

二代测序技术在脓毒症病原学诊断中应用进展

张瑶璐 卢中秋

摘要 脓毒症是一种由感染所致生理、病理和生化异常的临床综合征,常危及生命,近年来其发生率和病死率均有增多趋势。脓毒症的早期诊断和治疗能有效降低病死率。当前,病原菌培养是脓毒症病原学诊断的主要方法,但是病原菌培养需要数天至数周的时间,使得在临床上无法及时应用针对性的抗菌药物,从而延缓了有效治疗。目前,二代测序技术不断成熟,它检测病原体的速度快、范围广,现已成为感染性疾病中病原学诊断的有效手段,本文就二代测序技术的概念、功能以及二代测序技术在脓毒症病原学诊断中的作用展开论述。

关键词 脓毒症 二代测序技术 病原学诊断

中图分类号 R459.7

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.12.033

脓毒症是一种宿主对感染反应失调导致器官功能障碍的临床综合征,是世界上最常见的危重症之一^[1]。近年来,尽管在诊断和治疗方面均有进展,但短期病死率仍居高不下^[2]。正确的治疗策略对于脓毒症患者来说至关重要,而成功治疗的关键在于确诊为脓毒症后尽早使用抗菌药物。若不能及时使用抗菌药物,脓毒症患者的住院病死率就会大大增加^[3]。病原学培养技术是诊断脓毒症病原体的金标准,但其存在着一些不足,例如,病原体培养所需的时间过长,患者提前使用广谱抗生素导致无法培养出致病菌,无法鉴定除了可培养的细菌和真菌外的微生物等^[4-6]。因此,寻找检测范围广、不受抗菌药物干扰并且快速有效的诊断方法对脓毒症病原体的诊断将有极大的帮助。

近年来,二代测序技术发展迅速,已被证明是遗传性疾病基因诊断的有效手段^[7]。同时,二代测序技术也在感染性疾病的病原学诊断中逐步得到应用,为感染性疾病的准确诊断提供了更多的可靠依据。2014 年, Wilson 等^[8]报道了二代测序技术应用于感染性疾病病原学诊断中的病例。此后,较多报道介绍了二代测序技术在脓毒症病原学诊断中的应用,故本文对此进行综述。

一、二代测序技术概述

二代测序技术(又称为高通量或大规模并行测

序技术)作为一种新兴的分子诊断方法,可在一次测序过程中对样本中的所有核酸片段进行检测,既可检测出人类基因组,也可检测出样本中病原体的核酸序列。二代测序技术的特点是进行合成和延伸的同时进行测序,测序速度比第一代测序快,测序通量也较第一代测序高。二代测序的病原体检测的范围,远大于常规的血培养病原学检测,不仅包括细菌、真菌,还包括病毒、寄生虫等^[9]。近年来使用二代测序技术的成本已经显著降低^[10]。此外,与 Sanger 测序技术比较,二代测序技术不需要靶特异性引物,其优势是通过一次程序的运行,既能识别全部病原体,还能鉴别病原体的分型。因此,该技术在临床上可为医师的疾病判断提供更多有效的信息^[11]。

二代测序技术在临床实验室中最常见的应用包括:(1)全基因组测序:对目标病原体进行测序,获得完整的基因组信息,用于评估流行性疾病中的遗传关系、鉴定新物种等。(2)靶向二代测序:用扩增或探针杂交的方法进行基因富集,即使用 16S rDNA 细菌图谱或 PCR 扩增指定目标核酸片段,然后应用二代测序技术进行检测。(3)宏基因组二代测序:是一种对样本中全部核酸[DNA 和(或)RNA]进行平行测序的方法,可同时从样本中分离和扩增出宿主和病原体的核酸序列^[12]。现有的技术平台主要包括 Roche/454 GS FLX、Illumina/Solexa GenomeAnalyzer、Helicos BioSciences 公司的 HeliScope™ Single Molecule Sequencer、美国 Dana-her Motion 公司的 Polutionator;以及连接法测序,即通过引物来定位核酸信息,技术平台有 Applied Biosystems/SOLiD™ system。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81772112);浙江省重点研发计划项目(2021C03072);浙江省“十三五”中医药重点专科(急诊科)建设项目

作者单位:325000 温州医科大学附属第一医院急诊科;温州市急危重病与救援医学重点实验室

通讯作者:卢中秋,电子信箱:lzq_640815@163.com

二、二代测序技术在脓毒症病原学诊断中的应用

1. 病原体检测:对疾病进行快速诊断并获得准确的病原学资料对于有效的治疗至关重要。大量病例报告和临床研究表明,二代测序技术可以用于检测脑脊液、呼吸道分泌物、粪便、尿液和血液等中的病原体,能够提高包括脓毒症在内的感染性疾病病原学诊断的准确性、及时性,为精准治疗提供可靠的保障^[8,13~17]。Grumaz 等^[17]在2016年报道了首例基于游离循环DNA(circulating free DNA, cfDNA)的研究,即使用来自脓毒症患者和未感染对照组的血浆样本对脓毒症病原体进行定量测序诊断。该研究建立了脓毒症指示性量化指标(sepsis indicating quantifier, SIQ)评分,该指标为病原体的丰度和在脓毒症中致病作用大小的乘积。

SIQ 评分作为评估病原体致病性的定量评分,可以在测序结果中将病原菌的信号读数从污染物或微生物种中区分出来。该研究尝试将 cfDNA 的定量结果作为脓毒症的诊断和预后标志。由于 cfDNA 的半衰期很短,获得的 SIQ 评分在感染过程中呈动态变化,因此,微生物来源的 SIQ 评分可以反映感染的动态变化,用于监测患者的病情发展和评价对治疗的反应。该团队在另一项研究中基于二代测序技术,使用 SIQ 评分来定量诊断侵袭性真菌感染^[18]。该研究表明应用二代测序技术可以:(1)验证经血培养诊断出的念珠菌血症。(2)检测出早期血培养阴性的侵袭性真菌感染。(3)纠正被误诊为真菌定植,实则为侵袭性真菌感染的诊断。

Grumaz 等^[19]在一项包括50例脓毒症患者和20例未感染的择期手术患者作为对照组的研究中发现,28天的研究期间内二代测序诊断病原体的阳性率比血培养高6倍以上,这表明基于二代测序技术的分子检测技术为鉴定临床相关病原体提供了一个有价值的诊断平台,患者有可能从测序诊断中获得更合适的治疗。

Long 等^[20]在北京协和医院重症监护室(ICU)开展的单中心研究中包括来自78例ICU患者和10例健康志愿者的血浆样本。78份疑似菌血症患者的血浆标本通过二代测序和血培养进行分析,10份健康志愿者的血浆标本作为阴性对照进行二代测序分析,以校准和设定检测阈值。研究显示,就细菌和真菌而言,7个样本血培养和测序均呈阳性,3个样本血培养阳性而测序阴性,8个样本血培养阴性而测序阳性。以培养为标准,二代测序的敏感度和特异性分别为

72.7%和89.6%。另外,在14个样本中应用测序发现了病毒感染,这说明二代测序技术可以同时诊断病毒和细菌病原体。然而,在培养中只有细菌或真菌可被检测到。这一测序优势能通过一次性测试更全面了解患者的感染范围。当把血培养和测序结合起来时,诊断为阳性的样本数量从12.82%增加到23.08%,这为建立治疗方案提供了更准确的信息。

2. 鉴别污染菌(“排除”检测):在疾病评估中确认感染源和排除感染源同样重要。二代测序能够同时检测样本中存在的DNA和RNA病毒、细菌、真菌和寄生虫,因此其在排除感染方面似乎比常规的检测方法更有说服力。Gosiewski 等^[21]使用二代测序技术对健康受试者和脓毒症患者的血液样本进行检测,以确定健康人群和脓毒症患者血液中的细菌分类情况。研究表明,在健康受试者中,观察到血液中厌氧菌的数量明显占优势(76.2%),其中以双歧杆菌目细菌(73.0%)居多。在脓毒症患者中,检测到的大多数属于需氧或微需氧细菌(75.1%)。放线菌门的丰度在脓毒症中下降最为显著($P=0.000$),变形菌门在健康受试者中下降($P=0.000$)。

Grumaz 等^[17]研究发现,像痤疮丙酸杆菌这样常见的皮肤共生菌的标准化读数在所有样品之间都存在显著差异,尤其是在未受感染的对照组中检测到更高的丰度。利用这类数据,可为在脓毒症中鉴别致病菌提供依据。许多研究表明,二代测序技术的诊断性能,包括阳性预测值和阴性预测值,均强于临床上常用的检测方法^[22]。在一项前瞻性研究中,Salzberg 等^[23]从活检中保留了10例疑似中枢神经系统感染患者的脑组织,使用二代测序技术检测脑组织中的潜在病原体。在5例患者中获得了阴性或非特异性测序结果,以此推断为无活动性感染。该结论在后期的病理检查和有效的类固醇治疗中得到验证。可靠的阴性测序结果有助于支持无病原体感染的判断,这能够帮助医生减少对活动性感染的担忧。随着二代测序技术工作流程的改善和诊断准确性的提高,该技术将在排除感染方面发挥更大的作用。

3. 病原体耐药基因识别:及时、有效地应用抗菌药物对治疗脓毒症至关重要。常规的药敏试验通常在已经分离好的病原体上进行,这些方法非常耗时,并进一步忽略了难以培养及不可培养的细菌^[24]。二代测序能够对病原体的整个基因组进行测序,因此在识别细菌抗生素耐药性基因上具有巨大的潜力^[25]。二代测序技术是一种非靶向方法,理论上可以检测包

括抗生素耐药基因在内的所有基因。Grumaz 等^[17]分析了 1 例在肝移植后出现脓毒症症状的 59 岁女性的血浆样本,对其血浆 cfDNA 进行测序,检测出纳入了 CARD 数据库中的抗性基因,包括 *vanB*、*vanS_B*、*tet1* 和 *sat4*,且其检测结果与微生物学测试相符,显示病原体为抗万古霉素肠球菌,对万古霉素和四环素具有耐药性。因此,若有足量的序列覆盖,使用二代测序技术检测抗生素耐药性基因似乎是可行的。但是,目前研究中细菌和真菌测序的覆盖率仍然较低,往往只能满足物种鉴定的需要,不能有效地全面覆盖抗生素耐药基因的检测。因此,在测序获得病原体诊断结果后,临床医生仍需根据经验选择抗生素。这一缺点可能与血液中病原体的核酸含量远低于宿主的核酸含量,且 cfDNA 的半衰期较短有关^[26]。目前,二代测序技术在脓毒症诊断中的应用仍集中在病原体鉴定上,在抗生素耐药性的检测上缺少系统性的研究,未来有望在此方面开展深入研究。

三、展 望

脓毒症的诊断是一个挑战。运用二代测序技术检测病原体的潜力已经在许多研究和临床中得到证实,而且其在诊断脓毒症方面也显示出巨大的影响力。二代测序技术在包括脓毒症在内的感染性疾病诊断中也存在着许多亟待解决的问题。例如,标本中存在的微生物污染、运输及操作过程造成的污染及实验室环境的污染,都可能导致测序结果的准确度下降,增加检测结果分析的困难。因此,检测人员在操作过程需要遵守无菌原则,并且要建立完善的质量控制体系。由于测序技术的非特异性,检测出的微生物同时包括定植菌、污染菌和致病菌,增加了结果判读的复杂性和难度。

综上所述,cfDNA 定量分析在一定程度上有助于致病菌的判读。未来有望通过建立统一的数据库平台或者统计模型对测序结果进行排序和优化,排除正常微生物群和环境污染物的干扰,加之临床医生对患者自身情况和临床表现的综合分析来确定致病菌。同时,多数二代测序平台完成从采样到最终结果的分析需要 24 ~ 72h(平均为 48h)。而在检测病毒感染的技术中,特异性聚合酶链式反应(PCR)可在 12h 内完成病毒的鉴定,二代测序技术尚不能达到这个速度。二代测序检测感染性疾病病原体的费用高于任何一种常规检测手段,是其广泛应用于临床的一大阻碍。但测序技术在样本处理、工作流程建立、检测时间和费用设定等方面存在的不完善之处都是暂时的,

会被迅速发展的技术所克服。随着临床实践经验和评估的增多,二代测序技术在诊断脓毒症方面的临床应用价值将进一步提高。

参考文献

- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, *et al*. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis - 3)[J]. JAMA, 2016, 315(8): 801 - 810
- Alberto L, Marshall AP, Walker R, *et al*. Screening for sepsis in general hospitalized patients: a systematic review[J]. J Hosp Infect, 2017, 96(4): 305 - 315
- Ferrer R, Martin - Loeches I, Phillips G, *et al*. Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: results from a guideline - based performance improvement program[J]. Crit Care Med, 2014, 42(8): 1749 - 1755
- Dubourg G, Raoult D. Emerging methodologies for pathogen identification in positive blood culture testing[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2016, 16(1): 97 - 111
- Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, *et al*. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012[J]. Crit Care Med, 2013, 41(2): 580 - 637
- Vincent JL, Brealey D, Libert N, *et al*. Rapid diagnosis of infection in the critically ill, a multicenter study of molecular detection in bloodstream infections, pneumonia, and sterile sit infections[J]. Crit Care Med, 2015, 43(11): 2283 - 2291
- 高志杰,姜茜,陈倩,等. 第 2 代测序技术在甲基丙二酸尿症以及苯丙酮尿症诊断中的应用[J]. 医学研究杂志, 2015, 44(3): 111 - 114, 168
- 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
- Schlaberg R, Chiu CY, Miller S, *et al*. Validation of metagenomic next - generation sequencing tests for universal pathogen detection[J]. Arch Pathol Lab Med, 2017, 141(6): 776 - 786
- Schmidt B, Hildebrandt A. Next - generation sequencing: big data meets high performance computing[J]. Drug Discov Today, 2017, 22(4): 712 - 717
- Zhou K, Lokate M, Deurenberg RH, *et al*. Use of whole - genome sequencing to trace, control and characterize the regional expansion of extended - spectrum β - lactamase producing ST15 *Klebsiella pneumoniae*[J]. Sci Rep, 2016, 6: 20840
- Simner JP, Miller S, Carroll KC. Understanding the promises and hurdles of metagenomic next - generation sequencing as a diagnostic tool for infectious diseases[J]. Clin Infect Dis, 2018, 66(5): 778 - 788
- Sato M, Kuroda M, Kasai M, *et al*. Acute encephalopathy in an immunocompromised boy with astrovirus - MLB1 infection detected by next generation sequencing[J]. J Clin Virol, 2016, 78: 66 - 70
- 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(S2): S231 - S240

(转第 140 页)

基于上述理论及研究结果,SPG20 甲基化及 EGFR 与肺腺癌发生、发展、侵袭、转移及预后密切相关,但其具体作用机制尚不明确。今后研究中将以 SPG20 甲基化为切入点,结合 EGFR 研究为重点,对其促癌机制进行深入研究。对 DNA 异常甲基化的研究可以更加深入地了解恶性肿瘤的发病机制,为今后早期诊治、预后判断等提供更为可靠的依据。

参考文献

- 1 于正伦, 张曙光, 许顺. 148 例肺腺癌患者的预后影响因素分析[J]. 中国医科大学学报, 2019, 48(11): 1045 - 1048
- 2 Franceschini JP, Jamnik S, Santoro IL. Survival in a cohort of patients with lung cancer: the role of age and gender in prognosis[J]. J Bras Pneumol, 2017, 43(6): 431 - 436
- 3 周航, 武峰. 肺癌 CT 能谱成像: 定量分析及与 TTF-1 和 EGFR 表达水平的相关性[J]. 放射学实践, 2017, 32(8): 839 - 842
- 4 McGranahan T, Nagpal S. A neuro - oncologist, sperspective on management of brain metastases in patients with EGFR mutant non - small cell lung cancer[J]. Curr Treat Options Oncol, 2017, 18(4): 22 - 22
- 5 He Lifeng, Fan Xiaoxiao, Li Yirun, *et al.* Aberrant methylation status of SPG20 promoter in hepatocellular carcinoma: a potential tumor metastasis biomarker[J]. Cancer Genet, 2019, 233 - 234: 48 - 55
- 6 Zhangjian Zhou, Wei Wang, Xin Xie, *et al.* Methylation - induced silencing of SPG20 facilitates gastric cancer cell proliferation by activating the EGFR/MAPK pathway[J]. Biochemi Biophys Research Commun, 2018, 500(2): 411 - 417
- 7 刘威, 胡轶. 肺癌的诊断[J]. 临床内科杂志, 2020, 37(2): 73 - 77
- 8 Chen WQ, Sun KX, Zheng RS, *et al.* Report of cancer incidence and mortality in different areas of China, 2014[J]. China Cancer, 2018, 27(1): 1 - 14
- 9 马阳, 王蕊, 纪晓坤, 等. EGFR 突变对肺腺癌细胞自噬活性及 LC3、Beclin1 基因表达的影响[J]. 河北医科大学学报, 2019,

- 40(9): 1072 - 1075
- 10 梁宇, 侯和磊, 姜曼, 等. 中国年轻肺腺癌患者基因特点研究[J]. 中国肺癌杂志, 2020, 23(4): 239 - 246
- 11 赵森, 唐俊明. 基于数据挖掘分析肺腺癌中 ARHGEF16 的表达及其临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2020, 36(6): 695 - 697
- 12 Iida T, Iwanami A, Sanosaka T, *et al.* Whole - genome DNA methylation analyses revealed epigenetic instability in tumorigenic human ipscell - derived neural stem/progenitor cells[J]. Stem Cells, 2017, 35(5): 1316 - 1327
- 13 Nikolova E, Stanfield RL, Dyson HJ, *et al.* CHO hydrogen bonds mediate highly specific recognition of methylated CpG sites by the Zinc finger protein Kaiso[J]. Biochemistry, 2018, 57(14): 2109 - 2120
- 14 Kim SH, Park KH, Shin SJ, *et al.* CpG island methylator phenotype and methylation of Wnt pathway genes together predict survival in patients with colorectal cancer[J]. Yonsei Med J, 2018, 59(5): 588 - 594
- 15 常江, 王颖, 柳利, 等. IGF2BP3 低甲基化与结肠癌组织分化的关系[J]. 天津医药, 2015, 43(6): 642 - 645
- 16 魏绍峰, 张爱华. DNA 低甲基化及其与肿瘤关系的研究进展[J]. 癌变·畸变·突变, 2016, 28(3): 243 - 245, 249
- 17 Timp W, Bravo HC, McDonald OG, *et al.* Large hypomethylated blocks as a universal defining epigenetic alteration in human solid tumors[J]. Genome Med, 2014, 6(8): 61
- 18 Furey TS, Goh L, Murphy SK, *et al.* Genomic sweeping for hypermethylated genes[J]. Bioinformatics, 2007, 23(3): 281 - 288
- 19 丰锦春, 李宇翔, 李丹, 等. 乳腺癌组织 GFR α 1 基因甲基化状态与患者淋巴结转移的关系[J]. 山东医药, 2020, 60(23): 67 - 69
- 20 李猷, 柳东辉, 张国勇. 前列腺癌不良预后相关差异甲基化基因筛选[J]. 中国医药生物技术, 2020, 15(4): 411 - 417
- 21 刘彦明, 曹越, 何珊, 等. LZTS2 启动子 DNA 区域异常高甲基化与乙肝源性肝细胞癌的关系研究[J]. 重庆医学, 2020, 49(11): 1804 - 1808

(收稿日期: 2021 - 06 - 16)

(修回日期: 2021 - 07 - 11)

(接第 151 页)

- 15 Liu J, Almeida M, Kabir F, *et al.* Direct detection of shigella in stool specimens by use of a metagenomic approach[J]. J Clin Microbiol, 2018, 56(2): e01374
- 16 Mai NTH, Phu NH, Nhu LNT, *et al.* Central nervous system infection diagnosis by next - generation sequencing: a glimpse into the future? [J]. Open Forum Infect Dis, 2017, 4(2): ofx046
- 17 Grumaz S, Stevens P, Grumaz C, *et al.* Next - generation sequencing diagnostics of bacteremia in septic patients[J]. Genome Med, 2016, 8(1): 73
- 18 Decker SO, Sigl A, Grumaz C, *et al.* Immune - response patterns and next generation sequencing diagnostics for the detection of mycoses in patients with septic shock - results of a combined clinical and experimental investigation[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(8): 1796
- 19 Grumaz S, Grumaz C, Vainshtein Y, *et al.* Enhanced performance of next - generation sequencing diagnostics compared with standard of care microbiological diagnostics in patients suffering from septic shock[J]. Crit Care Med, 2019, 47(5): e394 - e402
- 20 Long Y, Zhang Y, Gong Y, *et al.* Diagnosis of sepsis with cell - free DNA by next - generation sequencing technology in ICU patients[J]. Arch Med Res, 2016, 47(5): 365 - 371
- 21 Gosiewski T, Ludwig - Galezowska AH, Huminska K, *et al.* Compre-

- hensive detection and identification of bacterial DNA in the blood of patients with sepsis and healthy volunteers using next - generation sequencing method - the observation of DNAemia[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2017, 36(2): 329 - 336
- 22 Somasekar S, Lee D, Rule J, *et al.* Viral surveillance in serum samples from patients with acute liver failure by metagenomic next - generation sequencing[J]. Clin Infect Dis, 2017, 65(9): 1477 - 1485
- 23 Salzberg SL, Breitwieser FP, Kumar A, *et al.* Next - generation sequencing in neuropathologic diagnosis of infections of the nervous system[J]. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm, 2016, 3(4): e251
- 24 Forbes JD, Knox NC, Ronholm J, *et al.* Metagenomics: the next culture - independent game changer[J]. Front Microbiol, 2017, 8: 1069
- 25 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
- 26 Dwivedi DJ, Tolt LJ, Swystun LL, *et al.* Prognostic utility and characterization of cell - free DNA in patients with severe sepsis[J]. Crit Care, 2012, 16(4): R151

(收稿日期: 2021 - 07 - 29)

(修回日期: 2021 - 08 - 16)