

宏基因组二代测序用于儿童呼吸道感染性疾病诊断的应用进展

赖丁香， 郑吉善， 潘云， 周颖， 李海波

基金项目：浙江省医药卫生科技项目(2023KY1118)；宁波市社会公益项目(2022S035)；宁波市品牌学科(PPXK2018-06)；宁波市医疗卫生高端团队(2022020405)

作者单位：315000 浙江 宁波,宁波大学医学部(赖丁香);宁波市妇女儿童医院儿科(郑吉善),出生缺陷综合防治中心(潘云,周颖,李海波)
作者简介:赖丁香(1987—),女,主治医师。研究方向:儿童呼吸系统疾病的诊治与研究
通讯作者:郑吉善,E-mail:zjs222@163.com;李海波,E-mail:lihaibo-775@163.com

【摘要】 呼吸道感染是儿童最常见的感染,严重威胁儿童生命健康,早期明确病原体对于该类疾病的临床诊治有重要意义。宏基因组二代测序(mNGS)具备无偏倚、全覆盖、高效率等优势,正被应用于临床感染性疾病诊断。本文通过一系列实例来介绍 mNGS 在儿童呼吸道感染性疾病中的应用价值。
【关键词】 呼吸道感染; 宏基因组二代测序; 应用; 儿童
doi:10.3969/j.issn.1674-3865.2023.03.004
【中图分类号】 R725.6 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1674-3865(2023)03-0199-04

Application of metagenomic next generation sequencing in the diagnosis of respiratory infectious diseases in children LAI Dingxiang, ZHENG Jishan, PAN Yun, ZHOU Ying, LI Haibo. School of Medicine, Ningbo University, Ningbo 315000, China

【Abstract】 Respiratory tract infection is the most common infection in children, which seriously threatens the life and health of children. Early identification of pathogens is of great significance for the clinical diagnosis and treatment of such diseases. Metagenomic next generation sequencing(mNGS) has the advantages of unbiasedness, full coverage and high efficiency, and is now being applied to clinical diagnosis of infectious diseases. This article introduces the application value of mNGS in children's respiratory infectious diseases through a series of examples.
【Keywords】 Respiratory infection; Metagenomic next generation sequencing; Application; Children

呼吸道感染是儿童最常见的感染。其中,急性下呼吸道感染如肺炎和细支气管炎是 5 岁以下儿童住院和院内死亡的主要原因,给家庭以及医疗卫生系统造成了沉重的负担^[1]。引起呼吸道感染的病原种类繁多,常见的有病毒、细菌、肺炎支原体、真菌等,不同病原体感染可有相似的临床表现,对于儿科医生来说,快速精确识别呼吸道病原体对临床决策至关重要。

呼吸道病原微生物常用检测方法包括分离培养、抗原抗体检测、核酸检测等,各有各的优势和缺点。培养虽作为微生物鉴定的金标准,但其存在耗时长、灵敏度低的不足,且易受抗生素使用的干扰;抗原、抗体检测快速准确,但可覆盖的病原数量有

限,且抗体检测存在窗口期;核酸检测则需要事先了解或假设病原微生物的类型^[2]。上述检测方法虽已在临床广泛应用,但在时效性、特异性、敏感性等方面存在局限,尤其在评估多种病原体感染病人时,已无法满足临床需求。宏基因组二代测序(metagenomic next generation sequencing, mNGS)作为一种新的诊断技术,被认为可以解决这些问题。其主要优点在于无需分离培养,无需经验预判,直接获取临床样本(血液、痰液、脑脊液、肺泡灌洗液等),通过生物信息分析,获得疑似致病微生物的种属信息,具有无偏倚、全覆盖、高效率的特点^[3],具有传统检测方法不可比拟的优势。

本综述从 mNGS 的发展背景、检测流程以及在儿

童呼吸道感染诊断的应用现状等几个方面进行阐述。

1 mNGS 的发展背景

宏基因组这一概念最初是在 1998 年由美国威斯康辛大学的 Jo Handelsman 等提出,即生境中所有微生物基因组的总和^[4],后来加州大学伯克利分校的研究人员 Kevin Chen 和 Lior Pachter 将其定义为“应用现代基因组学技术直接研究自然状态下的微生物的有机群落,而不需要在实验室中分离单一的菌株”的科学^[5]。由于样本量巨大,早期测序技术存在低通量、高成本的缺点,限制了宏基因组学的普遍应用。随着基因测序技术的迅猛发展,下一代测序技术的出现推动了宏基因组学的进一步研究。

下一代测序又叫高通量或大规模并行测序,可在单次运行中对数千至数十亿个单独的 DNA 片段进行测序。下一代测序技术在临床微生物学中的应用是多方面的,可以无差别地检测患者临床样本中的病原微生物的 mNGS 技术就是其中之一。2014 年新英格兰医学杂志报道了一则通过下一代测序协助临床成功诊断钩端螺旋体脑膜炎的病例,并促使患者进行敏感抗生素治疗后获得康复,首次证明了 mNGS 可为临床提供可靠的病原体信息^[6]。由此, mNGS 从基础研究转向临床实验室。2016 年,美国食品药品监督管理局发布下一代测序可用于微生物鉴定、抗菌药物耐药性及毒力分析^[7]。2018 年,高通量测序技术被写入我国成人医院获得性肺炎与呼吸机相关性肺炎诊断和治疗指南^[8]。之后几年,我国先后发布多部关于下一代测序临床应用的专家共识,为宏基因组分析和诊断技术的应用指明方向^[9-12]。

2 mNGS 的检测流程

mNGS 整个流程分为三部分:即采集有价值的标本、湿实验(实验室检测)和干实验(生物信息学分析)^[13]。其中湿实验主要包括:核酸的提取,文库的构建,及将构建好的文库放在仪器上进行自动化测序的过程。干实验是将下机的测序数据进行质控,去除宿主核酸序列,再与病原微生物数据库进行比对鉴定物种,最后出具报告的过程。在检测流程中的每个步骤均采取质量控制措施以确保结果的准确性。

3 mNGS 在呼吸道感染性疾病诊断中的应用

3.1 病原微生物的鉴定 mNGS 能够对所有潜在病原体进行无偏倚检测,近年来,越来越多的研究报道了该技术在病原诊断中的优势,但针对儿童病例的文献相对较少,现我们将对 mNGS 在儿科的应用效能进行概述。

3.1.1 病毒感染 病毒是儿童急性呼吸道感染最常见的病原体,种类繁多,易发生变异,可引起传染

病的暴发与流行。目前临床用于呼吸道病毒感染的检测方法主要以核酸扩增试验、快速抗原检测以及直接荧光抗体检测为主,其中核酸扩增试验以其高灵敏度和特异性,且不需要校准,被视为临床病毒学诊断的“参考标准”^[14]。然而,上述方法存在一定的缺陷,包括靶标数量有限可同时检测的病原数量不多、靶向病毒序列的保守区域发生突变可致敏感性下降或假阴性、仅测定包含的目标病原体,出现非典型或未知病毒逃脱检测^[13]。mNGS 不需要已知核酸序列,在检测常见病原体的同时,还能高效发现各种罕见及未知的病原体类型^[15-16]。在新型冠状病毒感染暴发初期,Zhu 等^[17]运用 mNGS 对不明原因肺炎患者的支气管肺泡灌洗液进行分析,发现一种新型 β 冠状病毒(2019-nCoV),并获得了三种新型冠状病毒的完整基因组序列,大大缩短了识别未知病原体的时间。在散发病毒感染时,同样体现了 mNGS 作为诊断工具的优越性。有报道显示,mNGS 在重症无应答肺炎患儿检测致病病原体的灵敏度显著提高,除了证实直接荧光抗体检测到的 9 例腺病毒感染外,还检测出 16 例腺病毒感染病例,此外 1 例初诊为白血病的患者被检测出巨细胞病毒感染,转为抗病毒治疗后,发热等症状迅速改善^[18]。

3.1.2 细菌感染 细菌是引起儿童呼吸道感染最常见的病原体之一。培养被认为是细菌鉴定的“金标准”,但某些病原体培养条件苛刻、体外生长缓慢、抗生素经验性使用等因素限制了培养的检出率,无法满足临床需求。研究证实,mNGS 技术在分析多种微生物感染的样本时比标准培养更为快捷、全面、准确^[19]。在对 112 例肺炎儿童的支气管肺泡灌洗液样本进行 mNGS 评估时,阳性检出率为 91.07%,而培养阳性率仅 40.18%,明显低于 mNGS($P < 0.01$),研究者将抗菌药物暴露同时纳入分析后发现,抗菌药物使用对 mNGS 的影响小于传统培养,结果有助于临床对诊疗方案的调整,改善预后并降低死亡率^[20]。与传统微生物检测的对比中,mNGS 诊断细菌感染的敏感性、准确性、阳性预测值以及阴性预测值均有明显优势,但在诊断常见细菌感染方面,例如肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、流感嗜血杆菌,与传统微生物检测没有显著差异,体现出 mNGS 更大的检测范围和检出率,可作为传统微生物检测的有力补充^[21]。在罕见菌的鉴定中,宏基因组检测同样有其独有的价值。黄美霞等^[22]首次通过支气管肺泡灌洗液宏基因测序协助确诊放线菌感染,克服了放线菌培养难、阳性率极低,需通过穿刺、手术等手段获得阳性病理标本确诊的难点,为肺放

线菌病的临床诊断提供了更为安全快速的途径。

3.1.3 肺炎支原体感染 肺炎支原体广泛存在于世界各地,每隔 3~7 年出现一次流行高峰,是儿童呼吸道感染常见的病原体之一^[23-24]。肺炎支原体的检测方法主要分病原学检测和血清学检测两大类,方法众多,各有优势,但近来有研究发现,肺炎支原体存在健康儿童呼吸道内携带现象,故尚无单一诊断方法区分其携带或感染^[25]。mNGS 作为无偏、全覆盖的检测手段,在肺炎支原体诊断中同样具有意义。Wang 等^[18]的研究中 mNGS 诊断肺炎支原体的敏感性与 PCR 相似;在另一项回顾性研究中,支气管肺泡灌洗液 mNGS 对肺炎支原体诊断的特异性和准确性均较高,但敏感性低于传统病原学检测(支气管肺泡灌洗液 PCR、血清抗体检测),但该研究中入院前肺炎支原体血清学抗体阳性患者进行了抗感染治疗,因此可能导致检出率下降^[21]。虽然 mNGS 不能作为确诊肺炎支原体感染的单一诊断方法,但不失为常规检测方案的有力补充,尤其在复杂呼吸道感染中有明显优势。

3.1.4 其他病原体感染 除上述病原体外,儿童呼吸道病原体还包括真菌、寄生虫等。真菌侵袭性感染常见于免疫功能受损时,尤其是接受免疫抑制剂、抗肿瘤药物、长期使用广谱抗生素以及留置各种导管的儿童。及时准确地确定真菌感染并鉴定种属,是侵袭性真菌病诊断和治疗的关键。Tsang 等^[26]对 319 例通过下一代测序诊断的真菌感染病例进行分析,仅不足三分之一的真菌培养结果为阳性,其中经 mNGS 诊断的耶氏疟原虫感染者中只有不到 20% 的病例在染色和显微镜检查中呈阳性,展示了 mNGS 在真菌诊断领域的巨大潜力,尤其那些培养困难的真菌以及真菌载量低的病例。近年来,有关 mNGS 诊断罕见病原体的报告逐渐增多,例如:什曼原虫^[27]、肺诺卡菌^[28]、鹦鹉热支原体^[29]、羌虫病^[30]等。杜彦强等^[28]通过 mNGS 确诊了 3 例肺诺卡菌病,仅 1 例痰培养呈阳性,确诊后给予利奈唑胺联合复方磺胺甲口恶唑抗感染治疗,最终 2 例好转出院,证实了检测结果的准确性,另 1 例死亡可能与该患儿存在肺部感染重、抗生素耐药等因素有关。

综上所述,mNGS 在单次检测中具有更广泛的病原体检测范围,与传统检测相比,在诊断新型或罕见病原体中具有独特的优势。

3.2 耐药性检测 原则上,mNGS 可通过获取致病微生物耐药基因来预测抗微生物药物耐药性,且已有研究报道展示了其在临床应用的潜力。Wang 等^[31]对免疫功能低下的重症肺炎患者进行 mNGS

分析,通过结合 MinION 和 BGISEQ-500 测序平台的优势,在培养阴性的肺组织样本中快速鉴定了肺炎克雷伯菌,并提供了 blaSHV-12,blaKPC-2,blaTEM-1,blaCTX-M-65 等抗性基因,此外还检测到了铜绿假单胞菌等其他细菌序列,结合临床后及时调整了抗感染策略,患者治疗好转后出院,mNGS 对抗生素耐药基因的分析为指导精准抗感染治疗提供了有价值的信息。另外,有研究者使用 mNGS 分析 63 份呼吸道标本,在鉴定病原体的同时,证实了耐药基因的存在与药敏试验结果一致,同时发现某些细菌的耐药基因型与某些特定抗菌药物间存在密切相关性,为我们提供了一种推断抗菌药物敏感性的新方法^[32]。尽管 mNGS 检测耐药基因的发展前景美好,但目前依旧属于探索研究阶段,仍有很多障碍需要克服。例如:大多数 mNGS 诊断平台存在读长偏短,难以获取耐药基因的全长序列信息;mNGS 无偏倚、全覆盖的特点,结果易受标本质量、背景基因组等影响,无法准确定位耐药基因的来源^[33]。

4 小结

mNGS 可在单次检测中对临床样本中所有遗传物质进行测序,可作为病原体鉴定的重要工具,尤其在急危重呼吸道感染时,能快速获得疑似感染微生物的基因信息,检出罕见的、新发的和混合感染的病原体,协助指导抗微生物药物的选择。但是,在实际应用中仍存在一定的局限性。首先,mNGS 尚缺乏统一的检测标准,不同的实验室和检测平台可导致检测结果的不确定^[34-35]。其次,采样标本的高背景导致检测敏感性降低,主要受人类宿主背景序列或者采样标本中的微生物菌群影响,尤其是低载量病原体^[3]。第三,如何区分 mNGS 所提供的微生物属于定植还是感染,对于报道的解读需要检测人员、临床医生等共同参与。最后,mNGS 复杂的检测程序和高昂的检测成本尚无法在临床普及。

总之,mNGS 在感染性疾病的应用价值获得了更多研究者以及临床医生的肯定,随着技术平台的完善和临床研究的增加,mNGS 将在临床实践中发挥更加重要的作用。

参考文献

- [1] Liu L, Oza S, Hogan D, et al. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals[J]. Lancet, 2016, 388(10063): 3027-3035.
- [2] 曹清,唐铭钰,杜白露. 儿童呼吸道病原检测应用进展及相关研究[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2019, 34(10): 721-725.
- [3] Chiu CY, Miller SA. Clinical metagenomics[J]. Nat Rev Gen-

et al. 2019, 20(6): 341-355.

[4] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes; a new frontier for natural products[J]. Chem Biol, 1998, 5(10): R245-249.

[5] Sharon I, Banfield JF. Microbiology. Genomes from metagenomics[J]. Science, 2013, 342(6162): 1057-1058.

[6] Wilson MR, Naccache SN, Samayoa E, et al. Actionable diagnosis of neuroleptospirosis by next-generation sequencing[J]. N Engl J Med, 2014, 370(25): 2408-2417.

[7] U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Devices and Radiological Health, Office of In Vitro Diagnostics and Radiological Health, Division of Microbiology Devices. Infectious Disease Next Generation Sequencing Based Diagnostic Devices; Microbial Identification and Detection of Antimicrobial Resistance and Virulence Markers [EB/OL]. (2016-05-13). <https://www.regulations.gov/document/FDA-2016-D-0971-0002>.

[8] 中华医学会呼吸病学分会感染学组. 中国成人医院获得性肺炎与呼吸机相关性肺炎诊断和治疗指南(2018 年版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2018, 41(4): 255-280.

[9] 宏基因组分析和诊断技术在急危重症感染应用专家共识组. 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, 28(2): 151-155.

[10] 《中华传染病杂志》编辑委员会. 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[J]. 中华传染病杂志, 2020, 38(11): 681-689.

[11] 中华医学会检验医学分会临床微生物学组, 中华医学会微生物学与免疫学分会临床微生物学组, 中国医疗保健国际交流促进会临床微生物与感染分会. 宏基因组高通量测序技术应用于感染性疾病病原检测中国专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(2): 107-120.

[12] 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. 中国新生儿肺表面活性物质临床应用专家共识(2021 版)[J]. 中华儿科杂志, 2021, 59(8): 627-632.

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

[14] 孙宇, 赵林清. 正确分析儿童急性呼吸道感染病毒病原检测结果[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2021, 36(24): 1856-1860.

[15] Thorburn F, Bennett S, Modha S, et al. The use of next generation sequencing in the diagnosis and typing of respiratory infections[J]. J Clin Virol, 2015, 69: 96-100.

[16] Lefterova MI, Suarez CJ, Banaei N, et al. Next-Generation Sequencing for Infectious Disease Diagnosis and Management; A Report of the Association for Molecular Pathology[J]. J Mol Diagn, 2015, 17(6): 623-634.

[17] Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019[J]. N Engl J Med, 2020, 382(8): 727-733.

[18] Wang H, Lu Z, Bao Y, et al. Clinical diagnostic application of metagenomic next-generation sequencing in children with severe nonresponding pneumonia[J]. PLoS One, 2020, 15(6): e0232610.

[19] Cummings LA, Kurosawa K, Hoogstraat DR, et al. Clinical Next Generation Sequencing Outperforms Standard Microbiological Culture for Characterizing Polymicrobial Samples[J]. Clin Chem, 2016, 62(11): 1465-1473.

[20] Yang A, Chen C, Hu Y, et al. Application of Metagenomic Next-Generation Sequencing (mNGS) Using Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) in Diagnosing Pneumonia of Children [J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(5): e0148822.

[21] Deng W, Xu H, Wu Y, et al. Diagnostic value of bronchoalveolar lavage fluid metagenomic next-generation sequencing in pediatric pneumonia[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 950531.

[22] 黄美霞, 叶贝, 姜源, 等. 儿童肺放线菌病一例并文献复习[J]. 中华儿科杂志, 2021, 59(1): 33-36.

[23] Waites KB, Xiao L, Liu Y, et al. Mycoplasma pneumoniae from the Respiratory Tract and Beyond[J]. Clin Microbiol Rev, 2017, 30(3): 747-809.

[24] Jacobs E, Ehrhardt I, Dumke R. New insights in the outbreak pattern of Mycoplasma pneumoniae[J]. Int J Med Microbiol, 2015, 305(7): 705-708.

[25] Spuesens EB, Fraaij PL, Visser EG, et al. Carriage of Mycoplasma pneumoniae in the upper respiratory tract of symptomatic and asymptomatic children: an observational study [J]. PLoS Med, 2013, 10(5): e1001444.

[26] Tsang CC, Teng JLL, Lau SKP, et al. Rapid Genomic Diagnosis of Fungal Infections in the Age of Next-Generation Sequencing[J]. J Fungi (Basel), 2021, 7(8): 636.

[27] Guo F, Kang L, Xu M. A case of pediatric visceral leishmaniasis-related hemophagocytic lymphohistiocytosis diagnosed by mNGS[J]. Int J Infect Dis, 2020, 97: 27-29.

[28] 杜彦强, 楚建平, 王娟, 等. 儿童肺诺卡菌病三例报道并文献复习[J]. 中国小儿急救医学, 2021, 28(12): 1115-1118.

[29] Wang L, Zha P, Wang Y, et al. The Value of MacroGene Second-Generation Sequencing in the Diagnosis, Guidance of Drug Use, and Efficacy Monitoring of Infectious Pneumonia in Premature Infants[J]. Comput Math Methods Med, 2022, 2022: 4398614.

[30] 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.

[31] Wang K, Li P, Lin Y, et al. Metagenomic Diagnosis for a Culture-Negative Sample From a Patient With Severe Pneumonia by Nanopore and Next-Generation Sequencing[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10: 182.

[32] Liu H, Zhang Y, Yang J, et al. Application of mNGS in the Etiological Analysis of Lower Respiratory Tract Infections and the Prediction of Drug Resistance[J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(1): e0250221.

[33] 梁文炎, 施毅, 孙文逵. 宏基因组高通量测序技术在革兰阴性菌耐药表型检测中的研究进展[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2022, 45(2): 209-213.

[34] Thoendel M, Jeraldo P, Greenwood-Quaintance KE, et al. Comparison of Three Commercial Tools for Metagenomic Shotgun Sequencing Analysis[J]. J Clin Microbiol, 2020, 58(3): e00981-19.

[35] Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases[J]. Clin Microbiol Rev, 2010, 23(3): 550-576.