

# 新技术“一网打尽”病原微生物

■本报记者 张思玮

新冠肺炎疫情再次将感染性疾病精准诊治问题推到了全球聚光灯下。

“明确病原是感染性疾病诊疗的基础。”近日,在中国医学科学院北京协和医学院主办的第三届感染性疾病精准医学高峰论坛上,中国工程院院士、中国医学科学院北京协和医学院院长王辰表示,感染性疾病对人类健康和全球公共卫生安全形成重大威胁,精准诊断则是实现其精准防控的前提。

但现实中,病原体感染复杂多样,新发病原体不断涌现,微生物耐药形势严峻……这些都给感染性疾病防治带来巨大挑战。

“传统病原微生物检测技术,类似于钓鱼,愿者上钩。而宏基因组测序技术(mNGS)更像是撒网捕鱼,力争一网打尽。”中国医学科学院北京协和医学院检验科主任徐英春说,传统检测手段存在病原体培养周期长、成功率低、功能指标分析能力不足和难以做到广谱检测的问题,而mNGS则为解决这些问题提供了一条新的路径。

如今,mNGS已经越来越多地被应用于临床实验室,但其能否作为常规病原体诊断工具成为业内讨论的热点。

## 解决临床感染难题的新利器

所谓的宏基因组测序技术(mNGS)是一种对患者样本中微生物和宿主遗传物质(DNA和RNA)序列进行全面分析的检测方法。

“作为一项不依赖于培养的检测技术,mNGS具有广覆盖(细菌、真菌、病毒、寄生虫)、灵敏度高的特点,能够深入提供病原鉴定分析、耐药基因和毒力因子分析。同时,它以序列为基础,可检测新发病原体,并进行溯源分类。”中华医学会呼吸病学分会主任委员、上海交通大学医学院附属瑞金医院党委书记瞿介明认为,mNGS无靶标测定标本中所有微生物,灵敏度高,阴性预测价值大。

传统病原检测涵盖临床常见病原体,具有一定的靶向性,阳性预测价值大,其中微生物培养的方法是目前感染病原检测的金标准,通常需要3~5天才能出报告结果。病毒检测还是以针对已知病原的PCR检测和血清学检测为主,检测目标狭窄,靶标固定,难以检测

## 3小时药敏检测 让抗生素精准狙击细菌

■本报记者 沈春蕾 通讯员 鄒兴旺

抗生素能救命,但抗生素滥用带来的超级细菌耐药也能致命。世界卫生组织专家估计,到2050年,由于细菌对抗生素耐药导致的死亡人数可能从目前估计的每年70万人增加到每年1000万人,世界生产总值的损失将达到100万亿美元。

近日,中国科学院苏州生物医学工程技术研究所(以下简称苏州医工所)联合复旦大学附属华山医院、英国牛津大学的科研团队,开发了一种适用于血液和尿液标本的快速药敏检测方法(FRAST)。相关研究成果发表于《分析化学》。

论文第一作者、苏州医工所研究员宋一之告诉《中国科学报》,“FRAST将尿液和血液标本的药敏检测时间由3~4天分别缩短为3小时和21小时,有望让抗生素精准狙击细菌。”

### 不够快、不够准

“药敏检测如果在获得标本当天完成,是最理想的。”论文作者之一、复旦大学附属华山医院主任医师徐晓刚向《中国科学报》解释,“只有拿到药敏报告后,才可以实现精准用药。”

药敏定量试验中的MIC(minimum inhibitory concentration)值,即在体外抑制细菌生长的最低药物浓度,一直是微生物药敏试验、抗菌药评价和临床抗菌方案制定的主流标准与主要依据之一。

徐晓刚介绍说,普通细菌的培养至少需要一天时间,厌氧菌可能需要72个小时,之后再做药敏试验还需要大概20个小时。

由于尿液细菌含量相对血液来说要多,节约了细菌培养的时间,使尿液药敏检测比血液药敏检测用时短,但仍无法在一个工作日内完成。并且现在的药敏检测对体外生长缓慢的细菌无能为力。

研究人员还发现,MIC只能从抑制细胞数目扩增这一角度反映与测量药效,却无法检测处于NGMA(Non-Growing but Metabolically Active)状态的病菌,即在药物作用下已经不再



中国mNGS解读联盟成立。

“传统病原微生物检测技术,类似于钓鱼,愿者上钩。而宏基因组测序技术(mNGS)更像是撒网捕鱼,力争一网打尽。”

新发、罕见病原以及鉴定疑难混合感染病原。

在新冠肺炎疫情防控中,mNGS大展风采。

“从新冠肺炎病原的发现和鉴定到确定核酸筛查的分子靶标,再到病毒溯源和变异监控,mNGS都发挥了极其重要的作用。”中国医学科学院北京协和医学院副院长王健伟表示。

事实上,自2008年以来,20多个国家的大量研究表明,mNGS在诊断未明确的感染性疾病方面提供了重要的参考数据。

徐英春提供的一组数据显示,通过分析全球有关mNGS的108项研究项目,美国和中国并列研究数量前两位,其中以中枢神经系统和呼吸系统的研究为主。

因此,mNGS被业内人士认为是解决临床感染难题的新利器。

### 兼具敏感性和特异性

临床上在探索确定诊断病原微生物方面仍面临巨大问题。

王辰表示,40%以上的重症肺炎、50%的感染中毒症、50%~70%中枢神经

系统感染都无法明确感染病原。这不仅消耗有限的医疗资源,增加医疗开销,还直接影响治疗效果,增加致死率,对整个社会造成重大负担。

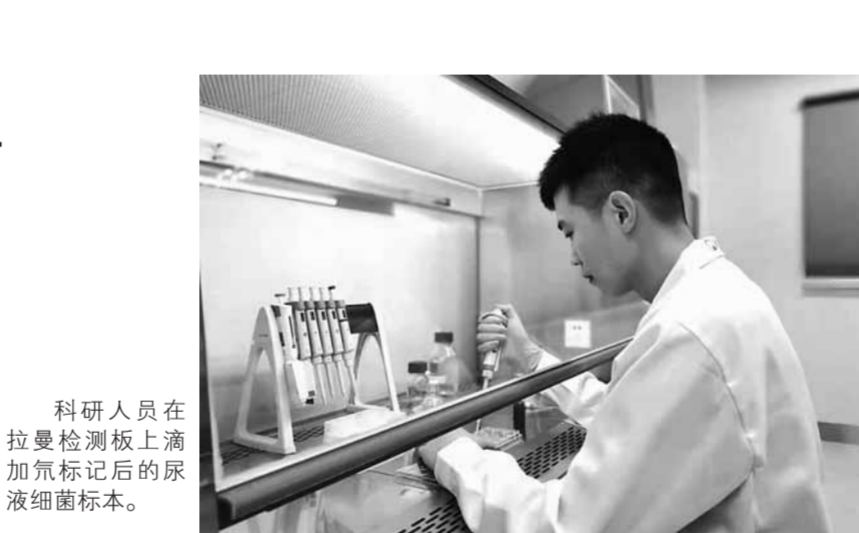
“其中,最难控的依然是呼吸道传染病。”王辰直言。

这一点也得到瞿介明的认同。他表示,肺部感染病原构成复杂,新发未知病原流行频现。从病原体构成上来看,有细菌性肺炎、病毒性肺炎、真菌性肺炎、支原体肺炎……与此同时,新发病原体层出不穷,病原微生物中超过70%的病毒来源于动物传播,而自然界超过99%的微生物尚未明确。

并且,下呼吸道样本还存在采样难、易污染、甄别难的问题。

mNGS则能较好地解决上述问题。一项对92例急性呼吸衰竭老年患者气管插管吸物的研究发现,mNGS可以一次性提供病原体、下呼吸道微生物组和宿主转录组全谱“画像”,阴性预测值可达到100%。

此外,还有研究显示,mNGS诊断感染性疾病敏感性和特异性分别为50.7%和85.7%,尤其在结核分枝杆菌、病毒、厌氧菌和真菌检测方面,均



科研人员在拉曼检测板上滴加标记后的尿液细菌标本。

征峰,则成为了单细胞水平细菌代谢活动的生物标志物。

宋一之说:“在抗生素作用下,易感菌代谢活性会受到抑制,而耐药菌则不受影响并产生明显的碳一氧峰,这一过程不依赖于细菌的增殖,对样品中细菌的数量要求也很低。因此通过单细胞拉曼光谱检测细菌活性,可以克服临床微生物试验对长时间培养的要求,使快速药敏成为可能。”这就是基于拉曼光谱—重水标记联用技术的FRAST方法。

### “从样本到报告”的快速诊断

据悉,拉曼光谱—重水标记联用技术可以直接用于单细胞而无需培养,并在几分钟内鉴定病原微生物种类,通过标记后(1~2小时)的拉曼特征峰,判定感染细菌的代谢活性,快速筛选有效抗生素种类。

以尿液感染标本检测为例,宋一之介绍了FRAST方法:“首先通过离心收集尿液中的细菌,之后在共聚焦显微拉曼系统下,对细菌观察并进行拉曼指纹图谱的采集,这一过程可判断尿液中是否有菌及菌量。”

研究人员将采集到的拉曼光谱利用机器学习模型,与团队已经建立的单细胞阴性菌和阳性菌的拉曼光谱数据库进行比对,预测样品中细菌的革兰氏阴性性,并以此选择合适药敏板。在重水环境中与不同种类和不同浓度的抗生素作用1~2小时后,细菌的拉曼光谱再次被采集,并通过算法分析其碳一氧峰强度特征。

试验过程中,研究人员在包含质控

优于培养法。

### 技术发展仍需规范

“无论是经典检测(形态学检查、分离培养、免疫学方法),还是快速检测(核酸检测技术),都应结合流行病学、临床特征等综合分析,去伪存真,确定其是否为真正致病菌。”瞿介明说,有了新方法不能就抛弃老方法,当然更不能固步自封在老方法上,而拒绝新方法,而是应该看清不同的检测方法的适用情况。两种方法互为补充,平行送检可有效提高检出率。

瞿介明提醒,任何新技术,不能“扔进篮子就是菜”。“我们做好优选,这也是对新技术的尊重,如果拿到篮子里全都是菜,很可能造成鱼龙混杂,毁了这项技术。”

并且,mNGS技术应用于临床也的确存在亟待解决的问题。

王健伟举例说,标本采样过程中对样本造成的污染、人类基因组的干扰、生物信息学分析、结果判断和解释等,特别是呼吸道本身为非无菌状态,大量定植或携带微生物核酸的存在也给临床结果的判读带来了挑战。

鉴于中国mNGS解读规范尚未统一,解读水平发展不平衡,解读领域人才匮乏的现状,王健伟、徐英春和复旦大学附属华山医院感染科主任张文宏等人发起成立了中国mNGS解读联盟。据悉,该联盟旨在加速mNGS解读标准制定,推进mNGS临床规范应用,助力感染性疾病精准诊断。

当然,分子诊断与测序成为感染性疾病精准诊断的重要工具,这一趋势已经无法阻挡。

“从病原体鉴定走向耐药和宿主感染等特征诊断,mNGS将逐渐迈入2.0时代。与此同时,在分级诊疗体系政策影响下,床旁快速诊断与分子诊断应联手提升医疗机构对感染性疾病诊治水平。”王辰认为,未来,mNGS将朝着规范化、规模化、精细化、自动化方向发展。

“最终希望通过多学科协作,利用更多的新技术及早发现病例,把病例控制在早期,让重症的病人更早得到救治,大幅度提高临床治疗水平。”张文宏说。

相关论文信息:  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1809700115>  
<https://doi.org/10.1093/cid/ciy693>

## 新知

近日,上海交通大学基础医学院生化与分子细胞生物学系董雪梅团队揭示结直肠癌浸润Treg细胞的葡萄糖代谢调控新机制,通过基因敲除小鼠和结直肠癌肿瘤模型,发现MondoA-TXNIP转录调控轴对肿瘤微环境中Treg细胞代谢模式以及可塑性的关键调控机理。该研究成果在线发表于《胃肠病学》。

结直肠癌(CRC)是全球发生率第二、死亡率第三的恶性肿瘤,结直肠癌微环境由肿瘤细胞、免疫细胞和基质细胞等共同构成。调节性T细胞(Treg)是一类免疫负向调控细胞,在肿瘤微环境中高度浸润,是构成免疫抑制微环境的主要细胞亚群之一,因此作为肿瘤免疫治疗的重要靶标受到广泛关注。结直肠癌浸润Treg细胞感应低氧、营养物质缺乏、酸性环境等多重代谢压力,呈现出代谢模式和生理功能的高度异质性,然而,微环境信号如何影响结直肠癌浸润Treg群体的异质性仍有待阐明。

为此,该研究团队通过分析单细胞测序数据发现结直肠癌浸润Treg细胞糖酵解活性增强,深入探究发现结直肠癌浸润

Treg细胞下调MondoA-TXNIP转录调控轴功能,增加葡萄糖转运蛋白Glut1表达和细胞膜定位,诱导糖酵解代谢模式下的Th17-like Treg细胞,削弱其免疫抑制功能,进一步促进Th17型炎症,抑制CD8<sup>+</sup>T细胞的抗肿瘤功能,并最终导致结直肠癌的发生发展。

结直肠癌免疫检查点抑制剂疗法在错配修复缺陷的微卫星不稳定性亚型患者中显示出较好的疗效,而占据结直肠癌病人80%~90%的微卫星稳定性亚型患者对于肿瘤免疫治疗几乎不响应,已有报道显示微卫星稳定性的结直肠癌中Th17细胞大量富集。董雪梅团队这项工作证实靶向IL-17A的anti-IL17A抗体治疗能显著抑制结直肠癌发生发展,并且anti-IL-17A抗体联合anti-PD-1抗体治疗效果更佳。研究人员创新性地探索了靶向炎症的中和抗体和免疫检查点抑制剂联合治疗结直肠癌的新方案,为微卫星稳定性亚型的结直肠癌病人从肿瘤免疫治疗中获益提供了可能的新干预靶点。(黄辛)

相关论文信息:<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.04.041>

## 结直肠癌微环境—细胞代谢调控新机制获揭示

## 医讯

### 国内首个《护理高质量发展宣言》发布

本报讯 近日,由复旦大学附属中山医院主办、以“创新驱动发展,智慧赋能亚洲”为主题的第10届国际护理理论论坛在上海举行。当天,论坛发布了国内首个《护理高质量发展宣言》。同时,还启动了“一带一路”中国—印度尼西亚护理人才培养项目。

开幕式上,复旦大学附属中山医院护理部主任张玉侠宣读了《护理高质量发展宣言》。该宣言由复旦大学附属中山医院联合32家国内顶尖医疗机构和护理院校共同起草,厘清未来护理在全球健康治理中的角色定位,明确了护理高质量发展的核心内涵,提出了党建引领、学科建设、人才培养、科学管理、服务创新等发展要义。

“这个宣言将会成为未来我国护理发展的纲领与航标,为护理牢牢把握高质量发展的战略机遇期提供重要指引,为护理事业加速发展注入新动能,促进护理为推动人类社会健康福祉作出更大贡献。”张玉侠说。

而“一带一路”中国—印度尼西亚护理人才培养项目旨在从顶层设计和可持续发展视角,形成中印人才培养的对话交流机制,建立多层次、多样化的护理人才合作培养平台,助推印度尼西亚健康事业整体发展,促进“一带一路”卫生健康合作创新发展,实现开放融合,协同打造“健康丝绸之路”,增进全人类健康福祉。(黄辛)

### 医疗器械管理者会议在青岛举行

本报讯 近日,由中国食品药品国际交流中心主办的医疗器械管理者会议(MD50)系列活动之新版《医疗器械监督管理条例》政策解读在青岛举行。

本次会议旨在为医疗器械监管机构和医疗器械企业管理者搭建沟通平台。会上,MD50医疗器械管理者共同发起“MD50红岛倡议”,号召业界做《医疗器械监督管理条例》的宣传贯彻者、遵法守法的践行者、行业创新的推动者、行业生态的塑造者、践行社会责任的引领者。

当天,青岛高新区与国药控股股份有限公司举行了战略合作签约仪式。双方将在加速医疗器械产业发展升级、完善医疗器械研发创新链条、推进医疗器械产业的跨越发展、开拓国际合作创新模式等领域深入长期合作。

据悉,今年6月新版《医疗器械监督管理条例》将正式实施。以此为契机,青岛将大力推介青岛产业政策,吸引更多医疗器械企业落地。(廖洋)

### 罕见“腹茧症”患者重获新生

本报讯 近日,上海交通大学医学院附属仁济医院教授刘颖斌团队为一名罕见“腹茧症”患者施行了高难度的复杂肠粘连松解术和小肠排列术,彻底解决了折磨患者一年多的腹痛和梗阻症状。术后,患者恢复良好,已出院。

“腹茧症”是一种罕见的腹部疾病,术前诊断率仅4.6%。该病通常因先天畸形、结核、恶性肿瘤、自身免疫反应、腹膜炎、盆腔内灌注化疗、腹膜透析、病毒感染等引起。

病人腹腔内纤维蛋白渗出增多,并在小肠部位形成纤维性包膜,进而导致肠管间发生粘连挛缩,形成腹部包块。患者通常表现为反复腹痛腹胀、呕吐便秘等。

“该病通常需要剖腹探查才能确诊,术前腹部X线常提示肠梗阻,小肠梗阻造影与CT可确诊,术后病理往往为纤维缔结组织。若患者存在肠梗阻反复发作的情况,则需手术切除包囊壁、松解肠间粘连和行肠排列术。”刘颖斌说。(黄辛)

### 赛默飞—新生巢共享实验室落地北京

本报讯 日前,为更好帮助入驻企业赋能加速,北京中关村生命科学园新生巢创新中心举行首场科学家日活动——赛默飞—新生巢共享实验室平台签约仪式。本次战略合作将依托赛默飞在生物科技领域的创新技术优势及生物医药行业全产业链服务能力,将新生巢及其所在的中关村生命科学园打造成为国内外领先的开放式、专业化的生物医药研发高端共享创新平台,及生物医药创新人才项目孵化基地,为生物制药产学研转化提供完善的生态圈。

据悉,2018年以来,北京高度重视医药健康产业发展,在十大高精尖产业中率先部署发布了医药健康三年行动计划,并将其提升至支撑北京创新发展“双发动机”的战略高度。(郑金武)