

· 论著 · 系统性疾病 ·

宏基因二代测序技术对恙虫病病原学诊断的价值

任 静* 钟华平 李淑珠 黎圣洪

厦门医学院附属第二医院感染疾病科(福建 厦门 361021)

【摘要】目的 探讨宏基因二代测序(mNGS)技术对恙虫病的诊断价值。**方法** 回顾性收集2019年1月至2023年12月于厦门医学院附属第二医院住院的恙虫病患者的病例资料,采集样本做外周血mNGS、外斐实验(WFT)、胶体金免疫色谱法(cCIA)检测,比较三种检测方法的敏感性、检测所需时间、检测前使用抗菌药物对检测敏感性的影响。**结果** 共纳入55例恙病患者, mNGS检测恙虫病的阳性率(87.27%, 48/55)明显高于WFT(33.96%, 18/53)和CIA(69.39%, 34/49),差异有统计学意义($P<0.05$)。检测前使用抗菌药物对mNGS、WFT、CIA阳性率均无影响($P>0.05$)。在检测时间上, mNGS平均用时为(1.50±0.14)d,较CIA平均用时(1.90±0.27)d短,差异有统计学意义($P=0.02$)。恙虫病的误诊率为58.51%。**结论** 在恙虫病诊断中, mNGS比WFT、CIA灵敏度高;检测前使用抗菌药物对mNGS、WFT、CIA敏感度无影响。

【关键词】 恙虫病;宏基因组学二代测序;诊断

【中图分类号】 R513.2

【文献标识码】 A

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2025.12.044

Etiological Dignostic Value of Metagenomic Next-generation Sequencing in Scrub Typhus

REN Jing*, ZHONG hua-ping, LI Shu-zhu, LI Sheng-hong.

Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Xiamen Medical College, Xiamen 361021, Fujian Province, China

Abstract: Objective To investigate the diagnostic value of Metagenomic next-generation sequencing (mNGS) in scrub typhus. **Methods** From January 2019 to December 2023, scrub typhus patients admitted to the Second Affiliated Hospital of Xiamen Medical College were retrospectively reviewed. Samples were collected for peripheral blood mNGS test, Weil-Felix test (WFT) and colloidal gold immunochromatography assay (CIA), the sensitivity, the time required for detection, the influence of antibiotics on detection sensitivity before detection of the three methods were compared. **Results** A total of 55 scrub typhus patients were included. The positive rate of mNGS (87.27%, 48/55) was significantly higher than that of WFT (33.96%, 18/53) and CIA (69.39%, 34/49), the difference was statistically significant ($P<0.05$). Preoperative use of antibiotics had no significant effect on the positive rate of mNGS, WFT and CIA ($P>0.05$). The detection time of mNGS (1.5±0.14)d was significantly shorter than that of the CIA(1.90±0.27)d, the difference was statistically significant ($P=0.02$). The misdiagnosis rate of scrub typhus was 58.51%. **Conclusion** The sensitivity of mNGS was higher than that of WFT and CIA in the diagnosis of scrub typhus patients. Preoperative use of antibiotics had no significant effect on the positive rate of mNGS, WFT and CIA.

Keywords: Scrub Typhus; Metagenomic Next-generation Sequencing; Diagnostic

恙虫病是恙螨叮咬导致的人兽共患立克次体病,流行于韩国、日本、中国、泰国等亚太地区,我国的高发地在东南沿海。临床上恙虫病的确诊多根据叮咬部位造成的特异性溃疡或焦痂,但因溃疡或焦痂部位较为隐蔽,导致临床上常常误诊、漏诊。恙虫病东方体感染可导致肝、肺、心、脑、消化、凝血等多器官功能的损害,若不能及时使用敏感抗菌药物,致死率可高达70%^[1],因此临床早期诊断对改善患者愈后起到关键作用。恙螨叮咬后,恙虫病东方体进入人体,局部繁殖入血后,造成恙虫病东方体血症^[2],但恙虫病东方体分离培养困难,目前临床上恙虫病常规的实验室诊断主要通过外斐实验(Weil-Felix test, WFT)、胶体金免疫色谱法(colloidal gold immunochromatography assay, CIA)等血清学检测手段。

近些年兴起的宏基因二代测序(metagenomic next-generation sequencing, mNGS)技术在血液标本检测中的运用已日渐成熟^[3-4],也为恙虫病病原学的早期诊断提供了新的思路,但目前尚缺乏其在恙虫病病原学诊断中的运用分析。本

研究回顾性分析2019年1月至2023年12月于厦门医学院附属第二医院住院的符合纳入标准的55例恙病患者资料,比较mNGS与WFT、CIA检测的诊断效能,评估mNGS在恙虫病诊断中的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 对2019年1月至2023年12月于厦门医学院附属第二医院住院的恙病患者进行回顾性分析。恙虫病的诊断符合《恙虫病预防控制技术指南(2009年版)》实验室诊断标准^[5]。(1)流行病学史:在流行季节有丛林或草地坐卧等野外活动史,(2)高热,(3)淋巴结肿大,(4)皮疹,(5)特异性焦痂或溃疡,(6)实验室检查:WFT阳性、CIA阳性、mNGS阳性。符合下列四种情况之一为临床诊断病例:1.同时具备(1)(2)(3)(5);2.同时具备(1)(2)(4)(5);3.同时具备(2)(3)(4)(5);4.同时具备(1)(2)(5)。符合下列三种情况者为实验室诊断病例:1.同时具备(1)(2)(3)及(6)中之一者,2.同时具备(1)(2)(4)及(6)中之一者,3.同时具备临床

【第一作者】任 静,女,主治医师,主要研究方向:传染病。E-mail: chenjingfjz@163.com

【通讯作者】任 静

诊断标准及(6)中之一者。本研究由厦门医学院附属第二医院医学伦理委员会讨论,并严格审核后批准(科伦:2024001)。

纳入标准:恙虫病实验室确诊患者,住院期间完成mNGS。

1.2 研究方法

1.2.1 WFT 采用变形杆菌 OXK、OX2及 OX19试剂盒(天润生物药业有限公司)进行检测,按试剂盒要求进行操作。外斐氏反应血清稀释度≥1:160即为凝集反应阳性。送检本院检验科完成。

1.2.2 CIA 应用恙虫病东方体抗体检测胶体金试剂检测血清样本的恙虫病东方体IgM、IgG。按照说明判断检测结果:C与T对应部位出现紫红色条带为阳性。送检厦门市疾控中心完成。

1.2.3 mNGS 采集寒战时外周血3mL,经样本处理、DNA提取、上机测序、数据分析、报告解读得出结论。mNGS恙虫病阳性定义:属严格序列数或种严格序列数≥2。送检达瑞检验公司完成。

1.3 统计学方法 采用SPSS 25.0软件进行统计学分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,非正态分布的计量资料以M(IQR)表示,组间采用两独立样本t检验。计数资料以例数(构成比)表示,采用 χ^2 检验,若理论频数 $1 \leq T < 5$,采用连续校正 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料 共纳入恙病患者55例(感染科:27例,儿科16例,全科医学科:6例,神经内科:4例,ICU:2例),年龄

5~73岁,男32例,女23例,43例(78.18%)发病前有明确的野外活动史,高发月份为6~10月(见图1)。

2.2 灵敏度比较 从表1可以看出mNGS的阳性率显著高于WFT,经 χ^2 检验显示差异有统计学意义($\chi^2=32.277$, $P < 0.01$),mNGS的阳性率亦高于CIA检测,差异有统计学意义($\chi^2=4.970$, $P=0.026$)。

2.3 检测前使用抗菌药物对mNGS、WFT、CIA检测结果的影响 在纳入的55例恙病患者中,有42例在检测抽血前使用过抗菌药物,42例检测了外周血mNGS,阳性36例(85.71%),40例检测了WFT,阳性13例(32.50%),37例检测了CIA,阳性26例(70.27%)。13例在检测前未使用过抗生素,13例检测外周血mNGS阳性12例(92.31%),13例检测了WFT,阳性5例(38.46%),12例检测了CIA,阳性8例(66.67%)。检测前使用抗菌药物对mNGS、WFT、CIA检测阳性率影响均无统计学意义($P > 0.05$)。见表2。

2.4 确诊时间的对比 从标本送检至报告结果,mNGS平均用时为(1.50±0.14)d,WFT组平均用时为(1.42±0.17)d,CIA平均用时为(1.9±0.27)d。mNGS检测用时与WFT组相当,差异无统计学意义($P=0.310$),而较CIA检测时间短,差异有统计学意义($P=0.02$)。见表3。

2.5 误诊情况 55例患者初诊误诊32例,误诊率58.18%,其中:18例(32.72%)误诊为肺炎,7例(12.73%)误诊为急性上呼吸道感染,5例(9.09%)误诊为脑膜脑炎,2例(3.63%)误诊为脓毒血症。

3 讨论

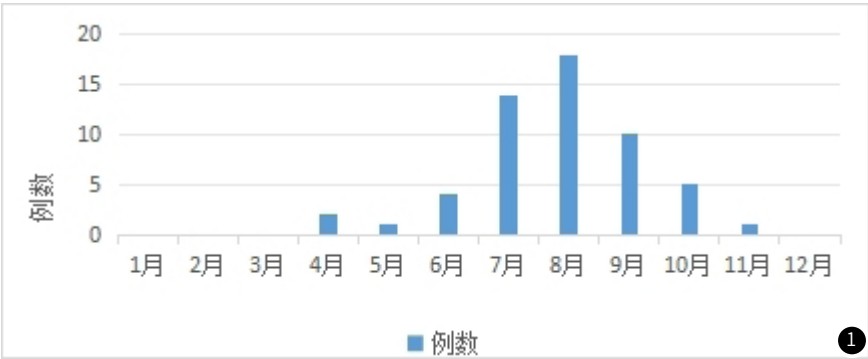


图1 2019至2023不同月份病例分布情况图。

表1 mNGS与WFT或CIA检测结果比较

方法	n	阳性(阳性率)	阴性(阴性率)
mNGS	55	48(87.27%)	7(12.23%)
WFT	53	18(33.96%)	35(63.64%)
CIA	49	34(69.39%)	15(30.61%)

表3 WFT、CIA法检测与mNGS平均用时对比

	mNGS	WFT	CIA
平均用时	(1.50±0.14)d	(1.42±0.17)d	(1.90±0.27)d
P值		0.31	0.02

表2 检测前有无使用抗生素对mNGS、WFT、CIA法检验阳性率的影响

	mNGS阳性	阳性率	WFT阳性	阳性率	CIA阳性	阳性率
检测前使用抗生素组	36例	85.71%(36/42)	13例	32.50%(13/40)	26例	70.27%(26/37)
检测前未使用抗生素组	12例	92.31%(12/13)	5例	38.46%(5/13)	8例	66.67%(8/12)
χ^2 值	0.022		0.155		0.000	
P值	0.883		0.693		1.000	

厦门地处“恙虫病三角”，属于亚热带沿海地区，夏季时间长、雨水充沛、植被覆盖率高，为虫鼠孳生提供了有利环境，属于恙虫病高发地区^[6]。本研究纳入恙虫病病例以6~10月发病居多，与福建地区恙虫病的流行时间相同^[7]，男性患者多于女性，可能与男性更多的户外活动行为有关。

鉴于恙病患者溃疡与焦痂或缺如，或隐蔽难寻，寻找敏感性高的辅助检查协助诊断是临床所需。常用的血清学测定中，WFT应因其简单、快速的优点在我国临床检验科开展较多，但发病早期WFT敏感性偏低，且变形杆菌、钩端螺旋体、回归热螺旋体感染的患者也可出现阳性结果，特异性较差^[8]。本研究中WFT检测阳性率为33.96%，与Fomda等^[9]的研究结果类似。本研究中另一种血清学测定采用的是CIA检测恙虫病立克次体IgM、IgG，该方法也是快速、简单的恙虫病抗体检测方法，于乐成^[10]等对CIA检测恙虫病的研究发现，CIA的诊断敏感性为100%，高于本研究中CIA检测敏感性，但该研究仅纳入9例患者。

mNGS是一种非培养的分子诊断技术，其通过对样本中的病原体序列信息与数据库进行对比，从而确定致病病原体，具有高敏感性、高精确性、耗时短的优点，且受抗菌药物影响小^[11]，目前在不明原因发热的病原诊断中运用广泛，尤其对罕见病原的诊断意义非凡。薛莉颖^[12]等研究发现，在恙虫病疫源地海南，不明原因发热患者中有32.79%(223/680)最后确诊为恙虫病，提示在恙虫病高发地区，尤其是在流行季节的不明原因发热患者需排查恙虫病，但若患者无典型的焦痂或溃疡，诊断较困难。目前对mNGS在恙虫病诊断中的运用研究开展较少，多为使用mNGS诊断无焦痂恙虫病的个案报道^[13]，既往研究显示，mNGS在恙虫病的早期诊断方面优于WFT^[14]。本研究中mNGS恙虫病立克次体检出率87.27%，阳性率明显高于WFT。本研究55例患者中7例mNGS未检测出恙虫病立克次体，但经CIA检测后确诊恙虫病，提示mNGS联合CIA检测可以提高恙虫病的诊断率。本研究mNGS检测前是否使用抗菌药物对mNGS检测阳性率影响无统计学意义($P=0.55$)，提示抗生素的使用不影响mNGS的检测。

本研究中mNGS检测确诊时间(1.50 ± 0.14)d较CIA检测时间(1.90 ± 0.27)d短，或与CIA检测需送至厦门疾控中心，程序较为繁琐有关。虽然mNGS检测费用高于WFT、CIA检测，但因其有更高的阳性率、检测耗时更短，更有利于快速临床决策，故总体来说mNGS检测利大于弊。但mNGS技术仍存在不足之处：(1)样本自身核酸背景DNA/RNA会影响检测^[15]；(2)对标本要求较高，当标本被污染时，检测易出现假阳性；(3)仍有假阴性存在；(4)缺乏明确的诊断标准^[16]，需要专业人员解读、判断检测结果，并需要结合临床其他表现判断检出菌是否为致病病原；(5)mNGS药敏结果源自于耐药基因的检测^[17]，与临床实际用药敏感情况存在差异；(6)费效比问题，且尚未纳入医疗保险。

恙虫患者的临床症状及体征常不典型，且恙虫病东方体分离培养条件苛刻，临床上很难通过培养检测出致病病原体，因缺乏病原学证据，临床上易误诊^[18-19]，导致无法准确使用敏

感抗菌药物治疗，常就此错失最佳治疗时间，甚至可逐步进展导致多系统器官的损害，危及生命。本研究中恙虫病误诊率高达58.18%，最容易被误诊为肺部感染(32.72%)，既往研究显示肺部是恙虫病东方体重要且常见的靶器官之一，恙虫病患者常合并肺部感染，重症患者甚至会发生肺间质病变^[1]。

综上所述，检测前使用抗菌药物对mNGS、WFT、CIA检测敏感度均无影响，但mNGS在恙虫患者的病原检测方面较WFT、CIA检测敏感度更高，可运用于恙虫患者的早期诊断，为临床用药提供精确依据。作为回顾性分析，本研究有一定的局限性，首先信息不够完整，导致统计分析存在偏倚；其次，本研究样本量较小，mNGS、WFT、CIA分别送检3个不同的实验室，易造成偏倚。未来需要更大样本的前瞻性队列研究或随机对照研究来进一步探索。

参考文献

- [1] Xu G, Walker DH, Jupiter D, et al. A review of the global epidemiology of scrub typhus [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2017, 11 (11): e0006062.
- [2] 李兰娟, 任红. 传染病学 [M]. 第9版. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 147-150.
- [3] Qin C, Zhang S, Zhao Y, et al. Diagnostic value of metagenomic next-generation sequencing in sepsis and bloodstream infection [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1117987.
- [4] Grumaz C, Hoffmann A, Vainshtein Y, et al. Rapid next-generation sequencing-based diagnostics of bacteremia in septic patients [J]. *J Mol Diagn*, 2020, 22 (3): 405-418.
- [5] 中国疾病预防控制中心. 恙虫病预防控制技术指南 (试行) [EB/OL]. [2009-01-05].
- [6] 郭志南, 陈敏, 陈华芳, 等. 厦门市恙虫病流行病学特征与防控策略 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2018, 34 (11): 1049-1055, 1067.
- [7] Qian L, Wang Y, Wei X, et al. Epidemiological characteristics and spatiotemporal patterns of scrub typhus in Fujian province during 2012-2020 [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2022, 16 (9): e0010278.
- [8] Kala D, Gupta S, Nagraik R, et al. Diagnosis of scrub typhus: recent advancements and challenges [J]. *3 Biotech*, 2020, 10 (9): 396.
- [9] Fomda BA, Abdullah N, Mir YB, et al. Comparative evaluation of serological tests used for the diagnosis of rickettsial diseases prevalent in the temperate region of North India [J]. *Indian J Med Microbiol*, 2022, 40 (2): 294-298.
- [10] 于乐成, 汪茂荣, 何长伦, 等. 外-斐反应与胶体金免疫色谱法对恙虫病的诊断价值 [J]. *江苏医药*, 2009, 35: 1395-1397.
- [11] 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.
- [12] 薛莉颖, 谢晓菲, 王高玉, 等. 海南省680例不明原因发热患者恙虫病东方体感染调查 [J]. *中国热带医学*, 2022, 22 (10): 930-934.
- [13] Li J, Chen C, Zou F, et al. Diagnosing scrub typhus without eschar: a case report using metagenomic next-generation sequencing (mNGS) [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9 (14): 1190.
- [14] Liu X, Zhang Y, Zhang J, et al. The early diagnosis of scrub typhus by metagenomic next-generation sequencing [J]. *Front Public Health*, 2021, 9: 755228.
- [15] 赵瑞芬, 董燕. 肺隐球菌病的CT影像学表现和病理特征分析 [J]. *中国CT和MRI杂志*, 2025, 23 (3): 52-55.
- [16] 谢婷婷, 王俊卿, 王哲, 等. 新型冠状病毒 (2019-nCoV) 肺炎临床及CT诊断 [J]. *中国CT和MRI杂志*, 2020, 18 (3): 147-150.
- [17] Wu X, Li Y, Zhang M, et al. Etiology of severe community-acquired pneumonia in adults based on metagenomic next-generation sequencing: a prospective multicenter study [J]. *Infect Dis Ther*, 2020, 9 (4): 1003-1015.
- [18] Xu P, Mao G, Jiang H, et al. Analysis of the epidemiological and clinical characteristics of 65 patients with scrub typhus on the east coast of China [J]. *Ann Palliat Med*, 2021, 10 (5): 5694-5705.
- [19] Gu XL, Qi R, Li WQ, et al. Misdiagnosis of scrub typhus as hemorrhagic fever with renal syndrome and potential co-infection of both diseases in patients in Shandong Province, China, 2013-2014 [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2021, 15 (3): e0009270.

(收稿日期: 2024-07-09)

(校对编辑: 赵望淇)