

宏基因组二代测序技术在感染性疾病中的临床应用进展

赵 洪, 杨光路

内蒙古医科大学附属医院, 内蒙古 呼和浩特

收稿日期: 2022年1月17日; 录用日期: 2022年2月9日; 发布日期: 2022年2月21日

摘 要

几乎所有的感染源都含有DNA或RNA基因组, 使得测序成为一种有吸引力的病原体检测方法。宏基因组二代测序(Metagenomic next-generation sequencing, mNGS)正越来越多地应用于临床中, 能否成为下一个常规的病原体检测工具已成为了人们关注的话题。mNGS方法直接从患者的临床样本中识别病原体。本综述主要从mNGS在中枢神经系统、肺部、血液、骨关节、尿路感染中的临床应用进行阐述。

关键词

宏基因组二代测序技术, 感染性疾病, 病原体

Progress in Clinical Application of Metagenomic Next-Generation Sequencing Technology in Infectious Disease

Hong Zhao, Guanglu Yang

The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Huhhot Inner Mongolia

Received: Jan. 17th, 2022; accepted: Feb. 9th, 2022; published: Feb. 21st, 2022

Abstract

Almost all sources of infection contain DNA or RNA genomes, making sequencing an attractive method for detecting pathogens. mNGS is being used more and more in clinic, and whether it can become the next routine pathogen identification tool has become a topic of concern. The mNGS method identifies pathogens directly from patients' clinical samples. This review focuses on the

clinical application of mNGS in central nervous system, lung, blood, bone joint and urinary tract infections.

Keywords

Metagenomic Next-Generation Sequencing, Infectious Diseases, Pathogen

Copyright © 2022 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. 宏基因组二代测序技术简介

自从 1977 年第一次 Sanger 测序技术问世以来, DNA 测序技术取得了显著的进步。第二代测序技术 (Next-generation sequencing, NGS), 通常也称高通量测序技术, 改进了第一代测序技术的低通量问题[1]。2005 年 Roche 公司率先推出基于微乳液 PCR 技术的 NGS 技术, 标志着 NGS 时代的到来[2]。NGS 又称大规模并行测序或高通量测序, 是一种允许同时测序数百万个 DNA 或 RNA 序列的技术[3]。mNGS 提供了一个全面的方法, 通过该方法几乎所有潜在的病原体如病毒、细菌、真菌和寄生虫都可以在一次检测中准确识别[4]。

2. 宏基因组二代测序技术感染性疾病中的应用

自从 2014 年 mNGS 首次在脑脊液中检测出钩端螺旋体, 首次证明 mNGS 用于临床中。mNGS 目前应用范围广泛, 包括抗菌素耐药性、微生物组、人类宿主基因表达(转录组学)和肿瘤学[5]。已有大量的文献证明, mNGS 可以作为一种针对于多个系统感染的诊断工具, 例如中枢神经系统感染、呼吸道感染、血流感染、假关节感染、尿路感染和眼部感染[6]。

2.1. 在中枢神经系统感染性疾病中的应用

中枢神经系统感染(Central nervous system infection, CNSI)是指由各种致病微生物引起的脑和脊髓炎症, 包括脑膜炎、脑炎、脓肿等。传统的脑脊液(CSF)培养可以识别大约(30~40)% CNS 感染(包括脑膜炎和脑炎)。近年来, mNGS 发展迅速, 在精准医学领域得到广泛应用。mNGS 具有样本处理简单、时间短、病原体检测范围广、随访半定量值等特点[7]。在明确有 CNSI 中 mNGS 阳性检出率为 57.0%。当种特异性序列(Species-specific read number, SSRN) ≥ 2 中, mNGS 在诊断病毒性脑炎和/或脑膜炎方面的表现最佳, 阳性率为 42.6%。SSRN ≥ 1 中, mNGS 在诊断结核性脑膜炎方面的表现最佳, 阳性率为 27.3%。在 SSRN ≥ 5 或 10, 诊断性能最适合确定细菌性脑膜炎; 敏感度为 73.3%。SSRN ≥ 2 时 mNGS 在隐球菌脑膜炎和脑曲霉病诊断中的敏感性分别为 76.92%和 80% [8]。尚晶[9]等研究中发现, 脑脊液 mNGS 病原学检出率为 53.33%, 与传统细菌培养相比, 差异具有统计学意义。Miller S [4]等研究发现 mNGS 敏感度为 73%, 特异性为 99%, 差异分析后的阳性率为 81%, 阴性率为 99%。随后对前瞻性收集的 20 份阳性脑脊液样本进行 mNGS, 这些样本来自一组因脑膜炎、脑炎和脊髓炎住院的儿童患者, 与传统的脑脊液微生物实验相比, 在识别致病菌方面, mNGS 的敏感性为 92%, 特异性为 96%。Yu G [10]等的研究中 mNGS 诊断结核性脑膜炎(Tuberculous meningitis, TBM)的敏感性为从 27%到 84%不等。mNGS 的综合灵敏度为 61%, 和 I^2 价值为 92%。此外, mNGS 诊断 TBM 特异性从 96%到 100%不等。mNGS 的综合特异性为 98%, 和

I^2 价值为 74%。mNGS 对 TBM 诊断的敏感性是中等, 特异性极高。

2.2. 在肺部感染中的应用

肺部感染是最常见和最重要的感染病之一, 特别是在老年人和免疫功能低下的个体中其发病率和死亡率高[11]。未及时发现病原菌是肺部感染患者治疗失败和死亡的主要原因。目前的微生物检测, 如基于培养的方法, 在灵敏度、速度和可用检测目标病原体的范围方面都有局限性。未能识别病因可能导致抗生素治疗非特异性和无效, 而导致不良后果[12]。迫切需要诊断效率更高的肺感染病原体检测和识别方法。近年来, 无偏移的 mNGS 被广泛用于检测不同类型的病原体[11]。陈金莲[13]等学者利用 mNGS, 85% (17/20) 的严重肺炎患者的支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中检测出各种病原体, 包括 10 例细菌感染病例、5 例病毒感染病例和 2 例真菌感染病例。相比之下, 通过常规微生物检测, 在 BALF 中可以检测出 50% (10/20) 病例中的病原体。王庆[12]等学者发现 mNGS 比传统培养在检测经纤维支气管镜肺活检(transbronchial lung biopsy, TBLB)、BALF 和支气管刷针(bronchial needle brushing, BB)标本中检测细菌、真菌更为敏感。mNGS 显示出 TBLB 的最高特异性, 其次是 BB 和 BALF。mNGS 在我们的研究中对于检测真菌特别有用: 通过培养方法在 1/21 样本中发现真菌肺炎, 而 mNGS 在 19/21 样本中发现真菌肺炎。mNGS 已用于检测 CT 引导下肺组织穿刺活检中的病原体: 细菌的敏感度和特异性分别为 100.0% 和 76.5%, 真菌的敏感度和特异性分别为 57.1% 和 61.5%, 高于培养方法。

2.3. 血流感染(Bloodstream Infection, BSI)中的应用

是危重病人中常见且危及生命的并发症, 通常导致败血性休克和死亡。据报道, 脓毒症患者在可记录到低血压的前 6 小时内, 有效抗生素的使用每延迟 1 小时, 存活率平均下降 7.6%。如果在 24 小时内不给予适当的治疗, 严重脓毒症的存活率从 80% 降到 10% [14]。传统的微生物检测技术, 包括血液培养(blood culture, BC)、血清免疫学检查和基于聚合酶链反应(PCR)的检测技术, 都存在明显的缺陷。BC 通常用于真菌和细菌检测, 但其培养周期较长(3~7 天), 临床标本中的 BC 阳性比例呈下降趋势, 最低阳性率仅为 9.9%。血清免疫学检查和 PCR 技术只能检测几种特定的病原体, 需要专门的试剂盒和引物。BC 的平均反馈时间为细菌 3 天、真菌 3 至 5 天和分枝杆菌 45 天, 而 mNGS 的周转时间仅为 32 至 48 小时[15]。mNGS 在疑似 BSIs 患者的病原体检测方面显示出巨大的潜力。mNGS 对疑似 BSIs 患者的病原微生物鉴定具有较高的敏感性和特异性。在总共 45 名患者的 60 个血液样本中, 血液培养检测出 10 个阳性(16.7%), 其中 7 个为革兰阴性细菌, 1 个为革兰阳性细菌, 2 个为真菌。mNGS 共检测出 126 种病原体, mNGS 的阳性率 68.3% (不包括病毒)明显高于血液培养的 16.7% [14]。Geng S [16]等研究发现 mNGS 的优势是显而易见的: mNGS 报告了 26 例阳性样本, 阳性率为 41.3% (26/63), 而 BC 阳性率仅为 7.9% (5/63), 其中一个重要原因是, 这些患者在取样前接受了广谱抗生素的治疗。发现 mNGS 受抗生素影响较小[15]。何波等从 25 例临床疑似血流感染的患儿, 检出病原体阳性 13 例, 阳性率为 52.0%。

2.4. 在尿路感染(Urinary Tract Infection, UTI)中的应用

UTI 是由多种病原微生物引起的, 其中以大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、变形杆菌、粪肠球菌、浮生葡萄球菌常见。UTI 主要发生在育龄妇女、年老、免疫力低下及尿路异常的人群。目前, 临床上尿路感染的检测主要是尿培养, 其过程耗时长, 检出率低, 尤其是在使用过抗生素的患者中, 其诊断价值有限。一般来说, UTI 的治疗依赖于经验药物, 而不是病原体诊断, 这导致抗菌剂的不当使用和耐药菌株的显著增加。相比之下, mNGS 能够克服临床培养的缺点, 并识别病原体以供进一步治疗。Li M [17]等从一名 33 岁男病人使用传统培养、血清学测试和 mNGS 检测对血液和尿液标本进行了检查。传统培养和血

清学测试结果为阴性, 而 mNGS 检测显示尿液标本中存在潜在的病原体粪肠杆菌, 随后 Sanger 测序和 qPCR 分析进一步证实了这一点。因此, 患者接受靶向利奈唑胺治疗后恢复。李娜[18]等学者从 2018 年 9 月至 2020 年 4 月复旦大学附属中山医院收治的送检尿液宏基因组二代测序的尿路感染患者共 33 例中利用 mNGS 检测方法, 30.3% (10/33) 的患者尿标本中检出 JC 多瘤病毒, 其中 1 例合并检出 BK 多瘤病毒。所有患者在检测前均使用抗菌药物治疗, 但仅一例尿培养阳性。

2.5. 在骨关节感染中的应用

骨关节感染(osteoarticular infection, OAI)是骨或关节感染。OAI 可能难以治疗, 其复发率高, 长期致残率高, 甚至死亡率高。及时准确的微生物诊断有助于及时或精确的应用抗菌治疗或手术。传统的微生物培养是大多数医院的主要诊断方法。据报道, 因其受先前抗生素使用, 罕见的病原体和植入物表面附着的生物膜的影响, 培养阳性率是 40%~70%。此外, 培养和识别微生物总是需要 2 到 14 天甚至 6 周的时间。mNGS 通过高通量测序和自动生物信息分析, 在短时间内(1 至 6 天)从临床标本中理论上识别所有已知微生物基因组。从 92 名 OAI 患者中收集了 130 个关节液、超声液和组织样本。将 mNGS 和微生物培养物的表现进行对比。mNGS 的整体灵敏度为 88.5% (115/130), 明显高于微生物培养 69.2% (90/130, $p < 0.01$)。关节液(mNGS: 86.7%与微生物培养: 68.7%, $p < 0.01$)和超声液(mNGS: 100%与微生物培养: 66.7%, $p < 0.05$)样本的敏感度显著提高。mNGS 检测出 12 种微生物培养未发现的致病菌株。其结论: 与常规培养物相比, mNGS 是 OAI 患者样本中致病菌检测的可靠诊断工具。mNGS 技术对于诊断难以培养的病原体或检测以前用抗生素治疗的患者样本更有价值[19]。13 例患者诊断为人工关节感染(periprosthetic joint infection, PJI), mNGS 检出阳性率为 84.62%, 高于培养阳性率(76.92%), 主要检出病原体为金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、白色假丝酵母菌、人型支原体等。结论是 mNGS 可快速检测 PJI, 从病原学角度为临床早期诊断 PJI 提供依据, 是传统培养方法的重要补充, 尤其在诊断培养阴性 PJI 方面具有优势[20]。

3. 小结

mNGS 目前越来越多地应用于临床中, 是对临床感染性疾病精准诊断及抗感染治疗的一项有重要价值的检测技术且已有专家共识, 在未来 5~10 年, 尽管 mNGS 不太可能完全取代传统的病原体鉴定, 但 mNGS 仍然有着巨大的潜力, 并随着时间的推移不断改进, 为感染性疾病提供更强的诊断能力。

基金项目

《二代测序在儿童化脓性脑炎诊治中的作用研究》项目编号: 2020GG0139。

参考文献

- [1] Li, N., Cai, Q.Q., et al. (2021) High-Throughput Metagenomics for Identification of Pathogens in the Clinical Settings. *Small Methods*, **5**, Article ID: 2000792. <https://doi.org/10.1002/smt.202000792>
- [2] 胡晓熠, 王惠明. 宏基因组二代测序在感染性疾病中的应用进展[J]. 微循环学杂志, 2021, 31(2): 70-73+78.
- [3] Wang, J.H., Han, Y.L. and Feng, J. (2019) Metagenomic Next-Generation Sequencing for Mixed Pulmonary Infection Diagnosis. *BMC Pulmonary Medicine*, **19**, Article No. 252. <https://doi.org/10.1186/s12890-019-1022-4>
- [4] Miller, S., Naccache, S.N., et al. (2019) Laboratory Validation of a Clinical Metagenomic Sequencing Assay for Pathogen Detection in Cerebrospinal Fluid. *Genome Research*, **29**, 831-842. <https://doi.org/10.1101/gr.238170.118>
- [5] 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>
- [6] 孙波, 郑光辉, 等. 宏基因组技术在感染性疾病中的应用[J]. 中国临床新医学, 2021, 14(1): 19-22.

- [7] Zhang, Y., Cui, P., *et al.* (2020) Clinical Application and Evaluation of Metagenomic Next-Generation Sequencing in Suspected Adult Central Nervous System Infection. *Journal of Translational Medicine*, **18**, Article No. 199. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02360-6>
- [8] Xing, X.W., Zhang, J.T., *et al.* (2020) Metagenomic Next-Generation Sequencing for Diagnosis of Infectious Encephalitis and Meningitis: A Large, Prospective Case Series of 213 Patients. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **10**, Article No. 88. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00088>
- [9] 尚晶, 上官丽娟, 等. 宏基因组二代测序法诊断细菌性脑膜炎的应用价值[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2020, 18(15): 2545-2548.
- [10] Yu, G.C., Zhao, W.C., Shen, Y.Q., *et al.* (2020) Metagenomic Next Generation Sequencing for the Diagnosis of Tuberculosis Meningitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*, **15**, e0243161. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243161>
- [11] Qian, Y.Y., Wang, H.Y., *et al.* (2021) Improving Pulmonary Infection Diagnosis with Metagenomic Next Generation Sequencing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **10**, Article ID: 567615. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.567615>
- [12] Wang, Q., Wu, B., *et al.* (2020) Optimal Specimen Type for Accurate Diagnosis of Infectious Peripheral Pulmonary Lesions by mNGS. *BMC Pulmonary Medicine*, **20**, Article No. 268. <https://doi.org/10.1186/s12890-020-01298-1>
- [13] Chen, J.L., Zhao, Y.X., *et al.* (2021) The Clinical Significance of Simultaneous Detection of Pathogens from Bronchoalveolar Lavage Fluid and Blood Samples by Metagenomic Next-Generation Sequencing in Patients with Severe Pneumonia. *Journal of Medical Microbiology*, **70**, Article ID: 001259. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001259>
- [14] Hu, B.C., Tao, Y., *et al.* (2021) 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. *Frontiers in Microbiology*, **12**, Article ID: 641202. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.641202>
- [15] Geng, S.K., Mei, Q., *et al.* (2021) Metagenomic Next-Generation Sequencing Technology for Detection of Pathogens in Blood of Critically Ill Patients. *International Journal of Infectious Diseases*, **103**, 81-87. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.11.166>
- [16] 何波, 李渊龙, 等. 宏基因二代测序在儿童血流感染中的应用[J]. 中国热带医学, 2021, 21(5): 440-444.
- [17] Li, M.S., Yang, F.H., *et al.* (2020) Identification of *Enterococcus faecalis* in a Patient with Urinary-Tract Infection Based on Metagenomic Next-Generation Sequencing: A Case Report. *BMC Infectious Diseases*, **20**, Article No. 467.
- [18] 李娜, 缪青, 等. 宏基因二代测序技术检测多瘤病毒在尿路感染中的临床应用[J]. 中华医学杂志, 2020, 100(28): 2198-2202.
- [19] Huang, Z.D., Zhang, Z.J., *et al.* (2020) Pathogenic Detection by Metagenomic Next-Generation Sequencing in Osteoarticular Infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **10**, Article No. 471. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00471>
- [20] 蒋昊辰, 宋春风, 等. 二代测序技术在人工关节感染病原学诊断中的应用[J]. 复旦学报(医学版), 2021, 48(4): 514-519.