床诊断的重要辅助手段,目前三个应用较多的主流平台中,Illumina的HiSeq 2000能测150 bp(单向),其新推出的MiSeq平

台最长可测至250 bp(单向),该系列仪器成本低、灵活性高、通量大,目前仍是二代测序平台中的主流测序平台<sup>[3]</sup>。SOLiD 5500xl能测75 bp(单向),后推出的Ion Proton平台最长可测200 bp(单向),Thermo Fisher体系测序仪准确率高且操作较为简单。作为国内测序的先驱,华大智造推出的MGISEQ-2000单端测序最长可测400 bp,双端测序最长可测300 bp,其次在测序质量和稳定性上表现出色<sup>[4]</sup>,深入并且快速的测序过程也使它们得以成为现今应用最广泛的测序技术。借助于宏基因组测序技术的发展,临床对传染病的检测能力也进一步提高。

## 1 传染病的实验室检测现状

目前,传染病在全世界的发病率越来越高,而且愈发频繁,致病源类型也变得多样化、复杂化。例如

基金项目:国家重点研发计划(编号:2022YFC2302804,2022YFC2302805)。

第一作者:邓炜(1997—),男,在读研究生,主要研究方向:病原体检测技术。

通讯作者:刘国平(1976—),男,教授,主要研究方向:动物重大疾病预防,E-mail:guoping.liu@yangtzeu.edu.cn。

大家熟知的艾滋病、禽流感和新型冠状病毒(Corona Virus Disease 2019, COVID-19)等病毒性传染病;多重或广谱耐药的结核分枝杆菌、脑膜炎双球菌引起的化脓性脑膜炎等经典细菌性传染病<sup>[6]</sup>;以及由疟原虫引起的疟疾等寄生虫传染病<sup>[7]</sup>、由新型隐球菌引起的隐球菌病<sup>[8]</sup>等等,各种新发和再发传染病均对人类健康造成极大威胁,所以,临床对传染病致病病原体诊断的时效性和准确性要求越来越高。

就传染病而言,传统检测手段主要有以下几种:(1)病原体的分离培养,这是最经典也是最常见的检测手段,但是病原体的体外培养费时费力,且绝大多数病原体是不可培养的<sup>[9]</sup>。由于有些病毒缺乏体外敏感细胞,病毒的分离比较困难,因而病毒分离培养一直以来都是病原微生物研究的一个难题。(2)免疫学方法,如酶联免疫吸附试验、补体结合试验、酶标斑点免疫法和免疫荧光法等,操作相对简单,可以特异性地识别病原体的抗原或者对应的抗体,具有重要辅助诊断价值。但因其病原体多种多样,研究开发出的抗原、抗体的数量远没有达到市场的需求。(3)PCR检测,该方法灵敏度高,特异性强,是当前病原体检测的主要技术手段之一。但该方法依赖于已知病原体的基因序列,设计扩增引物,由于引物相对于病毒基因组覆盖区域低,这意味着假如引物靶位序列被降解,则会造成假阴性结果。

传统的检测方法有其局限性,检测时间一般需要数日或几周时间,耗时长,容易漏检潜在的病原体,即便辅以免疫学和分子生物学手段,也不能准确发现及诊断病因,已经不能满足临床需求<sup>[10]</sup>。高通量测序技术可以直接对样本进行不偏倚高通量测序,实现传染病病原体的检测、分型溯源和耐药监测等多个方面的研究,这为快速、准确、全面地诊断病原体带来了新的契机。

## 2 宏基因组测序在传染性病原体检测中的应用

宏基因组测序是对样本中所有生物体的核酸进行测序和表征的过程,理论上可以检测样本中所有具有感染性的病原体(阮病毒除外)。病原体的复制都离不开核酸的复制,核酸序列是生物体的“指纹谱”,也是决定其表型和毒性的基础。通过宏基因组高通量测序,获得序列信息,与已知生物的序列进行比对,从而找到最接近的进行匹配。当一个生物体不能被识别时,宿主RNA测序可以从宿主基因表达特征推断该生物体是病毒、细菌、真菌还是寄生虫<sup>[11]</sup>。

近年来,新的病原菌不断产生和快速传播,再加上抗生素的滥用,病原菌耐药性提高,从而导致了机会性感染的比例不断上升,因此疾病的诊断与处理就显得更加复杂。宏基因组测序技术凭借其特异性和

敏感性的优势,为临床病原体诊断提供一种新的方法,该技术在呼吸道<sup>[12]</sup>、消化系统<sup>[13]</sup>、神经系统<sup>[14]</sup>、泌尿生殖系统<sup>[15]</sup>等方面有着广阔的应用前景。尤其在新冠疫情中,基于宏基因组测序的SARS-CoV-2基因测序方法的快速发展,为宏基因组测序在其他传染病中的应用提供了宝贵经验。

2.1 宏基因组测序在细菌性传染病诊断中的应用 细菌是传染性疾病中最常见的病原体之一,传统的细菌培养法周期较长,而且很多细菌难以进行培养,导致多重感染容易被忽略。利用宏基因组测序技术可以对样品直接进行序列分析,快速识别出已知的病原体,并能有效地识别出各类不明病原体。Lin等<sup>[16]</sup>对42例疑似传染性胰脏坏死病(infectious pancreatic necrosis, IPN)患者在发热期间[体温(T)≥38.5℃]采集血液样本进行宏基因组测序和微生物培养,在诊断IPN方面,宏基因组测序的敏感性显著高于血培养(95.2% vs 23.8%,  $P < 0.001$ ),宏基因组测序的阴性预测值为90.0%,同时宏基因组测序的时间明显短于微生物培养[(37.70±1.44)h和(115.23±8.79)h,  $P < 0.01$ ]。凭借着更准确的诊断性能和更短的检测周期,临床宏基因组测序对细菌性疾病早期诊断有着很大贡献。Kamau等<sup>[17]</sup>对一例55岁结肠穿孔患者的血培养液直接进行宏基因组测序,发现了一种在临床样本中很难被发现的细菌—红孔裂解杆菌,这是美国首例红孔氏杆菌感染病例报告,这说明宏基因组测序技术在罕见病原导致的传染病诊断中具有独特的优势。Sun等<sup>[18]</sup>回顾性分析2017—2019年上海肺科医院收治的疑似肺外结核(extra pulmonary tuberculosis, EPTB)症状、肺外标本涂片阴性的患者,其中利用宏基因组测序对所有活动性EPTB病例检测的敏感性最高(56.11%),这一敏感性显著高于液体培养(13.89%)和Xpert分子生物学检测(36.11%),同时宏基因组测序还在样本中检测出其他病原体。这些结果表明,宏基因组测序诊断EPTB具有较高的敏感性、特异性,特别是对结核性脑膜炎和结核性淋巴结炎有很高的诊断价值,可准确检测肺外标本中有效病原体,而且同时具有识别其他感染和合并感染的潜力,因此,对于临床比较困难或复杂的感染病例,宏基因组测序可作为一种高效的诊断方法。

2.2 宏基因组测序在病毒性传染病诊断中的应用 宏基因组测序技术已经成为病毒变异监测、分型鉴定及进化溯源分析的重要手段,利用宏基因组测序检测病原体时,无须预判病原体的范围,也不存在靶向测序法中的偏倚性<sup>[6]</sup>,故而在病毒共感染和未知病原体检测中发挥重要作用。Pin等<sup>[19]</sup>研究发现了一例通过宏基因组测序诊断的人类狂犬病病例。目

前狂犬病的诊断方法主要有直接免疫荧光检测(Direct Fluorescence Antibody Test, DFA),这是检测狂犬病的金标准。还有小鼠接种试验(Mouse Inoculation Test, MIT)和聚合酶链式反应(PCR),然而这些常规的检测手段仍有相当高的假阴性率和低病毒载量导致的检测困难的问题。在一些研究中,DFA 检测阳性率为 14%,MIT 检出率为 35%,PCR 检出率为 96%。与 PCR 不同,宏基因组测序不需要引物和特异性扩增,这意味着与传统技术相比具有更高的灵敏度和特异性<sup>[20-21]</sup>,这为狂犬病病毒的检测提供了另一种选择方法。Van Boheemen 等<sup>[23]</sup>研究了宏基因组测序在病毒性呼吸道感染常规诊断中的性能,设计并优化了测序方案,随后,使用 25 个临床样本对该方案进行了验证,与 PCR 相比,宏基因组测序的敏感性高达 83%,特异性为 94%,该宏基因组测序方案的灵敏度和特异性结果与 PCR 相当,并且使用宏基因组测序可以在一次测试中检测到所有潜在的病原体,同时获得有关病毒的其他详细信息。Li 等<sup>[24]</sup>对 70 例疑似埃博拉出血热患者进行全血样本检测时,患者的血液样本经 RT-PCR 检测呈阴性,但经宏基因组测序检测到了埃博拉病毒的基因序列,这说明,使用宏基因组测序可以在疫情暴发时及时地对病原体进行鉴别诊断和对患者实行早期分流,避免造成更大危害。Wu 等<sup>[25]</sup>对武汉市中心医院收治的一例出现急性发热、咳嗽和胸闷症状的患者采集支气管肺泡灌洗液样本,并对患者的样本进行宏基因组 RNA 测序,确定了一种来自冠状病毒科的新 RNA 病毒株,并在全球范围内首次公开了新型冠状病毒的序列,这不但支持临床医师在最短的时间内发现了病原体,同时也为新冠肺炎的诊断和疫苗的研制奠定了坚实的基础。

### 2.3 宏基因组测序在真菌性传染病诊断中的应用

真菌生长的营养需求较低,可以在一般培养基上生长,目前常用的真菌检测方法有直接镜检、培养法、分子生物学检测等。Greenwald 等<sup>[26]</sup>研究了一例在手术 21 年后出现难治性角膜炎累及 LASIK 皮瓣的 56 岁女性患者:共焦显微镜显示丝状真菌阳性,患者立即进行皮瓣截肢,随后进行局部抗真菌治疗,最终通过宏基因组测序证实为顶头孢霉菌感染,同时还可能混合感染了镰刀菌。这个病例证明宏基因组测序除了能鉴定非典型生物的培养结果外,还能鉴定可能发生继发性感染的病原体。He 等<sup>[27]</sup>研究了 8 例由宏基因组测序辅助诊断的真菌性人工关节感染(PJI)病例,重点探讨宏基因组测序在真菌性人工关节感染治疗中的应用价值。与传统微生物培养相比,宏基因组测序能准确地提高人工关节感染中真菌的检出率,尤其是在术前检测方面,可以更快选择合适的靶向抗菌药物和

手术治疗方案,从而提高真菌性感染治疗的成功率。Kumaraswamy 等<sup>[28]</sup>发现了一株 MDR CA 分离株,导致 HIV 患者脑脓肿无法药物控制,其对该分离株进行了全基因组测序,并做全面详细的基因组分析,涉及抗真菌耐药性,最终结果显示菌株表现出氟康唑敏感性降低,这表明宏基因组测序对临床耐药监测具有重要意义。

### 2.4 宏基因组测序在寄生虫传染病诊断中的应用

与原核生物相比,宏基因组学在真核生物尤其是寄生虫上的应用相对较少<sup>[29]</sup>,主要起到辅助常规检测手段的作用。临床上常见的寄生虫检测方法有形态学、免疫学、分子生物学等。Wylezich 等<sup>[30]</sup>收集了 41 份感染了猪流行性腹泻病毒的猪的腹泻样本,并对样本进行宏基因组测序,从宏基因组测序中提取的 41 个数据中,有 34 个数据共检测到 11 种不同的寄生虫、肠道原生生物。研究表明,宏基因组测序不仅适用于病毒和细菌,而且也适用于原生和后生内生生物(寄生虫、共生或互惠生物)的检测。Hu 等<sup>[31]</sup>采用常规的方法对患有人体免疫缺陷的患者进行脑脊液检查,一直都不能确定病因,最后利用宏基因组测序却意外地发现了弓形虫的基因序列,这说明宏基因组测序对寄生虫病的诊断是一种有效的手段。

### 3 宏基因组测序的局限性及展望

目前,宏基因组测序技术已经取得了长足的发展,但是它还不能在短时间内替代传统的检测手段,主要原因包括:(1) 目前我国的宏基因组测序技术缺乏规范化管理以及技术标准。(2) 目前已有大量的原始样品在利用宏基因组测序时未能检出致病源,经培养扩增后发现为阳性,说明目前对宏基因组测序的灵敏度还不够,有待进一步改进<sup>[32]</sup>。(3) 虽然宏基因组测序会测出样本中每个 DNA 或 RNA 片段的序列,但仅能鉴定数据库中已知具有同源性的病原体,如果微生物不在数据库中,或者引起感染的病原体是与已知微生物无同源性的新型病原体,则将不会对其进行鉴定。因此,宏基因组测序获得的阴性结果仅可以说明感染的可能性降低,不能明确排除感染<sup>[33]</sup>。(4) 临床标本应用于宏基因组测序,测试的大量序列属于宿主,这可能导致病原体的比例很低,浪费测序成本,同时会影响病原体检测的灵敏度,去除宿主核酸和富集标本核酸是一大难点。(5) 宏基因组测序设备昂贵,实验程序复杂,无法满足快速现场测试的需求<sup>[34]</sup>。

总体而言,虽然目前宏基因组测序在临床上应用有限,但相比于传统方法,宏基因组测序依靠高通量、高时效性的优点,在传染病溯源分型、变异监测等领域仍有重要作用。随着该技术的不断发展,检测费用

不断下降,测序时间不断缩短,在未来,它将在临床上得到广泛的应用:(1)传染病暴发的流行病学调查与监测中,宏基因组测序可快速准确地检测各类新发传染病,例如新型冠状病毒<sup>[35]</sup>、埃博拉病毒<sup>[36]</sup>、SARS冠状病毒<sup>[37]</sup>等具有重大传染性的病原体。同时还可用于对各类传染病的监测,英国公共卫生部和美国疾病控制和预防中心都使用宏基因组测序来监测传染病,如结核病、季节性流感、寄生虫病、埃博拉病毒等<sup>[38]</sup>,并据此构建其系统进化树,追溯其来源,监测病原体的变异。(2)临床病原微生物检测中,例如儿童肺炎链球菌感染在临床上很罕见,且症状不典型,仅凭影像学结果很容易被误诊为真菌、结核、肿瘤等。通过对肺泡灌洗液宏基因组测序有助于儿童肺炎链球菌感染的早期诊断<sup>[39]</sup>。除了对罕见病的诊断,宏基因组测序在普通传染病方面也有很大的帮助。很多传染病利用传统的检测方法很难确定其病因,而宏基因组测序可以为这类疾病的准确诊断提供基础。(3)其他方面,宏基因组测序也适用于非病原体的生物<sup>[40]</sup>,分析其群体的结构、物种识别、种群分化和位点变异。随着其技术平台的不断完善和临床研究的不断深入,其在临床上的应用将日益广泛。

#### 4 结语

宏基因组测序技术突破了常规方法的限制,对于难以培养的病原体以及未知的病原体,采用高通量宏基因组测序技术和专业的病原体数据库可以直接检测病原体的DNA、RNA,并对病原体进行分析,得出完整、准确的病原体基因信息。如果未来宏基因组测序能避免宿主自身DNA和RNA的干扰、缩短测序和生物信息学分析的周期、进一步规范测序流程,有望成为识别、预测和预防传染病的主要手段。

#### 参考文献

- [1] Handelsman J, Rondon M R, Brady SF, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products [J]. *Chem Biol*, 1998, 5(10): R245-R249.
- [2] Liu LY, Cui HF, Tian G. Application of high-throughput sequencing technology in metagenomics [J]. *Chin Med Biotechnol*, 2013, 8(3): 196-200.  
刘莉扬, 崔鸿飞, 田埂. 高通量测序技术在宏基因组学中的应用[J]. *中国医药生物技术*, 2013, 8(3): 196-200.
- [3] Wang YJ, Lu ZC, Chen JY, et al. The development of high-throughput sequencing technology and its application in clinical testing [J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2021, 60(5): 811-820.  
王玉静, 陆梓涔, 陈俊煜, 等. 高通量测序技术的发展及其在临床检测中的应用[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2021, 60(5): 811-820.
- [4] Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers [J]. *Nature*, 2013, 500(7464): 541-546.
- [5] Li WN, Liu G, Zhou R, et al. Comparative analysis of whole genome resequencing data from MGISEQ-2000, HiSeq 2000 and NovaSeq 6000 platforms [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2021, 57(11): 156-162.  
李伟宁, 刘刚, 周荣, 等. MGISEQ-2000、HiSeq 2000 与 NovaSeq 6000 平台全基因组重测序数据的比较分析[J]. *中国畜牧杂志*, 2021, 57(11): 156-162.
- [6] Li LH, Chen LD, Xiao B, et al. Application of metagenomic sequencing in detecting the pathogens of infectious diseases [J]. *Infectious Disease Information*, 2018, 31(1): 15-18.  
李林海, 陈丽丹, 肖斌, 等. 宏基因组测序在感染性疾病病原体检测中的应用[J]. *传染病信息*, 2018, 31(1): 15-18.
- [7] Wahab A, Shaukat A, Ali Q, et al. A novel metabarcoded 18S ribosomal DNA sequencing tool for the detection of *Plasmodium* species in malaria positive patients [J]. *Infect Genet Evol*, 2020, 82: 104305.
- [8] Chen M, Hong N, Hu S, et al. Molecular identification of *Cryptococcus gattii* from cerebrospinal fluid using single-cell sequencing: A case study [J]. *J Infect*, 2020, 81(4): 634-638.
- [9] Daniel R. The metagenomics of soil [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3(6): 470-478.
- [10] Liu WP, Xia H, Tao ZY. The use of metagenomic sequencing technology to diagnose infectious diseases [J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2021, 16(5): 614-618.  
刘韦萍, 夏惠, 陶志勇. 宏基因组测序技术在感染性疾病诊断中的应用[J]. *中国病原生物学杂志*, 2021, 16(5): 614-618.
- [11] Haslam DB. Future applications of metagenomic next-generation sequencing for infectious diseases diagnostics [J]. *J Pediatric Infect Dis Soc*, 2021, 10(Supplement 4): S112-S117.
- [12] Diao Z, Han D, Zhang R, et al. Metagenomics next-generation sequencing tests take the stage in the diagnosis of lower respiratory tract infections [J]. *J Adv Res*, 2022, 38: 201-212.
- [13] Cheng WY, Liu WX, Ding Y, et al. High sensitivity of shotgun metagenomic sequencing in colon tissue biopsy by host DNA depletion [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2022, 26: S1672-0229(22)00119-X.
- [14] Chen J, Zhang R, Liu L, et al. Clinical usefulness of metagenomic next-generation sequencing for the diagnosis of central nervous system infection in people living with HIV [J]. *Int J Infect Dis*, 2021, 107: 139-144.
- [15] Rodler S, Jung A, Greif P A, et al. Routine application of next-generation sequencing testing in uro-oncology-Are we ready for the next step of personalised medicine? [J]. *Eur J Cancer*, 2021, 146: 1-10.
- [16] Lin C, Bonsu A, Li J, et al. Application of metagenomic next-generation sequencing for suspected infected pancreatic necrosis [J]. *Pancreatol*, 2022, 22(7): 864-870.
- [17] Kamau E, Maliksi E, Kwan N, et al. *Catabacter hongkongensis* bacteremia identified by direct metagenomic sequencing of positive blood culture fluid, first case report in the US [J]. *Anaerobe*, 2021, 71: 102421.
- [18] Sun W, Lu Z, Yan L. Clinical efficacy of metagenomic next-generation sequencing for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in smear-negative extrapulmonary specimens in a high tuberculosis burden area [J]. *Int J Infect Dis*, 2021, 103: 91-96.

- [19] Pin L, Luta X, Linjie L, et al. A new choice for human rabies diagnosis: A case report of metagenomics next-generation sequencing in diagnosis of human rabies [J]. *J Infect Public Health*, 2022, 15(11): 1276-1278.
- [20] Miller S, Naccache SN, Samayoa E, et al. Laboratory validation of a clinical metagenomic sequencing assay for pathogen detection in cerebrospinal fluid [J]. *Genome Res*, 2019, 29(5): 831-842.
- [21] Torquato R, Iamamoto K, Fernandes ER, et al. Detection of rabies virus antigen by the indirect rapid immunohistochemistry test in equines and comparisons with other diagnostic techniques [J]. *Zoonoses Public Health*, 2020, 67(6): 651-657.
- [22] Reyes A, Carbo EC, Harinxma TSJ, et al. Viral metagenomic sequencing in a cohort of international travellers returning with febrile illness [J]. *J Clin Virol*, 2021, 143: 104940.
- [23] van Boheemen S, van Rijn A L, Pappas N, et al. Retrospective validation of a metagenomic sequencing protocol for combined detection of RNA and DNA viruses using respiratory samples from pediatric patients [J]. *J Mol Diagn*, 2020, 22(2): 196-207.
- [24] Li T, Mbala-Kingebeni P, Naccache SN, et al. Metagenomic next-generation sequencing of the 2014 ebola virus disease outbreak in the democratic republic of the congo [J]. *J Clin Microbiol*, 2019, 57(9): e00827-19.
- [25] 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.
- [26] Greenwald MF, Redd TK, Doan T, et al. Very late onset LASIK flap Acremonium fungal keratitis confirmed by metagenomic deep sequencing [J]. *Am J Ophthalmol Case Rep*, 2022, 25: 101294.
- [27] He R, Wang Q, Zhang F, et al. Metagenomic sequencing in the management of fungal periprosthetic joint infection [J]. *J Infect*, 2020, 81(5): 816-846.
- [28] Kumaraswamy M, Coady A, Szubin R, et al. Comprehensive whole genome sequencing with hybrid assembly of multi-drug resistant *Candida albicans* isolate causing cerebral abscess [J]. *Curr Res Microb Sci*, 2023, 4: 100180.
- [29] Mthethwa NP, Amoah ID, Reddy P, et al. A review on application of next-generation sequencing methods for profiling of protozoan parasites in water: Current methodologies, challenges, and perspectives [J]. *J Microbiol Methods*, 2021, 187: 106269.
- [30] Wylezich C, Belka A, Hanke D, et al. Metagenomics for broad and improved parasite detection: a proof-of-concept study using swine faecal samples [J]. *Int J Parasitol*, 2019, 49(10): 769-777.
- [31] Hu Z, Weng X, Xu C, et al. Metagenomic next-generation sequencing as a diagnostic tool for toxoplasmic encephalitis [J]. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2018, 17(1): 45.
- [32] Lewandowska DW, Capaul R, Prader S, et al. Persistent mammalian orthoreovirus, coxsackievirus and adenovirus co-infection in a child with a primary immunodeficiency detected by metagenomic sequencing: a case report [J]. *BMC Infect Dis*, 2018, 18(1): 33.
- [33] 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.
- [34] Li C, Wang Y. Progress in the application of metagenomic next-generation sequencing in pediatric infectious diseases [J]. *Pediatr Neonatol*, 2022, 63(5): 445-451.
- [35] Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin [J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 270-273.
- [36] Carroll MW. Retrospective versus real-time Ebola virus sequencing [J]. *Lancet Infect Dis*, 2019, 19(6): 567-568.
- [37] Liu Q, Du Z, Zhu S, et al. Metagenomic evidence for the co-existence of SARS and H1N1 in patients from 2007—2012 flu seasons in France [J]. *Biosaf Health*, 2021, 3(6): 307-311.
- [38] Armstrong GL, Maccannell DR, Taylor J, et al. Pathogen genomics in public health [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(26): 2569-2580.
- [39] Su L, Li SY, Hong Y, et al. Application of metagenomic sequencing from alveolar lavage fluid in diagnosis of pediatric pulmonary actinomycete infection: a case report [J]. *Journal of New Medicine*, 2022, 53(1): 66-69.
- 苏玲, 李素云, 洪燕, 等. 肺泡灌洗液宏基因组测序诊断儿童肺放线菌感染一例 [J]. *新医学*. 2022, 53(1): 66-69.
- [40] Chen G, Bai R, Zhang Y, et al. Application of metagenomics to biological wastewater treatment [J]. *Sci Total Environ*. 2022, 807(Pt 1): 150737.

(收稿日期: 2023-12-21)