

· 临床研究 ·

宏基因二代测序在肾综合征出血热重症患者中的诊断价值探讨

王海旭¹ 赵颖颖¹ 闫浩² 付明森³ 王彩云⁴ 赵阳超⁵ 贡文晶¹ 时学秀¹ 孙同文¹

¹ 郑州大学第一附属医院综合 ICU, 郑州 450052; ² 郑州大学第一附属医院重症医学规培基地, 永煤集团总医院, 商丘 476600; ³ 郑州大学第一附属医院内科重症基地, 郑州 450052; ⁴ 郑州大学第一附属医院重症医学规培基地, 固始县人民医院, 固始 465200; ; ⁵ 郑州大学第一附属医院体外生命支持中心, 郑州 450052

通信作者: 孙同文, Email: suntongwen@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2023.11.019

【摘要】目的 探讨宏基因二代测序 (metagenomic next-generation sequencing, mNGS) 技术在肾综合征出血热 (Hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS) 重症患者中的诊断价值。**方法** 回顾郑州大学第一附属医院 2020 年 1 月至 2022 年 6 月最终确诊为 HFRS 且完成 mNGS 的重症患者, 收集完善相应的临床资料并进行随访, 以 mNGS 是否检出汉坦病毒为标准将患者分为 mNGS 阳性组和阴性组, 比较这两组从出现症状到送检的时间中位数, 同时评价 mNGS 在不典型症状的 HFRS 重症患者中的检出率。**结果** 共纳入 15 例 HFRS 重症且完成 mNGS 的患者, 其中男性 14 例, 女性 1 例, 年龄中位数为 33 岁 (14~62 岁)。所有 HFRS 患者中有 9 例 mNGS 结果为阳性, 6 例为阴性。mNGS 阳性组从出现症状到送检的中位时间为 8 d (2~12 d), 阴性组为 8 d (4~9 d), 两组差异无统计学意义 ($Z=-0.659$, $P=0.510$)。在 15 例 HFRS 重症患者中不典型症状患者为 6 例, 其 mNGS 结果均为阳性。所有患者均完成电话随访, 随访中位时间为 1 年。其中 3 例死亡, 11 例肾功能恢复正常。**结论** mNGS 技术可辅助诊断肾综合征出血热, 对于诊断不明重症患者早期检测可减少漏诊。对临床考虑肾综合征出血热, mNGS 未检测到汉坦病毒患者, 仍需进一步检查, 以明确诊断。

【关键词】 肾综合征出血热; 汉坦病毒; 宏基因二代测序; 诊断

基金项目: 国家自然科学基金联合基金项目 (U2004110); 国家自然科学基金面上项目 (82172129); 2021 年度河南省青年人才托举工程项目 (2021HYTP053); 加贝酯治疗脓毒症与感染性休克的机制研究 (2019-hx-45)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2023.11.018

肾综合征出血热 (hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS) 又称流行性出血热, 是由汉坦病毒导致、鼠类啮齿动物为主要传染源的自然疫源性传染病。HFRS 分布呈世界性, 在亚洲、欧洲、美洲、非洲等多个国家和地区均有流行, 我国也是 HFRS 高发地区之一, 每年病死率波动于 0.60%~13.97%^[1]。

目前血清特异性抗体、汉坦病毒反转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测是 HFRS 诊断的金标准, 但部分患者的临床表现及检查结果缺乏特异度, 容易漏诊、误诊, 导致诊断困难, 甚至延误治疗, 尤其对于重症患者, 漏诊、误诊后果更严重。近年来关于宏基因组测序用于临床微生物检测的研究逐渐

增多, 且在准确性和时效性方面显示出了一定的优势^[2-3]。然而, 目前 mNGS 技术应用于 HFRS 的研究较缺乏, 基于此, 本文就血 mNGS 技术在 HFRS 重症患者中的诊断价值进行分析和探讨。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本研究为回顾性观察性研究, 以 2020 年 1 月至 2022 年 6 月郑州大学第一附属医院重症医学科收治的 HFRS 为研究对象。本研究经郑州大学第一附属医院科研和临床伦理委员会批准 (伦理审批号: 2022-KY-9043)。

纳入标准: (1) 病案首页诊断为 HFRS 或流行性出血

热；(2)符合《中华人民共和国卫生行业标准 - 流行性出血热诊断标准 (WS278-2008)》^[4] 确诊标准；(3)血液标本进行 mNGS 检测。

排除标准：(1)年龄小于 14 岁；(2)临床资料缺失；(3)未进行 mNGS RNA 检测。

HFRS 确诊标准：①发热，可伴有乏力、恶心、呕吐、腹痛及腹泻等消化道症状；②充血、渗出和出血等毛细血管损害表现：如面、颈和胸部潮红（三红），醉酒貌，头痛、腰痛和眼眶痛（三痛），球结膜充血、水肿、皮肤出血点；③低血压休克；④肾脏损害：尿蛋白、镜下或肉眼血尿、少尿或多尿；⑤典型病程分为发热期、低血压休克期、少尿期、多尿期、恢复期；⑥血常规：发热期外周血白细胞计数增高和血小板减少，出现异型淋巴细胞；血液浓缩或血液稀释；⑦尿常规：尿蛋白阳性，可有肉眼血尿，尿沉渣中可发现巨大的融合细胞；⑧血肌酐、尿素氮升高；⑨流行性出血热 IgM 抗体阳性。具备①②中至少一项加③④⑤⑥⑦⑧中至少一项加⑨即为确诊病例。

HFRS 重症标准：体温 40℃ 以上，有神经系统症状，休克，少尿 5 d 或无尿 2 d 以内。危重型诊断标准为在重症基础上出现以下情况之一：①难治性休克；②重要脏器出血；③无尿 2 d 以上；④其他严重合并症如心力衰竭、肺水肿、呼吸衰竭、昏迷、继发严重感染^[1]。

1.2 临床资料收集

收集并记录患者的临床资料，包括年龄、性别、人口学特征、流行病学特征、临床症状、体征、实验室检查、影像学检查及入重症监护室（intensive care unit, ICU）时的急性生理学及慢性健康状况评分系统（APACHE II）评分等临床特征，诊断及预后情况。

1.3 抗体鉴定

所有患者均进行流行性出血热 IgM、IgG 抗体检测。

1.4 预后评价标准

肾功能正常标准：(1)尿量每日 1 000~2 000 mL；(2)尿常规检查示尿蛋白阴性；(3)血肌酐检查示血肌酐值小于 115 μmol/L。

1.5 宏基因组二代测序

取 300 μL 血浆进行 DNA 和 RNA 核酸提取；总 RNA 采用 Illumina 公司 Ribo-Zero rRNA Removal Kit 试剂盒进行 rRNA 去除，随后采用 Thermo Fisher 公司的逆转录酶和 dNTPs 将提取好的 RNA 逆转录成 cDNA。采用基因组 DNA 片段化试剂盒对总 DNA 及逆转录后的 cDNA 进行建库，同时待测核酸加上测序所需的标签序列；制备好的文库经过纯化、扩增、再纯化后，使用 Qsep1 和 Qubit 分别对文库片段大小和文库浓度进行定量。然后依据预

设的上机数据量取定量文库混合后，使用 Illumina 公司的 Nextseq 550Dx 上机测序（单端 75 bp 测序，测序总序列数为 20 M reads/样本）。

测序数据下机后去除低质量的和长度小于 40 bps 的数据以获得高质量的数据。通过 BWA (BWA: <http://bio-bwa.sourceforge.net/>) 将比对上 GRCH38 的序列去除；剩余的微生物序列与微生物数据库比对，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，并获得种水平特异性序列（SSRN）、属水平相对丰度、鉴定置信度等信息。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件对数据进行统计学分析。使用 Kolmogorov-Smirnova 检验对计量资料进行正态性检验，非正态分布的连续性变量采用中位数（四分位数） $[M(Q_1, Q_3)]$ 表示，采用非参数检验中的 Mann-Whitney *U* 检验比较组间差异；分类变量用频数（*n*）描述，采用卡方检验比较差异。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床资料

最终纳入 15 例 HFRS 患者，均来自中国河南省，男性 14 例，女性 1 例，年龄 14~62 岁，中位数年龄 33 岁。10 例患者明确有鼠类接触史。最常见的临床症状为发热（14/15）、乏力（13/15）、恶心呕吐（11/15）、头痛（10/15）、腹痛腹泻（6/15），三痛征（同时具有头痛、腰痛、眼眶痛）（4/15），三红征（同时具有面、颈、胸皮肤潮红）发生率为 0%。见表 1。

2.2 影像学检查

所有患者均接受肾脏超声检查，2 例双肾肿大，3 例肾筋膜增厚，余患者无异常。

2.3 实验室检查

入院时患者体温 39.1（38.6，39.6）℃、白细胞计数（WBC）29.2（23.6，37.8） $\times 10^9/L$ 、C 反应蛋白 61.7（43.6，79.9）mg/L、降钙素原 9.6（4.2，27.9）ng/mL 等高于正常范围；血小板计数 17.0（14.0，32.0） $\times 10^9/L$ 较低。见表 1。

3 例患者入院时无尿，余 12 例患者入院尿常规尿蛋白均为阳性。

所有患者流行性出血热抗体 IgM 抗体均为阳性。

2.4 血 mNGS 结果

9 例（9/15）患者血 mNGS 检出汉坦病毒。汉坦病毒阳性患者，mNGS 检测距首发症状时间最长为 12 d，最短为 2 d，中位时间 8 d；汉坦病毒阴性患者，mNGS 检测距首发症状时间最长为 9 d，最短为 4 d，中位时间 8 d；

表 1 纳入患者的基本资料

一般资料	患者 (n=15)
年龄 (岁) ^a	33.0(30.0, 57.0)
男性 (例)	14
mNGS 距首次出现症状时间 (d) ^a	8(7, 9)
实验室检查 ^a	
WBC (×10 ⁹ /L)	29.2(23.6, 37.8)
血小板 (×10 ⁹ /L)	17.0(14.0, 32.0)
CRP (mg/L)	61.7(43.6, 79.9)
PCT (ng/mL)	9.6(4.2, 27.9)
T (°C)	39.1(38.6, 39.6)
临床症状 (例)	
发热	14
乏力	13
恶心、呕吐	11
头疼	10
休克	7
腹痛、腹泻	6
三痛征 (头痛、腰痛、眼眶痛)	4
三红征 (面、颈、胸皮肤潮红)	0
住院时间 (d) ^a	12.0(9.0, 26.0)
APACHE II 评分 ^a	15.0(10.0, 18.0)
SOFA 评分 ^a	9.0(5.0, 14.0)
重型及危重型例数 (例)	15
预后 (例)	
死亡	3
肾功能恢复完全	11
肾功能异常	1

注:^a为 $M(Q_1, Q_3)$; WBC 为血常规白细胞计数, 正常范围 (4~10) ×10⁹/L, CRP 为 C 反应蛋白, 正常范围 <10 mg/L, PCT 为降钙素原, 正常范围 <0.5 ng/mL, 血小板正常范围 (125~350) ×10⁹/L

Mann-Whitney U 检验差异分析结果显示, 汉坦病毒阳性组与阴性组比较, 送检 mNGS 时间距首发症状的时间差异无统计学意义 ($Z=-0.659, P=0.510$) (见图 1)。

6 例患者因 mNGS 结果提示汉坦病毒阳性, 而进一步明确诊断为 HFRS。

除汉坦病毒外, mNGS 检出屎肠球菌、米尔伊丽莎白菌、痤疮丙酸杆菌、奥斯陆莫拉菌、约氏不动杆菌、藤黄微球菌、烟曲霉和肺炎支原体、巴氏梭菌, 海氏肠球菌, 咽颊炎链球菌, 人类疱疹病毒、人类多瘤病毒。见表 2。

2.5 亚组分析

6 例入院时因症状不典型未考虑 HFRS, mNGS 检出汉坦病毒后, 进一步明确诊断的患者, 其阳性敏感度为 100%。其临床特征为: 3 例有不洁饮食史, 症状为发热、腹痛、腹泻, 无肌肉酸痛、腰痛、面部潮红、颈部潮红、皮肤潮红, 初步诊断为肠道来源的细菌感染; 1 例症状为发热、呕血、便血, 初步诊断为消化道来源细菌感染; 1 例症状为发热、腹痛、腹胀, 胆囊区压痛, 初步诊断为胆囊炎; 1 例症状为发热、咳嗽、咳大量黄痰, 初步诊断为肺部来源细菌感染。

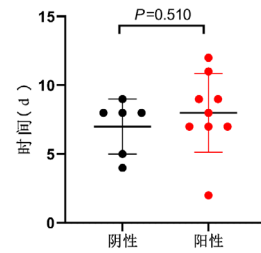


图 1 汉坦病毒阳性组与阴性组比较送检时间距首发症状时间差异 Mann-Whitney U 检验

表 2 病原学检查结果

编号	mNGS 检出汉坦病毒 (序列数)	mNGS 其他病原体检出 (序列数)	mNGS 距首次出现症状时间 (d)
1	汉坦病毒 (3)	屎肠球菌 (DNA 4, RNA 2)	12
2	阴性	米尔伊丽莎白菌 (1)	5
3	汉坦病毒 (207)	无	2
4	阴性	无	4
5	阴性	痤疮丙酸杆菌 (2), 奥斯陆莫拉菌 (2), 约氏不动杆菌 (1)	8
6	汉坦病毒 (2)	无	9
7	汉坦病毒 (12)	巴氏梭菌 (221), 海氏肠球菌 (51), 咽颊炎链球菌 (23), 人类疱疹病毒 4 型 (14)	8
8	汉坦病毒 (66)	无	7
9	阴性	藤黄微球菌 (1)、烟曲霉 (1)	8
10	汉坦病毒 (30)	无	7
11	正汉坦病毒属 (1)	肺炎支原体 (2)	9
12	汉坦病毒 (18)	人类多瘤病毒 2 型 (18)	7
13	汉坦病毒 (3)	无	11
14	阴性	无	8
15	阴性	无	9

表 3 实验室检查结果 [n=6, $M(Q_1, Q_3)$]

实验室检查	指标值
WBC (×10 ⁹ /L)	25.1 (21.4, 41.1)
血小板 (×10 ⁹ /L)	15.0 (9.0, 33.25)
CRP (mg/L)	70.9 (39.9, 82.3)
PCT (ng/mL)	5.7 (3.4, 27.9)

预后情况: 5 例存活, 1 例出院 3 d 后死亡, 死亡原因为家属放弃治疗。实验室检查结果见表 3。

2.6 预后

15 例患者均完成电话随访, 随访中位时间为 1 年。3 例死亡 (均为出院后 96 h 内), 11 例肾功能正常, 1 例肌酐升高。

3 讨论

mNGS 基于第二代测序技术, 具有不受传统培养条件限制、筛选病原广泛、出结果时间快等优势, 已越来越多的应用于临床感染性疾病的诊治^[5], mNGS 检测多种细

菌、真菌、病毒等病原微生物的研究均有相关报道^[6-7],而目前临床上使用 mNGS 技术检测汉坦病毒仅有少量个案报道^[8]。本研究收集、分析、总结了 15 例行 mNGS 检测的 HFRS 患者的临床资料,结果显示,9/15 的 HFRS 患者通过 mNGS 筛选出了汉坦病毒,其中 6/15 的患者血 mNGS 检测筛查出汉坦病毒后,经血清流行性出血热 IgM 抗体检测明确诊断。

传统可用于确诊 HFRS 的检测方法包括:血清特异性 IgM 抗体、IgG 抗体滴度、标本中分离到汉坦病毒或标本中检出汉坦病毒 RNA^[4]。mNGS 无需预设、不依赖于培养,可直接检测临床样本中的病原微生物(包括细菌、真菌、病毒、寄生虫、及非典型病原体),可涵盖新发、少见、及常规检测方法无法检出的病原体^[9]。HFRS 的临床表现多样,出现典型临床表现者少^[10],大部分患者缺乏典型的“三红征”、“三痛征”,本研究中 6 例患者入院时未考虑到 HFRS,由 mNGS 检出汉坦病毒后诊断 HFRS。此 6 例患者无典型的“三红征”、“三痛征”,5 例以消化道症状为主,1 例以呼吸道症状为主,此 6 例患者反应细菌感染的指标如白细胞,CRP, PCT 均较高,易误诊为消化道或呼吸道来源的细菌感染导致的脓毒症。故对于不典型的 HFRS 患者, mNGS 具有较好提示作用。由于 HFRS 危重型病死率明显高于其他类型,漏诊导致的治疗延误可能产生严重后果,早期明确诊断可给予更有针对性的治疗,改善患者预后。

邱建明等^[11]研究表明逆转录-套式 PCR 对 HFRS 患者发病 7 d 内血清 RNA 的检测率为 100%,但本研究患者发病 7 d 内 mNGS 检出阳性率 66.7%, 12 d 阳性率为 60%。结果显示,汉坦病毒阳性组与阴性组比较,送检 mNGS 时间距首发症状的时间差异无统计学意义,提示本研究汉坦病毒 mNGS 结果阴性,非送检时间的差异导致。本研究 mNGS 对于汉坦病毒检测敏感度相对较低考虑可能为两方面原因:①汉坦病毒为 RNA 病毒,而 RNA 不稳定,容易分解,若留取标本至检测时间较长易导致检测结果阴性;②样本中 RNA 本身含量较低,低于 mNGS 检测下限。故对需检测 RNA 病毒样本,采样及样本运输、检测时,应注意使用添加核酸稳定剂的试管,同时冷链运输,并及时进行检测^[12]。mNGS 技术本身尚有较大的优化和发展空间,一直有新的技术手段更新换代,较新的宏基因组测序技术^[13]可能有助于提高 RNA 病毒的检出率。因此,当 mNGS 检测结果与患者临床症状不符时,需根据临床资料进行进一步检查,以明确诊断,避免漏诊。

本研究患者病死率为 20%,与本研究所有患者均为 HFRS 重型或危重型有关。有文献报道危重型 HFRS 病死率高达 74%^[14]。此外研究样本量小,存在一定的偏倚。文

献报道^[1], HFRS 男女比例为 3 : 1,本研究男女比例为 14 : 1,与既往研究趋势相同,均为男性患者多于女性患者,另外本研究样本量小,存在一定偏倚。本研究为 mNGS 对于 HFRS 诊断价值的研究,尚无性别是否可影响 mNGS 检测结果的研究,故男女比例对于本研究结果的影响尚无法确定。本研究对于不典型临床表现 HFRS 患者, mNGS 阳性检出率为 100%,与本研究收集病例方法有关。mNGS 和 HFRS 抗体检测目前均非 ICU 的常规检查,在实际临床工作中仍然可能有一部分 HFRS 患者因未施行这项检查而漏诊,因此 mNGS 在临床工作中有很大的应用空间。

mNGS 检出汉坦病毒的同时,可同时检测是否合并其他病原菌感染,本研究中 7 例患者检出汉坦病毒外的病原菌,但需结合患者临床症状及其他辅助检查,综合判断所测出病原菌是否为致病菌^[9]。同时严格遵守标本采集指南对于减少标本采集时导致的污染至关重要。

本研究具有一定的局限性:(1)研究为单中心回顾性研究,仅统计行 mNGS 检测的 HFRS 患者汉坦病毒检出阳性率,未能统计 mNGS 检出汉坦病毒的特异性及误诊率;(2)研究样本量较小,需要未来大样本量研究,以增加结论的可靠性;(3)本研究患者均为重型及危重型 HFRS,是否适用于其他分型尚需进一步研究。

综上所述,在临床诊疗中,对于不典型 HFRS 患者, mNGS 可作为传统检测手段的有效补充,提高 HFRS 明确诊断率,在一定程度上减少漏诊与误诊事件。为不典型 HFRS 患者,特别是重症患者的进一步诊疗,赢取更多的时间和机会,从而改善疾病结局和预后。此外,由于现有 mNGS 检测方法仍在进步中,一致性存在差异,因而对于临床拟诊 HFRS 而 mNGS 结果为阴性的患者,仍建议完善抗体及病毒分离等检测进一步筛查以明确诊断。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 王海旭、赵颖颖:实施研究、分析/解释数据、论文撰写;闫浩、付明森、王彩云、赵阳超、贡文晶、时学秀:统计分析、数据收集及整理、技术支持;孙同文:研究设计、论文修改、获取研究经费

参 考 文 献

- [1] 中华预防医学会感染性疾病防控分会,中华医学会感染病学分会. 肾综合征出血热防治专家共识[J]. 中华传染病杂志, 2021, 39(5): 257-265. DOI: 10.3760/cma.j.cn311365-20210224-00067.
- [2] 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. DOI: 10.1056/NEJMoa1401268.
- [3] Duan LW, Qu JL, Wan J, et al. Effects of viral infection and microbial diversity on patients with sepsis: a retrospective study based on metagenomic next-generation sequencing[J]. World J Emerg Med, 2021, 12(1): 29-35. DOI: 10.5847/wjem.j.1920-8642.2021.01.005.
- [4] 卫生部. 中华人民共和国卫生部通告(卫通〔2008〕2号)[J]. 中华人民共和国卫生部公报, 2008(3): 8.
- [5] Chiu CY, Miller SA. Clinical metagenomics[J]. Nat Rev Genet, 2019, 20(6): 341-355. DOI: 10.1038/s41576-019-0113-7.
- [6] 孙思, 徐斐翔, 韩奕, 等. 宏基因组二代测序技术对肝脓肿病原学诊断的价值[J]. 中华急诊医学杂志, 2021, 30(10): 1229-1234. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2021.10.013.
- [7] 缪青, 马玉燕, 胡必杰. 基于宏基因组二代测序技术检测呼吸道病毒的临床应用[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(12): 1908-1912. DOI: 10.11816/cn.ni.2018-180856.
- [8] Liu EY, Lv SH, Yi PP, et al. Central nervous system infection with Seoul Orthohantavirus in a child after hematopoietic stem cell transplantation: a case report[J]. Virol J, 2022, 19(1): 75. DOI: 10.1186/s12985-022-01766-6.
- [9] Simner PJ, 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. DOI: 10.1093/cid/cix881.
- [10] 董欣, 孙同文, 李亚辉, 等. 肾综合征出血热 55 例临床特征分析[J]. 中国全科医学, 2018, 21(18): 2227-2230. DOI: 10.3969/j.issn.1007-9572.2018.00.084.
- [11] 邱建明, 董泽平, 杭长寿, 等. 应用反转录-套式 PCR 方法检测肾综合征出血热病人血清中的汉坦病毒特异性 RNA[J]. 病毒学报, 1997, 13(2): 119-125.
- [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. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20201026-00794.
- [13] Zhao N, Cao JB, Xu JY, et al. Targeting RNA with next- and third-generation sequencing improves pathogen identification in clinical samples[J]. Adv Sci, 2021, 8(23): 2102593. DOI: 10.1002/adv.202102593.
- [14] 宋宁娟. 肾综合征出血热患者进展为重型、危重型的早期危险因素分析及其风险预测模型的构建[D]. 南昌: 南昌大学, 2020.

(收稿日期: 2022-11-09)

(本文编辑: 张斯龙)

CHINESE MEDICAL ASSOCIATION
1915
中华医学会