

# 宏基因二代测序技术在少见的肺部感染性疾病中的应用

阿斯木古丽·沙依浪<sup>1</sup> 吐吾尼克·吐克达尔<sup>1</sup> 玛日耶姆·阿卜杜瓦伊提<sup>1</sup> 齐曼古力·吾守尔<sup>2\*</sup>

(1:新疆医科大学第二临床医学院 乌鲁木齐 830054 2:新疆医科大学第二附属医院呼吸科 乌鲁木齐 830054)

**摘要:**肺部感染(Pulmonary infection)是临床中最常见的感染性疾病,由各种病原微生物所引起的终末气道、肺泡及肺间质的炎症。最常见的病因是感染,还可由物理、化学、免疫及药物等因素引起<sup>[1]</sup>。主要表现为发热、咳嗽、咳痰、胸闷、胸痛,重者可出现呼吸衰竭甚至死亡,是发病率和病死率均较高的一种感染性疾病。本研究中肺部感染特指病原微生物所引起的感染。肺部感染可由多种病原体引起,病原学构成复杂。由于现代医学的迅速发展,随着广谱抗菌药物、糖皮质激素、免疫抑制剂等的广泛应用,各种非典型病原体、广谱耐药病原体以及多重病原体混合感染机率越来越大,肺部感染的人群也有增高趋势。据世界卫生组织报告肺部感染是世界上引起死亡的第四大死因。其中,急性肺部感染更是5岁以下儿童病死的首要原因。据统计2019年包括肺炎和细支气管炎在内的呼吸道感染影响了4.89亿人,且各个年龄段的死亡率均较高,尤其在老年人和婴幼儿<sup>[2,3]</sup>。近年来,新冠持续大流行加重了呼吸道相关疾病的负担<sup>[4]</sup>。

**关键词:**二代测序;肺部感染;病原学

肺部感染是造成全球死亡人数最多的一类感染,病原体种类繁多,病原诊断困难。早期精准识别病原体是诊治肺部感染的关键,有利于避免滥用抗生素和开展个体化诊疗,同时在提高治愈率,降低并发症和死亡率等方面均有积极的影响。然而传统病原学检测存在操作复杂、相对费时、阳性检出率低等短板难以满足临床诊断的需要。多种病原体混合感染和多重耐药病原体的出现使得病原体的鉴定更加困难。因此,迫切需要一种灵敏度高、高效、广谱的病原体检测方法。

宏基因二代测序技术(Metagenomic next generation sequencing, mNGS)是一种不依赖于传统的微生物培养,也无需特异性扩增和提前假设,是借助测序平台无差别、无选择性地对高通量测序获得核酸序列,根据对比得到的核酸序列判断样本中包含的病原微生物的种类。跟第一代相比二代测序技术具有更高通量、灵敏度更高、无偏倚等优势<sup>[5]</sup>。样本具有多样性(血液、痰液、肺泡灌洗液、胸水、腹水、脑脊液、组织标本等)以及对几乎所有类型感染性病原体都能覆盖<sup>[6]</sup>。mNGS技术具有极大的潜在价值,尤其是在反复检测病原体阴性、经验性治疗效果不理想、相关筛查检查结果诊断依据不足的患者身上能发挥出更大的作用。本文重点综述mNGS目前在肺部感染性疾病及不同系统感染性疾病当中的研究。

## 1 肺部感染性疾病病原学诊断的现状

目前临床上诊断肺部感染的传统的病原学检测方法可分为侵入性和非侵入性。首先选择非侵入性方法<sup>[7]</sup>。非侵入性多为痰液、支气管肺泡灌洗液病原菌的分离和培养,方法包括病原学诊断方法,如涂片镜检、分离培养;免疫学诊断方法,如抗原/抗体检测;分子生物学诊断方法,如微生物核酸的PCR;有些微生物很难在培养物中生长,甚至不可培养;而有些微生物(如,分枝杆菌和霉菌)则可能需要数周才能生长。免疫诊断学方法可以迅速检出病原体,但容易产生假阳性。虽然用PCR检测提供了一种可替代传统培养的诊断方法,但这种检测方法基于假设,如果引物特异性不强会造成假阳性。所以对现有的诊断技术而言,及时准确的鉴定病原体仍然具有很大的挑战性,因此迫切需要针对广泛病原体的多重诊断技术<sup>[8]</sup>。

## 2 mNGS在肺部感染性疾病病原学检测中的应用

近几年mNGS技术在肺部感染病原微生物鉴定领域中掀起了热潮,扩展了人们对肺部感染病原的认识。mNGS理论上可以报告所有已知基因组序列的病原体,其中包括3000余种细菌、4000余种病毒、200余种真菌和140种寄生虫,从而精准指导临床用药<sup>[9]</sup>。

陆思芬等学者<sup>[10]</sup>应用mNGS技术对840例疑似肺部感染患者的肺泡灌洗液进行了下呼吸道微生物特征分析,研究结果显示微生物阳性患者有743例,按照细菌,真菌,病毒和寄生虫进行分类:细菌感染阳性比

例明显高于病毒或真菌感染;其中检出频数最多的3个细菌为:鲍曼不动杆菌比例最高,其次是肺炎链球菌,肺炎克雷伯菌。阳性比例为第二是病毒,第三位是真菌,寄生虫感染最少。说明mNGS在检测细菌方面表现出更高的性能。共有407例患者检出混合型感染,以病毒和细菌混合型感染最多,说明它在混合感染的检测方面有明显的优势,而传统检测方法对混合感染的诊断存在局限性,漏检率高。更重要的是,本研究通过mNGS检测到了一些不常见的特殊病原体,例如鹦鹉热衣原体和马尔尼菲篮状菌等。马尔尼菲篮状菌主要见于艾滋病患者和其他免疫功能受损的个体,通常表现为不明原因发热<sup>[12]</sup>。鹦鹉热衣原体肺炎经常因不典型的临床特征而被误诊。传统检测方法的局限性可能是中国人鹦鹉热报告相对较少的主要原因<sup>[11]</sup>。在此提示临床医生,在遇到不明原因的肺部感染时,不能排除这些非典型病原体,可以考虑应用mNGS进行辅助诊断。目前即使结合了基于培养和非培养的技术,在免疫功能低下的患者中严重肺部感染的病因仍无法诊断的情况仍数不胜数,对此展开的相关研究也相对少。一项<sup>[13]</sup>对141例免疫功能低下的疑似肺炎患者的感染性样本同时进行mNGS和常规微生物学检测。结果显示:最终纳入标准的有60例,其中49例通过微生物学检测确诊为肺炎,22例单一病原体感染,27例多种病原体感染,41例真菌感染,包括30例耶氏肺孢子菌和22例曲霉菌,19例细菌感染,14例病毒感染。免疫功能低下患者的病原谱与正常患者病原谱不同,微生物混合感染和真菌感染最为常见。mNGS和常规微生物学检测对细菌和病毒的诊断准确率相当,但mNGS的敏感性较常规微生物学检测高。mNGS在全面检测病原体方面具有更好的优势,尤其是当面临罕见病原体时可以提供常规检测范围以外的病原体信息。<sup>[14]</sup>一项对110例疑似肺结核患者的肺泡灌洗液标本进行了mNGS检测,并与常规肺泡灌洗液或痰标本的微生物检测比较诊断性能。结果:在110例患者中,最终临床诊断为肺结核患者48例,非肺结核患者62例。mNGS诊断肺结核的敏感度为47.92%,与培养和MTB/RIF接近,但明显高于抗酸杆菌染色。mNGS可在3天内发现一半以上的感染患者,而常规方法需要长达90天以上才能发现49.58%的感染患者。研究表明,mNGS敏感性高,周期短,与传统检测方法联合可明显提高结核分枝杆菌的检出率,尤其是对痰稀少或涂片阴性的疑似肺结核病例。这与另一项研究结果一致<sup>[15]</sup>,mNGS在肺外结核的诊断性能整体优于传统检测,如结核性脑膜炎、骨关节结核等。在美国开展的一项多中心队列研究显示<sup>[16]</sup>,研究对象为397名年龄31天至17岁的需要机械通气的呼吸衰竭危重儿童。在225名下呼吸道感染儿童中确定病原微生物,其中呼吸道合胞病毒127例,流感嗜血杆菌70例,卡他莫拉菌65例最为流行,造成了很大比例的医疗负担。另外值得注意的是mNGS在46%疑似下呼吸道感染但培养为阴性的患者中

鉴定出了假定的病原体,说明其受抗生素影响小。本研究促进了对该类感染微生物流行病学的理解,有望在高危或研究不足的群体中确定病因。

mNGS 技术已广泛引入感染性疾病诊断的临床实践,在促进临床抗感染治疗的规范化方面发挥了重要作用。尤其在病因不明、经验治疗效果不佳、免疫缺陷等患者的病原学诊断中具有更高的指导意义。尽管如此,人们也发现该技术用于微生物复杂的呼吸样本仍处于早期阶段。它的发展仍受限于高核酸背景干扰、外源微生物污染、RNA 检测困难、尚无统一的解读标准、社会经济成本高等问题<sup>[17]</sup>。

### 3 NGS 在不同系统感染中的应用

#### 3.1 中枢神经系统感染

研究表明<sup>[18]</sup>,目前约 50% 的神经系统感染仍未得到明确的病因诊断,因此尽早病原识别至关重要。mNGS 在检测细菌、病毒、寄生虫方面检测率高,但对于真菌感染的诊断效能仍需要进一步验证。脑脊液含有的病原体通常较低,通过经验性抗生素治疗等干预下敏感性会再次降低,而 mNGS 即使在抗生素干预的情况下也表现出比常规方法更高的检测效能<sup>[19]</sup>。

#### 3.2 血流感染

现阶段血培养仍然是诊断血流感染的金标准,但血培养依赖临床预判且培养周期长,而且在血液标本采集之前就开始经验性抗菌治疗会显著降低血培养的敏感性<sup>[20]</sup>。同时根据 mNGS 结果调整抗感染治疗方案来指导治疗和观察治疗反应,防止了过度治疗和减少住院时间。

#### 3.3 骨和关节感染:

针对骨和关节感染的患者,滑膜液、植入物的超声清洗液以及假体周围的组织都可以用作 mNGS 检测标本。尤其推荐培养结果阴性、经验性抗菌药物疗效不佳,清创效果差的患者使用 mNGS 检测<sup>[21]</sup>。

#### 3.4 特殊人群感染:

免疫功能低下的患者推荐 mNGS 作为实体器和造血干细胞移植的一线感染诊断工具或常规检测的补充手段<sup>[19]</sup>。极大提高了不明原因发热患者的病原诊断率,并有望用作区分感染和非感染<sup>[12]</sup>。

## 4 结语及展望

肺部感染作为感染性疾病中发病率最高的疾病,成了 mNGS 应用最广泛的领域。高通量测序是一项革命性技术,其测序深度大、覆盖面广,从理论上能够无偏倚的检测各类病原微生物。虽然已经涌现出大量诊断成功的案例,但是现阶段临床实验室常规应用 mNGS 仍存在一些挑战。目前需要不断完善的质控流程,降低总成本和强大的去人源法,相信随着技术的不断成熟,这些问题会迎刃而解,有望成为一种快速、可靠的诊断手段,达到精准抗感染治疗目的<sup>[22]</sup>。

### 参考文献:

[1]Azoulay E,et al.Diagnosis of severe respiratory infections in immunocompromised patients.[J]Intensive Care Med,2020,46:298-314.  
[2]Torres A, Cilloniz C, Niederman MS, Menéndez R, Chalmers JD, Wunderink RG, van der Poll T. Pneumonia. Nat Rev Dis Primers. 2021 Apr 8;7(1):25.  
[3]Jankauskaite L,R Oostenbrink,Childhood lower respiratory tract infection:more evidence to do less. [J]Lancet,2021,398:1383-1384.  
[4]Langford B.J,et al.Bacterial co-infection and secondary infection in patients with COVID-19:a living rapid review and meta-analysis. [J]Clin Microbiol Infect,2020,26:1622-1629.  
[5]Li N,et al.High-Throughput Metagenomics for Identification of

Pathogen in the Clinical Settings. [J]Small Methods,2021,5:1-27.

[6]李思云.宏基因组二代测序技术在诊断不明原因肺部感染中应用价值的研究,2020,南昌大学[J],43.

[7]中国研究型医院学会呼吸病学专业委员会,成人呼吸系统感染性疾病病原学诊断专家意见编写组.成人呼吸系统感染性疾病病原学诊断专家意见[J].中华结核和呼吸杂志,2020,43(9):757-764.

[8]Gu W,et al.Rapid pathogen detection by metagenomic next-generation sequencing of infected body fluids. [J]Nat Med,2021,27:115-124.

[9]胡鹏.宏基因组分析和诊断技术概述[J].中国医药报,2020:3.

[10]陆思芬等.基于宏基因组二代测序技术的 840 例疑似肺部感染患者下呼吸道微生物特征分析[J].中国呼吸与危重监护杂志,2022,21(06):403-411.

[11]Li N, Li S, Tan W, Wang H, Xu H, Wang D. Metagenomic next-generation sequencing in the family outbreak of psittacosis: the first reported family outbreak of psittacosis in China under COVID-19. Emerg Microbes Infect. 2021 Dec;10(1):1418-1428.

[12]Haidar G, Singh N. Fever of Unknown Origin. N Engl J Med. 2022 Feb 3;386(5):463-477.

[13]Peng JM, Du B, Qin HY, Wang Q, Shi Y. Metagenomic next-generation sequencing for the diagnosis of suspected pneumonia in immunocompromised patients. J Infect. 2021 Apr;82(4):22-27.

[14]Shi C,L,et al.Clinical metagenomic sequencing for diagnosis of pulmonary tuberculosis. [J]J Infect,2020,81:567-574.

[15]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. Int J Infect Dis. 2021 Feb;103:91-96.

[16]Tsitsiklis A,et al.Lower respiratory tract infections in children requiring mechanical ventilation:a multicentre prospective surveillance study incorporating airway metagenomics. [J]Lancet Microbe,2022,3:284-293.

[17]Chiu CY, Miller SA. Clinical metagenomics. Nat Rev Genet. 2019 Jun;20(6):341-355.

[18]Ramachandran PS, Wilson MR. Metagenomics for neurological infections - expanding our imagination. Nat Rev Neurol. 2020 Oct;16(10):547-556.

[19]《中华传染病杂志》编辑委员会.中国宏基因组学二代测序技术检测感染病原体的临床应用专家共识[J].中华传染病杂志,2020,38(11):681-689.

[20]Timsit JF, Ruppé E, Barbier F, Tabah A, Bassetti M. Bloodstream infections in critically ill patients: an expert statement. Intensive Care Med. 2020 Feb;46(2):266-284.

[21]Li N, Cai Q, Miao Q, Song Z, Fang Y, Hu B. High-Throughput Metagenomics for Identification of Pathogens in the Clinical Settings. Small Methods. 2021 Jan 4;5(1):2000792.

[22]Gu W, Miller S, Chiu CY. Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. Annu Rev Pathol. 2019 Jan 24;14:319-338.

通信作者:齐曼古力·吾守尔,1958年,职务:呼吸与危重症医学科名誉主任,学位:博士,研究方向:呼吸科