



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2022.09.012

<http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2022.09.012>

· 论著 ·

# 宏基因组高通量测序技术在感染性疾病病原诊断中的临床应用

陈红梅 张建欣 赵英仁

**【摘要】 目的** 探讨宏基因组高通量测序技术(mNGS)在感染性疾病病原诊断中的临床应用。**方法** 通过具体分析 mNGS 在 4 个临床典型病例中的应用,探讨 mNGS 的临床应用适应证及如何正确地判读结果。**结果** 病例 1 病情危重,进展迅速,考虑感染可能,但病原不明,通过 mNGS 方法迅速锁定目标病原为钩端螺旋体。病例 2 为结核杆菌感染,病原培养需要时间较长,且阳性率低,常规方法联合 mNGS 可明显提高诊断率。病例 3 显示 mNGS 敏感度高,可检测到微量的基因产物,但也不排除检测过程中的痕量污染。所以在临床诊治过程中,应联合常规检测方法,结合流行病学史、临床表现及治疗反应综合判断,甄别假阳性可能。病例 4 显示 mNGS 因其高度敏感,对几乎所有病原微生物可无差别检测,所以其阴性结果对于排除感染亦具有较高的阴性预测值。**结论** mNGS 在感染性疾病的病原学诊断方面具有独特的优势,是传统病原学检测方法的有益补充。

**【关键词】** 宏基因组高通量测序技术; 感染性疾病; 病原诊断

**【中图分类号】** R240.3255

**【文献标识码】** A

感染性疾病是具有明确病原体的一类疾病,病原体主要包括细菌、真菌、病毒、寄生虫等 4 大类。临床工作中尽快明确病原是诊治感染性疾病的关键。但是传统病原学检测方法(包括涂片镜检、培养、抗原抗体的检查等)阳性率较低,导致病原学诊断十分困难。宏基因组高通量测序技术(mNGS)通过对临床样本 DNA 或 RNA 进行鸟枪法测序,可无偏倚检测多种病原微生物是目前病原学诊断的新技术,发展迅速,在肺部感染、中枢神经系统感染、血流感染、胸腔腔感染<sup>[1-5]</sup>等感染性疾病中,对病原学诊断特别是结核分枝杆菌、布氏杆菌、杜氏利士曼原虫等少见病原体的诊断发挥了重要的作用<sup>[6-9]</sup>。但由于此项新技术尚未完全成熟,在应用过程中,我们也发现了一些问题,如序列数较低,难于判断污染、定值亦或是真正致病的病原微生物;另外有些结果与传统培养结果不一致,导致临床医生决策两难。所以,在临床应用过程中,如何正确解读 mNGS 的检测结果,也是一项巨大的挑战。本文通过分析典型病例的诊疗过程,旨在探讨如何将 mNGS 更好地运用

于临床,为临床医生提供更确切的诊断线索。

## 临床资料

病例 1,男,19 岁,大一新生,因“发热伴全身皮肤黄染 4 天”于 2020 年 9 月 19 日入院。4 天前患者无明显诱因出现发热,最高体温达 38.2℃,无畏寒及寒战,同时发现全身皮肤黄染。我院门诊实验室检查:血常规:WBC 计数  $11.61 \times 10^9/L$  ( $3.50 \sim 9.50 \times 10^9/L$ ,括号内为正常参考值,以下相同),PLT 计数  $48 \times 10^9/L$  ( $125 \sim 350 \times 10^9/L$ );肝功能:总胆红素 715.8  $\mu\text{mol/L}$  ( $3.4 \sim 17.1 \mu\text{mol/L}$ ),直接胆红素 627.9  $\mu\text{mol/L}$  ( $0 \sim 3.4 \mu\text{mol/L}$ ),ALT 101 U/L ( $7 \sim 40 \text{ U/L}$ ),AST 92 U/L ( $13 \sim 35 \text{ U/L}$ );肾功能:尿素 36.62 mmol/L ( $3.10 \sim 8.80 \text{ mmol/L}$ ),肌酐 557  $\mu\text{mol/L}$  ( $41 \sim 81 \mu\text{mol/L}$ );降钙素原 6.47 ng/ml ( $0 \sim 0.50 \text{ ng/ml}$ );凝血功能:凝血酶原时间 14.2 秒 ( $9.8 \sim 12.1 \text{ 秒}$ ),凝血酶原活动度 81% ( $84\% \sim 128\%$ )。胸、腹部 CT 未见明显异常。为进一步诊治,以“黄疸待查”收住院。患者居住于陕西省汉中市,1 周前来西安上大学,入学后在校军训,无外出旅游及就餐史,既往体健,个人史及家族史无特殊。入院后查肝炎病毒系列(甲、乙、丙、戊肝)均为阴性,EB 病毒(EBV)及巨细胞病毒(CMV)均为阴性。磁共振胰胆管成像(MRCP)检查未发现胆道梗阻因素。溶血指

基金项目:西安交通大学第一附属医院教学研究改革重点项目(JG2021-0205)

作者单位:710061 西安,西安交通大学第一附属医院感染科(陈红梅、赵英仁);滨州市中心血站(张建欣)

通讯作者:赵英仁,E-mail:zhaoyingren@xjtu.edu.cn

标无异常。患者有发热, WBC 计数及降钙素原明显升高, 影像学未发现明确感染灶, 考虑严重血流感染导致脓毒症可能。但入院后行连续血培养结果均为阴性。为进一步明确病原, 采外周血行 mNGS 检查, 检测到钩端螺旋体特异序列, 为进一步验证, 行血清钩端螺旋体抗体检测结果为阳性, 确诊为钩端螺旋体感染导致的急性肝肾功能损害。经进一步追问病史, 患者入学前整理旧书时有鼠类排泄物接触史, 推测为可能的感染途径。入院后经两次血浆置换及保肝退黄等对症治疗, 并予以头孢曲松钠抗感染治疗后, 患者体温恢复正常, 肝功能及肾功能恢复正常后出院。

病例 2, 男, 31 岁, 职员, 因“发热伴咳嗽 1 周”于 2021 年 2 月 18 日入院。患者 1 周前劳累后出现发热, 体温波动于 37.5 ~ 39.8 °C 之间, 伴咳嗽, 咳少量白痰。当地医院查血常规提示 WBC 计数及中性粒细胞百分比升高, 降钙素原轻度升高, 胸部 CT 检查结果示胸膜肥厚粘连, 胸腔积液、双下肺炎症。予以抗细菌、抗病毒等治疗后, 体温仍反复波动。后转来我院, 门诊以“肺部感染?”收住院。患者个人史无特殊, 述其妻子 2 年前曾患输卵管结核, 治疗 3 个月痊愈。入院体格检查: T 38 °C, 双下肺呼吸音粗, 余无阳性体征。入院复查胸部 CT 提示右下肺新发斑片状影、两下肺纤维条索影。血常规: WBC 计数  $10.77 \times 10^9/L$ , 中性粒细胞百分比 77.8% (40.0% ~ 75.0%)。降钙素原正常。考虑为肺部感染, 为明确病原, 行痰细菌、真菌及结核菌涂片、培养检查, 呼吸道病毒系列等病原学检测结果均为阴性。序贯应用“更昔洛韦”抗病毒、“莫西沙星、哌拉西林钠他唑巴坦钠”抗细菌治疗后, 患者发热、咳嗽等症状无明显缓解。因结核菌素 (PPD) 试验阳性, 且既往有结核患者密切接触史, 考虑结核杆菌感染可能性大。进一步行支气管镜检查, 采集肺泡灌洗液行 mNGS 检测, 结果提示结核分枝杆菌复合群, 特异序列数为 9。诊断为肺结核。常规抗结核治疗后, 患者体温逐渐降至正常, 咳嗽症状缓解, 经规律、足疗程治疗后, 肺部炎症渗出消失。

病例 3, 男, 48 岁, 货车司机, 因“发热 1 月余”于 2020 年 6 月 4 日入院。患者 1 个月前无明显诱因出现发热, 体温最高达 37.8 °C, 轻度头痛, 未重视, 3 周前体温升高至 39 °C, 于当地医院查血常规提示 WBC 计数  $17.78 \times 10^9/L$ , 中性粒细胞百分比 92.2%, 血培养 4 次结果均为阴性。当地医院拟诊“菌血症”, 给予“莫西沙星、头孢哌酮钠舒巴坦钠”静脉滴注等治疗 1 周后体温恢复正常, 3 天后出院。1 周前再次出现发热, 体温最高达 38 °C, 当地医院再次给予莫西沙星治疗体温无下降。3 天前患者夜间突发寒战高热, 体温

达 42 °C, 于我院就诊, 门诊以“发热待查: 中枢神经系统感染?”收入院。个人及家族史无特殊, 开车运输路线固定, 否认特殊病畜等接触史。入院后进一步行血培养、骨髓培养等病原学检查, 结果均为阴性, 胸部影像学及普通超声心动图检查无异常。因患者头痛, 行脑脊液检查, 结果提示压力正常, 脑脊液常规生化无异常, 脑脊液涂片及培养结果均为阴性, 但脑脊液 mNGS 提示贝氏柯克斯体 (Q 热的病原体) 阳性, 1 个特异序列。进一步检测特异抗体结果为阴性, 给予多西环素治疗无效。后进一步经食道超声心动图检查发现主动脉瓣左冠瓣约 1 cm 大小赘生物, 诊断为感染性心内膜炎, 给予万古霉素抗感染治疗后, 体温明显下降, 后转至心外科手术治疗。

病例 4, 女, 24 岁, 研究生在读, 因“发热 2 周、全身皮疹 12 天”于 2021 年 6 月 8 日入院。患者 2 周前无明显诱因出现发热, 体温最高达 39.2 °C, 伴畏寒、肌肉酸痛、咽痛、双膝关节疼痛, 12 天前出现面部、四肢、腹部及背部散在红色皮疹, 突出于皮面, 无瘙痒及脱屑, 于当地医院查铁蛋白  $> 2000 \text{ ng/ml}$  (13 ~ 150 ng/ml), 肝功能异常。给予抗感染及对症治疗后效果不佳。为求进一步诊治遂来我院, 门诊以“发热、皮疹待查”收入院。既往史、个人史、流行病学史无特殊。入院体格检查: T 38.8 °C。右上臂可见散在红色丘疹, 突出于皮肤表面, 压之褪色。咽后壁红肿。余无阳性体征。入院后血常规检查: WBC 计数  $15.73 \times 10^9/L$ , 中性粒细胞百分比 94.5%, PLT 计数  $541 \times 10^9/L$ , C 反应蛋白 64.1 mg/L (0 ~ 10.0 mg/L), 铁蛋白 1 457 ng/ml (13 ~ 150 ng/ml); 肝功能: ALT 100 U/L, 白蛋白 32.3 g/L (40.0 ~ 55.0 g/L)。胸、腹部 CT 检查结果提示双侧胸腔少量积液, 盆腔积液, 脾脏增大。正电子发射计算机断层显像 (PET)-CT 检查结果示全身多发稍大淋巴结, 葡萄糖代谢不同程度增高, 骨髓葡萄糖代谢弥漫增高, 脾脏增大并葡萄糖代谢增高, 考虑血液系统异常增殖性病变, 建议行骨髓活检; 双侧少量胸腔积液。骨髓涂片及活检结果均无异常。行常规病原学检查结果均为阴性, 血液 mNGS 结果阴性。肿瘤标志物及风湿免疫性疾病相关检查结果均为阴性。成人 Still 病属于排除性诊断, 临床上需排除感染性疾病、风湿免疫性疾病及肿瘤性疾病。经全面检查排除上述 3 类疾病, 依据敏感性 & 特异性均较高的日本标准<sup>[10]</sup>, 主要标准符合: (1) 发热时体温大于 39 °C 并持续 1 周以上; (2) 有关节痛持续 2 周以上; (3) 有典型的皮疹; (4) WBC 计数  $> 10 \times 10^9/L$ ; 次要标准符合 (1) 咽痛; (2) 淋巴结肿大; (3) 脾脏肿大; (4) 肝功能异常; (5) 类风湿因子和抗核抗体阴性。本例患者符合包括 4 条主要标准的 9 条

标准,明确诊断为成人 Still 病。给予糖皮质激素治疗后,发热及皮疹消退,肝功能恢复正常。

## 讨 论

世界首例应用 mNGS 方法诊断了一例 14 岁男孩患的神秘脑炎,病原是钩端螺旋体,发表于 2014 年的新英格兰医学杂志,引起医疗界轰动<sup>[11]</sup>。后 mNGS 逐渐应用于感染性疾病的各个领域,显示其在发现新发病原体及罕见特殊病原体诊断方面的独特优势<sup>[12]</sup>。且 mNGS 不依赖于培养,报告时间较培养方法明显缩短,为临床决策争取了时间。为促进该技术的规范和发展,中华医学会组织检验及临床专家制定了 2021 版《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》(后简称 2021 版《共识》)<sup>[13]</sup>。

病例 1 以发热黄疸为主要表现,按照黄疸待查的诊疗思路,排除了梗阻性黄疸及溶血性黄疸,考虑肝细胞性黄疸。患者为青年男性,急性发热起病,既往无慢性肝肾病史,近期无酒精及药物应用史,迅速出现肝肾功能的严重损害,且 WBC 计数及降钙素原水平明显升高,临床考虑严重血流感染引起脓毒症的可能性大,但常规病原学检测结果均为阴性,通过血液 mNGS 检测发现钩端螺旋体阳性,进一步通过抗体检测阳性验证,同时追问到接触鼠类排泄物的流行病学史,进而经过目标病原治疗后,病情迅速好转,证实诊断明确。2021 版《共识》临床适应证中共识 3 建议各种原因导致患者急危重症表现,不排除感染所致,建议常规检测的同时,或在常规检测基础上,开展 mNGS。共识 6 建议高度疑似感染性疾病,但病原学诊断未明确且常规抗感染治疗无效,建议同时进行 mNGS 检测。此患者病情危重,考虑感染可能,通过 mNGS 迅速锁定目标病原,并通过其他方法确诊验证,结合流行病学史、临床表现及治疗效果综合分析、诊断明确。

病例 2 是一个有结核密切接触史的患者,出现发热、咳嗽等肺部炎症表现,常规抗感染治疗无效,且 PPD 阳性,高度怀疑结核感染,但常规结核菌检查结果为阴性。结核分枝杆菌为胞内寄生菌,且生长缓慢,生长条件苛刻,培养阳性率很低,mNGS 在结核杆菌诊断方面表现出了特殊的优势。此例患者我们通过 mNGS 检测肺泡灌洗液显示结核杆菌复合群阳性,虽然只有 9 个特异性序列,依据 2021 版《共识》共识 30, mNGS 检测报告中,建议结合不同标本类型与检出病原微生物的种类进行解读,呼吸道标本检出结核分枝杆菌,应认为是致病微生物。Zhou 等<sup>[14]</sup>对 123 例怀疑结核感染患者同时进行 mNGS 及常规诊断结核的方法进行检测,显示联合 mNGS 和 Xpert 可明显提高结核杆菌及

其他病原体的检出率。

病例 3 是一个发热待查的患者,发热待查的病因中仍以感染性疾病最常见,此患者前期抗感染治疗有效,且无风湿免疫性疾病及肿瘤性疾病的证据,仍考虑感染性疾病可能性大。我们采用 mNGS 在该患者脑脊液中检测到了极其罕见的 Q 热的病原体贝氏柯克斯体,但没有追踪到 Q 热相关的流行病学史及典型的临床表现,经有效药物治疗无效,且特异性抗体检测阴性,应考虑假阳性可能。进一步检查后发现心脏瓣膜的赘生物,诊断为感染性心内膜炎,经有效抗感染联合手术治疗,患者痊愈。mNGS 十分敏感,可检测到微量的基因产物,但也不排除检测过程中的痕量污染。所以在临床诊治过程中,应该联合常规检测方法,结合流行病学史、临床表现及治疗反应综合判断,甄别假阳性可能。美国学者 Graff 等<sup>[15]</sup>收集了 13 个关于 mNGS 在儿童中枢神经系统感染疾病中的临床应用研究进行分析,结果提示 mNGS 结果必须依据患者的临床背景进行详细解读, mNGS 的无偏倚性和高敏感性使其可检测到未被怀疑的病原体,而结合临床表现,这些病原体并不一定与临床相关。

病例 4 是一个青年女性,以发热皮疹为主要表现,临床符合成人 Still 病的诊断标准,但需要排除感染性疾病、风湿免疫性疾病及肿瘤性疾病。此例患者我们结合传统检测方法及 mNGS,排除上述疾病。由于常规病原学检测方法的阳性率较低,即使阴性也不能完全排除感染,所以临床上往往需要广谱抗生素的足疗程治疗无效来排除感染,导致抗生素滥用、耐药菌及继发感染的发生。mNGS 由于其高度敏感,对几乎所有病原微生物可无差别检测,所以其结果阴性对于排除感染常具有较高的阴性预测值<sup>[13]</sup>。Gan 等<sup>[16]</sup>在一项关于 mNGS 在 HIV 阴性患者隐球菌性脑膜炎诊断的临床研究中发现,其阴性预测值达到 98%。

正确的诊断源于科学的思维<sup>[17]</sup>。感染性疾病的病原学诊断采用传统的涂片、培养等方法阳性率较低,而 mNGS 等一些新兴技术发展迅速,敏感性明显提高,但对于检测结果,我们必须依据患者实际情况进行辩证分析,结合流行病学史、临床资料等综合评估,并通过有效的治疗进一步验证我们的判断是否正确。mNGS 是传统病原学检测方法的有益补充,我们应该在临床应用中逐渐完善,并期望能更好地为临床服务。

## 参 考 文 献

- [1] Han D, Li Z, Li R, et al. mNGS in clinical microbiology laboratories: on the road to maturity [J]. Crit Rev Microbiol, 2019, 45(5-6): 668-685.
- [2] Wu X, Li Y, Zhang M, et al. Etiology of Severe Community-Acquired Pneumonia in Adults Based on Metagenomic Next-Generation Sequencing: A Prospective Multicenter Study [J]. Infect Dis Ther, 2020, 9(4): 1003-1015.



[DOI]10.3969/j.issn.1001-9057.2022.09.013

<http://www.lcnkz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2022.09.013>

• 临床研究 •

# 小鼠肾小管上皮细胞来源外泌体改善脓毒症肾脏损伤炎症反应的研究

徐志育 朱永 田佳 李娜 宋海

**【摘要】 目的** 讨论小鼠肾小管上皮细胞(mRTEC)来源外泌体(mRTEC-EXO)对脓毒症肾脏损伤炎症反应的影响。**方法** 制备 mRTEC-EXO,使用透射电子显微镜观察其形态,通过共聚焦显微镜观测其是否被胚胎肾(EK)细胞摄取。将 84 只 SPF 小鼠随机分为对照组[腹腔注射生理盐水(NS)]、LPS 组(腹腔注射 LPS)、LPS + mRTEC-EXO 组(腹腔注射 LPS 同时尾静脉注射 mRTEC-EXO),每组各 28 只。NS 注射后或 LPS 干预 12 h 后,随机处死各组小鼠均 12 只,收集新鲜肾脏组织切片后行 HE 及免疫组化染色,观察肾小管、肾小球形态变化及肾小管间质炎性细胞、中性粒细胞的浸润程度。每组剩余 16 只小鼠继续观察至 150 h,记录其存活情况。采用 Western blot 检测 mRTEC-EXO 中 CD9、CD63、Calnexin 及 3 组小鼠肾脏组织中 MPO、MDA、TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的表达水平。**结果** Western blot 结果显示,mRTEC-EXO 表面标志物 CD9 和 CD63 呈高表达,而阴性标志物 Calnexin 呈低表达。共聚焦显微镜观察结果显示,EK 细胞可主动摄取 mRTEC-EXO。对照组小鼠生存率均高于 LPS 组和 LPS + mRTEC-EXO 组,LPS + mRTEC-EXO 组生存率高于 LPS 组( $P < 0.05$ )。与对照组比较,LPS 组和 LPS + mRTEC-EXO 组小鼠肾脏组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MDA、MPO 表达水平均明显升高;与 LPS 组比较,LPS + mRTEC-EXO 组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MDA、MPO 表达水平均明显降低( $P < 0.05$ )。与对照组比较,LPS 组及 LPS + mRTEC-EXO 组小鼠肾脏组织炎性浸润程度明显增加。与 LPS 组比较,LPS + mRTEC-EXO 组小鼠肾脏组织炎性浸润程度明显降低。**结论** mRTEC-EXO 可抑制中性粒细胞浸润并减弱脓毒症肾脏损伤炎症反应。

**【关键词】** 外泌体; 脓毒症; 中性粒细胞; 浸润; 肾损伤; 炎症反应**【中图分类号】** R459.7;R692 **【文献标识码】** A

基金项目:海南省卫生健康行业科研项目(19A200005)

作者单位:570311 海口,海南省人民医院 海南医学院附属海南医院重症医学科(徐志育、朱永、田佳、李娜);海南医学院基础医学与生命科学学院(宋海)

通讯作者:朱永,E-mail:icudoc123@163.com

- [3] Piantadosi A, Mukerji SS, Ye S, et al. Enhanced Virus Detection and Metagenomic Sequencing in Patients with Meningitis and Encephalitis [J]. mBio, 2021, 12(4): e0114321.
- [4] Greninger AL, Naccache SN. Metagenomics to Assist in the Diagnosis of Bloodstream Infection [J]. J Appl Lab Med, 2019, 3(4): 643-653.
- [5] Chen H, Zhang Y, Zheng J, et al. Application of mNGS in the Etiological Diagnosis of Thoracic and Abdominal Infection in Patients With End-Stage Liver Disease [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 741220.
- [6] Sun WW, Gu J, Fan L. [Application value of metagenomic next-generation sequencing (mNGS) in the diagnosis of different types of tuberculosis] [J]. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi, 2021, 44(2): 96-100.
- [7] 张来波, 孙水, 李伟, 等. 宏基因组检测法诊断人工全膝关节置换术后布氏杆菌感染一例 [J]. 中华老年医学杂志, 2020, 39(11): 1340-1341.
- [8] 曾敬, 赵洪普, 尹德龙, 等. 采用 mNGS 法诊断布氏杆菌性脊柱炎 1 例 [J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2019, 34(1): 103-104.
- [9] 杨洋, 周永召, 刘凯. 外周血宏基因组二代测序诊断内脏利什曼病三例 [J]. 华西医学, 2022, 37(5): 794-797.
- [10] Wang MY, Jia JC, Yang CD, et al. Pathogenesis, disease course, and prognosis of adult-onset Still's disease: an update and review [J]. Chin Med J (Engl), 2019, 132(23): 2856-2864.
- [11] 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.
- [12] Duan H, Li X, Mei A, et al. The diagnostic value of metagenomic next-generation sequencing in infectious diseases [J]. BMC Infect Dis, 2021, 21(1): 62.
- [13] 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.
- [14] Zhou X, Wu H, Ruan Q, et al. Clinical Evaluation of Diagnosis Efficacy of Active Mycobacterium tuberculosis Complex Infection via Metagenomic Next-Generation Sequencing of Direct Clinical Samples [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9: 351.
- [15] Graff K, Dominguez SR, Messacar K. Metagenomic Next-Generation Sequencing for Diagnosis of Pediatric Meningitis and Encephalitis: A Review [J]. J Pediatric Infect Dis Soc, 2021, 10 (Supplement\_4): S78-S87.
- [16] Gan Z, Liu J, Wang Y, et al. Performance of Metagenomic Next-Generation Sequencing for the Diagnosis of Cryptococcal Meningitis in HIV-Negative Patients [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 831959.
- [17] 李建国, 齐惠军, 郭慧, 等. 正确的诊断源于科学的思维 [J]. 医学与哲学, 2019, 40(24): 19-23.

(收稿日期:2022-03-27)

(本文编辑:余晓曼)