

UTILIZAREA METODEI DE SECVENȚIERE METAGENOMICĂ ÎN EXAMINAREA BIOSUBSTRATELOR CLINICE (REVIEW-UL LITERATURII)

Victoria BUCOV, Marina LUPU, Svetlana COLAC,
Veronica BURLAC, Natalia PETCOGLO

Agencia Națională pentru Sănătate Publică

[https://doi.org/10.52556/2587-3873.2025.1\(103\).05](https://doi.org/10.52556/2587-3873.2025.1(103).05)

Rezumat

Dezvoltarea noilor tehnologii de secvențiere au facilitat caracterizarea diversității taxonomice și funcționale a microorganismelor. Utilizarea secvențierii metagenomice de generație următoare oferă posibilități de detectare imparțială a tuturor agenților patogeni prezenți în proba analizată. Această tehnologie moleculară este un instrument nou utilizat pentru identificarea ADN-ului și/sau ARN-ului microbial în sânge și în alte biosubstraturi clinice. Studiul realizat este un review al literaturii. Autorii au examinat, folosind baze de date precum PubMed, Mendeley, Google Academic și fondurile bibliotecilor naționale, cele mai recente publicații care au corespuns întru totul scopului. Metagenomica, cunoscută și sub numele de genomica de mediu, este studiul conținutului genomic al unui eșantion de organisme obținute dintr-un habitat comun. Bolile infecțioase sunt frecvent observate în practica clinică, iar depistarea agenților cauzali este veriga-cheie în diagnosticul și tratamentul acestora. Metodele convenționale de diagnostic nu pot satisface nevoile clinice din cauza operațiunilor ce necesită timp și din cauza ratei pozitive scăzute. Secvențierea metagenomică de generație următoare poate depista bacterii, virusuri, ciuperci, paraziți, agenți patogeni rari și chiar agenți patogeni necunoscuți. Utilizarea secvențierii metagenomice pentru examinarea biosubstraturilor este un domeniu relevant, cu un potențial mare de explorat. Implementarea acestei tehnologii va duce la scăderea costurilor. Integrarea datelor folosind mai multe platforme tehnologice va duce la o mai bună înțelegere a modului de valorificare a metagenomilor.

Cuvinte-cheie: microorganism, secvențiere metagenomică, boli infecțioase, diagnostic

Summary

Use of the metagenomic sequencing method in the examination of clinical biosubstrates

The development of new sequencing technologies has facilitated the characterization of the taxonomic and functional diversity of microorganisms. The use of next-generation metagenomic sequencing provides opportunities for unbiased detection of all pathogens present in the analyzed sample. This molecular technology is a new tool used for the identification of microbial DNA and/or RNA in blood and other clinical biosubstrates. The present study is a literature review. Using databases such as PubMed, Mendeley, Google Scholar, and national library collections, the most recent publications that best aligned with the study's objectives were reviewed. Metagenomics, also known as environmental genomics, is the study of the genomic content of a sample of organisms obtained from a common habitat. Infectious diseases are frequently observed in clinical practice, and the detection of causative agents is the key link in their diagnosis and treatment. Conventional diagnostic methods cannot meet clinical needs due to time-

consuming operations and low positive rates. Next-generation metagenomic sequencing can detect bacteria, viruses, fungi, parasites, rare pathogens, and even unknown pathogens. The use of metagenomic sequencing for the examination of biosubstrates is an interesting field with much still to be explored. The implementation of this technology will lead to the reduction of costs. The integration of data using multiple technological platforms will lead to a better understanding of how to leverage metagenomes.

Keywords: microorganism, metagenomic sequencing, infectious diseases, diagnosis

Резюме

Использование метода метагеномного секвенирования при исследовании клинических биосубстратов

Развитие новых технологий секвенирования облегчило характеристику таксономического и функционального разнообразия микроорганизмов. Использование метагеномного секвенирования нового поколения открывает возможности для объективного выявления всех патогенов, присутствующих в анализируемом образце. Эта молекулярная технология представляет собой новый инструмент для идентификации микробной ДНК и/или РНК в крови и других клинических биосубстратах.

Проведенное исследование представляет собой обзор литературы. Были изучены наиболее современные публикации, соответствующие поставленной цели, с использованием таких баз данных, как PubMed, Mendeley, Google Scholar и фондов национальных библиотек. Метагеномика, также известная как экологическая геномика, это изучение геномного состава образцов организмов, полученных из общей среды обитания. Инфекционные заболевания часто встречаются в клинической практике, и выявление возбудителей является ключевым звеном в их диагностике и лечении. Традиционные методы диагностики не могут удовлетворить клинические потребности из-за длительности проведения процедур и низкой частоты положительных результатов. Метагеномное секвенирование нового поколения позволяет обнаруживать бактерии, вирусы, грибы, паразитов, редкие и даже неизвестные патогены. Использование метагеномного секвенирования для исследования биосубстратов – перспективная область, требующая большого изучения. Внедрение этой технологии позволит снизить затраты. Интеграция данных с использованием различных технологических платформ позволит лучше понять, как использовать метагеномы.

Ключевые слова: микроорганизмы, метагеномное секвенирование, инфекционные заболевания, диагностика

Introducere

Comunitățile microbiene pot fi caracterizate prin diversitatea taxonomică și funcțională, care a fost studiată pe scară largă, deoarece tehnologiile de secvențiere au permis obținerea de date mai rapid și mai precis [1].

Strategiile de diagnosticare rapidă și sensibilă sunt necesare pentru îngrijirea pacientului și menținerea sănătății publice. Cele mai multe dintre testele microbiologice convenționale actuale detectează doar un grup restrâns de agenți patogeni la un moment dat sau necesită ca un microb să fie cultivat cu succes dintr-o probă. Secvențierea metagenomică de generație următoare (SmGU) are potențialul de a detecta în mod imparțial toți agenții patogeni dintr-o probă, crescând sensibilitatea de detectare și permițând descoperirea agenților infecțioși necunoscuți. S-au construit așteptări mari în jurul SmGU; totuși, această tehnică este departe de a fi disponibilă pe scară largă [2]. În mai multe publicații sunt evidențiate progresele și opțiunile disponibile în prezent în ceea ce privește costurile, timpul de realizare, sensibilitatea, specificitatea, validarea și reproductibilitatea acestei metode în calitate de instrument de diagnostic în laboratoarele de microbiologie clinică. SmGU are potențialul de a revoluționa microbiologia clinică. Cu toate acestea, rolul său ca instrument de diagnostic nu a fost încă stabilit, ceea ce este crucial pentru implementarea cu succes a acestei tehnici.

Deși tehnicile tradiționale de diagnosticare a infecțiilor sunt mature și au un preț favorabil, majoritatea necesită timp și au o pozitivitate scăzută. Metoda de secvențiere metagenomică este utilizată pentru confirmarea diagnosticului clinic în mai multe patologii și a arătat rate pozitive semnificativ mai mari în probele din substraturi diferite, inclusiv sânge, lichid de lavaj bronhoalveolar și lichid cefalorahidian, precum și în determinarea diferiților agenți patogeni [3].

Testarea metagenomică a deschis o nouă fereastră și pentru examinarea viromului sângelui. Compus din virusuri bine-cunoscute, cum ar fi virusul imunodeficienței umane, virusul hepatitei C și virusul hepatitei B, viromul include și multe alte virusuri eucariote și fagi, a căror semnificație medicală, ciclul de viață, epidemiologie și impact asupra sănătății umane sunt mai puțin cunoscute și, prin urmare, considerate a fi comensali [4].

SmGU a fost studiată pe scară largă, deoarece identificarea și tiparea tuturor agenților patogeni nu se bazează pe cultură și regăsirea întregului ADN fără părtinire. Pe baza acestui context, cercetătorii în domeniu au detectat diferența dintre SmGU și metoda tradițională de cultură ca să exploreze relația

dintre rezultatele acestei metode noi și severitatea bolii, prognosticul pacienților infecțioși. SmGU a apărut ca o modalitate de diagnosticare atractivă, care permite detectarea unei game largi de patogeni, eșantionarea neinvazivă și diagnosticarea mai timpurie [5-7].

Scopul acestui articol este caracteristica publicațiilor științifice privind utilizarea metodei de secvențiere metagenomică pentru examinarea diferitor biosubstraturi clinice.

Material și metode

Alegerea surselor bibliografice privind utilizarea metodei de secvențiere metagenomică în condiții clinice a fost efectuată prin accesarea mai multor baze de date cum ar fi PubMed, Mendeley Google Academic și fondurile bibliotecilor naționale, cu analiza și alegerea publicațiilor care cel mai bine au corespuns scopului. Materialele analizate includ publicații științifice din anii 2019–2025. Ca îndrumare pentru evaluarea articolelor au fost folosite ghidurile PRISMA [*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) Guidelines, Accesibil la http://prisma-statement.org/documents/PRISMA_2020_checklist.pdf*]. La prima etapă au fost selectate 240 de surse bibliografice, din care prin studiere detaliată au fost selectate 45 de surse pentru analiză.

Rezultate

Metagenomica este studiul conținutului genomic al unui eșantion de organisme obținute dintr-un habitat comun. Metagenomica și alte discipline „omice” au captat atenția cercetătorilor timp de câteva decenii. Prin eșantionarea secvențelor de genomii microbieni într-un anumit mediu, metagenomica permite studiul capacității metabolice funcționale a unei comunități, precum și structura acesteia bazată pe distribuția și bogăția speciilor. Numărul în creștere exponențială de publicații despre microbiom ilustrează importanța tehnicilor de secvențiere care au permis extinderea cercetării microbiene în diverse domenii, inclusiv intestinul uman, antibiotice, enzime și multe altele [8].

Depistarea patogenului este veriga-cheie în diagnosticul și tratamentul bolilor infecțioase; cu toate acestea, metodele convenționale nu pot satisface nevoile clinice din cauza operațiunii care necesită timp și a ratei pozitive scăzute. Ca o nouă metodă de detectare a agenților patogeni, secvențierea metagenomică de generație următoare are o gamă largă de detectare și poate depista bacterii, virusuri, ciuperci, paraziți, agenți patogeni rari și chiar agenți patogeni necunoscuți. Tehnica de SmGU este imparțială și poate obține rapid, eficient și precis

toate informațiile despre acidul nucleic din probele de testare, poate analiza agenții patogeni și poate ghida diagnosticul și tratamentul clinic [9, 10]. Costul în continuă scădere al secvențierii și potențialele aplicații în creștere ale metagenomicii au condus la o creștere fără precedent a generării de date. Un alt aspect-cheie al acestor metode este interpretabilitatea lor. Aceste metode agregă date contextualizate și deschid calea pentru o îngrijire îmbunătățită a pacientului. În plus, metagenomica virală a revoluționat înțelegerea noastră pentru identificarea virusurilor necunoscute sau slab caracterizate [11-13].

SmGU s-a dovedit promițătoare în diagnosticul bolilor infecțioase la adulți, în timp ce eficacitatea sa în infecțiile pediatrice rămâne incertă. SmGU este valoroasă pentru detectarea patogenilor, diagnosticarea și managementul clinic al infecțiilor în rândul pacienților pediatrici, ceea ce poate ghida managementul clinic [14].

Întârzierile în terapia antimicrobiană eficientă au dus la scăderea ratelor de supraviețuire în rândul pacienților cu sepsis. Cu toate acestea, metodele actuale de diagnosticare bazate pe culturi au o sensibilitate scăzută din cauza expunerii concomitente la antibiotice și a organismelor cauzale exigente și atipice [15].

SmGU a fost folosită cu succes la cercetarea microbiomului intestinal care este implicat într-o varietate de stări fiziologice, dar controversa privind cauzalitatea rămâne nerezolvată. Au fost efectuate analize bidirecționale de randomizare mendeliană pe 3432 de indivizi chinezi cu date de genom întreg, metagenom întreg, antropometrice și trăsături metabolice ale sângelui. Au fost identificate 58 de relații cauzale între microbiomul intestinal și metaboliții din sânge și replicate 43 dintre ele. Acest studiu ilustrează valoarea informațiilor genetice umane pentru a ajuta la prioritizarea caracteristicilor microbiene intestinale în studii multilaterale, inclusiv cele clinice [16].

A fost studiat un aspect relevant privind longevitatea care are o puternică componentă familială și genetică. Caracteristicile dinamice ale microbiomului intestinal în timpul îmbătrânirii asociate cu longevitatea, funcția neuronală și imunitară au rămas necunoscute. Au fost dezvoltate studii pentru a obține în continuare informații despre stabilirea homeostaziei microbiomului care poate aduce beneficii longevității umane [17].

În activitatea clinică o mare parte din patologii este legată de infecțiile sangvine. A fost demonstrat că, în comparație cu sângele, plasma este mai potrivită pentru detectarea infecțiilor din fluxul sangvin folosind SmGU și este mai puțin afectată de ADN-ul gazdei. Proporția de ADN al gazdei a fost de 99,9%,

cu doar trei bacterii și nici o ciupercă detectată. La utilizarea plasmei, respectiv 97%, cu 84 de bacterii și două ciuperci detectate. Sensibilitatea testului și specificitatea detectării au fost de 79 și 91% pentru bacterii și de 91 și 89% pentru ciuperci, prin secvențierea Illumina; 75 și 81% pentru bacterii și, respectiv, 91 și 100% pentru ciuperci, prin secvențierea nanoporilor. Studiul a constatat că SmGU a avut o sensibilitate mai mare decât metoda tradițională [18-20].

A fost demonstrată importanța componentei microbiene în caracterizarea sepsisului, care poate oferi noi perspective biologice asupra etiologiei sepsisului și, în cele din urmă, sprijină dezvoltarea instrumentelor de diagnostic clinic sau chiar și prognosticul [21]. Au fost analizate retrospectiv datele clinice a 63 de pacienți în stare critică, care nu au putut fi diagnosticați cu hemocultură și care au fost supuși testării prin SmGU [22].

Prin examinarea comparativă a plasmei și celulelor sangvine pentru confirmarea prezenței a șapte microorganisme la 253 de pacienți septici, s-a stabilit că sensibilitatea SmGU cu sânge integral în diagnosticarea infecțiilor fluxului sangvin a fost de 85,21%, comparativ cu 36,09% în cazul metodei bacteriologice, $P < 0,0001$ [23].

Performanța SmGU a fost evaluată și comparată cu cea a testării culturii convenționale la pacienții cu sepsis. Probe prospective de sânge la 50 de pacienți cu sepsis au fost testate folosind culturi de microorganisme (bacteriene, fungice și virale) și SmGU de ADN microbial, care a avut rate de detecție mai mari decât cultura de sânge (88,0% față de 26,0%, $P < 0,001$) de 76,0% ($P = 0,054$). Dintre probele de sânge, comparativ cu culturi microbiene, SmGU a detectat semnificativ mai multe bacterii ($P < 0,001$), ciuperci ($P = 0,012$) și virusuri ($P < 0,001$). Această investigație oferă o metodă de diagnosticare sensibilă pentru pacienții cu sepsis și pentru detectarea infecțiilor multipatogene [25].

La 124 de pacienți cu sepsis sever au fost comparate datele SmGU și hemoculturii de rutină. Vârsta ($OR=1,016$), sexul (femei) ($OR=5,963$), datele privind mioglobina ($OR=1,005$) și rezultatul pozitiv virusologic ($OR=8,531$) au fost factori de risc independenți ai mortalității prin sepsis. Se poate de constatat că metoda de secvențiere metagenomică are avantajele unei rate pozitive rapide și ridicate în detectarea agenților patogeni la pacienții cu sepsis sever [26].

La examinarea a 194 de pacienți cu sepsis, rata pozitivă la SmGU pentru identificarea agenților patogeni a fost semnificativ mai mare decât cea a hemoculturii (77,7% vs. 47,9%), iar perioada de detecție a fost mai scurtă ($1,41 \pm 1,01$ zile vs. $4,82 \pm 1,01$ zile), cu o diferență semnificativă sub aspect statistic ($p < 0,05$). Hemocultura de rutină combinată cu metoda

de secvențiere poate reduce semnificativ mortalitatea pacienților septici, poate scurta timpul total de spitalizare a acestor pacienți [27]. La evaluarea valorii diagnostice a SmGU a sângelui în detectarea agenților patogeni de la pacienții diagnosticați clinic ca osteomielite hematogenă acută s-a stabilit că sensibilitatea acestei metode (77,3%) a fost mai mare decât a hemoculturii (42,4%) ($P < 0,001$), în timp ce durata de răspuns ($2,1 \pm 0,4$ zile) a fost mult mai mică în comparație cu hemocultura ($6,0 \pm 0,4$ zile), ($P < 0,001$). În plus, sensibilitatea testului de hemocultură (77,3%) a fost ușor mai mică decât cea a secvențierii (89,4%) [28].

SmGU s-a dovedit promițătoare în diagnosticul bolilor infecțioase nu numai la adulți, ci și la copii. Analiza retrospectivă a 1493 de probe de SmGU de la copii și adolescenți cu infecții generalizate (de sânge), sistemul nervos central și tractul respirator inferior a arătat concordanța procentuală pozitivă și acordul procentual negativ la compararea cu testele microbiologice convenționale pe baza diagnosticului clinic. Metoda de SmUG este valoroasă pentru detectarea patogenilor, diagnosticarea și managementul clinic al infecțiilor în rândul pacienților pediatrici și poate ghida managementul clinic [29].

La analiza valorii de aplicare a secvențierii metagenomice de generație următoare a sângelui la pacienții cu boli ale țesutului conjunctiv pentru a oferi o referință privind diagnosticul infecției și recomandări pentru tratamentul a 126 de pacienți, s-a demonstrat că această metodă are valoare de aplicare incrementală la pacienții suspecți de coinfecție, are o sensibilitate ridicată și o gamă largă de detecție pentru microorganisme [30].

La 162 de pacienți cu infecțiile fluxului sangvin s-a relevat că, în comparație cu hemocultura, SmGU a detectat un număr mai mare de agenți patogeni, în special pentru *Aspergillus spp.*, și o rată pozitivă semnificativ mai mare. Cu diagnosticul clinic final ca standard, sensibilitatea metodei a fost de 58,06%, semnificativ mai mare decât cea a hemoculturii (34,68%, $P < 0,001$) [31].

Analiza datelor clinice a 63 de pacienți în stare critică privind detectarea agenților patogeni din sânge prin metoda SmGU a arătat că metoda are o aplicabilitate bună pentru pacienți care nu au fost diagnosticați în stadiile incipiente ale infecției, iar SmGU trebuie efectuat cât mai devreme, pentru a obține rate mai mari de detecție a patogenilor [32].

La evaluarea performanței clinice a SmGU a ADN-ului fără celule plasmatică pentru detectarea agenților patogeni la 43 de perechi de probe de sânge și plasmă de la pacienții cu sepsis, folosind sânge ca probă de testare SmGU proporția de ADN-gazdă a fost de 99,9%, cu doar trei bacterii și nicio ciupercă

detectată. La utilizarea plasmei, proporția de ADN-gazdă a fost de aproximativ 97%, cu 84 de bacterii și două ciuperci detectate. Așadar, comparativ cu sângele, plasma este mai potrivită pentru detectarea infecțiilor din fluxul sangvin [33].

Comparația rezultatelor metodei de secvențiere metagenomică și metodei bacteriologice a stabilit că dintre cele 739 de probe pozitive, 532 au fost detectate ca infecții mixte. Comparativ cu culturile de patogeni, valoarea predictivă negativă a metodei metagenomice pentru detectarea bacteriilor și ciupercilor a fost de 98,9% [IC 95%, 96,9%-100%], cu o rată de acuratețe de 89,39%. În comparație cu reacția polimerazică, ratele de consistență ale SmGU pentru identificarea virusurilor au fost semnificativ ridicate. Această metodă are avantaje evidente în detectarea bacteriilor sau ciupercilor greu cultivabile, a virusurilor și a infecțiilor mixte [34, 35].

Progresele recente în testarea metagenomică au deschis o nouă fereastră în viromul sângelui mamifer. Au fost dezvăluite diferențe în compoziția virală în rândul donatorilor de sânge din două regiuni braziliene diferite și a fost demonstrată prezența unor virusuri emergente în probele obținute din Amazon. Sunt necesare studii suplimentare pentru a confirma această ipoteză [36,37].

La examinarea metodelor și asigurării calității SmGU pentru a detecta ADN microbial din probele de sânge din diferite laboratoare au fost stabilite diferențe semnificative. Pentru a asigura rezultate de testare în timp util și precise, fiecare laborator trebuie să optimizeze în mod activ procedurile de testare SmGU, să îmbunătățească măsurile de asigurare a calității și să efectueze validarea performanței înainte ca această metodă să fie utilizată pe scară largă [38].

Siguranța transfuziei de sânge este un element esențial al sănătății publice. La examinarea viromului de sânge la pacienții expuși frecvent la transfuzii utilizând secvențierea metagenomică Illumina și viromul acestor pacienți a fost comparat cu virusuri prezente la donatorii de sânge sănătoși. Un număr total de 155 cazuri de beta-talasemie, 149 de hemodializă și 100 de donatori au fost incluși în studiu. La examinarea donatorilor este utilă metoda de secvențiere metagenomică [39, 40].

Pe măsură ce tehnologia de secvențiere trece de la cercetare la setarea clinică, datorită maturității tehnologice și reducerii costurilor, ea este din ce în ce mai utilizată, ceea ce subliniază nevoia tot mai mare de teste de secvențiere mai rentabile și accesibile universal pentru a îmbunătăți îngrijirea pacientului și sănătatea publică. Dezvoltarea continuă a acestei metode are potențialul de a rafina acuratețea diagnosticului și eficacitatea tratamentului [41].

Odată cu apariția tehnologiei de SmUG, a fost produs un număr mare de date metagenomice despre microbii necultivabili, pe lângă microbii cultivabili. Pentru a reconstrui genomurile microbiene, au fost dezvoltati mai mulți algoritmi de asamblare prin încorporarea caracteristicilor metagenomice. A fost elaborat un sistem complet de analiză metagenomică ce permite efectuarea secvențierii și analizei unui metagenom de dimensiune medie în mai puțin de o zi, făcând posibilă obținerea de profiluri taxonomice și funcționale rapid și eficient [42, 43].

Concluzie

În final se poate constata că, în opinia experților, a existat o creștere exponențială a sistemelor de diagnosticare utilizate direct pe sânge și alte probe pentru a accelera identificarea microbiană și testarea sensibilității antimicrobiene a agenților patogeni. Puține studii au evaluat până acum impactul lor clinic; rezultatele finale vor depinde și de factori pre-analitici, și de factori post-analitici. În plus, multe dintre mecanismele de rezistență nu pot fi încă detectate cu tehnici moleculare, ceea ce afectează predicția fenotipului real de rezistență. Așadar, acesta este un domeniu interesant de explorat. Implementarea tehnologiei de secvențiere metagenomică va genera scăderea costurilor. Integrarea datelor folosind mai multe platforme tehnologice va duce la o mai bună înțelegere a modului de valorificare a metagenomilor. Ulterior, va fi posibil nu numai să caracterizăm microbioame complexe, ci și să manipulăm comunitățile pentru a obține rezultate promițătoare pentru sănătate, agricultură și sustenabilitatea mediului, precum și abordările-cheie pentru a depăși astfel de probleme [44, 45].

Declarație de finanțare

Articolul a fost realizat în cadrul subprogramului de cercetare Supravegherea rezistenței la antimicrobiene prin utilizarea tehnologiei de secvențiere metagenomică, codul 130.103, din cadrul Programului instituțional de cercetare al Agenției Naționale pentru Sănătate Publică.

Bibliografie

1. GARFIAS-GALLEGOS, D., ZIRIÓN-MARTÍNEZ, C., BUSTOS-DÍAZ, ED., et al. Metagenomics Bioinformatic Pipeline. In: *Methods Mol Biol.* 2022;2512:153-179. doi: 10.1007/978-1-0716-2429-6_10. PMID: 35818005.
2. SCHUELE, L., CASSIDY, H., PEKER, N, et al. Future potential of metagenomics in microbiology laboratories. In: *Expert Rev Mol Diagn.* 2021 Dec;21(12):1273-1285. doi: 10.1080/14737159.2021.2001329. PMID: 34755585.
3. REN, D., REN, C., YAO, R., et al. The microbiological diagnostic performance of metagenomic next-generation sequencing in patients with sepsis. In: *BMC Infect Dis.*

- 2021 Dec 16;21(1):1257. doi: 10.1186/s12879-021-06934-7. PMID: 34915851.
4. KANDATHIL, AJ., THOMAS, DL. The Blood Virome: A new frontier in biomedical science. In: *Biomed Pharmacother.* 2024 Jun;175:116608. doi: 10.1016/j.biopha.2024.116608. Epub 2024 May 3. PMID: 38703502.
5. HOGAN, CA., YANG, S., GARNER, OB., et al. Clinical Impact of Metagenomic Next-Generation Sequencing of Plasma Cell-Free DNA for the Diagnosis of Infectious Diseases: A Multicenter Retrospective Cohort Study. In: *Clin Infect Dis.* 2021 Jan 27;72(2):239-245. doi: 10.1093/cid/ciaa035. PMID: 31942944.
6. DUAN, H., LI, X., MEI, A. et al. The diagnostic value of metagenomic next-generation sequencing in infectious diseases. In: *BMC Infect Dis.* 2021 Jan 13;21(1):62. doi: 10.1186/s12879-020-05746-5. PMID: 33435894.
7. EDWARD, P., HANDEL, AS. Metagenomic Next-Generation Sequencing for Infectious Disease Diagnosis: A Review of the Literature With a Focus on Pediatrics. In: *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2021 Dec 24;10(Supplement_4):S71-S77. doi: 10.1093/jpids/piab104. PMID: 34951466.
8. BENZ, S., MITRA, S. From Genomics to Metagenomics in the Era of Recent Sequencing Technologies. In: *Methods Mol Biol.* 2023;2649:1-20. doi: 10.1007/978-1-0716-3072-3_1. PMID: 37258855.
9. HAN, SY. Clinical value of metagenomic next-generation sequencing in complicated infectious diseases. In: *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* 2022 Feb 15;24(2):210-215. English, Chinese. doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2110064. PMID: 35209988.
10. ZHOU, JJ., DING, WC., LIU, YC. et al. Diagnostic Value of Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pulmonary Infection in Intensive Care Unit and Non-Intensive Care Unit Patients. In: *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Aug 15;12:929856. doi: 10.3389/fcimb.2022.929856. PMID: 36046746.
11. ROY, G., PRIFTI, E., BELDA, E. et al. Deep learning methods in metagenomics: a review. In: *Microb Genom.* 2024 Apr;10(4):001231. doi: 10.1099/mgen.0.001231. PMID: 38630611.
12. CORANDER, J., HANAGE, WP., PENSAR, J. Causal discovery for the microbiome. In: *Lancet Microbe.* 2022 Nov;3(11):e881-e887. doi: 10.1016/S2666-5247(22)00186-0. Epub 2022 Sep 21. PMID: 36152674.
13. SLAVOV, SN. Viral Metagenomics for Identification of Emerging Viruses in Transfusion Medicine. In: *Viruses.* 2022 Nov 4;14(11):2448. doi: 10.3390/v14112448. PMID: 36366546.
14. DUAN, H., LI, X., MEI, A. et al. The diagnostic value of metagenomic next-generation sequencing in infectious diseases. In: *BMC Infect Dis.* 2021 Jan 13;21(1):62. doi: 10.1186/s12879-020-05746-5. PMID: 33435894.
15. MENG, LN., LI, G., YUAN, HX. et al. Utility of metagenomics next-generation sequencing in the diagnosis and treatment of severe infectious diseases in the intensive care unit. In: *Technol Health Care.* 2023;31(5):1887-1899. doi: 10.3233/THC-220856. PMID: 37302051.
16. LIU, X., TONG, X., ZOU, Y. et al. Mendelian randomization analyses support causal relationships between blood metabolites and the gut microbiome. In: *Nat Genet.* 2022 Jan;54(1):52-61. doi: 10.1038/s41588-021-00968-y. Epub 2022 Jan 3. PMID: 34980918.

17. WANG, J., QIE, J., ZHU, D. et al. The landscape in the gut microbiome of long-lived families reveals new insights on longevity and aging - relevant neural and immune function. In: *Gut Microbes*. 2022 Jan-Dec;14(1):2107288. doi: 10.1080/19490976.2022.2107288. PMID: 35939616.
18. YU, J., ZHANG, L., GAO, D. et al. Comparison of metagenomic next-generation sequencing and blood culture for diagnosis of bloodstream infections. In: *Front Cell Infect Microbiol*. 2024 Jan 24;14:1338861. doi: 10.3389/fcimb.2024.1338861. PMID: 38328669.
19. GU, W., DENG, X., LEE, M. et al. Rapid pathogen detection by metagenomic next-generation sequencing of infected body fluids. In: *Nat Med*. 2021 Jan;27(1):115-124. doi: 10.1038/s41591-020-1105-z. Epub 2020 Nov 9. PMID: 33169017.
20. TSANG, HF., YU, ACS., JIN, N. et al. The clinical application of metagenomic next-generation sequencing for detecting pathogens in bronchoalveolar lavage fluid: case reports and literature review. In: *Expert Rev Mol Diagn*. 2022 May;22(5):575-582. doi: 10.1080/14737159.2022.2071607. Epub 2022 May 2. PMID: 35473493.
21. TAN, CCS., ACMAN., M., van DORP, L. et al. Metagenomic evidence for a polymicrobial signature of sepsis. In: *Microb Genom*. 2021 Sep;7(9):000642. doi: 10.1099/mgen.0.000642. PMID: 34477543.
22. GENG, S., MEI, Q., ZHU, C. et al. Metagenomic next-generation sequencing technology for detection of pathogens in blood of critically ill patients. In: *Int J Infect Dis*. 2021 Feb;103:81-87. doi: 10.1016/j.ijid.2020.11.166. Epub 2020 Nov 20. PMID: 33227513.
23. WU, C., YU, X., GAI, W. et al. Diagnostic value of plasma and blood cells metagenomic next-generation sequencing in patients with sepsis. In: *Biochem Biophys Res Commun*. 2023 Nov 26;683:149079. doi: 10.1016/j.bbrc.2023.10.011. Epub 2023 Oct 11. PMID: 37871447.
24. CHIEN, JY., YU, CJ., HSUEH, PR. Utility of Metagenomic Next-Generation Sequencing for Etiological Diagnosis of Patients with Sepsis in Intensive Care Units. In: *Microbiol Spectr*. 2022 Aug 31;10(4):e0074622. doi: 10.1128/spectrum.00746-22. Epub 2022 Jul 21. PMID: 35861525.
25. YU, J., ZHANG, L., GAO, D. et al. Comparison of metagenomic next-generation sequencing and blood culture for diagnosis of bloodstream infections. In: *Front Cell Infect Microbiol*. 2024 Jan 24;14:1338861. doi: 10.3389/fcimb.2024.1338861. PMID: 38328669.
26. 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. In: *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Jul 13;12:905132. doi: 10.3389/fcimb.2022.905132. PMID: 35909965.
27. QIN, C., ZHANG, S., ZHAO, Y. et al. Diagnostic value of metagenomic next-generation sequencing in sepsis and bloodstream infection. In: *Front Cell Infect Microbiol*. 2023 Feb 10;13:1117987. doi: 10.3389/fcimb.2023.1117987. PMID: 36844396.
28. ZHANG, B., CHEN, X., YAO, X. et al. The diagnostic value of blood metagenomic next-generation sequencing in patients with acute hematogenous osteomyelitis. In: *Front Cell Infect Microbiol*. 2023 Jan 27;13:1106097. doi: 10.3389/fcimb.2023.1106097. PMID: 36779189.
29. ZHU, Y., GAN, M., GE, M. et al. Diagnostic Performance and Clinical Impact of Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pediatric Infectious Diseases. In: *J Clin Microbiol*. 2023 Jun 20;61(6):e0011523. doi: 10.1128/jcm.00115-23. Epub 2023 Jun 1. Erratum in: *J Clin Microbiol*. 2023 Nov 21;61(11):e0115023. doi: 10.1128/jcm.01150-23. PMID: 37260394.
30. SU, R., YAN, H., LI, N. et al. Application value of blood metagenomic next-generation sequencing in patients with connective tissue diseases. In: *Front Immunol*. 2022 Aug 1;13:939057. doi: 10.3389/fimmu.2022.939057. PMID: 35979346.
31. LIU, Q., LIU, X., HU, B. et al. Diagnostic performance and clinical impact of blood metagenomic next-generation sequencing in ICU patients suspected monomicrobial and polymicrobial bloodstream infections. In: *Front Cell Infect Microbiol*. 2023 Jun 26;13:1192931. doi: 10.3389/fcimb.2023.1192931. PMID: 37434786.
32. GENG, S., MEI, Q., ZHU, C. et al. Metagenomic next-generation sequencing technology for detection of pathogens in blood of critically ill patients. In: *Int J Infect Dis*. 2021 Feb;103:81-87. doi: 10.1016/j.ijid.2020.11.166. Epub 2020 Nov 20. PMID: 33227513.
33. YU, J., ZHANG, L., GAO, D. et al. Comparison of metagenomic next-generation sequencing and blood culture for diagnosis of bloodstream infections. In: *Front Cell Infect Microbiol*. 2024 Jan 24;14:1338861. doi: 10.3389/fcimb.2024.1338861. PMID: 38328669.
34. QIAN, M., LI, C., ZHANG, M., ZHAN, Y. et al. Blood metagenomics next-generation sequencing has advantages in detecting difficult-to-cultivate pathogens, and mixed infections: results from a real-world cohort. In: *Front Cell Infect Microbiol*. 2023 Dec 21;13:1268281. doi: 10.3389/fcimb.2023.1268281. PMID: 38188631.
35. FANG, Q., XIE, J., YIN, S. et al. Analysis of blood microbiota in patients with adult-onset Still's disease and sepsis by metagenomic next-generation sequencing. In: *Br J Hosp Med (Lond)*. 2024 Jul 30;85(7):1-16. doi: 10.12968/hmed.2024.0121. Epub 2024 Jul 30. PMID: 39078906.
36. DOUALEH, M., PAYNE, M., LITTON, E. et al. Molecular Methodologies for Improved Polymicrobial Sepsis Diagnosis. In: *Int J Mol Sci*. 2022 Apr 19;23(9):4484. doi: 10.3390/ijms23094484. PMID: 35562877.
37. BEZERRA, RDS., XIMENEZ, JPB., GIOVANETTI, M. et al. Metavirome composition of Brazilian blood donors positive for the routinely tested blood-borne infections. In: *VIRUS RES*. 2022 Apr 2;311:198689. doi: 10.1016/j.virusres.2022.198689. Epub 2022 Jan 26. PMID: 35090996.
38. DIAO, ZL., ZHANG, R., LI, JM. Analysis of the methods and quality assurance of metagenomic next-generation sequencing to detect the microbial cfDNA from blood samples in China. In: *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2022 Apr 19;102(15):1114-1118. Chinese. doi: 10.3760/cma.j.cn112137-20220104-00017. PMID: 35436811.
39. XU, M., GAO, J., LI, S. et al. Metagenomic analysis and identification of emerging pathogens in blood from healthy donors. In: *Sci Rep*. 2020 Sep 25;10(1):15809. doi: 10.1038/s41598-020-72808-8. PMID: 32978450.
40. THIJSSSEN, M., KHAMISPOUR, G., MALEKI, M. et al. Characterization of the Human Blood Virome in Iranian Multiple Transfused Patients. In: *Viruses*. 2023

- Jun 23;15(7):1425. doi: 10.3390/v15071425. PMID: 37515113.
41. CHEN, Q., YI, J., LIU, Y., YANG, C. et al. Clinical diagnostic value of targeted next-generation sequencing for infectious diseases (Review). In: *Mol Med Rep*. 2024 Sep;30(3):153. doi: 10.3892/mmr.2024.13277. Epub 2024 Jul 4. PMID: 38963022.
 42. TAMAMES, J., JIMÉNEZ-LALANA, D, REDONDO, Á. et al. In situ metagenomics: A platform for rapid sequencing and analysis of metagenomes in less than one day. In: *Mol Ecol Resour*. 2024 Feb;24(2):e13909. doi: 10.1111/1755-0998.13909. Epub 2023 Dec 8. PMID: 38063370.
 43. GHAZI, AR., MÜNCH, PC., CHEN, D. et al. Strain Identification and Quantitative Analysis in Microbial Communities. In: *J Mol Biol*. 2022 Aug 15;434(15):167582. doi: 10.1016/j.jmb.2022.167582. Epub 2022 Apr 7. PMID: 35398320.
 44. BURILLO, A., BOUZA E. Faster infection diagnostics for intensive care unit (ICU) patients. In: *Expert Rev Mol Diagn*. 2022 Mar;22(3):347-360. doi: 10.1080/14737159.2022.2037422. Epub 2022 Apr 7. PMID: 35152813.
 45. NEW, FN., BRITO, IL. What Is Metagenomics Teaching Us, and What Is Missed? In: *Annu Rev Microbiol*. 2020 Sep 8;74:117-135. doi: 10.1146/annurev-micro-012520-072314. Epub 2020 Jun 30. PMID: 32603623.

Autor corespondent:

Victoria BUCOV,

dr. hab. șt. med., profesor cercetător,
Șef Laborator științific Supravegherea
rezistenței la antimicrobiene, ANSP,
tel. +37379261188,
e-mail: v.e.bucova@gmail.com