

## 痰液宏基因组测序在肺部感染中的诊断价值\*

韩心远,高小娟,韦洁宏,熊丹,张秀明

深圳市罗湖医院集团医学检验实验室,广东深圳 518001

**摘要:**目的 探讨痰液宏基因组测序(mNGS)在肺部感染中的诊断价值。方法 选取 2020 年 7 月至 2021 年 7 月重症肺部感染患者,采集其痰液标本,并行微生物培养和 mNGS 同步检测,分析两种检测方法对重症肺部感染的诊断效能。结果 22 例患者的痰液同时进行微生物培养和 mNGS 检测,两种检测方法的阳性符合率 93.8%,阴性符合率为 33.3%,总符合率为 77.3%。细菌检出率 mNGS 高于微生物培养法(77.3% vs. 63.6%)。两种检测方法对 1 种及 >2 种病原体的检出率比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 在肺部感染病例中,痰液 mNGS 对病原菌的检出率高于微生物培养法,尤其对混合感染诊断价值更高,能为早期肺部感染提供诊断依据。

**关键词:**痰液; 宏基因组测序; 肺部感染

中图分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)15-2022-04

## Diagnostic value of metagenomics next-generation sequencing of sputum in pulmonary infection\*

HAN Xinyuan, GAO Xiaojuan, WEI Jiehong, XIONG Dan, ZHANG Xiuming

Department of Medical Laboratory, Shenzhen Luohu Hospital

Group, Shenzhen, Guangdong 518001, China

**Abstract: Objective** To investigate the diagnostic value of sputum metagenomics next-generation sequencing (mNGS) in pulmonary infection. **Methods** Patients with severe pulmonary infection were selected from July 2020 to July 2021, sputum samples were collected, and simultaneous microbial culture and mNGS detection were conducted to analyze the diagnostic efficacy of the two detection methods for pathogenic detection of severe pulmonary infection. **Results** The sputum samples of 22 patients were tested by both microbial culture and mNGS, and the positive and negative coincidence rates of the two methods were 93.8% and 33.3%, respectively. The total coincidence rate was 77.3%. The bacterial detection rate of mNGS was higher than that of microbial culture (77.3% vs. 63.6%). There were statistically significant differences in the detection rates of 1 and >2 pathogens between the two detection methods ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** In pulmonary infection cases, sputum mNGS has a higher detection rate of pathogenic bacteria than microbial culture method does, especially for the diagnosis of complex infection, which could provide diagnostic basis for early pulmonary infection.

**Key words:** sputum; metagenome next-generation sequencing; pulmonary infection

肺部感染是指由多种病原体引起的终末气道、肺泡腔和肺间质感染,常表现为呼吸困难、发热、咳嗽、咳痰等症状<sup>[1]</sup>。临床上针对器官移植、癌症治疗等通常会使用大剂量的免疫抑制剂,导致患者抵抗力下降,极易引发肺部感染。在重症监护病房,患者术后护理不当,机械侵入性检查或治疗同样极大地增加了肺部感染的可能性。此类患者往往病情发展快,预后差,且多为混合感染,快速精准的病原学诊断直接决定了患者的预后<sup>[2-4]</sup>。目前,临床常规开展的传统微

生物鉴定手段(培养、涂片等)时间长且精度不够,对临床指导价值非常有限。近年来,无偏倚、通量高的宏基因组测序(mNGS)技术有效地助力了肺部疑难感染的病原学诊断。本研究采用 mNGS 检测肺部感染患者痰液中的病原微生物,探讨痰液宏基因组测序在肺部感染中的诊断价值。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 以 2020 年 7 月至 2021 年 7 月深圳市罗湖医院集团重症医学科、儿科、呼吸内科重症肺

\* 基金项目:深圳市医疗卫生三名工程(SZSM201601062);深圳市医学重点学科(SZXK054)。

作者简介:韩心远,女,硕士研究生在读,主要从事临床微生物检验研究。△ 通信作者,E-mail:zxm0760@163.com。

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20220722.1903.008.html\(2022-07-25\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20220722.1903.008.html(2022-07-25))

部感染患者为研究对象。纳入标准:(1)出现胸痛、咳嗽、咳痰等症状;(2)体温超过 38 ℃;(3)经血常规检查,白细胞计数明显上升;(4)肺部有湿啰音;(5)胸部 X 线检查显示有肺部炎性改变。本研究符合《赫尔辛基宣言》原则。共纳入 22 例患者,其中男 10 例(45.5%),女 12 例(54.5%);年龄 0~86 岁;重症医学科患者 11 例,儿科患者 3 例,呼吸内科患者 8 例。所有患者均行微生物培养及 mNGS 检测。

**1.2 痰液标本的收集** 可自主咳痰患者清晨清水漱口 3 次后,用力咳出 1~2 口痰(勿将唾液和鼻后分泌物当作痰送检)于无菌痰杯内。无痰或咳嗽少痰患者,先刷牙(口腔黏膜、舌头和牙龈),勿用牙膏,后用 3~5 mL 3%NaCl 超声雾化后留痰。婴幼儿患者,清洗口腔后,拍背或刺激咳嗽,用一次性无菌吸痰管,在严格无菌操作下,负压吸取下呼吸道痰液。每一份标本的留取量应>1 mL,标本收集后立即分装至无菌、干燥、洁净的痰杯内,并于 2 h 内室温送检。

**1.3 方法** 所有标本同时进行 mNGS 和微生物培养检测。微生物培养方法参照《全国临床检验操作规程》第 4 版<sup>[5]</sup>对痰液进行质量筛查。合格的标本分区划线接种于血琼脂平板、巧克力琼脂平板、麦康凯平板。置 5%~10% CO<sub>2</sub> 环境中,(35±2)℃ 培养 18~24 h。所获菌株经人工及 microflex LT/SH 全自动快速物质谱检测系统(德国布鲁克公司)鉴定。mNGS 检测包括 DNA 和 RNA 两部分的检测。RNA 检测部分需将宿主细胞核糖体 RNA 去除,以提高 RNA 病毒的检测灵敏度。总核酸提取后,利用随机引物建库,PCR 扩增出标本中的所有微生物,最后对扩增片段的序列进行测定和比对,鉴定出具体的微生物种类,随后去宿主化以消除正常的人类微生物群落背景,从而找到所检测临床标本中可能致病的微生物。mNGS 技术主要检测指标为从微生物中读取到的特异核酸 read 数目,read 数目与该病原体含量呈正相关。若是定植微生物,read 数目含量不会太高。两种检测方法结果一致性比较:当微生物培养与 mNGS 检测出完全相同的病原体,认为结果完全一致;检测结果部分相同,认为结果部分一致;检测结果完全不同,认为结果不一致。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS23.0 软件对数据进行数据处理及统计分析。计数资料采用频数或百分率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 mNGS 与微生物培养结果比较** 两种检测方法结果显示,15 例 mNGS 与微生物培养均为阳性,阳性符合率为 93.8%;2 例 mNGS 与微生物培养均为阴性,阴性符合率为 33.3%;总符合率为 77.3%。见

表 1。

**2.2 两种检测方法检出不同种类病原体结果比较** 在 22 例肺部感染患者中,两种检测方法病毒检出率比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),mNGS 检测出 4 种病毒,分别是呼吸道合胞病毒 B 型、人疱疹病毒 1 型、人疱疹病毒 4 型及人疱疹病毒 6B 型。微生物培养常见鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌,mNGS 检测结果中常见肺炎链球菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、白假丝酵母菌及人疱疹病毒,两种检测方法对细菌和真菌检出率比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 2。

表 1 mNGS 和微生物培养结果比较

mNGS	微生物培养		总计(n)
	阳性[n(%)]	阴性[n(%)]	
阳性	15(68.2)	4(18.2)	19
阴性	1(5.0)	2(9.1)	3
总计	16(72.7)	6(27.3)	22

表 2 两种检测方法检出不同种类病原体结果比较 [n(%)]

方法	细菌	病毒	真菌
微生物培养	14(63.6)	0(0.0)	5(22.7)
mNGS	17(77.3)	6(27.3)	4(18.2)
$\chi^2$	0.983	6.947	0.140
P	0.322	0.008	0.709

**2.3 两种检测方法病原体检出种类数比较** 在 22 例肺部感染患者中,传统的微生物培养在多数情况下只能培养出 1 种病原菌。两种检测方法对 1 种及>2 种病原体的检出率比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 3 两种检测方法病原体检出种类数比较 [n(%)]

方法	病原体种类(种)			
	0	1	2	>2
微生物培养	6(27.3)	10(45.5)	3(13.6)	3(13.6)
mNGS	3(13.6)	3(13.6)	6(27.3)	10(45.5)
$\chi^2$	0.559	3.931	0.559	3.931
P	0.455	0.047	0.455	0.047

**2.4 两种检测方法结果一致性比较** 在两种检测方法结果完全一致的病原体中,2 例微生物培养和 mNGS 检测均为阴性,2 例微生物培养和 mNGS 结果均为阳性且一致(鲍曼不动杆菌 1 例,铜绿假单胞菌 1 例)。在两种检测方法结果不一致的病原体中,3 例微生物培养阴性,mNGS 检测阳性(肺炎链球菌 2 例、延长奈瑟菌 1 例、金黄色葡萄球菌和流感嗜血杆菌混合

感染 1 例), 1 例 mNGS 检测阴性, 微生物培养阳性 (鲍曼不动杆菌和嗜麦芽窄食单胞菌混合感染 1 例)。见表 4。

表 4 两种检测方法结果一致性比较[n(%)]

检测结果	细菌	病毒	真菌	$\chi^2$	P
完全一致	4(18.2)	0(0.0)	3(13.6)	4.205	0.122
部分一致	9(40.9)	0(0.0)	0(0.0)	21.176	<0.001
不一致	9(40.9)	22(1.0)	19(86.4)	22.935	<0.001

### 3 讨论

肺部感染是全球发病率最高的感染性疾病, 对全球造成的疾病负担极其沉重<sup>[6-7]</sup>。由于该类感染涉及的病原体众多, 多数医生在无法进行准确的病原学诊断前常采用经验治疗<sup>[8]</sup>, 不明病原体与混合感染往往导致经验性治疗效果不佳。快速、准确找到病原体, 给予敏感药物进行精准治疗, 提高疾病治疗效果, 改善不良预后, 是临床医生迫切需要解决的问题<sup>[9-10]</sup>。

尽管传统微生物培养是检测病原菌的“金标准”, 但对于肺部感染其检出率仅为 10% 左右<sup>[11]</sup>, 而 PCR 检测虽然在特异度、灵敏度和检测时效上明显优于微生物培养, 但因为 PCR 检测是基于已知的病原体基因组进行测序鉴定, 所能提供的信息依然不能解决临床微生物诊断检出率低的问题。因此, 对于未知病原体和混合感染的检测是传统检测方法难以逾越的障碍。无偏倚的 mNGS 与传统检测方法相比, 无需培养, 病原体覆盖度广, 灵敏度高, 有利于鉴定不明病原体和混合感染<sup>[9-12]</sup>。研究发现, 在肺部感染性疾病中, mNGS 检测的检出率均高于传统检测方法, 在细菌检测方面尤为突出<sup>[13-14]</sup>。本研究发现, 在肺部感染中, mNGS 检测对细菌的检出率略高于微生物培养, 但两者之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 与近年研究结果不一致<sup>[13-14]</sup>, 可能与本研究纳入的检测例数少有关。在混合感染方面, mNGS 对 1 种及  $> 2$  种病原体的检出率明显高于传统检测方法, 提示 mNGS 检测在混合感染的病原体检测方面有巨大的优势。有研究指出, mNGS 检测可以在早期确定重症肺部感染患者的病原体, 帮助临床医生对患者进行精准治疗, 从而降低重症肺炎患儿 28 d 和 90 d 的病死率<sup>[15]</sup>。本研究中, 在 mNGS 与微生物培养结果不一致的病原体中, 微生物培养阴性结果明显多于 mNGS 阴性结果, 也证明了 mNGS 检测的优越性。

mNGS 对真菌、病毒等非细菌类病原体的鉴定具有固有的优势, 对于一般病原体, mNGS 的检测阈值为 0.01~130.00 CFU/mL, 而微生物培养的检测阈值为 100.00~1 000.00 CFU/mL<sup>[16]</sup>。mNGS 基于病原体基因序列进行检测, 无需考虑其活性, 对已接受广谱抗菌药物治疗的患者, 仍可借助 mNGS 技术进

行病原学检测<sup>[17]</sup>。在本研究的检测结果中, 微生物培养常见鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌, mNGS 检测结果中常见肺炎链球菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、白假丝酵母菌及人疱疹病毒。

目前, 临床上传统的病毒检测方法主要为基于病毒基因的 PCR 技术和病毒抗原抗体的血清学检测。但这些检测方法需要提前预知病毒的基因序列或蛋白质序列信息, 因此对于不明、未知病毒则不能有效检出, 也难以快速进行病毒分型。在本研究的 mNGS 检测结果中共检测出 4 种病毒, 分别是呼吸道合胞病毒 B 型、人疱疹病毒 1 型、人疱疹病毒 4 型及人疱疹病毒 6B 型, 利用 mNGS 可更加精确地检测出病毒类型, 以便临床医生对患者进行精准治疗。

在 mNGS 的实际临床应用中, 仍存在多个需要关注的问题。(1) 受制备与纯化技术本身的限制, 试剂中可能普遍存在外源性核酸序列, 且 mNGS 所检测到的病原体序列也可能来自于正常的定植微生物群、标本污染, 而痰液标本往往会含有部分上呼吸道及口腔微生物, 因此需要检验人员有效区分出感染微生物<sup>[18]</sup>。(2) 病原体基因组数据库不完善, 目前还没有囊括所有病原微生物的生物信息数据库, 有可能导致漏检<sup>[19]</sup>。(3) mNGS 技术已逐渐成熟, 但还缺乏公认的质量控制与评价的指南, 因此需要临床医生以科学严谨的态度, 并采用合理的方式将 mNGS 应用于临床。

本研究也存在一定局限性。首先, 痰液作为临床上常见的检验标本, 有着取样方便、操作简单等优点, 但痰液的采样合格率因人而异, 且检验结果易受口腔杂菌的影响, 因此仅依赖痰液标本行病原体诊断尚缺乏定论; 其次, 传统检测方法中, 只利用微生物培养进行病原体检测, 受限于培养基成分及培养环境的限制, 难以检测出苛养菌, 亦无法检测出病毒。

综上所述, 在肺部感染患者的病原学诊断中, 痰液 mNGS 相比传统检测方法有更高的检出率, 尤其是对病毒及混合感染的检测更具有优势, 可为肺部感染患者的临床诊治提供依据, 有助于早期精准地进行临床干预。

### 参考文献

- [1] 冯玲, 熊佳丽, 高燕, 等. 宏基因组二代测序在肺部感染中的应用及优化[J]. 医学综述, 2021, 27(5): 912-916.
- [2] 陆瀚澜, 隋明星, 赵闻雨, 等. 高通量二代基因测序技术在器官移植术后肺部感染病原诊断的应用观察[J]. 中华器官移植杂志, 2020, 41(7): 388-392.
- [3] 康书红, 蔺红丽, 周福有. 胸腔镜根治术对老年食管癌患者术后肺部感染与呼吸功能及炎症因子的影响[J]. 实用癌症杂志, 2021, 36(4): 609-613.
- [4] 孙墨渊, 张俊涛, 杨玉霞, 等. 老年髌部骨折围手术期并发

肺部感染及其中医药防治的研究进展[J]. 中国医药导刊, 2021, 23(6): 424-428.

[5] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 182.

[6] QUINTON L J, WALKEY A J, MIZGERD J P. Integrative physiology of pneumonia[J]. *Physiol Rev*, 2018, 98(3): 1417-1464.

[7] LANKS C W, MUSANI A I, HSIA D W. Community-acquired pneumonia and hospital-acquired pneumonia[J]. *Med Clin North Am*, 2019, 103(3): 487-501.

[8] ZHUANG Q D, MA H Y, ZHANG Y, et al. Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis with nonneutropenic patients[J]. *Can Respir J*, 2017, 2017: 3685261.

[9] LI H, GAO H, MENG H, et al. Detection of pulmonary infectious pathogens from lung biopsy tissues by metagenomic next-generation sequencing[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8: 205.

[10] DE BENEDICTIS F M, KEREM E, CHANG A B, et al. Complicated pneumonia in children[J]. *Lancet*, 2020, 396(10253): 786-798.

[11] JAIN S, SELF W H, WUNDERINK R G, et al. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U. S. adults[J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(5): 415-427.

[12] SIMNER P J, MILLER S, CARROLL K C. Understanding the promises and hurdles of metagenomic next-generation sequencing as a diagnostic tool for infectious disease

ses[J]. *Clin Infect Dis*, 2018, 66(5): 778-788.

[13] 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.

[14] MITCHELL S L, SIMNER P J. Next-generation sequencing in clinical microbiology: are we there yet? [J]. *Clin Lab Med*, 2019, 39(3): 405-418.

[15] XIE Y, DU J, JIN W, et al. Next generation sequencing for diagnosis of severe pneumonia: China, 2010—2018 [J]. *J Infect*, 2019, 78(2): 158-169.

[16] SCHLABERG R, CHIU C Y, MILLER S, et al. Validation of metagenomic next-generation sequencing tests for universal pathogen detection[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2017, 141(6): 776-786.

[17] 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.

[18] CHIU C Y, MILLER S A. Clinical metagenomics[J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(6): 341-355.

[19] BESSER J, CARLETON H A, GERNER S P, et al. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2018, 24(4): 335-341.

(收稿日期: 2021-12-06 修回日期: 2022-04-01)

(上接第 2021 页)

[19] BOGUNIEWICZ J, RUBIANO L A, KAPLAN S L, et al. Comparison of musculoskeletal infections due to non-typhoidal salmonella species and staphylococcus aureus in immunocompetent children [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2019, 38(10): 1020-1024.

[20] BRITTO C D, MATHIAS S, BOSCO A, et al. Pathogen genomic surveillance of typhoidal Salmonella infection in adults and children reveals no association between clinical outcomes and infecting genotypes[J]. *Trop Med Health*, 2020, 48: 58.

[21] RUSSELL C D, TSANG S J, SIMPSON A, et al. Outcomes, microbiology and antimicrobial usage in pressure ulcer-related pelvic osteomyelitis: messages for clinical practice[J]. *J Bone Jt Infect*, 2020, 5(2): 67-75.

[22] WIN Z, O'FLYNN E, O'ROURKE E J, et al. F-18 FDG PET in the diagnosis and monitoring of salmonella vertebral osteomyelitis: a comparison with MRI[J]. *Clin Nucl Med*, 2006, 31(7): 437-440.

[23] GUFFROY B, VILLEVAL-FEDERICI L, HEIMBURGER C, et al. Management of Salmonella typhimurium sepsis with thoracic infectious aortitis using (18) F-FDG PET/CT[J]. *J Nucl Cardiol*, 2018, 25(1): 356-357.

[24] ZHAN Z, XU X, GU Z, et al. Molecular epidemiology and

antimicrobial resistance of invasive non-typhoidal Salmonella in China, 2007—2016[J]. *Infect Drug Resist*, 2019, 12: 2885-2897.

[25] CRUMP J A, SJOLUND-KARLSSON M, GORDON M A, et al. Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive Salmonella infections[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2015, 28(4): 901-937.

[26] KE Y, LU W, LIU W, et al. Non-typhoidal Salmonella infections among children in a tertiary hospital in Ningbo, Zhejiang, China, 2012—2019 [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2020, 14(10): e8732.

[27] MOON D C, KIM S J, MECHESSO A F, et al. Mobile colistin resistance gene mcr-1 detected on an IncI2 plasmid in salmonella typhimurium sequence type 19 from a healthy pig in South Korea[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(2): 398.

[28] PICCINI G, MONTOMOLI E. Pathogenic signature of invasive non-typhoidal Salmonella in Africa: implications for vaccine development[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2020, 16(9): 2056-2071.

(收稿日期: 2021-11-29 修回日期: 2022-04-08)