

# 高通量测序技术在分枝杆菌病诊断中的应用 专家共识

高通量测序共识专家组

通信作者:初乃惠,首都医科大学附属北京胸科医院结核科,北京 101149, Email: dongchu1994@sina.com; 黄海荣,首都医科大学附属北京胸科医院参比实验室,北京 101149, Email: huanghairong@tb123.org

**【摘要】** 高通量测序技术在分枝杆菌病领域中的应用日益普及,而在实际应用过程中,临床医师对技术本身及如何合理应用检测结果仍存在很多疑问。本共识针对高通量测序技术临床应用中存在的突出问题,依据公开发表的研究数据和参与专家的应用经验,经众多专家讨论形成,为在分枝杆菌病诊断过程中合理使用高通量测序技术提供参考。

**【关键词】** 高通量测序; 分枝杆菌; 诊断

DOI:10.3760/ema.j.cn311365-20221203-00492

中图分类号: R516

## Expert consensus on the application of high-throughput sequencing technology in the diagnosis of mycobacterial diseases

Expert Group on Consensus for High-throughput Sequencing

Corresponding authors: Chu Naihui, Tuberculosis Department, Beijing Chest Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 101149, China, Email: dongchu1994@sina.com; Huang Hairong, Reference Department, Beijing Chest Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 101149, China, Email: huanghairong@tb123.org

高通量测序 (high-throughput sequencing) 技术在感染性疾病病原学诊断及常见病原微生物的耐药诊断中优势明显,在分枝杆菌病领域也得到越来越广泛的应用,为疑难分枝杆菌病的诊断、鉴别诊断和耐药诊断提供了循证医学证据。然而在实际应用过程中,临床医师对于如何解读高通量测序结果、如何从大量数据中捕获有价值的信息、如何在诸多干扰因素存在的条件下做出正确的判断,均存在困惑。鉴于此,高通量测序共识专家组针对高通量测序技术临床使用过程中存在的突出问题,参考已发表的相关研究数据,并结合参与专家的临床使用经验形成成本共识,以期提高该技术的临床应用水平,去伪存真,使这项先进的检验技术得到科学合理的应用。

### 一、高通量测序技术概况

高通量测序技术泛指二代测序 (next-generation sequencing) 技术和第三代测序技术 (third-generation sequencing technique), 其也被统称为新一代测序技术。目前已有多种高通量测序方法用于临床感染性疾病的病原微生物鉴定,尤其是当缺乏诊断线索时,其对鉴定病原微生物具有显著优势。依据检测策略

的不同,高通量测序方法主要分为靶向测序 (targeted sequencing)、宏基因组学测序 (metagenomics next generation sequencing, mNGS) 和全基因组测序 (whole genome sequencing, WGS)<sup>[1-11]</sup>。分枝杆菌靶向测序技术是先通过靶向捕获分枝杆菌特异基因后再进行高通量测序,主要适用于临床怀疑分枝杆菌感染的患者,既有助于诊断结核病/非结核分枝杆菌 (nontuberculous mycobacteria, NTM) 病,又可以检测耐药基因突变,从而精准指导临床医师用药。2018 年 WHO 发布的《应用高通量测序技术检测耐药结核病相关基因突变的技术指导原则》重点关注了靶向测序技术用于结核病耐药诊断的功能<sup>[12]</sup>。mNGS 技术则是直接对标本中所有的核酸进行无偏倚检测和序列分析<sup>[13]</sup>, 包含但不限于分枝杆菌核酸的检测,同时囊括了其他病原体 and 大量人源宿主细胞的核酸检测,适用于临床线索未明确提示分枝杆菌感染可能,或分枝杆菌与其他病原体混合感染的患者。相比分枝杆菌靶向测序, mNGS 可检测出种类繁多的微生物,但无法实现对结核分枝杆菌耐药基因的全面检测。mNGS 检测获得的常规数据量中特定微

生物的序列数一般不足样本总序列数的 5%, 特异性序列覆盖度通常不到特定微生物基因组的 1%<sup>[14]</sup>, 因此几乎不可能用于特定微生物的耐药基因突变分析。WGS 则一般应用于流行病学调查、耐药菌株进化研究等<sup>[15-19]</sup>, 在临床的直接应用较少。

## 二、高通量测序技术的特点

二代测序技术近年来发展迅猛, 具有通量高、速度快的优点, 但存在读长较短, 不利于后续生物信息学分析的缺点, 且 PCR 扩增过程中 DNA 序列碱基的鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)偏好性也会影响检测的准确性<sup>[20]</sup>。另外, 二代测序仪需配置较高的硬件设备和计算资源, 且操作相对复杂<sup>[21]</sup>。上述缺点制约了二代测序技术的推广应用, 也推动了第三代测序技术的发展。

第三代测序技术也被称为单分子测序技术, 可实现对 DNA/RNA 分子直接测序, 且读长较长, 一般为几十甚至上百 kb(千碱基序列数), 测序通量高, 数据可实时读取分析, 速度更快, 在临床的应用也越来越多<sup>[22]</sup>。与二代测序相比, 第三代测序技术的使用更加方便、灵活。便携式的第三代纳米孔测序仪对基础设施要求低, 便于在高山、丛林、北极等自然环境下工作<sup>[23-25]</sup>; 单芯片的通量适用于 1~2 个标本, 可随时开机测序<sup>[26]</sup>。研究表明, 第三代纳米孔测序在结核病诊断和耐药结核病诊断方面具有良好的应用前景<sup>[27]</sup>。Goig 等<sup>[28]</sup>对比 Illumina 平台和 MinION 测序平台快速检测结核分枝杆菌耐药基因的能力, 发现基于纳米孔测序仪的靶向测序方法和 Illumina 平台的 WGS 方法对结核分枝杆菌耐药突变检测结果的一致性达到了 100%。Tafess 等<sup>[29]</sup>分别使用二代测序 Miseq 和第三代纳米孔测序仪 MinION 对 19 个与结核分枝杆菌耐药相关的基因进行靶向测序分析, 二代测序和纳米孔测序的灵敏度和特异度均为 94.8% 和 98.0%。Yu 等<sup>[27]</sup>对比研究了分子诊断技术 GeneXpert MTB/RIF 与第三代纳米孔测序技术对结核病诊断的应用价值, 结果显示纳米孔测序的阳性检出率明显高于 GeneXpert(分别为 94.8% 和 62.9%)。

大量研究数据表明二代测序技术和第三代测序技术各有所长: 二代测序读长短但准确度高; 第三代测序读长长但单碱基准确性稍差<sup>[20, 22, 24-25]</sup>。临床应用过程中应依据检测的主要目的选择适宜的测序技术。对于不同的测序方法, 在检测报告中都应标注样本测序获得的数据量、测序质量、平均读长、测序深度、基因覆盖度等技术指标, 便于报告评阅人了解检测的质量, 并由此评估报告结果的可靠性。

三、开展高通量测序检测的临床适应证和送检时机

### (一) 应用高通量测序检测分枝杆菌的适应证

靶向测序适用于病原学阴性的疑似肺结核、肺外结核、NTM 病的诊断及鉴别诊断, 也适用于菌量丰富的临床标本或菌株的耐药基因突变检测, 或用于分枝杆菌耐药的诊断。

mNGS 适用于病原学阴性的疑似肺结核、肺外结核、NTM 病及其他病原体感染的诊断及鉴别诊断。

### (二) 高通量测序检测分枝杆菌病的适宜送检人群及时机

#### 1. 靶向测序检测的适宜送检人群及时机

① 疑似肺结核患者, 具有典型的肺部影像学改变伴有或不伴有结核病中毒症状, 常规的痰标本抗酸杆菌涂片、培养和 GeneXpert 等分子生物学检查均报告阴性结果时, 或是有些患者增加了支气管肺泡灌洗液检查后仍不能确诊时。

② 疑似结核性胸膜炎患者, 具有典型的结核性胸膜炎的临床表现且胸腔积液为渗出液, 未找到其他引起胸腔积液的原因, 常规的抗酸杆菌涂片、培养和 GeneXpert 等分子生物学检查均报告阴性结果时。鉴于胸腔积液常规结核分枝杆菌检查阳性率低, 可考虑尽早送检。

③ 疑似肺外结核患者如结核性脑膜炎、淋巴结结核、骨关节结核、结核性心包炎、肾结核、肠结核等, 肺外结核诊断较困难, 对应的临床标本中的分枝杆菌含量较低, 常规检测灵敏度低, 建议及早送检。

④ 复治结核患者, 经过正规抗结核治疗但效果不理想, 且常规的抗酸杆菌涂片、培养和 GeneXpert 等分子生物学检查均报告阴性结果, 建议送检以明确耐药情况。

⑤ 疑似 NTM 病的患者, 即多次培养及分子检测结果阴性者, 尤其是同期抗酸杆菌涂片检查阳性的患者, 建议送检。

⑥ 考虑为多种药物耐药的结核病或 NTM 病患者, 建议及时送检以进一步获取多种药物的耐药证据, 此时推荐送检菌量丰富的临床标本或菌株。

#### 2. mNGS 检测的适宜送检人群及时机

① 疑似肺结核、结核性胸膜炎患者, 常规的抗酸杆菌涂片、培养和 GeneXpert 等分子生物学检查均报告阴性结果, 但仍需考虑与其他感染性疾病相鉴别的患者, 建议送检。

② 脑脊液常规检查及生物化学检查符合结核性脑膜炎的特点, 脑脊液常规的抗酸杆菌涂片、培

养、GeneXpert 等分子生物学检查均报告阴性结果时,且患者无法排除其他感染,建议尽早送检。

③ 淋巴结、肺组织、肠黏膜组织等新鲜组织标本病理检查发现肉芽肿性病理改变但未查到结核相关证据,仍需考虑与其他疾病鉴别时,建议送检组织标本。

### (三) 不建议送检高通量测序的情形

1. 临床上已经有明确病原诊断及耐药诊断的患者,不建议送检。

2. 临床症状和体征提示结核病可能,尚未开展常规结核病细菌学检查的患者,急症或常规结核病细菌学检查阳性发现率极低的情况除外。

3. 高通量测序结果不可作为疗效评价指标。

### 四、标本的采集、检测、报告及实验室质量控制

临床标本的质量直接影响检测结果。不同标本类型受定植菌影响的程度不同,由此导致高通量测序结果的可信度存在差异<sup>[13, 30]</sup>。建议建立不同类型临床标本的标准操作程序,减少污染的可能。

#### (一) 知情同意

标本采集前主管医师应向患者或其监护人或者委托人告知拟开展检测项目的目的、意义、优点和局限性(可能出现假阳性或假阴性结果)、费用(包括是否为自费)、预期报告时间、剩余标本的去向及保存时间、临检标本是否可匿名用于科研项目等,并告知高通量测序以外的其他可选检验项目,以获得知情同意。在整个流程中,要注意保护患者的个人隐私。

#### (二) 标本采集

针对分枝杆菌患者感染部位的不同,采集的标本类型主要包括痰液、诱导痰、支气管肺泡灌洗液、胸腔积液、脑脊液、心包积液、胃液、尿液、活检新鲜组织、骨髓、粪便、脓液、血液、拭子等,这些标本均可用于高通量测序技术检测,但检测结果的可信度依赖于标本中分枝杆菌的核酸质量和含量,而结果解读还需要考虑标本被污染的可能及定植菌存在的可能。

##### 1. 标本采集的一般注意事项<sup>[13, 30-32]</sup>

① 采集标本应尽量选择感染部位的体液或者新鲜组织送检,以提高检测的灵敏度。

② 应尽量在抗菌药物使用之前采集标本。

③ 不同类型的标本采集时需执行无菌操作,避免标本被污染。

④ 采样容器需明确标注样本类型及采集部位,并具有患者唯一识别信息,通常可包括检测编码、受检者的姓名、送检科室和住院号等信息。

⑤ 送检申请表需填写完整的受检者信息,包括

标本唯一性编码、采样日期、采样时间、患者个人基本信息、标本组织类型、采样单位和临床资料等。

⑥ 医护人员在样本采集、运输和检测过程中需仔细核对患者信息。

##### 2. 不同类型临床标本采集的注意事项<sup>[13, 30-32]</sup>

① 痰液:需留取至少 3~5 mL 置于无菌螺旋管中。患者留取标本前应用 0.9% NaCl 溶液漱口 2~3 次,之后用力咳出深部脓性痰。若患者无法自行咳痰,可通过吸痰器从气道采集,也可通过高渗盐水雾化吸入等诱导方式获得深部痰。

② 支气管肺泡灌洗液:需留取至少 10 mL 置于无菌螺旋管中。收集灌洗液时,弃去前段可能污染的部分,回收第 2 管及以后的标本。

③ 脑脊液:需留取至少 2 mL 置于无菌螺旋管中。弃去前段可能污染的部分,留取第 2 管及以后的标本。

④ 其他体液:胸腔积液、腹水需留取至少 25 mL;关节积液需留取至少 2 mL;脓肿抽液需留取至少 4 mL,中后段尿液需至少 10 mL。对于较容易留取的胸腔积液、腹水、尿液标本,建议多次留取,取沉渣 10 mL 送检。获取的标本均置于无菌螺旋管中。若为开放性脓肿,需清创后采集深部伤口或溃疡基底分泌物拭子置于无菌管中。若为封闭的脓肿,需对病灶局部的皮肤或黏膜表面彻底消毒,用注射器抽取脓液后留置。所以上述类型标本均应避免经引流管采集。

⑤ 穿刺/手术新鲜组织:手术需留取体积至少为 5 mm<sup>3</sup> 的组织标本(约黄豆粒大小),穿刺组织最少 2 条,均需置于组织采样管中。

⑥ 粪便:需留取黄豆粒大小的新鲜粪便或者稀便至少 3~5 mL,置于无菌螺旋管中。因粪便样本中病原菌众多,不建议做耐药基因检测。

⑦ 血液:需留取至少 10 mL 置于游离 DNA 采血管中。采集前需用消毒液仔细消毒,要求消毒液与皮肤作用一定时间方可采集。一般收集第 2 管标本送检。切忌通过预置的输液管或采血管采集血液标本。

⑧ 拭子:需至少采集 2 个拭子,置于组织采样管中送检。

⑨ 骨髓:需至少采集 0.5 mL,置于游离 DNA 采血管中送检。

#### (三) 标本保存和运输

标本采集后,应尽快送检,建议用冰袋低温运输。若运输时间在 24~72 h 内,建议干冰运输<sup>[13, 30-32]</sup>。若无法及时送检,血液标本可置于 4℃

冰箱保存,但最长保存时间不得超过 7 d(游离 DNA 采血管)。其他类型临床标本如不及时送检,可于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存,但最长保存时间不超过 7 d;若需长期保存,应置于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱。应避免标本的反复冻融,一般不得超过 3 次。标本到达实验室应尽快开始检测,若检测不能在 24 h 内开始,建议参照上述方案存储。

运输中应严格按照《中华人民共和国传染病防治法》等相关法规要求包装及转运。若涉及长距离运送,为降低生物安全风险,可考虑在生物安全防护条件下抽提核酸后再送检。

#### (四)高通量测序技术检测的操作流程

1. 样本前处理:分枝杆菌病患者的标本具有潜在的感染性,在样本处理前需进行灭活处理。通常样本前处理主要涉及分装、研磨、破壁、离心、过滤和纯化等步骤,分枝杆菌细胞壁较厚且含有大量脂质,因此需要进行破壁处理<sup>[33]</sup>。目前主要的破壁方式有机械研磨、化学酶处理、超声波破碎等,各实验室应建立标准操作流程。对于痰液这种黏性较高的标本,需要进行液化处理。

2. 核酸的提取:核酸提取的质量是决定高通量测序检测成功的关键,不同的操作实验室都应建立完整的核酸提取流程。首先要对选取的核酸提取试剂盒进行验证,确保核酸提取的效率及完整性,并对每次提取的核酸样本进行定量检测,以确保核酸满足后续实验要求,同时建立合格核酸样本的标准。在提取过程中应严格采取无菌流程,污染防控对标本结果的质量控制至关重要。每批次实验中都应包括内参照、阴性对照品和阳性对照品,以评估每批次样本中是否存在操作或环境带来的污染等异常。

3. 文库构建和基因测序:文库制备实验流程包括 PCR 富集、添加接头、末端修复、连接接头、纯化等流程,文库质量直接影响测序的数据质量。采用不同试剂盒制备文库,流程略有不同。若起始 DNA 含量在 10 ng 以上,可采用普通建库试剂盒;若 DNA 含量在 100 pg 至 10 ng,则采用超微量 DNA 建库试剂盒。制备好的文库可采用 Qubit 荧光染色法检测文库浓度,高质量的 DNA 文库其 A260/A280(A 为吸光度)通常在 1.75~2.00。文库定量后,需要调整核酸浓度,以便提高测序质量。目前,主流测序平台包括二代测序平台和三代测序平台,二代测序的数据量至少为 2 000 万条(20 million,即 20M)高质量序列<sup>[14]</sup>,三代纳米孔的数据量至少为 50 000 条高质量序列。

4. 生物信息学分析:生物信息学分析是对测序

获得的原始序列进行数据分析和处理的过程,以预定程序执行。该流程由多个软件组成,包括去除人源序列、处理微生物序列及相关元数据、检测目标序列,以及特定基因变异,实现检测与数据的转换。WHO 技术指南建议各个实验室建立自己的数据平台,并从公共数据库中收集全球结核病患者数据,以便丰富自己的分枝杆菌和耐药基因数据库,进一步确定耐药基因突变与临床表型耐药性之间的相关性,以便对检测结果进行更好的解读<sup>[12]</sup>。各个实验室在搭建耐药基因变异数据库时应有专业技术人员对每个变异进行人工审核,同时搭建好的流程对已知耐药或敏感的样本或质控品进行模拟和验证。要定期对数据库进行更新和优化。

5. 质量控制:实验室在各个操作环节都应进行严格的质量控制。每批次样本中应设置包括内参照、阴性对照品和阳性对照品。每批次实验均需评估是否存在操作或环境带来的污染风险。

#### (五)出具报告

1. 病原体检测报告需要符合《医疗机构临床实验室管理办法》与《医学检验实验室基本标准和管理规范(试行)》对检测报告的要求,列出患者信息、标本信息、检测方法、检测范围、检测结果、检测机构与报告人信息等内容。检测报告需要有严格的发放和审核流程,以确保报告的及时性、有效性、准确性和完整性。

2. 检测报告建议列出如下参数:测序质量(是否去除低复杂度、低质量序列、Q20、Q30 等)、读长、特异性读长、覆盖度、深度、丰度、阈值、置信度等。特异性序列是指唯一匹配到某种微生物基因组的核苷酸序列,其检出数量会受到微生物基因组大小、测序策略、标本中微生物载量及其核酸提取难易程度、标本中人源核酸比例等因素的影响。报告的微生物应该是符合阳性判断标准(即高于报告阈值)的微生物,具体的阳性判断标准难以统一,可以在确定测序平台、检测流程、数据库和生物信息分析方法后进行设置。

#### 五、临床结果判读

分枝杆菌病的诊断需结合流行病学史、临床表现、影像学 and 实验室检查结果等综合判断。在开始应用高通量测序技术的早期阶段,建议对检测结果与传统病原学检查方法进行对比分析,了解高通量测序结果的可信度。阳性结果解读需要关注:是否是常见的致病菌,临床表现是否与其致病性一致,是否能与其他病原学结果相呼应。阴性结果具有一定排除感染的价值,但还需结合临床进行综合判断。

## (一) 结核病诊断

1. 不同标本类型的诊断价值: 临床所有类型的标本均可开展高通量测序检测, 但不同类型标本由于其自身特点的不同, 由其衍生出的高通量测序数据的诊断价值会存在差异。

① 呼吸道标本: 包括痰标本和支气管肺泡灌洗液, 二者都属于开放性标本, 有发生污染的可能。因此, 从呼吸道标本中通过高通量测序检测鉴定到结核分枝杆菌核酸, 需要通过分析检测到的结核分枝杆菌序列数、测序数据量等判断结果的诊断价值。通过穿刺活检手术获得的新鲜组织标本中发现结核分枝杆菌核酸, 或是支气管镜或肺活检获得的新鲜组织标本病理检查提示分枝杆菌感染的典型肉芽肿性病变, 同时患者的痰标本或支气管肺泡灌洗液中分离到结核分枝杆菌核酸, 上述情况要优先考虑结核病的诊断。

② 非呼吸道标本: 主要是各种体液标本, 如肺外组织、血液、胸腔积液、脑脊液、心包积液和腹水等。体液中分离到分枝杆菌核酸, 具有较好的临床诊断价值, 但即便是无菌体液, 也依然有假阳性的报道。

2. 阳性阈值及判读标准: 建立高通量测序病原体诊断阈值的影响因素较多, 包括测序平台、测序流程、标本类型、病原体种类、患者状况, 目前尚无统一公认的阈值, 建议各实验室根据前期获得的数据建立适合自己实验室的判定阈值, 并在临床工作中不断加以验证。建议参考以下阳性阈值设定原则及结果判读标准设定判定阈值。

① mNGS 阳性阈值设定原则及判读标准: 阳性阈值的确定不依赖某个单一的指标, 包括但不限于特定微生物的检出序列数(也常称为 reads 数)、归一化每百万序列(reads per million, RPM)的比值、检出物种的基因组覆盖度、置信区间等。《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》建议, 对于结核分枝杆菌等具有临床重要意义且较难检测的病原菌, 检出 1 条特异性序列即可判定为阳性<sup>[30]</sup>。鉴于检测的复杂性, 本共识建议对获得个位数的序列需首先审核当前批次检测中是否有其他获得大量序列支持结核病诊断的标本。若无此类标本, 建议对测序所得序列进行置信区间评估, 或行其他方法学进行佐证; 若有此类标本, 还需综合判断是否属于污染, 可进行实时荧光定量 PCR 进行确认。若检测结果为阴性, 具有一定排除感染的依据, 但还需要结合临床综合判断。

② 靶向测序阳性阈值设定原则及判断标准: 由于靶向测序采用的是扩增分枝杆菌多靶点分类基因

的方法, 判断标准不同于 mNGS 检测。特异性序列大于 100 条序列, 且非单一靶点序列, 可推荐作为阳性阈值判定标准; 特异性数据小于 100 条序列, 特别是同批次有获得大量序列数支持结核病诊断的标本时, 需行其他方法学进行佐证, 可进行实时荧光定量 PCR 确认。特异性数据小于 10 条序列时, 尤当慎重判读, 建议考虑另留取一份样本进行检测以佐证本次检测结果。如重复样本获得阳性结果, 无论序列数如何, 都应首先考虑其结核病诊断; 如果复测结果为阴性, 则暂不考虑其结核病诊断。

3. 高通量测序检测结果中不同序列数的诊断意义: 任何标本类型, 如对同一微生物检出的拷贝数数量丰富时(至少几百条序列), 都可能具有重要的临床意义。当开放性标本的序列数比较低, 比如低于 5 条序列时, 需审慎地判定其诊断价值。对于 5 ~ 10 条序列的结果, 如果患者的症状、体征、疾病进程等临床表现也支持结核病的诊断, 可以考虑采纳上述结果。而对于少于 5 条序列的结果, 虽然已发表数据支持这一结果的诊断价值<sup>[12]</sup>, 但考虑到数据量太低有可能造成的误诊, 建议除了要结合临床表现外, 还可以考虑重复送检标本, 或通过开展其他结核病的检测技术, 对这一结果进行复核、确认。如果样本是无菌样本(脑脊液、血液)等, 检出 1 条特异性序列也可以结合临床综合判定为阳性。

## (二) NTM 病诊断

高通量测序对 NTM 病的诊断价值与对结核病的诊断价值有类似之处, 如检测技术的类型、标本的类型及序列数等。但高通量测序检测到 NTM 的核酸又与检测到结核分枝杆菌的核酸存在明显不同的价值, 这种不同主要是因为 NTM 并非像结核分枝杆菌一样属于绝对致病菌。除了海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌外, NTM 都属于机会致病菌, 可在机体中定植而不引起疾病, 因此需要依照指南推荐的判断标准, 仔细辨别其是否是引起感染的病原菌。有些 NTM 菌种在环境中普遍存在, 即便多次以不同的方法检测到, 仍应该审慎地判断其临床相关性。

1. 高通量测序检测结果回报为常见的致病性 NTM 菌种: 临床由 NTM 导致的感染越来越常见。已经报道的 NTM 菌种/亚种已超过 200 种<sup>[34]</sup>, 但能够致病的仅有几十种, 而临床常见的致病性 NTM 的菌种数量仅为个位数。根据来自国内的数据, 临床常分离到的菌种主要包括: 胞内分枝杆菌、鸟分枝杆菌、脓肿分枝杆菌、龟分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、偶发分枝杆菌、蟾蜍分枝杆菌、戈登分枝杆菌等<sup>[34]</sup>。上述分枝杆菌与临床的相关性并不一致。我国常见

的 NTM 菌种中,临床相关性较好的有胞内分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌和脓肿分枝杆菌,其次是鸟分枝杆菌。有些常被分离的菌种如戈登分枝杆菌、偶发分枝杆菌、土地分枝杆菌,在环境中普遍存在,致病概率并不高。高通量测序检测阳性等同于 1 次分子检测阳性,因此需要至少再有 1 份标本的检测鉴定结果为同一菌种时才考虑其临床意义。需要注意的是,不同地区菌种的临床相关性可能存在差异,如我国北方地区与南方地区相比,分离到 NTM 的概率相对较低,但临床相关性却高于南方地区。另外,综合医院分离的 NTM 的临床相关性要弱于结核病专科医院。在就诊时,综合医院常是患者就诊的首选,而患者到专科医院就诊时多经过了综合医院的初筛,所以更可能患有 NTM 病。

2. 高通量测序检测结果回报为罕见的 NTM 菌种:一般而言,关于这些罕见菌种致病的病例报道特别少见,甚至检索不到,且这些罕见菌种也不是环境中常能够分离到的菌种。在目前情况下,比较稳妥的处理原则是不优先考虑这些罕见分枝杆菌菌种为致病菌。只有在 2 次高通量测序鉴定为同一种 NTM 时,在充分考虑鉴定微生物的致病性和序列数,且结合患者的临床表现、治疗反应,以排除法将可能不致病的微生物逐一排除后,才适当考虑这些罕见分枝杆菌菌种致病的可能。同时,需关注患者是否有较严重的免疫性疾病或其他免疫抑制因素,因免疫抑制常对患者发生罕见的 NTM 感染有促进作用。

### (三)分枝杆菌病的耐药诊断

1. 高通量测序技术对耐药分枝杆菌病的诊断价值:mNGS 技术通常无法获得足够的结核分枝杆菌/NTM 的核酸序列信息,因此不用于分枝杆菌耐药的诊断。即便获得数据中包括了耐药基因的数据,但由于数据量偏低,考虑到患者体内菌群可能存在异质性的问题,所以少量数据可能无法准确反映患者体内菌群的真实组成情况,因此对上述数据不适于采纳。

靶向测序通过特定的捕获技术对标本中结核分枝杆菌/NTM 核酸及耐药基因进行富集,以提高核酸浓度,获得更多的数据信息。当临床标本中菌含量丰富时,能捕获到数量较多的不同耐药基因的序列,从而进行耐药的分子诊断。当样本中菌量较少时,捕获到的不同耐药基因的序列数可能会较少,此时虽然可以依据序列信息判定细菌是否耐药,但结果的可靠性大幅降低。此外,即便是同一标本,检测到的不同耐药基因的序列数量差异也可能非常显

著,对于检测到序列数量偏低的耐药基因,其结果判定的可信性大幅降低。当使用菌株作为检测标本时,可以方便地获得所关注的目的基因,通过高通量测序反应,获得多个耐药基因的序列信息。

### 2. 不同标本类型的诊断价值

① 临床标本:由于通常开展高通量测序检测的临床标本中,细菌含量比较低,所以难以应用临床标本直接开展耐药基因的检测。即便是靶向富集技术,能够对标本中的分枝杆菌核酸进行种属特异性的富集,也无法保证一定能够富集到目标靶基因。因此,仅建议对已知菌量丰富的临床标本开展基于靶向测序的耐药基因检测,但要对所获得结果的可靠性进行评估。

② 菌株:应用菌株直接开展靶向测序或 WGS 分析,不存在核酸靶量不足的问题,但由于测序技术可检测出菌群中含量很低的菌株,所以有可能会获得大量低频度突变,这些突变有可能并不会引起耐药。因此,根据临床价值的可靠程度设定阈值是准确判断结果的关键。目前多以发生突变的基因频度超过获取的全部对应基因序列的 70%~80% 作为判定标准,超过这个阈值可以明确判定存在耐药基因的突变,对于低于此阈值的突变,判定菌群中存在明显的异质性耐药。异质性耐药往往是耐药发生的早期阶段,患者有很大可能后续发展为真正的耐药,因此对于未达到明确耐药诊断标准的患者,也不建议继续使用相应药物。

3. 耐药基因阳性阈值及判断标准:目前针对临床标本靶向测序检测分枝杆菌耐药的判定缺乏统一的标准。在判读时,应参考突变发生位点、测序深度及突变频率综合判断。对于同义突变,报告中应当体现。同时对于数据库未收录的罕见突变,包括点突变、插入、缺失等,需进行功能蛋白结构预测,并结合临床治疗方式及预后对结核分枝杆菌的耐药性进行综合判断。

### 六、结语

目前高通量测序技术对分枝杆菌病诊断价值的相关文献相对较少,本共识中的观点还有待在未来不断完善。随着高通量测序技术的持续优化、临床应用经验的不断积累和临床数据的快速增加,对高通量测序技术用于菌阴肺结核、肺外结核和 NTM 病的诊断及耐药诊断价值的认知会逐渐深入。希望本共识能够在现阶段帮助临床医师科学、合理地应用高通量测序技术诊断分枝杆菌病。

执笔:初乃惠(首都医科大学附属北京胸科医院结核科)、黄海荣(首

都医科大学附属北京胸科医院参比实验室)、聂文娟(首都医科大学附属北京胸科医院结核科)

**专家委员会成员(按姓氏笔画排序):**王华(安徽省胸科医院结核科)、王泉(新疆医科大学第八附属医院检验科)、王静(重庆市公共卫生医疗救治中心医学检验科)、王云飞(浙江大学管理学院)、王玉清(青海省第四人民医院呼吸科)、王利花(太原市第四人民医院结核呼吸科)、代小伟(北京市结核病控制研究所实验室)、刘玉峰(青岛市胸科医院结核病科)、刘爱梅(广西壮族自治区胸科医院结核病科)、许佩松(安徽大学生命科学学院)、阮祥林(河南省胸科医院结核内科)、孙晓柯(河南省胸科医院结核内科)、孙德斌(沈阳市胸科医院结核科)、苏菲菲(温州市中心医院感染科)、杜鹃(武汉市肺科医院结核病区)、李卫民(首都医科大学附属北京胸科医院参比实验室)、李传友(北京市结核病控制研究所实验室)、李佩波(重庆市公共卫生医疗救治中心医务科)、杨伏萍(重庆市公共卫生医疗救治中心结核科)、杨国立(吉林省结核病医院内科)、吴桂辉(成都市公共卫生临床医疗中心结核科)、吴雪琼(解放军总医院第八医学中心结核病研究所结核病医学部)、邱超(佳木斯市传染病院结核中心)、初乃惠(首都医科大学附属北京胸科医院结核科)、张侠(南京市第二医院结核科)、张文宏(复旦大学附属华山医院感染病科)、张齐龙(江西省胸科医院内科)、陈晓红(福建省福州肺科医院结核科)、陈雪融(四川大学华西医院呼吸科)、武俊平(天津市海河医院呼吸科)、金龙(黑龙江省传染病防治院耐药病区)、聂文娟(首都医科大学附属北京胸科医院结核科)、黄海荣(首都医科大学附属北京胸科医院参比实验室)、黄朝林(武汉市金银潭医院胸外科)、曹文利(北京老年医院感染疾病科)、梁建琴(解放军总医院第八医学中心结核病研究所结核科)、梁瑞霞(河南省胸科医院结核内科)、董雅坤(河北省胸科医院结核科)、程洁(安徽省胸科医院结核科)、曾谊(南京市第二医院结核科)、谢周华(南宁市第四人民医院结核病区)、路希维(大连市公共卫生临床中心结核科)、蔡青山(杭州市红十字会医院结核科)、裴异(长沙市肺科医院肺科)、漆运(西安市胸科医院感染科)

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参 考 文 献

- [1] Rutanga JP, Van Puyvelde S, Heroes AS, et al. 16S metagenomics for diagnosis of bloodstream infections: opportunities and pitfalls[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2018, 18(8): 749-759. DOI: 10.1080/14737159.2018.1498786.
- [2] Tenover FC. Developing molecular amplification methods for rapid diagnosis of respiratory tract infections caused by bacterial pathogens[J]. *Clin Infect Dis*, 2011, 52(Suppl 4): S338-S345. DOI: 10.1093/cid/cir049.
- [3] Tessler M, Neumann JS, Afshinnekoo E, et al. Large-scale differences in microbial biodiversity discovery between 16S amplicon and shotgun sequencing[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 6589. DOI: 10.1038/s41598-017-06665-3.
- [4] Schlager R. Microbiome diagnostics[J]. *Clin Chem*, 2020, 66(1): 68-76. DOI: 10.1373/clinchem.2019.303248.
- [5] Liu MF, Liu Y, Xu DR, et al. mNGS helped diagnose scrub typhus presenting as a urinary tract infection with high D-dimer levels: a case report[J]. *BMC Infect Dis*, 2021, 21(1): 1219. DOI: 10.1186/s12879-021-06889-9.
- [6] Zhu T, Cai QQ, Yu J, et al. Metagenomic next-generation sequencing (mNGS) confirmed a critical case of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2021, 60(2): e42-e45. DOI: 10.1515/cclm-2021-0791.
- [7] Xie Z, Lai J, Ning C, et al. A case of paraplegia due to asymptomatic varicella-zoster virus infection in AIDS patient unexpectedly diagnosed by CSF metagenomic next-generation sequencing[J]. *BMC Infect Dis*, 2021, 21(1): 963. DOI: 10.1186/s12879-021-06611-9.
- [8] 孙雯雯, 顾瑾, 范琳. 宏基因组二代测序对不同类型结核病的诊断价值[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2021, 44(2): 96-100. DOI: 10.3760/cma.j.cn112147-20200316-00343.
- [9] Kaiser-Thom S, Gerber V, Collaud A, et al. Prevalence and WGS-based characteristics of *Staphylococcus aureus* in the nasal mucosa and pastern of horses with equine pastern dermatitis[J]. *BMC Vet Res*, 2022, 18(1): 79. DOI: 10.1186/s12917-021-03053-y.
- [10] Bwire G, Sack DA, Almeida M, et al. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* responsible for cholera epidemics in Uganda by PCR, MLVA and WGS[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2018, 12(6): e0006492. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006492.
- [11] Palittapongarnpim P, Mahasirimongkol S, Tokunaga K. Bacterial WGS and host genomewide SNP analysis of tuberculosis patients in Thailand [J]. *Infekciã i Immunitet*, 2018, 8(4): 576. DOI: 10.15789/2220-7619-2018-4-6.37.
- [12] World Health Organization. The use of next-generation sequencing technologies for the detection of mutations associated with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex: technical guide [R]. Geneva: World Health Organization, 2018.
- [13] 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.
- [14] Food and Drug Administration, HHS. Infectious disease next generation sequencing based diagnostic devices; microbial identification and detection of antimicrobial resistance and virulence markers; draft guidance for industry and food and drug administration staff; extension of comment period [EB/OL]. (2016-08-11) [2022-12-03]. <https://www.federalregister.gov/documents/2016/08/11/2016-19109/infectious-disease-next-generation-sequencing-based-diagnostic-devices-microbial-identification-and-detection-of-antimicrobial-resistance-and-virulence-markers>
- [15] Guo XJ, Takiff HE, Wang J, et al. An office building outbreak: the changing epidemiology of tuberculosis in Shenzhen, China[J]. *Epidemiol Infect*, 2020, 148: e59. DOI: 10.1017/S0950268820000552.
- [16] Yu H, Zhang Y, Chen X, et al. Whole-genome sequencing and epidemiological analysis of a tuberculosis outbreak in a high school of southern China [J]. *Infect Genet Evol*, 2020, 83: 104343. DOI: 10.1016/j.meegid.2020.104343.
- [17] Roetzer A, Diel R, Kohl TA, et al. Whole genome sequencing versus traditional genotyping for investigation of a *Mycobacterium tuberculosis* outbreak: a longitudinal molecular epidemiological study[J]. *PLoS Med*, 2013, 10(2): e1001387. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001387.
- [18] Zeng X, Kwok JS, Yang KY, et al. Whole genome sequencing data of 1 110 *Mycobacterium tuberculosis* isolates identifies insertions and deletions associated with drug resistance[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 365. DOI: 10.1186/s12864-018-4734-6.

- [19] Herranz M, Pole I, Ozere I, et al. *Mycobacterium tuberculosis* acquires limited genetic diversity in prolonged infections, reactivations and transmissions involving multiple hosts[J]. *Front Microbiol*, 2018,8:2661. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02661.
- [20] Schatz MC, Delcher AL, Salzberg SL. Assembly of large genomes using second-generation sequencing[J]. *Genome Res*, 2010, 20(9): 1165-1173. DOI: 10.1101/gr.101360.109.
- [21] Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(10):1135-1145. DOI: 10.1038/nbt1486.
- [22] van Dijk EL, Jaszczyszyn Y, Naquin D, et al. The third revolution in sequencing technology [J]. *Trends Genet*, 2018,34(9):666-681. DOI: 10.1016/j.tig.2018.05.008.
- [23] Shi Y, Tyson GW, Eppley JM, et al. Integrated metatranscriptomic and metagenomic analyses of stratified microbial assemblages in the open ocean[J]. *ISME J*, 2011, 5(6):999-1013. DOI:10.1038/ismej.2010.189.
- [24] Jain M, Fiddes IT, Miga KH, et al. Improved data analysis for the MinION nanopore sequencer[J]. *Nat Methods*, 2015,12(4):351-356. DOI: 10.1038/nmeth.3290.
- [25] Miles BN, Ivanov AP, Wilson KA, et al. Single molecule sensing with solid-state nanopores: novel materials, methods, and applications[J]. *Chem Soc Rev*, 2013,42(1):15-28. DOI: 10.1039/c2cs35286a.
- [26] Karamitros T, Magiorkinis G. Multiplexed targeted sequencing for Oxford Nanopore MinION; a detailed library preparation procedure [J]. *Methods Mol Biol*, 2018,1712:43-51. DOI: 10.1007/978-1-4939-7514-3\_4.
- [27] Yu G, Shen Y, Zhong F, et al. Diagnostic accuracy of nanopore sequencing using respiratory specimens in the diagnosis of pulmonary tuberculosis[J]. *Int J Infect Dis*, 2022,122:237-243. DOI: 10.1016/j.ijid.2022.06.001.
- [28] Goig GA, Torres-Puente M, Mariner-Llicer C, et al. Towards next-generation diagnostics for tuberculosis: identification of novel molecular targets by large-scale comparative genomics [J]. *Bioinformatics*, 2020, 36(4): 985-989. DOI:10.1093/bioinformatics/btz729.
- [29] Tafess K, Ng T, Lao HY, et al. Targeted-sequencing workflows for comprehensive drug resistance profiling of *Mycobacterium tuberculosis* cultures using two commercial sequencing platforms: comparison of analytical and diagnostic performance, turnaround time, and cost[J]. *Clin Chem*, 2020,66(6):809-820. DOI: 10.1093/clinchem/hvaa092.
- [30] 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.
- [31] 《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.
- [32] 中华预防医学会医院感染控制分会. 临床微生物标本采集和送检指南[J]. *中华医院感染学杂志*, 2018,28(20):3192-3200. DOI: 10.11816/cn.ni.2018-183362.
- [33] 文岚, 王孝君, 郭彦昌, 等. 痰中结核分枝杆菌 DNA 提取方法的比较及在 LAMP 检测中的应用[J]. *湖南师范大学学报(医学版)*, 2013(3):61-65.
- [34] 中华医学会结核病学分会, 分枝杆菌菌种中文译名原则专家共识编写组. 分枝杆菌菌种中文译名原则专家共识[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2018,41(7):522-528. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2018.07.003.

(收稿日期:2022-12-03)

(本文编辑:蒋蔚娜)

中华医学会 · 读者 · 作者 · 编者 ·

## 关于中华医学会系列杂志投稿网址的声明

为维护广大读者和作者的权益以及中华医学会系列杂志的声誉,防止非法网站假冒我方网站诱导作者投稿并通过骗取相关费用非法获利,现将中华医学系列杂志稿件管理系统网址公布如下,请广大作者加以甄别。

### 1. “远程稿件管理系统”网址

中华医学会网站(<http://www.cma.org.cn>)首页“在线服务与互动”栏目下的“期刊在线投/审稿”、中华医学会杂志社网站(<http://www.cmaph.org>)首页的“期刊在线投/审稿”,以及各中华医学会系列杂志官方网站接受投稿。作者可随时查阅到稿件处理情况。

### 2. 编辑部信息获取

登录中华传染病杂志网站(<http://www.zherbzz.com>),在首页“关于我们”中可查阅编辑部地址、联系电话等信息。

### 3. 费用支付

中华医学会系列杂志视杂志具体情况,按照有关规定,酌情收取稿件处理费和版面费。稿件处理费作者在投稿时支付;版面费为该稿件通过专家审稿并决定刊用后才收取。

欢迎投稿,并与编辑部联系。

特此声明。