

• 综述 •

病原微生物分子检测技术在脓毒症诊断与
预后评估中的临床价值*丁陈玲¹ 陈剑满¹ 皋源^{1△}

[关键词] 脓毒症;感染;微生物学技术;分子诊断技术

DOI:10.13201/j.issn.1009-5918.2022.01.017

[中图分类号] R459.7;R446.5 [文献标志码] A

Molecular-based detection technologies of pathogens for sepsis

Summary Sepsis is one of the main causes of intensive care unit admission and the poor prognosis in critically ill patients. As sepsis progresses rapidly, antimicrobial therapy should be started as soon as possible. The present identification of pathogens, which is important for sepsis diagnosis and guiding antimicrobial therapy, is time-consuming and limited by poor detection performance, leading to the missing prompt and adequate antimicrobial therapy. Therefore, it is important to accelerate the identification of the causative species in patients with sepsis. Nowadays, many molecular-based detection techniques, characterized by fast detection and high sensitivity, have been applied in clinical practice, multiplex PCR and metagenomic sequencing, for example. In addition, some new molecular techniques, such as digital PCR, third generation sequencing and cell-free DNA sequencing are also being explored to make up for deficiencies of the current techniques, further accelerating the identification of pathogens, as well as improving the detection rate, which may provide new evidences for the early diagnosis, early identification of pathogens and prognostic assessment for patients with sepsis.

Key words sepsis; infection; microbiological techniques; molecular diagnostic techniques

脓毒症是宿主对感染反应失调而引起的危及生命的器官功能障碍^[1-2],是引起住院患者死亡及远期预后不良的一大重要原因。全球每年脓毒症发病率为189/10万人,病死率为26.7%,而在需要转入重症监护室治疗的脓毒症患者病死率高达41.9%^[3]。脓毒症病情变化迅速,早期诊断及尽早干预有助于改善患者预后^[4]。病原菌检测可以为脓毒症的诊断及抗感染方案的制定提供依据,而目前传统培养学方法检出率低,且较为耗时,可能错过早期抗感染治疗的最佳时机。因此,加快脓毒症患者病原菌检测的速度十分重要。病原微生物分子诊断技术可以为脓毒症的早期诊断、病原菌及耐药性检测、预后评估提供新的方向。本文就相关的研究进展进行综述。

1 脓毒症病原菌检测现状

传统培养技术是目前脓毒症病原菌检测的“金标准”,可以处理大量临床样本^[5],但具有以下几个缺点:①传统培养技术往往需要3~4d的时间才能获得结果,可能错过早期抗感染治疗的最佳时

机。②传统培养技术由于灵敏度低,容易产生假阴性结果。脓毒症患者血液中的病原菌载量往往很低,通常只有 $1\sim 1\times 10^4$ CFU/mL^[6],传统培养技术仅能检测出18.7%脓毒症患者的病原菌^[7]。③传统培养技术可能产生假阳性结果,由于采样过程操作不当造成血样本的污染,导致假阳性结果的检出,从而增加不必要的抗菌药物的使用^[6]。因此,亟需新的检测技术以加快脓毒症病原菌的检出速度,提高检出率及检测准确率。

2 病原微生物分子检测技术

2.1 核酸扩增技术

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术通过体外模拟DNA的复制过程实现DNA快速扩增,包括变性、退火、延伸3个步骤,在引物及DNA聚合酶的作用下,以dNTP为原料通过温度变化完成目的基因的扩增,再通过凝胶电泳对扩增子进行检测^[8],细菌检测目前常用的扩增序列为16SrRNA序列扩增子检测^[9]。

随着实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)以及多重PCR(multiplex PCR)技术的实现,PCR技术在病原微生物检测中发挥出更大的价值,qRT-PCR通过加入荧光基团,利用荧光信号的变化实时监测扩增反应以及目的基因的相对定量检测,多重PCR技术则是在一个PCR反应体系中

*基金项目:上海市科学技术委员会科研项目(No:18411951100)

¹上海交通大学医学院附属仁济医院重症医学科(上海,200127)

△审校者

通信作者:皋源,E-mail:gaoyuanzhuren@126.com

加入两对及以上的引物,实现对多个目的基因的扩增^[10]。脓毒症常见的病原菌主要有克雷伯菌属、大肠杆菌、假单胞菌属、不动杆菌属以及金黄色葡萄球菌等^[11],目前已有多种商业化产品包含针对脓毒症常见病原菌引物的多重 PCR 反应体系,如 IridicaPlex ID (Abbott Molecular)、LightCycler-SeptiFast (Roche Molecular Diagnostics)、SepsiTest (Molzyme) 可以在 6~10 h 内完成脓毒症全血的病原菌检测^[12-14]。

随着 PCR 技术的革新,数字 PCR (digital PCR, dPCR) 可以完成细菌 16S rRNA 的绝对定量检测,灵敏度更高^[15-16],数字 PCR 通过分隔出上千个微小反应体系,一个反应体系中不存在或仅存在一个目标序列,扩增后通过荧光信号判断反应体系中是否存在目标序列,从而实现 DNA 的绝对定量检测^[10],主要技术有微滴式 dPCR (droplet dPCR, ddPCR) 和芯片式 dPCR (chip dPCR, cdPCR),分别依赖微滴技术及微流控技术完成反应体系的分隔。IC 3D 系统是依赖于微液滴反应系统及荧光探针进行检测的系统,检测速度更快,灵敏度更高,在 1~4 h 内就可以完成直接从全血检测病原菌^[17]。

2.2 宏基因组测序技术

宏基因组测序技术通过对微生物基因组进行高通量测序提供完整的微生物群体组成比例。宏基因组测序技术主要包括样本制备、文库建立、测序及数据分析这 4 个步骤,在样本完成 DNA 提取后,根据不同测序方法进行文库建立及测序,将获得的测序结果与基因库进行比对,完成测序序列的分类,再根据微生物测序序列的相对丰度提供微生物组成比例^[18]。

目前的测序方法主要有三代,一代测序是基于 PCR 技术的测序方式,通过在 PCR 体系中加入 ddNTP 使扩增过程终止,从而完成 DNA 片段的切割并利用电泳进行测序;二代测序较一代测序成本低、通量高,是目前微生物检测最常用的测序技术,常用的二代测序技术有 GA (genome analyzer) 平台测序 (Illumina),该方法是基于 PCR 的边合成边测序技术,带有不同荧光信号的 dNTP 参与扩增过程,通过检测荧光信号对大量 DNA 分子进行并行测序;第三代测序技术,比如纳米孔测序平台 (MinION, Oxford Nanopore Technologies),较二代测序而言实现了长读长测序,提高了检测速度,且无需扩增,该方法是在磷脂双分子层结构中镶嵌纳米孔通道,在膜两侧电位不同的情况下,会有电流不断通过纳米孔,通过检测 DNA 在通过纳米孔通道时引起的电流中断信号进行测序^[19-21]。

脓毒症 2018 拯救指南中建议对于脓毒症患者应在使用抗生素前获取血培养^[22],2021 年脓毒症管理指南中同样强调了对疑似脓毒症患者感染性

原因的检测^[23],而测序技术直接用于脓毒症患者血液样本的难点在于血液样本中的人源基因组占比 $\geq 99\%$ ^[24],无法直接针对微生物基因组进行测序,除了利用 PCR 技术对 16S rRNA 序列扩增外,目前的微生物血浆游离 DNA (microbial cell-free DNA, mcfDNA) 测序还可以通过离心的方式去除细胞内人源基因组,获取血浆小分子游离 DNA 后再进行测序^[24],mcfDNA 测序的第一个商业化产品 Karius test 可以在 29 h 内完成脓毒症病原菌检测^[25],三代测序的加入加快了 mcfDNA 测序的速度^[26]。

对于脓毒症患者而言,适当抗生素治疗的开始时间每晚 1 h 都会导致病死率增加 $4\% \sim 7\%$ ^[27],病原菌快速检测及检出率的提高对脓毒症诊断及开展抗菌治疗意义重大。分子检测技术在检测速度及检出率上相较传统血培养都有了很大提升^[28],检测速度上,PCR 技术较宏基因组测序技术检测速度更快,对于脓毒症常见致病菌的灵敏度更高,而 PCR 技术依赖引物进行检测,测序技术则可以检测 PCR 技术无法检测出的非常见脓毒症致病菌^[28]。

3 病原微生物分子检测技术在脓毒症诊断与预后评估中的临床价值

3.1 脓毒症早期诊断

Grumaz 等^[25]利用二代测序技术对 62 份脓毒症及健康人群的血浆 cfDNA 进行测序,结果发现脓毒症患者血浆 cfDNA 浓度显著升高,尤其是在脓毒症早期,高达 197.23 ng/mL ,而健康人群的血浆 cfDNA 浓度仅为 55.43 ng/mL 。Kisat 等^[29]的研究也同样证实了这一点,该研究对 30 例疑似脓毒症患者的血浆 DNA 进行测序并通过算法分类定量血浆细菌 DNA,结果发现感染患者的细菌 DNA 片段是无感染患者的 1.6 倍,这提示了病原微生物分子检测技术可以为脓毒症早期诊断提供依据。此后,Chen 等^[30]利用随机森林分类器对血浆病原菌游离 DNA 丰度进行分析,结果发现,利用该方法对脓毒症进行早期诊断的受试者工作曲线下面积为 0.93,敏感度和特异度分别为 0.71 及 0.80,作为对比,作者还利用传统 logistic 回归方法进行分析,其受试者工作特征曲线下面积为 0.77,提示了算法的加入可能可以使 mcfDNA 测序技术在脓毒症早期诊断中发挥更大的作用。利用 ddPCR 对 16S rRNA 序列定量检测也有助于脓毒症的诊断,Ziegler 等^[31]的研究发现脓毒症患者的 16S rRNA 序列载量为 $2.38 (\lg_{10} \text{ copies/mL})$,较非脓毒症患者 ($0 \lg_{10} \text{ copies/mL}$) 高。

3.2 病原菌检测

病原微生物分子检测技术在脓毒症病原菌检测方面较传统培养技术的检测速度快,且检出率高,而随着分子检测技术的革新,其检测速度及检

出率又有了很大的提升(表 1)。IridicaPlex ID (Abbott Molecular)平台通过 16S rRNA 及 23S rRNA 基因扩增可以在 6 h 内完成 780 种细菌及念珠菌属的检测,其敏感度为 77%~91%,特异度为 87%~99%,根据病原菌种属的不同,其最低检测限度为 0.25~128 CFU/mL^[6,12]。LightCyclerSeptiFast (Roche Molecular Diagnostics) 的敏感度在 60%~95%,特异度在 74%~99%,最低检测限度为 3~100 CFU/mL^[6,13-14]。SepsiTest(Molzyme)可以在 8~10 h 内完成 345 种细菌鉴定,敏感度为 37.5%~78.6%,特异度为 86.8%~94.4%,其最低检测限度是 10~80 CFU/mL^[6,14]。随着微流控及微液滴技术的加入,病原微生物分子检测技术的速度更快,且检出率也得到了提升,Abram 等^[17]利用 IC 3D 系统对接种了大肠埃希菌的全血进行检测,结果发现,对于细菌浓度为 1 CFU/mL 及 5 CFU/mL 的样本,IC 3D 系统的检出率为 50%,

而细菌浓度 10 CFU/mL 的样本,IC 3D 的检出率就可以达到 83%,对于 100 CFU/mL 及 1×10^4 CFU/mL 的样本,IC 3D 的检出率达到 100%且假阳性率为 0。

宏基因组测序技术同样可以用于病原菌的检测。Karius test 可以检测 1250 种病原菌,其敏感度为 92.9%,特异度为 62.7%,可以检测出 48.7% 脓毒症患者的病原菌^[25]。Fida 等^[32]对 60 例脓毒症患者进行血浆游离 DNA 的 16S rRNA 基因二代测序,结果在 47% 的样本中检测出可能的致病菌,高于传统血培养的阳性率 32%。Grumaz 等^[26]通过纳米孔平台对 8 例脓毒症患者的血浆 cfDNA 进行测序,8 例样本全部检测出相关的病原菌,同时对于病原菌含量高的样本,其检测速度十分快,在 1 例尿肠球菌感染患者的样本中,纳米孔测序技术在开始检测后的 1 min 检测出尿肠球菌,其余样本也都在 2~3 h 内完成检测。

表 1 病原微生物分子检测技术

技术名称	方法	耗时/h	敏感度	特异度	最低检测限度/ (CFU · mL ⁻¹)
IridicaPlex ID ^[12]	Multiplexed PCR+ESI-MS	6	77%~91%	87%~99%	0.25~128
SeptiFast ^[13-14]	qRT-PCR+probe hybridization	6	60%~95%	74%~99%	3~100
SepsiTest ^[14]	PCR+Sangersequencing	8~10	37.5%~78.6%	86.8%~94.4%	10~80
U-dHRM ^[6]	dPCR+HRM	3			50~100
IC 3D ^[17]	Droplet+DNA probe	1~4			10
Karius test ^[25]	cfDNA sequencing	29	92.9%	62.7%	
MinION ^[26]	Nanopore sequencing	5~6			

3.3 耐药性检测

病原微生物分子检测技术可以通过耐药基因检测病原菌的耐药性。IridicaPlex ID 平台可以检测 4 种耐药基因 *mecA*、*vanA/B* 以及 *bla_{KPC}*,SepsiFast 可以检测出 *mecA*^[12-14],IC 3D 系统可以检测 ESBL 基因 *bla_{CTX-M-1}* 及 *bla_{CTX-M-2}* 家族以及碳青霉烯类耐药基因 *bla_{OXA-48}* 和 *bla_{KPC}*,Abram 等^[17]利用 IC 3D 系统检测 10 份接种了临床分离株的全血样本,该技术检测出所有含 *bla_{CTX-M-14}* 基因的菌株,其敏感度及特异度均为 100%。纳米孔测序平台同样可以用于耐药基因检测,Zhou 等^[33]利用 MinION 测序平台对模拟血流感染的样本进行检测,菌株的耐药基因包括 *bla_{CTX-M}*、*bla_{TEM}*、*bla_{KPC}* 以及 *mdfA* 等,结果发现,在无培养直接检测的情况下,该技术可以检测出 20.6% 的耐药基因,而在经过培养后检出率大大提高,可以检测出 82.4% 的耐药基因。这些结果提示了病原微生物分子检测技术可以对脓毒症病原菌的耐药性进行检测,其结果可能可以在脓毒症患者的抗生素方案调整中发挥作用,但目前仍然缺乏相关临床研究^[32,34],一项关

于纳米孔平台测序对指导抗生素治疗的价值的多中心研究正在进行中^[35]。

3.4 感染部位判断

不同感染部位所致脓毒症的脏器功能损伤发生率各不相同^[36-37],病原微生物分子检测技术有助于感染部位的判断以及脓毒症个体化治疗方案的开展,Fida 等^[32]的研究利用二代测序技术对脓毒症患者的血浆 mcfDNA 进行测序,结果发现在 6 例血液样本中检测出胃肠道定植厌氧菌及泌尿系统定植菌乳球菌及脆乳杆菌,并且检出的定植菌与感染部位一致,此外,Watanabe 等^[38]对 1 例肠穿孔所致脓毒症患者的血液样本进行 16SrRNA 扩增子测序中检测出传统培养技术未检出的粪肠球菌,提示 mcfDNA 二代测序可能可以在判断脓毒症感染部位中发挥作用。

3.5 预测血流感染

Goggin 等^[39]使用血浆 cfDNA 测序对 47 例难治性肿瘤或肿瘤复发的免疫抑制患者的血液样本进行检测,其中 19 例患者后续出现血流感染症状,结果发现血浆 cfDNA 病原学检测可以在血流感染

症状发生前 3 d 预测血流感染的发生,对于血流感染发生的预测敏感度为 75%,特异度为 82%,而对于细菌感染,其敏感度及特异度分别高达 80%及 91%,这提示了血浆游离 DNA 测序技术在高危人群中运用可能可以提前预测血流感染及脓毒症的发生,以提早进行干预^[40]。

3.6 脓毒症预后预测

Ziegler 等^[31]的研究发现全血细菌 16S rDNA 数字 PCR 检测技术可以在血流感染患者脓毒症预后预测中发挥作用,该研究在患者确诊血流感染当天对全血进行 16S rDNA 数字 PCR 检测,结果发现初始的 16S rDNA 载量与血流感染患者病死率相关,脓毒症患者的初始载量越高,病死率越高,90 d 内死亡患者的初始载量为 2.83(lg10 copies/mL),而存活患者的初始载量为 0(lg10 copies/mL),同时在病程中对 16S rDNA 载量的持续监测也对预后有一定预测价值,结果持续阳性的患者提示预后不佳。

4 总结与展望

脓毒症是导致患者死亡的一大重要原因,仍然是目前治疗的难点及研究热点,早期诊断、早期个体化使用抗生素是脓毒症治疗的关键。病原微生物分子检测技术由于其检测速度快、检出率高,可以实现脓症患者病原菌的早期检测,一些技术如多重 PCR、二代测序技术已开始运用于临床,新的技术如微流控、微液滴技术、纳米技术的加入为分子检测技术带来了革新,不仅实现了对核酸的绝对定量检测,同时可以跳过扩增步骤,在灵敏度及速度上都有了很大的提升。同时,病原微生物分子检测技术还可以在脓毒症早期诊断、感染部位的确定、血流感染预测以及脓毒症预后评估方面发挥作用,随着技术的革新,病原微生物分子检测技术或许可以在脓毒症诊治中发挥更大的价值。然而,病原微生物分子检测技术操作流程复杂、成本高昂,关于简化流程、降低成本的方法还需要继续探索,同时由于血样本中病原菌载量低,如何提高病原菌检出率及检测准确率也还需要探索。此外,目前也少有研究去探索病原微生物分子检测技术的使用与临床预后之间的关系,因此仍需要多中心对照研究来验证它们的效能。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock(Sepsis-3)[J]. *JAMA*, 2016, 315(8): 801-810.
- [2] Cecconi M, Evans L, Levy M, et al. Sepsis and septic shock[J]. *Lancet*, 2018, 392(10141): 75-87.
- [3] Fleischmann-Struzek C, Mellhammar L, Rose N, et al. Incidence and mortality of hospital-and ICU-treated sepsis: results from an updated and expanded systematic review and meta-analysis[J]. *Intensive Care Med*, 2020, 46(8): 1552-1562.
- [4] Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2021[J]. *Crit Care Med*, 2021, 49(11): e1063-e1143.
- [5] Maugeri G, Lychko I, Sobral R, et al. Identification and Antibiotic-Susceptibility Profiling of Infectious Bacterial Agents; A Review of Current and Future Trends[J]. *Biotechnol J*, 2019, 14(1): e1700750.
- [6] Sinha M, Jupe J, Mack H, et al. Emerging Technologies for Molecular Diagnosis of Sepsis[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2018, 31(2): e00089-17.
- [7] 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.
- [8] Gaňová M, Zhang H, Zhu H, et al. Multiplexed digital polymerase chain reaction as a powerful diagnostic tool[J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 181: 113155.
- [9] Church DL, Cerutti L, Gürtler A, et al. Performance and Application of 16S rRNA Gene Cycle Sequencing for Routine Identification of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2020, 33(4): e00053-19.
- [10] Kuypers J, Jerome KR. Applications of Digital PCR for Clinical Microbiology[J]. *J Clin Microbiol*, 2017, 55(6): 1621-1628.
- [11] Vincent JL, Sakr Y, Singer M, et al. Prevalence and Outcomes of Infection Among Patients in Intensive Care Units in 2017[J]. *JAMA*, 2020, 323(15): 1478-1487.
- [12] Metzgar D, Frinder MW, Rothman RE, et al. The IRIDICA BAC BSI Assay: Rapid, Sensitive and Culture-Independent Identification of Bacteria and Candida in Blood[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0158186.
- [13] Giacobbe DR, Giani T, Bassetti M, et al. Rapid microbiological tests for bloodstream infections due to multidrug resistant Gram-negative bacteria: therapeutic implications[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2020, 26(6): 713-722.
- [14] Stevenson M, Pandor A, Martyn-St James M, et al. Sepsis; the LightCycler SeptiFast Test MGRADE[®], SepsisTest[™] and IRIDICA BAC BSI assay for rapidly identifying bloodstream bacteria and fungi-a systematic review and economic evaluation[J]. *Health Technol Assess*, 2016, 20(46): 1-246.
- [15] Scheler O, Postek W, Garstecki P. Recent developments of microfluidics as a tool for biotechnology and microbiology[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2019, 55: 60-67.
- [16] Salipante SJ, Jerome KR. Digital PCR-An Emerging Technology with Broad Applications in Microbiology

- [J]. *Clin Chem*, 2020, 66(1): 117-123.
- [17] Abram TJ, Cherukury H, Ou CY, et al. Rapid bacterial detection and antibiotic susceptibility testing in whole blood using one-step, high throughput blood digital PCR[J]. *Lab Chip*, 2020, 20(3): 477-489.
- [18] Breitwieser FP, Lu J, Salzberg SL. A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly[J]. *Brief Bioinform*, 2019, 20(4): 1125-1136.
- [19] Shendure J, Balasubramanian S, Church GM, et al. DNA sequencing at 40: past, present and future[J]. *Nature*, 2017, 550(7676): 345-353.
- [20] van Belkum A, Burnham CD, Rossen J, et al. Innovative and rapid antimicrobial susceptibility testing systems[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2020, 18(5): 299-311.
- [21] Lavezzo E, Barzon L, Toppo S, et al. Third generation sequencing technologies applied to diagnostic microbiology: benefits and challenges in applications and data analysis[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2016, 16(9): 1011-1023.
- [22] Levy MM, Evans LE, Rhodes A. The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update [J]. *Intensive Care Med*, 2018, 44(6): 925-928.
- [23] Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021 [J]. *Intensive Care Med*, 2021, 47(11): 1181-1247.
- [24] Gu W, Miller S, Chiu CY. Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection [J]. *Annu Rev Pathol*, 2019, 14: 319-338.
- [25] Grumaz S, Stevens P, Grumaz C, et al. Next-generation sequencing diagnostics of bacteremia in septic patients[J]. *Genome Med*, 2016, 8(1): 73.
- [26] Grumaz C, Hoffmann A, Vainshtein Y, et al. Rapid Next-Generation Sequencing-Based Diagnostics of Bacteremia in Septic Patients[J]. *J Mol Diagn*, 2020, 22(3): 405-418.
- [27] 黄昆鹏. 脓毒症的定义、诊断与早期干预——不可分割的三要素[J]. *临床急诊杂志*, 2021, 22(3): 221-226.
- [28] Hu B, Tao Y, Shao Z, et al. A Comparison of Blood Pathogen Detection Among Droplet Digital PCR, Metagenomic Next-Generation Sequencing, and Blood Culture in Critically Ill Patients With Suspected Bloodstream Infections [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 641202.
- [29] Kisat MT, Odenheimer-Bergman A, Markus H, et al. Plasma metagenomic sequencing to detect and quantify bacterial DNA in ICU patients suspected of sepsis: A proof-of-principle study[J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2021, 91(6): 988-994.
- [30] Chen P, Li S, Li W, et al. Rapid diagnosis and comprehensive bacteria profiling of sepsis based on cell-free DNA[J]. *J Transl Med*, 2020, 18(1): 5.
- [31] Ziegler I, Lindström S, Källgren M, et al. 16S rDNA droplet digital PCR for monitoring bacterial DNAemia in bloodstream infections [J]. *PLoS One*, 2019, 14(11): e0224656.
- [32] Fida M, Wolf MJ, Hamdi A, et al. Detection of Pathogenic Bacteria From Septic Patients Using 16S Ribosomal RNA Gene-Targeted Metagenomic Sequencing [J]. *Clin Infect Dis*, 2021, 73(7): 1165-1172.
- [33] Zhou M, Wu Y, Kudinha T, et al. Comprehensive Pathogen Identification, Antibiotic Resistance, and Virulence Genes Prediction Directly From Simulated Blood Samples and Positive Blood Cultures by Nanopore Metagenomic Sequencing[J]. *Front Genet*, 2021, 12: 620009.
- [34] Cambau E, Durand-Zaleski I, Bretagne S, et al. Performance and economic evaluation of the molecular detection of pathogens for patients with severe infections: the EVAMICA open-label, cluster-randomised, interventional crossover trial[J]. *Intensive Care Med*, 2017, 43(11): 1613-1625.
- [35] Irwin AD, Coin L, Harris P, et al. Optimising Treatment Outcomes for Children and Adults Through Rapid Genome Sequencing of Sepsis Pathogens. A Study Protocol for a Prospective, Multi-Centre Trial (DIRECT)[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 667680.
- [36] 黄飞, 祁玮, 何健, 等. 感染部位与发生脓毒症肝损伤的相关性研究[J]. *临床急诊杂志*, 2021, 22(10): 653-656.
- [37] 金魁, 王玉兰, 汪跃国, 等. 不同感染部位脓毒症急性肾损伤发生率及相关死亡风险分析[J]. *临床急诊杂志*, 2021, 22(7): 445-452.
- [38] Watanabe N, Kryukov K, Nakagawa S, et al. Detection of pathogenic bacteria in the blood from sepsis patients using 16S rRNA gene amplicon sequencing analysis[J]. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0202049.
- [39] 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.
- [40] Han D, Li R, Shi J, et al. Liquid biopsy for infectious diseases: a focus on microbial cell-free DNA sequencing[J]. *Theranostics*, 2020, 10(12): 5501-5513.

(收稿日期: 2021-10-26)