

宏基因二代基因检测技术诊断三日疟一例及文献复习

苏逸 缪青 王青青 蔡思诗 金文婷 潘珏 胡必杰

复旦大学附属中山医院感染病科, 上海 200032

通信作者: 胡必杰, Email: hu.bijie@zs-hospital.sh.cn

【摘要】 疟疾是旅行归来者发热最常见的原因, 因检测手段的局限, 常被误诊和漏诊。本文报道 1 例 35 岁中国男子从尼日利亚回国后发烧 10 d, 外周血疟原虫涂片 3 次及血培养 3 套均为阴性, 同步进行的宏基因二代基因检测技术 (mNGS) 提示三日疟, 治疗后迅速好转, 后经 PCR 确诊。本例病例报告提示 mNGS 可帮助临床医师快速精准识别疟疾感染。

【关键词】 疟原虫, 三日; 宏基因二代基因检测技术; 诊断

基金项目: 上海市公共卫生三年行动计划重点专科-传染病与卫生微生物学基金资助项目 (15GWZK0101)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-2397.2019.05.007

A case of *Plasmodium malariae* infection identified by metgenomic next-generation sequencing and literature review

Su Yi, Miao Qing, Wang Qingqing, Cai Sishi, Jin Wenting, Pan Jue, Hu Bijie

Department of Infectious Diseases, Zhongshan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200032, China

Corresponding author: Hu Bijie, Email: hu.bijie@zs-hospital.sh.cn

【Key words】 *Plasmodium malariae*; mNGS; Diagnosis

Fund program: The 4th Three-year Action Plan for Public Health of Shanghai Municipality (15GWZK0101)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-2397.2019.05.007

据世界卫生组织 (WHO) 统计, 2016 年全球有 2.1 亿人感染疟疾, 造成 44.5 万人死亡, 90% 的疟疾发生于非洲。随着耐药疟疾的逐渐增多, 疟疾的疫情控制面临严峻挑战^[1]。疟疾是旅行者归来发热最常见的原因, 随着国际旅行越来越普遍, 我国临床医师在考虑旅行归来发热待查患者的病原体谱时, 需要考虑到疟疾^[2]。

疟疾诊断的金标准为血涂片镜检找疟原虫, 其他方法包括血清抗原快速检测及分子生物学技术^[3]。宏基因二代基因检测技术 (mNGS) 作为一种新型的感染性疾病的诊断工具, 已越来越多的被用于临床。已有不少文献报道 mNGS 在细菌、真菌感染方面的诊断价值^[4], 关于寄生虫的相关报道极少, 该文采用 mNGS 诊断三日疟 1 例, 现报道如下。

1 病例介绍

患者男, 35 岁, 因“反复发热 10 d 余”于 2018 年 10 月 17 日收治入院。10 月 6 日, 患者自觉发热不适, 体温 38.5℃, 口服退热药物后退热。次日起床后乏力明显, 伴双膝关节及后腰部酸胀感。10 月 7 日、10 日均因发热至当地医院就诊, 查血培养 1 套, 血涂片找疟原虫 2 次均为阴性, 服用退热药物后热退。此后又间断发热 2 次。患者诉既往在非洲尼日利亚工作 6 年, 今年 7 月曾在当地诊断为疟疾 2 次, 2 次感染间隔 8 d, 分别为间日疟和恶性疟, 均予青蒿素 + 头孢类抗生素治疗后热退。9 月 26 日, 患者从尼日利亚回国。入院查体: 体温 36℃, 脉搏 88 次/min, 呼吸 18 次/min, 血压 108/82 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa)。精神尚可, 食欲下降, 体力、体质量无明显变化。皮肤巩膜无黄染, 全身浅表淋巴结未及肿大。双肺听诊呼吸音清, 未闻及啰音。心脏听诊无杂音, 双下肢无水肿。腹部平软, 肝脾肋

引用格式: 苏逸, 缪青, 王青青, 等. 宏基因二代基因检测技术诊断三日疟一例及文献复习 [J]. 中华临床感染病杂志, 2019, 12 (5): 359-361. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-2397.2019.05.007.

下未及。实验室检查:外周血白细胞(WBC) $6.31 \times 10^9/L$,血小板(PLT) $130 \times 10^9/L$,血红蛋白(Hb) $142 g/L$,嗜酸性粒细胞 $1.1 \times 10^9/L$,C-反应蛋白(CRP) $56.8 mg/L$,降钙素原(PCT) $0.46 ng/mL$,红细胞沉降率(ESR) $21 mm/1 h$,总胆红素 $26.5 \mu mol/L$,直接胆红素 $12.2 mol/L$,抗核抗体 1:320,肿瘤标记物阴性,血培养 2 套阴性,巨细胞病毒(CMV) DNA(-),单个核 EB 病毒 DNA 5.81×10^6 ,血浆 EB 病毒 DNA(-),T-SPOT A/B 0/1,完善立克次体核酸+抗体、寄生虫抗体(囊虫、肺吸虫及华支睾吸虫等)、利氏曼原虫抗体、布尼亚病毒抗体+核酸、疟疾血涂片,为尽早明确发热病原体,同时行血 mNGS 检测。胸腹部增强 CT 结果示脾脏增大;头颅 MRI+增强:未见明显异常。

患者入院后前 2 d 未有发热,10 月 19 日体温上升至 $38.3^\circ C$,有发冷,无寒战。10 月 18 日,血涂片回报阴性。10 月 20 日,血清立克次体核酸和抗体、寄生虫、利氏曼原虫、布尼亚抗体+核酸回报均为阴性,血 mNGS 结果示疟原虫属相对丰度(指属水平上检测到的该微生物在整个样本中检测到的相同类型微生物中所占的比重)93.17%,标化后属严格比对序列数(属水平上严格比对该物种的序列数)1 220,标化后种严格序列数(种水平上严格比对该物种的序列数)181,三日疟占 mNGS 病原体总覆盖度(指检测到的该微生物核酸序列覆盖到该微生物整个基因组序列的比值)0.136%。予以青蒿素阿莫地奎片 2 片,1 次/d,服用 3 d 后热退出院。10 月 22 日,复查血常规及炎症指标均正常。10 月 24 日,PCR 结果回报证实三日疟。

2 mNGS 检测及结果解读

2.1 样本处理和 DNA 提取 取 $300 \mu L$ 血浆,使用 TIANamp Micro DNA Kit (DP316,天根生化科技北京有限公司),根据试剂盒说明书提取 DNA。提取的 DNA 用作 DNA 文库构建。

2.2 DNA 文库构建和测序 使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 对文库打断片段的长度进行质控分析,使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.)对 DNA 文库浓度进行质控分析,经环化形成单链环形结构。环化后的文库经滚环复制(RCA)生成 DNB 纳米球。制备好的 DNB 纳米球加载到测序芯片。使用 BGISEQ-500 进行测序。

2.3 数据分析及结果解读 测序数据下机后去除低质量的和长度 $< 35 bp$ 的数据以获得高质量的数据。通过 Burrows-wheeler aligner (BWA: <http://bio-bwa.sourceforge.net/>) 比对,将高质量数据中比对上人参考基因组序列的数据去除。剩下的数据在去除低复杂度序列后与专用的微生物大数据库比对,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。

3 讨论

疟疾为旅行者归来发热的首要原因,比例高达 21%,来自撒哈拉以南非洲地区旅行归来患者疟疾引起的发热比例高达 42%^[5]。由于疟疾起病为非特异性表现,与其他常见的发热性疾病难以区分,容易被漏诊,以致逐渐发展为重症疟疾并导致死亡。因此,临床医师面对旅行归来发热的患者,不应遗漏疟疾。

疟疾诊断方法包括显微镜检查、检测抗原的快速诊断试验(RDTs)和分子生物学技术(PCR)。有研究表明,血涂片的阳性率为 56%,11%患者可以通过血涂片正确鉴定疟原虫的种类^[6],RDTs 的敏感度与血涂片相当^[7]。在我国,血涂片为常用的疟疾筛查手段,由于血液涂片的敏感度和特异度较低,加之实验室技术员经验不足,实际的敏感度可能更低。临床医师高度怀疑疟疾时,可行 PCR 检查^[8]。PCR 只能检测有限种类病原体,在发热原因不明及鉴别诊断较多时,无法快速给临床医师提供思路。2016 年英国疟疾治疗指南推荐疟疾的诊断和治疗都应尽早进行^[9]。

mNGS 是一种新型的病原体基因组学诊断技术,有助于临床医师诊断病原体未知的感染性疾病^[10-11]、发现培养无法发现的病原体^[12]、通过监测微生态提前预测感染^[13]、预测药物敏感性^[14],比传统检测手段结果更快更精准。同时,也存在需进一步减少人员序列^[15]、无法避免操作过程中的污染^[16],尚无明确标准界定感染、定植还是污染、费用较高、市场基因公司鱼龙混杂等缺点。感染病科医师根据患者疾病疑难危重复杂的程度、患者经济条件等多方面因素选择正规的机构进行检测,同时应通过不断充实自己的专业知识正确解读病原学报告。

本例报告是在我国首次采用 mNGS 技术检测到

疟原虫,经疟原虫 PCR 证实。我院作为 mNGS 技术最早与临床接轨的医院之一,至今已有超过 2 000 例标本的检测经验,曾检测出耶氏肺孢子菌、东方立克次体、巴尔通体、鹦鹉热衣原体、猪疱疹病毒、腺病毒等常规培养无法检测到的有临床意义的病原体。目前 mNGS 经常被应用于疑难复杂感染病例,因其可检测的病原体范围广泛,面对不明原因的发热时,可帮助临床医师及时发现罕见或意想不到的病原体,极大加快了诊断速度,可改善患者预后。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 苏逸:文章撰写、采集数据;缪青、王青青:分析、解释数据;蔡思诗、金文婷:采集数据;潘珏、胡必杰:研究指导、论文修改

参 考 文 献

- [1] World Health Organization. World malaria report 2017 [R]. WHO, 2017;1-280.
- [2] Scaggs Huang FA, Schlaudecker E. Fever in the returning traveler [J]. *Infect Dis Clin North Am*, 2018, 32(1):163-188. DOI: 10.1016/j.idc.2017.10.009.
- [3] Kattenberg JH, Ochodo EA, Boer KR, et al. Systematic review and meta-analysis: Rapid diagnostic tests versus placental histology, microscopy and PCR for malaria in pregnant women [J]. *Malaria J*, 2011, 10: 321. DOI: 10.1186/1475-2875-10-321.
- [4] Miao Q, Ma Y, Wang Q, et al. Microbiological diagnostic performance of metagenomic next-generation sequencing when applied to clinical practice [J]. *Clin Infect Dis*, 2018, 67(suppl-2):S231-S240. DOI: 10.1093/cid/cix693.
- [5] Wilson ME, Weld LH, Boggild A, et al. Fever in returned travelers: results from the GeoSentinel Surveillance Network [J]. *Clin Infect Dis*, 2007, 44(12): 1560-1568. DOI: 10.1086/518173.
- [6] Yavne Y, Leshem E, Paran Y, et al. *Plasmodium malariae* in Israeli travelers: A nationwide study [J]. *Clin Infect Dis*, 2017, 65(9):1516-1522. DOI: 10.1093/cid/cix560.
- [7] Hahn WO, Pottinger PS. Malaria in the traveller: How to manage before departure and evaluate upon return [J]. *Med Clin North Am*, 2016, 100(2): 289-302. DOI:10.1016/j.mcna.2015.09.008.
- [8] Kattenberg JH, Ochodo EA, Boer KR, et al. Systematic review and meta-analysis: rapid diagnostic tests versus placental histology, microscopy and PCR for malaria in pregnant women [J]. *Malar J*, 2011, 10:321. DOI:10.1186/1475-2875-10-321.
- [9] Lalloo DG, Shingadia D, Bell DJ, et al. UK malaria treatment guidelines 2016 [J]. *J Infect*, 2016, 72(6):635-649. DOI: 10.1016/j.jinf.2016.02.001.
- [10] 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.
- [11] Thoendel M, Jeraldo P, Greenwood-Quaintance KE, et al. A novel prosthetic joint infection pathogen, *mycoplasma salivarium*, identified by metagenomic shotgun sequencing [J]. *Clin Infect Dis*, 2017, 65(2):332-335. DOI:10.1093/cid/cix296.
- [12] Ruppé E, Lazarevic V, Girard M, et al. Clinical metagenomics of bone and joint infections: a proof of concept study [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):7718. DOI:10.1038/s41598-017-07546-5.
- [13] Langelier C, Kalantar KL, Moazed F, et al. Integrating host response and unbiased microbe detection for lower respiratory tract infection diagnosis in critically ill adults [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(52): E12353-E12362. DOI: 10.1073/pnas.1809700115.
- [14] Su M, Satola SW, Read TD. Genome-based prediction of bacterial antibiotic resistance [J]. *J Clin Microbiol*, 2019, 57(3). pii: e01405-18. DOI:10.1128/JCM.01405-18.
- [15] Thoendel M, Jeraldo PR, Greenwood-Quaintance KE, et al. Comparison of microbial DNA enrichment tools for metagenomic whole genome sequencing [J]. *J Microbiol Methods*, 2016, 127: 141-145. DOI:10.1016/j.mimet.2016.05.022.
- [16] Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses [J]. *BMC Biol*, 2014, 12:87. DOI:10.1186/s12915-014-0087-z.

(收稿日期:2019-06-19)

(本文编辑:金建华)