

宏基因组测序在一起聚集性腹泻暴发事件病原学分析中的应用

王倩¹, 高洁², 郭晓晨², 甄博珺², 张萍², 高翔^{1*}

(1. 河北医科大学公共卫生学院卫生检验与检疫教研室, 河北石家庄 050017; 2. 北京市通州区疾病预防控制中心微生物检验科, 北京 101199)

[摘要] **目的** 应用宏基因组测序(metagenomic next-generation sequencing, mNGS)技术对一起腹泻病毒检测阴性的聚集性腹泻暴发事件进行病原学分析, 探讨mNGS在腹泻暴发事件中的应用价值。**方法** 收集2023年9月一起腹泻病毒检测阴性的腹泻暴发事件的6份肛拭子样本, 对其进行mNGS, 基于测序数据分析暴发事件的病原体以及毒力基因、耐药基因携带情况。**结果** 6份肛拭子样本均检测到大肠埃希菌, reads数为74~38 446, 相对丰度为0.01%~20.15%, 其中仅样本S5中检出肠集聚性大肠埃希菌中多种编码肠毒素的毒力基因 *astA*、*set1A*、*set1B* 及 *pet* 等; 5份样本检测到产气荚膜梭菌, reads数为32~3 056, 相对丰度为0.01%~0.10%, 其中2株检出 α 毒素基因 *cpa*, 主要检出四环素类耐药基因 *tet(M)*、*tetB(P)*、*tetA(P)*; 4份样本中检测到沙门菌, reads数为39~302, 相对丰度为0.01%~0.03%, 主要检出沙门菌毒力岛基因 *invC*、*prgH*、*prgJ*、*prgK* 等及氨基糖苷类、 β -内酰胺类、喹诺酮类等多处基因斜体种耐药基因; 1份样本中检测到空肠弯曲菌, reads数为640, 相对丰度为0.05%, 主要检出氨基糖苷类耐药基因 *APH(2'')-I_f*、*APH(3')-III_a* 及四环素类耐药基因 *tet(O)*, 未检出毒力基因。**结论** 本次聚集性腹泻暴发事件可能由产气荚膜梭菌、沙门菌、空肠弯曲菌及肠集聚性大肠埃希菌感染导致, mNGS可应用于腹泻暴发的病原学诊断, 并指导临床精准用药及耐药菌防控监测。

[关键词] 腹泻; 宏基因组测序; 病原体; 毒力基因; 耐药基因 doi:10.3969/j.issn.1007-3205.2026.03.015

[中图分类号] R442.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-3205(2026)03-0341-05

Application of metagenomic next-generation sequencing in the etiological analysis of a clustered diarrhea outbreak event

WANG Qian¹, GAO Jie², GUO Xiao-chen², ZHEN Bo-jun², ZHANG Ping², GAO Xiang^{1*}

(1. Health Inspection and Quarantine Teaching and Research Office, School of Public Health, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Department of Microbial Inspection, Tongzhou District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 101199, China)

[Abstract] **Objective** To apply metagenomic next-generation sequencing (mNGS) for etiological analysis in a clustered diarrhea outbreak with negative viral test results, and to investigate the application value of mNGS in diarrhea outbreaks. **Methods** mNGS was performed on 6 anal swab samples collected from a diarrhea outbreak with negative viral test results in September 2023. The causative pathogen, as well as the presence of virulence genes and drug resistance genes, was analyzed based on the sequencing data. **Results** *Escherichia coli* was detected in all 6 anal swab samples, with read counts of 74—38 446 and relative abundances of 0.01%—20.15%. Among these, multiple enterotoxin-encoding virulence genes of enteroaggregative *Escherichia coli*, including *astA*, *set1A*, *set1B*, and *pet*, were detected only in sample S5. *Clostridium perfringens* was detected in 5 samples, with read counts of 32—3 056 and relative abundances of 0.01%—0.10%. The α toxin gene *cpa* was identified in 2 of these strains. Tetracycline resistance genes *tet(M)*, *tetB(P)* and *tetA(P)* were predominantly detected. *Salmonella enterica* was detected in 4 samples, with read counts of 39—302 and relative abundances of 0.01%—0.03%. *Salmonella* pathogenicity island

[收稿日期] 2025-12-16

[基金项目] 北京市通州区科技创新人才资助项目(JCQN2023026)

[作者简介] 王倩(2001-), 女, 河北秦皇岛人, 河北医科大学公共卫生学院医学硕士研究生, 从事微生物检验相关研究。

*通信作者。E-mail: gaoxiang312@163.com

genes, including *invC*, *prgH*, *prgJ*, and *prgK*, were mainly identified, along with various resistance genes for aminoglycosides, β -lactams and quinolones. *Campylobacter jejuni* was detected in 1 sample, with read counts of 640 and a relative abundance of 0.05%. Aminoglycoside resistance genes *APH(2'')-I_f* and *APH(3')-III_a*, along with the tetracycline resistance gene *tet(O)*, were predominantly detected, while no virulence genes were identified.

Conclusion This clustered diarrhea outbreak is potentially caused by *Clostridium perfringens*, *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, and enteroaggregative *Escherichia coli*. mNGS can be applied for the etiological diagnosis of diarrhea outbreaks and can guide precise clinical medication as well as the surveillance and control of drug-resistant bacteria.

[Key words] diarrhea; metagenomic next-generation sequencing; pathogen; virulence genes; drug resistance genes

感染性腹泻是指由细菌、病毒、真菌或寄生虫引起的以腹泻为主要临床表现的胃肠道疾病^[1], 发病率高、流行广泛, 已有研究报道腹泻是5岁以下儿童死亡的第三大原因^[2]。引起感染性腹泻的病原体种类繁多, 快速、准确地识别病原体对指导临床治疗、控制病情发展至关重要, 可有效改善腹泻患者预后。宏基因组测序(metagenomic next-generation sequencing, mNGS)是近年来新兴的微生物诊断技术, 通过高通量、无假设、无偏倚的测序从而更全面地检测样本中已知、甚至新发的病原体^[3], 具有速度快、敏感度高、检测范围广等显著优势^[4], 已广泛应用于临床感染性疾病的病原学诊断中。然而mNGS在腹泻病原体鉴定中的应用相对较少, 但随着mNGS的持续发展、测序成本的降低, mNGS可为快速诊断腹泻病原体以及进一步精准防控提供依据^[5]。本研究回顾性分析2023年9月北京市通州区报告的一起腹泻病毒检测阴性的聚集性腹泻暴发事件, 探讨mNGS在腹泻暴发的病原学诊断以及耐药分析中的应用价值, 为相似腹泻暴发事件提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2023年9月, 北京市通州区某小学先后多名学生出现腹泻症状, 辖区疾病预防控制中心接到报告后立即前往该校开展流行病学调查, 最终于卫生院接受治疗的腹泻患者中采集肛拭子样本共6份, 均为9岁男性患者, 无剩余食品和环境样本采集。对肛拭子样本采用5种腹泻病毒多重核酸测试剂盒(包括轮状病毒、诺如病毒、肠道腺病毒、星状病毒、札如病毒)检测病原体, 结果为阴性。

本研究已通过北京市通州区疾病预防控制中心伦理委员会批准。

1.2 主要试剂及仪器 核酸提取试剂盒(凯杰);

Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen); Qubit® ssDNA Assay Kit (Invitrogen); MGIEasy 酶切DNA文库制备试剂盒(华大基因); MGIEasy DNA纯化磁珠试剂盒(华大基因); MGIEasy DNA Adapters-16试剂盒(华大基因); MGIEasy 环化模块(华大基因); DNBSEQ一步法DNB制备试剂盒(华大基因); MGISEQ-2000RS高通量测序试剂盒(华大基因); MGISEQ-2000RS测序载片(华大基因); Qubit®3.0荧光定量仪(Invitrogen); MGISP-100自动化建库仪(华大基因); MGISEQ-2000RS基因测序仪(华大基因)。

1.3 mNGS检测及测序数据分析 提取6例肛拭子样本DNA, 通过MGISP-100自动化建库平台进行DNA文库构建, 过程包括酶切打断、片段选择、末端修复、连接接头和PCR扩增, 之后将DNA文库进行变性解旋、单链环化, 经滚环复制后形成DNA纳米球(DNA nainoball, DNB), 将合格的DNB加载到测序载片上, 利用MGISEQ-2000RS基因测序仪进行高通量测序。

对原始测序数据进行质控, 通过华大基因的微生物快速识别平台去除低质量、低复杂度和人源基因组序列, 将质控后的高质量测序数据与微生物基因组数据库进行比对, 得到样本的微生物鉴定结果; 再将序列与毒力因子数据库(Virulence Factor Database, VFDB)、抗生素抗性基因数据库(Structured Antibiotic Resistance Genes, SARG)中收录的基因序列进行比对, 得到样本携带的毒力基因和耐药基因结果。

2 结果

2.1 病原检出结果 mNGS结果显示, 在6份肛拭子样本中, 均检测到一定丰度的大肠埃希菌, reads数为74~38 446, 相对丰度为0.01%~

20.15%；5份样本中检测到产气荚膜梭菌，reads数为32~3 056，相对丰度为0.01%~0.10%；4份样本中检测到沙门菌，reads数为39~302，相对丰度为0.01%~0.03%；1份样本中检测到空肠弯

曲菌，reads数为640，相对丰度为0.05%。除此之外还检测到肛拭子样本中一些常见菌，但无明显其他致病菌。不同样本中病原体reads数目及相对丰度见表1。

表1 mNGS检出的病原体 reads 数目及相对丰度在不同病例中分布

Table 1 The distribution of pathogen read counts and relative abundance in different cases detected by mNGS

样品编号	测序总序列片段数目	Q30(%)	大肠埃希菌 (数目,%)	产气荚膜梭菌 (数目,%)	沙门菌 (数目,%)	空肠弯曲菌 (数目,%)
S1	26 388 753	92.40	3 272(5.30)	179(0.01)	39(0.01)	640(0.05)
S2	23 850 587	92.49	7 805(3.80)	314(0.01)	78(0.01)	—
S3	21 481 326	91.68	187(0.17)	54(0.01)	—	—
S4	26 824 607	94.23	38 446(20.15)	32(0.01)	302(0.03)	—
S5	20 417 534	91.56	4 345(3.42)	3 056(0.10)	—	—
S6	4 580 591	91.11	74(0.01)	—	100(0.01)	—

2.2 毒力基因检测结果 在6份肛拭子样本中，1份样本（S5）检出肠集聚性大肠埃希菌中编码热稳定肠毒素 EAST1 的毒力基因 *astA*、肠毒素 ShET1 基因 *set1A* 及 *set1B*、肠毒素 PET 基因 *pet* 以及其他毒力基因 *pic*、*aatA*、*aatB*、*aatC*、*aatD*、*aatP*、*aaP* 等，其余样本未检出其他致泄性大肠埃希菌的典型毒力基因；在5株产气荚膜梭菌中，2株（S1、S5）检出 α 毒素基因 *cpa*，未检出其他毒素基因；4株沙门菌中均检测到不同种类、数量的沙门菌毒力岛相关基因，包括毒力岛1基因 *invC*、*prgH*、*prgJ*、*prgK* 及毒力岛2基因 *ssaO*、*ssaP*、

ssaT、*ssaU* 等；空肠弯曲菌未检出毒力基因。

2.3 耐药基因检测结果 产气荚膜梭菌主要检出四环素类耐药基因，其中5株均检出 *tet (M)* 基因，4株检出 *tetB (P)* 基因，3株检出 *tetA (P)* 基因；空肠弯曲菌主要检出氨基糖苷类耐药基因 *APH (2'') -I_f*、*APH (3') -III_a* 及四环素类耐药基因 *tet (O)*；沙门菌主要检出氨基糖苷类、 β -内酰胺类、喹诺酮类等多种耐药基因，并检出 *MacAB-TolC*、*EmrAB-TolC* 等外排泵系统相关基因，沙门菌耐药基因热图见图1。

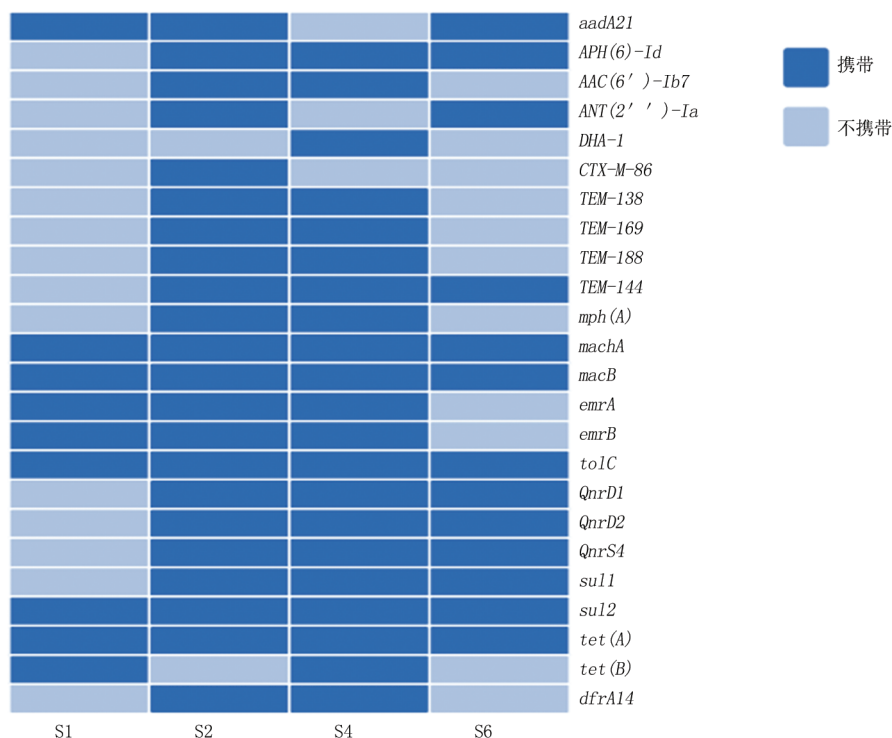


图1 mNGS检出的4株沙门菌的耐药基因热图

Figure 1 Heatmap of drug resistance genes in 4 *Salmonella enteric* detected by mNGS

3 讨 论

引起感染性腹泻的病原体复杂多样,目前传统病原检测包括涂片法、培养法、PCR等,涂片法可诊断寄生虫感染,但需特殊染色,敏感度低;培养法成本低、特异度高,但耗时长,结果易受病原体载量、培养基选择等因素影响;PCR速度快、剪感度高,但常需针对高度怀疑的病原体^[6]。传统方法优缺点并存,有时不能满足临床需要。而缺乏病原学证据的情况下,长期经验抗感染治疗可能导致细菌耐药日益严重^[7-8]。随着二代测序技术的发展,mNGS不仅能一次性获得样本微生物的群落构成,还可经生物信息学方法进行毒力、耐药基因检测,已在临床病原诊断及指导治疗中表现出巨大潜力^[5]。

本研究中的暴发事件现场调查时,5种肠道病毒初筛结果阴性,且由于在患者恢复期采样,病原体可能已被大量清除。面对此类复杂场景,传统检测方法已不具优势。本研究对6份样本进行mNGS检测,综合分析物种鉴定及毒力基因结果后,最终显示4株产气荚膜梭菌、4株沙门菌,1株空肠弯曲菌及1株肠集聚性大肠埃希菌。这归功于mNGS独特的高敏感、广覆盖优势,它无需提前假设,不依赖病原分离与培养,弥补了传统方法的局限性,通过核酸序列比对精准识别病原体,对检测低载量、难培养甚至罕见病原体具有显著优势^[9-10]。研究^[11]表明mNGS在11例传统方法阴性的腹泻样本中检出3株空肠弯曲菌及2株沙门菌。崔志刚等^[5]对腹泻暴发的研究显示mNGS能够检出多重荧光PCR未能检测到的沙门菌和志贺菌。一项对新生儿聚集性感染的调查^[12]中,6例患儿肠道通用病毒PCR阳性,后开展轮状病毒、埃可病毒11型特异性PCR结果均阴性,最终通过mNGS检测到患儿粪便、血清中低拷贝数的埃可病毒18型。

mNGS的高通量测序可覆盖携带耐药基因的质粒等^[13],可快速提供较为全面、系统的耐药信息,有利于指导临床精准治疗及耐药菌的防控监测。已有研究^[14-15]显示mNGS检出的耐药基因与实际耐药表型大部分一致。本研究产气荚膜梭菌检出的3种耐药基因,有研究^[16-18]显示与四环素耐药密切相关,也有研究^[19]表明空肠弯曲菌 $APH(2'')-Ij$ 基因对庆大霉素和链霉素、 $tet(O)$ 基因对四环素均有良好的预测耐药能力,临床医师可据此调整抗生素策略。本研究显示沙门菌携

带多种耐药基因,其中 $CTX-M$ 、 TEM 型为产超广谱 β -内酰胺酶基因,是菌株出现多重耐药的重要原因^[20]。近年来沙门菌耐药水平整体较高^[21],亚洲地区多重耐药率高达50.96%^[22]。这主要由于这些基因通常位于质粒上,易通过水平基因转移在不同菌种之间传播^[23]。因此,此类基因的检出不仅提示临床需谨慎制定抗感染方案,亦具有潜在的公共卫生风险,提示相关部门应强化感染控制措施,以防止其进一步传播与扩散。

综上所述,本次腹泻暴发可能由产气荚膜梭菌、沙门菌、空肠弯曲菌及肠集聚性大肠埃希菌感染导致。mNGS可应用于腹泻暴发的病原学诊断,并指导临床精准用药及耐药菌防控监测。本研究具有局限性:mNGS数据量庞大复杂,目前尚无统一标准区分定植、污染及致病病原体,需结合流行病学史、临床症状、免疫状态等综合判断^[24-25]。由于本事件无剩余食品和环境样本采集,故难以进一步确认引起暴发的主要责任病原体及溯源感染途径。随着测序技术的不断发展,在完善改进质量控制、病原识别方法、解读标准等技术问题后,mNGS将得到更广泛的应用^[26]。

[参考文献]

- [1] 国家卫生健康委员会,国家中医药管理局.儿童急性感染性腹泻病诊疗规范(2020年版)[J].传染病信息,2021,34(1):7-14.
- [2] GBD 2019 Under-5 Mortality Collaborators. Global, regional, and national progress towards Sustainable Development Goal 3.2 for neonatal and child health: All-cause and cause-specific mortality findings from the Global Burden of Disease Study 2019[J]. Lancet,2021,398(10303):870-905.
- [3] 王明慧,蒋露晰,宋美君.肺泡灌洗液宏基因组二代测序技术在肺部感染病原诊断中的作用[J].中国感染与化疗杂志,2023,23(3):385-389.
- [4] 林明珍,赵磊.宏基因组的二代测序技术在初治失败社区获得性肺炎患者病原菌检测中的应用价值[J].临床肺科杂志,2021,26(8):1180-1184.
- [5] 崔志刚,遇晓杰,赵嘉咏,等.宏基因组测序在腹泻暴发调查中的应用[J].疾病监测,2021,36(6):616-621.
- [6] 约尔兰姆·托合提,陆妍,朱雨悦,等.儿童腹泻病原体常用检测方法研究进展[J].检验医学与临床,2022,19(23):3298-3302.
- [7] 吴昊,程海林,方玉林,等.宏基因组二代测序技术在重症肺炎病原学诊断中的应用价值[J].新疆医科大学学报,2022,45(11):1301-1305.
- [8] 吴捷.重视儿童感染性腹泻的规范诊疗[J].中国实用儿科杂志,2025,40(6):459-463.
- [9] 中华医学会检验医学分会.高通量宏基因组测序技术检测病原微生物的临床应用规范化专家共识[J].中华检验医学杂

- 志, 2020, 43(12): 1181-1195.
- [10] Chiu CY, Miller SA. Clinical metagenomics [J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(6): 341-355.
- [11] Joensen KG, Engsbro ALØ, Lukjancenko O, et al. Evaluating next-generation sequencing for direct clinical diagnostics in diarrhoeal disease [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2017, 36(7): 1325-1338.
- [12] 尚永朋, 赵宇曦, 邓名贵, 等. 宏基因组二代测序技术辅助诊断新生儿埃可病毒 18 型聚集性感染 [J]. *中国感染控制杂志*, 2022, 21(4): 317-322.
- [13] 李永军, 王雅杰. 宏基因组耐药基因的报告与解读 [J/CD]. *现代医学与健康研究电子杂志*, 2022, 6(6): 89-92.
- [14] Liu H, Zhang Y, Yang J, et al. Application of mNGS in the Etiological analysis of lower respiratory tract infections and the prediction of drug resistance [J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10(1): e0250221.
- [15] Lin L, Zhang R, Zhang Z, et al. Clinical Value of metagenomics next-generation sequencing in antibiotic resistance of a patient with severe refractory *mycoplasma pneumoniae* pneumonia: A case report [J]. *Infect Drug Resist*, 2023, 16: 4593-4597.
- [16] Feng Y, Fan X, Zhu L, et al. Phylogenetic and genomic analysis reveals high genomic openness and genetic diversity of *Clostridium perfringens* [J]. *Microb Genom*, 2020, 6(10): mgen000441.
- [17] Park M, Rafii F. The prevalence of plasmid-coded cpe enterotoxin, $\beta(2)$ toxin, tpeL toxin, and tetracycline resistance in *Clostridium perfringens* strains isolated from different sources [J]. *Anaerobe*, 2019, 56: 124-129.
- [18] 范学政, 李文平, 秦玉明, 等. 产气荚膜梭菌及其公共卫生危害 [J]. *中国兽药杂志*, 2021, 55(9): 57-64.
- [19] 许艳平, 渠淑晴, 王潇, 等. 2023—2024 年徐州市空肠弯曲菌耐药及毒力基因分析 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2025, 16(10): 112-118.
- [20] 李高芬, 李俊, 邱秀燕, 等. 儿童非伤寒沙门菌胃肠炎抗感染治疗研究进展 [J]. *中国药业*, 2024, 33(17): 152-157.
- [21] 李金勍, 牛亚楠, 秦璞, 等. 2021—2022 年全国多中心沙门菌血清分型及耐药性分析 [J]. *协和医学杂志*, 2025, 16(5): 1120-1130.
- [22] Wang Y, Xu X, Jia S, et al. A global atlas and drivers of antimicrobial resistance in *Salmonella* during 1900—2023 [J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 4611.
- [23] Pribul BR, Festivo ML, de Souza MM, et al. Characterization of quinolone resistance in *Salmonella* spp. Isolates from food products and human samples in Brazil [J]. *Braz J Microbiol*, 2016, 47(1): 196-201.
- [24] Han D, Li Z, Li R, et al. mNGS in clinical microbiology laboratories: On the road to maturity [J]. *Crit Rev Microbiol*, 2019, 45(5/6): 668-685.
- [25] 《中华传染病杂志》编辑委员会. 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.
- [26] 王振奇, 白净卫, 赵秀英. 宏基因组二代测序技术在临床应用中的研究进展 [J]. *北京医学*, 2023, 45(3): 243-248.
- (本文编辑: 何祯)