

• 专家面对面 •

mNGS 在检验与临床中的应用

李 维¹, 卓 超^{2#}, 许建成^{3#}, 余方友^{4#}, 陈 茶^{5#}, 关鸿志^{6#}

1. 重庆大学附属中心医院/重庆市急救医疗中心检验科, 重庆 400012; 2. 广州医科大学附属第一医院/广州呼吸健康研究院感染科, 广东广州 510120; 3. 吉林大学第一医院检验科, 吉林长春 130021; 4. 上海市肺科医院/同济大学附属肺科医院检验科, 上海 200433; 5. 广东省中医院大学城医院检验科, 广东广州 510006; 6. 中国医学科学院北京协和医院神经内科, 北京 100005

关键词:宏基因组二代测序; 报告解读; 感染性疾病; 序列数; 检验与临床

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.01.001

中图法分类号:R-1

文章编号:1673-4130(2023)01-0001-07

文献标志码:A

OSID:



宏基因组二代测序(mNGS)投入临床使用的时间并不算长,但近些年随着诊断分子微生物学的飞速发展,mNGS因具有耗时短、检测范围广等优势受到检验科和临床的广泛关注。相较于传统的临床微生物的检测方法,

mNGS不仅有效提高了病原微生物的检出率,也弥补了传统检测方法的不足,特别是在某些疑难重症感染性疾病的精准诊疗中发挥着重要作用。随着近年来mNGS相关应用规范及专家共识的相继出台^[1-5],如何利用现有的新兴检测手段完善目前的临床诊疗路径,提高对疾病的诊断效率,是检验科和临床都亟待思考的问题。比如mNGS检测的基本流程和管理要求有哪些?mNGS在鉴别菌种方面的准确性如何?mNGS技术应用于感染性疾病的临床适应证有哪些?mNGS报告如何解读,解读应注意哪些问题?在什么场景或时机下使用mNGS可以最大化提高患者的预后?医院检验科可以依托mNGS平台开展哪些临床研究工作?检验科和临床对mNGS未来发展的期待是什么?

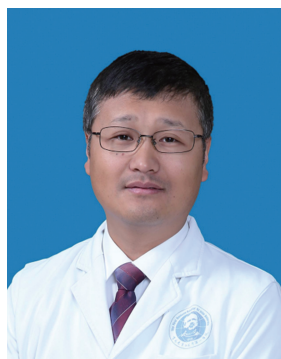
关于mNGS有很多需要深入探讨的问题。本期邀请国内多位检验与临床的一线专家对mNGS的相关问题进行了深度探讨,同时也对mNGS未来的发展提出了展望。

序列数的影响因素有哪些?



卓超:mNGS是一种不需要培养,不需要前提假设,从临床样品中提取核酸,利用基因组学的方法研究样品中所有微生物的种类和含量的技术。mNGS检测中的Reads指的是匹配到该病原体的序列数目,其多少与标本中病原体本身载量负荷、核酸提取量、人源序列比例有关^[1]。

2 mNGS技术应用于感染性疾病的临床适应证有哪些?微生物学适应证有哪些?耐药学适应证有哪些?流行病学和感染控制学适应证有哪些?



许建成:当出现以下临床适应证:(1)不明原因发热或发热症候群;(2)急危重症不除外感染;(3)免疫受损疑似继发感染;(4)疑似局部感染,病原学诊断未明确、不及时处理则后果严重;(5)高度疑似感染性疾病,常规抗感染治疗无效;(6)慢性感染或慢性疾病不除外感染;(7)食物中毒、溺水、旅游、特殊环境(不除外感染性疾病),建议在行常规手段检测的同时开展mNGS。但mNGS不适用于评估抗感染治疗效果,以及常规微生物

作者简介:李维,女,主任技师,主要从事血液筛查、感染性疾病的标志物研发和经血传播疾病等相关研究。[#] **共同第一作者简介:**卓超,男,主任医师,主要从事发热性疾病、呼吸道感染性疾病的诊治及细菌耐药性监测和细菌耐药机制相关研究。[#] **共同第一作者简介:**许建成,男,主任医师,主要从事微生物学实验室诊断相关研究。[#] **共同第一作者简介:**余方友,男,主任技师,主要从事细菌耐药机制相关研究。[#] **共同第一作者简介:**陈茶,男,主任技师,主要从事细菌耐药机制及临床疑难菌鉴定及分类学研究。[#] **共同第一作者简介:**关鸿志,男,主任医师,主要从事脑炎与神经感染免疫性疾病、罕见病、临床脑脊液学研究。

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20221222.1020.002.html>(2022-12-27)

物检查容易明确病原体的感染^[2]。

当出现以下微生物学适应证:(1)出现疑似新发病原体或某特殊病原体;(2)传统检测手段无法检出微生物但确有微生物感染指征;(3)考虑多病原感染,传统技术手段只能明确其中一部分,建议常规手段检测的同时开展 mNGS。感染性疾病已明确病原体或考虑某病原体,需知晓毒力因子相关信息时,可考虑行 mNGS 物种鉴定联合 mNGS 检测毒力基因。

当正常有微生物部位疑似感染,或正常无微生物部位疑似感染但标本有污染时,不建议采用 mNGS 进行耐药性检测;正常无微生物部位疑似感染且标本采集过程污染概率低,考虑采用 mNGS 进行物种鉴

定的同时检测耐药基因;有菌种特异性的耐药性基因的检测考虑 mNGS 检测耐药基因,预测耐药表型。

当疑似出现聚集性事件或暴发事件时,考虑微生物导致感染性疾病,或去过特殊区域或有特殊工作史,病因未明的感染性疾病,建议常规手段检测的同时开展 mNGS。

3 mNGS 检测的基本流程和管理要求有哪些?

许建成:标本采集的基本要求:(1)标本应严格无菌采集,避免污染;(2)标本应添加核酸稳定剂;(3)标本运送过程须防污染、冷链快速运送;(4)标本不能及时检测时,应保存于低于-80℃冰箱或液氮。不同类型标本采集要求见图 1^[3]。

标本种类	标本类型	体积	患者准备	采集要求	采集管	运输条件
一般类型	全血	成人3~5 mL 婴幼儿1 mL	(1)皮肤清洁消毒 (2)抗菌药使用前采集 (3)如已使用抗菌药物, 在下 次用药前采集	采血后立即轻轻 颠倒混匀8~10次	专用采 血管	常温 (96 h内)
	粪便	3~5 mL	-	新鲜	无菌杯	
无菌标本	脑脊液	≥1.2 mL	(1)皮肤清洁消毒 (2)抗菌药使用前采集	建议第2管以后的 脑脊液	无菌杯	立即运送, 推荐干冰/冰 盒运输
	关节液、 胸腔积液、 腹水	≥3 mL	(1)皮肤清洁消毒 (2)抗菌药使用前采集	采样过程尽量保 持无菌环境, 皮 肤严格消毒		
	玻璃体液/ 房水	50~100 μL	(1)抗菌药使用前采集			
	新鲜组织	2~3针穿刺或绿 豆大小组织	不能注射器直接送检			

A

标本种类	标本类型	体积	患者准备	采集要求	采集管	运输条件
呼吸系统标本	BALF支气管冲洗液	5~10 mL	(1) 减少口咽部菌群污染 (2) 抗菌药使用前采集	肺泡灌洗部位为CT上病灶 相应部位	无菌杯	48 h 内标本可暂存 2~8℃, 冷链运输
	咳痰	5~10 mL	(1) 清水漱口 2~3 次 (2)用力咳出深部痰	-		立即运送至实验室,推荐干 冰/冰盒运输
	经人工气道吸痰	-	-	弃前段可能污染部分		
	诱导痰	-	-	用 3%~9%浓盐水诱导深部 咳痰		匀浆保存:同上;新鲜肺组 织:专用组织保存液常温运 送
	肺组织	不大于黄豆粒 大小	-	靠近外周病灶 CT或彩超引 导下行肺穿刺活检	专用保护液的拭子 采集套装	2~8℃运输
	鼻咽拭子	-	(1)先擤鼻涕 (2)头部向后稍微倾斜	-		48 h 内标本可暂存 2~8℃, 冷链运输
	胸腔积液/脓液	-	-	超声引导或 CT 引导下穿刺 留取标本	-	同肺组织
	纵膈或肺门淋巴结 组织	-	-	细针穿刺直接留取标本	-	无血清分离: (1)室温保存, 常温运输; (2)已离心血浆-80℃保存
	外周血	-	抗菌药使用前采集	-	DNA 标本保存管	常温
	福尔马林固定石蜡 包埋样品切片	10~15 张	-	-	-	常温

B

注:A为一般类型、无菌标本标本采集要求,B为呼吸系统标本采集要求。

图 1 标本采集要求

标本长期保存的原则:(1)用于 DNA 测序的标本在-20℃保存不超过 7 d;(2)用于 RNA 测序的标本应在-80℃保存;(3)避免标本反复冻融,一般不超过 3 次;(4)理论上-80℃可长期保存;(5)怀疑高致病性或新发、突发传染病,须遵循国际“通用生物安全标本

转运要求”包装及转运要求,尽可能在生物安全条件下提取核酸后再运送标本。

核酸提取的基本要求:(1)建立经验证的标准化核酸提取流程;(2)选择经验证的病原体核酸提取试剂盒进行提取,应验证细菌、真菌、病毒、寄生虫等核

酸提取效能,应保证病毒核酸提取完整性,胞壁较厚病原体应采取常规法以外的破壁方法或以游离核酸 (cell free 核酸) 为检测对象进行检测;(3)高宿主背景标本提取时可采用经验证方法去除宿主细胞,如使用去污剂、低渗溶液、抗甲基化 DNA 磁珠、基因编辑技术剥离目标序列或在提升检测灵敏度基础上选择 cell free 核酸进行病原检测,更大程度降低人源干扰,提升检测准确性;(4)提取过程应有防污染措施,包括阴性对照和阳性对照。

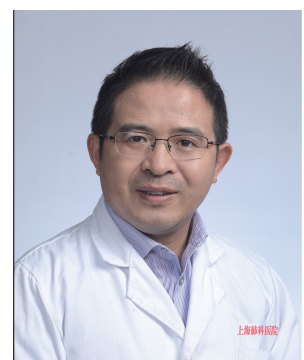
建库的基本要求:(1)采用经过验证的流程进行建库;(2)建库慎用各种扩增方法,因扩增会使正常菌群或污染病原体序列扩大,导致真正病原体判断困难。

建库的主要内容包括:(1)制备 DNA 文库:包括末端修复、连接接头、PCR 富集、纯化、克隆生成等过程;(2)制备 RNA 文库:包括去除核糖体、反转录及杂交、片段化、第一/二链合成、末端修复、连接接头、PCR 富集、纯化、克隆生成等环节;(3)明确核酸质量(纯度、浓度)及文库产出标准(文库浓度、片段大小);(4)评估外源核酸污染。

测序的基本要求:(1)采用经过验证的流程进行测序;(2)测序原始数据应进行质控,并且过滤掉低复杂度、低质量的序列,确保测序原始数据质量;(3)标本允许情况下,优先进行宏转录组建库和测序。在测序过程中,需要注意以下几点:①不同测序平台可能会产生不同类型读长;②测序平台错误率不同,错误读取碱基的概率不同;③测序仪在处理具有大的均聚物重复序列、富含 GC、结构重复以及基因组其他复杂区域标本时,常会错误读取碱基;④不同标本测序深度需求不同,主要由不同标本宿主背景比例、微生物多样性决定,其次是不同测序平台和测序成本影响。

生物信息学分析流程应经性能确认和验证,包括数据库优化、比对方法和比对参数的优化等,确保准确报告致病病原体。

4 如何考虑 mNGS 检出低序列的病毒、分枝杆菌属、诺卡菌属、真菌?



余方友:对于序列数的多少才有意义的问题目前没有统一的规定。从采集的标本中获得的结核分枝杆菌,无论序列数多少,应慎重对待这些结果,结合临床表现及影像学特征可考虑为病原菌的可能,但也应考虑假阳

性的可能。而非结核分枝杆菌在环境中大量存在,因此若检出非结核分枝杆菌,需要结合临床来判断其致病性。对于分枝杆菌属、诺卡菌属、真菌等破壁困难的微生物而言,可能提取出的 DNA 很少,因此即使序列数很低,也应考虑为致病菌。但对于这类微生物的阴性预测值则需要谨慎考虑,可能因破壁困难, DNA 没有被成功提取,从而导致假阴性的情况。因此需要进一步结合临床,并寻找辅助实验来验证以确认其致病性。

5 mNGS 在鉴别菌种方面的准确性如何,对于定植和感染的区分是否有明确的依据。

许建成:mNGS 能否准确鉴定定植或感染病原体,目前难有定论。传统检测方式,比如痰标本培养,根据行标或共识容易判断定植或感染病原体,但是 mNGS 检测的病原体种类繁多,许多未知病原体,在数据库或文献中很难查到相关信息,此时很难评估定植菌或致病菌,只能不断积累数据,综合评估。

临床医生是感染性疾病诊治的执行者,经过临床医生的诊疗实践,才能确认 mNGS 报告的病原体是否有价值、患者是否需要治疗、治疗是否有效等。所以对来自呼吸道、消化道、生殖道等正常有微生物的标本,准确判断定植或感染病原体还有很长的路要走。工作中时常会遇到病原体检测报告与患者病情不符的情况,如患者尚未出现明显感染的临床表现,但 mNGS 检测却报告出很多病原体,这时需要评估该检测报告。mNGS 检测范围很广,对大部分病原体检测准确,但临床医生应意识到有些病原体可能是标本采集、核酸提取、建库引入的污染。总体来讲, mNGS 是一项非常好的技术,但在区分定植菌和感染菌方面还有待进一步探讨及评估。

6 mNGS 报告应如何解读?



陈茶:第 1 点,在解读 mNGS 报告时应结合不同的标本类型及检出病原微生物的种类来分析,同时应关注该标本是来源于无菌部位还是有菌部位,即在确认致病微生物时应考虑微生物是否真正来源于感染部位,是否是真正的潜在病原菌。

第 2 点,从 mNGS 报告结果中时常会发现常见的、易于培养的病原体,对于这些病原体,建议结合传统微生物培养方法,将两种方法结合起来,有助于临床更加准确地判断。第 3 点,需关注核酸提取过程中破壁较困难的微生物,如分枝杆菌属、奴卡菌、真菌(尤其

是丝状真菌)等。因为在常规情况下第三方公司或者实验室采用的方法对这些破壁困难的微生物的破壁效果可能不好,最后得出的结果可能是该类微生物序列数较低,但我们仍需将其纳入可能的病原微生物,并积极采用其他方法进行验证,如血清学实验等。虽然 mNGS 阴性结果对排除感染有较好的预测价值,但对于核酸提取难度大的微生物,则需要注意其漏检的情况,即 mNGS 对此类病原微生物的阴性预测价值较低。第 4 点,不能通过不同病原微生物检出序列数的多少来判断其致病性的大小,即以序列数的多少来判断谁是致病菌谁不是,需结合微生物种类的差异以及致病性的特点来判断。最后, mNGS 报告的解读不能仅凭结果简单地判断,还需结合临床症状,以及临床微生物、分子生物学、影像学及感染科医生等多学科的共同讨论,来综合判断。

7 宏基因组阴性结果对排除感染性疾病的价值是什么呢?

陈茶:关于宏基因组测序阴性结果对于排除感染的价值问题是目前大家非常关注的问题。是不是宏基因组测序阴性结果一定说明不存在感染的情况呢?实际情况并没有那么简单。宏基因组测序阴性结果在大多数情况下可以排除微生物感染的存在,但谨慎来讲,其仅能说明存在感染的可能性较低,因为对于病原微生物数量少或核酸提取困难的微生物,宏基因组测序可能出现假阴性结果。想提高宏基因组测序阴性结果的诊断价值,关键在于应注意整个过程中的环节控制,使其避免出现假阴性结果的情况。

第 1 点,关注标本质量问题。正确的检验结果的前提是选择合适的标本类型及采集合格的标本。注意无菌操作,避免人为的污染。另外,标本保存、运输条件都非常关键。

第 2 点,优化核酸提取流程。核酸提取过程中的任何环节都可能会影响到检验结果,如果临床已提示可能存在胞内菌、结核分枝杆菌、真菌等感染,则更应当关注标本的前期处理等过程。每批样品都需做阴性或者阳性质控,监控好每个质量环节,这有助于提高病原微生物的检出。在工作中,若遇到宏基因组测序呈阴性结果,但采用显微镜法等传统检测方法测出病原体的情况,提示在宏基因组测序的实验流程,如前期核酸提取等步骤需要优化。

第 3 点,完善数据库。若数据库未及时更新完善,不包括新的或少见物种,也可能会出现假阴性结果。因此不断更新和完善数据库的完整性,对于提高

病原菌的检出率非常重要。

综上, mNGS 技术在微生物检测方面具有较高的价值,但整个实验及应用过程,需要进一步去完善,同时,要正确看待其阴性结果,不能盲目将得到的阴性结果即认为是排除感染的依据。

8 mNGS 用于感染性疾病的报告解读应注意哪些问题?

许建成:解读报告应关注的参数包括测序丰度、总序列数、特异序列数、阈值、微生物序列的数据量、测序深度、测序质量、覆盖度等。

mNGS 检测报告解读的基本原则之一是分级解读。其中,高等级条件致病菌(如结核分枝杆菌等)在大部分标本中均可能是病原体;中等级条件致病菌(如念珠菌属)在无菌样本中可能为病原体,但在痰液、肺泡灌洗液等标本中可能是共生菌;低等级条件致病菌(如凝固酶阴性葡萄球菌)在大部分样本中为共生菌,在少数情况为致病菌。

检测报告中的序列数通常为特异且唯一比对到某病原体基因组上的序列条数,序列数越高说明该病原体存在的可信度越高;而同一患者的多个样本中检出相同病原体,此病原体致病的可能性增加。

阴性预测值的报告解读分以下几类。第一种情况是在正常菌群样本(如痰液、肺泡灌洗液等存在微生物的样本)中,检测结果无病原体检出,但存在较多疑似背景微生物,提示标本为合格标本,应着重关注患者基本信息及跟进最新临床病情,综合判断,排除感染的可能性。第二种情况是在采集的样本不能反映感染病灶情况(如肺部感染,但采集标本为外周血)时,检测结果和疑似背景微生物均无检出,对于脑脊液、外周血等无菌样本可提示排除感染;而痰液、肺泡灌洗液等存在微生物的样本必须重新回溯检测流程和质控,必要时从样本核酸提取开始重新检测和复核。

对罕见病原体、胞内菌等特殊病原体的报告解读困难的原因包括样本中含量低、胞内释放未完全、核酸提取效率低、序列数低于报告阈值等。对罕见病原体的报告解读,应了解比对数据库内容,明确是否涵盖少见病原或新发病原;结合病史并进行临床沟通后再报告。对胞内、破壁困难的微生物的报告解读,可以调整报告阈值;有时即使序列数很低,也要考虑为致病原体;积极寻找辅助实验帮助验证,如特异引物 PCR、一代测序、曲霉菌 GM 试验、IgG 抗体等。

此外, DNA 和 RNA 同时检出可提示致病的可能性更高。对于重症疾病、复发感染、不明原因发热、长

期使用免疫抑制剂等情况,推荐 48~72 h 内完成检测并发出报告。对于常规易培养的病原微生物,如革兰阳性菌中的葡萄球菌属、多数链球菌、肠球菌,革兰阴性菌中的肠杆菌目等,传统培养手段能给出较好结果,并非 mNGS 优势所在。血浆样本的游离 DNA 进行 mNGS 检测时,应注意检出序列属于致病微生物、样本污染、死亡微生物裂解,还是定植菌群所致的一过性菌血症。

对于不同标本类型的报告解读,在确认致病微生物时,应考虑检出微生物是否为感染部位的潜在病原体,注意排除常见定植菌、污染菌与工程菌的影响,不同标本类型的报告解读见图 2^[4]。

mNGS 检测结果应由一定生物信息学知识,从事临床感染或临床微生物等专业人员,结合患者临床背景、影像学资料、其他实验室检查结果,综合判断。

9 如何逐渐完善目前的临床诊疗路径? 新型病原和危重症患者的诊疗路径有何不同?



关鸿志:临床诊疗路径的选择需要根据不同的疾病采取不同的策略。以神经感染性疾病为例,新英格兰杂志一篇实验室学者发表的多中心脑脊液第二代测序研究中,从患者发病到使用脑脊液第二代测序的平均时间为 40 d,而我们国内神经科医生做了一项多中心研究,从患者发病到采用第二代测序的平均时间为 10 d。我们当时研究的入组标准为首次腰穿之后无法确诊,若经验治疗无效,在第二次腰穿时取脑脊液送检行第二代测序,或是将第一次腰穿冻存的脑脊液送检行第二代测序,最后统计平均送检时间为 10 d 左右,这一入组标准在当时可以作为脑脊液第二代测序的临床适应证或者推荐检测时机。而目前临床上从发病到进行第二代测序的时间可能已不到一周,或者只有 3~4 d。

第二代测序技术真正改变了神经感染性疾病的诊断策略。以往的 PCR 检测方法对单纯疱疹性脑膜炎的确诊率较低,可及性不高。尽管我们推测疱疹性脑膜炎是国内成人最常见的病毒性脑炎类型,但在以前的临床上却难以通过检测证实。脑脊液第二代测序临床应用,使中国人群的病毒性脑炎病原谱得以逐渐清晰,且随着第二代测序地广泛应用,单中心、多中心乃至全国的神经感染病原体谱相关研究也越来越多。

脑脊液第二代测序作为一项单一病原体检测方

法,阳性率可达到 30%~40%,这是目前其他技术检测无法匹及的。在未来,第二代测序技术随着其可及性及成本的降低会被越来越广泛应用,而成为一种一线检测方法。目前,对于病因不明的脑炎患者,我们首先选择可及性更高的一线检测方法,但如果一线检测方法无法得出有效的鉴别诊断结果,则需进行第二代测序,或者对于特殊类型的脑炎,或重症脑炎,采用传统检测技术可能无法得出可靠结果时,可采用第二代测序。第二代测序对低载量病毒灵敏度较高,覆盖度很广,因此其正在发展成为一项一线神经性感染疾病的诊断技术。但我认为它不会替代传统的诊断技术,对于黄病毒脑炎等,血清学的检测,包括 IgM 抗体检测仍然主要的确诊实验。第二代测序对 RNA 病毒的检测,其灵敏度目前还达不到临床期待的水平。在未来,如果第二代测序成本进一步降低,可及性进一步提高,其可能成为一项一线检测手段,更多的脑炎病例会在首次腰穿脑脊液检查时采用第二代测序。有必要探索以第二代测序为核心的神经感染病原体诊断策略,第二代测序与传统检测手段联合应用,传统检测方法(如血清学检测、PCR、培养法等)可作为第二代测序结果的验证实验或补充试验。

10 在什么场景或时机下使用 mNGS 可以最大化地提高患者的预后?

关鸿志:对于疾病而言,精准的诊断是有效治疗的基础。如果以神经性感染疾病为例,神经性感染疾病患者种类非常多,病情多较危急,现实情况下不允许进行多次经验性治疗,我们医院目前在进行的脑炎一体化诊断项目,项目入组标准为脑脊液白细胞计数 $>5 \times 10^6/L$,即根据国际卫生组织标准,存在脑炎的症状,且脑脊液白细胞升高可确认为脑炎综合征。脑炎的病因总体上分为有感染性和自身免疫性两大类,因此确诊脑炎的患者会进行第二代测序和自身免疫性脑炎相关抗体检测。如果二者结果均呈阴性,会追加肿瘤相关检测,综合应用以上技术可达到 60%~70%的确诊率,这样可在首次腰穿后达到一个较高的确诊率。若在三、五年前是无法实现这样高的确诊率。我们也希望通过提高确诊率,来提高治疗的及时性和效果,从而改善患者预后。

11 检验科可以依托 mNGS 平台开展哪些临床研究工作?

许建成:第 1 点,最重要的一点,无论是临床还是检验科都希望做一项工作,就是根据不同部位或不同类型标本,绘制出致病菌谱。目前在解读报告时,最

常见的问题是需要评估检测到的病原体是致病菌还是定植菌。因此未来可以设计实验,分析各种标本的致病菌及定植菌。第 2 点,感染性疾病不同部位、不同类型标本 mNGS 检测的相关性值得探讨。对于同一种感染,我们可以采集不同部位标本,如肺炎患者除了采集痰液,也可以采集血液标本或其他类型标本,因此分析不同部位标本 mNGS 检测的价值及相关性是未来临床研究工作之一。第 3 点,虽然目前 mNGS 检测主要关注的是病原体的检测,对致病菌的耐药分析还较少关注,但未来我们可以将 mNGS 与

传统检测方法(纸片法、MIC 法、PCR 法等)比较,探究不同方法之间的相关性。

12 目前,mNGS 检测临床应用面临哪些挑战?

许建成:mNGS 检测面临挑战,包括费用偏高、报告时间偏长、测序深度偏低、目前检测流程尚未标准化(阈值、背景菌等)、质量保证体系尚不完善、报告尚不规范、报告解读常与临床脱节、与传统方法的结合有待加强等。mNGS 技术是一个非常有前景的技术,但在临床研究和科研方面,仍需继续研究和评估,使其能为临床提供更有价值的服务。

无
菌
标
本
——
脑
脊
液
标
本

A

报告微生物特性	初步报告	举例
神经侵袭性	确定为责任病原体	肺炎链球菌、单纯疱疹病毒1型等
非人体定植菌且环境中不常见	可能为责任病原体	产单核细胞李斯特菌、猪带绦虫等
核酸提取难度大,难检出	考虑为致病病原体	结核分枝杆菌、隐球菌、白色念珠菌

阳性情况	报告分析	举例
报告微生物与传统微生物检查结果一致	报告微生物是责任病原体可能性大	-
报告微生物与传统微生物检查结果不一致	根据检出微生物特性+临床表现综合评估致病可能	-
可能为DNA病毒在中枢神经系统感染潜伏	综合临床病情判断感染时期	脑脊液EB病毒阳性,可见于潜伏感染、活动性感染等多种中枢神经系统疾病

有
菌
标
本
——
呼
吸
道
标
本

B

标本类型	报告微生物特性	初步报告	举例
痰液或BALF	上呼吸道常见定植微生物	考虑为定植微生物	草绿色链球菌、奈瑟菌属、嗜血杆菌属等
	不存在或很少存在于口腔的病原体	考虑为致病微生物	嗜肺军团菌、衣原体、白喉棒状杆菌等
呼吸道标本	结核分枝杆菌复合群(MTBC)	考虑为致病病原体	MTB、卡内蒂分枝杆菌、牛分枝杆菌等
	NTM	结合检出分枝杆菌属排名及种的类别,考虑致病微生物	鸟胞分枝杆菌复合物、脓肿分枝杆菌复合物
	真菌	如序列数较低,需结合其他学科(影像学、病理学等)考虑致病微生物	隐球菌属、曲霉属、毛霉属等
	院内感染病原体	综合评估检出序列数、相对丰度与机械通气、临床信息、影像学证据,考虑致病微生物	鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌等

有
菌
标
本
——
呼
吸
道
标
本

C

标本类型	报告微生物特性	初步报告	举例
痰液或BALF	低毒力病原体	考虑为致病微生物	免疫功能抑制患者感染金黄色葡萄球菌
	高致病性/传染性	复核检测结果+使用其他技术验证,必要时需上报疾控中心	狂犬病病毒、布鲁菌等
呼吸道标本	环境中广泛存在微生物	考虑为标本处理中的污染	军团菌、曲霉菌、阿米巴等
	口腔厌氧菌	结合病史、标本类型、文献资料综合判读	具核梭菌、星状链球菌等
	多个标本检测出同一病原体(2种类型呼吸道标本/1种呼吸道标本+1种其他种类标本)	如序列数较低,需结合其他学科(影像学、病理学等)考虑致病微生物	隐球菌属、曲霉属、毛霉属等

注:A 为无菌标本脑脊液标本类型,B、C 为有菌标本呼吸道标本类型。

图 2 不同标本类型的报告解读

13 临床对 mNGS 未来发展的期待都是怎样的, 比如需要 mNGS 有哪些性能上的升级呢?

卓超:目前,在中国,mNGS 正处于高速发展的阶段,也帮助临床解决了很多问题。未来可以优化的有以下几个方面,第 1 点是 DNA/RNA 双流程检测的问题,在 mNGS 检测中,若临床医生默认送检程序为 DNA 流程,则可能存在部分重要的 RNA 病毒(如流感病毒、新型布尼亚病毒等)漏检的情况。第 2 点是前处理优化问题,mNGS 检测关键的两个点是核酸富集及去除人源宿主核酸。目前大部分公司采用的是反向富集的方式,采用正向富集的较少,未来可通过正向富集和反向富集结合的方式来优化。此外,可通过定量 PCR 法检测人源宿主核酸占比的方式在前处理阶段进行优化。第 3 点是数据库优化问题,目前很多测序公司直接下载现有数据库,但应用于临床时会出现错误,因此在未来可通过临床建立数据库,为病原体的检出和疾病诊断提供更精准的数据。第 4 点是被靶向加靶向的问题,目前 mNGS 检测价格昂贵,新开发的靶向二代测序(tNGS),可靶向检测常见的引起感染性疾病的病原体,因此降低了检测费用,同时还有助于重要的独立基因和耐药基因的检出,从而指导临床用药。第 5 点,也是最难的一点是实现人工智能的解读,大家公认检测结果的解读需结合临床,但是临床医生的认知水平参差不齐,因此,建立人工智能分析,可为基层医生或者更多受众面进行准确地分析提供帮助。第 6 点是测序公司本土化,本土化对于送检流程及标本质量控制非常重要,目前大部分标本是由临床医生采集后,由第三方公司派人送检,整个过程均可能造成标本污染,而降低最终报告的可信度和价值。因此在未来,希望 mNGS 检测实现本土化,同时与传统检测技术进行比对,最终得到一个准确、可信的报告。

14 检验科对 mNGS 未来发展的期待都是怎样的, 比如需要 mNGS 有哪些性能上的升级呢?

李维:第 1 点是目前收费和检测成本太高,而国内不少医院检验科都跃跃欲试,希望通过自建平台或分子实验室自己做 mNGS,首先需要把价格和成本降下来,把实惠留给患者;另外还必须要有足够的标本量才能支撑昂贵的仪器和芯片费用,能否开得起机,这

可能是目前医院检验科想要自建平台和已经开始做 mNGS 面临的最大的“瓶颈”和最现实的问题。第 2 点是 mNGS 报告时间相对较长,离临床需要的时间有一定的差距。前面专家谈到实验室平台的本地化,都一致认为本地化检测是医院招标或找第三方平台的重要衡量标准之一。本地化检测可明显缩短报告时间,且可减少因运输产生的标本交叉污染的问题。第 3 点是测序深度不够高的问题,各家平台和公司的测序深度参差不齐,但没有相关法规做出明确的规范。当然测序深度的把控需要与检测成本结合起来,从中找到既能满足检测需求,又能控制检测成本的平衡点。第 4 点是标准化问题,2022 年国家卫生健康委临床检验中心公布的 mNGS 室间质评结果依然不理想,所以各实验室和第三方平台的实验操作还需进一步规范,比对数据库的选择需要进一步的标准化,各方面均有待提高。最后一点,检验人可在未来将更多的精力投入到耐药基因的相关研究上,这可能是下一个值得关注的“风口”。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 中华医学会检验医学分会临床微生物学组, 中华医学会微生物学与免疫学分会临床微生物学组, 中国医疗保健国际交流促进会临床微生物与感染分会. 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.
- [3] 中华医学会细菌感染与耐药防治分会. 呼吸系统感染中宏基因组测序技术临床应用与结果解读专家共识[J]. 中华临床感染病杂志, 2022, 15(2): 90-102.
- [4] 中华医学会神经病学分会感染性疾病与脑脊液细胞学学组. 中枢神经系统感染性疾病的脑脊液宏基因组学第二代测序应用专家共识[J]. 中华神经科杂志, 2021, 54(12): 1234-1240.
- [5] 中华医学会检验医学分会. 高通量宏基因组测序技术检测病原微生物的临床应用规范化专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(12): 1181-1195.

(收稿日期: 2022-10-27 修回日期: 2022-12-20)

(本文编辑: 陈玮嘉 张耀元)