

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.22.011

宏基因组二代测序在肺部非典型病原体感染中的应用*

谢燕君, 卢健聪[△], 叶 凯, 林俊鸿

惠州市中心人民医院呼吸与危重症医学科二区, 广东惠州 516001

摘 要:目的 探究宏基因组二代测序(mNGS)检测对肺部非典型病原体感染的诊断价值。方法 收集 2019 年 11 月 20 日至 2020 年 7 月 17 日该院呼吸与危重症医学科收治的诊断肺部感染性疾病并行 mNGS 检测的 51 例患者, 比较传统检测方法与 mNGS 检测对病原体检出率的差异, 并探讨 mNGS 在肺部非典型病原体感染中的应用。结果 检出组的炎症指标水平与未检出组比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。mNGS 检测对病原菌的检出率明显高于传统检测方法(88.24% vs. 47.06%, $P<0.05$)。mNGS 检测对非典型病原体的检出率明显高于传统检测方法(58.82% vs. 15.69%, $P<0.05$)。mNGS 检测在同一患者中检出 2 种及以上非典型病原体的混合感染共 13 例, 明显高于传统检测方法的 1 例($P<0.05$)。结论 mNGS 检测对肺部非典型病原体感染的检出率明显优于传统检测方法, 其可以同时检出多种病原体感染, 对肺部非典型病原体感染的病原学诊断价值优于传统检测方法。

关键词:宏基因组二代测序; 非典型病原体; 肺部感染

中图法分类号:R563

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)22-3065-04

Application of metagenomic next-generation sequencing in pulmonary atypical pathogen infection*

XIE Yanjun, LU Jiancong[△], YE Kai, LIN Junhong

No2. Zone of Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Huizhou Central People's Hospital, Huizhou, Guangdong 516001, China

Abstract: Objective To explore the diagnostic value of metagenomic next-generation sequencing (mNGS) in pulmonary atypical pathogen infection. **Methods** A total of 51 cases who were diagnosed with pulmonary infectious diseases and underwent mNGS detection in the Department of Respiratory and Critical Care Medicine of the hospital from November 20, 2019 to July 17, 2020 were collected, the difference between traditional detection methods and mNGS detection in the detection rate of pathogens was compared, and the application of mNGS in pulmonary atypical pathogen infection was discussed. **Results** There was no significant difference between the detected group and the non detected group ($P>0.05$). The detection rate of mNGS detection for pathogens was significantly higher than that of traditional detection methods (88.24% vs. 47.06%, $P<0.05$). The detection rate of mNGS detection for atypical pathogens was significantly higher than that of traditional detection methods (58.82% vs. 15.69%, $P<0.05$). There were 13 cases of mixed infection of 2 or more atypical pathogens detected by mNGS detection in the same patient, which was significantly higher than that of 1 case detected by traditional detection methods ($P<0.05$). **Conclusion** The detection rate of mNGS detection in pulmonary atypical pathogen infection is significantly better than that of traditional methods. mNGS detection could detect multiple pathogens at the same time, and has better diagnostic value than traditional detection methods for the pathogens of pulmonary atypical pathogens.

Key words: metagenomic next-generation sequencing; atypical pathogen; pulmonary infection

肺部感染是临床上的常见病, 在一份全球死亡率分析报告中指出, 呼吸道感染依然是死亡的首要缘由之一^[1]。肺部感染病例中大部分无法明确致病菌, 而经验性治疗往往只覆盖常见菌群。非典型病原体的

定义具有广义和狭义之分, 狭义上是指支原体、衣原体和军团菌, 广义上是指除细菌以外的所有病原体^[2]。非典型病原体如真菌、病毒、衣原体、支原体、军团菌等所致的感染治疗效果欠佳^[2], 即使临床上对

* 基金项目: 广东省惠州市科技计划项目(2020Y100)。

作者简介: 谢燕君, 女, 住院医师, 主要从事肺部感染、慢性阻塞性肺疾病的研究。 [△] 通信作者, E-mail: ljic81@126.com。

网络首发 <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20221102.1635.014.html>(2022-11-03)

病原体的检出率不断提高,也改变不了肺部感染病死率高的现状,究其原因主要是病原体无法及早明确诊断。在感染性疾病中,超过 30% 的呼吸道感染通过传统的检测方法[直接检查、抗原抗体检测、聚合酶链反应(PCR)、分离和培养等]仍无法鉴别其病原体^[3]。宏基因组二代测序(mNGS)是近年新兴的微生物检测方法,具有灵敏度高、特异性强、覆盖度广、检测能力强等优势^[4],mNGS 检测对重症肺炎合并免疫缺陷患者病原体的检出率明显高于传统检测方法,而且不受使用抗菌药物种类的影响^[5]。对非典型病原体的诊断,传统的检测方法能力有限,随着 mNGS 的应用,有望改变这一困境。本研究将从几个方面观察 mNGS 在肺部非典型病原体感染中的应用价值。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2019 年 11 月 20 日至 2020 年 7 月 17 日本院呼吸与危重症医学科收治的诊断肺部感染性疾病并行 mNGS 检测的 51 例患者,其中女 12 例,男 39 例;年龄 16~89 岁,平均(61.24±18.87)岁;社区获得性肺炎 35 例,医院获得性肺炎 16 例;符合重症肺炎诊断标准 13 例。纳入标准:肺部感染的诊断标准遵循《内科学》第 9 版中的肺炎章节^[6]。如果患者没有支气管肺泡灌洗禁忌证,首选肺泡灌洗液检测,如果存在禁忌证或者患者拒绝纤维支气管镜检查,则选择痰液检测,如果患者没有痰,则选择血液检测。排除标准:(1)不配合检查;(2)妊娠或哺乳期女性;(3)资料不齐全。本研究经本院伦理委员会批准(编号:KYLL2020055),所有患者及其家属均已签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 炎症指标 所有入选的患者在入院后,使用抗感染药物前抽取静脉血,送检验科用全自动生化分析仪检测患者血常规、C 反应蛋白、降钙素原等。

1.2.2 传统病原体检测方法 入选患者外送行抗原及抗体检测(包括军团菌、支原体、立克次体、衣原体、腺病毒、合胞病毒、流感病毒),特异性核酸序列检测(包括流感病毒、腺病毒、鼻病毒、冠状病毒、合胞病毒、流感嗜血杆菌、肺炎链球菌、军团菌、结核分枝杆菌等),在本院行微生物的涂片、培养等,标本来源包

括血液、痰液、肺泡灌洗液、咽拭子等,菌种的培养分离根据《下呼吸道感染细菌培养操作指南:WSIT 499-2017》^[7]进行。

1.2.3 肺泡灌洗液的采样流程 (1)部位:根据患者胸部 CT 影像学,选择病灶较严重的相应肺段;弥漫性改变者选择右肺中叶或左肺上叶舌段;(2)支气管镜顶端嵌顿于相应支气管段或亚段开口,经操作孔分多次注入 37℃ 无菌生理盐水,总量 60~90 mL,用低于 100 mm Hg 负压吸引获取肺泡灌洗液,总回收率≥30%;(3)弃去回收液前段可能被污染的部分,收集约 5 mL 立即送检。标本交由某基因公司配送和检测。

1.2.4 mNGS 检测 外送某基因公司,采用高通量测序技术,对标本中微生物核酸序列进行分析,通过与数据库中已有微生物的核酸序列进行比对,从而对微生物进行鉴定。检测流程包括前处理、核酸提取、合成 cDNA、片段化、文库构建、测序、生物信息分析及报告解读等。基于 Illumina 测序高通量测序平台进行 mNGS 检测。质量控制要求:测序数据量≥20 M,测序读长>50 bp,去人源序列达 90% 以上,病原数据库>10 000 种,涵盖细菌、真菌、病毒、寄生虫、分枝杆菌、衣原体和支原体多种病原微生物。

1.2.5 mNGS 检测结果判读 (1)若两种检测鉴定出相同微生物,则认为是致病菌;(2)若影像学提示存在病变且 mNGS 检测检出序列数为其他微生物的两倍,可考虑为致病菌;(3)若呼吸道标本检出结核分枝杆菌、腺病毒、流感病毒,血液标本中检出布鲁菌属,不论 mNGS 检出序列数如何,均可认为是致病菌^[6]。

1.2.6 分组标准 根据 mNGS 检测是否检出微生物分为检出组与未检出组。

1.3 统计学处理 采用 SPSS23.0 软件进行数据处理和统计分析。非正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,两组间比较采用秩和检验。计数资料采用频数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 检出组与未检出组相关炎症指标比较 两组白细胞计数、降钙素原、C 反应蛋白水平比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 检出组与未检出组相关炎症指标比较 [$M(P_{25}, P_{75})$]

组别	<i>n</i>	白细胞计数($\times 10^9/L$)	降钙素原(g/L)	C 反应蛋白(mg/L)
检出组	45	9.60(6.30,12.80)	0.12(0.06,0.48)	57.64(12.88,105.31)
未检出组	6	9.25(5.40,13.25)	0.51(0.27,0.58)	123.34(94.47,225.37)

2.2 mNGS 检测与传统检测方法检出率比较 51 例患者中,采取传统检测方法标本显示阳性结果有 24

例,检出率为 47.06%,而 mNGS 检测标本显示阳性结果 45 例,检出率为 88.24%,mNGS 检测检出率明

显高于传统检测方法($\chi^2=19.75, P<0.05$)。

2.3 mNGS 检测与传统检测方法对非典型病原体感染检出率比较 mNGS 检测检出病毒 20 例(疱疹病毒 7 例、EB 病毒 10 例、巨细胞病毒 2 例、甲型流感病毒 1 例),支原体 4 例,衣原体 1 例,弯孢霉属 1 例,白色念珠菌 14 例,曲霉菌 2 例,马拉色菌 2 例,肺孢子菌 5 例,共 30 例患者检出非典型病原体感染,检出率为 58.82%。传统检测方法检出曲霉菌 2 例,白色念珠菌 5 例,支原体 2 例,共 8 例患者检出非典型病原体感染,检出率为 15.69%。mNGS 检测对非典型病原体感染的检出率高于传统检测方法($\chi^2=40.60, P<0.05$)。

2.4 mNGS 检测与传统检测方法对非典型病原体混合感染检出率比较 mNGS 检测检出 30 例非典型病原体感染患者中,在同一患者中检出 2 种及以上非典型病原体的混合感染共 13 例;传统检测方法检出 8 例非典型病原体感染患者中,检出 1 例混合感染;mNGS 检测对非典型病原体混合感染检出率高于传统检测方法($\chi^2=16.59, P<0.05$)。

3 讨论

相关研究表明,非典型病原体感染在肺部感染中占比逐渐上升,约 22% 的肺部感染致病菌为非典型病原体,且在肺部感染患者中,若初始经验性治疗覆盖非典型病原体可加快病情控制、缩短住院时间及降低病死率,但大部分患者未能接受上述治疗^[8],并且经验性治疗可导致传统检测方法对病原体的检出率下降,从而增加治疗疾病所需的费用及时间^[9],故寻找一个可供临床医生及早准确识别非典型病原体感染的方法显得尤为重要。

本研究发现,mNGS 检测对总体病原体及非典型病原体的检出率均高于传统检测方法。这是因为 mNGS 是新一代的病原微生物鉴定方法,以序列为基础,不需要培养,通过直接提取标本中全部微生物的核酸进行高通量测序,目前 mNGS 检测的数据库覆盖超过 10 000 种病原体,能同时检测多种病原体(细菌、真菌、病毒、寄生虫、支原体、衣原体),具有无偏倚、广覆盖的特点,能快速准确地提供病原鉴定、分型结果,拓宽检测的病原谱,提高病原体的整体检出率。传统病原体检测方法多以培养为主,耗时需要 3~5 d,检出率仅有 15%~20%。PCR 检测与血清学检测在灵敏度、特异性和检测时效上明显优于培养法,但是其仅能基于已知的病原菌进行,检测目标局限,所能提供的信息有限,依然无法解决临床病原体检出率低的问题。除此之外,对于混合感染和未知病原体的检测是传统检测方法无法逾越的障碍。本研究发现,mNGS 检测不仅对非典型病原体感染的检出率优于传统检测方法,且对于同一患者存在 2 种及以上病原

体的混合感染的检出较传统检测方法也具有明显的优势。本研究发现,mNGS 检测与传统检测方法对部分标本的检测结果显示存在差异,考虑可能存在以下因素:(1)标本取样时间不一致;(2)标本的取样位置存在差别;(3)mNGS 检测在检测真菌和结核分枝杆菌上存在一定缺陷,存在假阴性的可能;(4)所使用的标本类型不同,本研究中部分采用血液标本进行 mNGS 检测。

本研究发现,mNGS 检测在多种非典型病原体的检测中存在明显优势,传统病毒检测方法中,病毒特异性抗原抗体检测的检出率偏低,PCR 检测虽然可以准确检测病毒核酸,但只能检出已知的致病菌^[10],对于未知的病原体检测,mNGS 检测较 PCR 检测具有明显优势^[11],故 mNGS 检测可作为传统检测方法的补充手段,有助于更快更早地定位致病菌^[11-12]。本研究中,1 例病毒感染患者入院时的咽拭子并未检测出甲型流感病毒感染,外送肺泡灌洗液行 mNGS 检测后提示甲型流感病毒感染,予抗病毒治疗后病情逐步得到控制。真菌感染多发生于免疫力低下患者,如艾滋病、器官移植、慢性消耗性疾病及服用免疫抑制药物等患者^[13]。对于肺孢子菌肺炎患者,确诊需检出肺孢子菌的滋养体或包囊,本研究中 mNGS 检测共检出 5 例肺孢子菌,但传统检测方法均未能在上述标本中检出致病菌,对这类患者进行对症治疗后其病情好转并出院。在支原体、衣原体及军团菌检测方面,因其培养条件苛刻,临床中需比较恢复期血清学指标或尿抗原等进行确诊,虽然血清学检测及 PCR 检测的开展为其诊断提供了帮助,但需临床医生有目的地进行检测,因此诊断较难^[14]。有研究表明,mNGS 检测可弥补传统检测方法在少见致病菌中检测的不足^[15],且 mNGS 检测范围大,检测所需时间短,仅需 48 h 即可得出结果,为临床下一步诊治提供参考,故 mNGS 检测为非典型病原体感染的诊断提供了强有力的帮助^[16]。同时,mNGS 检测结果受抗菌药物的影响小,可以为临床用药提供更准确地指导^[17]。

综上所述,mNGS 检测作为新的检测手段,目前已经在临床中广泛应用,其对非典型病原体的检出优势明显,对肺部非典型病原体感染的病原学诊断价值优于传统检测方法。虽然 mNGS 检测的优点很多,但是其价格昂贵,标本保存条件高,对于耐药菌的检测仍在探索中,且对于报告准确性的解读仍有待进一步提升。

参考文献

- [1] GBD 2016 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 [J]. Lancet, 2017, 390

(10100):1151-1210.

[2] MURDOCH D R, CHAMBERS S T. Atypical pneumonia: time to breathe new life into a useful term? [J]. Lancet Infect Dis, 2009, 9(8): 512-519.

[3] DAHYOT S, LEMEE L, PESTEL-CARON M. Description and role of bacteriological techniques in the management of lung infections [J]. Rev Mal Respir, 2017, 34(10): 1098-1113.

[4] LECUIT M, ELOIT M. The diagnosis of infectious diseases by whole genome next generation sequencing: a new era is opening [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2014, 4: 25.

[5] 卢健聪, 谢燕君, 叶凯, 等. mNGS 技术在免疫缺陷重症肺炎患者病原体诊断中的意义 [J/CD]. 中华肺部疾病杂志 (电子版), 2021, 14(3): 360-362.

[6] 葛均波、徐永健、王辰. 内科学 [M]. 9 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 41-57.

[7] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 下呼吸道感染细菌培养操作指南: WS/T 499-2017 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.

[8] ARNOLD F W, SUMMERGILL J T, LAJOIE A S, et al. A worldwide perspective of atypical pathogens in community-acquired pneumonia [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 175(10): 1086-1093.

[9] BARBER K E, ORTWINE J K, AKINS R L. Ceftazidime/avibactam: who says you can't teach an old drug new tricks? [J]. J Pharm Pharm Sci, 2016, 19(4): 448-464.

[10] 陈涔, 李园园, 潘频华, 等. 二代测序技术在重症社区获得性肺炎诊断中的意义 [J]. 中国感染控制杂志, 2020, 19

(4): 335-340.

[11] WANG H, LU Z, BAO Y, et al. Clinical diagnostic application of metagenomic next-generation sequencing in children with severe nonresponding pneumonia [J]. PLoS One, 2020, 15(6): e0232610.

[12] 缪青, 马玉燕, 胡必杰. 基于宏基因组二代测序技术检测呼吸道病毒的临床应用 [J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(12): 1908-1912.

[13] PARIZE P, MUTH E, RICHAUD C, et al. Untargeted next-generation sequencing-based first-line diagnosis of infection in immunocompromised adults: a multicentre, blinded, prospective study [J]. Clin Microbiol Infect, 2017, 23(8): 574. e1-574. e6.

[14] ZHANG H, ZHAN D, CHEN D, et al. Next-generation sequencing diagnosis of severe pneumonia from fulminant psittacosis with multiple organ failure: a case report and literature review [J]. Ann Transl Med, 2020, 8(6): 401.

[15] 朱榕生, 罗汝斌, 王选铤. 鹦鹉热衣原体致重症社区获得性肺炎一例 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2019, 42(7): 548-551.

[16] SCHMOCH T, WESTHOFF J H, DECKER S O, et al. Next-generation sequencing diagnostics of bacteremia in pediatric sepsis [J]. Medicine (Baltimore), 2021, 100(25): e26403.

[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.

(收稿日期: 2021-12-16 修回日期: 2022-04-08)

(上接第 3064 页)

[5] 周志强, 孙梅, 代爱军. 术前血清糖类抗原 125、血管内皮生长因子及丙酮酸激酶 M2 型表达与子宫内膜癌复发的关系 [J]. 中国临床医生杂志, 2020, 48(8): 968-971.

[6] 中国抗癌协会妇科肿瘤专业委员会. 子宫内膜癌诊断与治疗指南 (2021 年版) [J]. 中国癌症杂志, 2021, 31(6): 501-512.

[7] 肖婧, 吴颖. 子宫内膜癌患者微卫星不稳定性及其临床意义研究 [J]. 中国全科医学, 2022, 25(3): 275-279.

[8] 申晓畅, 孙一卿, 颜磊, 等. miR1290 在子宫内膜癌发生发展中的作用及其机制 [J]. 中华肿瘤杂志, 2022, 44(2): 130-138.

[9] 陈玉芬, 张秀俊, 苏海飞, 等. 血清 miR-155 联合组织 PTEN 检测对子宫内膜癌的诊断价值 [J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(1): 37-40.

[10] 李丽. 血清 HE4、PKM2、sFLT1 水平结合 3D-TVS 血流动力学指数对子宫内膜癌的诊断价值 [J]. 中国医学创

新, 2022, 19(6): 153-157.

[11] 张慧玲, 吕艳关. 术前血清 CA125、HE4 和中性粒细胞与淋巴细胞比值联合检测在子宫内膜癌诊断中的作用 [J]. 现代肿瘤医学, 2020, 28(5): 792-795.

[12] 张晓荣, 李微. 乙型肝炎相关肝细胞癌患者血清 AFP、VEGF、AFU 水平与微血管侵犯的相关性分析 [J]. 检验医学与临床, 2021, 18(22): 3294-3297.

[13] 赵健, 高荣荣. 检测 CA199、VEGF、HE4 预测子宫内膜癌淋巴结转移价值 [J]. 中国计划生育学杂志, 2020, 28(11): 1901-1904.

[14] 王会忠, 高远, 刘佰慧, 等. 子宫内膜癌患者超声造影定量指标与血清基质金属蛋白酶及 VEGF 表达关系 [J]. 中国计划生育学杂志, 2021, 29(11): 2469-2473.

[15] 吕俊杰, 胡春秀, 陈京亨, 等. 妇科恶性肿瘤术后复发及其影响因素分析 [J]. 华南预防医学, 2020, 46(4): 441-443.

(收稿日期: 2022-02-04 修回日期: 2022-06-10)