

病原微生物高通量测序在儿童感染性疾病诊断中的应用现状

邓佳怡, 郑改焕*

国家儿童健康与疾病临床研究中心, 儿科发育疾病研究教育部重点实验室, 儿童感染免疫重庆市重点实验室, 重庆

收稿日期: 2022年12月17日; 录用日期: 2023年1月9日; 发布日期: 2023年1月19日

摘要

感染性疾病是世界范围内儿童死亡的主要原因之一。近年来循证医学逐步发展, 病因诊断变得越来越重要。依靠传统方法已无法满足目前医学环境下诊断和治疗的需要, 宏基因组学下一代测序(mNGS)逐渐显示出其在病原体诊断方面的独特优势。本文旨在通过综述近年来国内外mNGS应用相关文献, 介绍其在感染性疾病诊断和治疗中的提示意义。

关键词

宏基因组学下一代测序, 高通量测序, 感染性疾病, 儿童

Application of High-Throughput Sequencing of Pathogenic Microorganisms in Diagnosis of Infectious Diseases in Children

Jiayi Deng, Gaihuan Zheng*

National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Chongqing Key Laboratory of Child Infection and Immunity, Chongqing

Received: Dec. 17th, 2022; accepted: Jan. 9th, 2023; published: Jan. 19th, 2023

Abstract

Infectious diseases are the leading cause of death of children worldwide. With the development of

*通讯作者。

evidence-based medicine in recent years, etiological diagnosis becomes more and more important. Relying on traditional methods has been unable to meet the needs of diagnosis and treatment in the current medical environment. Metagenomic next-generation sequencing (mNGS) has gradually shown its unique advantages in pathogen diagnosis. This article aims to introduce the significance of mNGS in the diagnosis and treatment of infectious diseases by reviewing the relevant literature on the application of mNGS at home and abroad in recent years.

Keywords

Metagenomic Next-Generation Sequencing, High-Throughput Sequencing, Infectious Diseases, Children

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

儿童患感染性疾病容易快速发展为危重症, 早诊断早治疗是影响儿童感染性疾病预后的重要因素, 明确病原是儿童感染性疾病早期治疗的关键。由于儿童感染性疾病临床表现不典型、病原学依据获取困难, 临床工作中应用传统病原体检测方法如 PCR、特异性抗原抗体检测、细菌培养等常常仍不能明确病原, 使儿童感染性疾病的病原学诊断陷入困境, 因此需要更灵敏的检测技术作为传统检测技术的补充。宏基因组高通量测序[1] (metagenomic next-generation sequencing, mNGS) 临床研究开始探索其实用性, 以及耐药基因检测、传染病爆发、各类病因不明疾病等的应用。本文主要探讨临床 mNGS 文献的最新进展, 重点是已发表的儿科数据。让临床医生更深入地了解 mNGS 的优缺点。并为需要进一步研究的领域提供方向。

2. mNGS 的发展历史

mNGS [1] 是一种用于鉴定临床标本中微生物的 DNA 和 RNA 的新型基因检测技术, 在一次测试中直接对样本中所有核酸成分进行测序, 并与数据库匹配, 从而实现无假设的检测和综合诊断, 是一项革命性的新技术。基因组测序于 1977 年首次开展, Sanger sequencing 发展为第一代测序[2], 此后, 各种测序手段飞速发展, 统称为“下一代测序”(NGS), NGS 在诊断中最常见的应用包括[3]: 1) 靶向扩增子测序, 涉及用不同方法富集特定基因区域; 2) mNGS 对标本的宿主和病原体的所有核酸进行平行测序。本文重点介绍 mNGS 在识别儿童感染性疾病标本中病原体核酸的应用。

3. 宏基因组在儿童感染性疾病中的应用

3.1. mNGS 在呼吸道感染疾病中的应用

姚仲伟[4]等人分析了 29 例诊断为重症社区获得性肺炎患儿的 BALF 的传统病原学与 mNGS 检测的诊断效能。发现细菌检出率、病原体阳性率及混合感染检出情况, mNGS 均明显高于传统检测方法。马彩霞[5]等人分析了 47 例儿童重症肺炎支原体肺炎的 BALF 病原学结果, 发现 mNGS 测得混合感染明显高于传统病原学检测。尤其对合并病毒感染的检测, 与临床 PCR 结果完全相符, 且 mNGS 能早期进行病毒分型和病毒载量分析, 这说明 mNGS 对于病原体检测快速且准确, 对于小年龄的危重症儿童来说, 早期行 mNGS 检查有助于精准诊疗, 改善预后。

血流感染是重症肺炎患者常见的并发症, 被认为是预测不良预后的独立危险因素。因此在临床工作上, 对于不便行支气管镜的重症患者可优先选择血样本。Gangfeng Yan [6]等人分析了 PICU 收治的 34 名儿童血液样本 mNGS 结果与血清炎症指标、淋巴细胞亚群的关联, 认为耶氏肺孢子虫的丰度与总白细胞计数和免疫缺陷的减少呈正相关; 与社区获得性肺炎儿童相比, 医院获得性肺炎患者的血液细菌种类丰富度显著增加, 血流细菌丰度与血清降钙素原水平呈正相关。

Henan Li [7]等人发现肺组织的 mNGS 对于检测患者肺部是否存在病原体的速度和灵敏度方面具有潜在优势, 且与组织病理学方法相比, mNGS 在真菌和结核分枝杆菌的评价中表现出最高的特异性, 然而需要对 mNGS 进行准确的数据管理和解释。Sander van Boheeme [8]等人对呼吸道样本进行回顾性验证发现 mNGS 的灵敏度和分析特异性与 PCR 相当, 在考虑非 PCR 目标病毒病原体时更高。Zheng [9]等人通过对 29 例重症肺炎患儿的临床资料进行单因素分析发现入院前是否使用抗生素不会影响 mNGS 的检测结果, 可以弥补传统培养难克服的缺陷。

3.2. mNGS 在中枢神经系统中的应用

脑膜炎及脑炎的诊断及治疗多依赖于早期明确病因[10], 因此临床工作上早期识别病原体尤为重要。在经验治疗组中, mNGS 的检出率显著高于常规方法。对于疑似中枢神经系统感染的患者, mNGS 可显著提高病因诊断率, 有效指导临床策略[11]。Guliz Erdem [12]等人使用脑脊液 mNGS 来诊断患有不明病因脑炎或脑膜脑炎患儿的感染。采用已知肠病毒性脑膜炎患者和原发性颅内高压患者的脑脊液作为对照。结果表明实验组 27 例患者在阳性对照组中, mNGS 正确识别了肠道病毒并明确基因型。在阴性对照组中未检测到病毒序列。亦有研究表明 mNGS 可能根据序列数判断病情程度及病程长短, 以及对比评估病情好转程度[13] [14]。

mNGS 可以补充传统的诊断方法, 以确定病因, 进行监测, 并预测暴发。Saha [15]等人进行了一项回顾性研究, 该研究以患儿脑脊液的 mNGS 来确定原因不明病例的病因的验证和应用研究, 发现有 3 例神经侵入性基孔肯雅病毒(CHIKV), 与此前被确认为此前毒株之间相同度大于 99%, 之后对同年出现特发性脑膜炎儿童所剩余储存的 472 个 CSF 样本进行特异性 qPCR, 发现了 17 例 CHIKV 脑膜炎, 暴露了一个未被确认的脑膜炎暴发。对于临床表现缺乏特异性的儿童结核性脑膜炎感染、脑脊液结果不典型情况下, 早期行 mNGS 检测在一定程度上可以提高诊断精确度[16] [17]。

3.3. mNGS 在传染性疾病中的应用

病原学的检测开始进入生物信息时代, mNGS 可以追溯传染源及预测传染病的暴发。尚永朋[18]等人收集了同期发热伴腹泻或皮疹的新生儿、其他新生儿、医护人员以及环境标本进行 mNGS 检测。有症状新生儿 mNGS 均检出肠道病毒, 18 例无症状新生儿检出 2 例。医务人员及环境标本未检出。提示 mNGS 能有效辅助诊断肠道病毒感染, 并且具有追溯医院聚集性肠道病毒感染病原体的潜力。提示我们工作中同病房内如果同时或先后出现入院后腹泻患儿需警惕肠道病毒院内传播, 预防院感发生。Doyle V. Ward [19]等人发现基因组和临床流行病学数据的整合可以增强感染控制监测, 以及识别交叉传播事件。更深入地了解医疗保健环境中的交叉传播事件将需要扩展当前的监测方法。Hanna Jerome [20]等人使用 mNGS 对 40 名发热 $\geq 38^{\circ}\text{C}$ 的返回旅行者的血浆样品进行测序, 并与临床诊断分析进行比较。发现登革热病毒、戊型肝炎、博拉病毒、甲型肝炎、基孔肯雅病毒感染。在目前疫情全球化时代, mNGS 有助于发热返乡旅客病毒感染的诊断, 及时了解病毒种类, 有效预防疫情播散。

mNGS 目前也常应用于儿童结核病的诊断。许愿愿[21]等人报导了 3 例结核相关检查阴性, 经 mNGS 早期诊断重症结核病病例, BALF 及静脉血 mNGS 均检出 TB, 序列数在 1~34 之间, 相较于细菌、病毒

而言, 序列数较低, 但对于 mNGS 检出的培养条件较严苛的非环境定植菌, 标本受污染可能性较小, 若临床表现符合, 应高度考虑致病菌可能。刘霞[22]等人回顾分析了 19 例明确为活动性肺结核患儿 mNGS、XPERT 结果, 发现一定程度上 mNGS 可以弥补 XPERT 假阴性的检出, 但如果推广 mNGS 为诊断结核病的常见手段, 还需克服结核分枝杆菌的特点, 提高标本检出率。Wen [23]等人通过基因数据库分析发现并验证了 4 个结核相关基因, 并可能成为有效的生物标记物, 从而方便用于国人的结核病诊断。结核相关基因的完善使得 mNGS 具有检测多个耐药位点以进行精确治疗的潜力。

对于寄生虫诊断 mNGS 有其独特优势。对于儿童患者而言, 流行病学较隐匿, 临床症状和体征缺乏特异性, 易延误诊治, 且病情进展快、较危重, 若没有及时治疗易转为重症甚至危及生命。在抗体检测阴性时, mNGS 则能发挥一定作用。罗智强[24]等人报导了 3 例儿童广州圆线虫脑膜炎病例, CSF 中 mNGS 检测到序列数为 718~5109, 占总寄生虫序列数的比值超过 99%。而寄生虫抗体检测只有 1 例检出。Du [25]等人报导了首例因反复出现肩部和胸部疼痛以及呼吸急促为临床表现, 最后通过组织 mNGS 确诊为儿童曼氏裂头蚴病的案例。mNGS 可作为抗体检测、活检的补充诊断手段。林威[26]等人报导了 3 例以发热及多系统受累为主要临床表现的患儿, 使用多种抗生素治疗无效, 且无典型焦痂体征患儿, 经 mNGS 检测后提示恙虫病东方体感染。mNGS 为不常见病原体引起的特定传染病提供了临床上准确高效的诊断, 特别是临床表现不典型, 实验室指标不能明确的情况下[27] [28]。

4. mNGS 在临床应用中的问题

mNGS 在临床上运用中也存在许多问题。第一是不同的部位标本的选取及处理方法会影响结果, 从微生物菌群丰富的样本中可检测出多种病原体。而罕见的病原体和治疗后减少的细菌种群可能被二代测序解释为背景细菌, 如何精准选取标本及处理是需要解决的技术问题。第二是对特定菌株有一定局限性, 对于细胞壁较厚的如真菌、结核分枝杆菌等, 核酸提取效率较低, 导致检出率、序列数、敏感性均偏低, 且需要临床医生根据检测出的序列数及相对丰度结合临床表现及特异性实验室结果等共同解读。第三是从样本中识别核酸序列, 只能通过现有数据库分析是否具有耐药基因, 有不能进行药敏试验的缺点。第四是目前多项回顾性研究[22] [29] [30]认为不加选择地应用 mNGS 检测的临床影响有限。而具有明确定义的深部感染的免疫功能低下的患者可能从检测中受益最多, 需要进一步的研究如更大样本量的研究、前瞻性、比较研究来评估 mNGS 测试对其有影响的所有临床场景, 提高性价比的同时规范临床应用。第五是目前国内外对于呼吸道[31]、血流感染[32]、重症感染[33]及特殊人群[34] [35] [36]感染等应用 mNGS 有相关的初步指南, 但对于泌尿道、消化道感染方面, 国内外缺乏此类文献。尿液 mNGS 对泌尿系统感染疾病及引起急性肾损伤病因诊断具有一定参考价值。目前临床相关文献较少, 也无相关专家共识, 是研究的薄弱领域。

5. 展望

mNGS 的出现使病原体检测进入基因信息化时代, 目前国内外有限的研究和病例报道证明了此项技术的潜力。随着技术成本的降低、病原体序列数据库的扩大和数据分析工具的改进, 临床微生物实验室使用 mNGS 的许多局限性正在被克服。上述多项研究均表明 mNGS 在临床症状不典型或常规检查不能明确或者怀疑混合感染, 以及患者情况危急, 需要快速全面的检测结果时, 可能会表现出更好的性价比。诊断性 mNGS 倾向于在未来十年发挥越来越重要的作用。

参考文献

- [1] Chiu, C.Y. and Miller, S.A. (2019) Clinical Metagenomics. *Nature Reviews. Genetics*, **20**, 341-355.
<https://doi.org/10.1038/s41576-019-0113-7>

- [2] Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **74**, 5463-5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- [3] Han, D., Li, Z., Li, R., et al. (2019) mNGS in Clinical Microbiology Laboratories: On the Road to Maturity. *Critical Reviews in Microbiology*, **45**, 668-685. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2019.1681933>
- [4] 姚仲伟, 李美锦, 王桃, 等. 肺泡灌洗液宏基因组测序在儿童重症社区获得性肺炎的诊断价值[J]. 实用医学杂志, 2021, 37(9): 1203-1206.
- [5] 马彩霞, 陈镜龙, 陆泳, 等. 肺泡灌洗液宏基因组测序在儿童重症肺炎支原体肺炎混合感染中的诊断价值[J]. 临床儿科杂志, 2020, 38(12): 891-895.
- [6] Yan, G.F., Liu, J., Chen, W.M., et al. (2021) Metagenomic Next-Generation Sequencing of Bloodstream Microbial Cell-Free Nucleic Acid in Children with Suspected Sepsis in Pediatric Intensive Care Unit. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **11**, Article ID: 665226. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.665226>
- [7] Li, H., Gao, H., Meng, H., et al. (2018) Detection of Pulmonary Infectious Pathogens from Lung Biopsy Tissues by Metagenomic Next-Generation Sequencing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **8**, 205. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00205>
- [8] Boheemen, S., Rijn, A., Pappas, N., et al. (2019) Retrospective Validation of a Metagenomic Sequencing Protocol for Combined Detection of RNA and DNA Viruses Using Respiratory Samples from Pediatric Patients. *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD*, **22**, 196-207. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2019.10.007>
- [9] Zheng, Y.H., Lin, W., Zhang, T.L., et al. (2022) Value of Metagenomic Next-Generation Sequencing in Children with Severe Infectious Diseases. *Chinese Journal of Contemporary Pediatrics*, **24**, 273-278.
- [10] Polage, C.R. and Cohen, S.H. (2016) State-of-the-Art Microbiologic Testing for Community-Acquired Meningitis and Encephalitis. *Journal of Clinical Microbiology*, **54**, 1197-1202. <https://doi.org/10.1128/JCM.00289-16>
- [11] Ge, M., Gan, M., Yan, K., et al. (2021) Combining Metagenomic Sequencing with Whole Exome Sequencing to Optimize Clinical Strategies in Neonates with a Suspected Central Nervous System Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **11**, Article ID: 671109. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.671109>
- [12] Erdem, G., Kapsan, I., Sharma, H., Kumar, A., et al. (2021) Cerebrospinal Fluid Analysis for Viruses by Metagenomic Next-Generation Sequencing in Pediatric Encephalitis: Not Yet Ready for Prime Time? *Journal of Clinical Microbiology*, **36**, 350-356. <https://doi.org/10.1177/0883073820972232>
- [13] Li, M.H., Li, Y.J., Hu, B., et al. (2019) Clinical Characteristics and Next Generation Sequencing of Three Cases of *Listeria monocytogenes* Meningitis with Complications. *Chinese Journal of Pediatrics*, **57**, 603-607.
- [14] 过湘云, 陈李兰, 马静波. 宏基因组二代测序确诊皮氏罗尔斯顿菌感染化脓性脑膜炎 1 例[J]. 临床神经病学杂志, 2021, 34(6): 411-411+458.
- [15] Saha, S., Ramesh, A., Kalantar, K., et al. (2019) Unbiased Metagenomic Sequencing for Pediatric Meningitis in Bangladesh Reveals Neuroinvasive Chikungunya Virus Outbreak and Other Unrealized Pathogens. *mBio*, **10**, e02877-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.02877-19>
- [16] 张芙蓉, 陈锋. 高通量测序技术诊断儿童结核性脑膜炎合并血管炎 1 例[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2021, 28(2): 234-236.
- [17] 钱乔乔, 刘婷, 孙丹, 等. 脑脊液二代测序对 5 例结核性脑膜炎患儿精准诊断价值研究[J]. 中国实用儿科杂志, 2021, 36(1): 53-56.
- [18] 尚永朋, 赵宇曦, 邓名贵, 等. 宏基因组二代测序技术辅助诊断新生儿埃可病毒 18 型聚集性感染[J]. 中国感染控制杂志, 2022, 21(4): 317-322.
- [19] Ward, D.V., Hoss, A.G., Kolde, R., et al. (2019) Integration of Genomic and Clinical Data Augments Surveillance of Healthcare-Acquired Infections. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, **40**, 649-655. <https://doi.org/10.1017/ice.2019.75>
- [20] Jerome, H., Taylor, C., Sreenu, V.B., et al. (2019) Metagenomic Next-Generation Sequencing Aids the Diagnosis of Viral Infections in Febrile Returning Travellers. *Journal of Infection*, **79**, 383-388. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2019.08.003>
- [21] 许愿愿, 王昶, 童文佳, 等. 儿童重症结核病 3 例临床特点及宏基因组二代测序结果分析[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2021, 36(15): 1187-1190.
- [22] 刘霞, 孟晨, 马静, 等. 呼吸内镜联合快速现场评价技术在儿童活动性肺结核诊断中的应用价值[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2021, 36(18): 1412-1416.
- [23] Wen, Z.L., Wu, L.W., Wang, L., et al. (2022) Comprehensive Genetic Analysis of Tuberculosis and Identification of Candidate Biomarkers. *Frontiers in Genetics*, **13**, Article ID: 832739. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.832739>

- [24] 罗智强, 廖建湘. 儿童广州管圆线虫脑膜炎 3 例临床特点及脑脊液宏基因组二代测序诊断价值分析[J]. 中国实用儿科杂志, 2022, 37(1): 59-62.
- [25] Du, B., Tao, Y., Ma, J., *et al.* (2018) Identification of Sparganosis Based on Next-Generation Sequencing. *Infection, Genetics and Evolution*, **66**, 256-261. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.10.005>
- [26] 林威, 林蓓蓓, 唐震海, 等. 宏基因组二代测序技术协助诊断 3 例无焦痂儿童恙虫病[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2022, 37(3): 210-213.
- [27] 丁锡富, 施国富, 胡爱荣, 等. 基于宏基因组二代测序的聚集性发热事件病原体鉴定[J]. 中国卫生检验杂志, 2022, 32(2): 182-185.
- [28] 赵朝慧, 朱红琼, 刘曦. 宏基因组测序在感染性疾病患者无菌部位检测病原体的价值[J]. 中国热带医学, 2021, 21(7): 658-662.
- [29] Niles, D.T., Revell, P.A., Ruderfer, D., *et al.* (2022) Clinical Impact of Plasma Metagenomic Next-Generation Sequencing in a Large Pediatric Cohort. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, **41**, 166-171. <https://doi.org/10.1097/INF.00000000000003395>
- [30] Li, Y.G., Jiao, M.F., Liu, Y., *et al.* (2022) Application of mNGS in *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Frontiers in Medicine*, **9**, Article ID: 802719. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.802719>
- [31] 徐放, 申阿东. 宏基因组测序在儿童呼吸道感染性疾病研究中的应用[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2020, 35(10): 783-786.
- [32] 编辑委员会中华传染病杂志. 中国宏基因组学第二代测序技术检测感染病原体的临床应用专家共识[本文附更正] [J]. 中华传染病杂志, 2020, 38(11): 681-689.
- [33] 宏基因组分析和诊断技术在急危重症感染应用的专家共识[J]. 中华急诊医学杂志, 2019(2): 151-155.
- [34] Brown, J.R., Bharucha, T. and Breuer, J. (2018) Encephalitis Diagnosis Using Metagenomics: Application of Next Generation Sequencing for Undiagnosed Cases. *Journal of Infection*, **76**, 225-240. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2017.12.014>
- [35] Chai, J.H., Lee, C.K., Lee, H.K., *et al.* (2018) Cost-Benefit Analysis of Introducing Next-Generation Sequencing (Metagenomic) Pathogen Testing in the Setting of Pyrexia of Unknown Origin. *PLOS ONE*, **13**, e0194648. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194648>
- [36] 中华医学会儿科学分会新生儿学组, 中华儿科杂志编辑委员会. 宏基因组二代测序技术在新生儿感染性疾病中的临床应用专家共识[J]. 中华儿科杂志, 2022, 60(6): 516-521.