

本文引用格式:程长昆,姜长舟.宏基因组二代测序在下呼吸道感染患者支气管肺泡灌洗液中的病原学诊断价值[J].安徽医学,2024,45(3):326-330.DOI:10.3969/j.issn.1000-0399.2024.03.013

宏基因组二代测序在下呼吸道感染患者支气管肺泡灌洗液中的病原学诊断价值

程长昆 姜长舟

[摘要] **目的** 比较下呼吸道感染患者支气管肺泡灌洗液(BALF)中病原菌的宏基因组二代测序(mNGS)和常规培养检测结果,分析mNGS检出阳性的影响因素和临床意义。**方法** 回顾性分析2020年4月至2023年3月安庆市望江县医院的130例下呼吸道感染患者的BALF样本,进行mNGS和常规培养检测,比较2种方法的阳性率、病原体分布和一致性,分析mNGS检出阳性与患者临床指标和预后的关系。**结果** mNGS检出阳性率为76.9%,常规培养检测阳性率为43.1%,差异有统计学意义($P<0.05$)。mNGS能够检测出更多种类的病原菌,主要为革兰阴性杆菌、真菌和非典型病原体。mNGS与常规培养检测结果在细菌、真菌和非典型病原体方面具有中等一致性,在病毒和寄生虫方面具有较低一致性。mNGS检出阳性与患者年龄、基础疾病、外周血白细胞和C反应蛋白等因素相关,是影响mNGS检出阳性的危险因素。**结论** mNGS在下呼吸道感染患者BALF中的病原学诊断优于常规培养检测,能检测出更多和更广的病原菌,有助于下呼吸道感染患者临床合理用药和改善患者预后。

[关键词] 下呼吸道感染;支气管肺泡灌洗液;宏基因组二代测序;病原学诊断

doi:10.3969/j.issn.1000-0399.2024.03.013

下呼吸道感染是指喉以下的气管、支气管、肺泡等部位发生的感染性疾病^[1]。下呼吸道感染的病原体十分复杂,以细菌和真菌为主要致病因素^[2]。及时准确地鉴定下呼吸道感染的病原体,对于指导临床合理用药、降低耐药率、改善患者预后具有重要意义^[3]。目前,临床上常用的下呼吸道感染病原体检测方法主要有传统的微生物培养、分子生物学检测和宏基因组二代测序(metagenomics next-generation sequencing, mNGS)等^[4-7]。近年来,mNGS在下呼吸道感染的病原学诊断中逐渐展现出其优势和潜力^[8-10]。支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)是利用支气管镜对肺段或亚肺段进行灌洗后采集到的肺泡表面液体,是目前最能反映下呼吸道感染的病原体分布情况的标本,具有较高的代表性和准确性^[11]。因此,本研究采用mNGS和常规培养检测方法对下呼吸道感染患者BALF中的病原体进行分析,探讨2种方法的优缺点和一致性,以及mNGS检出阳性与患者临床指标和预后的关系,为临床提供有价值的参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性收集2020年4月至2023年3月安庆市望江县医院内科130例下呼吸道感染患者的临床资料。根据mNGS是否检出病原体,将患者分为

检出组100例和未检出组30例。两组患者年龄、性别和基础疾病比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表1。本研究符合伦理原则,经过医院伦理委员会批准(伦理编号:2023-LC-003)。

表1 两组患者一般资料比较

指标	检出组 (n=100)	未检出组 (n=30)	χ^2 值	P值
年龄(岁)	55.6±15.8	50.7±17.3	1.737	0.166
性别[例(%)]			0.190	0.664
男性	58(58.0)	16(53.3)		
女性	42(42.0)	14(46.7)		
基础疾病[例(%)]			1.639	0.795
高血压	28(28.0)	8(26.7)		
糖尿病	16(16.0)	4(13.3)		
慢性阻塞性肺疾病	24(24.0)	6(20.0)		
肺癌	12(12.0)	2(6.7)		
其他	20(20.0)	10(33.3)		

1.2 纳入与排除标准 纳入标准:①年龄≥18岁者;②以《诸福棠实用儿科学》(第8版)^[12]中下呼吸道感染的诊断标准为金标准,包括社区获得性肺炎、医院获得性肺炎、呼吸机相关性肺炎等者;③入院后24h内进行支气管镜检查并采集BALF样本者;④BALF样本同时进行mNGS和常规培养检测者。排除标准:①合并其他

部位的感染性疾病者;②BALF 样本不符合质量要求,如回收率低于 30%、细胞总数低于 10⁴/mL、中性粒细胞比例高于 80% 等者;③BALF 样本在运输或保存过程中发生污染或损坏者;④患者或其家属不同意参与本研究者。

1.3 方法 所有患者均在入院后 24 h 内进行支气管镜检查,按照标准操作程序采集 BALF 样本,每个肺段或亚肺段灌注生理盐水 20~40 mL,回收率不低于 30%,回收液体立即分装为 2 份,一份用于 mNGS 检测,另一份用于常规培养检测。

1.3.1 mNGS 检测 采用 QIAamp DNA Mini Kit(Qiagen, 德国)提取 BALF 样本中的总核酸,采用 NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina(NEB, 美国)构建文库,采用 Illumina NovaSeq 6000 平台进行双端 150 bp 高通量测序。测序数据经过质量控制、去除人源序列、去除低质量序列、去除重复序列等步骤后,与 NCBI 数据库进行比对分析,根据比对结果确定病原体种类和相对丰度。设定检出阈值为每百万条 reads 中至少有 5 条 reads 与目标序列匹配。

1.3.2 常规培养检测 将 BALF 样本接种于血琼脂培养基、巧克力琼脂培养基、MacConkey 琼脂培养基、马铃薯葡萄糖琼脂培养基等不同培养基上,置于 37℃ 恒温箱中培养 24~48 h,观察菌落生长情况,按照常规方法进行菌种鉴定和药敏试验。同时将 BALF 样本接种于液体培养基中,置于自动血培养仪中培养 5 d,观察是否有阳性信号产生,如有阳性信号,则进行菌种鉴定和药敏试验。另外,将 BALF 样本制成涂片,在油镜下观察是否有真菌或寄生虫存在。

1.4 观察指标 主要观察指标为 mNGS 和常规培养检测的阳性率、检测病原体的分布、病原体检测的一致性。次要观察指标为 mNGS 检出组和未检出组患者的

临床指标、治疗方案、预后情况及影响 mNGS 检出阳性的因素。其中,临床指标包括外周血白细胞、C 反应蛋白、降钙素原、中性粒细胞计数及血清中细胞因子的浓度。预后情况包括住院时间、转入 ICU 的比例、机械通气的比例及病死率等。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析。计量资料均符合正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用 *t* 检验;计数资料以频数和百分比表示,两组间比较采用 χ^2 检验。mNGS 与常规培养检测结果的一致性采用 Kappa 系数进行评价,Kappa 值在 0.01~0.20 为无一致性,0.21~0.40 为较低一致性,0.41~0.60 为中等一致性,0.61~0.80 为较高一致性,0.81~1.00 为完全一致性。影响 mNGS 检出阳性的因素采用 logistic 多因素回归分析,以 *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 mNGS 和常规培养检测结果比较 mNGS 检测结果显示,130 例下呼吸道感染患者 BALF 中共检出病原体 100 株,未检出寄生虫。mNGS 检出阳性率为 76.9%(100/130)。常规培养检测结果显示,130 例下呼吸道感染患者 BALF 中共检出病原体 56 株,未检出非典型病原体和寄生虫。mNGS 与常规培养检测的阳性率比较,差异有统计学意义($\chi^2=31.026, P<0.001$)。见表 2。以《诸福棠实用儿科学》(第 8 版)中下呼吸道感染的诊断标准为金标准,分别以常规培养及 mNGS 检测结果为检验变量,绘制受试者工作特征(receiver operator characteristic, ROC)曲线。ROC 曲线显示, mNGS 检测的曲线下面积(area under the curve AUC)为 0.84,而常规培养检测的 AUC 为 0.76。见图 1。

表 2 mNGS 和常规培养检测的阳性率和病原体分布比较

项目	mNGS(<i>n</i> =100)	常规培养(<i>n</i> =56)	AB 全阳(例)	AB 全阴(例)	A 阳 B 阴(例)	A 阴 B 阳(例)	Kappa 值
mNGS 阳性率	76.9% (100/130)	43.1% (56/130)					
细菌(株)	64(38/18/18/4)	48(32/12/2/2)	36	62	28	4	0.542
真菌(株)	24(14/6/4)	6(4/2/0)	4	102	20	4	0.418
病毒(株)	10(4/2/4)	2(2/0/0)	2	116	8	4	0.246
非典型病原体(株)	2(1/1)	0	0	128	2	0	0.122
寄生虫(株)	0	0	0	130	0	0	-

注:A 为 mNGS 培养,B 为常规培养。细菌种类:革兰阴性杆菌/革兰阳性球菌/厌氧菌/其他细菌;真菌种类:念珠菌属/曲霉属/其他真菌;病毒种类:呼吸道合胞病毒/肺炎支原体/其他病毒;非典型病原体:军团菌属/肺炎衣原体。

2.3 两组患者临床指标和预后比较 mNGS 检出组与未检出组在外周血白细胞、C 反应蛋白、降钙素原、中性粒细胞计数及血清中细胞因子浓度差异均有统计学意义(*P*<0.05)。mNGS 检出组患者的住院时间、转入 ICU 的比例、机械通气的比例、病死率等预后指标均高

于未检出组,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 3。

2.4 影响 mNGS 检出阳性的多因素 logistic 回归分析将 mNGS 检出阳性作为因变量,将年龄、性别、基础疾病、外周血白细胞、C 反应蛋白、降钙素原、中性粒细胞

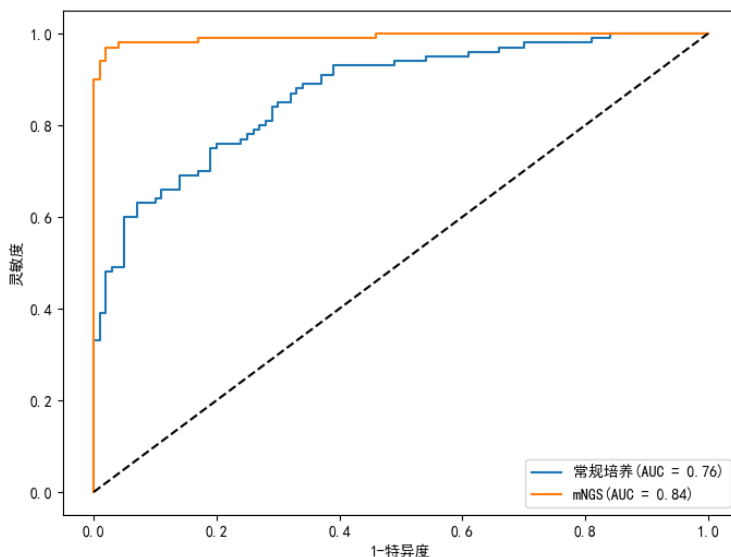


图 1 mNGS与常规培养的ROC曲线分析

表 3 两组患者临床指标比较

指标	检出组(n=100)	未检出组(n=30)	t值	P值
外周血白细胞($\times 10^9/L$)	12.4 \pm 4.6	8.7 \pm 3.2	4.293	<0.001
C反应蛋白(mg/L)	98.3 \pm 45.2	65.4 \pm 32.1	3.138	0.003
降钙素原(ng/mL)	12.7 \pm 8.4	7.6 \pm 5.3	3.135	0.003
中性粒细胞计数($\times 10^9/L$)	9.8 \pm 4.2	6.4 \pm 2.9	4.102	<0.001
IL-6(pg/mL)	76.5 \pm 34.6	48.3 \pm 26.1	3.766	<0.001
IL-8(pg/mL)	102.4 \pm 42.3	68.7 \pm 31.2	3.991	<0.001
TNF- α (pg/mL)	38.6 \pm 16.5	25.4 \pm 12.3	3.494	0.001
住院时间(d)	18.2 \pm 7.3	13.5 \pm 5.6	3.372	0.001
转入ICU的比例[例(%)]	32 (32.0)	6 (20.0)	15.371	<0.001
机械通气的比例[例(%)]	28 (28.0)	4 (13.3)	14.448	<0.001
病死率[例(%)]	16 (16.0)	2 (6.7)	7.436	<0.001

注:IL-6为白细胞介素6,IL-8为白细胞介素8,TNF- α 为肿瘤坏死因子 α 。

计数及血清中细胞因子等作为自变量。连续变量(年龄、外周血细胞、C反应蛋白、降钙素原、中性粒细胞计数、血清中细胞因子)以原始数值表示,二分类变量:性别(0=女性,1=男性)和基础疾病(0=无,1=有)。采用逐步回归法进行多因素 logistic 回归分析,结果显示,年龄、基础疾病、外周血白细胞和 C 反应蛋白是影响 mNGS 检出阳性的危险因素。见表 4。

3 讨论

下呼吸道感染是一种常见的呼吸系统疾病,其病原体复杂多样,及时准确地鉴定病原体对于指导临床合理用药、降低耐药率、改善患者预后具有重要意义。本研究采用 mNGS 和常规培养检测方法对下呼吸道感

染患者 BALF 中的病原体进行分析,探讨两种方法的优缺点和一致性,以及 mNGS 检出阳性与患者临床指标和预后的关系,为临床提供有价值的参考。

本研究结果显示,mNGS 检出阳性率高于常规培养检测,差异有统计学意义($P < 0.001$),与张彩霞等^[13]的研究结果一致。这可能与 mNGS 能够同时检测样本中所有类型的核酸序列,从而鉴定出多种已知或未知的微生物有关,而常规培养检测受限于培养条件、培养时间、抗生素干扰等因素,不能检测非培养性或难培养性微生物。

本研究结果显示,mNGS 与常规培养检测结果在细菌、真菌和非典型病原体方面具有中等一致性(Kappa=0.42~0.54),在病毒和寄生虫方面具有较低一致性(Kappa=0.12~0.25)。可能与以下原因有关:①mNGS

表 4 影响 mNGS 检出阳性的多因素 logistic 回归分析

因素	回归系数	标准误	Wald χ^2 值	P 值	OR 值	95%CI
常数项	-1.211	0.053	522.079	<0.001	0.292	0.233~1.038
年龄	0.034	0.011	9.544	0.002	1.028	1.005~1.060
性别	-0.120	0.340	0.125	0.722	0.891	0.441~1.792
基础疾病	0.937	0.372	6.344	0.011	2.560	1.244~5.282
外周血白细胞	0.171	0.048	12.691	0.001	1.182	1.066~1.302
C 反应蛋白	0.022	0.013	8.864	0.004	1.024	1.007~1.043
降钙素原	0.012	0.010	4.440	0.057	1.007	1.001~1.021
中性粒细胞计数	0.088	0.061	2.081	0.113	1.101	0.980~1.234
血清中细胞因子	0.058	0.021	3.628	0.066	0.996	0.996~1.000

能够检测出常规培养检测难以发现的病原体,如非培养性或难培养性微生物、新发现的微生物等;②mNGS 能够区分不同菌属或菌种之间的微小差异,而常规培养检测可能将其归为同一类;③mNGS 可能检测到一些非致病性或低致病性的微生物,如皮肤或口腔的正常菌群,而常规培养检测可能忽略其存在;④mNGS 可能检测到一些已经死亡或被抑制的微生物的核酸残留,而常规培养检测只能检测活性的微生物^[14-15]。因此, mNGS 与常规培养检测结果之间存在一定的差异,不能完全替代或否定彼此,而应结合临床综合判断。

本研究结果显示, mNGS 检出阳性与患者年龄、基础疾病、外周血白细胞和 C 反应蛋白等因素相关,提示 mNGS 可作为下呼吸道感染患者病情评估和预后判断的辅助手段。mNGS 检出组患者的外周血白细胞、C 反应蛋白、降钙素原、中性粒细胞计数及血清中细胞因子等炎症指标均高于未检出组,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明 mNGS 检出阳性反映了患者体内存在较强的炎症反应^[16-17]。mNGS 检出阳性提示患者预后不良^[18-19]。多因素 logistic 回归分析显示,年龄、基础疾病、外周血白细胞和 C 反应蛋白是影响 mNGS 检出阳性的危险因素,表明这些因素与患者体内病原体负荷和感染严重程度有关^[20]。

本研究有以下局限性:①本研究为回顾性对照研究,存在选择偏倚和混杂因素的可能;②本研究纳入的患者数量较少,可能影响结果的稳定性和可信度;③本研究未对 mNGS 检测到的非致病性或低致病性微生物进行进一步验证,可能导致结果的过度解释或误解。

综上所述, mNGS 在下呼吸道感染患者 BALF 中的病原学诊断中具有较高的敏感性和广谱性,能够检测出常规培养检测难以发现的病原体,对于指导临床合理用药和改善患者预后具有重要意义。mNGS 与常规培养检测结果之间存在一定的差异,不能完全替代或否定彼此,而应结合临床综合判断。

参考文献

- [1] 马圆,韩莹,马礼兵,等.下呼吸道感染疾病负担及影响因素研究进展[J].中华流行病学杂志,2023,44(2):341-347.
- [2] 任燕飞,张敏,杨涛,等.呼吸重症科患者下呼吸道感染病原菌流行病学分析[J].检验医学,2023,38(2):157-162.
- [3] KINI S, KALAL B S, CHANDY S, et al. Prevalence of respiratory syncytial virus infection among children hospitalized with acute lower respiratory tract infections in Southern India[J]. World J Clin Pediatr, 2019,8(2):33.
- [4] 王帆,安海波,张燕,等.重组人干扰素 α 1b联合布地奈德雾化对呼吸道合胞病毒感染大鼠肺泡灌洗液及肺组织黏蛋白1的影响[J].国际呼吸杂志,2022,42(19):1459-1463.
- [5] 郭水根,王晶,粟玲,等.PSM法评价两种吸入剂治疗 COPD 伴下呼吸道感染的疗效与安全性[J].复旦学报(医学版),2022,49(5):670-676,696.
- [6] ROUZÉ A, MARTIN-LOECHES I, POVOA P, et al. Relationship between SARS-CoV-2 infection and the incidence of ventilator-associated lower respiratory tract infections: a European multicenter cohort study[J]. Intensive Care Med, 2021, 47: 188-198.
- [7] 蔡昌君,黄惠敏,桂冬梅,等.人 β -防御素-3调控呼吸道合胞病毒致哮喘小鼠的气道重塑及白细胞激活[J].东南大学学报(医学版),2022,41(2):183-192.
- [8] 田鹤,成怡冰,朱庆雄,等.下呼吸道感染患儿肺泡灌洗液的病原菌分布及其耐药模式[J].中华传染病杂志,2022,40(1): 20-27.
- [9] ADDERLEY N, HUMPHREYS C J, BARNES H, et al. Bronchoalveolar lavage fluid lymphocytosis in chronic hypersensitivity pneumonitis: a systematic review and meta-analysis[J]. Eur Respir J, 2020, 56(2):2000206.
- [10] ZHENG Y, QIU X, WANG T, et al. The diagnostic value of metagenomic next-generation sequencing in lower respiratory tract infection[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 694756.
- [11] MURPHY C N, FOWLER R, BALADA-LLASAT J M, et al. Multicenter evaluation of the biofire filmarray pneumonia/

- pneumonia plus panel for detection and quantification of agents of lower respiratory tract infection[J]. *J Clin Microbiol*, 2020,58(7):e00128-20.
- [12] 江载芳,申昆玲,沈颖. 诸福棠实用儿科学(上册)[M]. 8版. 北京:人民卫生出版社,2015:1247-1251.
- [13] 张彩霞,刘新年,杜川,等. mNGS技术和血清G试验在判断耶氏肺孢子菌感染与定植中的价值及二者相关性研究[J]. *中国全科医学*, 2023,26(11):1355-1360.
- [14] 曾湘鹏,薛明明,徐斐翔,等. 549例细菌性肝脓肿患者临床特征分析及mNGS技术在细菌性肝脓肿病原学应用研究[J]. *中华急诊医学杂志*, 2022,31(8):1091-1096.
- [15] GENTILOTTI E, DE NARDO P, CREMONINI E, et al. Diagnostic accuracy of point-of-care tests in acute community-acquired lower respiratory tract infections. a systematic review and meta-analysis[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2022,28(1):13-22.
- [16] 张称,张芳,张莹,等. 下呼吸道感染新生儿痰标本中病原菌种类调查及危险因素分析[J]. *中国妇幼保健*, 2023,38(4):705-708.
- [17] 李维,卓超,许建成,等. mNGS在检验与临床中的应用[J]. *国际检验医学杂志*, 2023,44(1):1-7.
- [18] 鲁炳怀. mNGS应用背景下的下呼吸道感染病原学检测基础能力[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2023,46(4):315-318.
- [19] 朱云,卢根,靳蓉,等. 2017-2020年我国儿童急性下呼吸道感染住院病例中呼吸道合胞病毒的感染情况分析[J]. *中华预防医学杂志*, 2022,56(12):1739-1744.
- [20] 郝小康,周军. 社区获得性下呼吸道感染患者3种病原菌分布及其耐药性分析[J]. *中国抗生素杂志*, 2022,47(9):967-970.

(2023-07-09收稿)

(本文编校:周雪春,张迪)