

综述 • Review

基于宏基因组测序的临床病原体检测技术 研究进展及临床应用

吴婉清^{1,3,5} 喻鑫杰^{1,3,5} 王苗苗² 谢沈博⁶ 刘学英² 赵鹏飞⁴
杨励勤⁵ 郑艺⁵ 蔡霈⁵ 潘文京¹ 刘洪娜¹

(1. 南华大学 未来科学研究院 衡阳医学院 湖南 衡阳 421001; 2. 湖南工业大学 医用纳米材料与器件湖南省重点实验室 湖南 株洲 412007; 3. 南华大学附属第一医院检验科 湖南 衡阳 421005; 4. 安徽中医药大学 安徽 合肥 230012; 5. 南华大学 湖南省妇幼保健院 湖南 长沙 410008;
6. 伦敦大学学院 人口与健康学院 儿童健康部门 英国 伦敦 WC1E 6BT)

摘 要 宏基因组测序以其广谱、无偏、无需培养的特点，正改变临床感染诊断模式。其在未知或罕见病原体识别、混合感染解析、免疫抑制人群管理、脑炎等低丰度病原检测以及耐药基因预测方面均表现出显著优势。宏基因组测序还可以用于耐药性监测、传播链分析和公共卫生预警，扩展传统检测的能力。然而，其临床应用仍受宿主背景高、缺乏统一标准、定量能力有限、成本较高等因素限制。随着富集技术、测序技术、自动化流程及人工智能算法的发展，宏基因组测序有望实现更高灵敏度、更快周转时间和更规范的临床应用，为精准感染诊疗与公共卫生监测提供重要支撑。

关键词 宏基因组测序；病原体检测；感染性疾病；免疫抑制；自动化平台

文章编号 034-2025-3417

Metagenomic Next-Generation Sequencing in Clinical Pathogen Detection: Applications, Challenges, and Future Directions

Wu Wanqing^{1,3,5}, Yu Xinjie^{1,3,5}, Wang Miaomiao², Xie Shenbo⁶, Liu Xueying², Zhao Pengfei⁴, Yang Liqin⁵, Zheng Yi⁵, Cai Pei⁵, Pan Wenjing¹, Liu Hongna¹

(1. Hengyang Medical College, University of South China, Hengyang 421001, China; 2. Hunan Provincial Key Laboratory of Medical Nano Materials and Devices, Hunan University of Technology, Zhuzhou 412007, China; 3.

收稿日期: 2025-09-02 录用日期: 2025-10-09

基金项目: 四大慢病重大专项 (编号: 2023ZD0507400, 2023ZD050740X); 湖南省自然科学基金 (编号: 2023JJ50199, 2025JJ80663);
湖南省教育厅科学研究项目 (编号: 22A0385); 2025年度湖南省重点研发计划 (编号: 2025JK2134); 湖南省卫生健康委
基金 (编号: W20243057, D202302046032)

通讯作者: 刘洪娜, 单位: 南华大学 未来科学研究院 衡阳医学院 湖南 衡阳

引用格式: 吴婉清, 喻鑫杰, 王苗苗, 等. 基于宏基因组测序的临床病原体检测技术研究进展及临床应用[J]. 环球医学进展, 2025, 4(2): 22-30.

Department of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421005, China; 4. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 5. The Maternal and Child Health Hospital of Hunan Province, University of South China, Changsha 410008, China; 6. University College London, Faculty of Population Health Sciences, Great Ormond Street Institute of Child Health, London WC1N 1EH, UK)

Abstract Metagenomic next-generation sequencing (mNGS) has emerged as a powerful, unbiased diagnostic tool that overcomes the limitations of conventional culture and targeted assays. Its broad pathogen coverage enables rapid identification of rare, novel, and mixed infections, particularly benefiting critically ill and immunocompromised patients. mNGS also supports antimicrobial-resistance profiling, host-pathogen interaction analysis, and epidemiological surveillance. Despite these advantages, several challenges hinder routine clinical adoption, including high host-background interference, limited quantitative accuracy, and lack of standardized workflows across laboratories. Additionally, database errors, contamination control, and the balance between sequencing depth, sensitivity, and cost remain key constraints. Advances in host-depletion methods, long-read sequencing, automation, and AI-driven bioinformatics are expected to improve sensitivity, interpretability, and turnaround time. With expanding evidence from real-world studies, mNGS is poised to evolve from an innovative diagnostic approach into a comprehensive platform for pathogen detection, resistance assessment, and public-health monitoring.

Keywords: Metagenomic next-generation sequencing; Pathogen detection; Infectious diseases; Immunosuppression; Automated platform

感染性疾病是当今世界严重威胁人类健康的重大疾病，其病原体来源复杂、种类繁多，包括病毒、细菌、真菌和寄生虫等多类微生物，可累及人体的呼吸、消化、循环和神经等各组织器官^[1]。随着全球人口流动增加、新发与再发病原体不断出现，临床感染的病因诊断变得愈发复杂，当代公共卫生仍存在许多挑战。

目前临床常用的病原学诊断手段主要包括形态学观察、病原体培养、免疫学检测以及 PCR 靶向扩增等。细菌培养目前仍有多达 99% 的微生物不易培养^[2]，使得培养法用时长，适用范围窄。免疫学测定和使用 PCR 的核酸检测，快速准确，但它们需要有关病原微生物类型的先验知识或假设。而在中枢神经系统感染、深部组织感染等样本量有限、宿主成分复杂的场景下，传统检测的阳性率往往更低。总体而言，这些方法普遍存在灵敏度受限、检测范围狭窄、无法识别未知病原体以及操作周期较长等局限，致使大量感染病例在临床上仍处

于病因不明的状态^[3]，延误最佳治疗时机，甚至威胁患者生命。

宏基因组测序 (metagenomic next-generation sequencing, mNGS) 的出现为病原检测带来了技术革新。mNGS 作为一种基于高通量测序的非靶向病原学检测技术，具有显著的广谱、无偏倚和高度灵敏等优势。其在一次测序中可同时捕获细菌、病毒、真菌等多类微生物的信息，不依赖培养条件或预设引物，避免传统方法因培养偏好或检测范围受限而产生的漏检^[4]；同时，对低丰度、难培养或非典型病原体具备更高检出能力，尤其适用于病原负荷低或疑难感染的场景^[5]。此外，由于 mNGS 不依赖先验知识，其在新发、罕见或未知病原体的识别中展现出独特优势。除了直接用于病原体鉴定之外，mNGS 还能同时提供气道微生物组特征、宿主免疫反应以及耐药性基因等关键信息，从而为感染的诊断、分型与个体化治疗提供更全面的支持^[6]。总体而言，mNGS 的引入显著拓展了

临床病原体检测的广度与深度,为复杂感染的诊断提供了有力工具。

1 宏基因组测序技术概述

1.1 宏基因组测序的原理与流程 mNGS 的一般流程包括样本处理、核酸提取、文库构建、测序与生物信息学分析。首先从组织或环境中采集样本,如血液、脑脊液、呼吸道分泌物、组织活检与尿液等。提取的总 DNA 或 RNA 样本会经过反转录、酶切、修饰等步骤,构建成为适合测序的文库。可根据检测需求采用基于 DNA 或 RNA 的 mNGS。基于 DNA 的 mNGS 方法比 RNA 的 mNGS 方法更简单,适用于细菌、真菌及 DNA 病毒^[7];而基于 RNA 的 mNGS 可实现对 RNA 病毒的快速检测^[8]。测序技术方面, Illumina 等第二代平台因错误率低、数据稳定性高,仍为临床主流^[9];第三代技术(如 Oxford Nanopore、PacBio)则具有长读长、速度快的优点,这使得基因组从头组装更容易、更准确,如 Nanopore 可在约 6 小时内完成从样本到报告的流程,并已用于多种突发传染病的现场检测^[10]。生物信息学是 mNGS 的核心环节,包括质量控制、人源序列剔除、比对及物种鉴定,常用数据库涵盖 NCBI NT/NR、RefSeq、Kraken 等。近年来,背景污染数据库的构建及机器学习算法^[11]的引入显著降低了假阳性,提高了结果的准确性和临床可解释性。

与传统病原检测方法相比, mNGS 在广谱快速检测^[12]、非培养依赖性及新发病原体识别方面具有显著优势。例如,在微生物培养阴性的骨关节感染患者中, mNGS 共检出 114 种病原体,其中常见病原包括金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌和铜绿假单胞菌等^[13],显著提升了培养阴性 OI 的病原学诊断率并为临床治疗提供

了关键依据。此外, mNGS 可同步解析耐药基因信息,为抗菌药物方案的优化提供重要参考。

1.2 主流宏基因组测序平台与试剂盒 目前国内外已有多种 mNGS 平台和配套试剂盒进入临床使用,如 Illumina 的 Nextera DNA Flex、华大基因 PMseq、南京诺唯赞 VAHTS Universal DNA Library Prep Kit、QIAseq FX DNA Library Kit 等。这些系统在自动化程度、样本适配范围 and 数据分析流程上不断完善,使 mNGS 更加贴近临床常规检测需求。

2 宏基因组测序技术的研究进展

近年来,随着研究人员不断优化和验证的 mNGS 的检测流程,提高检测灵敏度,以及发展专用生物信息软件,加速了该技术从科研应用向临床检验应用的转化,改变了临床医生诊断和治疗感染性疾病的方式。

2.1 样本前处理与核酸优化技术 临床样本通常具有宿主背景高、病原体核酸低的显著特征,例如在呼吸道样本中, 95% 的原始 mNGS 读数来源于人鼻咽抽吸物样本^[14],极易掩盖低丰度病原体信号。因此,优化样本前处理是提升 mNGS 性能的首要环节。

预富集策略通过选择性富集微生物核酸或颗粒,实现对病原体信号的显著增强。研究者利用红细胞膜包裹的磁性纳米颗粒,模拟细胞表面的受体—配体相互作用,高效靶向并富集流感病毒颗粒,显著提高了病毒检出灵敏度^[15]。此类物理或仿生学富集方法使低丰度病毒的检测更加可靠。

针对高宿主核酸背景,人源核酸去除方法通过反向削减高丰度的宿主序列,来提升病原体检出率。Gu 等基于 CRISPR-Cas9 的序列特异性切割能力,实现对线粒体 rRNA 等高丰度宿主序列的选择性清除,使其在样本中的含量

降低超过 99%，从而显著富集病原体序列^[16]。该方法尤其适用于活检样本或深部组织样本的微生物检测。

传统核酸扩增常伴随偏好性和非特异扩增。为此，研究者们通过调控聚合酶特性、优化引物退火温度及循环条件等提高扩增均匀性。近年来，等温扩增技术因其对降解样本的包容性和较低的序列偏好性受到关注，在猴痘病毒暴发期间用于监测病毒基因组变异，为疫情应对提供快速稳定的支持^[17]。

2.2 测序与生物信息学创新 随着测序平台性能的提升与分析算法的迭代，mNGS 的数据解释能力得到显著增强，尤其是在低丰度病原体识别、污染控制与耐药机制解析方面。

实验室常见污染源包括试剂背景菌（如 *Ralstonia*、*Acinetobacter*）及环境微生物，这些成分若缺乏背景过滤容易导致假阳性。在临床分析中，通常结合定量或半定量策略区分病原体与定植菌。例如，在耶氏肺孢子菌（*Pneumocystis jirovecii*）检测中，当其在真菌类序列中的相对占比超过 85% 时，通常提示其更可能为致病来源，而非背景定植成分^[18]。此类方法强化了 mNGS 在复杂呼吸道感染诊断中的可靠性。

靶向捕获测序是面向低丰度病原体的重要技术进展。与非靶向 mNGS 相比，病原体靶向测序（pathogen targeted next-generation sequencing, ptNGS）通过探针富集目标病原体核酸显著提高检出率、缩短周转时间并降低了测序成本。在脑膜炎诊断中，ptNGS 的敏感性由 mNGS 的 41.7% 提升至 70.8%，能够检出多种 mNGS 漏掉的病原体，有效弥补了脑脊液培养阳性率低的不足^[19]。

长读长测序在耐药机制研究与质粒背景解析方面展现独特优势。研究发现，在多重耐药

菌监测中，Illumina 等短读长平台能够精准识别菌株及其耐药等位基因，如 blaKPC-2，而 Oxford Nanopore 等长读长平台可实现实时检测，最快仅需 2.3 分钟即可获得耐药基因并解析耐药基因所在的质粒结构，二者形成互补优势^[20]。

机器学习的引入进一步提升了 mNGS 数据解释能力，可用于降低误报率、推断耐药性并鉴别致病菌与共生菌。深度学习模型可对读长进行噪声分类，从而降低假阳性率。一项针对下呼吸道感染的研究显示，通过训练机器学习模型区分病原体与共生菌，在独立验证集上准确率可达 95.5%^[11]，展现了智能算法在复杂临床样本解析中的巨大潜力。

3 宏基因组测序在病原体检测中的临床应用

mNGS 凭借广谱、无偏、无需培养等优势，逐渐成为复杂感染与疑难病例的重要诊断工具。特别是在病原体来源不明、混合感染、免疫抑制宿主以及公共卫生事件中，mNGS 能够显著提升诊断率和治疗效率。以下从典型临床场景系统阐述其应用价值。

3.1 未知、罕见和新发病原体的快速识别 传统检测依赖先验病原假设，难以识别未知或罕见病原体，而 mNGS 具备无靶标、全景式扫描能力，可在单一检测中捕获所有潜在微生物，从而在不明原因感染中检测新型和罕见的致病病原体^[6]。

2020 年研究人员利用 RNA 体系的 mNGS 迅速鉴定出其病原体为一种此前未被发现的冠状病毒，即 SARS-CoV-2，用时仅约 5 天，相比 2003 年 SARS 病毒鉴定所需的 5 个月大幅缩短^[21]，充分体现了 mNGS 在新发病原体快速识别方面的效率与优势。另一项针对脓毒症与血流感染的研究指出，mNGS 在识别引发血

流感染 (BSI) 并进展为脓毒症的病原体方面具有检测周期更短、阳性检出率更高等优势^[22]。这些案例充分说明 mNGS 是病因不明感染的重要突破口。

3.2 复杂混合感染与免疫缺陷人群的全面解析 mNGS 在单次检测中覆盖数千种病原体, 从而显著提升混合感染的检出效率。其对混合性肺部感染的检出敏感性远高于传统方法^[23], 并可在呼吸道病毒检测中与 RT-PCR 保持高度一致, 同时补充识别常规检测遗漏的共感染及替代感染^[24]。

免疫抑制患者, 如器官移植受者、长期糖皮质激素治疗患者、HIV/AIDS 病人等, 常同时面临多种病原体感染, 但传统方法通常难以全面覆盖。mNGS 检测随这类人群非常有价值, 例如在 HIV 患者中, mNGS 可同步识别细菌、病毒、真菌及寄生虫等多类机会致病菌^[25], 大幅提升诊断速度。

3.3 疑难及危重感染的诊断价值 在脑炎、脑膜炎、骨关节感染、感染性心内膜炎等复杂病程中, 病原体通常含量低或难培养, 导致传统检测的诊断率有限。mNGS 以其高灵敏度和非培养特性成为重要补充。一项多中心前瞻性研究显示, 其在脑脊液样本中的总体阳性率为 57%, 对病毒性脑炎、结核性、细菌性脑膜炎及真菌感染的检出敏感性可达 80%^[26]。

在骨关节感染中, 尤其是人工关节置换术后的低度感染, 病原往往难以培养。mNGS 能直接对滑液、新鲜组织进行分析, 检出在传统微生物培养中为阴性的微生物谱, 为低丰度或隐匿性感染的诊断与治疗提供关键依据^[13]。

3.4 耐药性研究与病原追踪 mNGS 不仅提供病原识别结果, 还能同步解析耐药基因、毒力基因等遗传特征, 为抗菌药物选择提供精准指导。采用 mNGS 对下呼吸道感染患者的样

本进行分析, 其中革兰氏阳性菌的预测灵敏度达 70%、特异性 95%, 革兰氏阴性菌的灵敏度 100%^[27]。结合 Cas9 靶向富集与纳米孔测序, 低丰度耐药基因可被放大超过 2500 倍, 使快速耐药性监测成为可能^[27]。

此外, mNGS 可揭示病原来源差异并辅助溯源人兽共患疾病^[28]。Sachsenröder 等对城市野鼠肠道内容物的宏基因组分析发现其携带多种病毒, 包括博卡病毒、沙波病毒、诺如病毒和轮状病毒等, 其中轮状病毒 A 与人类菌株具有高度同源性, 提示存在跨种传播风险^[29]。

3.5 疾病进展评估及公共卫生监测 在传染病暴发或流行病监测中, mNGS 可用于动态评估病原体载量、监测基因变异并重建传播链。根据流行病学和测序结果建立系统进化树, 实现病原来源追溯、变异监控与精准诊断, 从而优化临床治疗和公共卫生决策。在院内感染防控中, mNGS 能在高风险区域环境样本中识别高丰度耐药基因与潜在病原体, 为院感预防与环境风险评估提供重要支持^[30]。此外, 宏基因组同样应用于病原体以外的生物群体研究^[31], 解析其群体的结构、物种鉴定、种群分化和位点变异等生物学特征。

4 mNGS临床应用的瓶颈与挑战

尽管 mNGS 在病原体检测方面展现出显著优势, 但其常规化应用仍受制于技术局限、标准化不足及成本等多重因素, 尚未形成真正全面、稳定、可推广的诊断体系。

4.1 技术层面的核心挑战 临床样本 (特别是血液、脑脊液、呼吸道样本) 中, 宿主 DNA 常占总序列的 90% 以上, 这使病原体序列处于极低丰度状态, 降低病毒及细胞内病原体的检出率。尽管已有宿主耗竭及磁珠富集策略, 但不同实验室间效果差异显著, 仍难完全解决背

景噪声问题。同时，mNGS 的灵敏度受测序深度强烈影响，深度不足易导致漏检，而加深测序又显著增加成本，当测序量低于约 500 万读长时假阴性风险明显升高^[32]。此外，mNGS 检测结果通常为读长数、相对丰度等指标，受基因组大小、裂解与富集效率影响，难以准确反映真实病原体载量，限制其在疾病监测和疗效评估中的应用，例如抗生素治疗后的细菌性脑膜炎中难以判断检出 DNA 来源于残留还是持续感染。再者，常用公共数据库，如 NCBI，仍存在低复杂度序列、注释错误、人源污染及载体序列等问题，可能引发假阳性，进一步影响临床判读的准确性^[33]。

4.2 标准化与质量控制不足 mNGS 涉及样本处理、核酸提取、建库、测序与生物信息分析等多个复杂步骤，但目前缺乏统一的临床级标准体系。任意环节不规范均可能导致假阴性或污染。尤其开放式建库对环境和人员培训要求高，限制基层医院的推广使用。不同机构在阴阳性对照设置、阈值定义、报告格式等方面差异显著，导致跨机构结果缺乏可比性，也削弱了临床医生对 mNGS 结果的信任度。

4.3 成本与周转时间的限制 mNGS 检测的费用通常远高于培养等传统方法，且富集与去除宿主步骤会进一步增加成本，使其难以作为常规筛查应用于普通感染患者。多数实验室的周转时间仍需 24–48 小时，尚不足以完全满足脓毒症、脑膜炎等急危重症对小时级诊断的需求。尽管自动化与流程优化正在推进，但距离真正的临床即时检测仍有差距。

5 总结与展望

宏基因组测序（mNGS）作为突破传统病原检测局限的无偏高通量技术，近年来在临床感染学领域展现出显著应用价值。无论是在未

知和新发病原体的发现、疑难与危重感染的快速诊断、免疫缺陷患者的复杂混合感染解析，还是在耐药性研究、院感防控与公共卫生监测等方面，mNGS 均提供了传统培养和靶向检测难以实现的广谱识别能力。其无需先验信息、可同时检测细菌、病毒、真菌及寄生虫，并能同步捕获耐药基因、毒力因子和微生物群落信息，为感染病因学研究、个体化治疗决策和流行病学监测开辟了新的技术路径。伴随富集策略、长读长测序、AI 智能判读和自动化检测平台的成熟，mNGS 正加速向更高灵敏度、更快速响应和更广泛临床场景发展。

尽管如此，mNGS 离临床常规化应用仍存在多重挑战。高比例宿主核酸背景依然是低丰度病原体检出的主要瓶颈，尤其在血液、CSF 等低生物量样本中更为突出；污染控制、背景菌识别及跨实验室流程差异仍可能造成结果偏差。此外，mNGS 属于半定量检测，读数难以等同真实病原负荷，临床解释往往需要结合病史、影像学及其他实验室指标综合判读。更重要的是，目前数据库质量、算法体系、阈值设定及报告规范尚未统一，不同平台与机构间结果一致性有限，成为其进入指南、推广应用的核心限制因素。

未来，mNGS 的发展方向日益明确。首先，在技术层面，宿主去除、低生物量富集、CRISPR 靶向扩增等方法将持续提升灵敏度；封闭式自动化平台将减少污染并缩短周转时间；长读长测序与实时数据分析有望在急诊与重症场景实现小时级诊断。其次，人工智能将进一步提升病原识别、耐药预测和阳性判读的准确性；区域性背景菌数据库和高质量参考基因库的建设将增强结果可靠性。最后，在临床与公共卫生层面，随着前瞻性研究和真实世界证据不断积累，mNGS 在 CNS 感染、呼吸道感染、

血流感染、免疫抑制患者管理、院感监测及病原溯源等领域的价值将获得更全面的验证。

总体来看, mNGS 正处于从创新方法向临床常规工具快速过渡的关键阶段。未来, 随着成本降低、标准化体系完善以及自动化与 AI 的深度融合, mNGS 将在感染诊断体系中承担更加核心的角色, 并有望从单一病原识别技术发展是集病原检测、耐药性分析、感染动力学监测及公共卫生预警于一体的综合诊断平台, 为精准医学和传染病防控提供更为强大的技术支撑。

利益冲突声明: 本文不存在任何利益冲突。

作者贡献声明: ①吴婉清负责设计论文框架, 起草论文, 修改论文; ②喻鑫杰负责设计论文框架, 修改论文; ③王苗苗负责设计论文框架, 数据收集; ④刘学英负责数据收集; ⑤赵鹏飞负责数据收集和论文意见补充; ⑥杨励勤负责论文意见提出和补充; ⑦蔡需负责文献检索与筛选; ⑧潘文京负责论文意见提出并指导论文写作及定稿; ⑨刘洪娜负责论文意见提出并指导论文写作。

参考文献:

- [1] Schirmer M, Garner A, Vlamakis H, et al. Microbial Genes And Pathways Ininflammatory Bowel Disease. *Nat Rev Microbiol.* 2019 Aug;17(8):497-511. doi: 10.1038/s41579-019-0213-6.
- [2] Daniel R. The metagenomics of soil. *Nat Rev Microbiol.* 2005 Jun;3(6):470-8. doi: 10.1038/nrmicro1160.
- [3] Jain S, Self WH, Wunderink RG, et al. Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization among U.S. Adults. *The New England journal of medicine.* 2015 Jul 30;373(5):415-27. doi: 10.1056/NEJMoa1500245.
- [4] Babiker A, Bradley HL, Stittleburg VD, et al. Metagenomic Sequencing To Detect Respiratory Viruses in Persons under Investigation for COVID-19. *J Clin Microbiol.* 2020 Dec 17;59(1):e02142-20. doi: 10.1128/JCM.02142-20.
- [5] Li H, Gao H, Meng H, et al. Detection of Pulmonary Infectious Pathogens From Lung Biopsy Tissues by Metagenomic Next-Generation Sequencing. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8 doi: 10.3389/fcimb.2018.0020510.3389/fcimb.2018.00205.s001.
- [6] 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 Adv Res.* 2021 Sep 29;38:201-212. doi: 10.1016/j.jare.2021.09.012.
- [7] Ciuffreda L, Rodríguez-Pérez H, Flores C. Nanopore sequencing and its application to the study of microbial communities. *Comput Struct Biotechnol J.* 2021;19:1497-1511. doi: 10.1016/j.csbj.2021.02.020.
- [8] Van Boheemen S, van Rijn AL, 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 Mol Diagn.* 2020;22(2):196-207. doi: 10.1016/j.jmoldx.2019.10.007.
- [9] Simner PJ, Miller S, Carroll KC. Understanding the Promises and Hurdles of Metagenomic Next-Generation Sequencing as a Diagnostic Tool for Infectious Diseases. *Clin Infect Dis.* 2018 Feb 10;66(5):778-788. doi: 10.1093/cid/cix881.
- [10] Charalampous T, Kay GL, Richardson H, et al. Nanopore metagenomics enables rapid clinical diagnosis of bacterial lower respiratory infection. *Nat Biotechnol.* 2019;37(7):783-792. doi: 10.1038/s41587-019-0156-5.
- [11] Langelier C, Kalantar KL, Moazed F, et al. Integrating host response and unbiased microbe detection

- for lower respiratory tract infection diagnosis in critically ill adults. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018 Dec 26;115(52):E12353-e12362. doi: 10.1073/pnas.1809700115.
- [12] Miao Q, Ma Y, Wang Q, et al. Microbiological Diagnostic Performance of Metagenomic Next-generation Sequencing When Applied to Clinical Practice. *Clin Infect Dis*. 2018 Nov 13;67(suppl_2):S231-S240. doi: 10.1093/cid/ciy693.
- [13] Ding H, Huang J, Lin L, et al. Shedding light on negative cultures in osteoarticular infections: leveraging mNGS to unravel risk factors and microbial profiles. *Front Cell Infect Microbiol*. 2024 Nov 25;14:1457639. doi: 10.3389/fcimb.2024.1457639.
- [14] Yang J, Yang F, Ren L, et al. Unbiased parallel detection of viral pathogens in clinical samples by use of a metagenomic approach. *J Clin Microbiol*. 2011 Oct;49(10):3463-9. doi: 10.1128/JCM.00273-11.
- [15] Chen HW, Fang ZS, Chen YT, et al. Targeting and Enrichment of Viral Pathogen by Cell Membrane Cloaked Magnetic Nanoparticles for Enhanced Detection. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017 Nov 22;9(46):39953-39961. doi: 10.1021/acsami.7b09931.
- [16] Gu W, Crawford ED, O'Donovan BD, et al. Depletion of Abundant Sequences by Hybridization (DASH): using Cas9 to remove unwanted high-abundance species in sequencing libraries and molecular counting applications. *Genome Biol*. 2016;17(1) doi: 10.1186/s13059-016-0904-5.
- [17] Licheri M, Licheri MF, Probst L, et al. A novel isothermal whole genome sequencing approach for Monkeypox Virus. *Sci Rep*. 2024 Sep 27;14(1):22333. doi: 10.1038/s41598-024-73613-3. Erratum in: *Sci Rep*. 2025 Feb 5;15(1):4346. doi: 10.1038/s41598-025-88455-w.
- [18] Zhang Y, Ai JW, Cui P, et al. A cluster of cases of pneumocystis pneumonia identified by shotgun metagenomics approach. *J Infect*. 2019 Feb;78(2):158-169. doi: 10.1016/j.jinf.2018.08.013.
- [19] Gao D, Hu Y, Jiang X, et al. Applying the pathogen-targeted next-generation sequencing method to pathogen identification in cerebrospinal fluid. *Ann Transl Med*. 2021 Nov;9(22):1675. doi: 10.21037/atm-21-5488.
- [20] Yee R, Breitwieser FP, Hao S, et al. Metagenomic next-generation sequencing of rectal swabs for the surveillance of antimicrobial-resistant organisms on the Illumina Miseq and Oxford MinION platforms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2021 Jan;40(1):95-102. doi: 10.1007/s10096-020-03996-4.
- [21] Zhu Na, Zhang D, Wang W, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *The New England journal of medicine*. 2020;382(8):727-733. doi: 10.1056/NEJMoa2001017.
- [22] Sun L, Zhang S, Yang Z, et al. Clinical Application and Influencing Factor Analysis of Metagenomic Next-Generation Sequencing (mNGS) in ICU Patients With Sepsis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Jul 13;12:905132. doi: 10.3389/fcimb.2022.905132.
- [23] Wang J, Han Y, Feng J. Metagenomic next-generation sequencing for mixed pulmonary infection diagnosis. *BMC Pulmonary Medicine*. 2019;19(1) doi: 10.1186/s12890-019-1022-4.
- [24] Babiker A, Bradley HL, Stittleburg VD, et al. Metagenomic sequencing to detect respiratory viruses in persons under investigation for COVID-19. *Journal of clinical microbiology*. 2020 Oct 16. doi: 10.1128/JCM.02142-20.
- [25] 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. *mBio*. 2015 Dec 8;6(6):e01888-15. doi: 10.1128/mBio.01888-15.
- [26] Xing XW, Zhang JT, Ma YB, et al. Metagenomic Next-Generation Sequencing for Diagnosis of Infectious Encephalitis and Meningitis: A Large, Prospective Case Series of 213 Patients. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Mar 5;10:88. doi: 10.3389/fcimb.2020.00088.
- [27] Serpa PH, Deng X, Abdelghany M, et al. Metagenomic prediction of antimicrobial resistance in critically ill patients with lower respiratory tract infections. *Genome Med*. 2022 Jul 12;14(1):74. doi: 10.1186/s13073-022-01072-4.
- [28] Harrison EM, Paterson GK, Holden MTG, et al. Whole Genome Sequencing Identifies Zoonotic Transmission Of Mrsa Isolates With The Novel Meca Homologue Mecc. *EMBO Mol Med*. 2013 Apr;5(4):509-15. doi: 10.1002/emmm.201202413.
- [29] Sachsenröder J, Braun A, Machnowska P, et al. Metagenomic identification of novel enteric viruses in urban wild rats and genome characterization of a group A rotavirus. *J Gen Virol*. 2014 Dec;95(Pt 12):2734-2747. doi: 10.1099/vir.0.070029-0.
- [30] Yang J, Li L, Zhu X, et al. Microbial Community Characterization and Molecular Resistance Monitoring in Geriatric Intensive Care Units in China Using mNGS. *Infect Drug Resist*. 2023 Aug 8;16:5121-5134. doi: 10.2147/IDR.S421702.
- [31] Jin X, Zhang Y, Zhang P, et al. The Structure And Function Of The Global Citrus Rhizosphere Microbiome. *Nat Commun*. 2018 Nov 20;9(1):4894. doi: 10.1038/s41467-018-07343-2.
- [32] Schlager R, Chiu CY, Miller S, et al. Validation of Metagenomic Next-Generation Sequencing Tests for Universal Pathogen Detection. *Arch Pathol Lab Med*. 2017;141(6):776-786. doi: 10.5858/arpa.2016-0539-RA.
- [33] Breitwieser FP, Lu J, Salzberg SL. A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. *Brief Bioinform*. 2019 Jul 19;20(4):1125-1136. doi: 10.1093/bib/bbx120.