

# 利用高通量宏基因组测序技术检测血液病患者感染性病原体的横断面研究

杨理 顾佳 龙筱露 沈克锋 张炜 肖敏

**【摘要】目的** 利用高通量宏基因组测序技术对血液病患者感染性病原体进行横断面调查, 为此类感染性疾病高危患者的快速诊断及早期针对性用药提供依据。**方法** 回顾性分析2019年1月至6月华中科技大学同济医学院附属同济医院血液科血液病患者外周血临床标本高通量宏基因组分析数据及患者临床特征, 并归纳血液病患者的感染病原体种类特征。**结果** 共纳入41例患者资料, 检出病原体阳性患者24例, 其中细菌感染以假单胞菌属感染比例最高(4/24、16.67%), 其次为不动杆菌属(2/24、8.33%)、克雷伯菌属(2/24、8.33%)、葡萄球菌属(2/24、8.33%)和黄单胞杆菌属(2/24、8.33%); 而奈瑟菌属、米勒菌属、幽门螺杆菌以及结核分枝杆菌则较罕见。共有6例患者检出混合型感染, 其中以病毒和细菌混合型感染最为多见(4/24、16.67%)。真菌感染的病原菌种类较细菌性病原体更为分散, 白色念珠菌、青霉菌、肺孢子菌和根霉菌检出1例(占0.04%), 无明显聚集性; 病原体相对丰度方面, 83.33%(5/6)真菌病原体阳性患者的检出序列片段数偏少(< 100), 仅1例检出高负荷真菌感染(曲霉菌序列片段数为2 836)。病毒类病原体的检测结果显示, 病毒筛查谱限于已知的常见DNA病毒; 从测序结果看, 24例检测阳性患者中巨细胞病毒、EB病毒和单纯疱疹病毒1型为检出率最高的病毒, 均占20.83%(5/24); 较真菌, 病毒种类存在一定聚集性, 其相对负荷亦较高(平均序列片段数> 200); 而单纯疱疹病毒2型和指环病毒属病毒检出率相对较低, 分别占4.17%(1/24)和8.33%(2/24)。**结论** 本研究创新性地利用高通量宏基因组测序技术检测血液病患者感染性疾病的病原体谱系; 利用高通量宏基因组测序技术可快速锁定病原体并予以针对性抗菌药物治疗具有重要的临床价值。

**【关键词】** 高通量宏基因组学; 血液系统; 恶性肿瘤; 病原体; 测序; 诊断

**Microbiome profiling analysis on patients with hematological malignancies and infectious diseases by high-throughput sequencing** Yang Li, Gu Jia, Long Xiaolu, Shen Kefeng, Zhang Wei, Xiao Min. Hematology Department, Tongji Hospital, Tongji Medical School, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: Xiao Min, Email: Xiaomin@tjh.tjmu.edu.cn

**【Abstract】Objective** To investigate the infectious pathogens in patients with hematologic diseases by high-throughput macrogenome sequencing, and to provide evidence for rapid diagnosis and early targeted drug use. **Methods** From January to June 2019, the data and clinical characteristics of the patients with peripheral blood were analyzed, retrospectively, and the types of infectious pathogens were summarized. **Results** Total of 41 patients were collected, among whom, 24 cases were pathogens positive, of which the highest percentage of bacterial infection was *Pseudomonas spp.* (4/24, 16.67%), following by *Acinetobacter spp.* (2/24, 8.33%), *Klebsiella spp.* (2/24, 8.33%), *Staphylococcus spp.* (2/24, 8.33%) and *Stenotrophomonas maltophilia* (2/24, 8.33%). However, *Neisseria spp.*, *Moellerella spp.* and *M. tuberculosis* infections were all rare. Total of 6 patients detected mixed infection, among which virus and bacteria mixed infection was the most common (4/24, 16.67%). In comparison, *fungus* infection demonstrated scattered feature, with each one positive case (0.04%) detected for *Candida albicans*, *Penicillium spp.*, *Pneumocystis carinii*, *Rhizopus spp.*, and *Saccharomyces spp.* For the relative abundance of pathogens was concerned, 83.33% (5/6) of positive fungal pathogens had less fragment reads (< 100) and only 1 case had high load *fungus* infection (*Aspergillus spp.* reads

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2020.02.003

基金项目: 国家自然科学基金(No. 81700145, 81770211)

作者单位: 430030 武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院血液内科

通信作者: 肖敏, Email: Xiaomin@tjh.tjmu.edu.cn

was 2 836). Detection results of viral pathogens showed that the virus screening spectrum was limited to known common DNA viruses. The results showed that cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV) and herpes simplex virus type 1 (HSV1) had the highest detection rates among 24 positive patients, accounting for 20.83% (5/24); compared with fungal pathogens, there was a certain aggregation of virus species, and its relative load was higher (average sequence reads > 200). The detection rates of HSV2 and torquetenosis virus (TTV) were relatively low, accounting for 4.17% (1/24) and 8.33% (2/24), respectively. **Conclusions** The high-throughput macrogenome sequencing technique was used to detect the pathogenic strains of infectious diseases in patients with hematologic diseases. High-throughput macrogenome sequencing technology could rapidly target pathogens and provide targeted antimicrobial therapy had important clinical value.

**【Key words】** High-throughput macrogenomics; Blood system; Malignant tumor; Pathogen; Sequencing; Diagnosis

血液系统疾病患者因原发病累及其淋巴造血系统, 普遍导致患者机体免疫受损, 因此感染是血液病患者常见的并发症之一<sup>[1-2]</sup>, 因经验性抗菌药物使用以及常规的培养方法耗时耗力<sup>[3]</sup>, 导致此类感染未能得到及时准确的诊断, 最终严重影响血液病患者的整体预后。随着近年来基于高通量测序技术的快速发展, 一种以PMseq<sup>TM</sup>为代表, 基于“鸟枪法”的二代测序技术已经越来越广泛的应用于病原体检测中<sup>[4-7]</sup>。此技术首先对超声或化学法打断为极短片段的DNA序列进行测序, 随后利用算法将其进一步“拼接”为较长的序列并进行多物种的核酸序列基本局部相似性比对, 通过序列比对的相似性及相对丰度确定样本DNA中所有的微生物种类及比例。相比于培养法, 该技术具有快速、敏感、广谱的巨大优势<sup>[8-11]</sup>。本研究回顾性分析了2019年上半年华中科技大学同济医学院附属同济医院血液内科利用PMseq<sup>TM</sup>技术检测血液病患者全血标本中的病原体数据, 旨在分析血液病患者临床感染病原体的谱系特征, 为血液病患者感染性疾病的早期诊断提供依据, 现报道如下。

## 资料与方法

### 一、标本来源和处理

标本来源于华中科技大学同济医学院附属同济医院血液科2019年1月至6月住院患者共41例, 患者住院期间均给予经验性抗菌药物及抗真菌药物, 48~72 h后体温仍> 38.5 °C; 在征得患者及其家属的知情同意后, 应用EDTA抗凝管采集静脉血5 ml, 裂除红细胞并低温离心获取有核细胞沉淀, 利用Qiagen DNA提取试剂盒获取标本中总DNA样本, -80 °C保存。

### 二、深度测序

标本DNA冷链运输至华大基因公司(武汉)进行PMseq<sup>TM</sup>文库构建, 利用BGISEQ-50平台进行高通量宏基因组测序<sup>[12]</sup>。

### 三、数据处理

下机序列去除接头序列, 剔除测序低质量以及重复序列后, 所获取的序列片段数先行过滤来源于人源DNA的片段数; 而后进一步过滤疑似来源于背景微生物数据库的数据(以排除背景微生物干扰); 最终获取的数据通过比对微生物基因组数据库获取可疑致病微生物的种类及相对丰度信息。

## 结 果

### 一、基本资料

本研究纳入华中科技大学同济医学院附属同济医院血液内科共41例患者, 年龄14~76岁, 其中男性23例、女性18例; 原发病: 淋巴瘤患者22例, 白血病患者10例, 多发性骨髓瘤患者5例, 骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndromes, MDS)、慢性活动性EBV(chronic active Epstein-Barr virus, CAEBV)感染、白细胞和血小板计数减少、发热待查患者各1例。患者样本采集时临床症状: 29例患者表现为高热(标本采集前48 h内体温> 40 °C), 伴咳嗽、咯痰及肺部感染表现患者7例, 组织脓肿(肛周、胸壁和腹股沟)患者3例, 胸腹水患者2例, 淋巴肿大患者2例;

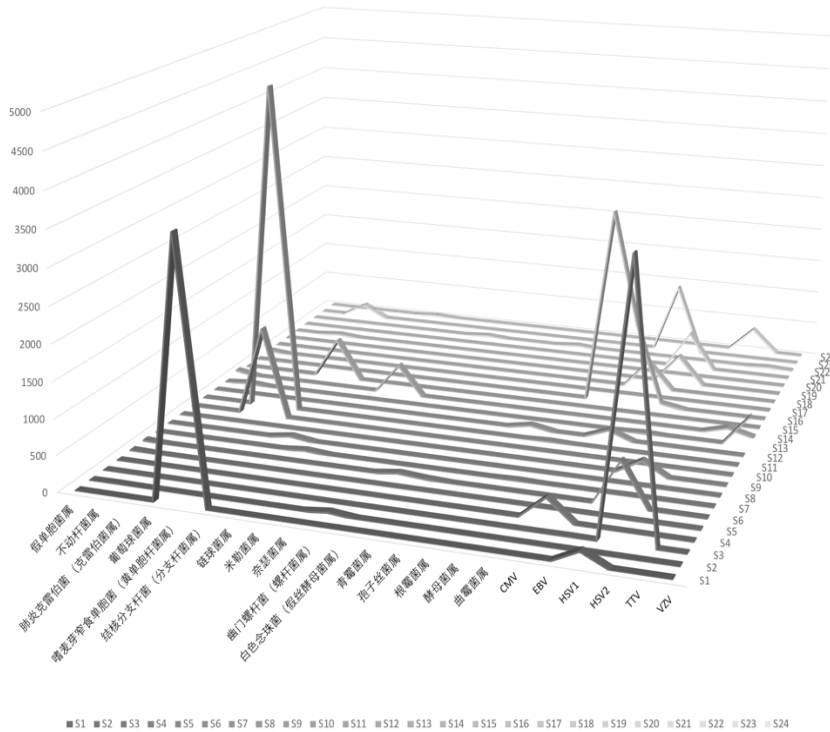
### 二、病原体测序

41例患者的测序结果中, 微生物病原体阳性患者24例(占58.5%); 其中每例患者宏基因组学检出的病原微生物信息如图1所示; 各类病原体检出病例占比如图2所示, 其中病毒与细菌感染阳性病例比例显著高于真菌感染者。

1. 患者细菌感染谱特征：检出细菌种类频数分布见表1（因不同微生物所获取的片段数差异，部分具有高片段的阳性微生物可比对确定至种，而相对测序丰度低的细菌通过比对仅能确定至属）。患者感染菌种的分布比例：假单胞菌比例最高，占16.67%（4/24），其次为不动杆菌（8.33%、2/24）、肺炎克雷伯菌（8.33%、2/24）、葡萄球菌（8.33%、2/24）和嗜麦芽窄食单胞菌（8.33%、

2/24）；而奈瑟菌属、米勒菌属、幽门螺杆菌和结核分枝杆菌各检出1例（4.17%）。

2. 真菌感染谱特征：潜在真菌感染频率分布可见表2；较细菌感染，真菌感染种类较为分散，白色念珠菌、青霉菌、肺孢子菌和根霉菌各检出1例（占0.04%），无明显聚集性；病原体相对丰度方面，大部分阳性患者（5/6、83.33%）真菌检测序列片段数偏少（< 100），仅1例检出高负荷真



注：S1 ~ S24 代表样本编号，垂直轴代表片段数  
 图1 阳性样本宏基因组病原微生物种属分布及丰度信息图

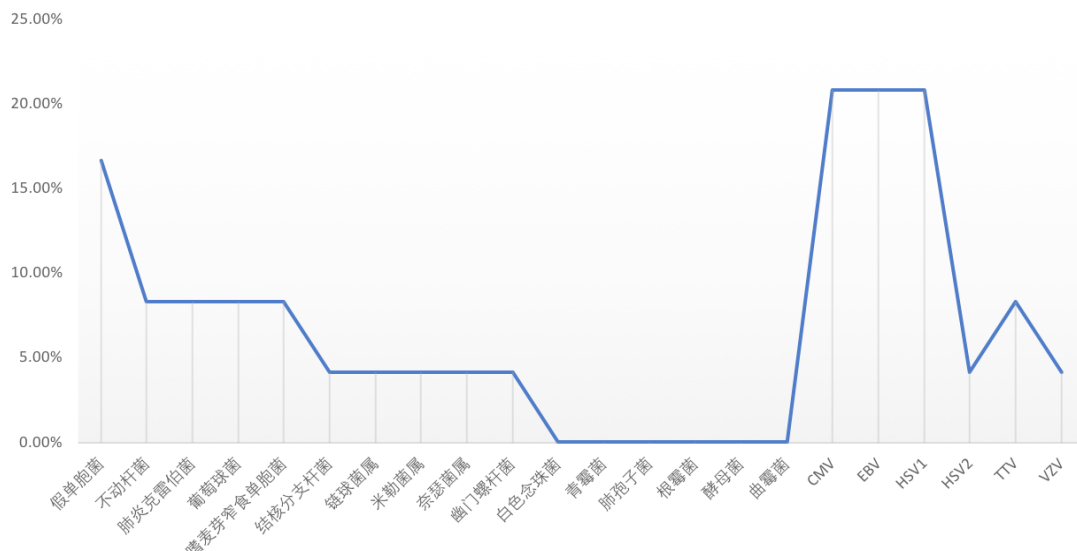


图2 血液病感染者各类检出病原体比例

菌感染(曲霉菌序列片段数为2 836);

3. 病毒感染谱特征: 受限于患者送检标本为DNA, 病毒筛查谱限于已知的常见DNA病毒; 测序结果显示(表3), 在24例阳性患者中, CMV、EBV、HSV1为检出率最高的病毒(占比均为20.83%), 相比于真菌, 病毒种类存在一定聚集性, 其相对负荷亦较高(平均片段数 > 200); 而HSV2、TTV检出率相对较低(占4.17%和8.33%), 见表3。

4. 混合性感染特征: 针对混合感染者, 共检出6例患者具有2种或以上的病原体感染, 其中以细菌病毒混合感染比例最高(16.67%), 而细菌+真菌+病毒混合感染及细菌+真菌混合感染的比例较低(4.17%), 见表4。

5. 与传统微生物培养结果比较: ①检测结果: 仅6例患者的病原学培养检测呈阳性: 其中血培养阳性3例(嗜麦芽窄食单胞菌, 铜绿假单胞菌, 肺

表4 24例测序阳性患者混合感染类型

混合感染类型	例数
细菌+真菌+病毒	1 (4.17)
细菌+病毒	4 (16.67)
细菌+真菌	1 (4.17)
真菌+病毒	0 (0.00)

炎克雷伯杆菌各1例); 肺泡灌洗液培养阳性2例(结核分枝杆菌、肺孢子菌各1例); 组织培养阳性1例(金黄色葡萄球菌1例), 而同时期测序检测结果提示, 共5例患者均可到一致的病原体DNA序列片段数(一致性达83.3%)。②检测耗时: 6例患者的培养法检测结果所需时间为3~7 d, 而测序法所需时间仅为2 d, 后者更具有时效优势; ③检出菌种: 6例患者通过培养法检出的均为单一致病微生物, 而同时期测序法检测结果共有4例检出混合性感染(细菌+病毒3例, 细菌+真菌+病毒1例), 提示测序法具有更强的检出效能。

表1 24例测序阳性患者细菌种类分布

菌属(种)	平均序列片段数	阳性例数(%)
假单胞菌	24.5	4 (16.67)
不动杆菌	16	2 (8.33)
克雷伯杆菌	110	2 (8.33)
葡萄球菌	2 993	2 (8.33)
嗜麦芽窄食单胞菌(黄单胞杆菌属)	2 089	2 (8.33)
结核分枝杆菌(分枝杆菌属)	52	1 (4.17)
链球菌属	30	1 (4.17)
米勒菌属	441	1 (4.17)
奈瑟菌属	27	1 (4.17)
幽门螺杆菌(螺杆菌属)	38	1 (4.17)

表2 24例测序阳性患者真菌种类分布

菌属(种)	平均序列片段数	阳性例数(%)
白色念珠菌(假丝酵母菌属)	47	1 (0.04)
青霉菌属	17	1 (0.04)
肺孢子菌(孢子菌属)	30	1 (0.04)
根霉菌(根霉菌属)	66	1 (0.04)
曲霉菌(曲霉菌属)	2836	1 (0.04)

表3 24例测序阳性患者病毒种类分布

病毒类型	平均序列片段数	阳性例数(%)
CMV	615.2	5 (20.83)
EBV	369.6	5 (20.83)
HSV1	204.4	5 (20.83)
HSV2	3 662	1 (4.17)
TTV	59.5	2 (8.33)
VZV	437	1 (4.17)

## 讨 论

目前研究普遍认为, 恶性血液病患者原发病和化疗药物对免疫系统的打击所造成的粒细胞、淋巴细胞缺乏及免疫功能缺陷是发生院内感染的重要因素<sup>[13-14]</sup>。首先, 既往文献表明, 对此类患者的细菌感染谱而言, 其细菌感染部位多发于呼吸道, 感染的病原体以革兰阴性杆菌多见<sup>[15-16]</sup>。本研究中测序阳性患者的细菌谱分布与前述结论一致; 其次, 从真菌感染谱来看, 较细菌性感染, 血液病患者因接受过高强度的化疗, 导致其存在严重的机体免疫功能抑制, 因此存在更高的机会性真菌感染, 但症状易被忽视, 且侵袭性真菌感染的部位也更为多变, 加之真菌培养鉴定难度较大, 因而难以确诊<sup>[17]</sup>。而高通量宏基因组测序技术为真菌感染诊断新的技术手段<sup>[18]</sup>。本研究中真菌感染谱无明显聚集性, 亦提示此类患者为真菌机会性感染。第三, 针对血液病患者的病毒性感染, 以往研究指出, 血液病患者特殊的免疫状态易导致潜伏状态的病毒再激活引发活动性感染甚至致死性损伤<sup>[19-20]</sup>, 而就病毒类型而言, EBV、CMV、HSV和VZV较为常见感染类型<sup>[21]</sup>。本研究中阳性患者的病毒谱分布与以上结论一致。

此外, 本研究提示部分患者呈现复杂的混合型感染, 尤其以细菌及病毒的混合型感染更为多

见,与既往报道类似<sup>[22-23]</sup>,给临床诊断及治疗带来了新的挑战。本研究结果提示,测序结果提示混合型感染的患者,因其自身免疫功能严重紊乱,进而可能发生更为严重的感染,故更容易获得阳性的病原体培养结果;而另一方面,因多重微生物存在培养物共存、相互竞争和相互抑制的状态,临床应用抗菌药物造成的影响,以及真菌及病毒类微生物培养相对困难,混合型感染的患者应用传统微生物培养法可能无法较好获取患者感染谱全貌以供临床医生全面的评估感染病情。因此,高通量宏基因组学将为感染性疾病的诊断带来新的突破口。进一步探究多重病原体在血液病患者感染性疾病发生发展过程中的特征与致病机制,将为进一步改善抗感染治疗,提高此类患者的整体预后具有重要的作用。

本研究通过对比传统微生物培养结果,证实高通量宏基因组测序技术不仅具有较好的一致性,在敏感性上更具有显著优势;但受限于本研究样本量较少,需扩大样本将进一步证实宏基因组测序法的可靠性。未来利用高通量宏基因组测序技术深入研究病原体耐药相关基因的突变谱,追踪耐药性质粒在病原体间的传播与扩增特点,将为院内多重耐药菌感染的困局提供新的突破口<sup>[24-26]</sup>。但因高通量宏基因组测序技术高度的敏感性,临床样本采集及实验室测序诸多环节中均存在潜在的污染可能,其所造成的假阳性是影响宏基因组准确性不可忽略的重要一环,只有充分重视样本采集程序的严格无菌化操作,以及实验室质控和对照,保持各中心实验室操作流程的一致化,才能使此项技术进一步在临床工作中发挥应有的作用。

### 参 考 文 献

[1] 金玲,张永红.粒细胞减少伴发热患者的抗感染治疗[J].临床药物治疗杂志,2011,9(1):12-15.  
 [2] 张荣莉,韩明哲.中性粒细胞缺乏伴发热血液病患者感染治疗指南解读[J].中国循证医学杂志,2015,15(7):764-766.  
 [3] 金美花.侵袭性真菌感染诊断的三种方法研究[J].中国民康医学,2014,26(11):23-25.  
 [4] 冯国栋,贺曼,汪昕,等.二代测序技术在诊断神经系统感染性疾病中的应用[J].诊断学理论与实践,2018,17(4):391-395.  
 [5] Perlejewski K, Popiel M, Laskus T, et al. Next-generation sequencing (NGS) in the identification of encephalitis-causing viruses: Unexpected detection of human herpesvirus 1 while searching for

RNA pathogens[J]. J Virol Method,2015,226(1):1-6.  
 [6] 黄晶晶,肖盟,徐英春,等.二代测序技术在微生物和感染性疾病中的应用[J].协和医学杂志,2018,9(5):448-452.  
 [7] Saeb AT, Abouelhoda M, Selvaraju M, et al. The use of next-generation sequencing in the identification of a fastidious pathogen:a lesson from a clinical setup[J]. Evol Bioinform Online, 2017,12:1176934316686072.  
 [8] 郭纯,钟礼立,易红玲,等.荧光免疫层析技术在儿童甲型流感诊断中的临床价值[J].中国当代儿科杂志,2016,18(12):1272-1276.  
 [9] Paniz MA, Talharl C, Sander H, et al. Lobomycosis:an emerging disease in humans and del-phinidae[J]. Mycoses,2012,55(4):298-309.  
 [10] Capobianchi MR, Giombini E, Rozera G, et al. Next-generation sequencing technology in clinical virology[J]. Clin Microbiol Infect,2013,19(1):15-22.  
 [11] Fukui Y, Aoki K, Okuma S, et al. Metagenomic analysis for detecting pathogens in culture-negative infective endocarditis[J]. J Infect Chemother,2015,21(12):882-884.  
 [12] 程军,胡欢,张思明,等.二代测序在检测感染性心内膜炎患者心脏瓣膜组织病原体中的应用[J].中国感染控制杂志,2019,18(4):277-282.  
 [13] Kharfan-Dabaja MA, Wierda WG, Cooper LJ, et al. Immunotherapy for chronic lymphocytic leukemia in the era of BTK inhibitors[J]. Leukemia,2014,28(3):507-517.  
 [14] 马闪珊,赵硕,孙冬梅,等.恶性血液病患者侵袭性真菌感染的影响因素及感染前后肠道菌群结构变化分析[J].中华医院感染学杂志,2017,27(5):1039-1042.  
 [15] 王伏田,吴铭,徐肇明,等.恶性血液病医院感染的分析[J].实用医学杂志,2003,19(2):180-181.  
 [16] 贾立伟.恶性血液病患者合并血流感染的临床和病原学特征[J].临床医药文献电子杂志,2018,5(69):17.  
 [17] 李旭玲.恶性血液病侵袭性真菌感染的研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2018,18(59):34-35.  
 [18] 杨娉娉,韩秀蕊,胡淑玲,等.恶性血液病患者侵袭性真菌感染分子生物学诊断研究[J].陕西医学杂志,2016,45(7):792-793, 798.  
 [19] 徐爽,吕晓丽,邹菊贤,等.8种血液病患者人巨细胞病毒感染情况分析[J].国际检验医学杂志,2016,37(20):2915-2917.  
 [20] 边红放,华川,王晓,等.疱疹病毒感染与血液病的相关性分析[J].实用医技杂志,2007(14):1954-1955.  
 [21] 金欣,陈建魁,于农,等.荧光定量聚合酶链反应监测造血干细胞移植后巨细胞病毒感染[J].中国卫生检验杂志,2010,20(6):1431-1432.  
 [22] 李志芳,代桂芝,夏雯虹,等.儿科血液病房医院感染的分析及预防[J].中华医院感染学杂志,2013,23(10):2380-2381, 2384.  
 [23] 代小英,陈昭斌.医院感染病原体研究进展[J].中国消毒学杂志,2018,35(5):379-383.  
 [24] 季美华,王翔.血液病并发感染的病原学及耐药性分析[J].标记免疫分析与临床,2017,24(10):1094-1097.  
 [25] 王秀凤,陈祎霏,尹秀云,等.血液病患者鲍曼不动杆菌的耐药性分析及其耐药基因检测[J].国际检验医学杂志,2013,34(18):2364-2366.  
 [26] 谷美,刘慧敏,孟璐,等.全基因组测序技术在细菌耐药性检测中的研究进展[J].中国乳品工业,2019,47(5):26-31.

(收稿日期: 2019-07-02)

(本文编辑: 孙荣华)

杨理,顾佳,龙筱露,等.利用高通量宏基因组测序技术检测血液病患者感染性病原体的横断面研究[J/CD].中华实验和临床感染病杂志(电子版),2020,14(2):99-103.