

宏基因组测序技术检测血流感染样本去宿主干扰效应 四种预处理方法的比较

贾适瑜¹, 王飞燕¹, 杨琳梅¹, 耿洁¹, 李峰¹, 高简², 周洲¹, 程军¹ (1. 中国医学科学院阜外医院实验诊断中心, 北京 100037; 2. 云南省阜外心血管病医院检验科, 昆明 650102)

摘要: **目的** 探讨不同去宿主方法对血流感染样本中病原微生物检测的影响。**方法** 以浓度分别为 10^5 , 10^3 , 10^2 和 10CFU/ml 的模拟金黄色葡萄球菌血流感染样本为研究对象, 将检测分为全血组和血浆组, 使用宏基因组测序 (metagenomic next generation sequencing, mNGS) 比较 Saponin 法、Wash 法、CD45 法和 MoLYsis 法四种预处理方法的病原微生物 reads 检出数和占比, 以评估不同方法的去宿主效率。**结果** 血流感染病原微生物初始浓度在 10^3CFU/ml 以下的微生物检出占比小于 0.15%。四种去宿主方法中, Saponin 法 reads 检出数最多, 病原微生物检出占比最高, 血浆组检测结果占比可提升至 18% 以上; Wash 法及 CD45 法相比直接提取法病原微生物 reads 检出数均未显著增加, MoLYsis 法的 reads 检出数水平有明显增高。血浆组病原微生物 reads 检出数多于全血组, 去宿主方法可明显提高病原微生物的丰度。**结论** 对比四种去宿主方法的 mNGS 检测结果, Saponin 法可明显去除宿主核酸, 提高病原微生物的 reads 检出数, 尤其血浆组去宿主效果最好。

关键词: 血流感染; 去宿主方法; 病原微生物; 宏基因组测序

中图分类号: Q781; R446 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2023) 04-154-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2023.04.028

Comparison of the Efficiency of the Four De-host Methods for the Detection of Bacterial Blood Stream Infection Samples with Metagenomic Next Generation Sequencing

JIA Shiyu¹, WANG Feiyan¹, YANG Linmei¹, GENG Jie¹, LI Feng¹, GAO Jian², ZHOU Zhou¹, CHENG Jun¹

(1. Center of Laboratory Medicine, Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100037, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Fuwai Cardiovascular Hospital of Yunnan Province, Kunming 650102, China)

Abstract: **Objective** To discuss the effects of the different de-host methods for the detection of blood stream infection (BSI) samples. **Methods** *Staphylococcus aureus* was injected into the peripheral BSI samples. And the simulated BSI samples with concentrations of 10^5 , 10^3 , 10^2 , 10CFU/ml , respectively, were as the objects. The detection was divided into the whole blood and the plasma group. Metagenomic next generation sequencing (mNGS) was used to detect the reads and proportion of the nucleic acid of pathogenic microorganism to evaluate the de-host efficiency of four pretreatment methods (Saponin method, Wash method, CD45 method and MoLYsis method). **Results** The detection of pathogenic microorganisms in BSI with an initial concentration below 10^3CFU/ml was less than 0.15%. Among the four host removal methods, the Saponin method could significantly increase the proportion of microorganisms, especially in the plasma group, which could increase the proportion of pathogen detection results to more than 18%. Compared with the direct extraction method, the Wash method and the CD45 method were not rich pathogenic nucleic acid significantly. The detection level of the reads by MoLYsis method was significantly higher than that by direct extraction method. The number of microorganisms detected in the plasma group was higher than that in the whole blood group, and the de-host methods can significantly increase the abundance of pathogenic microorganisms. **Conclusion** Comparing the mNGS detection results of the four de-host methods, the Saponin method could significantly remove human nucleic acids and increase the proportion of pathogenic microorganisms, especially in the plasma group, which had the best host removal effect.

Keywords: blood stream infection; de-host; pathogen microorganism; metagenomic next generation sequencing

血流感染 (blood stream infection, BSI) 是指各种病原微生物侵入血流而引起的一种严重全身感染性疾病^[1]。随着侵入性操作、广谱抗生素及免疫抑制剂等的广泛应用, 血流感染的发生率呈逐年上升趋势。

基金项目: 云南省心血管病临床医学中心项目 (FZX2019-06-01): 二代测序技术检测感染性心内膜炎患者血液中病原菌的应用价值。

作者简介: 贾适瑜 (1991-), 女, 硕士研究生, 主管技师, 研究方向: 病原微生物的分子生物学诊断, E-mail: jiashiyu1991@126.com。

通讯作者: 程军, E-mail: jackcheng2001@163.com。

势^[2]。血流感染的早期诊断对缩短住院时长、减少治疗费用、降低病死率有重要意义。目前,其诊断主要依赖于传统培养方法,但存在报告时间长、苛养菌培养困难等缺点^[3-4]。分子生物学检测具有高灵敏度、高特异度及报告时间短等优点,已成为难培养病原微生物检测的重要手段。但多数分子生物学方法只能检测某些特定类型的病原微生物^[5-6],无法满足临床对疑难重症感染的诊断需求。宏基因组测序(metagenomic next generation sequencing, mNGS)技术则可在感染早期不受靶标限制从样本中直接检测包括细菌、病毒、真菌和寄生虫在内的所有病原微生物^[7]。然而,血流感染患者初始病原微生物浓度在 $1 \sim 10^3$ CFU/ml之间^[8-9],大量宿主核酸限制了血液中病原微生物的检测,如何降低宿主核酸对病原微生物的影响,成为mNGS亟需解决的问题。因此,建立高效、标准化的病原微生物核酸分离方法对于血流感染的早期诊断至关重要。本研究通过mNGS检测预处理后的模拟血流感染样本,旨在评估Saponin法、Wash法、CD45法和MolYsis法四种预处理方法的去宿主效率^[10-13]。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选择金黄色葡萄球菌 ATCC25923 标准菌株模拟血流感染样本,来自无感染患者的全血混合样本作为基质和阴性对照。血液样本纳入标准为:患者无发热,血细胞检测、血清降钙素原、C反应蛋白和红细胞沉降率结果未见异常。该研究已通过伦理审查委员会批准。研究对象均知情同意。

1.2 仪器与试剂 核酸提取选用 ZymoBIOMICS DNA minipre Kit 试剂盒(ZYMO RESEARCH 公司,货号 D4300),核酸定量使用 Qubit High Sensitivity dsDNA assay 试剂盒(ThermoFisher SCIENTIFIC 公司,货号 32851)。去宿主部分使用热不稳定性耐高盐核酸酶 HL-SAN(ActicZymes 公司,货号 70910-202),Saponin 干粉(Sigma-Aldrich 公司,货号 47036),蛋白酶 K 冻干粉(北京索莱宝科技有限公司,货号 P9460),Dynabeads®CD45 试剂盒(ThermoFisher SCIENTIFIC 公司,货号 11153D),MolYsis™ Basic5 试剂盒(Molzym 公司,货号 D-301)。mNGS 部分使用 Bioruptor 超声打断仪(Diagenode 公司,型号 Bioruptor Plus),Agilent 2100 Bioanalyzer 生物分析仪(Agilent 公司,型号 G2939B),Agilent High Sensitivity DNA Kit(Agilent 公司,货号 5067-4626),ABI 7500 荧光定量 PCR 仪(ThermoFisher SCIENTIFIC 公司,型号 ABI 7500),Illumina Nextseq 测序平台(Illumina 公司,型号 Nextseq 500)。

1.3 方法

1.3.1 模拟血流感染样本制备:将 ATCC25923 标准菌株接种在血琼脂平板上培养 24h 后,制备 0.5 麦氏单位的菌悬液。用临床全血混合样本作为稀释液,将菌悬液进一步稀释至 10^5 , 10^3 , 10^2 , 10CFU/ml,最终制备体积为 10ml 的不同浓度的模拟血流感染样本,剩余的临床全血混合样本作为阴性对照。

1.3.2 四种去宿主方法处理样本:根据方法学适用条件将检测分为全血组和血浆组,全血组包括 Saponin 法、CD45 法和 MolYsis 法,血浆组包括 Saponin 法、Wash 法,每份样本进行二次重复检测。

1.3.2.1 Saponin 法:取 8ml 模拟样本,800r/min 离心 5min,转移上层血浆至新的 EP 管;将血浆 9 000r/min 离心 5min 后,弃上清液,吸取 200 μ l PBS 重悬沉淀,再加入 200 μ l 5% Saponin 溶液(5g Saponin 溶于 95g 双蒸水),37℃ 振荡孵育 15min,孵育过程中每 2min 混匀 1 次;孵育完成后加入 350 μ l 无菌水,静置 30s,再加入 12 μ l 5mol/L 的 NaCl 溶液,涡旋混匀。8 000r/min 离心 5min,弃上清液,加入 100 μ l PBS 重悬沉淀,再加入 100 μ l 的 HL-SAN buffer(5.5mol/L NaCl,100mmol/L MgCl₂ 水溶液),涡旋混匀。加入 10 μ l HL-SAN,立即混匀,37℃ 1 300r/min 孵育 15min;加入 1ml PBS,8 000r/min 离心 3min,弃上清液;1ml PBS 重悬,8 000r/min 离心 3min,弃上清液,250 μ l PBS 重悬沉淀,重悬液用于核酸提取。

1.3.2.2 Wash 法:取 8ml 模拟样本,3 200r/min 离心 30s,取血浆至新的 5ml 低吸附管内,并加入等体积无菌水,涡旋混匀;室温孵育 5min,期间不断混匀;13 300r/min 离心 2min;弃上清,吸取 250 μ l PBS 重悬沉淀,重悬液用于核酸提取。

1.3.2.3 CD45 法:具体参照 Dynabeads®CD45 说明书。

1.3.2.4 MolYsis 法:具体参照 MolYsis™ Basic5 试剂盒说明书。

1.3.3 DNA 提取和 mNGS 样本经过预处理去宿主之后,使用 Zymo BIOMICS DNA minipre Kit 试剂盒提取 DNA, Qubit High Sensitivity dsDNA assay 进行核酸定量。用 Bioruptor 将提取的 DNA 片段化。使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 生物分析仪及配套的 Agilent High Sensitivity DNA Kit 对片段化的 DNA 验证后制备文库。PCR 扩增使用 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪。测序使用 Illumina Nextseq 平台,每个血流感染样本的测序量为 2.5G。测序完成后使用 Burrows-Wheeler Alignment(BWA)将人基因组数据与 GRCh38 进行序列比对去除宿主基因^[14]。剩余的测序数据通过 SNAP 与 NCBI nt 数据库比对,最终获得靶物种 reads 检出数和丰度信息。所

有 mNGS 阳性结果均经 Sanger 测序验证。

1.4 统计学分析 采用 Python3.9 软件作为数据分析工具, 计量资料服从正态分布并以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 去宿主方法组间比较采用配对样本 t 检验; 全血组及血浆组病原微生物核酸检出情况组间比较采用卡方检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 全血组不同去宿主方法病原微生物检出情况比较 全血组不同去宿主方法金黄色葡萄球菌 reads 检出数结果见表 1, 可见阴性对照的 reads 检出数小于 5 条; 病原微生物检出结果占比见表 2。直接提取法微生物检出占比均小于 0.15%, 去宿主处理可提升血流感染病原微生物的 reads 检出数, 提高

血流感染病原菌的占比。从检测结果来看, Saponin 法病原微生物 reads 检出数最多, 微生物占比最高, 其中 10^2 CFU/ml 水平差异有统计学意义, 其余浓度 reads 检出数也明显增加, 但因样本量相对较小, 样本间差异离散度较大, 导致差异无统计学意义。CD45 法病原微生物检出数相比直接提取法均未显著增加, 10^2 及 10^3 CFU/ml 样本检出的 reads 检出数有所降低, 差异无统计学意义。MoLYsis 法由于样本及试剂问题, 只有 10^2 和 10^5 CFU/ml 水平有检测结果, 10^2 CFU/ml 样本水平虽只有 1 个检测结果, 其 reads 检出数相较其他方法明显增加, 10^5 CFU/ml 样本水平 reads 检出数较其他方法亦明显增加, 差异有统计学意义, 可见该方法具有较好的去宿主效果。

表 1 全血组不同去宿主方法金黄色葡萄球菌 reads 检出数差异 ($\bar{x} \pm s$)

稀释浓度 (CFU/ml)	直接提取法	Saponin 法	CD45 法	MoLYsis 法	t_1	P_1	t_2	P_2	t_3	P_3
0	3.50 ± 0.71	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^1	5.50 ± 3.54	622.00 ± 808.93	43.00 ± 24.04	-	-1.08	0.47	-1.08	0.47	-	-
10^2	21.50 ± 6.36	$11\,048.50 \pm 241.12$	16.50 ± 3.54	$19\,696.00$	-63.01	0.01	-63.01	0.01	1.29	0.42
10^3	$1\,960.00 \pm 325.27$	$16\,145.00 \pm 1292.59$	411.50 ± 70	-	-12.40	0.05	-12.40	0.05	-	-
10^5	$2\,771.50 \pm 67.18$	$14\,373\,98.50 \pm 532\,668.49$	$10\,156.00 \pm 1117.23$	$4\,681\,562.00 \pm 138\,810.72$	-3.81	0.16	-3.81	0.16	-47.64	0.01

注: - 表示无数据。 t_1 和 P_1 为直接提取法和 Saponin 法 reads 检出数比较, t_2 和 P_2 为直接提取法和 CD45 法 reads 检出数比较, t_3 和 P_3 为直接提取法和 MoLYsis 法 reads 检出数比较。

表 2 全血组不同去宿主方法金黄色葡萄球菌占比情况 (%)

稀释浓度 (CFU/ml)	直接提取法	Saponin 法	CD45 法	MoLYsis 法	t_1	P_1	t_2	P_2	t_3	P_3
10^1	0.12	1.31	0.16	-	-1.02	0.49	-7.00	0.09	-	-
10^2	0.12	1.53	0.16	38.30	-15.67	0.04	-4.00	0.16	-3.75	0.17
10^3	0.13	0.24	0.15	-	-7.00	0.09	>100	<0.01	-	-
10^5	0.14	11.0	0.22	95.77	-1.54	0.37	>100	<0.01	-48.17	0.01

注: - 表示无数据。 t_1 和 P_1 为直接提取法和 Saponin 法金黄色葡萄球菌占比比较, t_2 和 P_2 为直接提取法和 CD45 法金黄色葡萄球菌占比比较, t_3 和 P_3 为直接提取法和 MoLYsis 法金黄色葡萄球菌占比比较。

2.2 血浆组不同去宿主方法病原微生物检出情况比较 血浆组不同去宿主方法金黄色葡萄球菌 reads 检出数见表 3。序列比对后, 不同去宿主方法金黄色葡萄球菌检出结果占比见表 4。与直接提取法相比, Saponin 法 reads 检出数最多, 各水平 reads 检

出数均明显高于其他方法, 但由于批内检测差异较大, 仅 10^5 CFU/ml 水平差异有统计学意义。Wash 法 reads 检出数低于 Saponin 法, 病原微生物检出数和非宿主比例均未显著增加, 且 10^2 CFU/ml 水平 reads 检出数有所丢失, 检出效果明显不如 Saponin 法。

表 3 血浆组不同去宿主方法金黄色葡萄球菌 reads 检出数差异 ($\bar{x} \pm s$)

稀释浓度 (CFU/ml)	直接提取法	Saponin 法	Wash 法	t_1	P_1	t_2	P_2
0	6.00 ± 2.83	-	-	-	-	-	-
10^1	37.50 ± 28.99	792.00 ± 377.60	814.50 ± 729.03	-3.06	0.20	-1.57	0.36
10^2	161.50 ± 40.31	$9\,125.00 \pm 7\,997.38$	121.00 ± 4.24	-1.58	0.36	1.29	0.42
10^3	2159.50 ± 454.67	$51\,856.00 \pm 20\,719.64$	$3\,499.50 \pm 587.61$	-3.47	0.18	-14.26	0.04
10^5	$62\,295.00 \pm 5\,731.81$	$2\,966\,242.00 \pm 42\,284.99$	$92\,549.50 \pm 6\,183.65$	-85.53	0.01	-94.69	0.01

注: - 表示无数据。 t_1 和 P_1 为直接提取法和 Saponin 法 reads 检出数比较, t_2 和 P_2 为直接提取法和 Wash 法 reads 检出数比较。

表4 血浆组不同去宿主方法金黄色葡萄球菌占比情况(%)

稀释浓度(CFU/ml)	直接提取法	Saponin法	Wash法	t_1	P_1	t_2	P_2
10^1	0.14	18.99	0.22	-2.75	0.22	-4.00	0.16
10^2	0.13	32.07	0.28	-1.09	0.47	-3.75	0.17
10^3	0.15	22.72	0.20	-2.93	0.21	-3.67	0.17
10^5	0.71	58.37	0.96	-23.20	0.03	-7.00	0.09

注: t_1 和 P_1 为直接提取法和 Saponin 法金黄色葡萄球菌占比比较, t_2 和 P_2 为直接提取法和 Wash 法金黄色葡萄球菌占比比较。

表5 全血组及血浆组金黄色葡萄球菌核酸检出占比情况比较

稀释浓度(CFU/ml)	直接提取法				Saponin法			
	血浆组(%)	全血组(%)	χ^2	P	血浆组(%)	全血组(%)	χ^2	P
10^1	0.14	0.12	0	>0.99	18.99	1.31	15.25	<0.01
10^2	0.13	0.12	0	>0.99	32.07	1.53	31.21	<0.01
10^3	0.15	0.13	0	>0.99	22.72	0.24	22.70	<0.01
10^5	0.71	0.14	0	>0.99	58.37	11.09	47.24	<0.01

3 讨论

mNGS 作为不经培养直接从临床标本中鉴定出病原微生物的分子诊断技术,具有高灵敏度、高通量及无偏倚检测的优势,可显著提高疑难重症感染的诊断效率^[15-16]。然而由于 mNGS 采用鸟枪法测序,大多数病原微生物的检测会受宿主高核酸背景(通常 >99%)的影响,从而使病原微生物的检出数据不足,大大限制了该方法的分析灵敏度。虽然增加测序深度可提高病原微生物的检出,但当测序深度达平台期(约 20M)后,增加测序深度不能显著提升其检测性能,检测时间和成本却大幅增加。为了避免低载量病原微生物的漏检,减少实验部分的干扰,去宿主步骤成为 mNGS 的重要环节。目前国内外去宿主研究主要针对呼吸道、脑脊液等体液及其他包含微生物菌群的组织标本类型,血流感染去宿主相关研究仍相对较少^[17-19]。

血液样本去宿主和富集微生物核酸的方法主要包括:①差速离心或过滤等基于细胞大小差异的方法去除宿主细胞;②差异裂解法选择性裂解宿主细胞,然后用酶或化学试剂去除暴露的核酸^[20]。Saponin 作为表面活性剂对人源细胞膜进行裂解,细菌和真菌由于有细胞壁的保护可免受裂解,同时渗透压可以差异裂解细胞膜,随后利用高盐溶液破坏宿主细胞释放出的染色体,非特异性核酸内切酶 HL-SAN 对宿主核酸进行切割,洗涤后即完成了去宿主过程^[10]。Wash 法则是基于宿主细胞与微生物大小差异,使用不同离心条件对宿主细胞进行清除,该方法简单易操作,不需要特殊仪器设备,可去除完整性较好的人源细胞,缺点在于操作引入误差较大,去宿主的均一性无法保证,多次离心及洗涤步骤减

2.3 全血组及血浆组金黄色葡萄球菌核酸检出情况比较 将 Saponin 法和直接提取法的全血和血浆检测结果进行比较(见表5),可见 Saponin 法模拟样本四个水平血浆组检测结果均高于全血组,差异有统计学意义($P<0.01$),且 Saponin 法血浆组金黄色葡萄球菌检测结果占比均提高至 18% 以上。直接法血浆组检测结果和全血组结果差异均无统计学意义($P>0.05$)。

少人源核酸的同时易造成病原微生物的丢失。CD45 法则是利用共价偶联抗人 CD45 抗体的超顺磁性微珠,直接从全血去除 CD45+ 白细胞,操作简便省时,但无法去除不表达 CD45 的白细胞。MolYsis 法使用离液剂和去污剂选择性裂解哺乳动物细胞,之后用不受离液剂和去污剂影响的 DNA 酶消化,随即对病原微生物进行裂解,高效分离并富集目标核酸,且不引入任何外源微生物(如工程菌),可同时富集病原菌,但是价格昂贵,本研究由于样本及试剂问题,只有部分检测结果,结果证明该方法确实具有较好的去宿主效果,后续可用临床样本进一步证实。朱盈等^[21]通过对比 Saponin 法、SDS 法和水洗法对血流感染样本的去宿主效率,发现 Saponin 法的去宿主效率最优,与本研究结果一致。

本研究尚存在一定的局限性。首先由于不同浓度梯度的样本量较小,宿主背景下病原检测结果不够稳定,后续需要增加样本量并使用真实样本进一步验证。其次本研究只将金黄色葡萄球菌纳入研究,涉及的菌谱不够全面,后续会将革兰阳性菌、革兰阴性菌、真菌、病毒等纳入研究范围,且充分考虑不同耐药基因对 mNGS 检测的影响。未来将对 mNGS 的灵敏度、重复性和特异度等方法学性能进行系统验证,评估血流感染 mNGS 检测的全流程。

综上,本研究通过比较 Saponin 法、Wash 法、CD45 法和 MolYsis 法四种预处理方法的去宿主干扰效应,明确了 Saponin 法血浆组的去宿主效率最高。为后续 mNGS 的相关研究奠定了基础,对血流感染的早期精准诊断具有重要意义。

参考文献:

[1] 上海市微生物学会临床微生物专业委员会. 上海

- 市医学会检验医学专科分会,上海市医学会危重病专科分会.血流感染临床检验路径专家共识[J].中华传染病杂志,2022,40(8):457-475.
- Clinical Microbiology Division of Shanghai Society of Microbiology, Shanghai Society of Laboratory Medicine, Shanghai Medical Association, Shanghai Society of Critical Care Medicine, Shanghai Medical Association. Expert consensus on clinical laboratory strategies for bloodstream infection [J]. Chinese Journal of Infectious Diseases, 2022, 40(8): 457-475.
- [2] FLEISCHMANN C, SCHERAG A, ADHIKARI N K J, et al. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis, current estimates and limitations[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2016, 193(3): 259-272.
- [3] 张晨,孙虹佳.新型感染标志物在脓毒症早期诊断中的应用及研究进展[J].现代检验医学杂志,2021,36(1):156-160.
- ZHANG Chen, SUN Hongjia. Latest research progress of early serum inflammatory and oxidative stress mediator of sepsis [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2021, 36(1): 156-160.
- [4] FAN Shuling, MILLER N S, LEE J, et al. Diagnosing sepsis - the role of laboratory medicine [J]. Clin Chim Acta, 2016, 460: 203-210.
- [5] 高正琴.空肠弯曲菌TaqMan-MGB双重探针实时荧光定量PCR快速检测[J].现代检验医学杂志,2019,34(6):1-5,15.
- GAO Zhengqin. Rapid detection of *Campylobacter jejuni* with TaqMan-MGB dual probe real-time fluorescence quantitative PCR[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(6): 1-5, 15.
- [6] 邱会茹,王佳琳,薛文成,等. PCR-HRM 方法分析 16S rRNA 基因进行细菌鉴定的可行性研究 [J]. 现代检验医学杂志,2019,34(3):37-41.
- QIU Huiru, WANG Jialin, XUE Wencheng, et al. Feasibility study on analysis of 16S rRNA gene for bacterial identification by PCR-HRM method [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(3): 37-41.
- [7] 沈丹丹,刘妍,胡娟,等.一例无毒力白喉棒状杆菌携带者的临床特征和病原学诊断分析[J].现代检验医学杂志,2021,36(4):132-135,170.
- SHEN Dandan, LIU Yan, HU Juan, et al. Clinical characteristics and etiological diagnosis of a case of non-toxic *Corynebacterium diphtheria* carrier[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2021, 36(4): 132-135, 170.
- [8] YAGUPSKY P, NOLTE F S. Quantitative aspects of septicemia[J]. Clinical Microbiology Reviews, 1990, 3(3): 269-279.
- [9] TRUNG N T, HIEN T T, HUYEN T T, et al. Enrichment of bacterial DNA for the diagnosis of blood stream infections [J]. BMC infectious diseases, 2016, 16: 235.
- [10] HASAN M R, RAWAT A, TANG P, et al. Depletion of human DNA in spiked clinical specimens for improvement of sensitivity of pathogen detection by next-generation sequencing[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2016, 54(4): 919-927.
- [11] CHARALAMPOUS T, KAY G L, RICHARDSON H, et al. Nanopore metagenomics enables rapid clinical diagnosis of bacterial lower respiratory infection[J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(7): 783-792.
- [12] ANSON L W, CHAU K, SANDERSON N, et al. DNA extraction from primary liquid blood cultures for bloodstream infection diagnosis using whole genome sequencing[J]. Journal of Medical Microbiology, 2018, 67(3): 347-357.
- [13] VUTUKURU M R, SHARMA D K, RAGAVENDAR M S, et al. A rapid, highly sensitive and culture-free detection of pathogens from blood by positive enrichment [J]. Journal of Microbiological Methods, 2016, 131: 105-109.
- [14] DURBIN H. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform[J]. Bioinformatics, 2009, 25(14): 1754-1760.
- [15] JING Chendi, CHEN Hongbin, LIANG Yong, et al. Clinical evaluation of an improved metagenomic next-generation sequencing test for the diagnosis of bloodstream infections[J]. Clinical Chemistry, 2021, 67(8): 1133-1143.
- [16] GU Wei, DENG Xianding, LEE M, et al. Rapid pathogen detection by metagenomic next-generation sequencing of infected body fluids[J]. Nature Medicine, 2021, 27(1): 115-124.
- [17] HERAVI F S, ZAKRZEWSKI M, VICKERY K, et al. Host DNA depletion efficiency of microbiome DNA enrichment methods in infected tissue samples [J]. Journal of Microbiological Methods, 2020, 170: 105856.
- [18] 罗珮,张晨虹.胃组织微生物群系高通量测序研究中去除宿主DNA的方法比较[J].中国科学:生命科学,2023,53(5):725-735.
- LUO Pei, ZHANG Chenhong. Comparison of host DNA depletion methods in gastric tissue microbiome analysis based on high-throughput sequencing [J]. Scientia Sinica(Vitae), 2023, 53(5): 725-735.
- [19] CHEN Hongbin, ZHENG Yafeng, ZHANG Xiaoyang, et al. Clinical evaluation of cell-free and cellular metagenomic next-generation sequencing of infected body fluids [J]. Journal of Advanced Research, 2023, S2090-1232(23)00068-1.
- [20] MAROTZ C A, SANDERS J G, ZUNIGA C, et al. Improving saliva shotgun metagenomics by chemical host DNA depletion[J]. Microbiome, 2018, 6(1): 42.
- [21] 朱盈,杨启文.细菌及真菌血流感染宏基因组学检测标本预处理方法探索[J].国际检验医学杂志,2021,42(23):2834-2838.
- ZHU Ying, YANG Qiwen. Exploration of pretreatment methods for metagenomics detection specimens of bacterial and fungal bloodstream infection[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2021, 42(23): 2834-2838.

收稿日期:2022-10-13

修回日期:2023-06-14