

高通量靶向测序(tNGS)在评估儿童哮喘病原学检测中的前景分析

邢懿衍¹, 石敏²

¹吉首大学医学院, 湖南 吉首

²吉首大学第一附属医院(湘西土家族苗族自治州人民医院), 儿童医学中心, 湖南 吉首

收稿日期: 2026年6月21日; 录用日期: 2026年7月15日; 发布日期: 2026年7月22日

摘要

呼吸道感染是哮喘的主要诱发因素之一, 病原体常见于外源性入侵致病菌和内源性定植菌机会感染, 且几乎所有的病原体都含有DNA或RNA。因此, 测序成为病原体检测的一种理想方法。高通量靶向测序是在高通量下一代测序技术基础上, 通过特定片段库调取数十或数百种已知病原体核酸片段后, 再去针对性测序, 其可以规避大量人源宿主核酸干扰, 在检测范围广的同时大幅度提高病原体检出率。本文描述靶向测序在哮喘患儿呼吸道病原体检测中的作用, 并分析其前景。内容包括: (a) 靶向测序技术原理及临床检测流程; (b) 靶向测序相较传统测序的优劣对比; (c) tNGS在临床应用层面的挑战与策略; (d) 病原体分析对儿童哮喘的重要性。靶向测序是一项新兴技术, 其随着近些年片段库的完善补充和手段成熟, 有望显著提升临床医师对于儿童呼吸道病原体检测和分析能力。

关键词

靶向测序, tNGS, 儿童哮喘, 病原微生物

Prospective Analysis of High-Throughput Targeted Next-Generation Sequencing (tNGS) in Evaluating Pathogen Detection for Pediatric Asthma

Yiyan Xing¹, Min Shi²

¹School of Medicine, Jishou University, Jishou Hunan

²Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Jishou University (People's Hospital of Xiangxi Tujia and Miao Autonomous Prefecture), Jishou Hunan

Received: June 21, 2026; accepted: July 15, 2026; published: July 22, 2026

文章引用: 邢懿衍, 石敏. 高通量靶向测序(tNGS)在评估儿童哮喘病原学检测中的前景分析[J]. 临床医学进展, 2026, 16(7): 1890-1895. DOI: 10.12677/acm.2026.1672714

Abstract

Respiratory infections are one of the main triggers of asthma, commonly caused by exogenous invading pathogens or endogenous colonizing bacteria that lead to opportunistic infections. Nearly all such pathogens contain DNA or RNA, making sequencing an ideal method for pathogen detection. Targeted high-throughput sequencing builds upon next-generation sequencing technologies by selectively amplifying and sequencing nucleic acid fragments from dozens or hundreds of known pathogens using specific gene panels. This approach effectively avoids interference from abundant human host nucleic acids, enabling broad detection coverage while significantly improving pathogen detection rates. This article discusses the role of targeted sequencing in detecting respiratory pathogens in asthmatic children and analyzes its future prospects. The content includes: (a) The principles of targeted sequencing technology and its clinical workflow; (b) A comparative analysis of advantages and limitations between targeted sequencing and conventional sequencing methods; (c) Challenges and Strategies of tNGS in Clinical Application; (d) The importance of pathogen analysis in pediatric asthma. As a relatively new technology, targeted sequencing has seen continuous improvements in gene panel development and technical refinement in recent years, offering great potential to substantially enhance clinicians' capabilities in detecting and analyzing respiratory pathogens in children.

Keywords

Target Next-Generation Sequencing, tNGS, Pediatric Asthma, Pathogenic Microorganism

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

支气管哮喘是儿童时期最常见的慢性气道炎症性疾病,但其潜在的发病机制尚不明确,可能与感染、环境及某些微量元素水平有关[1]-[3]。其中感染是儿童哮喘发作的关键因素,近些年针对儿童哮喘与呼吸道病原体之间相关性的研究较多,尤其是对病毒的研究,但由于儿童呼吸道相关的病毒类型及其亚型种类繁多,往往只能针对某种或某几种病毒进行研究[4][5]。此外,有关细菌及支原体的相关研究也未有定论[6]。传统的抗原、抗体、PCR 检测法及培养检测针对性强,能够满足临床医学的某些需求,但其各有优劣,尤其是灵敏度、特异度及培养周期等问题,对研究的局限性也比较强,随着高通量测序(又称下一代测序)的技术成熟和成本降低,其在临床和科研领域的应用也越来越广泛[7]。但高通量测序同样存在一些问题,其理论上能够覆盖所有病原体的检测,但过于广泛的核酸数据加上无特定的指导或临床策略,会对真正目标病原体的识别造成极大干扰,尤其是感染初期病原体尚未大量繁殖时,大量人源宿主核酸会淹没微量的病原信号[8]。不可否认,高通量测序在罕见、疑难及新发病原体的检测中尤具巨大价值,但面对目标明确的病原体谱分析时,则会因为测序范围过于广泛而难以排除干扰。因此,靶向高通量测序(tNGS)的应用,无疑更适合于儿童哮喘病原学检测分析。

2. 靶向测序技术原理及临床检测流程

2.1. 技术原理

tNGS 技术分为: (a) 超多重 PCR 法(mp-tNGS),即基于多重 PCR 技术,在一个反应体系中加入几十

到几百对特异性引物，指数级扩增目标病原体(如结核分枝杆菌、曲霉、特定病毒等)的保守基因片段。(b)液相探针杂交捕获法(hc-tNGS)，即设计一批生物素标记的特异性核酸探针，与标本中打断后的 DNA 文库进行液相杂交。再利用链霉亲和素磁珠，像“磁铁”一样把结合了探针的目标片段吸附出来，洗脱掉非目标核酸[9]-[12]。

2.1.1. mp-tNGS

mp-tNGS 检测板涵盖了临床上常见的数百种病原体靶标，通过去除数据库中的相似冗余，并过滤噬菌体及质粒等人工序列，再对数据库进行二次清理和注释以清除低质量序列，后通过大数据模型进行参数对比，筛选出可用于精确鉴定物种和菌株的靶位点。

2.1.2. hc-tNGS

hc-tNGS 是一种基于常规 mNGS 文库构建的技术，其探针杂交捕获过程可特异性结合微生物，从而增强病原微生物的检出能力。在操作过程中，通过探针对目标所需病原微生物的特异性基因、物种保守基因、相关耐药基因和毒力基因进行杂交、捕获和洗涤，之后获取所需要的序列片段，从而鉴定目标病原体种类、分型和毒力以及耐药性[13]-[15]。

2.2. 临床检测流程

阶段	关键步骤	临床核心操作与质控要点
1. 标本前处理	液化、破壁、浓缩	痰液需先液化；针对难破壁的真菌（如隐球菌）和分枝杆菌，必须做研磨珠研磨或酶消化等前置破壁，这是影响检出率的关键。
2. 核酸提取	总核酸提取	同时提取DNA和RNA，以便一份试剂盒可测DNA病毒、RNA病毒、细菌和真菌。提取后需测浓度和纯度。
3. 文库构建	反转录、加接头、纯化	RNA需先反转录为cDNA；随后对核酸片段末端修复、加测序接头。文库质量直接决定后续捕获效率。
4. 靶向富集	核心捕获	加入引物池（PCR法）或探针池（杂交法），将目标病原及耐药基因的片段大量复制或特异性吸附出来。
5. 上机测序	高通量测序	纯化后的富集文库，在测序仪上进行高深度测序，产出原始数据（FASTQ格式）。
6. 生信分析	数据比对、判读	去宿主→与病原参考数据库比对→鉴定种属。对于耐药基因，需比对专门数据库（如CARD、ResFinder）。
7. 报告解读	人工复核发报告	由临床检验师或医生综合序列数、覆盖度、耐药位点突变与病人临床表型，判断是致病菌还是背景/定植。耐药基因需结合菌种看，比如看到 <code>mecA</code> 基因且检出葡萄球菌，方可报“MRSA（耐甲氧西林金黄色葡萄球菌）”。

Figure 1. tNGS testing procedure
图 1. tNGS 检测步骤

从患儿处收集呼吸道样本(如痰液或鼻咽拭子), 鼻咽拭子应在无菌条件下由专业医护人员操作, 避免污染, 采集后立即对样本进行处理, 包括但不限于离心分离、DNA 提取等步骤, 并迅速存储于 -80°C 冰箱中, 以保持核酸完整性, 使用专门设计的引物对目标微生物核酸进行吸引后纯化富集文库, 在测序仪进行高深度测序, 产出原始数据, 将数据与病原参考数据库对比后鉴定种属及耐药基因, 后续由临床检验师及医师综合数据结果及患者临床表现进行进一步判断[9]-[12] (见图 1)。

3. 靶向测序相较传统测序的优劣对比

哮喘的发作及严重程度与呼吸道病原体有着紧密联系, 常常和病毒、细菌、真菌及支原体有关, 但其中进一步的关系仍有待被挖掘[16]-[18]。其根本原因是既往研究中的病原体获取手段常常为抗原抗体、培养或 PCR 等, 这些方法各有其优劣, 受各种条件限制, 同一研究群体往往只采用 1 到 2 种采样手段, 无法获取较为全面的病原体谱[7] [19] [20]。

在 mNGS (宏基因组测序) 发展成熟的基础上, tNGS 目前已具有广谱、快速、准确且成本效益高的优势, 其不仅可以用于对感染诱发的儿童哮喘急性发作进行病原学诊断, 还能够对哮喘患儿各病程时期的呼吸道病原生态学进行分析从而挖掘更深层规律[21]。

同样的, tNGS 仍有一些不足之处: (a) 特定数据库筛选后的结果注定其会遗漏一些真正的病原体微生物, 这些微生物可能是无意义的, 也可能是导致哮喘致病的罕见病原体, 这需要 mNGS 去进一步补足[22] [23]。(b) mNGS 会受到大量人源性宿主片段的干扰, tNGS 身为其同源手段, 仍然有一定的干扰情况。首先 tNGS 会生成一份包含多种病原微生物的报告, 其中包括致病菌、条件致病菌和定植微生物, 若是进行哮喘患儿的呼吸道病原生态学分析则不受其影响, 但如果要对哮喘诱发因素进行精确诊断, 从多种微生物中寻找出真正致病菌, 则需要临床医师结合患儿的病情进行诊断, 这不仅受医师的经验影响, 也需要患儿家属对病史的准确描述[24]。(c) 尽管测序前的 PCR 步骤增加了低丰度微生物的检出灵敏度, 但也增加了污染风险, 此前任何环节不慎造成的细微污染, 都将在 PCR 中被扩大, 使干扰极大增加, 但这是所有采样类检查不可避免的情况, 其有赖于人员培训后的精细操作, 以及科技发展后提纯手段的成熟[25]。

4. tNGS 在临床应用层面的挑战与策略

tNGS 在哮喘儿童呼吸道病原检测层面有巨大潜力, 但作为一项新兴技术, 其在临床转化方面仍面临诸多挑战, 需要我们谨慎对待。

(1) tNGS 过于依赖其核心病原体 panel 的设计质量, panel 需覆盖临床常见以及区域流行性的病原体, 但本身“封闭性”的设计决定其无法检测出 panel 之外的病原体, 尤其是一些新发或者罕见病原体, 这极大可能造成临床上的“阴性漏检”情况[22] [23]。这对试剂盒自身及其背后供应链有着极高的要求, 整个体系需要对病原数据的变化进行及时更新迭代。同时, 由于每次测序过程中多重 PCR 的扩增步骤, 在提高灵敏度的同时也成倍放大了任何实验操作环节中引入的微量污染, 导致污染序列主导测序结果, 因此, 建立严格的实验室区、标准化操作流程是 tNGS 临床转化不可或缺的前提[25]。

(2) tNGS 报告中通常包含明确致病菌、条件致病菌及正常定植菌, 本身分析具有一定难度, 且哮喘患儿本身气道微生态可能存在失衡, 更加剧了从众多微生物中精准识别诱发“元凶”的难度[24]。这一困难单从生物信息学角度恐难以解决, 需结合临床两方面。一方面需结合序列丰度等指标进行初筛; 另一方面, 临床医生需结合患儿的具体情况、当地病原体流行病学特征等进行多方面综合分析判断。这一过程高度依赖临床经验, 是目前制约 tNGS 临床转化的瓶颈。

(3) 综上两点造成了 tNGS 的成本较高, 无论是对实验室的设备条件等要求, 还是临床医师的经验要求都是目前存在的问题。且该技术成本效益是否优于传统检测技术, 仍缺乏高质量前瞻性医学、经济学

研究证据。此外, tNGS 在不同临床场景下的应用价值存在差异: 对于危重、疑难等感染情况, mNGS 的全方面筛查更具有优势, 而对于目标明确, 同时检测多种病原体及耐药基因, 或者进行无关“定植、致病”的微生物生态分析, tNGS 的高灵敏度、高深度测序则更为适用[21] [22]。因此, 合理区分各种检测技术的应用场景, 准确其适用性与不足, 是推动技术发展与临床实用性的关键。

5. 病原体分析对儿童哮喘的重要性

(1) 儿童气道由于其独特的生理结构特点, 在哮喘的气道高反应性及慢性炎症下, 易发生粘液阻塞导致肺功能及生活质量下降, 严重者有肺结构不可逆性损伤[26]。而病原体是造成气道高分泌的最常见原因, 不同病原体所引发机制不同, 但都可使气道内的粘液分泌量增加数十至数百倍, 同时感染也是诱发哮喘急性发展的常见因素[27] [28]。作为一个慢性呼吸系统疾病, 哮喘往往难以被治愈, 其主要手段是控制治疗及过敏原的规避, 而病原体微生物作为儿童哮喘中的一个重要环节, 了解其中的规律对临床哮喘患儿的早发现、早预防有着难以替代的重要性[29] [30]。目前临床中有关病毒与哮喘急性发作的研究较多, 尤其是鼻病毒、呼吸道合胞病毒等常见病毒。但细菌, 尤其是机会致病菌、定植菌等对哮喘患儿发病的频率、严重程度等有无影响等研究较少。关于呼吸道微生物的生态群分析与儿童哮喘之间的关系相关研究几乎空白, 目前仍缺少临床数据研究以作支撑, 其原因可能与以往缺乏适合哮喘患儿这一特定人群的广谱病原学检测手段有关, 而 tNGS 的出现, 在往后的研究中具有很大前景。

(2) 综上, tNGS 作为一项具有前景的新兴项目, 有待于诸多研究验证其可行性:

(a) 对于临床效用的验证, 可以设计多中心大数据的前瞻性研究, 直接比较 tNGS 指导下的哮喘患儿急性发作期抗生素合理使用率、住院时长, 症状缓解时间及再入院率等临床指标, 提供较高级的循证医学证据。

(b) 对于致病菌与定植菌的鉴别分析, 可以进行大样本的临床数据分析, 利用机器学习方法, 通过人工智能辅助临床医师更精准地分析与解读微生物在哮喘患儿呼吸道中的价值与意义。

(c) 可以利用 tNGS 技术对各季节(月份)、各病程时期(急性发作期、慢性持续期、临床缓解期)或者初发、治疗后、复发等不同阶段的哮喘患儿呼吸道微生物进行生态分析, 探索其动态变化规律与哮喘深层关联, 为哮喘的长期管理和个体化治疗提供新策略。

参考文献

- [1] 中华医学会儿科学分会呼吸学组, 中华儿科杂志编辑委员会, 中国医药教育协会儿科专业委员会. 儿童支气管哮喘诊断与防治指南(2025) [J]. 中华儿科杂志, 2025, 63(4): 324-337.
- [2] Ntontsi, P., Photiades, A., Zervas, E., Xanthou, G. and Samitas, K. (2021) Genetics and Epigenetics in Asthma. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, Article No. 2412. <https://doi.org/10.3390/ijms22052412>
- [3] 任天思, 郭秀玲, 李然, 等. 25-羟维生素 D3 和病毒感染与反复喘息婴幼儿哮喘预测指数的相关性研究[J]. 徐州医科大学学报, 2023, 43(2): 128-133.
- [4] Bochkov, Y.A., Watters, K., Ashraf, S., Griggs, T.F., Devries, M.K., Jackson, D.J., et al. (2015) Cadherin-Related Family Member 3, a Childhood Asthma Susceptibility Gene Product, Mediates Rhinovirus C Binding and Replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**, 5485-5490. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421178112>
- [5] Jackson, D.J. and Gern, J.E. (2022) Rhinovirus Infections and Their Roles in Asthma: Etiology and Exacerbations. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, **10**, 673-681. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2022.01.006>
- [6] 朱道娟, 彭东红. 细菌定植或感染与儿童哮喘的关系研究进展[J]. 儿科药科学杂志, 2016, 22(6): 63-65.
- [7] Gu, W., Miller, S. and Chiu, C.Y. (2019) Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, **14**, 319-338. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012751>
- [8] Li, Y., Sun, B., Tang, X., Liu, Y., He, H., Li, X., et al. (2020) Application of Metagenomic Next-Generation Sequencing for Bronchoalveolar Lavage Diagnostics in Critically Ill Patients. *European Journal of Clinical Microbiology &*

- Infectious Diseases*, **39**, 369-374. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03734-5>
- [9] 中华医学会检验医学分会临床微生物学组, 中华医学会微生物学与免疫学分会临床微生物学组, 中国医疗保健国际交流促进会临床微生物与感染分会. 宏基因组高通量测序技术应用于感染性疾病病原检测中国专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(2): 107-120.
 - [10] 中国医学装备协会基因检测分会, 医疗辅助技术(医学检验)国家临床医学研究中心, 中华医学会检验医学分会临床微生物学组. 宏基因组高通量测序技术临床实验室规范化应用指南(2026 版) [J]. 中华医学杂志, 2026, 106(14): 1304-1317.
 - [11] 中国医学装备协会检验医学分会. 靶向二代测序在感染性疾病诊疗中的规范化应用专家共识 2025 [J]. 中华检验医学杂志, 2025, 48(4): 469-477.
 - [12] 晁灵善. 病原体靶向测序在下呼吸道感染病原诊断的应用研究[D]: [博士学位论文]. 石家庄: 河北医科大学, 2024.
 - [13] Liu, Y.N., Zhang, Y.F., Xu, Q., Qiu, Y., Lu, Q., Wang, T., *et al.* (2023) Infection and Co-Infection Patterns of Community-Acquired Pneumonia in Patients of Different Ages in China from 2009 to 2020: A National Surveillance Study. *The Lancet Microbe*, **4**, e330-e339. [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(23\)00031-9](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(23)00031-9)
 - [14] Li, Z.J., Zhang, H.Y., Ren, L., Lu, Q., Ren, X., Zhang, C., *et al.* (2021) Etiological and Epidemiological Features of Acute Respiratory Infections in China. *Nature Communications*, **12**, Article No. 5026. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25120-6>
 - [15] Huang, X.B., Yuan, L., Ye, C., Zhu, X., Lin, C., Zhang, D., *et al.* (2020) Epidemiological Characteristics of Respiratory Viruses in Patients with Acute Respiratory Infections during 2009-2018 in Southern China. *International Journal of Infectious Diseases*, **98**, 21-32. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.06.051>
 - [16] 陈玲, 胡荆江, 覃军. 儿童支气管哮喘合并呼吸道感染病原学及其危险因素[J]. 中华医院感染学杂志, 2023, 33(18): 2855-2859.
 - [17] 李立学, 王平康, 张祥, 等. 儿童支气管哮喘呼吸道感染病毒感染及危险因素分析[J]. 公共卫生与预防医学, 2022, 33(3): 154-156.
 - [18] Jartti, T. and Gern, J.E. (2017) Role of Viral Infections in the Development and Exacerbation of Asthma in Children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **140**, 895-906. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.08.003>
 - [19] 秦大妮, 马铁梁, 沈惠平, 等. 基于高通量测序技术观察哮喘患儿上呼吸道菌群多样性的变化[J]. 江苏大学学报(医学版), 2023, 33(6): 493-497.
 - [20] 惠锦言, 徐欣丰, 姜心瑶, 等. 哮喘儿童口腔和肠道真菌多样性及代谢谱的多组学研究[J]. 现代预防医学, 2026, 53(3): 471-478.
 - [21] Yin, Y., Zhu, P., Guo, Y., Li, Y., Chen, H., Liu, J., *et al.* (2024) Enhancing Lower Respiratory Tract Infection Diagnosis: Implementation and Clinical Assessment of Multiplex PCR-Based and Hybrid Capture-Based Targeted Next-Generation Sequencing. *eBioMedicine*, **107**, Article ID: 105307. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2024.105307>
 - [22] Chen, Q., Yi, J., Liu, Y., Yang, C., Sun, Y., Du, J., *et al.* (2024) Clinical Diagnostic Value of Targeted Next-Generation Sequencing for Infectious Diseases (Review). *Molecular Medicine Reports*, **30**, Article No. 153. <https://doi.org/10.3892/mmr.2024.13277>
 - [23] Hilt, E.E. and Ferrieri, P. (2022) Next Generation and Other Sequencing Technologies in Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases. *Genes*, **13**, Article No. 1566. <https://doi.org/10.3390/genes13091566>
 - [24] Rodino, K.G. and Simner, P.J. (2024) Status Check: Next-Generation Sequencing for Infectious-Disease Diagnostics. *Journal of Clinical Investigation*, **134**, e178003. <https://doi.org/10.1172/jci178003>
 - [25] Gao, L., Li, L., Fang, B., Fang, Z., Xiang, Y., Zhang, M., *et al.* (2023) Carryover Contamination-Controlled Amplicon Sequencing Workflow for Accurate Qualitative and Quantitative Detection of Pathogens: A Case Study on SARS-CoV-2. *Microbiology Spectrum*, **11**, e0020623. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00206-23>
 - [26] 邹映雪, 赵德育, 刘瀚旻, 等. 儿童气道黏液高分泌管理专家共识[J]. 中国实用儿科杂志, 2023, 38(12): 881-887.
 - [27] Johnson, D.C. (2011) Airway Mucus Function and Dysfunction. *The New England Journal of Medicine*, **364**, 978.
 - [28] Evans, C.M. and Koo, J.S. (2009) Airway Mucus: The Good, the Bad, the Sticky. *Pharmacology & Therapeutics*, **121**, 332-348. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.11.001>
 - [29] Biagi, C., Rocca, A., Poletti, G., Fabi, M. and Lanari, M. (2020) Rhinovirus Infection in Children with Acute Bronchiolitis and Its Impact on Recurrent Wheezing and Asthma Development. *Microorganisms*, **8**, Article No. 1620. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101620>
 - [30] 徐金梅, 张德强, 王永霞, 等. 儿童下呼吸道感染病原菌种类调查及并发哮喘的预测模型构建[J]. 中国病原生物学杂志, 2024, 19(7): 768-772.