

医学参考报

微生物与感染专刊

Microbiology and Infection

第六期 NO.06

mNGS 在临床病原学诊断中的应用

【据《Clin Chem》2021年12月报道】题：宏基因组二代测序在感染性疾病诊断中的应用（美国加州大学旧金山分校检验医学系 作者 Miller S 等）

宏基因组二代测序技术（metagenomics next-generation sequencing, mNGS）越来越多用于检测疑似感染病例中的病原体。这种无偏检测方法能对广泛的感染类型进行诊断，可比任何单一方法检出更多的潜在病原体。传统的感染性疾病诊断依赖于培养、抗原或分子标记物直接检测患者样本中的病原体，或基于宿主和抗体对感染的反应进行间接检测。mNGS 无须预设，不依赖于传统的微生物培养，而是检测标本中所有病原体核酸序列，识别核酸序列 [DNA 和（或）RNA] 作为生物标志物来鉴定患者样本中的病原体，可鉴定更广泛的微生物种类。本文主要关注 mNGS 在临床病原学诊断中的应用。

一、mNGS 的检测流程

mNGS 的检测流程分为分析前、湿实验分析、干实验分析与分析后流程（图 1）。mNGS 分析前主要涉及样本的采集和运输，采集用于 mNGS 的最佳标本对于准确的 mNGS 报告至关重要。标本类型的选择很大程度上取决于患者的临床症状，但也需考虑采集时间对样本质量的影响，尽可能采集感染局灶部位样本。采集样本过程需严格无菌操作，避免污染。采集的样本要有足够的量，并及时送检。mNGS 湿实验流程主要是生成临床样本的序列数据。第一步是核酸提取，核酸提取需要按标本类型进行不同的前处理，提取前的微生物富集可以通过不同的细胞裂解方式实现。核酸提取后，用样品中的核酸混合物进行文库制备。文库构建的目的在于给未知序列的核酸片段两端加上已知序列信息的接头以便于测序，单样本文库构建完成后需进行 PCR 扩增、再将多个文

库样本混合进行测序。RNA 测序则需进行逆转录步骤，把样本中的 RNA 逆转录成 cDNA。测序前需要测定文库样品的浓度，以确定合适的测序深度和序列长度，减少测序错误率。mNGS 干实验室流程主要是生物信息学分析，以识别序列数据中的病原体核酸序列。主要步骤是下机数据过滤、宿主过滤、生物数据库比对、按物种进行分类和基因组图谱分析，根据丰度、序列数量、基因覆盖度等进行排序，根据检测阈值筛选病原菌，最终得出报告。mNGS 最后的分析数据与相关的临床信息一起呈现在报告中，这份报告阐述了所鉴定的微生物以及相关的测序指标，并包括关于检测病原潜在临床意义的解释性评论。由于 mNGS 能够检测任何病原体，被内源性或环境菌群污染的样本可能会出现假阳性，而关于这些可能是污染的注释对于告知临床医生是非常必要的。检测到异常病原体或高致病性病原体需与临床医生进行讨论，以指导后续检测和治疗方案。

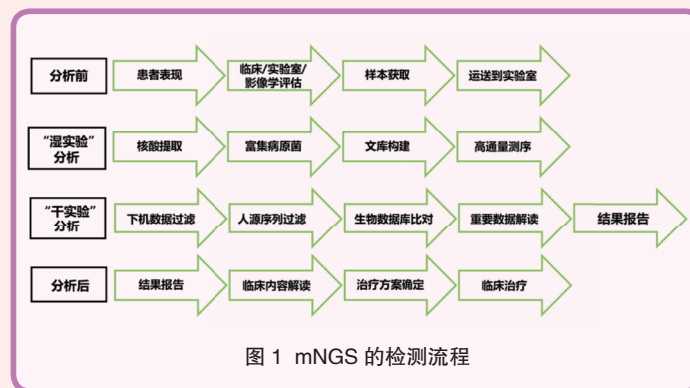


图 1 mNGS 的检测流程

二、mNGS 在感染性疾病中的应用

越来越多的研究对 mNGS 在临床病原学诊断的性能进行了评估，最初的研究主要集中在病例报告或小规模病例系列，但目前有了更大规模的研究。研究所涉及的感染性疾病主要集中在中枢神经系统感染、脓毒症、不明原因发热、心内膜炎、呼吸道感染、关节感染、眼部感染及组织感染等

领域，涉及范围逐渐延伸拓展，mNGS 正不断显示出其特有的优越性。

1. 中枢神经系统感染

脑脊液 mNGS 验证结果表明，其阳性符合率为 81%，阴性符合率为 99%。随后的临床试验表明，22% 的中枢神经系统感染感染仅用 mNGS 即可诊断，其中近半数 mNGS 结果可用于指导治疗决策。

2. 脓毒症

有研究应用 mNGS 对血流感染患者进行病原体诊断，相比血培养，mNGS 能显著提高诊断的敏感性，灵敏度高达 94%，mNGS 也能在 15% 的血培养阴性病例中发现潜在病原体。

3. 不明原因发热

研究表明，mNGS 能够检测热带地区登革热、寨卡病毒和其他病毒。对于免疫功能低下的患者，特别是中性粒细胞减少发热患者，大幅提高病原体的检出率，因为这些患者具有广泛的潜在病原体感染风险。

4. 心内膜炎

mNGS 对培养阴性心内膜

炎数据可反映宿主免疫反应，以进一步确定对呼吸道感染的免疫反应，并有助于将生物体检测分类为可能的责任病原体和疑似共生微生物群。

6. 关节感染

人工关节感染相关研究发现，mNGS 的灵敏度（88% ~ 96%）高于培养（52% ~ 80%），mNGS 对病原体鉴定的灵敏度（96%）也高于细菌的 16S PCR（82%）。mNGS 应用于培养阴性病例诊断人工关节感染，这可以提高成本效益。

7. 眼部感染

mNGS 应用于眼内感染的病原学诊断，结果显示 mNGS 不仅与 PCR 检测阳性标本结果高度一致（阳性符合率 > 85%），还可检出非典型病原体，包括风疹病毒、人类 T 淋巴细胞病毒、二氧化碳噬纤维菌、茄病镰刀菌与丝虫等。

8. 组织感染

mNGS 可以识别组织样本中的其他生物体，尤其是厌氧菌和病毒。研究表明，以临床诊断为参考，mNGS 检测的阳性符合率（86%）高于培养（45%）和常规方法（58%）。由于人类宿主背景的影响，mNGS 检测仍存在挑战，可考虑 16SRNA 的富集。

目前，mNGS 在临床病原学诊断中的应用中取得越来越多的成果和进展，被认为是临床病原学诊断的重要手段之一。大多研究表明，mNGS 具有类似于 PCR 检测的敏感性，这种新型的无偏检测方法能对广泛的感染类型进行诊断，并且比传统方法识别更多的潜在病原体，但 mNGS 目前仍存在局限性，由于污染和无临床意义的微生物检测造成的低特异性是其重要的关注点，这也强调了解读微生物致病性与临床症状潜在关联的重要性，尚待进一步的研究来评估 mNGS 检测对临床结局的改善及成本效益。

（广东省人民医院 凌勇 顾兵 编译）

执行主编简介



顾兵 教授

医学博士、博士研究生导师、博士后合作导师，现任广东省人民医院检验科主任、学科带头人。美国普渡大学及 UCLA 访问学者，省“科教强卫”医学重点人才、“333 工程”人才、“六大人才高峰”人才、“六个一工程”高层次卫生人才。全国检验医学专家国际论文学术影响力排名第三十五，现担任中华医学会检验分会青委会副主任委员、中国医学装备协会检验医学分会副会长，J Lab Precis Med 执行主编。

主要从事重大传染病快速检测新技术与耐药菌感染防控，主持国家级基金 4 项、省部级 8 项。以第一或通讯发表论文 165 篇，包括 SCI 论文 99 篇，JCR1 区论文 38 篇，10 分以上 9 篇，累计影响因子 562.4 分，H-index 为 34，被引频次总计 4700 余次；编写学术专著和教材 36 部，获授权专利 7 项，获省科学技术奖 8 项。

导读

- mNGS 报告解读那些事儿 **2**版
- 联合检测方法在成年 SCAP 患者病原体鉴定中的应用 **3**版
- mNGS 在腹腔感染脓毒症患者微生物学诊断中的应用 **4**版
- 联合中枢神经系统宏基因组学与宿主反应诊断中枢感染 **5**版
- mNGS 在中国首例鸚鵡热家庭暴发中的应用 **6**版
- 通过宏基因组和宏转录组看 COPD 宿主和微生物 **7**版

病原宏基因组技术(mNGS)当前应用进展迅速,“蒲公英”式开展为各级医院疑难危重特殊感染病患早期精准诊断带来巨大价值,然而,mNGS广覆盖所带来的检测结果多种多样,而且当前多家企业单位结果报告逻辑并不一致,部分结果让临床医生眼花缭乱。本篇提及一些mNGS概念要则,为临床医生深入认知、规范应用mNGS做支撑(图1)。

一、技术解读定义与挑战

mNGS报告是怎么解读出来的?原始列表中那么多菌,哪一个要考虑?此类问题实际是在关心mNGS报告出具的技术过程。何为技术解读?我们将mNGS数据下机后,经过初步的生物信息比对以及按照初步病原体类别分类后,交由以检验专家为主要参与人员进行解读的过程,称为技术解读。

技术解读从业人员通常需要具备微生物、分子检测、临床医学、甚至生物信息学等方面的多学科知识。因当前mNGS技术解读主要在第三方检测单位完成,技术解读人员与临床专家密切沟通存在一定的“脱节”,获取并联合患者的诸多临床信息进行综合解读困难重重。当然,现阶段国内部分顶级三甲医院已经搭建

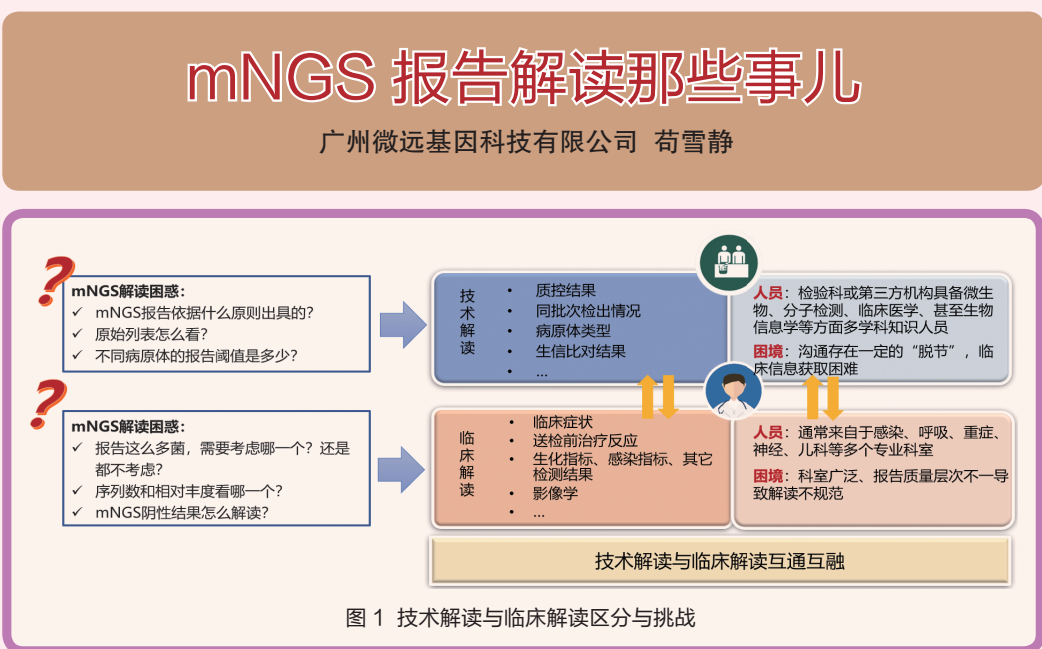


图1 技术解读与临床解读区分与挑战

mNGS本地化平台并开展了临床应用。此种模式下,技术解读人员可以更加充分地基于患者临床信息进行技术解读。

二、临床解读定义与挑战

检出这么多病原体,该考虑哪一个?这个病原体很少见,要不要考虑?此类问题实际上是在关注mNGS报告出具后,一份报告如何结合患者的临床信息进行解读。何谓临床解读?我们将mNGS报告出具后,临床专家在技术解读专家的支持下,在更充分的临床信息比如生化指标、临床症状、其他检测结果与影像学,综合多方

位因素进行解读的过程,称为临床解读。

临床解读的专家通常来自感染、呼吸、重症、神经、儿科等多个专业科室。因mNGS技术所涉及的感染相关临床科室广泛,技术解读的指标不一,从业人员的资质不一,就会导致临床专家拿到报告质量层次不一。如何准确通过“火眼识别”报告结果的可靠性,成为了当前难点与痛点。因而临床专家对mNGS的报告解读不仅局限于临床的解读,更加需要与技术解读专家沟通,关注“背后的故事”,最终做出综合诊疗。

三、技术解读与临床解读互通互融

相较于其他检测方法,mNGS前处理到报告解读等任一环节的微小扰动将会影响mNGS的检测结果甚至患者预后。例如当前mNGS行业最大的挑战之一,即是各种提取建库试剂极难做到“无核酸化”。目前这一难点成为了检测单位间是否能准确进行解读的分水岭之一,也附带影响着临床解读的准确性。

因此,技术解读不仅局限于技术环节,更需要关注检验背后的目标患者,临床解读不仅只关注临床解读,更需要关注背后的

作者简介

苟雪静

中山大学微生物学硕士,微远基因高级产品经理,广东省精准医学应用学会微生物分会委员。具有6年病原宏基因组学研发与临床应用经验,已发表SCI文章5篇以上,累计影响因子20+,撰写病原宏基因组解读与进展文章200余篇。

技术细节,检测方与临床通过密切的沟通后,共同确认检测结果的可信度以及与临床的符合度,进一步制定患者的诊疗策略。因此,mNGS报告解读的分类强调了技术的先进性与特殊性,并非作为拉开检验与临床的一条“三八线”,而是一条拉近技术解读与临床解读的“牵引绳”。互通互融,增强沟通,是mNGS广泛应用,更好服务病患核心要素。

四、总结

mNGS的到来让耶氏肺孢子菌、鹦鹉热等传统检测方法难检测的病原体变得更加常见,从核酸检测层面一定程度“改变”了临床与检验学科对当前感染病原谱的认知。同样,mNGS的到来也抛出了很多技术与临床解读的疑问。关注并重视mNGS报告解读这最后一道全流程关口,是当前临床的迫切需求,也是方法学广泛应用的必走之路。我们期待更多细化后的技术解读与临床解读要点,助力mNGS更好地用于疑难危重感染病患。

宏基因组学在下呼吸道感染病原学分析及耐药性预测中的应用

【据《Microbiology Spectrum》2022年2月报道】题:宏基因组学二代测序技术在下呼吸道感染病原学分析及耐药性预测中的应用(中国江苏大学附属人民医院 作者 Liu H 等)

下呼吸道感染(LRTI)的发病率和病死率较高,特别是在儿童、老年人和免疫低下人群中。由于下呼吸道感染是由包括细菌、病毒和真菌在内的数百种病原体引起的,因此,很难及时准确地确定病原体。目前,常规的病原体检测包括微生物培养、组织病理学、聚合酶链式反应等,而这些检测方法已不能满足下呼吸道感染诊断和预后的需要。宏基因组二代测序技术(mNGS)的快速发展为LRTI的诊断和治疗

提供新的见解,而如何解释mNGS结果在LRTI中的应用很少,因此,本研究同时对下呼吸道标本进行常规微生物检测和mNGS检测,比较两种方法在LRTI病原学分析及耐药性预测中的价值。

本研究同时对46例疑似下呼吸道感染患者的下呼吸道标本进行常规微生物检测和mNGS检测。利用受试者工作特征(ROC)曲线评估了上述三种指标在LRTI中鉴定病原菌的性能,并建立了病原菌鉴定的分界值。使用截止值分析LRTI中的真阳性病毒,并确定哪些病毒易与细菌混合感染。同时分析mNGS对抗生素

下转第3版

医学参考报

理事长兼总编辑:巴德年
副理事长兼副总编辑:曹雪涛等
理事会秘书长:周赞

社长:魏海明
副社长:吕春雷
副社长:周赞

社址:北京市西城区红莲南路30号红莲大厦
B0403
邮编:100055
总机:010-63265066
网址:www.yxckb.com

微生物与感染专刊

第二届编辑委员会

学术顾问: FanrongKong 王金良 王贵强 李天生 张秀珍
陈民钧 倪语星 童明庆 (按姓氏笔画排序)
名誉主编: 夏薇 薛博仁 (按姓氏笔画排序)
主编: 徐英春
副主编: 卓超 郑波 俞云松 逢崇杰 顾兵 韩崇旭 (按姓氏笔画排序)
常务编委: 李轶 余方友 张菁 周志慧 单斌 赵鸿 徐和平 徐雪松 曹壮 韩艳秋 辜依海 喻华 鲁辛辛 廖康 魏莲花 (按姓氏笔画排序)
编委: 王琳淇 王福祥 王豫萍 方秋红 邓淑文 石荔 占萍 叶枫 包学英 朴文花 朱镭 李俊明 杨青 沈继录 张华 张静 阿祥仁 陈丽萍 陈益国 范铁艳 林宁 国钰梅 赵建宏 胡辛兰 姚立琼 郭大文 郭经滨 黄涛 黄文辉 曹存巍 康梅 (按姓氏笔画排序) 企业编委: 李永军 麻锦敏 康可人 韩剑锋 (按姓氏笔画排序)
本期执行主编: 顾兵

第二届青年编辑委员会

主任委员: 徐英春
副主任委员: 王贺 王俊瑞 任传利 李刚 张丽 (按姓氏笔画排序)
青年编委: 王毅 王凯飞 方文捷 朱鹏飞 刘旭 刘笑芬 孙于谦 李雪 李楠 李颖 李征途 李俊峰 李晓波 吴华 时景伟 邹盛华 宋贵波 张杰 张莉 张琦 张任飞 陈良远 范欣 郑瑞 栾艳森 程敬伟 (按姓氏笔画排序)
编辑部主任: 王贺
广告部主任: 张琪
办公室主任: 杨洋
宣传组组长: 王瞳
副主任: 郁静 刘亚丽
主任助理: 黄晶晶 井然
项目组组长: 杨文航
财务组组长: 张戈
责任编辑: 黄晶晶 井然 杨洋 郁谨茵 姚丽康 闫梦瑶 刘晓晨 张弘 赵云虎 李玉武

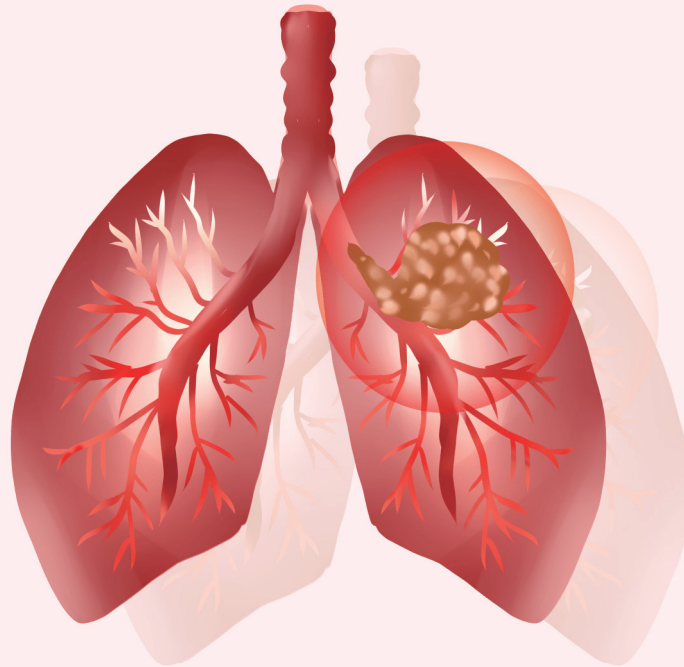
联合检测方法在成年 SCAP 患者病原体鉴定中的应用

【据《Emerg Microbes Infect》2022年2月报道】题:联合检测方法鉴定成年人重症社区获得性肺炎(SCAP)的病原学:中国的一项多中心前瞻性研究(中国上海交通大学医学院附属瑞金医院 作者 瞿介明等)

社区获得性肺炎(CAP)是全球主要的传染病疾病负担。SCAP是最严重的一种,占住院CAP患者的17%~21%。然而,作为一种特殊的异质性疾病,大多数CAP的研究都是在发达国家进行的,中国SCAP疾病流行谱尚不完整。近年来,病原体分子检测技术的敏感性、可获得性和可负担性有了很大的改善,有助于医生更好的理解SCAP病因。本研究利用联合检测方法[综合利用常规微生物培养、抗原抗体检测、聚合酶链反应(PCR)和宏基因组二代测序(mNGS)检测致病原],结合临床表现综合判定SCAP致病原。旨在描述中国成年SCAP患者的临

床特点,并评估联合检测的益处,以帮助临床医生做出更准确的临床判断。

来自中国的瞿介明教授等学者开展了这项多中心、前瞻性、观察性研究。该研究根据中国胸科学会(2016版)指南对所有诊断为SCAP的成年住院患者进行筛查。纳入标准:(1)需要气管插管行机械通气治疗;(2)脓毒症休克经积极液体复苏后仍需要血管活性药物治疗;(3)符合 ≥ 3 个次要标准:①呼吸频率 ≥ 30 次/min;②氧合指数 ≤ 250 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa);③多肺叶浸润;④意识障碍和(或)定向障碍;⑤血尿素氮 ≥ 7.14 mmol/L;⑥收缩压 < 90 mmHg需要积极的液体复苏。收集患者基线数据,所有临床数据均上传至在线数据库。利用上述联合检测技术对患者血液、尿液和呼吸道标本进行微生物检测,由当地中心主治医师团队和本研究专家组根据各检



测结果、患者临床特征和治疗反应确认本次致病原。使用SPSS和R软件对数据进行统计分析。

研究发现:(1)本研究共纳入328例成年SCAP肺炎患者,终纳入275例(92.3%)用于最终分析。(2)在275

例符合条件的患者中,仅77例(28.0%)未能找到致病原。中国SCAP患者的五大常见致病原依次为流感病毒(23.2%,46/198)、肺炎链球菌(19.6%,39/198)、肠杆菌(14.6%,29/198)、嗜肺军团菌(12.6%,25/198)、肺炎支

原体(11.1%,22/198)。此外,鹦鹉热衣原体和钩端螺旋体在2019年有所增加。(3)在应用联合检测方法时,病原检出率为74.2%(222/299),而常规培养为14.4%(43/299),不使用mNGS时为40.8%(122/299)。(4)联合检测方法提高了致病原检出率,明确致病原与未明确的SCAP患者的住院死亡率分别为21.7%(43/198)和25.9%(20/77)。(5)30d死亡率为18.9%(52/275),63例(22.9%)在医院死亡,其中20例(31.7%)没有明确致病原。

综上,中国SCAP的主要致病原为流感病毒、肺炎链球菌和肠杆菌科细菌,其中流感病毒有明显的季节分布性。早期即采用联合检测方法提高了致病原检出率,对患者生存有益。临床医生应该意识到罕见病原体的出现,包括鹦鹉热衣原体和钩端螺旋体。

(广州医科大学附属第一医院 姚丽康 卓越 编译)

宏基因组二代测序提高肺炎病原体的诊断鉴别能力

【据《J Transl Med》2022年5月报道】题:过宏基因组测序增强肺炎患者DNA和RNA病原体检测(中国北京大学人民医院 作者 He Y 等)

目前常规的肺炎病原体检测方法主要有病原体培养、直接/间接免疫荧光测定、聚合酶链反应(PCR)和环介导等温扩增(LAMP)等,但这些方法都有局限性,有20%~60%的肺炎患者中没有鉴定出病原体。近年来,宏基因组二代测序(mNGS)的应用越来越广泛,在全面检测已知和未知微生物方面具有独特优势。然而呼吸道样本,尤其是支气管肺泡灌洗液(BALF)的病原体

载量非常低而宿主核酸比例较高,因此,难以从呼吸道定植菌和环境污染中区分出真正的病原体。该研究通过优化mNGS流程同步检测肺炎患者呼吸道样本中的DNA和RNA病原体,旨在评估与常规病原体检测方法相比,优化后的mNGS流程在肺炎病原体检测中的临床效用。

研究者自2013—2019年共采集北京、郑州和福州8家三级医院的151例肺炎确诊病例的呼吸道样本(痰液或BALF),并对样本进行回顾性分析。为了提高mNGS检测性能,研究者优化了宿主DNA去除程序和RNA文库制备程序,通过皂苷

和Turbo DNase去除人类DNA,并与商业人类DNA去除试剂盒(MolYsis)比较。该研究纳入确诊为肺炎且呼吸道样本和检测过程通过了mNGS质量控制的151例患者,并以没有肺炎、肺癌或任何其他呼吸道疾病的个体样本作为对照组,用作识别呼吸道样本中“背景菌群”作为背景集以优化检测流程。优化后的NGS流程在1个工作日内完成。

对BALF样本的mNGS检测结果显示,在未经处理的样本中,宿主DNA读取的原始比率超过99%,经皂苷法处理后降低到大约90%,且检测出更多的阳性病例和更多种类的病

原体;皂苷法处理后微生物组的读数较未处理样本产生了大约20倍的富集。此外,与商业试剂盒MolYsis去除人DNA相比,皂苷法在病毒的检测上更具优势。对常规检测和mNGS检测结果的比较显示,在所有151例患者中,常规培养共检测到19种病原体,其中大部分是细菌和真菌(其中白念珠菌是常规培养最易检测的病原体);mNGS则检测到47种病原体且具有更广泛的病原体谱,包括了细菌、病毒、真菌、支原体、衣原体和螺旋体,尤其是病毒和其他非典型病原体(其中肺炎支原体和铜绿假单胞菌易被检测)。最后,对mNGS与

常规测试之间的一致性分析显示,优化后的mNGS灵敏度为70.4%,特异性为72.7%,总体一致率为71.5%。

综上所述,优化后的mNGS流程对检测以BALF为主的呼吸道样本能够有效去除宿主核酸并富集微生物组的读数。与常规检测相较,mNGS对肺炎病原体的检测具有更高的微生物检测率和更广泛的病原体谱(尤其是对于病毒和一些难以培养的病原体),在细菌检测方面可能表现出比常规培养更好的效果,但在真菌检测方面并不优于常规检测。

(复旦大学附属中山医院 华剑兰 张静 编译)

上接第2版

耐药性预测的准确性。

结果显示,46例受试者中,常规方法共检出38株细菌、1株烟曲霉菌和2株人呼吸道合胞病毒,而mNGS法鉴定出63株细菌、1株烟曲霉菌和61株病毒。mNGS共鉴定出61种病毒,其中35种根据Lg(RPKM)阈值被认为是真阳性病毒。最常见的真阳性病毒为人疱疹病毒4型,其次为人 α 疱疹病毒1型。人类 γ 疱疹病毒4型最有可能与细菌共感染,10株人 γ 疱疹病毒4型中有6株(60%)与13株细菌共感染。药敏试验显示携带耐药基因的细菌耐药(用mNGS检测)。然而,部分多重耐药菌的耐药基因未被检测到。

综上所述:与常规检测方法相比,mNGS检测病原菌的假阳性率明显提高。

Lg(RPKM)和基因组覆盖率都能鉴定出真阳性病原菌,其中Lg(RPKM)的检测效果最好。相关分析还表明,病原菌的相对丰度与Lg(RPKM)之间没有显著的相关性,这主要是因为相对丰度受样品中细菌基因组总数的影响。因此,相对丰度不是鉴别真阳性和假阳性病原菌的理想指标,但本研究还具有局限性,真菌病原体因样本量较小而不能进行分析,细菌Lg(RPKM)阈值鉴定的真阳性病毒大多无法用其他方法确认,疱疹病毒检测的临床意义有待确定。尽管如此,本研究仍然为mNGS在LRTI中的适用性提供了一个新的视角。与传统的微生物检测方法相比,mNGS具有多重优势。尽管mNGS在临床应用中仍需要克服许多挑战,但它将是临床微生物学诊断的一项革命性技术。

(江苏省苏北人民医院 王雅惠 韩崇旭 编译)

mNGS 在腹腔感染脓毒症患者微生物学诊断中的应用

【据《Front Microbiol》2022年2月报道】题：血浆 mNGS 与腹腔引流液培养在腹腔感染脓毒症患者中的检测能力比较（北京协和医院重症医学科 作者 Li DK）

对于腹腔感染患者，腹腔引流液培养（PD）是检测病原体的常用方法，临床环境中 PD 培养的阳性率为 19.5% ~ 63.7%，而培养和药敏结果通常需要超过 72 小时，因此，需要一种新的方法对病原学进行检测。自 2010 年以来，宏基因组测序（mNGS）技术具有高通量的能力和无偏倚病原体检测的优势，已被应用并验证为诊断感染病的方法。然而，对于腹腔感染脓毒症患者，研究 mNGS 表现的相关临床研究是有限的，因此，本研究旨在比较血浆 mNGS 与常规 PD 培养对腹腔感染脓毒症患者的病原检测能力。

来自北京协和医院重症医学科的 Li DK 等研究者，收集了自 2018 年 1 月至 2020 年 12 月，共 109 例腹腔感染脓毒症患者病例，进行了一项单中心的前瞻性观察性研究。排除标准：（1）临床数据不完整，包括没有微生物学数据；（2）未能在重症医学科（ICU）入院后 24 小时内获取足够的样本进行 mNGS 分析；（3）预期寿命小于 24 小时；（4）未满足纳入标准或未获得书面同意。123 例腹腔感染脓毒症患者，其中 6 例因至少 24 小时无法存活而被排除在外，8 例患者因临床数据不足而被排除。最终，109 例患者被纳入分析。所有 109 例患者均接受了常规 PD 培养（需氧和厌氧）和血浆 mNGS 检测。在 PD 培养中检测到 92 例阳性标本，而血浆 mNGS 检测到 61 例阳性标本（图 1）。45 例患者（44.0%）血浆 mNGS 和 PD 培养结果有相同病原菌。结果显示 PD 培养阳性的数量明显高于血浆 mNGS。

与 PD 培养相比，血浆 mNGS 检出病原菌更快。根据 mNGS 的结果，接受初始抗菌药物治疗的患者在住院时间和纠正休克时间都少于未在 48 小时接受抗菌药物治疗的患者，显示出更好的临床结果。

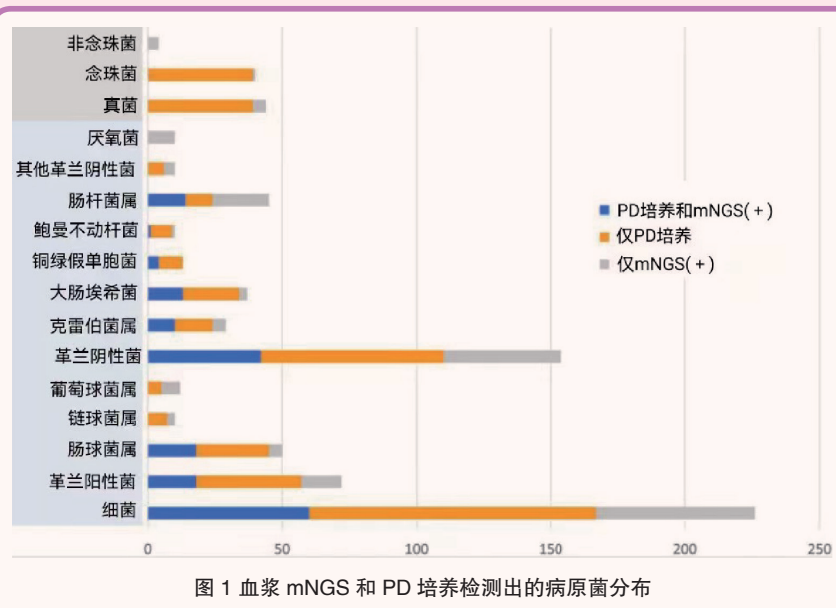


图 1 血浆 mNGS 和 PD 培养检测出的病原菌分布

综上所述，在腹腔感染脓毒症患者中，血浆 mNGS 可以通过识别病原体的循环 DNA 来提供早期、非侵入性的快速诊断。与传统的 PD 培养方法相比，血浆 mNGS 培养法更快速，但检出病原菌数量少，未体现出明显优势。该研究也同样提示要合理利用与理解 mNGS 在临床实际应用中的价值。

（宁夏医科大学总医院 郭琴琴 李刚 编译）

mNGS 在冠状动脉钙化致病机制研究中的应用

【据《Sci Rep》2022年1月报道】题：冠状动脉粥样硬化患者血液中存在牙周致病菌（哥伦比亚联合大学牙科学院 作者 Corredor Z 等）

牙周炎是世界第六大疾病，全球有 5% ~ 20% 的成年人患有严重牙周炎。口腔组织中存在 500 ~ 700 种微生物，这些细菌能形成生物膜，在组织结构上黏附、播散和生存，破坏牙周组织引起宿主的炎症反应，从而导致牙龈炎或牙周炎。有研究表明，口腔细菌与冠状动脉粥样硬化（CAD）、卒中等全身性疾病相关，有可能与牙周细菌在动脉斑块上定植、释放炎症因子、激活宿主自身免疫反应、产生细菌毒素，促进细胞通透性增加和凋亡等相关，但致病机理尚不明确。为评估牙周细菌与动脉斑块之间的关系，以往常用分子生物学技术来检测少数的牙周病原体，对其他牙周病原体的研究甚少。本研究拟通过宏基因组测序法（mNGS）对 CAD 患者和健康人群外周血液中存在的龈下菌斑复合物中细菌种类、丰度及生物多样性进行分析，从而评估牙周菌群在动脉粥样硬化中的作用。

来自哥伦比亚联合大学牙科学院的 Corredor Z 等研究者从 NCBI GEO 数据库中获得来自 8 例 CAD 患者（CAC 积分 > 500）和 8 名健康人（CAC 积分 = 0）外周血中细菌的 RNA 序列。使用 Hisat2 v.2.1.0

与 GRCh38 参考基因组来绘制序列，unmapped 序列用 Kraken v.1.020 来分析，由 Pavian 生成细菌分类报告，Vegan v.2.5.6 计算细菌丰度和多样性。DESeq2 v.1.28.1 比较两组之间每个标准等级的细菌计数。Welch 双样本 *t* 检验分析两组间物种平均计数，InteractiVenn 绘制了维恩图。

结果显示，51 种细菌仅在 CAD 患者、41 种细菌仅在健康人群中存在。有心杆菌目、棒状杆菌目和梭杆菌目等 1 门、1 纲、3 目、2 科、1 属的菌数在两组间有显著差异（ $P=0.00031$, 0.00030 , 0.00001 ），有 23 种牙周细菌在两组血液中存在，有 12 种细菌出现频率有显著差异（图 1），而这以往未见报道。CAD 患者中具核梭杆菌的发生率明显偏少（ $P=0.0012$ ），牙龈卟啉单胞菌则更多见（ $P=0.030$ ）。

综上所述，本研究发现 CAD 患者和非 CAD 患者外周血中存在的牙周细菌种类有显著差异，支持了 CAD 患者龈下菌斑复合病原体能通过血液从口腔播散到动脉，从而引起或加剧动脉粥样硬化这一假说。因样本量小、临床资料不充分等原因，此研究的数据可用性受限，但本研究中已报告的细菌可进一步深入研究。（绵阳市第三人民医院 张任飞 编译）

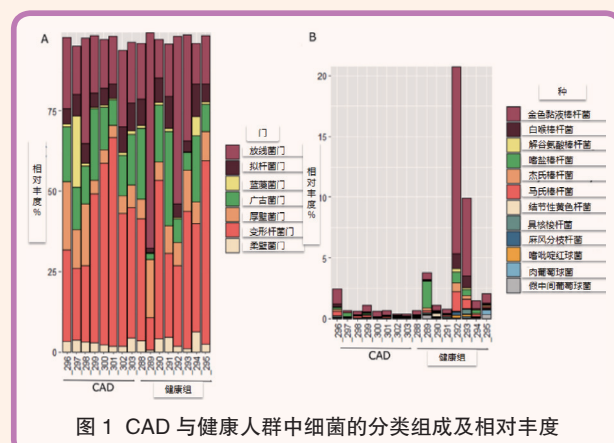


图 1 CAD 与健康人群中细菌的分类组成及相对丰度

mNGS 对免疫缺陷患者感染性疾病的诊断能力

【据《Blood Rev》2022年5月报道】题：采用 mNGS 诊断免疫缺陷患者的感染性疾病（美国华盛顿大学医学系过敏和传染病科 作者 Casto AM 等）

对免疫缺陷患者进行感染性疾病诊断给临床带来较大挑战，免疫缺陷患者通常会由罕见或未知病原体引发感染，感染时症状表现不典型，且易发生混合感染。免疫缺陷患者既往所患有的某些疾病，会产生类似于感染的体征和症状，使得临床对感染的评估既耗时又需大量的检测结果来排除感染。同时对免疫缺陷患者进行感染诊断的复杂性也包括：基于对病原体抗体的检测，在无法产生抗体反应的患者中，其结果可能不可靠；另外，活检样本的采集对患者来说更易使其在术中出现继发性感染等，而目前利用非靶向的 mNGS 诊断方法来检测病原体，已在很多免疫缺陷患者的感染诊断中得到广泛应用。

本研究列举了 mNGS 中的关键步骤，该过程从临床样本中提取核酸开始，然后对提取的物质片段化，通过 PCR 扩增上述片段后测序，将扩增的查询序列与来自微生物的已知序列数据库进行比较，以计算方式确定核酸的来源物种。

研究同时回顾了 2008—2020 年已发表的病例报道，其中 mNGS 已被用于免疫缺陷患者的感染诊断，多个案例从患者脑脊液或脑活检组织中明确了病原体。也有关于虫媒病毒感染的报道，如在肾移植患者中诊断出西尼罗河病毒，在接受治疗的淋巴瘤成年患者中发现圣·路易脑炎病毒感染的致命病例等。另外，戊型肝炎病毒、星状病毒引起的脑炎，因器官移植感染沙粒病毒、蝉传脑炎病毒，弓形虫引起的中枢神经系统感染等病例，均采用了 mNGS 被证实。通过分析，其中一些病例若可尽早获得 mNGS 结果，患者的最终结局则可能会有所不同，而多数死亡病例是因病毒感染，未及时进行有效治疗造成的。

研究发现，相关案例和系列文章主要介绍了 mNGS 作为诊断工具的成功案例。当前以免疫缺陷患者为对象的 mNGS 研究数量有限，同时研究也按照样本类型（脑脊液、血浆、呼吸道样本、尿液样本及混合样本）对有参考价值的文献进行了回顾，并评估了 mNGS 的性能指标，包括灵敏度、特异性、阳性预测值和阴性预测值。最终结果提示，目前对 mNGS 的大多数研究规模有限，未来仍将继续研究如何更好地量化 mNGS 的诊断性能问题。而文章也指出，小规模研究为接下来的荟萃分析、为未来在免疫缺陷患者中进行更大规模的研究奠定了基础。

综上所述，mNGS 在诊断免疫缺陷患者感染性疾病中具有广阔前景，同时在其未来研究的过程中，还需调查 mNGS 的成本效益，评估 mNGS 的检测性能，探讨抗菌药物对 mNGS 的影响等一系列问题。

（广东省人民医院 赵越 顾兵 编译）

联合中枢神经系统宏基因组学与宿主反应诊断中枢感染

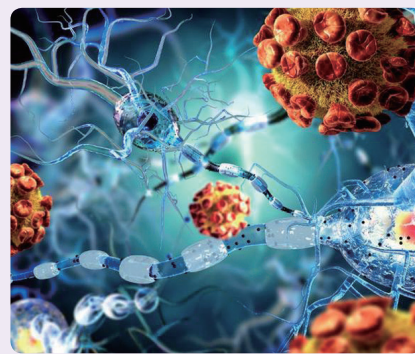
【据《Nat Commun》2022年3月报道】题:联合中枢神经系统宏基因组学与宿主反应诊断结核性脑膜炎及其相似感染(加利福尼亚大学威尔神经科学研究所 作者 Ramachandran PS 等)

结核性脑膜炎(TBM)是结核病最严重的并发症,早期和适当的治疗对于降低发病率和死亡率至关重要,但诊断非常困难,培养和核酸检测缺乏敏感性,而临床表现、影像学 and 实验室检测又缺乏特异性。宏基因组学(mNGS)是一种有效的神经感染病诊断分析方法,诊断TBM特异高,但敏感度欠缺。本研究旨在通过脑脊液mNGS数据中的人类基因表达成分来开发一种互补的机器学习分类器(MLC),结合mNGS提高检测性能。

来自加利福尼亚大学威尔神经科学研究所的 Ramachandran PS 等研究者招

募了368例患有亚急性脑膜炎的乌干达成年HIV感染者,根据统一病例定义将患者分为确定的、疑似的、可能的、不确定和非TBM,对脑脊液总mNGS的RNA和DNA文库进行测序以鉴定脑膜炎病原体。该研究团队首先创建了一个240人的训练组,组内包含明确患有TBM和其他神经系统疾病,包括疑似的TBM、可能的TBM、不确定和非TBM的患者,通过这个组确定结核病的最佳报告阈值,并构建MLC,然后又建立了一个130人测试组(其中有2人各在2个组),通过盲法用测试组评估单独宿主基因表达MLC,和联合了mNGS和宿主基因表达MLC两种方法在诊断有无TBM患者时的敏感性和特异性,并使用生物信息学技术评估浅层测序联合MLC的检测能力。

mNGS识别了一系列与TBM相似



的感染(以及合并感染),包括新出现的、可治疗的和疫苗可预防的病原体,如Wesselsbron病毒、弓形虫(*Toxoplasma gondii*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、巴西诺卡氏菌(*Nocardia brasiliensis*)、麻疹病毒(measles virus)和巨细胞病毒(cytomegalovirus)。结合mNGS的特异性和MLC的敏感性,二者

联合检测对TBM及其许多相似疾病的检测具有较高的敏感性(88.9%)和特异性(86.7%),且测序深度对MLC的敏感性或特异性并未产生影响。

综上所述,通过mNGS可检出许多以前未诊断的神经系统感染。此外,该研究还开发了一种联合mNGS和脑脊液宿主转录组分析的方法来诊断TBM与其他非结核性脑膜炎。且随着病例数的增加,这种联合方法的准确性还将提高,并有望更灵敏、更快地检测可治疗或疫苗可预防的疾病如TBM、TBM合并感染和TBM相似的感染。最后,从脑脊液微量的细胞中提取有用的宿主转录组学数据的能力,预示着未来MLC的发展,即可以区分其他临床重叠的神经炎症综合征,如病毒性脑炎和自身免疫性脑炎。

(海南省人民医院 吴华 编译)

宏基因组二代测序技术在新生儿感染疾病的应用

【据《Frontiers in microbiology》2022年3月报道】题:宏基因组二代测序技术在新生儿感染疾病诊断和监测中的应用(来自中国湖南儿童医院新生儿科 作者 Rong Zhang 等)

微生物感染是导致新生儿群体发病和死亡的一个重要原因,而传统的微生物检测通常需要较长的检测时间并且灵敏度较低,因此,需要一种准确的诊断检测技术来检测病原体。微生物检测和鉴定的黄金标准是微生物培养,而由于有限的样本量、间歇性菌血症以及产妇在产后的抗菌药物暴露等因素导致在新生儿感染疾病中的微生物培养检出率较低。

宏基因组二代测序技术(mNGS)是

不依赖微生物培养的,具有检测广泛微生物和抗菌药物抗性基因的优势,可从临床上的各种标本中检测出微生物种类及对该微生物核酸进行测序。

本研究在新生儿重症监护室招募了10例怀疑有微生物感染的患儿,收集患儿的外周血、痰液、支气管肺泡灌洗液和脑脊液等进行mNGS检测和常规微生物学检测,通过生物信息学分析及统计学分析来描述受试者的特征。

研究发现,(1)研究纳入10例患儿,年龄中位数为19.5(3~52)天,胎龄中位数为37.96(31~40⁺)周,出生体重中位数为3261(1300~4300)g,感染疾病类型包括肺炎、脓毒症和脑膜炎。(2)全部患儿样本通过传统方法(培

养、抗原检测和PCR)和mNGS进行检测。案例一,19天大的患儿因间歇性发热和呼吸急入院,其常规微生物培养均为阴性,而mNGS检测提示结核分枝杆菌感染,予以抗结核治疗后达到治愈标准。案例二,4天大的患儿因高热入院,其常规微生物培养均为阴性,而mNGS检测提示嗜肺军团菌感染,予以调整抗菌药物治疗后达到治愈标准。案例三,15天大的患儿因呼吸急促15天,发热3天,抽搐2天入院,患儿的血液样本CRP、PCT及脑脊液的白细胞计数值均偏高,脑脊液的mNGS及16s rRNA测序均提示蜡样芽孢杆菌感染,予以调整抗菌药物治疗后病情好转,但出现神经系统发育迟缓问题。(3)8例患儿在抗菌

药物调整后达到治愈标准,并显示出正常的发育,而2例脑膜炎患儿出现神经系统发育迟缓问题。

该研究也存在几个局限性,①样本量小。②成本高,检测的复杂性及缺乏实验标准。③难以区分致病微生物和定植或污染微生物。④所有患儿在进行mNGS之前均接受过经验性抗菌药物治疗,可能会影响微生物检测的灵敏度。

综上所述,当所有常规方法都无法检测出微生物时,mNGS可早期进行病因诊断并调整抗菌药物治疗方案,缩短住院时间,改善预后,降低新生儿感染疾病管理的总体成本和负担。

(广州医科大学附属第一医院 李嘉慧 卓越 编译)

宏基因组二代测序技术在儿科传染病诊断中的潜在应用:以 SARS-CoV-2 为例

【据《JPIDS》2021年12月报道】题:宏基因组二代测序技术在儿科传染病诊断中的潜在应用:以 SARS-CoV-2 为例(美国纽约石溪儿童医院 作者 Andrew S. 等)

随着新型冠状病毒肺炎病例在全球范围快速暴发,很快 SARS-CoV-2 便被分离并确认。生物医学领域的研究人员对于引起这种新型流行病的病原体给予了空前的关注。仅在数月之内,便在检测、疫苗及治疗方法等方面取得了快速的进展。其中,最重要的是能够用来确认微生物源的宏基因组二代测序技术。

宏基因组二代测序的程序复杂,在一些步骤上需要专业性知识,才能高效地取得准确结果。首先取得临床样本,然后从样本中提取并纯化DNA和(或)RNA。通过各种方法,将遗传物质分离成小的片段链,以便于大规模平行测序,或称“鸟枪法”测序。在测序仪中,通用接头(Universal Adapters)链接到数以百万计的片段,这些片段通过聚合酶链反应(PCR)被扩增。片段在被扩增的同时被测序,这使得人们能够在短时间内确认数以亿计的核苷酸碱基对。随后,通过将读数与已知的基因组相对照,生物信息处理器对核酸序列进行分析。在人类样本中,>99%的读数属于典型的人类基因组。在某些应用环境下,剩余读数与已知的微生物基因组数据库相匹配。如果某种微生物的DNA/RNA的数量超过了健康对照人群的阈值,那么这种微生物就会被判定并被说

成是存在于样本中,从而确认该种微生物具有潜在地临床相关性,即可能会被认定为病原体。

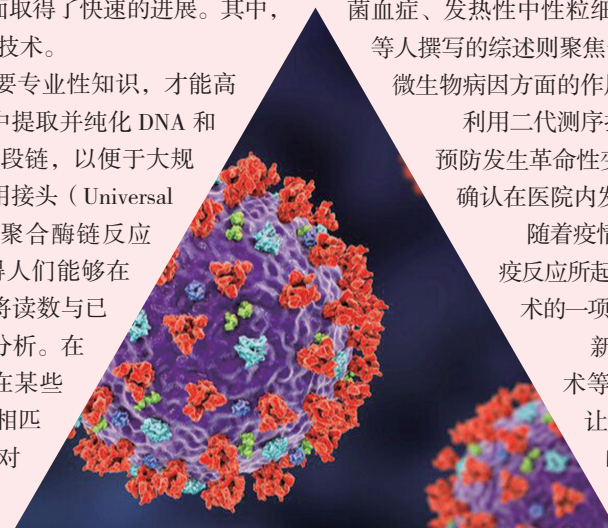
宏基因组二代测序技术作为一种潜在的,针对新型或未预期型疾病的诊断工具而备受关注。由Edward和Handel撰写的综述对宏基因组二代测序技术在诊断包括菌血症、发热性中性粒细胞减少、骨髓炎等多种疾病时的表现进行了概述。Graff等人撰写的综述则聚焦于宏基因组二代测序技术在提示小儿脑膜炎和小儿脑炎的微生物病因方面的作用。

利用二代测序技术的全基因组测序(WGS)有可能使医院感染的发现和预防发生革命性变革。Greninger和Zerr对利用全基因组测序(WGS)技术确认在医院内发生的细菌性、病毒性、真菌性感染进行了综述。

随着疫情的发展,人们已经清楚地了解到机体对SARS-CoV-2的免疫反应所起到的关键作用。Silverman和Green向读者介绍了二代测序技术的一项令人激动的新应用:微生物流式细胞术联合二代测序技术。

新冠疫情已经向人们展示了应用诸如宏基因组二代测序技术等前沿科技应对新挑战的重要性。我们希望能够通过本刊,让读者更加深入地了解宏基因组二代测序技术及其使用,同时激励读者去发现这种新兴临床工具的新应用。

(吉林省脑科医院 金冠 曹壮 编译)





mNGS 在中国首例鸚鵡热家庭暴发中的应用

【据《Emerg Microbes Infect》2021年12月报道】题：宏基因组二代测序(mNGS)在鸚鵡热家庭暴发中的应用：新冠疫情下中国首次报告的鸚鵡热家庭暴发(中国重庆医科大学附属第二医院呼吸与危重症医学科 作者 Li N 等)

鸚鵡热是一种由鸚鵡热衣原体导致的人畜共患感染性疾病，主要发生在鸚鵡、野生鸟类、及商业饲养的家禽等。人类可以通过吸入含有病原体的鸟类分泌物、干燥粪便、或羽毛上的灰尘而感染。鸚鵡热通常是散发的，国外偶有鸚鵡热暴发的报告，但迄今为止，我国尚无鸚鵡热家庭暴发的报告。人类鸚鵡热的临床症状包括发热、乏力、肌痛、头痛、畏寒，咳嗽通常很少，偶有干咳或不咳，影像学表现为肺实变和浸润，难以与其他常见病原体引起的社区获得性肺炎相鉴别。鸚鵡热现有诊断方法主要包括荧光免疫法和补体结合实验等血清学方法、鸚鵡热衣原体分离培养、PCR等分子检测，但这些检测方法仅在特定的实验室开展。因此，鸚鵡热易被误诊或漏诊。宏基因组下一代测序(mNGS)能够精准、快速识别临床标本中几乎所有的潜在病原体，对于少见病原体的诊断具有优势。

重庆医科大学附属第二医院呼吸科团队于2020年12月在1周内先后收治3例鸚鵡热衣原体肺炎患者，该3例患者来自同一个6人大家庭。研究者从电子病例中调取3例患者的临床数据，包括症状、实验室检查结果、CT影像学结果、临床病程等资料，同时收集患者的治疗方案、临床转归及相关

随访数据。

3例鸚鵡热衣原体肺炎患者包括2名女性和1名男性，年龄中位值为56岁。3例患者具有明确的暴露史，连续饲养2只鸚鵡，且鸚鵡在患者入院前1周死亡。3例患者行mNGS检测，均发现鸚鵡热衣原体核酸片段，且血清学检查、血培养和痰培养等常规微生物学检查结果均为阴性。3例患者无特征性临床表现，均反复高热(体温>38.5℃)和乏力，2例患者出现寒战、咳嗽和纳差，1例患者出现肌痛。3例患者无特征性影像学表现，主要以实变伴支气管充气征为主，且病变始于肺下叶，多为单侧。3例患者白细胞计数中位值 $7.3 \times 10^9/L$ ，中性粒细胞百分比中位值76.3%，CRP中位值133 mg/L，PCT中位值0.45 ng/ml。3例患者伴有肝功能异常，均出现乳酸脱氢酶升高，2例患者出现谷丙转氨酶和谷草转氨酶水平升高，1例患者出现肌酸激酶水平升高和低钾血症。2例患者行支气管镜检查，表现为气管充血和支气管黏膜水肿，段支气管内有少量白色稀薄分泌物。3例患者确诊鸚鵡热衣原体肺炎后，根据指南采用米诺环素治疗。患者在治疗后发热消失，咳嗽、乏力、纳差等一般情况逐渐好转；肺部影像学显示炎症明显吸收；降钙素原和C反应蛋白明显下降，接近正常水平。

综上所述，本研究结果提示鸚鵡热衣原体肺炎缺乏特征性临床和影像学表现，使用mNGS可以提高诊断率，减少延迟，缩短疾病控制的过程。

(重庆医科大学附属第二医院 李娜 广州微远基因科技有限公司 许媛 编译)

mNGS 有助于优化肺移植受者早期抗菌策略

【据《Front Microbiol.》2022年3月报道】题：基于宏基因组二代测序(mNGS)的肺移植受者早期抗菌策略优化(中国四川省人民医院 作者 Zhang XQ 等)

感染性并发症仍然是肺移植受者发病率和死亡率较高的主要原因。目前，世界范围内肺移植术后感染多采用广谱抗菌药物覆盖，这可能会导致抗菌药物滥用和耐药性增加，以及潜在的肝肾损伤。因此，严密的围术期抗感染治疗尤为重要。精确的病原体检测是精确抗感染治疗的前提。mNGS因其准确、快速、广谱的病原体检测而成为临床病原体检测的热点。本研究以mNGS报告为主要依据，结合临床情况，在肺移植术后7天内制定新的抗菌药物方案调整策略，以减少抗菌药物的使用。

为了验证该策略的临床效果，来自中国的Zhang XQ等学者开展了这项研究。研究纳入四川省人民医院2018年10月至2021年7月肺移植患者。收

集患者基线和住院期间数据，术后2小时内采集供体和受体肺组织以及支气管肺泡灌洗液(BALF)样本，24小时内送mNGS检测，同时将BALF标本进行常规微生物培养。抗菌药物用药方案调整策略：(1)根据供者、受者和围术期的情况制定了基本的抗菌方案。初步方案的原则是：用最少的抗菌药物覆盖所有可能的病原体。(2)获得常规病原体检测结果及mNGS报告后，根据以下情况调整抗菌方案：①维持基本抗菌治疗方案；②根据患者临床特点及病原体检测结果改变基本抗菌治疗方案：因无感染迹象而进行抗菌药物降级治疗或简化抗菌药物方案；无新发感染，但根据临床特点及病原菌检测结果，提前添加其他抗菌药物或更换原有抗菌药物；有新发感染，改变抗菌药物。对抗菌药物策略的有效性进行评价。对数据进行统计分析。

研究发现：(1)本研究共纳入30例肺移植患者，受者

平均年龄 57.8 ± 1.03 岁，15例为单肺移植，15例为双肺移植，共获得有效样本86份。(2)经mNGS检测，BALF标本的阳性率(86.67%)高于供体肺组织(20.0%)和受体肺组织(13.33%)。(3)mNGS检测的阳性率显著高于相同BALF标本病原体培养的阳性率(86.67% vs 30.0%)。(4)在所有3种临床标本中，BALF的临床病原学诊断价值最高：在受体肺组织中仅检测到病毒，在供体肺组织中仅检测到病毒和支原体，但在BALF中检测到的病原体种类最多且以细菌为主。(5)共检出22种细菌，主要为革兰阴性菌(66.67%，20/30)，提示革兰阴性菌可能是肺移植后首先考虑的病原菌。(6)采用上述策略后，70.0%(21/30)的患者术后7天内未发生新发感染，6.67%(2/30)的患者感染得到有效控制。该策略的整体有效性为90.0%(27/30)。

综上，mNGS结合传统病原体检测方法和临床特点，在

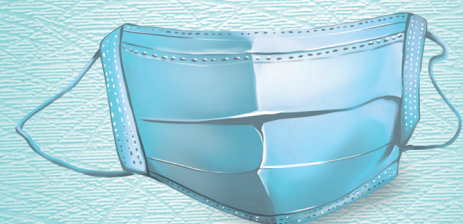
肺移植受者术后7天内优化抗菌药物治疗方案是有效的。对于接受肺移植的患者，术后早期BALF样本比其他临床样本

在指导早期抗菌药物调整上更有价值。

(广州医科大学附属第一医院 姚丽康 卓越 编译)

公益广告

戴口罩 预防新冠肺炎



去人员密集的公共场所、办公场所，
乘公共交通工具、电梯，家有医学观察者，
到医疗机构就诊等，请佩戴口罩。

中宣部宣教局、国家卫生健康委宣传司 指导
中国健康教育中心 制作

通过宏基因组和宏转录组看 COPD 宿主和微生物

【据《Front Microbiol》2022年3月报道】题：基于宏基因组学和宏转录组测序探讨慢性阻塞性肺病患者宿主和微生物的变化（中国东南大学生命科学与技术学院发育基因与人类疾病关键实验室 作者 Yang J 等）

慢性阻塞性肺疾病（COPD）患者呼吸道内可发现多种细菌，而急性加重期慢性阻塞性肺疾病（AECOPD）患者气道内细菌携带状况将发生显著改变。巨噬细胞具有 M1 和 M2 两种类型的生物学行为模式，前者对炎症发生发展起促进作用，后者起抑制作用。巨噬细胞生物学行为模式转变受 *CDI63*、*MARCO*、*SLAMF8*、*HLA-C*、*OLFML2B* 等基因调控。了解微生物构成和宿主炎症反应变化对于研究 COPD 患者气道微生物群和肺部慢性炎症之间的机制联系具有重要意义。在临床中，利用传统的病原学诊断技术准确地找到病原体比较困难。关于微生物组在 COPD 病理方面的意义，以及 COPD 临床微生物组生物标志物的潜力研究仍处于早期阶段。

东南大学生命科学与技术学院团队采集了 12 例 AECOPD 患者治疗前的痰液样本，其中 4 例患者经治疗后转为稳定期，并再次取得其痰液样本。对这 16 份样本进行了宏转录组和宏基因组测序。探究稳定期 COPD 患者和 AECOPD 患者呼吸道内微生物类群和宿主基因表达方面的差异。

研究结果显示，在门一级水平上，两组患者痰液细菌丰度最高的 5 个门（优势门）的分别是

厚壁菌门（*Firmicutes*）、放线菌门（*Actinobacteria*）、变形菌门（*Proteobacteria*）、拟杆菌门（*Bacteroidetes*）、梭杆菌门（*Fusobacteria*）。宏基因组和宏转录组测得的优势门比例相似。在纲一级水平上，两种方法检测到的特定微生物丰度存在一定差异（图 1）。研究对 AECOPD 组与稳定期 COPD 组所检测到的细菌在门、纲、目、科、属五个分类学水平上进行了比较，但未发现统计学差异。

稳定期组中的 5 个宿主基因表达水平显著上调，使用 DAVID 数据库对表达差异显著的基因进行分析，结果表明，这 5 个基因在免疫反应和炎症途径中会被富集，并与巨噬细胞免疫过程相关，除 *HLA-C* 之外，其他 4 个基因均具有抑制炎症作用。通过 Spearman 相关系数反映基因间相关性，联合 Cytoscape 软件、STRING 数据库构建的基因表达相关关系网显示，*CDI63* 基因位于关系网中心地位，且与 *MARCO*、*SLAMF8* 基因共表达。4 个炎症抑制基因的表达具有相互促进作用，而对 *HLA-C* 表达具有抑制作用。

综上所述，重度 COPD 患者和稳定期 COPD 患者的肺部微生物群无明显统计学差异。稳定期 COPD 患者 *MARCO* 和 *CDI63* 基因的表达显著增加，对减轻患者肺部损伤具有积极作用。这些发现将进一步研究 COPD 的进展和潜在的生物标志物提供线索。

（广东省人民医院 顾兵 广州微远基因科技有限公司 王浩迪 编译）

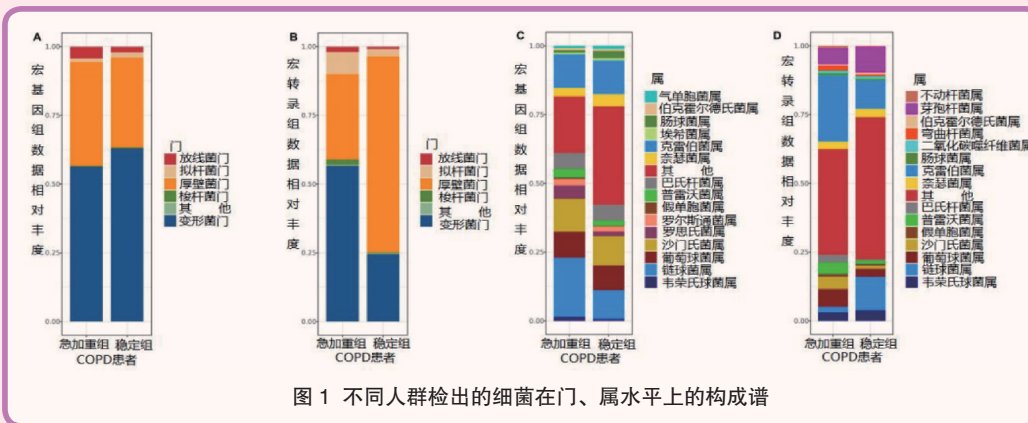


图 1 不同人群检出的细菌在门、属水平上的构成谱

宏基因组二代测序在肺结核患者肺部微生物群谱中的应用

【据《Microbiol Spectr》2021年12月报道】题：使用宏基因组二代测序深入了解肺结核患者独特的肺微生物群谱（广东省深圳市第三人民医院国家传染病临床研究中心 作者 Xiao G 等）

世界上大约有 1/4 的人口感染了结核分枝杆菌，但只有 5% ~ 10% 最终发展为活动性结核病，这意味着宿主和环境因素在决定结核分枝杆菌感染的结果方面发挥着重要作用。应用非培养技术研究肺微生物群改变了我们以前认为健康的肺是无菌的观点。尽管人类微生物菌群研究迅速发展，但针对肺结核背景下肺部微生物菌群的研究仍有限。多数以痰液作为肺和下呼吸道微生物菌群的指标，只有 3 项研究使用支气管肺泡灌洗液（BALF）样本检查了微生物群。抗结核治疗对肺部菌群的影响尚未被探索。为确定与肺结核相关的肺部菌群分布，并表征抗结核治疗过程中的纵向变化，Xiao G 等进行了本研究。

本研究共纳入五组受试者：①未治疗肺结核组（UTG），②治疗肺结核组（TTG），③治愈肺结核组（CTG），④健康对照组（HCG），⑤肺癌患者组（LCG）。所有参与者的 BALF 标本均采用预温无菌生理盐水（每次 20 ml，2 ~ 6 次）灌注和抽吸（每次 10 ~ 20 ml）的方法采集。同时收集健康参与者的咽拭子，以调查上呼吸道和下呼吸道微生物群的差异。使用宏基因组二代测序（mNGS）检测样本中的微生物群。

研究结果显示，咽拭子 ACE 指数和 Chao1 指数在种和属水平上显著高于 BALF 样本。在种和属水平上，UTG 的 ACE 指数、Chao1 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数都远低于 HCG 和 LCG；PCoA 显示 UTG 在属水平上与样地的 HCG 和 LCG 可以区分开来。UTG 的 ACE 指数、Chao1 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数均显著低于 TTG 和 CTG；在 PCoA 样地的种和属水平上，UTG 样本聚集在一起，远离 TTG 和 CTG 样本。CTG 和 TTG 在最丰富的前 30 种中表现出相似的组成，但与 UTG 不同。CTG 样品的 ARGs 丰度最高，TTG 组 ARGs 丰度略低于 CTG 组，UTG 的 ARGs 丰度远低于 TTG 和 CTG；HCG 组和 CTG 组在种或属水平上 ACE 指数、Chao1 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数均无显著差异。

综上所述，本研究结果表明，肺结核患者表现出与健康个体和肺癌患者不同的独特的肺部微生物群特征；抗结核治疗增加了肺部微生物群的 α 多样性，并影响 β 多样性；抗结核治疗加速了 ARGs 的富集。这些发现可以帮助我们更好地了解结核病的发病机制。

（江苏省苏北人民医院 李玉武 韩崇旭 编译）

超深度混合宏基因组测序在人类肠道微生物组中的应用

【据《Gut Microbes》2022年1月报道】题：超深度混合宏基因组测序能够对人类肠道微生物组中的低丰度物种进行基因组和功能表征（内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室 作者 Hao Jin 等）

数以万亿计的微生物定植于人类肠道，代表着一个与人类共存的巨大有机体库。宏基因组测序技术的快速发展及在肠道微生物菌群中应用，揭示了众多肠道微生物物种在宿主健康和疾病中的关键作用。以往的宏基因组测序深度对于低丰度（相对丰度 < 0.1%）物种来说，几乎不可能进行精确和深入地比较宏基因组分析，从而会忽略许多重要的基因组信息。事实上，一些对人类健康起着极其重要作用的肠道微生物可能只是以低丰度物种的形式存在。因此，迫切需要测序技术改进，分析低丰度物种对精确而深入理解肠道生态和肠道微生物群的功能极为重要。本研究旨在改进测序技术解决宏基因组测序深度问题，精确和深入地比较宏基因组分析。

内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室的研究者收集了 8 名志愿者的 12 份粪便样品。12 份粪便样品中，8 份采用高深度 Illumina 测序结合 PacBio 宏基因组测序，4 份采用高深度 Illumina 测序，共产生了 551 Gbp 高质量 Illumina HiSeq 数据和 70 Gbp PacBio 宏基因组数据。然后对测序数据进行一系列的去宿主、质控、组装、binning、聚类还原基因组后，对基因组的相对丰度、质量、新型物种、SNP 密度和 pN/pS、基因组功能、染色体可移动遗传元件以及染色体外的可移动遗传

元件进行了分析。

本研究采用不同宏基因组组装方法（metaSPAdes、Flye、hybrid-long）进行重组，组装得到 4 个完整的环状基因组（YA1_M7, YA2_M2, YA2_M3, YA2_M4）。超深度混合测序的基因组组装质量评估发现，使用不同方法测试宏基因组的组装性能，metaSPAdes（针对短读长），Flye（针对长读长）和 hybrid-long（针对短读和长读长）。“hybrid-long”方法显著提升了组装的总长度和组装的连续性，表现在 N50 长度和最大 scaffold 长度，产生了 44 个超过 1 Mbp 的 scaffolds，表明短读长与长读长相结合的模式来进行组装，提高了组装性能；对 binning 性能进行评估发现，相较于普通测序深度，深度混合测序极大提升了 binning 的效率，且普通测序产生的 bins 数量（bin 大小 > 200 Kbp）明显低于超深度测序产生的 bins 数量。在测序量达到 5 Gbp 或 10 Gbp 时，超过 98% 的高丰度物种基因组被恢复，其完整度 > 80%，并且大约 23% 为低丰度物种基因组，但未发现超低丰度物种的基因组。

综上所述，超深度混合测序的方法可以揭示更完整的宏基因组功能信息，并且揭示了复杂微生物群中存在的稀有物种的基因组特征，突出了宏基因组功能潜力方面的价值。此外，研究结果表明，这些物种具有未知的和特定的基因组特征，特别是 MGEs 和代谢途径的模式，这也表明它们可能在肠道微生物群中发挥着特定作用，并对宿主有积极作用。

（青海省人民医院 阿祥仁 程鹏 周健武 吕艳翎 杨博杰 王珑璐 李乾坤 编译）



感染精准医学行业引领者

我们深深明了
每一份珍贵样本的背后
都有一位亟待救治的病患

微远基因简介

专注

感染精准领域深耕成果丰硕

- 公司成立于2018年
- 20万临床样本，10万病患
- 3000名医生，800家医院
- SCI文章50篇，专利30项，软著20项

极致

六大医学检验实验室辐射全国

北京 上海 广州 郑州 成都 南京

尽责

鉴定新发、罕见病原体

- 北京鼠疫感染病原的早期发现
- 新冠病毒最早期的发现与鉴定
- 鉴定人感染H3N8禽流感病毒

至臻

全面质量管理提高检验质量

微远满分通过mNGS室内质评并获得行业首个CAP认证

参评单位	得分
微远基因	100
北京协和医院	100
解放军总医院第一医学中心	100
上海儿童医学中心	100
武汉同济医院	100

共赢

医院深度合作加速转化

与超100家医院建立合作关系

引领

中国mNGS解读联盟加速行业规范

革新

探针捕获技术步入mNGS 2.0时代

自研

病原微生物领域基因测序仪获批

病原宏基因组(mNGS)本地化检测平台解决方案

病原宏基因组检测本地化挑战与困难

样本流程繁多

- 样本类型包括呼吸道，血液，脑脊液等超过10种
- 从样本前处理到报告解读，超过6个主要操作步骤
- 提取，建库，测序等多个环节质量控制技术复杂

自动化挑战高

- 多样本类型需要差异化处理，自动化难度高
- 样本通量10~60个/天，波动较大
- mNGS继续发展，自动化路径仍不明确

结果解读复杂

- 序列数据多，参数复杂，需综合分析
- 检出病原多样，难区分定植与感染，临床沟通复杂
- 大数据分析病原谱统计要求高

技术人员高配

- 对生信分析人员要求高，工作量大
- 实验技术人员多，班次安排复杂
- 需要有报告审阅与临床解读人员

应对本地化挑战mNGS实验室建设理念

全程化

- 从样本接收到报告审阅，实现全流程闭环管理
- 提取，建库，测序等关键环节实现重点质控保证
- UMSI内参体系减少人为操作错误

模块化

- 提取与建库环节模块式自动化
- 满足不同样本类型与差异样本通量需求
- 适应未来mNGS方法学发展需求与变化

智能化

- 智能生信算法实现一键式操作与自动化升级
- 引入专家规则系统，智能化报告生成与临床解读
- 宏基因组大样本统计分析 with 医院数据库构建

定制化

- 勘测院内实验室面积与布局，定制实验室设计
- 根据临床与检测需求，定制mNGS平台与人员配置
- 响应学科建设与科研需求，定制数据分析与课题设计

病原宏基因组2.0时代 探针捕获·全面覆盖DNA与RNA病原

病原捕获宏基因组组合二为一，DNA与RNA病原共同检测

探针捕获技术特点

探针捕获RNA病原

探针捕获DNA病原

磁珠富集目标病原

病原捕获宏基因组产品特点

全面

无需预设同步报告
全覆盖25863种病原体

高敏

百万探针捕获3000+临床重要病原体
提升检测阳性率10%~15%

深入

关键耐药/毒力基因深度覆盖
分子药敏辅助指导临床用药

微生物与感染专刊长期合作伙伴

