

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671-9638. 20233285

论著·临床微生物与感染监测专题

三家宏基因组测序平台的性能评估比较

杨 涵, 郭巧梅, 王薛庆, 舒 文

(上海交通大学附属第一人民医院检验医学中心, 上海 200080)

[摘要] **目的** 对三家宏基因组测序(mNGS)平台开展性能评估。**方法** 三家平台(A、B和C)对18个参考品和8个临床标本进行mNGS,分析检测灵敏度、特异度、阴性预测值和阳性预测值。**结果** A、B和C平台对于参考品的灵敏度分别为97.8%、100%、45.1%,特异度分别为50.0%、100%、100%,阴性预测值分别为25.0%、100%、3.8%,阳性预测值分别为87.3%、75.2%、93.2%。对于临床标本的灵敏度分别为87.0%、82.6%、87.0%,阳性预测值分别为90.9%、65.5%、60.6%。**结论** 本研究丰富了国内mNGS平台数据,为感染性疾病的诊断新技术的发展提供了一定的建议。

[关键词] 宏基因组; 感染性疾病; 性能评估; mNGS

[中图分类号] R446

Performance assessment of three metagenomic next-generation sequencing platforms

YANG Han, GUO Qiao-mei, WANG Xue-qing, SHU Wen (Department of Laboratory Medicine, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China)

[Abstract] **Objective** To assess the performance of three metagenomic-next generation sequencing (mNGS) platforms. **Methods** 18 reference and 8 clinical specimens were performed mNGS by three platforms (A, B and C). Sensitivity, specificity, negative predictive value and positive predictive value were analyzed. **Results** For reference, sensitivity of platform A, B and C were 97.8%, 100%, and 45.1%; specificity were 50.0%, 100% and 100%; negative predictive value were 25.0%, 100% and 3.8%; positive predictive value were 87.3%, 75.2% and 93.2%. As for clinical specimens, sensitivity of platform A, B and C were 87.0%, 82.6% and 87.0%; positive predictive value were 90.9%, 65.5% and 60.6%. **Conclusion** This research enriches the data in domestic mNGS platform, and provides suggestions for the development of new diagnostic technologies for infectious diseases.

[Key words] metagenomics; infectious disease; performance assessment; mNGS

感染性疾病作为全球十大死亡原因之一,病原菌的早期诊断对其临床治疗的开展至关重要^[1-3]。而及时准确的诊断病原菌现今仍具有很大的挑战性。传统微生物培养、靶向核酸检测及抗原抗体检测都存在一定的局限性^[4-6]。宏基因组测序(metagenomic next-generation sequencing, mNGS)是基于高通量测序平台,直接对标本中的DNA或RNA进行无偏性测序,通过生物信息学分析,检测标本中可能含有的病原微生物(包括病毒、细菌、真菌和寄生虫)^[7]。与传统基于培养学的病原检测技术相比,

mNGS具有检测速度快、种类多、灵敏度高等特点,已逐渐成为临床疑难和未知病原微生物检验的重要手段^[8-11]。为规范mNGS技术在感染性疾病诊断中的应用,国内临床指南和专家共识也在不断发布与更新^[4, 12-14]。2016年以来,国内开展mNGS的第三方检验平台已达数十家,但各家平台mNGS检测产品的性能差异性较大,存在很多技术问题,且缺乏质量管理控制和评价体系,为医疗机构实验室本地化带来挑战^[15-16]。为便于医疗机构更有效地开展mNGS本地化检测系统,丰富国内mNGS数据,本研

[收稿日期] 2022-08-24

[基金项目] 上海交通大学“医工交叉研究基金”(YG2016QN31);上海市第一人民医院医院感染管理课题(SYYG20211013)

[作者简介] 杨涵(1994-),女(汉族),安徽省桐陵市人,硕士研究生,主要从事细菌毒力与耐药性研究。

[通信作者] 舒文 E-mail: shuwen654321@163.com

究选取了国内临床应用较为成熟的三家 mNGS 检测平台,对其规范开展不同产品性能评估。

成熟的平台,分别命名为 A、B、C。其中 A 和 B 来自北京,C 来自江苏。

1 材料与方法

1.2 测试样品

1.1 mNGS 厂家 研究选取 3 家 mNGS 临床应用

测试样品包括参考品和临床标本。
1.2.1 参考品 参考品主要由中国食品药品检定研究院提供,主要有 D 系列和 M 系列,规格为 1 mL/管,见表 1、2。

表 1 D 系列参考品

Table 1 References of D series

编号	中文	拉丁名	类别	浓度(CFU/mL)
D1-1	格氏李斯特菌	<i>Listeria grayi</i>	G ⁺ Bacterium	400 000
	副流感嗜血杆菌	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	G ⁻ Bacterium	300 000
	琼氏不动杆菌	<i>Acinetobacter junii</i>	G ⁻ Bacterium	200 000
	马红球菌	<i>Rhodococcus equi</i>	G ⁺ Bacterium	150 000
	藤黄微球菌	<i>Micrococcus luteus</i>	G ⁺ Bacterium	15 000
D1-2	格氏李斯特菌	<i>Listeria grayi</i>	G ⁺ Bacterium	40 000
	副流感嗜血杆菌	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	G ⁻ Bacterium	30 000
	琼氏不动杆菌	<i>Acinetobacter junii</i>	G ⁻ Bacterium	20 000
	马红球菌	<i>Rhodococcus equi</i>	G ⁺ Bacterium	15 000
	藤黄微球菌	<i>Micrococcus luteus</i>	G ⁺ Bacterium	1 500
D1-3	格氏李斯特菌	<i>Listeria grayi</i>	G ⁺ Bacterium	4 000
	副流感嗜血杆菌	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	G ⁻ Bacterium	3 000
	琼氏不动杆菌	<i>Acinetobacter junii</i>	G ⁻ Bacterium	2 000
	马红球菌	<i>Rhodococcus equi</i>	G ⁺ Bacterium	1 500
	藤黄微球菌	<i>Micrococcus luteus</i>	G ⁺ Bacterium	150
D1-2(10)	格氏李斯特菌	<i>Listeria grayi</i>	G ⁺ Bacterium	4 000
	副流感嗜血杆菌	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	G ⁻ Bacterium	3 000
	琼氏不动杆菌	<i>Acinetobacter junii</i>	G ⁻ Bacterium	2 000
	马红球菌	<i>Rhodococcus equi</i>	G ⁺ Bacterium	1 500
	藤黄微球菌	<i>Micrococcus luteus</i>	G ⁺ Bacterium	150
D1-1(100)	格氏李斯特菌	<i>Listeria grayi</i>	G ⁺ Bacterium	4 000
	副流感嗜血杆菌	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	G ⁻ Bacterium	3 000
	琼氏不动杆菌	<i>Acinetobacter junii</i>	G ⁻ Bacterium	2 000
	马红球菌	<i>Rhodococcus equi</i>	G ⁺ Bacterium	1 500
	藤黄微球菌	<i>Micrococcus luteus</i>	G ⁺ Bacterium	150
D2-1	干燥奈瑟氏菌	<i>Neisseria sicca</i>	G ⁻ Bacterium	150 000
	荧光假单胞菌	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	G ⁻ Bacterium	150 000
	嗜水气单胞菌	<i>Aeromonas hydrophila</i>	G ⁻ Bacterium	150 000
	嗜肺军团菌	<i>Legionella pneumophila</i>	G ⁻ Bacterium	100 000
	葡萄牙棒孢酵母	<i>Candida lusitanae</i>	Fungus	4 000
D2-2	干燥奈瑟氏菌	<i>Neisseria sicca</i>	G ⁻ Bacterium	15 000
	荧光假单胞菌	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	G ⁻ Bacterium	15 000
	嗜水气单胞菌	<i>Aeromonas hydrophila</i>	G ⁻ Bacterium	15 000
	嗜肺军团菌	<i>Legionella pneumophila</i>	G ⁻ Bacterium	10 000
	葡萄牙棒孢酵母	<i>Candida lusitanae</i>	Fungus	400
D2-3	干燥奈瑟氏菌	<i>Neisseria sicca</i>	G ⁻ Bacterium	1 500
	荧光假单胞菌	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	G ⁻ Bacterium	1 500
	嗜水气单胞菌	<i>Aeromonas hydrophila</i>	G ⁻ Bacterium	1 500
	嗜肺军团菌	<i>Legionella pneumophila</i>	G ⁻ Bacterium	1 000
	葡萄牙棒孢酵母	<i>Candida lusitanae</i>	Fungus	40

表 2 M 系列参考品
Table 2 References of M series

编号	中文	拉丁名	类别	浓度 (CFU/mL 或 Copies/mL)
M2	大肠埃希菌	<i>Escherichia coli</i>	G ⁻ Bacterium	20 000
	肺炎链球菌	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	G ⁺ Bacterium	200
	格特隐球菌	<i>Cryptococcus gattii</i> VGI	Fungus	1 000
	巨细胞病毒	<i>Cytomegalovirus</i>	DNA Virus	2 000
	人类疱疹病毒 6 型	<i>Human betaherpesvirus</i> 6B	DNA Virus	70 000
	人类疱疹病毒 1 型	<i>Human alphaherpes virus</i> 1	DNA Virus	11 000
	埃可病毒 11 型	<i>Echovirus</i> 11	RNA Virus	140
	人免疫缺陷病毒 C 群 1 型	<i>Human immunodeficiency virus</i> 1	RNA Virus	17 000
M4	脑膜炎奈瑟菌	<i>Neisseria meningitidis</i>	G ⁻ Bacterium	1 000
	无乳链球菌	<i>Streptococcus agalactiae</i>	G ⁺ Bacterium	40 000
	流感嗜血杆菌	<i>Haemophilus influenzae</i>	G ⁻ Bacterium	2 000
	单核细胞增多性李斯特菌	<i>Listeria monocytogenes</i>	G ⁺ Bacterium	20 000
	人类疱疹病毒 2 型	<i>Human alphaherpes virus</i> 2	DNA Virus	52 000
	副肠孤病毒 A 型/双埃可病毒 3 型	<i>Parechovirus</i> 3	RNA Virus	700 000
	水痘带状疱疹病毒	<i>Varicella zoster virus</i>	DNA Virus	660
M6	粪肠球菌	<i>Enterococcus faecalis</i>	G ⁺ Bacterium	20 000
	白念珠菌	<i>Candida albicans</i>	Fungus	400
	产酸克雷伯菌	<i>Klebsiella oxytoca</i>	G ⁻ Bacterium	30 000
	化脓链球菌	<i>Streptococcus pyogenes</i>	G ⁺ Bacterium	20 000
	腺病毒 C 亚群	<i>Human mastadenovirus</i> C	DNA Virus	150 000
	副流感病毒 1 型	<i>Parainfluenza virus</i> 1	RNA Virus	400 000
	呼吸道合胞病毒 A 型	<i>Respiratory syncytial virus</i> A	RNA Virus	12 000
	呼吸道合胞病毒 B 型	<i>Respiratory syncytial virus</i> B	RNA Virus	17 000
M8	干燥奈瑟氏菌	<i>Neisseria sicca</i>	G ⁻ Bacterium	70 000
	荧光假单胞菌	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	G ⁻ Bacterium	70 000
	嗜水气单胞菌	<i>Aeromonas hydrophila</i>	G ⁻ Bacterium	60 000
	葡萄牙棒孢酵母	<i>Candida lusitanae</i>	Fungus	2 000
	嗜肺军团菌	<i>Legionella pneumophila</i>	G ⁻ Bacterium	60 000
	腺病毒 E 亚群	<i>Human mastadenovirus</i> E	DNA Virus	400 000
	甲型流感病毒(H1N1)	<i>Influenza A virus</i> (2009H1N1)	RNA Virus	550 000
	乙型流感病毒	<i>Influenza B virus</i>	RNA Virus	110 000

参考品覆盖革兰阳性菌、革兰阴性菌、真菌、DNA 病毒和 RNA 病毒等不同种属病原体,所选病原体在病原种类、基因组大小、GC 含量等方面覆盖广泛,可代表实际临床标本中病原体的多样性。D 系列由人源背景 1×10^5 cells/mL 和不同病原体组成,M 系列由背景菌(人乳头瘤病毒 18 型、吉拉尔迪贪铜菌、猪鼻支原体)和不同病原体组成,其中 D0

和 M9 是阴性参考品。D1 系列有 3 支(D1-1、D1-2 和 D1-3),D2 系列有 3 支(D2-1、D2-2 和 D2-3),M 系类有 4 支(M2、M4、M6 和 M8)。另外,使用无菌无核酸酶水分别将 D1-1 和 D1-2 稀释 100、10 倍,制备成 D1-1(100)和 D1-2(10)。所有参考品进行随机编码,并随机分配给三家平台,见表 3。

表 3 参考品分配情况

Table 3 Distribution of references

参考品	A	B	C	体积(mL)
D0	R2204	R2205	R2206	1
D1-1	R2201	R2202	R2203	1
D1-2	R2207	R2208	R2209	1
D1-3	R2210	R2211	R2212	1
D1-2(10)	R2228	R2229	R2230	1
D1-2(10)	R2225	R2226	R2227	1
D1-2(10)	R2222	R2223	R2224	1
D1-1(100)	R2219	R2220	R2221	1
D1-1(100)	R2216	R2217	R2218	1
D1-1(100)	R2213	R2214	R2215	1
D2-1	R2231	R2232	R2233	1
D2-2	R2234	R2235	R2236	1
D2-3	R2237	R2238	R2239	1
M2	R2240	R2241	R2242	1
M4	R2243	R2244	R2245	1
M6	R2246	R2247	R2248	1
M8	R2249	R2250	R2251	1
M9	R2252	R2253	R2254	1

表 4 临床标本及分配情况

Table 4 Clinical specimens and distribution

临床标本	A	B	C	标本类型	体积(mL)	培养结果
20220208	S2261	S2262	S2263	肺泡灌洗液	5	鲍曼不动杆菌
20220209-1	S2264	S2265	S2266	腹腔积液	5	无菌
20220209-2	S2267	S2268	S2269	胸腔积液	5	无菌
20220211-2	S2270	S2271	S2272	腹腔积液	5	近平滑念珠菌、结核硬脂酸棒状杆菌
20220211-3	S2273	S2274	S2275	腹腔积液	5	热带念珠菌、尿肠球菌
20220214-1	S2276	S2277	S2278	腹腔积液	5	肺炎克雷伯菌
20220217-1	S2279	S2280	S2281	肺泡灌洗液	5	无可疑致病菌
20220210-1	S2282	S2283	S2284	肺泡灌洗液	5	无可疑致病菌

2 结果

2.1 检测周转时间(turn around time, TAT) 研究汇总各家 TAT 时间,其中 A 平台在 24 h 内汇报结果,B 和 C 平台的 TAT 分别为 4、7 d。其中,B 平

1.2.2 临床标本 前瞻性收集 8 份临床标本,主要类型为胸/腹腔积液和肺泡灌洗液,其中 4 份培养检出病原菌,剩余 4 份培养未检出病原菌。每份临床标本分装成 3 管,5 mL/管,及时冻存在 -80°冰箱。所有标本进行随机编号,并随机分配给不同测试平台。见表 4。

1.3 研究内容 所有编号的参考品和临床标本分别分配给平台 A、B、C,由不同平台工作人员取样,干冰运输至各自实验室安排后续样本提取、检测和出具报告。mNGS 检测流程包括:首先对样本进行前处理,提取样本核酸。利用随机引物建库,对构建完成的文库进行质量评估,筛选出合格的 DNA 文库样本。将筛选后的 DNA 文库样本上机扩增测序,并对数据质量进行评估,去除低质量短片断的序列及匹配到宿主基因组的序列,最后比对到包括已知病毒、细菌、真菌和寄生虫的微生物参考基因组数据库中,检索所有序列匹配基因组目标的种属信息、匹配的序列数量、占总序列数比值等。

台在样品 DNA 测序中分别做了去人源和未去人源化处理。

2.2 参考品检测性能 通过研究阴性参考品和阳性参考品病原体的检出情况,评估各家 mNGS 检出灵敏度、特异度、阴性预测值和阳性预测值。参考品 mNGS 检测性能分析结果见表 5。

表 5 参考品 mNGS 检测结果汇总
Table 5 mNGS detection results of reference

编号	A	B	C
D1-1	格氏李斯特菌、副流感嗜血杆菌、琼氏不动杆菌、马红球菌、藤黄微球菌、长臂猿白血病病毒	格氏李斯特菌、副流感嗜血杆菌、琼氏不动杆菌、马红球菌、藤黄微球菌	格氏李斯特菌、副流感嗜血杆菌
D1-2	格氏李斯特菌、副流感嗜血杆菌、琼氏不动杆菌、马红球菌、藤黄微球菌、长臂猿白血病病毒	格氏李斯特菌、副流感嗜血杆菌、琼氏不动杆菌、马红球菌、藤黄微球菌	格氏李斯特菌、副流感嗜血杆菌
D1-3	格氏李斯特菌、副流感嗜血杆菌、琼氏不动杆菌、马红球菌、藤黄微球菌、长臂猿白血病病毒	格氏李斯特菌、副流感嗜血杆菌、琼氏不动杆菌、马红球菌、藤黄微球菌	格氏李斯特菌、副流感嗜血杆菌
D1-2(10)	格氏李斯特菌、副流感嗜血杆菌、琼氏不动杆菌、马红球菌、藤黄微球菌、长臂猿白血病病毒	格氏李斯特菌、副流感嗜血杆菌、琼氏不动杆菌、马红球菌、藤黄微球菌、干燥奈瑟氏菌、荧光假单胞菌、嗜水气单胞菌、嗜肺军团菌、葡萄牙棒孢酵母	呼吸道合胞病毒 B 型
D1-2(10)	格氏李斯特菌、副流感嗜血杆菌、琼氏不动杆菌、马红球菌、藤黄微球菌、长臂猿白血病病毒	格氏李斯特菌、副流感嗜血杆菌、琼氏不动杆菌、马红球菌、藤黄微球菌、干燥奈瑟氏菌、荧光假单胞菌、嗜水气单胞菌、嗜肺军团菌、葡萄牙棒孢酵母	呼吸道合胞病毒 B 型
D1-2(10)	格氏李斯特菌、副流感嗜血杆菌、琼氏不动杆菌、马红球菌、藤黄微球菌、长臂猿白血病病毒	格氏李斯特菌、副流感嗜血杆菌、琼氏不动杆菌、马红球菌、藤黄微球菌、干燥奈瑟氏菌、荧光假单胞菌、嗜水气单胞菌、嗜肺军团菌、葡萄牙棒孢酵母	呼吸道合胞病毒 B 型
D1-1(100)	格氏李斯特菌、副流感嗜血杆菌、琼氏不动杆菌、马红球菌、藤黄微球菌、长臂猿白血病病毒	格氏李斯特菌、副流感嗜血杆菌、琼氏不动杆菌、马红球菌、藤黄微球菌、干燥奈瑟氏菌、荧光假单胞菌、嗜水气单胞菌、嗜肺军团菌、葡萄牙棒孢酵母	呼吸道合胞病毒 B 型
D1-1(100)	格氏李斯特菌、副流感嗜血杆菌、琼氏不动杆菌、马红球菌、藤黄微球菌、长臂猿白血病病毒	格氏李斯特菌、副流感嗜血杆菌、琼氏不动杆菌、马红球菌、藤黄微球菌、干燥奈瑟氏菌、荧光假单胞菌、嗜水气单胞菌、嗜肺军团菌、葡萄牙棒孢酵母	呼吸道合胞病毒 B 型
D1-1(100)	格氏李斯特菌、副流感嗜血杆菌、琼氏不动杆菌、马红球菌、藤黄微球菌、长臂猿白血病病毒	格氏李斯特菌、副流感嗜血杆菌、琼氏不动杆菌、马红球菌、藤黄微球菌、干燥奈瑟氏菌、荧光假单胞菌、嗜水气单胞菌、嗜肺军团菌、葡萄牙棒孢酵母	呼吸道合胞病毒 B 型
D2-1	干燥奈瑟氏菌、荧光假单胞菌、嗜水气单胞菌、嗜肺军团菌、葡萄牙棒孢酵母、长臂猿白血病病毒	干燥奈瑟氏菌、荧光假单胞菌、嗜水气单胞菌、嗜肺军团菌、葡萄牙棒孢酵母	荧光假单胞菌、嗜水气单胞菌、嗜肺军团菌、葡萄牙棒孢酵母
D2-2	干燥奈瑟氏菌、荧光假单胞菌、嗜水气单胞菌、嗜肺军团菌、葡萄牙棒孢酵母、长臂猿白血病病毒	干燥奈瑟氏菌、荧光假单胞菌、嗜水气单胞菌、嗜肺军团菌、葡萄牙棒孢酵母	荧光假单胞菌、嗜水气单胞菌、嗜肺军团菌、葡萄牙棒孢酵母
D2-3	干燥奈瑟氏菌、荧光假单胞菌、嗜水气单胞菌、嗜肺军团菌、葡萄牙棒孢酵母、长臂猿白血病病毒	干燥奈瑟氏菌、荧光假单胞菌、嗜水气单胞菌、嗜肺军团菌、葡萄牙棒孢酵母	荧光假单胞菌、嗜水气单胞菌、嗜肺军团菌、葡萄牙棒孢酵母
M2	大肠埃希菌、肺炎链球菌、格特隐球菌、巨细胞病毒、人类疱疹病毒 6 型、人类疱疹病毒 1 型	大肠埃希菌、肺炎链球菌、格特隐球菌、巨细胞病毒、人类疱疹病毒 6 型、人类疱疹病毒 1 型、埃可病毒 11 型、人免疫缺陷病毒 C 群 1 型	格特隐球菌、巨细胞病毒、人类疱疹病毒 1 型
M4	脑膜炎奈瑟菌、无乳链球菌、流感嗜血杆菌、单核细胞增多性李斯特菌、人类疱疹病毒 2 型、副伤寒病毒 A 型/双埃可病毒 3 型、水痘带状疱疹病毒	脑膜炎奈瑟菌、无乳链球菌、流感嗜血杆菌、单核细胞增多性李斯特菌、人类疱疹病毒 2 型、副伤寒病毒 A 型/双埃可病毒 3 型、水痘带状疱疹病毒	脑膜炎奈瑟菌、无乳链球菌、流感嗜血杆菌、单核细胞增多性李斯特菌、人类疱疹病毒 2 型、副伤寒病毒 A 型/双埃可病毒 3 型
M6	粪肠球菌、白念珠菌、产酸克雷伯菌、化脓链球菌、腺病毒 C 亚群、副流感病毒 1 型、呼吸道合胞病毒 A 型、呼吸道合胞病毒 B 型	粪肠球菌、白念珠菌、产酸克雷伯菌、化脓链球菌、腺病毒 C 亚群、副流感病毒 1 型、呼吸道合胞病毒 A 型、呼吸道合胞病毒 B 型	粪肠球菌、白念珠菌、产酸克雷伯菌、化脓链球菌、腺病毒 C 亚群、副流感病毒 1 型、呼吸道合胞病毒 B 型
M8	干燥奈瑟氏菌、荧光假单胞菌、嗜水气单胞菌、葡萄牙棒孢酵母、嗜肺军团菌、腺病毒 E 亚群、甲型流感病毒(H1N1)、乙型流感病毒、腺病毒 B 亚群	干燥奈瑟氏菌、荧光假单胞菌、嗜水气单胞菌、葡萄牙棒孢酵母、嗜肺军团菌、腺病毒 E 亚群、甲型流感病毒(H1N1)、乙型流感病毒	荧光假单胞菌、嗜水气单胞菌、葡萄牙棒孢酵母、嗜肺军团菌、腺病毒 E 亚群、甲型流感病毒(H1N1)、乙型流感病毒、黏液奈瑟菌

2.2.1 检出灵敏度 研究采用不同阳性参考品的不同病原体作为阳性金标准,计算不同 mNGS 平台对阳性参考品中不同病原体的阳性检出率(即检出灵敏度)。研究统计了 91 份参考品病原体,结果显示 B(100%,91 份)和 A(97.8%,89 份)的检出灵敏度远优于 C(45.1%,41 份)。结果见图 1。

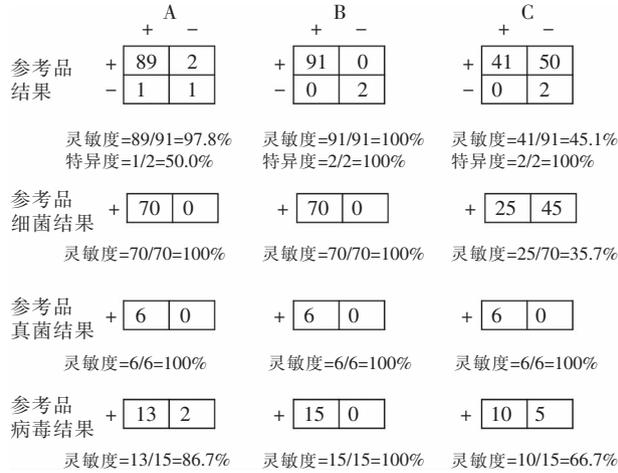


图 1 三家 mNGS 平台参考品的性能分析

Figure 1 Performance analysis on references of three mNGS platforms

2.2.2 检测特异性 研究计算阴性参考品(D0 和 M9)病原体各家 mNGS 平台的检测情况,结果显示

B 和 C 平台无多报现象,特异度为 100%,而 A 平台对 D0 多报了长臂猿白血病毒,特异度为 50%(1/2),见图 1。

2.2.3 阴性预测值 在阴性参考品检测中,B 和 C 平台都报告了 D0 和 M9 两个阴性结果,而 A 平台对 D0 多报了长臂猿白血病毒。在阳性参考品中,A 和 C 平台分别报了 2 个和 50 个阳性病原体为阴性。三家 mNGS 阴性预测值分别为 B 平台 100%(2/2)、A 平台 25.0%(1/4)、C 平台 3.8%(2/52)。

2.2.4 阳性预测值 在 91 个阳性参考品病原体检测中,B 平台报告 91 个阳性和多报了 30 个结果(三次 D1-2(10)和三次 D1-1(100)重复均多报了 5 个病原菌),A 平台报告 89 个阳性和多报 13 个阳性(M8 多报了腺病毒 B 亚群,D 系列均多报了长臂猿白血病毒),C 平台报告了 41 个阳性和多报 3 个病原体[D1-2(10)和 D1-1(100)多报了呼吸道合胞病毒 B 型,M8 多报了黏液奈瑟菌]。三家 mNGS 阳性预测值分别为 B 平台 75.2%(91/121)、A 平台 87.3%(89/102)、C 平台 93.2%(41/44)。

2.3 临床标本检测性能 研究以培养或 2 家 mNGS 平台同时检出的病原体为阳性金标准,分析诊断灵敏度和阳性预测值。鉴于本次研究未提供完全无菌临床体液标本,无法评估诊断特异性和阴性预测值。临床标本 mNGS 检测性能分析结果见表 6。

表 6 培养和 mNGS 临床标本病原体检测结果汇总

Table 6 Pathogen detection results of cultured and mNGS clinical specimens

样本编号	标本类型	临床诊断	培养	A	B	C
20220208	肺泡灌洗液	多发伤	鲍曼不动杆菌	白念珠菌、鲍曼不动杆菌、人类疱疹病毒 1 型、嗜麦芽窄食单胞菌	白念珠菌、鲍曼不动杆菌、人类疱疹病毒 1 型、嗜麦芽窄食单胞菌	白念珠菌、鲍曼不动杆菌、人类疱疹病毒 1 型、肺炎克雷伯菌、嗜麦芽窄食单胞菌
20220211-2	腹腔积液	急性胰腺炎	近平滑念珠菌、结核硬脂酸棒状杆菌	近平滑念珠菌、黏金黄棒状杆菌	巨细胞病毒	近平滑念珠菌、纹带棒杆菌
20220211-3	腹腔积液	胃肿瘤	热带念珠菌、尿肠球菌	热带念珠菌、人类疱疹病毒 1 型、人类疱疹病毒 2 型、尿肠球菌、纹带棒杆菌	丁酸梭菌、热带念珠菌、人类疱疹病毒 1 型、人类疱疹病毒 4 型(EBV)、人类疱疹病毒 7 型、尿肠球菌、细环病毒 22 型、细环病毒 24 型、长双歧杆菌	人类疱疹病毒 4 型(EBV)、人类疱疹病毒 1 型、化脓链球菌、热带念珠菌、尿肠球菌、唾液支原体、纹带棒杆菌
20220214-1	腹腔积液	腹腔感染	肺炎克雷伯菌	肺炎克雷伯菌、庚型肝炎病毒	肺炎克雷伯菌、肝炎病毒 C 型、庚型肝炎病毒	肺炎克雷伯菌
20220209-1	腹腔积液	自发性腹膜炎	无菌	艰难梭菌	艰难梭菌、乙型肝炎病毒	艰难梭菌
20220209-2	胸腔积液	胸腔积液	无菌	具核梭杆菌	具核梭杆菌	具核梭杆菌

续表 6 (Table 6, Continued)

样本编号	标本类型	临床诊断	培养	A	B	C
20220210-1	肺泡灌洗液	肺癌、2 型糖尿病	无可疑致病菌	肺炎链球菌、流感嗜血杆菌	流感嗜血杆菌、人类疱疹病毒 7 型	产黑色普雷沃菌、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、缓症链球菌、人类疱疹病毒 7 型、殊异韦荣球菌、微黄奈瑟菌、韦德纤毛菌、血孪生球菌、牙龈卟啉单胞菌、牙周梭杆菌、黏滑口腔球菌
20220217-1	肺泡灌洗液	急性髓系白血病、重症肺炎、脓毒性休克	无可疑致病菌	巨细胞病毒、呼吸道合胞病毒、铜绿假单胞菌、微小根毛霉、烟曲霉	呼吸道合胞病毒、人类疱疹病毒 1 型、巨细胞病毒、人类疱疹病毒 6 型、铜绿假单胞菌、微小根毛霉、烟曲霉	巨细胞病毒、呼吸道合胞病毒、铜绿假单胞菌、烟曲霉

2.3.1 检出灵敏度 临床标本共检出 23 种病原体,不同 mNGS 平台的检出灵敏度分别为 A 平台 87.0% (20 种),B 平台 82.6% (19 种)、C 平台 87.0% (20 种),见图 2。

2.3.2 阳性预测值 mNGS 相比于培养方法会发现更多的阳性病原体,本次评估研究发现不同 mNGS 平台在临床标本中分别报告了 22 个(A)、29 个(B)、33 个(C)阳性病原体,其中真阳性病原体分别为 20 个(A)、19 个(B)和 20 个(C)。试验计算不同 mNGS 平台阳性预测值分别为 A 平台 90.9% (20/22)、B 平台 65.5% (19/29)、C 平台 60.6% (20/33)。

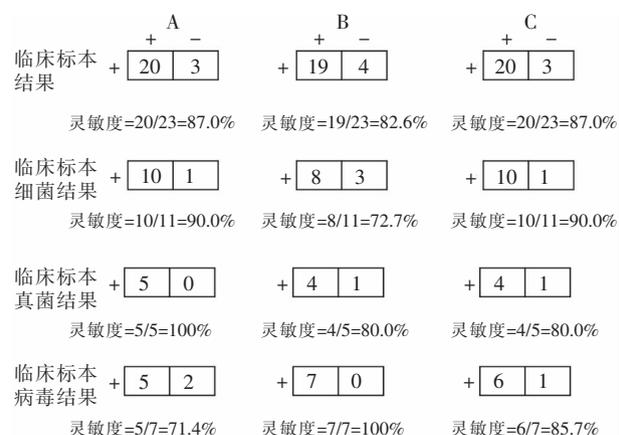


图 2 三家 mNGS 平台临床标本的性能分析

Figure 2 Performance analysis on clinical specimens of three mNGS platforms

3 讨论

mNGS 对于不明原因感染、混合及复杂病原体

感染的诊断优势显著。2021 年 7 月 15 日,国务院发布《关于支持浦东新区高水平改革开放打造社会主义现代化建设引领区的意见》^[15] 中提出,允许有条件的医疗机构按照相关要求开展自行研制体外诊断试剂试点。政策支持推动了 mNGS 实验室本地化的发展,建立完整的质量管理控制体系是重点更是难点^[16]。

目前,采用 mNGS 进行感染性疾病诊断最大的瓶颈为污染引起的假阳性^[12]。污染来源包括实验室试剂或环境中检测到的背景微生物和正常人体菌群,以及生信分析或数据库错误(例如错误注释),这些均可能导致假阳性^[2, 12]。本研究在结果汇总时发现,各家在参考品检测中均出现了污染。A 平台在对 D 系列参考品进行 RNA 测序时,多报了一种 RNA 病毒——长臂猿白血病病毒,这可能来自标本运输、核酸提取及实验室污染等过程^[2, 17]。B 平台在 D1-1(100)和 D1-2(10)重复检测样品中报告了 D2 系列全部的病原体,可能是实验室检测过程中污染导致。C 平台在除了 D1-1(100)和 D1-2(10)外的其他参考品都报告了人乳头瘤病毒 18 型(M 系列参考品的背景菌),怀疑存在标本交叉污染。因此,如何减少污染是 mNGS 检测技术在未来急需攻克的问题。

本研究结果显示,三家平台对细菌、真菌和病毒的检测效能也存在一定差异,可能与不同微生物种类本身结构的差异,核酸释放效率差异明显有关^[4, 18]。另外,病毒的准确分型也十分考验宏基因组的生信流程^[2]。对于临床标本 20220211-3,B 和 C 平台检出了人类疱疹病毒 4 型,也就是 EB 病毒,而 A 平台检出的是人类疱疹病毒 2 型。临床上这两种病毒

引起的临床症状大相径庭。因此,提高病毒检测的灵敏度及特异度,仍是宏基因组临床应用的挑战之一。

本次研究评估比较了三家 mNGS 平台对于参考品和临床标本的检测性能。结果显示,在参考品评估中,B 平台 mNGS 的灵敏度、特异度和阴性预测值最高,C 平台 mNGS 的阳性预测值最高。而在临床标本评估中,A 平台的灵敏度和阳性预测值的性能明显优于 B 和 C。TAT 显示 A 平台报告回报速度最快。三家平台均存在定植菌及背景菌被多报的现象,造成该现象可能的原因是:由于不同类型微生物基因组长度和测序平台等存在差异,无法建立统一的致病菌判断标准,导致某些背景菌被误判为致病菌。因此,在 mNGS 结果解读方面,实验室需综合测序目的、标本类型、技术特点等建立并验证阳性阈值及判断标准,根据微生物序列数目、基因组覆盖度、相对丰度和病原体的临床相关性等形成一套内部的结果解读规则^[15],并与临床保持良好的沟通,才能得到一份合理的检测报告。

本研究也存在一定的局限性。首先,由于前瞻性收集病原菌阳性的临床血液和脑脊液标本的难度较大,本研究未开展血液和脑脊液临床标本的宏基因组评估。其次,由于临床标本的病原菌检测缺少金标准,单纯培养只能检出常见细菌和真菌,病毒和难培养的细菌无法检出,因此本研究选择了以培养或 2 家 mNGS 平台同时检出的病原体作为金标准,进而分析诊断灵敏度和阳性预测值。该方法的准确性尚缺乏定论。

感染性疾病的诊断是现今医学上的难点和重点,本研究丰富了国内宏基因组平台资料,为感染性疾病诊断新技术的进步和完善提供了一定的建议。另外,mNGS 对于已知以及未知病原体都具有强大的检测能力,面对检出的大量病原体,如何正确地去看待及解读,使其更好地指导临床感染性疾病的诊治,这需要临床实验室工作人员加强相关知识的学习,联合强大的生物信息学团队,并与临床保持良好的沟通才能实现。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

[1] Gu W, Deng XD, Lee M, et al. Rapid pathogen detection by metagenomic next-generation sequencing of infected body fluids[J]. *Nat Med*, 2021, 27(1): 115-124.

[2] 刘东来,张春涛,王佑春,等.病原宏基因组高通量测序技术质量控制与评价的挑战和思考[J].*生物工程学报*,2020,36(12):2598-2609.
Liu DL, Zhang CT, Wang YC, et al. Challenges and considerations on quality control and evaluation of pathogen metagenomic next-generation sequencing[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, 36(12): 2598-2609.

[3] McGill F, Heyderman RS, Panagiotou S, et al. Acute bacterial meningitis in adults[J]. *Lancet*, 2016, 388(10063): 3036-3047.

[4] 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.
Laboratory Medicine Society of Chinese Medical Association. Expert consensus on clinical standardized application of metagenomics next-generation sequencing for detection of pathogenic microorganisms[J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2020, 43(12): 1181-1195.

[5] Schlager 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.

[6] Greninger AL. The challenge of diagnostic metagenomics[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2018, 18(7): 605-615.

[7] Gu W, Miller S, Chiu CY. Clinical metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection[J]. *Annu Rev Pathol*, 2019, 14: 319-338.

[8] 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.

[9] Zheng Y, Qiu XJ, Wang T, et al. The diagnostic value of metagenomic next-generation sequencing in lower respiratory tract infection[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 694756.

[10] Govender KN, Street TL, Sanderson ND, et al. Metagenomic sequencing as a pathogen-agnostic clinical diagnostic tool for infectious diseases: a systematic review and Meta-analysis of diagnostic test accuracy studies[J]. *J Clin Microbiol*, 2021, 59(9): e0291620.

[11] Han DS, Li ZY, Li R, et al. mNGS in clinical microbiology laboratories: on the road to maturity[J]. *Crit Rev Microbiol*, 2019, 45(5/6): 668-685.

[12] 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.
Clinical Microbiology Group, Laboratory Medicine Branch, Chinese Medical Association, Clinical Microbiology Group, Microbiology and Immunology Branch, Chinese Medical Association, Clinical Microbiology and Infection Branch of China Healthcare International Exchange Promotion Association.

Chinese expert consensus on metagenomics next-generation sequencing application on pathogen detection of infectious diseases[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2021, 44(2): 107-120.

- [13] 宏基因组学测序技术在中重症感染中的临床应用共识专家组, 中国研究型医院学会脓毒症与休克专业委员会, 中国微生物学会微生物毒素专业委员会, 等. 宏基因组学测序技术在中重症感染中的临床应用专家共识(第一版)[J]. 中华危重病急救医学, 2020, 32(5): 531-536.

Consensus Expert Group on the Clinical Application of Metagenomic Sequencing Technology in Moderate and Severe Infections, Sepsis and Shock Committee of Chinese Research Hospital Association, Microbial Toxin Committee of Chinese Society of Microbiology, et al. Expert consensus for the application of metagenomic next generation sequencing in the pathogen diagnosis in clinical moderate and severe infections (first edition)[J]. Chinese Critical Care Medicine, 2020, 32(5): 531-536.

- [14] 《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.

Editorial Board of Chinese Journal of Infectious Diseases. Clinical practice expert consensus for the application of metagenomic next generation sequencing[J]. Chinese Journal of Infectious Diseases, 2020, 38(11): 681-689.

- [15] 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.

Han DS, Ma XL, Wu WJ. Current status and challenges of

pathogen metagenomic high-throughput sequencing testing implemented in a clinical laboratory affiliated to a hospital[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2022, 45(2): 100-104.

- [16] 刘东来, 沈舒, 田颖新, 等. 病原宏基因组高通量测序技术质量评价参考品的建立[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2022, 14(5): 727-730.

Liu DL, Shen S, Tian YX, et al. Establishment of reference panel for quality evaluation of pathogen metagenomic next-generation sequencing[J]. Journal of Molecular Diagnostics and Therapy, 2022, 14(5): 727-730.

- [17] Denner J. Transspecies transmission of gammaretroviruses and the origin of the gibbon ape leukaemia virus (GaLV) and the koala retrovirus (KoRV)[J]. Viruses, 2016, 8(12): 336.

- [18] Liu DL, Zhou HW, Xu T, et al. Multicenter assessment of shotgun metagenomics for pathogen detection[J]. EBioMedicine, 2021, 74: 103649.

(本文编辑:陈玉华)

本文引用格式:杨涵,郭巧梅,王薛庆,等. 三家宏基因组测序平台的性能评估比较[J]. 中国感染控制杂志, 2023, 22(1): 59-67. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20233285.

Cite this article as: YANG Han, GUO Qiao-mei, WANG Xue-qing, et al. Performance assessment of three metagenomic next-generation sequencing platforms[J]. Chin J Infect Control, 2023, 22(1): 59-67. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20233285.