

宏基因组高通量测序在难治性尿路感染 诊治中的应用 3 例*

齐尔¹ 刘立² 谢珍³ 张楷乐⁴ 傅强⁴

[摘要] 尿路感染是泌尿外科的常见疾病,然而许多患者表现为顽固性、难治性或慢性尿路感染症状,对生活与工作造成巨大影响。目前临床中的常用检测为尿常规、中段尿培养等,存在较高的假阴性发生率。宏基因组测序高通量测序(mNGS)以往多应用于肿瘤和遗传病诊断,在尿路感染方面尚未开展,本研究探索了 mNGS 在顽固性尿路感染治疗中的应用价值。3 例顽固性尿路感染女性患者,年龄分别为 25、26 和 57 岁,尿常规、尿三杯和中段尿培养无明显病原体证据,经过经验性用药无明显缓解。患者进行中段尿液样本采集和 mNGS 检测,通过基因序列分析细菌、真菌、病毒等基因,并提供耐药基因报告。随后进行敏感性药物应用,每周进行随访,收集患者主诉和尿常规、尿培养报告。治疗成功标准为患者主诉下尿路症状好转、尿常规和尿培养阴性。3 例患者的 mNGS 检测均发现了多种微生物感染和耐药基因,使用敏感抗生素治疗后症状明显好转。以上病例提示,mNGS 能够发现常规尿液检查无法获得的病原微生物数据和耐药基因数据,对指导临床药物选择、缩短患者感染病程、减少抗生素的经验性滥用有促进作用,可作为常规病原学检测无法解释的复杂性尿路感染,以及排除病因不明的下尿路症状患者的可选性检测方法。

[关键词] 尿路感染;宏基因组;下尿路症状;病原微生物

DOI:10.13201/j.issn.1001-1420.2022.11.014

[中图分类号] R691.3 **[文献标志码]** B

Application of metagenomic next-generation sequencing in the diagnosis and treatment of refractory urinary tract infections: report of 3 cases

QI Er¹ LIU Li² XIE Zhen³ ZHANG Kaile⁴ FU Qiang⁴

¹Community Health Service Center of Xietu Street, Xuhui District, Shanghai, 200032, China;

²MedcareDx Co., Ltd; ³Nanjing Practice Medicine Co., Ltd; ⁴Department of Urology, Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University)

Corresponding author: ZHANG Kaile, E-mail: great_z0313@126.com

Summary Urinary tract infection is a common disease in urology. However, many patients show intractable, refractory or chronic infection syndrome, which has a great impact on their life and work. At present, the commonly used methods of clinical detection are urine routine test, midstream urine culture, etc., which have a large false negative incidence. Metagenomic next-generation sequencing(mNGS) has been used for the diagnosis of tumors and genetic diseases in the past, but has not been carried out in urinary tract infections. This study explored the application value of mNGS in the treatment of refractory urinary tract infections. Three female patients with refractory urinary tract infection, aged 25, 26 and 57 years, respectively, underwent urine routine test, but no obvious evidence of pathogens was found in the urine three-cup or midstream urine cultures, or no significant remission was found after empirical medication. The midstream urine samples were collected and mNGS tests were performed. Bacterial, fungal, viral and other genes were analyzed by gene sequence, and drug resistance gene reports were provided. Subsequently, sensitive drug and weekly follow-up were performed. Patient complaints, urine routine tests, urine culture reports were collected. Treatment success criteria were improvement of patient complaints in lower urinary tract symptoms and negative urine routine and urine culture. MNGS detection of the

*基金项目:国家自然科学基金青年项目(No:81700590);上海交通大学“医工交叉研究基金”(No:YG2017QN15);上海市卫生健康科研项目(No:20184Y0053)

¹上海市徐汇区斜土街道社区卫生服务中心(上海,200032)

²上海麦凯生物科技有限公司

³南京实践医学检验有限公司

⁴上海市第六人民医院泌尿外科

通信作者:张楷乐,E-mail:great_z0313@126.com

three patients found a variety of microbial infections and drug resistance genes, and the symptoms were significantly improved after treatment with sensitive antibiotics. Results of these cases suggest that mNGS can find pathogenic microbial data and drug resistance gene data that cannot be obtained by routine urine examination. MNGS can promote the selection of clinical drugs, shorten the course of infection, and reduce the empirical abuse of antibiotics, so it can be applied to complex urinary tract infection that cannot be explained by routine pathogenic testing. It can also be an optional test to exclude patients with other lower urinary tract symptoms without clear etiology.

Key words urinary tract infection; metagenomic next-generation sequencing; lower urinary tract symptoms; pathogenic microorganism

尿路感染是泌尿外科的常见疾病,典型表现是尿频、尿急、尿痛等下尿路症状。女性患者常见的原因急性膀胱炎、尿道炎、肾盂肾炎^[1-2]。诊断尿路感染的一般方法包括下尿路刺激症状结合尿常规和中段尿培养。然而,临床中仍有许多患者仅表现为尿路刺激症状和异常的尿常规白细胞增多,而多次中段尿培养仍然显示无细菌^[3-4]。对于该类患者,经验性使用抗生素往往无法达到较好的疗效。而膀胱过度活动症患者的诊断应该是在患者尿常规检测没有明显白细胞增加、白细胞酯酶、亚硝酸盐和中段尿培养异常的情况下得出的^[5-6]。然而以上这些检查都存在假阴性的情况,因此,亟需一种更为先进的微生物检测手段来发现尿路感染病原体。

近年来,高通量测序技术的发展促使测序周期以及测序成本大幅下降,为病原体宏基因组高通量测序技术(metagenomic next-generation sequencing, mNGS)在临床的应用带来新契机^[7]。mNGS技术不依赖于传统的微生物培养,是通过对感染标本直接进行宏基因组高通量测序,然后和微生物专用数据库(包括几千甚至数万种细菌、真菌、病毒、寄生虫)比对和智能化算法分析,获得疑似致病微生物的种属信息。该技术根据提取核酸的种类不同,分为DNA检测流程和RNA检测流程。DNA检测流程适用于胞内寄生的细菌如结核分枝杆菌、细胞壁较厚的真菌如隐球菌、DNA病毒如腺病毒等病原。RNA检测流程适用于流感病毒、呼吸道合胞病毒、冠状病毒等RNA病毒^[8]。利用mNGS技术进行病原体检测可一次性对感染标本进行网捞式筛查,无需经验性预判病原,即可检出“未知”病原体及多种混合感染病原体,还能提供初步耐药基因和毒力因子等信息,可以作为传统检测方法的有力补充。本文将分析3例难治性下尿路症状女性患者的临床资料,以及mNGS数据和治疗效果。

1 资料与方法

1.1 临床资料

就诊患者主诉下尿路刺激症状,进行尿常规、尿三杯和尿培养检查,尿常规和尿三杯显示白细胞增加或白细胞酯酶阳性患者予口服抗生素3~5 d治疗,5 d后根据尿培养结果和患者症状停药,或者

根据药敏结果更换抗生素。尿常规、尿三杯或中段尿培养无明显异常,但仍有明显症状的患者进行mNGS检测,所有患者被告知检查目的,并签署知情同意书。所纳入的3例患者均无高血压、糖尿病等慢性疾病,无手术史。

1.2 基因检测

用DNA保存管收集6 mL尿液,QIAamp游离DNA试剂盒(QIAGEN, Valencia, CA, USA)抽提其中的cfDNA,由麦凯(上海)生物技术有限公司和南京实践医学检验有限公司用Illumina Next-Seq550Dx高通量测序仪进行高通量测序。原始数据去除低质量序列、接头序列和重复序列后,将剩余的高质量读段与人类基因组hg19参考序列比对,再将未比对上的序列与专业的细菌、真菌、病毒和寄生虫基因组参考序列数据库比对,根据设定的阈值等因素判定致病病原。

1.3 基因检测指导下的抗感染治疗

根据基因检测结果中的细菌、真菌和病毒信息,以及耐药基因信息,给予患者敏感抗生素治疗,每7 d复查1次尿常规、尿三杯和尿培养,记录患者主诉症状。治疗痊愈标准为患者无明显下尿路症状主诉,尿常规、尿三杯和中段尿培养无炎症和感染指标异常。

2 结果

最终3例患者进行尿液基因检测,包括上海市徐汇区斜土街道社区卫生服务中心内科门诊患者2例,上海市第六人民医院泌尿外科患者1例。患者均为女性,年龄分别为25、26和57岁,其共同症状为反复尿频、尿急、尿痛,经经验性用药无明显好转,且尿液检测无病原微生物依据。后提供中段尿液标本进行mNGS检测,发现多种微生物感染和耐药基因(表1),使用敏感抗生素治疗后症状明显好转。

3 讨论

病原体鉴定是临床用药的决策前提和基础,在抗菌药物合理使用中发挥着不可替代的作用,在对患者尿液样本进行定性、定量分析的基础上,提供临床相关的信息,以辅助临床诊疗决策。本文报道的3例患者均是反复尿频、尿急、尿痛症状,持续时间1~3个月,常规抗菌药物治疗失败,症状无明显

好转。病例 1 进行了反复的中段尿细菌培养,均无法找到病原体,之后使用 mNGS 技术,获得铜绿假单胞菌和真菌感染信息,遂进行尿液真菌培养,明确了近平滑假丝酵母,随后使用革兰氏阴性菌敏感的三代头孢(头孢克肟)和氟康唑联合使用,1 周后随访,患者症状明显好转。病例 2 为反复下尿路症状近两个月,在外院治疗无明显好转,检查尿常规、尿三杯和尿培养无法获得炎症和感染依据,使用 mNGS 明确了粪肠球菌感染,根据相关文献,给予呋喃妥因和阿莫西林治疗后症状好转。病例 3 为中老年女性,有反复下尿路症状,经多种抗生素、中成药及抗膀胱过度活动症药物治疗无效,尿液检查和中段尿培养未见阳性结果,偶尔见白细胞酯酶阳性,mNGS 显示大肠埃希菌计数显著升高,遂加强革兰氏阴性菌药物,给予左氧氟沙星、阿米卡星及米诺环素,患者症状明显好转。

表 1 患者 mNGS 检测微生物情况

病例	微生物名称	标化计数
病例 1		
高度可以致病病原	铜绿假单胞菌	263
	三重分枝杆菌	20
	近平滑假丝酵母	300
	JC 病毒	349
需关注的潜在病原	大肠埃希菌	59
	黑曲霉	28
耐药基因预测	四环素	
病例 2		
高度可以致病病原	粪肠球菌	675
	人乳头瘤病毒 90 型	640
	JC 病毒	250
需关注的潜在病原	铜绿假单胞菌	41
	近平滑假丝酵母	9
耐药基因预测	大环内酯类	
病例 3		
高度可以致病病原	大肠埃希菌	1 199 657
	弗劳第柠檬酸杆菌	74 531
	肠道沙门氏菌	61 733
	无乳链球菌	6706

mNGS 技术目前在呼吸科、ICU、感染科等疑难危重和不明原因感染患者中的应用和研究已有较多报道,国内部分相关专家共识已经纳入该技术^[9-10]。但目前该技术在泌尿外科相关感染中的专题研究并不多见,大多数所涉及的二代测序(NGS)均是基于 16S rDNA 的 NGS 技术,该技术

主要针对细菌和真菌的检测,具有一定的偏好性,而 mNGS 技术则可以同时检测包括细菌、真菌、病毒、衣原体、支原体及寄生虫等在内的数万种病原微生物,是一种无偏的检测技术^[7]。

在尿道感染中,完全应用该技术检测的报道较为少见^[11]。从文献检索上看,mNGS 在泌尿外科相关感染中的应用值得进行系统地研究探讨。今后我们的研究方向将从临床问题出发,设计前瞻性研究,探讨 mNGS 在泌尿相关感染病原体包括耐药基因检出上的临床指导价值。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Byron JK. Urinary tract infection[J]. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 2019, 49(2): 211-221.
- [2] Nik-Ahd F, Lenore Ackerman A, Anger J. Recurrent urinary tract infections in females and the overlap with overactive bladder[J]. Curr Urol Rep, 2018, 19(11): 94.
- [3] 杭永贵,唐庆生,周晓畏,等上尿路感染致尿脓毒症的相关危险因素分析及病原菌特点[J]. 临床泌尿外科杂志, 2020, 35(5): 380-384.
- [4] 陈中举,田磊,杨为民,等. 2016~2018 年泌尿外科患者尿路感染病原菌分布及耐药性分析[J]. 临床泌尿外科杂志, 2020, 35(2): 103-107, 111.
- [5] Klein RD, Hultgren SJ. Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host-pathogen interactions and new treatment strategies [J]. Nat Rev Microbiol, 2020, 18(4): 211-226.
- [6] Mody L, Juthani-Mehta M. Urinary tract infections in older women: a clinical review[J]. JAMA, 2014, 311(8): 844-854.
- [7] Ishihara T, Watanabe N, Inoue S, et al. Usefulness of next-generation DNA sequencing for the diagnosis of urinary tract infection[J]. Drug Discov Ther, 2020, 14(1): 42-49.
- [8] Chiu CY, Miller SA. Clinical metagenomics[J]. Nat Rev Genet, 2019, 20(6): 341-355.
- [9] 李颖,麻锦敏. 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]. 感染、炎症、修复, 2020, 21(2): 75-81.
- [10] 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.
- [11] Li M, Yang F, Lu Y, Huang W. Identification of Enterococcus faecalis in a patient with urinary-tract infection based on metagenomic next-generation sequencing: a case report[J]. BMC Infect Dis, 2020, 20(1): 467.

(收稿日期: 2021-03-14)