

· 论著 ·

建立一种宏基因组二代测序 DNA 流程检测 BALF 标本的性能确认方法

宋慧娟 鲁艳军 田磊 陈中举 汪玥 刘为勇 毛莉妍 孙自镛 彭静

华中科技大学同济医学院附属同济医院检验科, 武汉 430000

通信作者: 彭静, Email: ppjj6@126.com

【摘要】 目的 建立一种宏基因组二代测序(mNGS) DNA 流程检测 BALF 标本的性能确认方法。方法 以 HeLa 细胞代表宿主细胞, 向无菌生理盐水中加入不同浓度 HeLa 细胞、7 种病原体(肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、肺炎克雷伯菌、白色念珠菌、新型隐球菌、烟曲霉和腺病毒)和干扰物质制备模拟 BALF 标本, 同时收集临床 BALF 标本, 以传统检测方法为参比方法, 评价 mNGS 检测结果, 确定 mNGS 的最低检出限、精密度、抗干扰能力、稳定性和准确度。结果 模拟标本中, 肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、肺炎克雷伯菌、白色念珠菌、新型隐球菌、烟曲霉和腺病毒 7 种病原体的最低检出限分别为 150、262、102、67、96、83 CFU/ml 和 439 拷贝/ml。模拟阳性标本中所有病原体重复检测结果符合率均为 100%。抗干扰试验结果显示, 人源核酸浓度越高, mNGS 检出病原体序列数越少。以大肠埃希菌和宋内志贺菌评价 mNGS 对近源物种分辨能力, 结果显示, 当宋内志贺菌浓度为 4 000 CFU/ml 时, 该系统能稳定分辨大肠埃希菌和宋内志贺菌。稳定性试验结果显示, 标本进行 1、2、3 次冻融或在 4 °C、-20 °C、-80 °C 放置 36 h 后病原体序列数无明显变化。与传统检测方法相比, 17 份临床标本的初步准确度为 82.4%(14/17)。2021 年 10 月 25 日至 2022 年 9 月 14 日同济医院同时进行 mNGS 和传统方法检测的临床 BALF 标本的持续评估结果显示, mNGS 相对细菌培养、真菌培养、分枝杆菌培养、结核分枝杆菌培养和常规 PCR 技术的准确度分别为 67.5%(472/699)、81.5%(570/699)、92.3%(335/363)、96.4%(350/363) 和 86.8%(132/152)。与常规 PCR 技术比较, mNGS 检测耶氏肺孢子菌、腺病毒、肺炎支原体的准确度分别为 89.4%(84/94)、93.3%(56/60) 和 87.1%(61/70)。结论 通过制备模拟 BALF 标本以及以传统检测方法为参比方法, 可以初步评价 mNGS 检测 BALF 标本的性能特征。

【关键词】 支气管肺泡灌洗液; 宏基因组二代测序; 性能确认; 准确度; 结核分枝杆菌

基金项目: 国家科技基础资源调查专项(2019FY01206)

Establishment of a performance validation method for mNGS DNA workflow to detect BALF specimens

Song Huijuan, Lu Yanjun, Tian Lei, Chen Zhongju, Wang Yue, Liu Weiyong, Mao Liyan, Sun Ziyong, Peng Jing

Department of Laboratory Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430000, China

Corresponding author: Peng Jing, Email: ppjj6@126.com

【Abstract】 **Objective** To establish a performance validation method for mNGS applied in BALF samples. **Method** HeLa cells were used as a representative of host cells, and simulated BALF samples were prepared by adding different concentrations of HeLa cells, seven species of isolated pathogens (including *Streptococcus pneumoniae*, *Hemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida*

DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20230828-00095

收稿日期 2023-08-28 本文编辑 唐栋

引用本文: 宋慧娟, 鲁艳军, 田磊, 等. 建立一种宏基因组二代测序 DNA 流程检测 BALF 标本的性能确认方法[J]. 中华检验医学杂志, 2023, 46(10): 1067-1073. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20230828-00095.



albicans, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, and *Adenovirus*), and interfering substances to sterile normal saline. Clinical BALF samples were collected simultaneously, and the results of mNGS were evaluated using traditional detection methods as a reference. The limit of detection (LOD), precision, anti-interference ability, stability, and accuracy of mNGS were determined. **Results** In the simulated samples, the LOD of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, and *Adenovirus* were 150, 262, 102, 67, 96, 83 CFU/ml, and 439 copies/ml, respectively. The repeatability of the detection results for all pathogens of simulated positive BALF samples was 100%. The anti-interference test showed that the higher the concentration of human DNA, the fewer pathogen sequences detected by mNGS. *Escherichia coli* and *Shigella sonnei* were used to evaluate the ability of mNGS to distinguish closely related species. The results showed that the system could stably distinguish *Escherichia coli* and *Shigella sonnei* when the concentration of *Shigella sonnei* was 4,000 CFU/ml. The stability test results showed that there was no significant change in the number of pathogen sequences detected whether after 1 to 3 freeze-thaw cycles or storage at 4 °C, -20 °C, or -80 °C for 36 h. Compared with traditional detection methods, the accuracy of 17 clinical samples was 82.4%(14/17). Continuous evaluation of clinical BALF samples simultaneously tested by mNGS and traditional methods at Tongji Hospital from October 25, 2021, to September 14, 2022, showed that the accuracy of mNGS compared to bacterial culture, fungal culture, mycobacterial culture, *Mycobacterium tuberculosis* culture, and conventional PCR techniques was 67.5%(472/699), 81.5%(570/699), 92.3%(335/363), 96.4%(350/363), and 86.8%(132/152), respectively. Compared with conventional PCR techniques, the accuracy of mNGS for detecting *Pneumocystis jirovecii*, *Adenovirus*, and *Mycoplasma pneumoniae* was 89.4%(84/94), 93.3%(56/60), and 87.1%(61/70), respectively. **Conclusion** By preparing simulated BALF samples and using traditional detection methods as a reference, the performance characteristics of mNGS in detecting BALF samples can be preliminarily evaluated.

【Key words】 Bronchoalveolar lavage fluid; Metagenomic next-generation sequencing; Performance validation; Accuracy; *Mycobacterium tuberculosis*

Fund program: National Science and Technology Basic Resources Survey Special of China (2019FY01206)

呼吸道感染因其发病率和病死率高,成为全球主要的健康问题,下呼吸道感染尤为严重。下呼吸道感染病原谱广,及时获得病原学诊断,对于针对性治疗和预防具有至关重要的作用。宏基因组二代测序(metagenomic next-generation sequencing, mNGS, 又称高通量测序或下一代测序技术)因其无靶向检测病原体特点,在疑难感染病例诊断、少见病原体和新发病原体感染防治中发挥了重要作用,受到普遍关注^[1-4]。然而, mNGS 如此广泛的病原谱,加之操作的复杂性,使其性能确认难以实施,文献报道有限^[5]。

支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)是下呼吸道感染疑难病例、少见和新发感染病例病原学诊断的重要标本,相较于血液、脑脊液等无菌标本, BALF 病原学更为复杂,本研究借鉴近年国外一些实验室完成的脑脊液及其他体液标本的 mNGS 性能评估方案^[6-8],参考相关专家共识^[1,9-11],结合 mNGS 无靶向检测病原体特点,基于 mNGS DNA 流程检测 BALF 标本,建立初步性能评估和持续性能评估相结合的方法,探索逐步完善

mNGS 技术性能确认的方案。

材料与方法

一、材料

(一)模拟阴性 BALF 标本

以 HeLa 细胞(人宫颈癌细胞)代表宿主细胞,将购自武汉普诺赛生命科技有限公司的高浓度 HeLa 细胞 1 600×g 离心 5 min, 倍比稀释后采用血球计数板计数。以含有 2×10⁵ 个/ml HeLa 细胞的无菌生理盐水模拟阴性 BALF 标本。

(二)模拟阳性 BALF 标本

1. 复苏菌株:将保存的肺炎克雷伯菌、白色念珠菌和新型隐球菌纯菌株接种于血平板,将肺炎链球菌、流感嗜血杆菌接种于巧克力平板,将烟曲霉接种于沙保罗斜面培养基,置于 37 °C 恒温箱中培养过夜(巧克力平板培养需维持 5% CO₂ 环境)。

2. 配制菌悬液:复苏后的细菌和真菌经质谱鉴定正确后,用灭菌木棒挑取血平板和巧克力平板上的单个菌落,溶于无菌生理盐水,充分混匀,配制麦

氏比浊度为 0.5 的菌悬液;向沙保罗斜面培养基中加入适量无菌生理盐水,轻柔颠倒混匀,将液体转移至比浊管,调整无菌生理盐水体积以配制 0.5 麦氏比浊度的烟曲霉菌悬液。

3. 制备阳性 BALF 标本:采用平板菌落计数法对倍比稀释后的菌悬液进行定量。病毒拷贝数则通过实时荧光定量聚合酶链式反应计算。根据研究设计的终浓度于模拟阴性 BALF 标本中加标不同病原体以模拟阳性 BALF 标本。以上模拟标本一次性配制, -20 °C 保存。

(三) 临床 BALF 标本

将 17 份于华中科技大学同济医学院附属同济医院进行传统方法检测的临床 BALF 标本(14 份阳性, 3 份阴性)用于 mNGS 的初步准确度确认。将 2021 年 10 月 25 日至 2022 年 9 月 14 日于该院同时进行 mNGS 和传统方法检测 BALF 标本的病例纳入本研究用于持续准确度评估。

二、仪器和试剂

1. 仪器: REF 21250 DensiCHEK 电子比浊仪 VITEK (法国梅里埃公司)、Bioprep-24 生物样品均质仪(北京天根公司)、Qsep1 生物片段分析仪(台湾光鼎公司)、Qubit 4.0 核酸荧光定量仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、NextSeq CN500 高通量测序仪(美国 illumina 公司)、全自动微生物质谱检测系统 Autof ms1000(郑州安图生物公司)。

2. 试剂: DNA 提取试剂盒(粤穗械备 20191662 号, 广州微远医疗器械有限公司)、基因组 DNA 片段化试剂盒(粤穗械备 20202085 号, 广州微远医疗器械有限公司)、Qubit dsDNA HS Assay kit 试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、NextSeq CN500 高通量测序试剂盒(美国 illumina 公司)。

三、检测方法

1. 传统检测方法:微生物分离培养[包括细菌、真菌和分枝杆菌。除非结核分枝杆菌(non-tuberculous mycobacteria, NTM)通过 16S rDNA 测序外,其他病原体采用质谱鉴定]、PCR 技术[如常规 PCR 技术检测 BALF 标本中耶氏肺孢子菌、咽拭子中腺病毒和肺炎支原体,以及 GeneXpert MTB/RIF 技术检测结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)/利福平耐药]。

2. mNGS:对 600 μ l BALF 标本进行破壁处理,取 300 μ l 破壁后标本进行核酸提取、建库和加标签。对纯化、扩增、再纯化后的文库进行片段大小

和浓度测定,将合格文库加载至测序仪上进行 75 个循环单端测序,每个文库生成约 2 000 万序列。测序数据下机后通过 Trimmomatic 软件去除低质量、长度小于 40 bp 的序列和接头序列以获得高质量的数据。mNGS 检测系统从美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中的 RefSeq(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>)和 nt/nr(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>)数据库中筛选人类相关序列,选用人类参考基因组 hg38 和中国人人群的两个参考基因组 YH2.0 和 HX1 作为宿主参考基因组构建人源数据库(IDhost V2.0),从病理系统资源整合中心(PATHosystems Resource Integration Center, PATRIC, <https://www.patricbrc.org/>)、全球共享禽流感数据倡议组织数据库(Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data, GISAID, <https://www.gisaid.org/>)、GenBank 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)、NCBI 的 RefSeq 和 nt/nr 数据库中筛选微生物参考基因组,构建微生物数据库(IDseqDB V2.0:包含 12 142 种细菌、2 680 种真菌、206 种分枝杆菌、10 061 种病毒、654 种寄生虫和 120 种支原体/衣原体)。通过 Burrows-Wheeler Aligner 软件(BWA: <http://bio-bwa.sourceforge.net/>)将比对上 IDhost V2.0 的序列去除,剩余的微生物序列与 IDseqDB V2.0 比对,并将比对后的数据按照病毒、细菌、真菌和寄生虫等进行分类和排列,获得种特异性序列、鉴定置信度、相对丰度等信息。

四、性能确认参数

(一) 检出限

选择 7 种病原体(肺炎链球菌代表革兰阳性细菌、流感嗜血杆菌和肺炎克雷伯菌代表革兰阴性细菌、白色念珠菌和新型隐球菌代表酵母菌、烟曲霉代表霉菌、腺病毒代表 DNA 病毒)建立不同物种的检出限。根据文献和预试验结果预估各病原体检出限,并在此浓度附近配制 4 个浓度梯度工作液(在模拟阴性 BALF 标本中加标不同浓度的代表性病原体制备模拟阳性标本),每个浓度至少重复检测 10 次。利用 SPSS 22.0 (美国 IBM 公司)软件进行 probit 统计学分析,病原体 95% 检测阳性率时的最低浓度即为检出限。

(二) 精密度

在模拟阴性 BALF 标本中加入 3 倍检出限(模拟弱阳性标本)的肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、肺炎

克雷伯菌、白色念珠菌、新型隐球菌和烟曲霉,加入 1 倍检出限(模拟临界阳性标本)的腺病毒得到模拟阳性 BALF 标本。每天重复 10 次检测该标本,连续检测 2 d。

(三)抗干扰能力

1. 人源核酸干扰:根据精密度试验方案加入 7 种病原体,将模拟 BALF 标本中人源核酸浓度调整为 2×10^5 、 2×10^6 、 2×10^7 个/ml HeLa 细胞,比较不同浓度人源核酸对检测结果的影响。

2. 近源物种干扰:将大肠埃希菌和宋内志贺菌按照 3 种不同比例混合后加入模拟的阴性 BALF 标本中(大肠埃希菌和宋内志贺菌的浓度分别为 1 000 : 1 000 菌落形成单位(colony forming units, CFU)/ml、4 000 : 1 000 CFU/ml 和 1 000 : 4 000 CFU/ml),以验证 mNGS 检测系统分辨近源物种的能力。

(四)稳定性

分别对精密度试验中制备的模拟阳性 BALF 标本进行 1、2、3 次冻融,评估冻融次数对检测结果的影响。将模拟的阳性 BALF 标本分别放置在 4°C 、 -20°C 、 -80°C 36 h,评估保存温度对检测结果的影响。

(五)准确度

将同时接受 BALF mNGS 和传统方法检测,且检测时间相距 5 d 以内的病例纳入 mNGS 准确度评估,以传统检测方法作为参考方法来评估 mNGS 准确度。同一病例中,mNGS 未检测到传统方法所检出的任一病原体则被定义为 mNGS 假阴性,传统方法检测阴性,而 mNGS 检测阳性则被定义为 mNGS 假阳性。

结 果

一、检出限

通过 probit 分析,确定了模拟标本中 7 种病原体的检出限,结果见表 1。其中,细菌类病原体的检出限(平均 171 CFU/ml)高于真菌类病原体的检出限(平均 82 CFU/ml)。

二、精密度

模拟阳性 BALF 标本中各病原体重复检测结果符合率均为 100%,见表 1。

三、抗干扰能力

本研究结果显示随着模拟标本中人源核酸水平的升高,mNGS 检出病原体的序列数降低,当人

表 1 mNGS 检测模拟 BALF 标本中 7 种病原体的检出限和精密度

病原体	检出限	精密度(重复检测结果符合率%)
肺炎链球菌	150(CFU/ml)	100
流感嗜血杆菌	262(CFU/ml)	100
肺炎克雷伯菌	102(CFU/ml)	100
白色念珠菌	67(CFU/ml)	100
新型隐球菌	96(CFU/ml)	100
烟曲霉	83(CFU/ml)	100
腺病毒	439(拷贝/ml)	100

注:mNGS 为宏基因组二代测序,BALF 为支气管肺泡灌洗液,CFU 为菌落形成单位

源核酸水平达到 2×10^7 个/ml HeLa 细胞时,7 种病原体均未检出(图 1)。近源物种大肠埃希菌和宋内志贺菌的浓度为 1 000 : 4 000 CFU/ml 时,检出序列数分别为 19 和 18 条;2 种细菌浓度分别为 1 000 : 1 000 或 4 000 : 1 000 CFU/ml 时,均仅检出大肠埃希菌,序列数分别为 37 和 84 条。

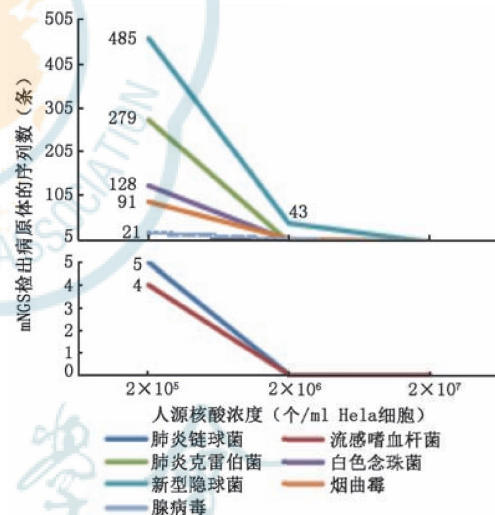


图 1 包含不同浓度人源核酸的模拟标本的宏基因组二代测序检测结果

四、稳定性

标本冻融次数和保存温度对 mNGS 检测系统的影响见图 2。模拟的阳性 BALF 标本进行 1、2、3 次冻融或在 4°C 、 -20°C 、 -80°C 放置 36 h 后检测到的病原体序列数无明显变化。

五、准确度

用于初步准确度评估的 17 份临床 BALF 标本(热带念珠菌和肺炎克雷伯菌阳性标本各 3 份,近平滑念珠菌、鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌阳性标本各 2 份,结核分枝杆菌、白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、流感嗜血杆菌、黏质沙雷菌、洋葱伯克霍尔德

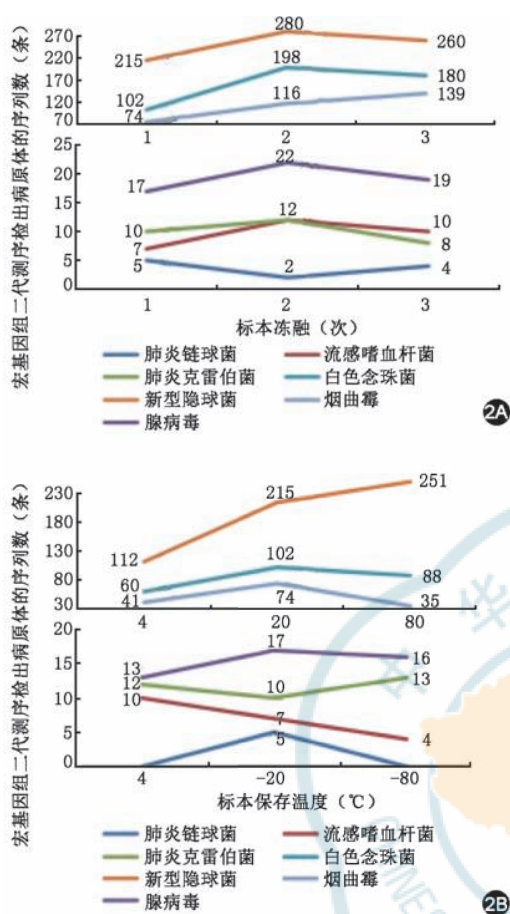


图2 稳定性评估结果(2A为不同冻融次数时模拟标本的宏基因组二代测序检测结果;2B为不同温度保存条件下模拟标本的宏基因组二代测序检测结果)

菌、光滑假丝酵母菌、烟曲霉和长孢洛德酵母菌阳性标本各1份)中,2份临床阳性标本(分别培养出近平滑念珠菌和光滑假丝酵母菌)经mNGS检测为阴性,1份培养阴性的临床标本经mNGS检出流感嗜血杆菌,mNGS检测系统的敏感度和特异度分别为85.7%(12/14)和66.7%(2/3),准确度为82.4%(14/17)。

临床BALF标本持续评估阶段,mNGS相对传统检测方法的准确度评估结果见表2。共纳入699份细菌培养病例,mNGS对细菌检测的敏感度、特异度和准确度分别为84.3%(118/140)、63.3%(354/559)、67.5%(472/699)。mNGS检测假阳性的205份标本中,肺炎链球菌、流感嗜血杆菌和肺炎克雷伯菌的检出率分别为16.6%(34/205)、22.0%(45/205)和13.2%(27/205)。mNGS诊断真菌感染(699份)的敏感度、特异度和准确度分别为81.6%(133/163)、81.5%(437/536)和81.5%(570/699)。99份假阳性标本中,白色念珠菌和烟曲霉的占比分别为39.4%(39/99)和20.2%(20/99)。在30份

mNGS假阴性真菌标本中,近平滑念珠菌最常见,占有近平滑念珠菌培养阳性标本的91.7%(11/12)。

以分枝杆菌培养作为参比方法,在363份BALF标本中,mNGS检测分枝杆菌的敏感度、特异度和准确度分别为76.9%(20/26)、93.5%(315/337)、92.3%(335/363)。其中,mNGS检测NTM真阳性、假阳性、假阴性、真阴性标本分别为2、13、2和346份,敏感度、特异度和准确度分别为50.0%(2/4)、96.4%(346/359)和95.9%(348/363)。mNGS检测MTB真阳性、假阳性、假阴性、真阴性标本分别为18、9、4和332份,敏感度、特异度和准确度分别为81.8%(18/22)、97.4%(332/341)和96.4%(350/363)。mNGS检测MTB假阴性的4份标本均接受了培养和GeneXpert MTB/RIF检测,其中两种方法均检出MTB的标本有2份,仅通过培养检出MTB的标本有2份。同样,以分枝杆菌培养作为参比方法,在318份BALF标本中,GeneXpert MTB/RIF检测MTB真阳性、假阳性、假阴性、真阴性标本分别为17、4、5和292份,敏感度、特异度和准确度分别为77.3%(17/22)、98.6%(292/296)和97.2%(309/318)。

mNGS相对常规PCR技术(152份标本检测病原体包括耶氏肺孢子菌、腺病毒和肺炎支原体)的敏感度、特异度和准确度分别为74.4%(29/39)、91.2%(103/113)、86.8%(132/152)。mNGS检测耶氏肺孢子菌(94份)的敏感度、特异度和准确度分别为8/14、95.0%(76/80)和89.4%(84/94)。mNGS检测腺病毒(60份)的敏感度、特异度和准确度分别为3/5、96.4%(53/55)、93.3%(56/60)。70份进行肺炎支原体检测的临床BALF标本中,mNGS的敏感度、特异度和准确度分别为86.4%(19/22)、87.5%(42/48)和87.1%(61/70)。

此外,我们对传统方法难以检测的病原体的

表2 宏基因组二代测序相对传统检测方法的准确度评估结果

宏基因组二代测序相对传统检测方法	真阳性(份)	假阳性(份)	假阴性(份)	真阴性(份)
细菌培养	118	205	22	354
真菌培养	133	99	30	437
分枝杆菌培养	20	22	6	315
结核分枝杆菌培养	18	9	4	332
常规PCR技术	29	10	10	103

mNGS 检出情况进行了统计,结果显示在 762 份 BALF 标本中,mNGS 额外检出 25 份惠普尔养障体、15 份新型隐球菌、8 份鹦鹉热衣原体、2 份口腔毛滴虫、2 份刺变形虫副衣原体、1 份圣乔治诺卡菌和 1 份沙眼衣原体。

讨 论

近年来,mNGS 在临床研究,特别是在少见、疑难感染病例中应用的报道逐渐增多,显示出良好的应用前景。然而,该技术的无靶向检测特征,使其性能确认面临极大挑战。本实验室基于 mNGS DNA 流程检测 BALF 标本,通过制备模拟标本辅以临床标本,建立初步性能评估和持续性能评估相结合的方法,探索 mNGS 的性能确认方案。

本研究制备的模拟 BALF 标本中各病原体的 mNGS 检出限存在差异,总体而言,细菌检出限高于真菌,该结果与 Miller 等^[6-7]的研究结果基本一致,可能与不同类型病原体基因组大小存在差异等因素有关。

mNGS 检测的干扰因素除人类宿主核酸外,还应考虑邻近物种间的交叉反应^[12]。鉴于埃希菌属与志贺菌属具有较高的基因组相似性(>70%),本研究通过制备大肠埃希菌和宋内志贺菌混合感染标本,评估 mNGS 对近源物种的分辨能力,结果显示,当两种菌同为低浓度(1 000:1 000 CFU/ml),或仅宋内志贺菌为低浓度时,mNGS 出现宋内志贺菌假阴性结果,而大肠埃希菌不受浓度影响,在本研究设计的三组混合浓度标本中均能检出,这可能与大肠埃希菌特异性区域长于志贺菌属,在混合菌中更容易被检出有关。

随着临床应用的进展,定期分析检测结果可以作为 mNGS 初始性能确认的重要附加内容,用于逐步完善准确性评估和优化检测系统^[13]。我们的研究结果也表明,持续性能确认可以弥补初步确认试验中标本量不足,病原体覆盖少,以及传统检测方法缺乏分层分析等缺点,因此,持续性能确认结果更准确和全面,是初步性能确认试验必要的补充。

本研究准确度的持续评估结果显示 mNGS 相对细菌和真菌培养特异度小于 90%,有以下几种可能原因:(1)微生物培养受方法学限制,检测病原谱窄,其检测灵敏度可能较 mNGS 低,此时的 mNGS 假阳性结果实际上可能为真阳性;(2)相对于微生物培养需要活的微生物,mNGS 不易受抗菌药物治

疗的影响,对活的和死的微生物核酸均可检出,具有更高的阳性检出潜能。此外,mNGS 测序读长较短(特异性较低),测序过程可出现碱基读取错误,比对数据库不精密,生信分析方法缺陷,以及实验过程可引入微生物或核酸污染等均可能导致 mNGS 检测假阳性,因此对于 mNGS 检测的阳性结果,尤其是少见病原体的检出通常需要其他方法学验证。本研究结果也表明 mNGS 检测的敏感度较低(70%~90%),除了可能与 mNGS 测序深度不足、病原体与宿主基因占比低、标本未充分破壁等多种因素有关外^[10],还可能与本研究仅以单一传统检测方法作为参考方法有关。值得注意的是,我们发现近平滑念珠菌在 mNGS 检测中具有较高的漏检率,查阅原始数据发现一部分标本检出近平滑念珠菌,但归为微生态,另一部分标本检出序列数太低,表明 mNGS 检出近平滑念珠菌的临床价值及报告规则还需进一步评估。

核酸提取效率是影响 mNGS 结果的重要因素,MTB 相较其他微生物更难提取核酸,且易形成菌团,难以制备模拟标本。因此,本研究采用持续评估的方式对 mNGS 检测 MTB 的性能进行确认,可充分反映 mNGS 检测系统的核酸提取效率和对 MTB 的检测性能。结果显示 mNGS 对 MTB、细菌和真菌具有相似的诊断敏感度(分别为 81.8%、84.3% 和 81.6%),说明 mNGS 具有良好的破壁效果以及核酸提取效率。关于 mNGS 和 GeneXpert MTB/RIF 对 MTB 诊断效能的比较尚无统一的结论^[14-15]。本研究结果显示,mNGS 诊断 MTB 的敏感度略高于 GeneXpert MTB/RIF(81.8% 比 77.3%),特异度与 GeneXpert MTB/RIF 相似(97.4% 比 98.6%)。上述结论不一致的原因可能与不同研究采用的检测技术平台、研究人群以及参考标准不同等有关。综上所述,mNGS 对 BALF 中的 MTB 具有良好的检测性能。值得注意的是,本研究中,mNGS 检测 NTM 的敏感度为 50.0%,这可能与阳性标本量太低(4 份临床阳性标本)有关,还需扩大样本量进一步评估。

本研究局限性如下:(1)本研究中模拟病原体种类及标本量较少,后续需增加病原体种类及数量,对其检出限、精密度等指标进行性能确认。(2)mNGS 检测无靶向,随着 mNGS 进一步开展,新的病原体将不断出现,因此需要开展持续性能确认。(3)临床实践尚缺乏 RNA 病毒、寄生虫及其他标本类型等的性能确认数据,后续需要补充其他标本和微生物类型以完善 mNGS 的性能确认。

综上所述,本研究结果表明对于传统检测手段无法确定病原体的疑难病例以及危急重患者可进行 mNGS 检测,而对于有明确怀疑病原体的感染病例则首选传统方法检测。同时,本研究通过制备模拟 BALF 标本以及收集小样本量临床标本,以传统检测方法为参比方法,初步确认了 mNGS 检测 BALF 标本的性能特征,在项目开展后,扩大样本量对其准确度进行持续性能评估,为本机构提高 mNGS 检测质量和能力提供了科学依据,也为其他实验室及相关技术的性能确认提供了思路。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 宋慧娟:试验的设计与实施、数据的采集与分析以及文章的撰写;彭静、鲁艳军、田磊:指导以及文章审阅;陈中举、汪玥、刘为勇:提供试验材料;毛莉妍:对文章进行了审阅;孙自镛:提供了指导、研究经费、试验材料,同时对文章进行了审阅

参 考 文 献

- [1] 《中华传染病杂志》编辑委员会. 中国宏基因组学第二代测序技术检测感染病原体的临床应用专家共识[J]. 中华传染病杂志, 2020, 38(11): 681-689. DOI: 10.3760/cma.j.cn311365-20200731-00732.
- [2] Gu W, Miller S, Chiu CY. Clinical metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection[J]. *Annu Rev Pathol*, 2019, 14: 319-338. DOI: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012751.
- [3] Chiu CY, Miller SA. Clinical metagenomics[J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(6): 341-355. DOI: 10.1038/s41576-019-0113-7.
- [4] Gu W, Deng X, Lee M, et al. Rapid pathogen detection by metagenomic next-generation sequencing of infected body fluids[J]. *Nat Med*, 2021, 27(1): 115-124. DOI: 10.1038/s41591-020-1105-z.
- [5] 韩东升, 马筱玲, 吴文娟. 病原体宏基因组高通量测序医院实验室本地化之路:现状和挑战[J]. 中华检验医学杂志, 2022, 45(2): 100-104. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20211009-00619.
- [6] Miller S, Naccache SN, Samayoa E, et al. Laboratory validation of a clinical metagenomic sequencing assay for pathogen detection in cerebrospinal fluid[J]. *Genome Res*, 2019, 29(5):831-842. DOI: 10.1101/gr.238170.118.
- [7] Blauwkamp TA, Thair S, Rosen MJ, et al. Analytical and clinical validation of a microbial cell-free DNA sequencing test for infectious disease[J]. *Nat Microbiol*, 2019, 4(4): 663-674. DOI: 10.1038/s41564-018-0349-6.
- [8] Hasan MR, Rawat A, Tang P, et al. Depletion of human DNA in spiked clinical specimens for improvement of sensitivity of pathogen detection by next-generation sequencing[J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54(4):919-927. DOI: 10.1128/JCM.03050-15.
- [9] 张栋, 张京家, 杜娟, 等. 病原宏基因组高通量测序性能确认方案[J]. 中华检验医学杂志, 2022, 45(9):899-905. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20220721-00426.
- [10] 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. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20201026-00794.
- [11] 中国医师协会检验医师分会分子诊断专家委员会. 实验室自建分子诊断项目基本要求专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(12): 897-900. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2016.12.007.
- [12] 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. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20200903-00704.
- [13] Mattocks CJ, Morris MA, Matthijs G, et al. A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests[J]. *Eur J Hum Genet*, 2010, 18(12): 1276-1288. DOI: 10.1038/ejhg.2010.101.
- [14] Shi C, Han P, Tang P, et al. Clinical metagenomic sequencing for diagnosis of pulmonary tuberculosis. [J]. *The Journal of infection*, 2020, 81(4): 567-574. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.08.004.
- [15] Xi L, Yuanli C, Hui O, et al. Tuberculosis diagnosis by metagenomic next-generation sequencing on bronchoalveolar lavage fluid: a cross-sectional analysis[J]. *Int J Infect Dis*, 2021, 104: 50-57. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.12.063.

