

## 诊疗经验

## 宏基因组新一代测序技术诊治感染性疾病 1 例

王婷<sup>1</sup> 郑波<sup>2\*</sup><sup>1</sup>北京水利医院内科,北京 100036<sup>2</sup>北京大学第一医院临床药理研究所,北京 100034

关键词 宏基因组新一代测序技术; 感染性疾病

中图分类号 R515.3 文献标识码 A DOI 10.11768/nkjwzzzz20220318

本文报道了 1 例因肺部感染合并腹腔感染引起发热的老年男性患者,传统培养未明确病原微生物,经验性抗感染治疗后患者仍持续发热,感染加重,结合病史并完善全血标本病原微生物 DNA 高通量基因检测明确为 G<sup>+</sup> 葡萄球菌属感染,通过针对性治疗,患者感染得到控制。

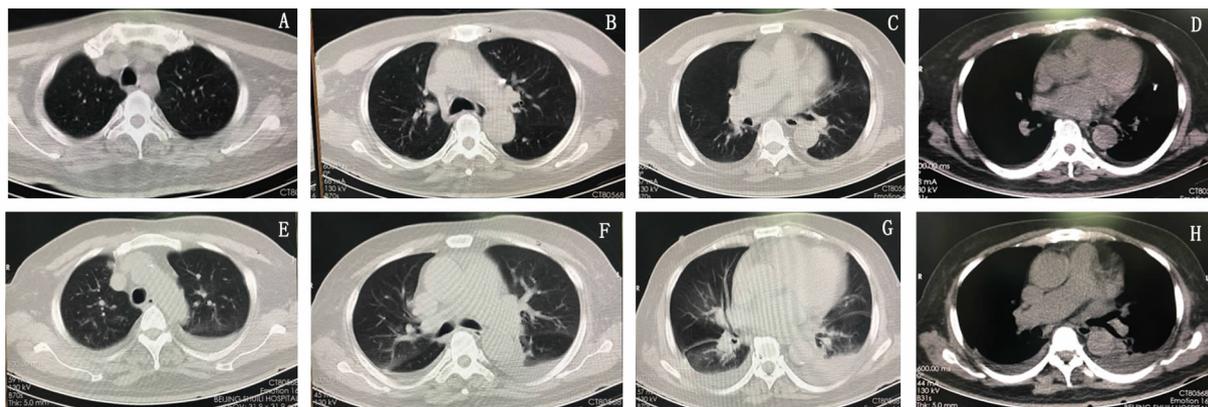
## 病例资料

患者男,78 岁,主因“发热伴发现胰腺占位 1 个月,加重 1 周”于 2019 年 7 月 16 日收入北京水利医院内科病房。患者 1 个月前外出旅游时因受凉发热,体温 37.8℃,自服感冒药效果不佳,在外院经相关检查发现“胰腺恶性肿瘤、肝脏转移?”,行肝脏穿刺病理检查,明确“低分化腺癌”。1 周前(肝脏穿刺 2 d 后)患者出现寒战、高热,体温最高 39.1℃,偶有咳嗽、咳少量白色粘痰,无胸痛、咯血、咳脓臭痰及痰中带血,自服头孢地尼效果不佳入院。既往史:高血压病史 30 余年,有反流性食管炎病史。入院查体:T 39.1℃,BP 180/70 mmHg,巩膜无黄染,全身浅表淋巴结未及肿大,双肺呼吸音粗,可闻及少许湿性啰音,心率 100 次/min,律齐,未闻及杂音,腹部膨隆,无压痛及反跳痛,未触及包块,肝脾肋下未触及,Murphy 征阴性(-),叩诊呈鼓音,移动性浊音(-),肠鸣音 3~4 次/min,双下肢中度可凹性水肿。辅助检查:动脉血气 PH 7.502,二氧化碳分压 36.2 mmHg,氧分压 51.3 mmHg,乳酸 1.5 mmol/L,碱剩余 5.2 mmol/L;血常规:白细胞 17.1 × 10<sup>9</sup>/L,中性粒细胞百分比 90.8%,淋巴细胞百分比 6.7%,单核细胞百分比 2.4%,血红蛋白 107 g/L,血小板 86 × 10<sup>9</sup>/L,降钙素原 0.50 ng/mL,C 反应蛋白 91 mg/L;生化:谷氨酰转氨酶 157 U/L,总胆红素

8.7 μmol/L,白蛋白 31 g/L,碱性磷酸酶 180 U/L,前蛋白 57 mg/L,钠 130.7 mmol/L,铁 4.8 μmol/L;免疫球蛋白 A 4.27 g/L,免疫球蛋白 M 0.21 g/L。尿常规:尿蛋白(+),微量白蛋白 178 mg/dL。心电图:窦性心动过速,心率 100 次/min,ST-T 改变。血管超声:双侧颈动脉粥样硬化伴斑块形成,右侧胫后静脉一支中段血栓形成。腹部超声:胰尾低回声(2.6cm × 2.3cm),肝内多发实性占位(大者 14.3cm × 12.4cm),胆囊壁增厚,左肾囊肿,腹腔积液。胸部 CT:双下肺多发条形高密度影,双侧胸腔少量积液,动脉硬化,见图 1。腹部 CT:肝左叶占位病变伴肝内转移,胰尾部占位病变,胆囊结石,腹盆腔少量积液,见图 2。头颅 CT 未见异常。入院诊断:发热待查,胰腺恶性肿瘤,肝转移,肝功能异常,轻度贫血,低蛋白血症,下肢深静脉血栓形成,反流性食管炎,高血压病,外周动脉粥样硬化。

入院后经验性先后给予注射用哌拉西林/他唑巴坦 5 g,每 8 h 1 次(7 月 16 日-7 月 18 日)、盐酸莫西沙星注射液 0.4 g,1 次/d(7 月 17 日-7 月 19 日)、注射用美罗培南 1.0 g,每 8 h 1 次(7 月 18 日-7 月 24 日)、奥硝唑氯化钠注射液 0.5 g,每 12 h 1 次(7 月 19 日-7 月 24 日)、注射用替考拉宁 0.2 g,1 次/d(7 月 19 日-7 月 24 日)多种抗生素治疗后患者仍持续发热,感染指标持续偏高,感染进行性加重,见图 1、3 及表 1,考虑患者炎症未得到控制,存在败血症,曾先后 3 次抽取血培养行需氧及厌氧瓶培养均为(-)、痰、尿培养(-)。分析该患者感染部位可能有:①肺:患者有呼吸道症状,胸部 CT 影像进展,但痰培养未找到致病微生物,无法指导抗生素使用;②腹腔感染:腹部超声及 CT 可见腹部占位,不排除肿瘤周围组织继发感染可能;③血源性:

\* 通信作者:郑波,E-mail:doctorzhengbo@163.com,北京市西城区西什库大街 8 号



注:图 A~D 为 7 月 16 日影像,图 E~H 为 7 月 24 日影像

图 1 胸部 CT



图 2 腹部 CT

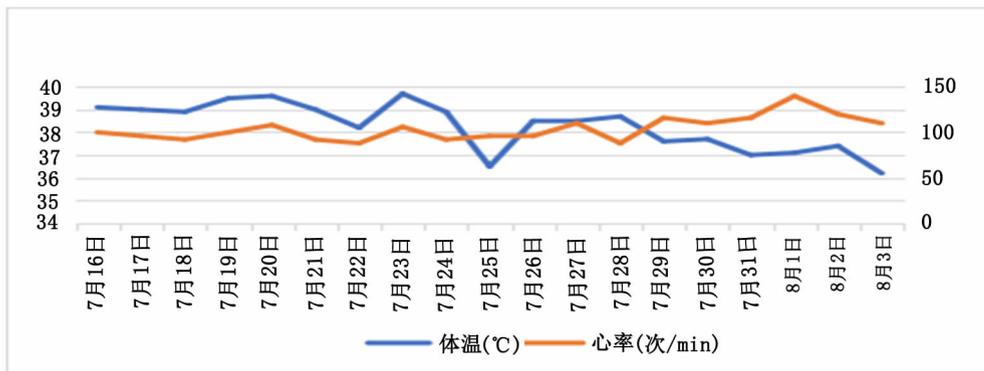


图 3 体温及心率变化表

入院后曾多次抽取外周血、行静脉输液等医疗操作,但多次血培养结果均为阴性。④其他:泌尿系、皮肤软组织、胆源性、胃肠道、中枢神经系统等,因患者进食排便正常,腹部 CT 未见肠管、肝胆管扩张,尿、便常规未见异常,考虑可能性不大。目前为止临床常规微生物检查无法明确病原体,于 7 月 23 日行全血标本病原微生物 DNA 高通量基因检测,对样本中微生物核酸序列进行分析,24 h 结果:G<sup>+</sup>葡萄球菌属检出序列数为 5 174,其中路邓葡萄球菌检出序列数为 502,沃氏葡萄球菌 328;背景菌为表皮葡萄球菌 2 820,人类疱疹病毒 5 型(CMV)7,未检出真菌、寄生虫、结核分枝杆菌、支原体及衣原体。此结果提示该患者感染主要以 G<sup>+</sup>葡萄球菌属为主,结

合患者肿瘤、肝脏穿刺病史,考虑医源性感染可能性大,同时合并肺部感染,于 7 月 24 日开始调整抗生素方案为注射用替考拉宁 0.4 g,1 次/d + 注射用磷霉素钠 4 g,每 8 h 1 次联合抗感染治疗,1 d 后患者体温高峰开始下降,1 周后体温逐渐降至正常,感染指标改善,患者感染得到控制,见表 1。

### 讨论

感染性疾病是严重威胁人类健康和公共卫生的重大疾病,随着耐药病原微生物不断增多,感染性疾病的发病率和病死率高居不下。严重的感染性疾病可导致多脏器功能衰竭,病死率可高达 50%<sup>[1~3]</sup>。尽早针对病原微生物进行抗感染治疗,能够显著降

表1 实验室指标变化表

项目日期	WBC ( $\times 10^9/L$ )	NE (%)	Hbg (g/L)	Hct (%)	CRP (mg/L)	PCT (ng/mL)	ALB (g/L)	D-Dimer (mg/L)
7.16	17.1	90.8	107	31	91	0.5	31	30.27
7.18	19.5	90.4	98	28.6	101	-	-	23.41
7.22	13.5	87.2	92	28	81	5.71	26.7	17.29
7.24	21.6	87.5	92	28	104	15.63	30.7	-
7.29	-	-	-	-	119	4.83	30.2	15.61
8.1	14.5	79.1	94	30	85	-	29.3	12.61

注：“-”表示数值缺失；WBC：白细胞，NE%：中性粒细胞百分比，Hbg：血红蛋白，Hct：红细胞压积，CRP：C反应蛋白，PCT：降钙素原，ALB：白蛋白，D-Dimer：D二聚体

低患者的病死率。

传统的病原微生物检测方法检测时间长、检出率低，无法满足当前临床治疗的需求。据文献报道目前国内血培养阳性率不足18%，阳性报警时间长，非常见微生物的及时检出率更低，血培养作为金标准的地位正在受到挑战<sup>[4]</sup>。临床上大部分痰液标本不合格，约15%~30%的患者在痰标本留取前已经使用过多种抗生素，一些比较脆弱的细菌如肺炎链球菌和流感嗜血杆菌检出率均为0。以上方法均无法满足目前临床早期快速诊断的需要。其他血清学检测及核酸扩增试验虽能拓宽病原体的检测范围，但因检出的病原体种类复杂、与临床符合度不高而限制了其广泛应用。此外，还有一些新型微生物检查技术，包括生物芯片、生物传感器以及分子生物学等，由于投入成本高、操作难度大，无法在临床中推广应用。以往的研究结果表明超过60%的感染性病例虽然进行了上述检查，依然无法进行病原学诊断<sup>[5]</sup>。不仅影响抗生素的精准使用，还导致广谱抗生素的滥用及误用，耐药率不断升高。

宏基因组新一代测序技术(metagenomics next generation sequencing, mNGS)不依赖于传统的微生物培养，无需特异性扩增，直接对临床样本中的核酸进行高通量测序，然后与数据库中千余种病原微生物种类进行比对分析，根据序列信息判断样本中病原微生物种类，计算出所有检出病原微生物的参数，包括比对序列数、相对丰度、基因组覆盖度和深度等，从而快速、客观地显示出临床样本中含量较多的病原微生物(包括病毒、细菌、真菌、寄生虫等)，阳性率较传统方法提高3~4倍以上。此外，mNGS还能阐释不同细菌的耐药机制，能够对耐药菌的流行情况进行精准分析，指导抗生素治疗策略，尤其适用于感染性疾病急危重症和疑难病症的诊治<sup>[6~11]</sup>，尤其对于脓毒症、重症肺炎、免疫抑制宿主并发严重感

染等具有较高的临床应用价值<sup>[12~15]</sup>；mNGS在抗菌药物治疗方案的制定、病情监测和控制疾病进展、评估疗效等方面也有一定的指导作用。

Miao等<sup>[16]</sup>回顾了2017年4月-12月间的511份临床标本，比较了使用mNGS与传统微生物培养方法对感染性疾病病原微生物的判断，结果表明两种方法对诊断感染性疾病的敏感性和特异性分别是(50.7% vs 35.2%； $P < 0.01$ )和(85.7% vs 89.1%； $P = 0.39$ )，特别是对于结核分枝杆菌( $OR 4, 95\% CI 1.7 \sim 10.8$ )、病毒( $OR \infty, 95\% CI 1.71 \sim \infty$ )、厌氧菌( $P < 0.01$ )和真菌( $OR 4, 95\% CI 1.6 \sim 10.3$ )的识别mNGS远超过传统微生物培养方法。以往的研究提示mNGS对诊断感染性疾病的阴性和阳性预测价值分别是37.4%和91.2%，且不受是否使用抗生素的影响<sup>[17]</sup>。但mNGS特异性稍差，在检测常见细菌感染方面可能不如其他技术有优势，尤其对胞内菌和厚壁微生物检出率低。

目前mNGS的主要适应证<sup>[6]</sup>如下：①病情危重需要尽快明确病原体的患者，②特殊病患者，如免疫抑制宿主、合并基础疾病、反复住院的重症感染患者需要尽快明确病原体时，③传统微生物检测技术反复阴性且治疗效果不佳的患者，④疑似新发病原体、临床上提示可能有一定传染性的患者，⑤疑似特殊病原体感染的患者，⑥长期发热和/或伴有其他临床症状、感染病因不明的患者。

mNGS可以无偏倚地检测出临床样本中的所有病原微生物，特别适用于检出复杂感染性疾病中罕见、非典型的致病菌。mNGS送检标本多样化，如：静脉血、痰液、胸水和腹水、咽部分泌物、局灶穿刺物、组织、肺泡灌洗液、脑脊液等，其中无菌标本的检测价值更大。由于mNGS的广泛性、全面性，不受抗生素使用影响等诸多优势，可开发空间大，是未来很有潜力的微生物检测方法。

目前 mNGS 的研究主要集中在对各种病毒的识别上。如 2020 年 1 月 11 日,在全球新型冠状病毒肺炎肆虐的疫情下,张永振团队率先利用 mNGS 对武汉华南市场 5 例病人送检的标本进行分析,领先于全球最早在《病毒学组织》网站上发布了该病毒的全基因组序列<sup>[18]</sup>。张文宏团队也通过 mNGS 诊断过 1 例人类直接接触猪的污染物感染狂犬病毒引起眼内炎的患者,及时有效地抗病毒治疗后成功手术,保住了患者的视力<sup>[14]</sup>。

mNGS 因其敏感、高效的特点对感染性疾病的精准诊断和个性化治疗有一定价值,将成为临床诊治中必不可少的重要工具。mNGS 具有比传统病原微生物检测技术更强大的效能,但在应用方面还存在一些需要改进的地方,比如:①对实验室及技术人员的要求较高,涉及样本处理、提取核酸、文库制备、上机测序、质控及生物信息分析等多个环节,目前仍缺乏规范性的指南及质控标准,无法确保检测结果一致性。②成本高、价格贵,目前多以个案及小规模的研究报道出现,尚需要大样本的研究进一步证实其有效性及临床价值<sup>[19-26]</sup>。③对于检测结果的正确解读需要依靠专业的医疗团队,结合临床情况具体分析才能得出更精准地判断。

总之,临床上针对感染严重、生命体征不稳定的患者,在早期病原体不明确的情况下,首先经验性采用广谱抗菌药物治疗,推荐联合使用 mNGS 与传统微生物培养方法提高病原学诊断的敏感性和特异性,待明确病原体后再更换为窄谱抗菌药物从而进行针对性治疗,之后密切随访患者的临床表现和治疗效果,从而有效减少抗菌药物的使用强度,降低病原微生物的耐药率,降低感染性疾病患者的病死率。

#### 参考文献

- 1 申川,马路园,赵彩彦.感染与非感染之惑的思考与临床实践[J].内科急危重症杂志,2018,24(3):3.
- 2 Weng L, Zeng XY, Yin P, et al. China Critical Care Clinical Trials Group (CCCCTG). Sepsis-related mortality in China: a descriptive analysis[J]. Intensive Care Med, 2018, 44(7):1071-1080.
- 3 Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock; 2016[J]. Intensive Care Med, 2017, 43(3):304-377.
- 4 张荣芳,李轶,钱磊,等.重症医学科患者血流感染病原菌分布及耐药性分析[J].检验医学与临床,2021,18(11):4.
- 5 Ewig S, Torres A, Angeles Marcos M, et al. Factors associated with unknown aetiology in patients with community-acquired pneumonia[J]. Eur Respir J, 2002, 20(5):1254-1262.
- 6 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.
- 7 张晖,弓孟春,徐军,等.中国精准急诊医学的应用体系规划探索[J].中华急诊医学杂志,2016,25(10):5.
- 8 周永召,李亚伦,范红,等.临床宏基因组学在呼吸感染性疾病精

准诊疗中的疑问解析[J].中国呼吸与危重监护杂志,2018,17(6):539-543.

- 9 Goldberg B, Sichtig H, Geyer C, et al. Making the leap from research laboratory to clinic: challenges and opportunities for next-generation sequencing in infectious disease diagnostics[J]. mBio, 2015, 6(6):e01888-15.
- 10 Westblade LF, van Belkum A, Grundhoff A, et al. Role of clinicogenomics in infectious disease diagnostics and public health microbiology[J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(7):1686-1693.
- 11 Lusk RW. Diverse and widespread contamination evident in the unmapped depths of high throughput sequencing data[J]. PLoS One, 2014, 9(10):e110808.
- 12 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.
- 13 Brown JR, Bharucha T, Breuer J. Encephalitis diagnosis using metagenomics: application of next generation sequencing for undiagnosed cases[J]. J Infect, 2018, 76(3):225-240.
- 14 Ai JW, Weng SS, Cheng Q, et al. Human endophthalmitis caused by pseudorabies virus infection, China, 2017 [J]. Emerg Infect Dis, 2018, 24(6):1087-1090.
- 15 Schlager R, Chiu CY, Miller S, et al. Professional practice committee and committee on laboratory practices of the American society for microbiology; Microbiology Resource Committee of the College of American Pathologists. Validation of metagenomic next-generation sequencing tests for universal pathogen detection[J]. Arch Pathol Lab Med, 2017, 141(6):776-786.
- 16 Miao Q, Ma Y, Wang Q, et al. Microbiological diagnostic performance of metagenomic next-generation sequencing when applied to clinical practice[J]. Clin Infect Dis, 2018, 67(suppl 2):S231-S240.
- 17 Rhodes J, Hyder JA, Peruski LF, et al. Antibiotic use in thailand: quantifying impact on blood culture yield and estimates of pneumococcal bacteraemia incidence[J]. Am J Trop Med Hyg, 2010, 83(2):301-306.
- 18 Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J]. Nature, 2020, 579(7798):270-273.
- 19 Langelier C, Zinter MS, Kalantar K, et al. Metagenomic sequencing detects respiratory pathogens in hematopoietic cellular transplant patients[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2018, 197(4):524-528.
- 20 Bouquet J, Melgar M, Swei A, et al. Metagenomic-based surveillance of pacific coast tick dermacentor occidentalis identifies two novel bunyaviruses and an emerging human rickettsial pathogen[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):12234.
- 21 Turner P, Suy K, Tan LV, et al. The aetiologies of central nervous system infections in hospitalised Cambodian children[J]. BMC Infect Dis, 2017, 17(1):806.
- 22 Graf EH, Simmon KE, Tardif KD, et al. Unbiased detection of respiratory viruses by use of RNA sequencing-based metagenomics: a systematic comparison to a commercial PCR panel[J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(4):1000-1007.
- 23 Parize P, Muth E, Richaud C, et al. Untargeted next-generation sequencing-based first-line diagnosis of infection in immunocompromised adults: a multicentre, blinded, prospective study[J]. Clin Microbiol Infect, 2017, 23(8):574. e1-574. e6.
- 24 Schlager R, Queen K, Simmon K, et al. Viral pathogen detection by metagenomics and pan-viral group polymerase chain reaction in children with pneumonia lacking identifiable etiology[J]. J Infect Dis, 2017, 215(9):1407-1415.
- 25 Gu W, Deng X, Lee M, et al. Rapid pathogen detection by metagenomic next-generation sequencing of infected body fluids[J]. Nat Med, 2021, 27(1):115-124.
- 26 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.