

宏基因组学技术在感染性眼病诊断中的应用

于锦霞^{1,2}, 王莹^{1,2}, 郝建霞³, 高延娥^{2,4}, 毕宏生^{1,2,4}, 解孝锋^{1,2}

引用:于锦霞,王莹,郝建霞,等.宏基因组学技术在感染性眼病诊断中的应用.国际眼科杂志 2021;21(12):2090-2095

基金项目:国家中医药管理局专科专病循证能力提升项目(No. 2019XZZX-YK010)

作者单位:¹(250014)中国山东省济南市,山东中医药大学;
²(250002)中国山东省济南市,山东中医药大学附属眼科医院;
³(276400)中国山东省沂水县人民医院急诊中心;
⁴(250002)中国山东省济南市,山东省眼病防治研究院

作者简介:于锦霞,毕业于山东中医药大学,硕士研究生,研究方向:中西医结合眼科疾病研究。

通讯作者:解孝锋,毕业于山东中医药大学,博士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:中西医结合眼科疾病研究. yankeboshi@126.com

收稿日期:2021-01-29 修回日期:2021-10-28

摘要

宏基因组学(metagenomics, MGS)技术是近年快速发展起来的微生物研究技术,在病原微生物检测中具有广阔的应用前景。相较于传统依赖于微生物培养的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)检测技术,宏基因组学技术无需培养,直接利用从少量样本中提取全部微生物DNA,依靠高通量测序技术(high-throughput sequencing, HTS)可快速地对病原微生物的鉴定和定量检测,为临床提供精准诊断依据,有利于更好地指导医生制定治疗方案。眼科疾病中,有不少由病原微生物引发的疾病存在发病快、样品难获取、诊断困难等难题,宏基因组学的发展为眼科疾病病原的检测提供新的技术手段和思路,本文将对宏基因组学技术在眼科疾病诊断中的应用进行综述,主要介绍宏基因组学技术应用于眼表、内眼的代表性眼科疾病诊断的研究进展,分析和总结该技术在临床应用中展现的优势和不足,及其发展前景。

关键词:宏基因组学;病原微生物;角膜炎;干眼;眼内炎;葡萄膜炎

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2021.12.13

Application of metagenomics in the diagnosis of ophthalmic diseases

Jin-Xia Yu^{1,2}, Ying Wang^{1,2}, Jian-Xia Hao³, Yan-E Gao^{2,4}, Hong-Sheng Bi^{1,2,4}, Xiao-Feng Xie^{1,2}

Foundation item: Project of National Administration of Traditional Chinese Medicine to Improve the Evidence-based Ability of Specialized Diseases (No.2019XZZX-YK010)

¹Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, Shandong Province, China; ²Affiliated Eye Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan

250002, Shandong Province, China; ³Emergency Center, Yishui County People's Hospital, Linyi 276400, Shandong Province, China; ⁴Institute of Ophthalmology Disease Prevention and Control of Shandong, Jinan 250002, Shandong Province, China

Correspondence to: Xiao-Feng Xie. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, Shandong Province, China; Affiliated Eye Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250002, Shandong Province, China. yankeboshi@126.com

Received: 2021-01-29 Accepted: 2021-10-28

Abstract

• In recent years, metagenomics (MGS) is the fastest growing fields in microbiology, and has been broadly applied in the detection of pathogenic microorganisms. Comparing with the traditional polymerase chain reaction (PCR)-based detecting technology which relies on microbial culture, MGS can directly detect the sequences of the total microbial DNA from uncultured samples with the high-throughput sequencing platform. It can help the doctors identify the involved pathogens more quickly and provide better medication guidance. Among the known ophthalmic diseases, a lot of them are caused by the infection of pathogens and have many difficulties in clinical diagnosis and treatment. The development of metagenomics provides us a more effective and reliable way for detecting the pathogens of ophthalmic diseases. This article was aimed to review the development of MGS, applications and in the field of ophthalmology, as well as its current deficiencies and the possible development directions in the future.

• KEYWORDS: metagenomics; pathogenic microorganism; keratitis; dry eye; endophthalmitis; uveitis

Citation: Yu JX, Wang Y, Hao JX, et al. Application of metagenomics in the diagnosis of ophthalmic diseases. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2021;21(12):2090-2095

0 引言

在病原微生物和病原体的研究诊断中,传统的技术手段主要依赖于对微生物的分离和纯化培养,然而研究表明目前有99%以上的微生物种类是无法进行体外培养的。常规基于聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)检测技术的病原体分析方法虽然可以快速的检测病原微生物,但是需要根据已知基因序列合成引物,因此,PCR技术只能用于对已知病原微生物的检测,而对未知病原体则显得束手无策^[1-3]。近年来,二代测序(next generation sequencing, NGS)技术凭借其通量大、准确性高、无需微生物培养等诸多优势,极大地推动了以宏基因组学

为代表的微生物相关领域的快速发展^[4-5]。随着测序成本的快速降低,宏基因组学技术被逐步应用于病原体诊断和病原微生物的研究中,有助于提高临床诊断准确性,促进病原微生物致病机制研究^[6-7]。

眼部微生物对眼睛的正常生理状态起着重要作用,微生物群落结构的变化可能会导致眼部疾病^[8]。早在1907年,Axenfeld就首次尝试对眼部微生物进行研究^[9]。然而,由于眼睛具有精细的解剖结构,难以获得足量的样本、传统诊断技术的局限性等原因^[2],导致人们对眼部微生物群落的研究十分不足,对眼部微生物群及其功能也所知甚少^[10],因此对眼部疾病的诊断及治疗也存在很多困难。宏基因组学开创的无需假设病原体的诊断方法,凭借其快速、高效和准确的分析优势,在多种眼部疾病的诊断中广泛应用,尤其是眼部感染性疾病^[8],为提高某些眼科疾病尤其是眼部感染性疾病的诊断准确性、优化治疗方案奠定了技术基础^[2],现对宏基因组学技术在眼科疾病诊断中的应用进行综述。

1 眼表疾病

1.1 角膜炎

角膜炎(keratitis)是一种眼睛的炎症性疾病,如果得不到及时医治,可能会导致威胁视力的并发症,最终导致失明。全球每年有超过100万人感染角膜炎。病原微生物感染引发的角膜炎是一种严重的感染性眼病,是世界范围内角膜混浊和视力下降的主要原因。

研究表明细菌、真菌或者病毒等类型的微生物感染均可以引发角膜炎^[11-12]。宏基因组技术较早用于细菌性角膜炎(bacterial keratitis, BK)的病原体研究中。2013年,Tuzhikov等^[13]采用宏基因组技术对角膜炎患者和健康个体的眼表样品进行检测,结果发现,健康个体的眼表微生物群落主要以变形菌门为主,而在角膜炎患者的受损伤眼中,铜绿假单胞菌则是优势菌种。张茹^[14]采用基于Illumina高通量测序的宏基因组技术检测了32例BK患者和32名健康对照者,结果发现在细菌门类水平上,两组眼表微生态中含量最高的都是变形菌门(proteobacteria),在健康对照组中放线菌门(actinobacteria)含量较高,而在角膜炎患者的眼表微生态中,厚壁菌门(firmicutes)、异常球菌-栖热菌门(deinococcus-thermus)以及拟杆菌门(bacteroidetes)含量较高;在种属水平上,健康人群的眼表微生态多样性明显高于角膜炎患者组,其中痤疮丙酸杆菌(propionibacterium acnes)、表皮葡萄球菌(staphylococcus epidermidis)及拥挤棒状杆菌(corynebacterium accolens)等18种菌在对照组中的丰度均显著高于疾病组。

真菌性角膜炎(fungal keratitis, FK)由于真菌培养的低阳性率^[15],使得采用传统PCR检测技术难以鉴定其病原体,而宏基因组技术的使用则有助于准确鉴定FK的致病菌种。比如,Ge等^[16]采用基于16S rRNA基因测序的宏基因组技术对健康眼、FK患者的感染眼和对侧眼的结膜拭子样本进行检测,使用操作分类单元对微生物多样性进行分析,结果发现感染眼和对侧眼的眼表微生物群落中的细菌多样性降低,并且棒状杆菌(corynebacterium)和葡萄球菌的丰度降低,假单胞菌、无色杆菌(achromobacter)、柄杆菌(caulobacter)、嗜冷杆菌(psychrobacter)的丰度增加,据此推测这些变化可能会增加FK发病的风险。Prashanthi等^[12]采用常规PCR检测技术和基于NGS的宏基因组检测技术,分别对FK患者的感染眼、健康者的双眼的进行微生物分析,结果发现相较于PCR技术的低检

出率,宏基因技术在FK患者眼表检出了更多种类的真菌,通过与健康者进行比较,发现大多数FK患者眼部微生物群落中的曲霉菌属(aspergillus)、毛球腔菌属(setosphaeria)、马拉色菌属(malassezia)等11个菌属发生了显著的变化。

这些研究表明,宏基因组技术能直接用于角膜炎眼表样品的检测,尤其是克服了真菌性病原体难以培养的障碍,而且能准确的检测出角膜炎感染眼中异常的菌群变化,识别出可能的病原体,提高了人们对微生物性角膜炎的病原体类型和发病机制的认识,有助于临床医生根据病原体类型做出针对性的治疗^[16-18]。

1.2 干眼

干眼病(dry eye disease, DED)是一种多因素炎症性疾病,全球患病率为5%~34%。眼表微生物群的改变被认为是DED的主要病理生理学原因之一,如果眼部微生物种群的平衡被打破,可能导致由免疫作用引起的眼部黏膜部位的炎症反应^[19]。因此,研究DED眼表微生物群落的变化,有助于研发新的治疗方法,恢复眼表正常的微生物群落,进而减轻和治疗DED。

宏基因组技术应用于DED患者眼部微生物群落的研究极大地提高了对该疾病致病微生物的认识。早在2007年,Graham等^[20]采用DNA测序技术,对DED患者和健康者(共91人)的眼表样本进行微生物检测发现,与正常眼的微生物分布相比,芽孢杆菌(bacillus sp.)和产酸克雷伯菌(klebsiella oxytoca)等菌种仅存在于DED患者的眼表中。2016年,de Paiva等^[21]采用了16S rDNA测序技术,分别对DED患者和健康者的结膜眼表进行检测微生物发现,DED患者的结膜眼表中厚壁菌门丰度增加,放线菌门、变形菌门和拟杆菌门丰度减少。陈红等^[22]应用宏基因组技术检测DED患者眼表微生物样本,通过计算shannon指数发现,DED患者眼表以路邓葡萄球菌(staphylococcus lugdunensis)、代尔夫特菌(delftia)、杰氏棒状杆菌(corynebacterium jeikeium)等为代表的15种微生物的相对丰度较高,健康受试者的眼部则是缓症链球菌(streptococcus mitis)、门多萨假单胞菌(pseudomonas mendocina)等为代表的10种微生物的相对丰度较高,且在代谢途径上存在着差异,并且DED患者眼表微生物中的抗生素抗性基因明显多于健康受试者。2019年,Dong等^[23]采用16S rDNA测序技术,检测了47例睑板腺功能障碍(meibomian gland dysfunction, MGD)患者和42名健康对照者的眼表微生物样本,结果发现,在门类水平上,MGD患者中厚壁菌门和变形菌门的相对丰度显著高于对照组,放线菌门的相对丰度显著低于对照组;在种属水平上,MGD患者葡萄球菌属和鞘脂单胞菌属(sphingomonas)的丰度显著高于对照组,棒状杆菌属丰度显著降低。同年,Li等^[24]采用相同的检测方法,进行研究发现假单胞菌、巴氏杆菌可能是引发MGD主要病原菌,而金黄色葡萄球菌和痤疮丙酸杆菌则与MGD并无显著相关性。2020年,Andersson等^[25]采用16S rDNA测序技术,检测了67例的眼表微生物样本,发现含泪缺乏型DED患者的眼表微生物种群多样性水平显著降低;该研究还确定假单胞菌为对照组的细菌生物标志物,而芽孢杆菌(bacilli)则被确定为含泪缺乏性DED患者的细菌生物标志物。与Andersson等^[25]的研究结果类似,Zilliox等^[26]检测DED病患者39例78眼的眼表样本发现,棒状杆菌是DED患者眼表最常见的细菌。

从这些研究案例可见,宏基因组技术可以检测出因干眼症导致的眼表微生物群落变化,并根据各类菌群的失衡程度识别出可能的病原体,从而开发出更有效的治疗方案^[27]。

1.3 沙眼 沙眼(trachoma)是由沙眼衣原体(*chlamydia trachomatis*, CT)感染导致沙眼的,是世界范围内感染致盲的主要原因。沙眼的病理生理机制是复杂和多因素的^[28]。传统的研究方法依赖于微生物培养,在沙眼患者眼部微生物群落结构的研究中存在严重局限,因而,宏基因组技术成为我们研究沙眼患者眼部微生物群落结构的重要技术手段^[29]。

2014年,Zhou等^[30]通过16s rDNA测序技术,在沙眼流行社区的105名冈比亚健康志愿者眼表样品中,发现了属于22门610属的微生物,在相对丰度高于1%的菌属中,80%的参与者中存在棒状杆菌属、链球菌属、丙酸杆菌属、葡萄球菌属、芽孢杆菌属(*bacillus*)和雷尔氏菌属(*ralstonia*);其次,发现沙眼衣原体感染与细菌多样性减少、棒状杆菌和链球菌属增加有关。2019年,Pickering等^[29]应用16s rDNA测序和宿主结膜基因表达技术,分别在儿童和成年人中检测了沙眼患者及健康的眼表微生物样本,发现在儿童中,活动性沙眼并不会导致眼部微生物的显著变化,嗜血杆菌(*haemophilus*)富集与抗菌反应相关,但与活动性沙眼无关;在成人中,瘢痕性沙眼患者的眼部细菌多样性降低,棒状杆菌属的相对丰度增加,且其丰度增加可能与眼部对微生物的先天免疫反应相关。

综上所述,沙眼衣原体的感染降低了眼部微生物群落多样性,棒状杆菌属等菌属异常增殖,从而引发沙眼症状,改善了我们对沙眼感染及其发病机制的认识。但是,目前对于沙眼衣原体感染导致眼部微生物群落变化的研究尚不足,仍需进一步研究。

1.4 其他眼表疾病 此外,宏基因组技术也是睑缘炎(blepharitis)、慢性泪囊炎(chronic dacryocystitis)、史蒂文斯-约翰逊综合征(Stevens-Johnson syndrome, SJS)等其他眼表疾病病原体检测的一种重要技术手段。已有许多研究表明微生物感染可能引发睑缘炎,但是对其病原体却知之甚少^[31]。Lee等^[31]在针对睑缘炎的宏基因组研究中发现,与健康对照组相比,睑炎患者眼表中丙酸杆菌减少,葡萄球菌、链球菌(streptophyta)、棒状杆菌和水栖菌的相对丰度增加;2018年,Jiang等^[32]的独立研究进一步发现,随着睑缘炎疾病严重程度的增加,表皮葡萄球菌(*staphylococcus epidermidis*)和麦氏棒杆菌(*corynebacterium macginleyi*)的水平升高。慢性泪囊炎是常见的泪囊疾病,可诱发急性泪囊炎、角膜炎等严重眼部并发症^[33],Eguchi等^[34]在慢性泪囊炎病例的宏基因组检测结果中,发现了副流感嗜血杆菌(*haemophilus parainfluenzae*)、葡萄球菌,以及革兰氏阴性厌氧菌(*veillonella*);此外,作者还分析了3例未接受眼科药物治疗的老年人结膜囊微生物样本,发现假单胞菌的含量最高。SJS是一种罕见但严重的皮肤不良反应,死亡率高达30%,通常是由药物或不太常见的感染引发的^[26]。Zilliox等^[26]对SJS患者的宏基因组学研究表明,57%的SJS患者至少一只眼睛中的微生物群落以葡萄球菌为主。严重的松弛眼睑综合征(lax eyelid syndrome, LES)可导致角膜炎、新生血管和溃疡^[26],Zilliox等^[26]采用宏基因组技术对LES的患者进行研究,发现棒状杆菌是LES最常见的细

菌。翼状胬肉是一种常见的慢性炎症性增殖性眼部疾病,有研究认为,免疫介导的炎症反应会引发翼状胬肉^[35]。惠娜等^[35]采用16S rDNA基因测序对翼状胬肉进行了宏基因组研究,通过比较发现,棒状杆菌在翼状胬肉患者眼表微生物群落中的丰度显著增高,可能参与引发翼状胬肉。这些研究表明,宏基因组技术在许多感染性眼表疾病的病原体诊断中都极具应用价值,尤其是针对病原体未知的眼表疾病时,更是有着超越传统技术的明显优势。

2 眼内疾病

相较于眼表易暴露于环境而易受感染,眼内因血-视网膜屏障的存在,受微生物影响的可能性较小^[36],因此,关于眼内疾病微生物的研究很少。通常情况下,由于眼球穿通伤、眼部手术、角膜溃疡穿孔等因素导致会外部病原微生物侵入,或者病原微生物通过血液进入眼内等会导致眼内病原微生物感染。目前对眼内疾病微生物的研究多集中在眼内炎及葡萄膜炎上,对其他眼内疾病的研究尚且不足。

2.1 眼内炎 眼内炎是一种严重威胁视力的疾病,常见的眼内手术如白内障手术、玻璃体腔注射术等^[37-38]均有可能引起眼内炎的发生,仅在美国2013年就有600多万次玻璃体腔注射^[39],每年由此导致的眼内炎感染高达数千例。但是,目前传统依赖于微生物培养的眼内炎微生物检测方法仍存在严重缺陷。1995年,一项研究采用传统检测方法对眼内炎患者的眼内微生物样品进行检测,发现69.3%患者检测为阳性,超过30%的病例检测失败^[40]。同时,对注射后眼内炎的诊断阳性率则更低^[41]。因此,宏基因组技术在眼内炎的应用显得尤为重要。

早在2015年, Lee等^[42]采用基于16S rDNA测序的宏基因组技术对21例术后眼内炎患者的玻璃体样本进行检测,结果发现,有14例均鉴定出与炎症密切相关的菌种。2016年,杨宝霞等^[43]对细菌性眼内炎的患者(5例5眼),抽取每例患者的房水或玻璃体标本,分别进行16S rDNA高通量测序、涂片法和细菌培养法进行检测,结果16S rDNA测序技术在5例标本中检测阳性率为100%,远高于其余两种方法;还发现外伤细菌性眼内炎标本中高丰度菌属为葡萄球菌属、链球菌属和假单胞菌属。Gandhi等^[44]采用HTS技术,对75例疑似感染性眼内炎患者的玻璃体样本进行测序,发现73.7%的常规技术检测为阴性的患者,其玻璃体样本存在微生物,其中曲霉属、镰刀菌属、明脐霉属(*exserohilum* sp.)和念珠菌属是最主要的菌属。Kirstahler等^[45]应用宏基因组技术检测了白内障手术或玻璃体腔注射后眼内炎患者的玻璃体标本,确定了14例患者中的12例的主要病因,包括表皮葡萄球菌6例,粪肠球菌(*enterococcus faecalis*)2例,粘质沙雷氏菌(*serratia marcescens*)1例,类芽孢杆菌(*paenibacillus*)1例,溶血性葡萄球菌(*staphylococcus hominis*)1例,以及1例同时感染多种病原菌(包括卡他莫拉菌(*moraxella catarrhalis*)和藤黄微球菌(*micrococcus luteus*)等,研究表明宏基因组技术的人类眼内液标本分析可以提供有关传染病管理的可操作的信息。

综上所述,对于眼内炎,在常规方法束手无策的情况下,宏基因组技术依然有极高的病原菌检出率,这表明宏基因组技术可以作为眼内炎病原体的常规检查手段,具有重要的临床意义。

2.2 葡萄膜炎 葡萄膜炎(uveitis)是发达国家失明的主要

原因之一,占严重视力障碍的 10%~15%^[46-47]。引起葡萄膜炎的病原微生物比较复杂,针对感染性葡萄膜炎,开发一种可快速、全面鉴定其致病病原体的技术显得非常必要。传统检测手段无法对标本做出整体分析,具有较大局限性,近年来,宏基因组技术因其在不依赖于培养的情况下,即可对样品所有微生物 DNA 进行测序分析,而在感染性葡萄膜炎研究中受到越来越多的重视^[48]。

2016 年,Doan 等^[49]采用宏基因组技术检查了 6 例感染性葡萄膜炎患者的眼内液体样本(其中包括 1 例未知病因的慢性葡萄膜炎患者),结果发现,宏基因组技术的诊断结果证实该 5 例已知诊断患者的病因,此外还确诊了未知病因的慢性葡萄膜炎患者的病因。张明新等^[48]对 19 例葡萄膜炎患者的玻璃体标本微生物进行宏基因组测序检测,结果发现 7 例测序结果为阳性,其中 3 例为水痘-带状疱疹病毒(varicella-zoster virus, VZV),且对 3 例 VZV 的标本采用 PCR 技术进行验证,结果与宏基因组测序结果一致。这表明宏基因组技术是一种非常有效的葡萄膜炎诊断技术。此外,还有研究表明葡萄膜炎与肠道微生物群失调具有联系,如一项对 13 例自身免疫性或特发性葡萄膜炎患者与 13 名健康对照者进行宏基因组技术分析的研究发现,患者肠道内粪杆菌属(faecalibacterium)、拟杆菌属(bacteroides)、毛螺菌属(lachnospira)和瘤胃球菌属(ruminococcus)的丰度减少,然而,普氏菌属(Prevotella)和链球菌属的丰度增加,前者可通过产生短链脂肪酸具有抗炎作用,后者则具有促炎和致病性,因而推测这两类细菌可能与葡萄膜炎有关^[50-51]。

通过比较可以发现,与在眼内炎诊断中的研究结果类似,宏基因组技术对感染性葡萄膜炎也有着非常高的诊断准确率,而且相较于常规诊断技术,其在鉴定未知的致病微生物方面有着显著的优势^[48]。

2.3 其他眼内疾病 目前,宏基因组学技术除用于眼内炎、感染性葡萄膜炎研究外,还被用于其他一些眼内感染性疾病的研究中。Gonzales 等^[52]利用宏基因组深度测序技术分析两例患眼内淋巴增生性疾病的个体,发现只需使用少量水溶样本,就可以检测出导致眼内淋巴瘤的感染性病原体。杨宝霞^[53]采用 16s rDNA 测序技术发现白内障患者术前结膜囊菌群中发现 27 个门类、191 科、585 个属,细菌物种多样性在患者间差异较大,用药前后结膜囊的菌群结构也发生了明显的变化。2018 年,Ham 等^[54]在一项采用 16s rDNA 技术对 9 例伴有视网膜病变的 2 型糖尿病患者研究中发现,与 16 名健康者相比,患者的结膜眼表微生物多样性发生显著变化,在门类水平上变形菌门的丰度增加,厚壁菌门和蓝藻菌门(cyanobacteria)的丰度减少;在种属水平上,患者的结膜眼表微生物中不动杆菌属、伯克氏菌属(burkholderia)、伦墨墨氏菌属(rheinheimera)和微球菌(micrococcus)的丰度增加。以上研究表明,宏基因组技术对一些眼内感染性疾病的病原体也有着非常高的诊断准确率。

3 总结和展望

眼部微生物对眼睛的正常生理状态起着重要作用,任何变化都会扰乱眼睛环境的稳态,从而导致眼部疾病^[2]。相较于传统技术,宏基因组技术的显著优势在于仅用少量样品、且无需培养即可检测出样本中的所有微生物,有助于更加全面、无差别的研究眼部微生物,也可以节约时间,特别是在其他传统方法失败的情况下,给予患者及时有效

的治疗。目前的研究表明,宏基因组技术在由细菌、真菌、病毒感染引起的角膜炎、眼内炎及葡萄膜炎等眼病的病原微生物诊断中效果显著,其准确性远高于常规诊断技术。此外,在应对未知病原微生物感染引起的眼病时,宏基因组学技术可能是目前最有效的检测手段,有助于快速、准确识别新病原,及时采用新的治疗策略^[55]。

然而,目前宏基因组学技术应用于眼科疾病诊断尚不成熟,还存在一些局限和不足,如:(1)尚未确立宏基因组技术用于眼科疾病诊断的技术标准。宏基因组检测技术所涉及诸多技术环节^[2],包括取样方法、DNA 提取试剂盒、测序平台、数据质量控制参数等,都还没有确立统一的标准^[56-58]。宏基因组数据用于临床诊断是将在测序文库中出现异常富集的微生物识别为可能的病原体。因为宏基因组技术检测的对象是环境中所有的核酸序列,任何一个不规范的操作,都可能导致数据被污染或者造成分析误差,从而影响临床决策^[58]。比如, Li 等^[11]在 16 例感染性角膜炎和 4 例对照组样本的宏基因组数据中发现,约 2.4% 的测序片段不能归属于任何已知的微生物基因组,推测可能是污染物。如果文库中存在大量污染物,则很可能干扰致病病原体的识别。为了提高宏基因组技术的可靠性,应加快相关研究,尽快确立规范其发展的技术标准。(2)缺乏完善的眼科病原微生物数据库。宏基因组技术用于病原微生物的诊断需要借助于完善的病原微生物数据库^[59]。目前,眼科领域尚缺乏这类专业化的病原微生物数据库。可喜的是已经有研究者积极推动这方面的研究,如 Delbeke 等^[57]通过系统全面的对近 10a 眼表宏基因组检测的数据进行解析,挖掘出多种疾病可能的病原微生物。目前,虽然已经利用宏基因组 NGS 数据证实了许多能引起眼部感染的病原体,但相关的数据资源仍然比较有限,还需要收集更多的检测数据用于数据库构建^[60]。(3)宏基因组检测的成本和效率有待改善。目前,国内已经有商业公司开展眼部宏基因组检测服务,其服务的成本和效率都还有较大的改善空间,在一定程度上限制了该技术的推广。快速诊断对大多数眼部传染病都是至关重要的,尤其是对那些极有可能导致失明的疾病。因此,必须要提高检测效率,减少延误^[60]。

随着宏基因组检测技术的日渐成熟和完善,我们相信宏基因组学技术将在眼科疾病诊断中得到广泛应用,帮助临床医生快速诊断病原体,设计出有效的治疗方案,改变过去对病原未知患者所采取的广谱化治疗策略,提高治疗的精准性,使更多的患者收益。

参考文献

- 1 Taravati P, Lam D, van Gelder RN. Role of molecular diagnostics in ocular microbiology. *Curr Ophthalmol Rep* 2013;1(4):181-189
- 2 Gallon P, Parekh M, Ferrari S, et al. Metagenomics in ophthalmology: Hypothesis or real prospective? *Biotechnol Rep (Amst)* 2019;23:e00355
- 3 Laupland KB, Valiquette L. The changing culture of the microbiology laboratory. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2013;24(3):125-128
- 4 Forbes JD, Knox NC, Ronholm J, et al. Metagenomics: the next culture-independent game changer. *Front Microbiol* 2017;8:1069
- 5 Browne HP, Forster SC, Anonye BO, et al. Culturing of 'unculturable' human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature* 2016;533(7604):543-546
- 6 Schlager R, Chiu CY, Miller S, et al. Validation of metagenomic next-generation sequencing tests for universal pathogen detection. *Arch Pathol Lab Med* 2017;141(6):776-786

- 7 Doan T, Pinsky BA. Current and future molecular diagnostics for ocular infectious diseases. *Curr Opin Ophthalmol* 2016;27(6):561-567
- 8 Lu LJ, Liu J. Human microbiota and ophthalmic disease. *Yale J Biol Med* 2016;89(3):325-330
- 9 Linhart RW. The effect of the eye patch on organisms of the conjunctival sac. *Am J Ophthalmol* 1950;33(8):1280-1282
- 10 Shin H, Price K, Albert L, et al. Changes in the eye microbiota associated with contact lens wearing. *mBio* 2016;7(2):e00198
- 11 Li ZG, Breitwieser FP, Lu J, et al. Identifying corneal infections in formalin-fixed specimens using next generation sequencing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018;59(1):280-288
- 12 Prashanthi GS, Jayasudha R, Chakravarthy SK, et al. Alterations in the ocular surface fungal microbiome in fungal keratitis patients. *Microorganisms* 2019;7(9):309
- 13 Tuzhikov A, Dong QF, Panchin A, et al. Keratitis-induced changes to the homeostatic microbiome at the human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(15):2891
- 14 张茹. 基于宏基因组测序检测角膜炎性疾病患者眼表微生态的改变. 温州医科大学 2019
- 15 Vengayil S, Panda A, Satpathy G, et al. Polymerase chain reaction-guided diagnosis of mycotic keratitis: a prospective evaluation of its efficacy and limitations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(1):152-156
- 16 Ge C, Wei C, Yang BX, et al. Conjunctival microbiome changes associated with fungal keratitis: metagenomic analysis. *Int J Ophthalmol* 2019;12(2):194-200
- 17 Shigeyasu C, Yamada M, Aoki K, et al. Metagenomic analysis for detecting fusarium solani in a case of fungal keratitis. *J Infect Chemother* 2018;24(8):664-668
- 18 Brown JR, Bharucha T, Breuer J. Encephalitis diagnosis using metagenomics; application of next generation sequencing for undiagnosed cases. *J Infect* 2018;76(3):225-240
- 19 Heidari M, Noorizadeh F, Wu K, et al. Dry eye disease: emerging approaches to disease analysis and therapy. *J Clin Med* 2019;8(9):1439
- 20 Graham JE, Moore JE, Jiru X, et al. Ocular pathogen or commensal: a PCR-based study of surface bacterial flora in normal and dry eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(12):5616-5623
- 21 de Paiva CS, Jones DB, Stern ME, et al. Altered mucosal microbiome diversity and disease severity in sjögren syndrome. *Sci Rep* 2016;6:23561
- 22 陈红, 文小凤, 邓裕华, 等. 干眼患者眼表宏基因组研究. *眼科新进展* 2017;37(2):129-132
- 23 Dong X, Wang Y, Wang W, et al. Composition and diversity of bacterial community on the ocular surface of patients with meibomian gland dysfunction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2019;60(14):4774-4783
- 24 Li Z, Gong Y, Chen S, et al. Comparative portrayal of ocular surface microbe with and without dry eye. *J Microbiol* 2019;57(11):1025-1032
- 25 Andersson J, Vogt JK, Dalgaard MD, et al. Ocular surface microbiota in patients with aqueous tear-deficient dry eye. *Ocul Surf* 2021;19:210-217
- 26 Zilliox MJ, Gange WS, Kuffel G, et al. Assessing the ocular surface microbiome in severe ocular surface diseases. *Ocul Surf* 2020;18(4):706-712
- 27 沈乎醒, 高卫萍, 韦庆波, 等. 基因组学在干眼研究中的应用进展. *国际眼科杂志* 2021;21(5):810-813
- 28 Hu VH, Holland MJ, Burton MJ. Trachoma: protective and pathogenic ocular immune responses to chlamydia trachomatis. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7(2):e2020
- 29 Pickering H, Palmer CD, Houghton J, et al. Conjunctival microbiome-host responses are associated with impaired epithelial cell health in both early and late stages of trachoma. *Front Cell Infect Microbiol* 2019;9:297
- 30 Zhou Y, Holland MJ, Makalo P, et al. The conjunctival microbiome in health and trachomatous disease; a case control study. *Genome Med* 2014;6(11):99
- 31 Lee SH, Oh DH, Jung JY, et al. Comparative ocular microbial communities in humans with and without blepharitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(9):5585-5593
- 32 Jiang XD, Deng AH, Yang JR, et al. Pathogens in the Meibomian gland and conjunctival sac: microbiome of normal subjects and patients with Meibomian gland dysfunction. *Infect Drug Resist* 2018;11:1729-1740
- 33 Hou K, Ai T, Liu R, et al. Modeling chronic dacryocystitis in rabbits by nasolacrimal duct obstruction with self-curing resin. *J Ophthalmol* 2017;2017:1-8
- 34 Eguchi H, Hotta F, Kuwahara T, et al. Diagnostic approach to ocular infections using various techniques from conventional culture to next-generation sequencing analysis. *Cornea* 2017;36(Suppl 1):S46-S52
- 35 惠娜, 秦莉, 黎黎. 翼状胬肉患者眼表微生物菌群分析. *国际眼科杂志* 2019;19(11):1989-1993
- 36 Caspi RR. In this issue: Immunology of the eye—inside and out. *Int Rev Immunol* 2013;32(1):1-3
- 37 Du DT, Wagoner A, Barone SB, et al. Incidence of endophthalmitis after corneal transplant or cataract surgery in a medicare population. *Ophthalmology* 2014;121(1):290-298
- 38 Merani R, Hunyor AP. Endophthalmitis following intravitreal anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) injection: a comprehensive review. *Int J Retina Vitreous* 2015;1:9
- 39 Avery RL, Bakri SJ, Blumenkranz MS, et al. Intravitreal injection technique and monitoring: updated guidelines of an expert panel. *Retina* 2014;34(Suppl 12):S1-S18
- 40 Results of the Endophthalmitis Vitrectomy Study. A randomized trial of immediate vitrectomy and of intravenous antibiotics for the treatment of postoperative bacterial endophthalmitis. Endophthalmitis Vitrectomy Study Group. *Arch Ophthalmol* 1995;113(12):1479-1496
- 41 Shah CP, Garg SJ, Vander JF, et al. Outcomes and risk factors associated with endophthalmitis after intravitreal injection of anti-vascular endothelial growth factor agents. *Ophthalmology* 2011;118(10):2028-2034
- 42 Lee AY, Akileswaran L, Tibbetts MD, et al. Identification of torque teno virus in culture-negative endophthalmitis by representational deep DNA sequencing. *Ophthalmology* 2015;122(3):524-530
- 43 杨宝霞, 李虹, 孔凡芳, 等. 16S rDNA 测序技术对细菌性眼内炎房水和玻璃体标本中细菌的鉴别作用. *中华实验眼科杂志* 2016;34(10):883-887
- 44 Gandhi J, Jayasudha R, Naik P, et al. Targeted high-throughput sequencing identifies predominantly fungal pathogens in patients with clinically infectious, culture-negative endophthalmitis in south India. *Microorganisms* 2019;7(10):411
- 45 Kirstahler P, Bjerrum SS, Friis-Møller A, et al. Genomics-based identification of microorganisms in human ocular body fluid. *Sci Rep* 2018;8(1):4126
- 46 Miserocchi E, Fogliato G, Modorati G, et al. Review on the worldwide epidemiology of uveitis. *Eur J Ophthalmol* 2013;23(5):705-717
- 47 Caspi RR. A look at autoimmunity and inflammation in the eye. *J Clin Invest* 2010;120(9):3073-3083
- 48 张明新, 彭晓燕, 呼风, 等. 宏基因组测序技术检测感染性葡萄

膜炎病原体的初步研究. 中华眼科杂志 2020;56(7):519-523

49 Doan T, Wilson MR, Crawford ED, *et al.* Illuminating uveitis: metagenomic deep sequencing identifies common and rare pathogens. *Genome Med* 2016;8(1):90

50 Kalyana Chakravarthy S, Jayasudha R, Sai Prashanthi G, *et al.* Dysbiosis in the gut bacterial microbiome of patients with uveitis, an inflammatory disease of the eye. *Indian J Microbiol* 2018; 58 (4): 457-469

51 Richards JL, Yap YA, McLeod KH, *et al.* Dietary metabolites and the gut microbiota: an alternative approach to control inflammatory and autoimmune diseases. *Clin Transl Immunology* 2016;5(5):e82

52 Gonzales J, Doan T, Shantha JG, *et al.* Metagenomic deep sequencing of aqueous fluid detects intraocular lymphomas. *Br J Ophthalmol* 2018;102(1):6-8

53 杨宝霞. 应用 16S rDNA 测序技术分析白内障术前结膜囊菌群变化的研究. 济南大学 2016

54 Ham B, Hwang HB, Jung SH, *et al.* Distribution and diversity of ocular microbial communities in diabetic patients compared with healthy

subjects. *Curr Eye Res* 2018;43(3):314-324

55 Lalitha P, Prajna NV, Sikha M, *et al.* Evaluation of metagenomic deep sequencing as a diagnostic test for infectious keratitis. *Ophthalmology* 2021;128(3):473-475

56 Costea PI, Zeller G, Sunagawa S, *et al.* Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies. *Nat Biotechnol* 2017;35(11):1069-1076

57 Delbeke H, Younas S, Casteels I, *et al.* Current knowledge on the human eye microbiome: a systematic review of available amplicon and metagenomic sequencing data. *Acta Ophthalmol* 2021;99(1):16-25

58 Sabapathypillai SL, James HR, Lyerla RRL, *et al.* The next generation of ocular pathogen detection. *Asia Pac J Ophthalmol* 2021;10(1):109-113

59 Chiu CY, Miller SA. Clinical metagenomics. *Nat Rev Genet* 2019;20(6):341-355

60 Ma L, Jakobiec FA, Dryja TP. A review of next-generation sequencing (NGS): applications to the diagnosis of ocular infectious diseases. *Semin Ophthalmol* 2019;34(4):223-231