

呼吸道病原靶向二代测序在肺部感染病原体诊断中的应用进展

王 亮, 韩英花*, 金渊花, 崔松日

(和龙市人民医院呼吸内科, 和龙 133500)

摘 要:肺部感染作为临床常见的感染性疾病之一,其病原体种类繁多。呼吸道病原靶向二代测序技术在肺部感染病原体诊断中的应用近年来取得了显著进展,能够针对样本中的已知病原微生物及其耐药基因进行高效、精准的检测。现阶段,随着该技术的不断进步,有望在临床诊断中发挥更大的作用。本文将既往呼吸道病原靶向二代测序(targeted next-generation sequencing, tNGS)技术诊断肺部感染病原体的研究进行整合综述,以期肺部感染病原体的快速、准确诊断提供有力支持。

关键词:肺部感染;病原体;诊断;呼吸道病原靶向二代测序;应用进展

0 引 言

肺部感染主要是指终末气道、肺泡及肺间质部位发生的严重病变,属于临床极为常见的疾病。随着耐药病原体的出现,肺部感染的治疗难度也在不断增加。由于不同病原体对抗生素和其他治疗药物的敏感性存在差异,肺部感染病原体的精确诊断有助于精准治疗。目前,临床诊断鉴别肺部感染病原体主要手段包括痰培养、支气管镜肺泡灌洗、血清学检测、核酸检测等方式,虽然上述检测方式均能够发挥不同的优势和作用,但其检测效果仍存在一定局限性。呼吸道病原靶向二代测序(tNGS)诊断是一种先进的分子诊断技术,通过生物信息学分析,实现对病原体的精准鉴定和分型,具有广谱性、高灵敏度、高特异性、快速性等特点^[1]。本文将既往有关“tNGS在肺部感染病原体诊断”中的应用研究进行汇总,以进一步分析tNGS的综合应用价值。

1 tNGS 应用概况

tNGS,即靶向高通量测序技术,是一种结合多重聚合酶链式反应(multiplex PCR)和二代测序技术的新型病原微生物检测方法。在tNGS的检测过程中,需要根据目标基因序列设计特异性引物。这些引物能够识别并扩增目标病原体的特定核酸片段。随后利用设计的特异性引物同

时作用于待测样品中的核酸,并通过PCR反应扩增出大量的目标核酸片段,这一过程主要基于超多重PCR扩增技术的多种引物同时扩增机制,提高了检测效率和通量。当扩增后的目标核酸片段被送入高通量测序平台进行测序时,高通量测序技术能够同时对数百万甚至数十亿个DNA片段进行测序,测序仪会逐个读取DNA片段上的碱基序列,并生成测序数据。测序完成后,将预处理的测序数据与参考基因组或数据库进行比对,以确定测序片段的来源和种类,并以此解析出目标病原体的种类、数量、变异情况等信息^[2]。

2 tNGS 在不同病原体中的诊断效能

2.1 在细菌中的诊断应用

肺部感染中常见的细菌类型包括革兰氏阳性菌(如肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌)和革兰氏阴性菌(如肺炎克雷伯杆菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌)等,其中肺炎链球菌是细菌性肺炎的主要病原体,占到肺部感染菌的50%~70%。tNGS能够检测到多种常见的肺部感染细菌,如肺炎链球菌、流感嗜血杆菌和金黄色葡萄球菌等。

相较于常规微生物学培养检测,tNGS能够显著提高病原体的检出率。在一项纳入70名确诊为下呼吸道感染重症患者的研究中,tNGS的总体检出率高达55.71%,而传统病原学培养的检出率仅为21.43%^[3]。tNGS技术可以

第一作者:王亮,硕士,研究方向为呼吸系统感染性疾病临床研究。

*通信作者:韩英花,副主任医师,研究方向为呼吸系统感染性疾病临床研究。E-mail: hlhyh0203@126.com。

覆盖多种细菌, 一次检测即可覆盖 95% 以上的常见病原体感染, 尤其在复杂的肺部感染中具有显著优势^[4]。除了上述病原菌外, 张静等人也通过 tNGS 也在肺部感染患者中检测到化脓性链球菌、炭疽杆菌、军团菌等的存在^[5]。宁宁等人在研究中对 454 例患者进行 tNGS 检测, 结果发现, 单一感染患者 95 例、混合感染患者 97 例, 并据此对治疗方案进行调整, 其中直接改变了 92 例患者的抗生素治疗决策, 84 例患者经治疗后出现明显好转。进一步证明了 tNGS 在肺部感染细菌中的诊断优势^[6]。此外, tNGS 的平均实验周转时间较短, 通常为数小时左右, 最多不超过一天, 明显短于常规微生物学检测所需的 2~5 天时间, 并且快速检测有助于尽早明确病原体情况, 减少了患者的用药成本。然而, tNGS 在肺部细菌感染检测中也并非处于绝对优势。研究发现, 当细菌浓度介于 $10^3 \sim 10^4$ CFU/mL 时, tNGS 的阳性预测值可能会降低。这意味着在细菌载量较低的情况下, tNGS 无法准确检测出这些细菌情况, 从而限制了其在低丰度病原体检测中的应用^[7]。此外, tNGS 的结果解释尚缺乏统一的标准。这意味着不同的实验室或研究人员可能会得出不同的结论, 从而影响诊断的准确性和一致性。在结核杆菌的诊断中, 传统方式如抗酸杆菌涂片和培养的检出率较低, 尤其是在涂片阴性和培养阴性的病例中, 漏诊率较高。报道指出, 抗酸杆菌涂片无法区分结核分枝杆菌、麻风杆菌和其他非结核分枝杆菌, 而 tNGS 通过对目标基因区域的高效富集和深度测序, 能够精准识别结核分枝杆菌并与其他抗酸杆菌进行区分。tNGS 在耐药性检测方面的表现同样出色, 能够覆盖与耐药相关的多个基因区域, 并提供高深度的全长序列信息。与表型药敏试验相比, tNGS 检测利福平耐药性的灵敏度和特异性均达到 100%, 异烟肼耐药性的检测也表现出较高的准确性(95%)。此外, tNGS 与全基因组测序的一致性较高, 且明显优于传统的双脱氧链终止法测序, 能为临床提供可靠的用药指导^[8]。笔者认为, 将 tNGS 技术引入肺部细菌感染的检测, 不仅显著提高了病原体的检出率, 还极大缩短了检测时间, 且 tNGS 技术能够覆盖多种细菌, 包括常见的革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌, 尤其在混合感染中的应用优势显著。

2.2 在病毒中的诊断应用

近年来, 病毒性肺炎的传播风险不断上升, 如呼吸道合胞病毒、流感病毒、副流感病毒、腺病毒等引起的病毒性肺炎极为复杂, 在临床症状、影像学特征上的表现差异较小, 且具有快速传播和变异的特点, 新的病毒株出现时现有诊断方法无法及时识别。在此背景下, tNGS 技术应运而生。

报道指出, 目前已出现一种基于 tNGS 的检测技术,

即 ViroCap 检测技术。该技术通过使用高特异度的 DNA 探针捕获病毒基因组序列, 能够检测到低浓度的病毒, 且具有高度的特异性, 减少了假阳性和假阴性的风险。与传统的 PCR 技术相比, ViroCap 能够在一次检测中同时识别多种病毒, 提供更全面的病毒诊断信息, 尤其是在多种病毒共感染的情况下, 诊断信息仍较为准确。另有研究指出, tNGS 能够同时检测 DNA 和 RNA 病毒, 而宏基因组下一代测序(mNGS)通常只能检测 DNA 或 RNA 中的一种^[9]。这使得 tNGS 在检测 RNA 病毒(如鼻病毒)时具有明显优势。Li S 等人的研究结果显示, tNGS 能够成功检测出鼻病毒 A、B、C 的三种亚型, 但 mNGS 却无法对鼻病毒的亚型进行分类, 这是由于 mNGS 仅能采取 DNA 测序^[10]。另外一项研究中发现, mNGS 中的例患者检出了人疱疹病毒, 但 tNGS 却未能检测到。在接下来的治疗中, 虽然多数患者未接受治疗但仍出现好转, 这意味着这些病毒可能是定植而非致病^[11]。

此外, 还有研究发现, tNGS 可以通过捕获富集技术, 能够检测到传统方法难以发现的病毒, 甚至是一些未被临床实验室常规检测的病毒^[12]。Wylie KM 等对 ViroCap 技术和宏基因组鸟枪测序技术进行比较^[13], 发现相较于宏基因组鸟枪测序技术, ViroCap 技术不仅诊断出了所有预期的病毒, 还额外发现了其他的 20 多种病毒。然而, 有研究发现, 新病毒的基因组与现有捕获探针的序列差异较大, 导致新病毒基因组无法被有效富集, 这也限制了其在新发突发传染病检测中的应用范围^[14]。笔者认为, 对于肺部感染病毒的诊断, 除推动病毒诊断技术的发展外, 有效的防控方案仍为加强对病毒检测和加快建立预警系统, 以便及时发现和应对新的病毒威胁。

2.3 在真菌中的诊断应用

肺部真菌感染主要是由真菌感染侵袭人体肺部从而导致支气管-肺部疾病。常见的肺部真菌感染主要包括肺念珠菌感染、肺曲霉菌感染、肺隐球菌感染、肺孢子菌感染等。其中, 条件致病菌占大多数, 主要有念珠菌、曲霉菌、隐球菌等。正常情况下, 真菌广泛存在于上呼吸道, 并不会致病, 但当患者长期应用免疫抑制药或机体抵抗力下降, 真菌就会侵袭肺部导致感染。研究指出, 真菌细胞壁较厚, 传统核酸提取方法效率较低, tNGS 在样本处理阶段通常结合珠磨法、酶解法等破壁技术来充分释放真菌核酸。廖毓香等通过优化破壁条件, 成功提高了屎肠球菌等检出率, 但其在研究中同样指出, 白色念珠菌的检测仍需进一步优化^[15]。姚璐等在低丰度真菌中采用 tNGS 技术进行检测, 成功确诊 1 例暗色丝孢霉感染病例^[16]。此外, 在张玉林等的成人肺炎诊断中发现, tNGS 的真菌检出率

(15.05%)明显高于 mNGS(13.12%)。这意味着 tNGS 在真菌检测方面更优于宏基因组测序^[17]。

2.4 在衣原体、支原体中的应用

Dunlap 等在报告中强调, tNGS 所检测出 1 例的肺炎支原体感染与血培养检测出的坏死梭形杆菌不一致, 这说明 tNGS 为诊断肺部支原体提供了新的可能^[18]。然而, 目前有关 tNGS 在肺炎支原体感染中的研究较少, 且部分研究表明, tNGS 在肺炎支原体中的检出率较低, 虽然这可能与样本来源有关, 但仍需要未来的研究进一步去验证^[19]。

衣原体作为一类细胞内寄生的微生物, 同样可以引起下呼吸道感染。近年来鹦鹉热衣原体感染的趋势有所增加。传统的衣原体检测方法如 PCR 等, 虽然具有较高的灵敏度, 但往往只能针对特定的衣原体类型进行检测。虽然 tNGS 在衣原体感染中的应用尚处于起步阶段, 但荣蓉等人在研究中提及了 mNGS 在鹦鹉热衣原体感染中诊断效能较高, 可作为接下来的研究重点^[20]。

3 总结

tNGS 技术作为一种新兴的高通量测序方法, 在肺部感染病原体的诊断中展现出了独特的优势。通过精确的靶向设计, tNGS 技术能够实现对多种呼吸道病原体的快速检测, 为临床诊治提供了更为全面的病原体诊断信息。此外, tNGS 技术还具有样本需求量少、检测周期短等优点, 进一步提升了其在肺部感染病原体诊断中的实用性, 然而, 尽管 tNGS 技术取得了显著的进展, 但仍存在一些限制。如样本采集和处理对检测结果具有较大影响, 且 tNGS 检测技术的成本相对较高。此外, 目前 tNGS 技术大多应用于细菌、真菌及病毒检测中, 在衣原体和支原体检测中的应用较少, 因此还需要进一步验证其适用范围。随着 tNGS 技术的不断进步和应用成本的降低, 该技术仍有望在肺部感染病原体诊断中发挥更重要的作用。

参考文献

- [1] 徐伟玲, 于少飞. 病原靶向二代测序在下呼吸道感染病原体诊断中应用价值研究进展[J]. 检验医学与临床, 2023, 20(20): 3068-3072.
- [2] 宋燕华, 周子博, 闫亚芳. 宏基因组二代测序在骨关节感染病原学诊断中的应用价值[J]. 河南医学研究, 2024, 33(24): 4471-4474.
- [3] 李婷, 何铭辉, 林钊, 等. 病原靶向二代测序(t-NGS)在重症患者中的病原学诊断应用研究[J]. 岭南急诊医学杂志, 2024, 29(6): 624-627+631.
- [4] 胡丽玲, 杨晓云, 郑纺. 宏基因组二代测序在感染性疾病精准诊断中的应用进展[J]. 中国实验诊断学, 2023, 27(9): 1105-1110.
- [5] 张静, 张厚亮, 周兴悦, 等. tNGS技术在天津市发热呼吸道症候群病原特征分析的应用研究[J]. 广州医药, 2024, 55(12): 1421-1429.
- [6] 宁宁. 肺泡灌洗液靶向二代测序检测在儿童社区获得性肺炎诊疗中的应用价值[D]. 南昌: 南昌大学医学部, 2023.
- [7] 孟翠翠. 宏基因组二代测序技术在感染性疾病病原体检测中的诊断价值研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2023.
- [8] 黄晓园, 郑凯文, 张俊杰, 等. 基于多重PCR靶向测序技术建立临床病原菌检测方法[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2023, 15(9): 1473-1477.
- [9] 董文超, 咎强, 马建兵, 等. 宏基因组二代测序技术在假体周围感染中寻找病原菌的应用和价值[J]. 实用骨科杂志, 2022, 28(1): 30-35.
- [10] LI S, TONG J, LIU Y, *et al.* Targeted next generation sequencing is comparable with metagenomic next generation sequencing in adults with pneumonia for pathogenic microorganism detection [J]. Infect, 2022, 85(5): e127-e129.
- [11] 封韬, 付堃, 张智慧, 等. 宏基因组二代测序技术在血液病患者合并感染诊疗中的应用[J]. 长春师范大学学报, 2024, 43(4): 87-91.
- [12] 李健雄, 施勇, 徐刚, 等. 基于纳米孔靶向全基因组测序技术的新冠肺炎病例快速鉴定研究[J]. 实验与检验医学, 2024, 42(2): 131-133.
- [13] WYLIE K M, WYLIE T N, BULLER R, *et al.* Detection of Viruses in Clinical Samples by Use of Metagenomic Sequencing and Targeted Sequence Capture [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2018, 56(12): e01123-18.
- [14] 魏滔滔. 宏基因组二代测序在DD供肾移植术后肺部感染诊疗中的应用[D]. 衡阳: 南华大学, 2021.
- [15] 廖毓香, 朱水泉, 伍桂雄, 等. 靶向高通量测序技术(tNGS)在下呼吸道感染病原体检测中的诊断价值[J]. 系统医学, 2024, 9(6): 81-83, 87.
- [16] 姚璐. *M. arundinis*引起播散性暗色丝孢霉病1例报道并文献复习[D]. 南宁: 广西医科大学, 2018.
- [17] 张玉林, 曹彬. 呼吸道感染的病原学检测及其临床应用[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2024, 47(5): 497-500.
- [18] DUNLAP D G, MARSHALL C W, FITCH A, *et al.* Improved detection of culprit pathogens by bacterial DNA sequencing affects antibiotic management decisions in severe pneumonia [J]. American Journal of Case Reports, 2018, 19: 1405-1409.
- [19] 李雪, 李丹. 老年医院获得性肺炎病原体快速检测方法的建立和应用[J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(8): 1835-1839.
- [20] 荣蓉, 林惠贞, 黄祎丹, 等. 重症鹦鹉热衣原体肺炎1例[J]. 广东医科大学学报, 2024, 42(1): 115-117.