

二代测序技术在病原微生物检测及感染性疾病 诊断中的应用*

钱克莉¹ 袁喆^{1,2}

(重庆医科大学附属第一医院 1. 感染管理科; 2. 感染科, 重庆 400016)

【摘要】 早期准确检测、鉴定致病病原体对于感染性疾病流行病学监测、防控及诊治至关重要。与传统方法相比,二代测序技术(NGS)具有显著的优势。一方面其检测速度更快更准确,缩短诊断时间;另一方面,二代测序技术不仅可以识别病原体,还可以进一步表征微生物组,识别耐药基因及毒力因子。因此,其在感染性疾病尤其是可能引起广泛传播的呼吸道传染病诊治防控领域有着重要作用。本文简要介绍 NGS 技术及其目前在感染性疾病中的诊治应用,以及展望其未来应用。

【关键词】 二代测序; 感染性疾病; 测序技术; 病原微生物

【中图分类号】 R51 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2025. 01. 001

The clinical application of next-generation sequencing in detection of pathogenic microorganisms and diagnosis of infectious diseases

QIAN Keli¹, YUAN Zhe^{1,2}

(1. Department of Infection Control, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

2. Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

【Abstract】 Early and accurate detection and identification of pathogenic microorganisms are of vital significance for the epidemiological surveillance, prevention, control and treatment of infectious diseases. Compared with traditional approaches, next-generation sequencing technology (NGS) holds remarkable advantages. On one hand, it features a faster and more accurate detection speed, reducing the diagnostic duration. On the other hand, NGS can not only identify pathogens but also further characterize the microbiome and detect resistance genes as well as virulence factors. Hence, it plays a crucial role in the diagnosis, treatment, prevention and control of infectious diseases, particularly in the field of respiratory infectious diseases that may cause widespread dissemination. This article briefly presents NGS technology and its current applications in the diagnosis and treatment of infectious diseases, along with its prospects for future usage.

【Key words】 Next-generation sequencing; Infectious diseases; Sequencing technology; Pathogenic microorganisms

长久以来,病毒、细菌和真菌等病原体所致的感染性疾病是人类健康与全球公共卫生安全的巨大挑战,是全球人类发病和死亡的主要原因。而新发传染病尤其是呼吸道传染病可以迅速在医疗机构甚至社

区蔓延,严重威胁人民群众生命健康安全^[1]。早期快速准确检测及鉴定致病病原体是传染病防控、诊治的关键。传统的病原鉴定方法包括培养法、血清学检测和分子生物学方法(如核酸扩增)等^[2]。相较于传统

基金项目:重庆市自然科学基金项目(CSTC2009BB5061);重庆人社局科研基金项目(09958013)

执行编委简介:袁喆,重庆医科大学附属第一医院感染科教授、主任医师、硕士生导师,医院感染管理科主任。中国医院协会医院感染管理专委会委员,中华预防医学会感染控制专委会委员,中华医学会结核病分会感染控制专委会常务委员,重庆市医院管理学会医院感染专委会副主任委员,重庆市预防医学会感染控制专委会副主任委员。主持或参与多项国家及省部级科研课题。发表论文 50 余篇,参编医学专著 4 部。从事感染性疾病医、教、研 30 余年及医院感染管理工作 10 余年。在传染病防控、不明原因发热的诊断、疑难重症感染的治疗、抗菌药物合理使用及多重耐药菌感染防控等方面具有丰富的临床和管理经验。E-mail: yuanzhe-1030@163.com

引用本文:钱克莉,袁喆.二代测序技术在病原微生物检测及感染性疾病诊断中的应用[J].西部医学,2025,37(1):1-4. DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2025. 01. 001

技术,二代测序(Next-generation sequencing, NGS)技术可同时数百万个碱基片段进行高通量、大规模测序^[3]。在过去的几十年里,NGS 在临床诊断中应用有所增加,从单纯的研究工具发展为诊断技术^[4]。在遗传疾病和癌症诊断领域,NGS 已经成为诊断的黄金标准^[5-6]。近十年来,NGS 在临床微生物学诊断的应用中也越来越广泛^[7]。本文简要介绍了感染性疾病病原体的传统诊断方法,以及 NGS 技术在感染性疾病中的诊治应用,并展望其未来应用。

1 感染性疾病病原体传统诊断方法

感染性疾病病原体传统诊断方法包括培养、涂片镜检、免疫试验、成像技术和核酸检测方法。目前,培养法是检测及鉴定病原体的金标准,但培养法需要有经验的检验人员鉴定且耗时较长,可能延误诊治及防控^[8-9];同时在使用抗菌药物后在采样进行细菌培养,其阳性率可能大大降低。而显微镜检可以评估样品质量,发现污染,提供早期感染诊断指向以指导治疗。但仍存在对技术人员技能要求高、对实验条件和病原浓度要求也相对较高、耗时长等局限性^[10]。

病原体侵入人体后,在血液、体液和组织中作为抗原刺激机体,通过免疫应答产生特异性抗体。免疫学方法是通过特异性抗原或抗体的检测来明确患者是否感染某种病原体,临床常用包括酶联免疫吸附法、免疫荧光法、化学发光免疫分析等。但部分病原微生物并不能表达特异性抗原或诱导特异性抗体产生,或者诱导延迟,限制了其临床应用^[11-13]。

在实验室检测结果报告前,胸部 X 线检查和计算机断层扫描对呼吸道病原体感染的诊断具有重要的补充作用,在早期症状出现之前,影像学检查可以发现一些异常。相较于 X 线,CT 灵敏度更高,但辐射剂量大,费用高,且需要有经验的诊断医生^[14]。

基于核酸的检测方法聚合酶链反应(Polymerase chain reaction, PCR)检测在灵敏度、特异度和检测耗时等方面明显优于传统培养法,但由于 PCR 检测是靶向测序方法,需事先假设病原体,对未知病原体的识别能力差^[15-16]。

2 NGS 技术及其在感染性疾病中的应用

NGS 技术又称高通量测序(High-throughput sequencing),是基于 PCR 和基因芯片发展的测序技术,可快速、高效对 DNA 或 RNA 进行测序分析,并对一个物种的基因组和转录组进行深入、细致、全貌的分析^[4]。NGS 检验无须对病原菌进行分离培养,也不依靠已知核酸序列,直接对待测标本检测,从而极大节约了检测时间,提高检测效率,尤其是对未知或者难以培养的病原体的检测有重要作用;同时 NGS 技术

可测定病原体全基因组序列,是目前分辨率最高的病原体分型方法。在此基础上,还能够判断病原体同源性远近,区分不同进化路线,以便追踪或预防流行性疾病的暴发^[17]。

2008 年研究者利用无偏倚高通量测序鉴定了引起肾综合征出血热的汉坦病毒^[18];在 2010 年的一项研究中,研究者使用 RNA 测序来表征患者呼吸道样本中引起 2009 年 H1N1 流感大流行毒株的转录组,发现在病毒载量较低的情况下也能检测到病毒序列^[19],并且单分子测序在 RT-PCR 遗漏的鼻拭子中也发现了混合流感变异^[20]。这两个研究证实了 NGS 对已知及新型病原体均具高敏感性。

目前,NGS 技术已广泛运用于临床病原微生物检测,主要包括宏基因组二代测序(metagenomics next-generation sequencing, mNGS)及靶向二代测序(targeted next-generation sequencing, tNGS)^[21]。

2.1 mNGS 及其在感染性疾病中的应用

mNGS 指对标本中的全部生物基因组进行测序分析,通过与微生物参考基因组比对获取标本中的微生物物种组成、物种丰度等信息。它无需预设目标序列,直接对样本中所有的核酸序列进行高通量测序,一次性进行细菌、病毒、真菌和寄生虫等所有潜在病原体检测。因此,mNGS 相较于常规病原学检测方法能显著提高标本内病原体的检出率。此外,mNGS 还可以为进化追踪、菌株鉴定和抗性预测提供所需的辅助基因组信息^[22]。2014 年发表于新英格兰杂志的一篇病例报道开启了 NGS 用于临床诊断的新篇章:一名 14 岁男孩因发热和头痛症状逐渐恶化至脑积水及癫痫持续状态,但其包括脑活检在内的所有诊断检查均未发现异常,对其脑脊液进行 NGS 测序后发现为神经钩端螺旋体病^[23]。同年 Knittler 等^[24]采用 mNGS 技术诊断了 1 例由传统常规微生物检测难以识别的鸚鵡螺杆菌导致的严重肺炎和多器官衰竭病例。随后的研究进一步证实了 mNGS 对包括病毒、细菌、真菌和寄生虫在内的多种病原体的敏感性高于 PCR 或培养^[25-26]。

虽然表型药敏试验是确定细菌病原体对抗菌药物耐药性的金标准,但 mNGS 可通过检测抗菌药物耐药基因(Antimicrobial Resistance Genes, ARG)来识别潜在的耐药菌,为临床抗菌药物管理策略提供分子生物学支撑^[27]。张群等^[28]采用 mNGS 与常规微生物培养检测呼吸道感染患者肺泡灌洗液标本,并进行革兰阳性菌抗菌药物耐药基因分析及耐药表型鉴定,发现 mNGS 可以检测出革兰阳性菌中 ARGs,并可以较好的预测耐药表型。康亮亮等^[29]将血液病/恶性肿瘤

合并脓毒症患儿血液标本同时采用微生物培养及 mNGS 检测,发现 mNGS 相较普通微生物培养可检出更多阳性菌及可疑耐药菌。由于 mNGS 精准度高、耗时短及准确率高的特点,医疗机构也将其应用于多重耐药菌医院感染暴发。范鹏超等^[30]采用 mNGS 及传统病原学培养方法对重症监护病房 5 例检出 CRAB 患者呼吸道标本及病房环境标本进行病原学检测,判定为医院感染暴发并采取综合控制措施,快速有效控制暴发事件。

由于其无差别检测方法,mNGS 有助于在感染性疾病中检测新的病原体。社区获得性肺炎是儿童住院的主要原因,约 20% 的病例无法识别病原体,但这不利于把握最佳治疗时机以及预防医院获得性感染。一项研究将 mNGS 应用于病因不明的儿科 CAP 患者呼吸道样本及对照呼吸道样本,除了麻疹病毒和副流感病毒等已知病毒外,检测结果还包括许多临床少见的病毒,如指环病毒属,博卡病毒,人类疱疹病毒-6 和-7^[22-31]。

2.2 tNGS 及其在感染性疾病中的应用

tNGS 是结合基因扩增和高通量测序的一种针对目的基因序列进行测序的方法,它不依赖于传统的微生物培养,直接对临床样本中的核酸进行富集,再通过高通量测序,然后与数据库进行比对分析。根据比对到的序列信息来判断样本包含的病原微生物种类,能够快速、客观地检测临床样本中较多的病原微生物为临床诊断提供依据。

与常规微生物检测相比,tNGS 在重症社区获得性肺炎患者的肺泡灌洗液中和急性下呼吸道感染患者的痰液中对如铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌和肠杆菌等病原体诊断的敏感性和特异性均较高^[32-33]。由于其检测时间较常规培养更短,通过直接对痰液中结核分枝杆菌进行测序可提供比常规痰培养更全面的耐药检测结果^[34];另一方面,tNGS 的检测不依赖于微生物培养结果,有研究采用 tNGS 从结核患者的粪便中识别病原体及其耐药基因,为难以提供呼吸道样本的结核病患者提供关键的诊断信息^[35]。

tNGS 的另一重要作用在于对如流感、冠状病毒等呼吸道病原体的常规监测,尤其对于病毒分型及突变的监测。有研究采用 tNGS 应用于 ICU 患者下呼吸道病毒检测,确定了 H1N1 pdm09 变异和 222G/N/A 基因突变,有助于监测流感突变的速度和方向^[36]。在新型冠状病毒大流行期间,较多研究者采用 tNGS 跟踪 SARS-CoV-2 基因组突变并检测新出现的显著变异。有研究对美国郊区有症状的 SARS-CoV-2 病例的高密度扩增子测序显示,病毒正在进化,57% 的

菌株携带 spike D614G 变体。这一发现还确定了 D614G 是美国的主要和新兴 SARS-CoV-2 分离物^[37-39]。

3 展望

NGS 技术改变了临床微生物学,在呼吸道传染病诊断和流行病学调查中发挥着越来越重要的作用,在病原体检测方面显示出突出的应用潜力。呼吸道病原体的早期正确诊断对患者目标治疗以及预后至关重要,目前除常规检测方法外,NGS 已成为临床病原学诊断的强有力手段,尤其在病原学诊断困难患者及危重症患者中更具优势。临床医生需要结合患者病情及不同技术的特点来选择合适的检测方法,并结合患者床表现、实验室及影像学检查结果、传统病原学检查结果等综合解读 NGS 检测结果。

同时,随着科学技术的不断发展,也需要持续规范的优化 NGS 技术以应用于呼吸道传染病的精准诊疗与防控。在技术层面,自动化流程以及准确且更快速的测序仪可能是 mNGS 和 tNGS 技术转化的两大发力点;在应用层面,mNGS 和 tNGS 都需要进一步明确临床使用场景,并根据临床应用场景明确检测样本类型、目标病原菌范围、阳性判断值以及产品配套使用的数据库。

【参考文献】

- [1] BENZIGER C P, ROTH G A, MORAN A E. The global burden of disease study and the preventable burden of NCD[J]. *Glob Heart*, 2016, 11(4): 393-397.
- [2] BURSLE E, ROBSON J. Non-culture methods for detecting infection[J]. *Aust Prescr*, 2016, 39(5): 171-175.
- [3] UHLEN M, QUAKE S R. Sequential sequencing by synthesis and the next-generation sequencing revolution[J]. *Trends Biotechnol*, 2023, 41(12): 1565-1572.
- [4] SLATKO B E, GARDNER A F, AUSUBEL F M. Overview of next-generation sequencing technologies[J]. *Curr Protoc Mol Biol*, 2018, 122(1): e59.
- [5] SABOUR L, SABOUR M, GHORBAN S. Clinical applications of next-generation sequencing in cancer diagnosis[J]. *Pathol Oncol Res*, 2017, 23(2): 225-234.
- [6] 王征, 侯维, 郑素军. 二代测序在遗传代谢性肝病诊断应用中的挑战及思考[J]. *临床内科杂志*, 2024, 41(4): 221-225.
- [7] DEURENBERG R H, BATHOORN E, CHLEBOWICZ M A, et al. Reprint of "Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention"[J]. *J Biotechnol*, 2017, 250: 2-10.
- [8] KEIPP T H, FALSEY ANN R. The diagnosis of viral respiratory disease in older adults[J]. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*, 2010, 50(5): 747-751.
- [9] FALSEY A R, FORMICA M A, WALSH E E. Diagnosis of respiratory syncytial virus infection: comparison of reverse transcription-PCR to viral culture and serology in adults with respir-

- atory illness[J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(3): 817-820.
- [10] CALDERARO A, BUTTRINI M, FARINA B, *et al.* Respiratory tract infections and laboratory diagnostic methods; a review with A focus on syndromic panel-based assays[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(9): 1856.
- [11] ZHANG Y, HUNG T, SONG J D, *et al.* Electron microscopy: essentials for viral structure, morphogenesis and rapid diagnosis [J]. *Sci China Life Sci*, 2013, 56(5): 421-430.
- [12] 苏喆, 姚秋玲. 间接免疫荧光法对多种呼吸道病毒快速检测应用[J]. *系统医学*, 2019, 4(6): 48-49, 52.
- [13] TRÉ-HARDY M, WILMET A, BEUKINGA I, *et al.* Validation of a chemiluminescent assay for specific SARS-CoV-2 antibody[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2020, 58(8): 1357-1364.
- [14] FRED H L. Drawbacks and limitations of computed tomography: views from a medical educator[J]. *Tex Heart Inst J*, 2004, 31(4): 345-348.
- [15] LI H Y, BAI R L, ZHAO Z Y, *et al.* Application of droplet digital PCR to detect the pathogens of infectious diseases[J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(6): BSR20181170.
- [16] SMITH C J, OSBORN A M. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2009, 67(1): 6-20.
- [17] NAFEA A M, WANG Y E, WANG D Y, *et al.* Application of next-generation sequencing to identify different pathogens[J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1329330.
- [18] PETERSSON L, KLINGSTRÖM J, HARDESTAM J, *et al.* Hantavirus RNA in saliva from patients with hemorrhagic fever with renal syndrome [J]. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14(3): 406-411.
- [19] GRENINGER A L, CHEN E C, SITTTLER T, *et al.* A metagenomic analysis of pandemic influenza A (2009 H1N1) infection in patients from North America[J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13381.
- [20] KURODA M, KATANO H, NAKAJIMA N, *et al.* Characterization of quasispecies of pandemic 2009 influenza A virus (A/H1N1/2009) by de novo sequencing using a next-generation DNA sequencer[J]. *PLoS One*, 2010, 5(4): e10256.
- [21] MITCHELL S L, SIMNER P J. Next-generation sequencing in clinical microbiology: are we there yet? [J]. *Clin Lab Med*, 2019, 39(3): 405-418.
- [22] FILKINS L M, BRYSON A L, MILLER S A, *et al.* Navigating clinical utilization of direct-from-specimen metagenomic pathogen detection: clinical applications, limitations, and testing recommendations[J]. *Clin Chem*, 2020, 66(11): 1381-1395.
- [23] WILSON M R, NACCACHE S N, SAMAYOA E, *et al.* Actionable diagnosis of neuroleptospirosis by next-generation sequencing[J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(25): 2408-2417.
- [24] KNITTLER M R, BERNDT A, BÖCKER S, *et al.* Chlamydia psittaci: new insights into genomic diversity, clinical pathology, host-pathogen interaction and anti-bacterial immunity[J]. *Int J Med Microbiol*, 2014, 304(7): 877-893.
- [25] WYLEZICH C, PAPA, BEER M, *et al.* A versatile sample processing workflow for metagenomic pathogen detection[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 13108.
- [26] BROWN J R, BHARUCHA T, BREUER J. Encephalitis diagnosis using metagenomics: application of next generation sequencing for undiagnosed cases[J]. *J Infect*, 2018, 76(3): 225-240.
- [27] ELLINGTON M J, EKELUND O, AARESTRUP F M, *et al.* The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST subcommittee[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2017, 23(1): 2-22.
- [28] 张群, 王明月, 钱倩, 等. mNGS 检测革兰阳性菌耐药基因的临床应用[J]. *中华医院感染学杂志*, 2022, 32(18): 2721-2724.
- [29] 康亮亮, 武宇辉, 赫南南, 等. 儿童重症监护病房血液病/恶性肿瘤合并脓毒症患儿病原及耐药分析[J]. *中国小儿急救医学*, 2024, 31(1): 28-34.
- [30] 范鹏超, 刘贺, 巴婧翀, 等. 宏基因组二代测序在耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌医院感染暴发中的应用 [J]. *中国感染控制杂志*, 2024, 23(2):
- [31] SCHLABERG 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.
- [32] LI F, WANG Y, ZHANG Y H, *et al.* Etiology of severe pneumonia in children in alveolar lavage fluid using a high-throughput gene targeted amplicon sequencing assay [J]. *Front Pediatr*, 2021, 9: 659164.
- [33] CHAO L S, LI J H, ZHANG Y N, *et al.* Application of next generation sequencing-based rapid detection platform for microbiological diagnosis and drug resistance prediction in acute lower respiratory infection[J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(24): 1644.
- [34] DOYLE R M, BURGESS C, WILLIAMS R, *et al.* Direct whole-genome sequencing of sputum accurately identifies drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* faster than MGIT culture sequencing[J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56(8): e00666-18.
- [35] SIBANDZE D B, KAY A, DREYER V, *et al.* Rapid molecular diagnostics of tuberculosis resistance by targeted stool sequencing[J]. *Genome Med*, 2022, 14(1): 52.
- [36] PIRALLA A, ROVIDA F, GIRELLO A, *et al.* Frequency of respiratory virus infections and next-generation analysis of influenza A/H1N1pdm09 dynamics in the lower respiratory tract of patients admitted to the ICU [J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0178926.
- [37] MCNAMARA R P, CARO-VEGAS C, LANDIS J T, *et al.* High-density amplicon sequencing identifies community spread and ongoing evolution of SARS-CoV-2 in the southern United States[J]. *Cell Rep*, 2020, 33(5): 108352.
- [38] FUCHS M, RADULESCU C, TANG M, *et al.* Mini-XT, a miniaturized tagmentation-based protocol for efficient sequencing of SARS-CoV-2[J]. *J Transl Med*, 2022, 20(1): 105.
- [39] GOHL D M, GARBE J, GRADY P, *et al.* A rapid, cost-effective tailed amplicon method for sequencing SARS-CoV-2 [J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 863.