

宏基因组二代测序在社区获得性肺炎中的应用价值

张娟娟 闫晓培 李 宁

摘要 目的 探讨宏基因组二代测序 (metagenomic next - generation sequencing, mNGS) 检测支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中病原微生物在社区获得性肺炎中的诊断价值。**方法** 选取 2018 年 11 月 ~ 2021 年 7 月至苏州市立医院住院的初始治疗失败的社区获得性肺炎患者 57 例, 所得 BALF 同时进行传统方法和 mNGS 检测, 比较两种方法的诊断价值。**结果** 在 57 例患者 BALF 病原学检测中, mNGS 的检出率高于传统方法 (80.70% vs 33.33%), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。mNGS 检测的采信率为 84.78%, 敏感度为 90.70%, 特异性为 50.00%, 阳性预测值为 84.78%, 阴性预测值为 63.64%。mNGS 检测细菌阳性率高于传统方法 (43.86% vs 15.79%), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但两者检测真菌、结核及病毒的阳性率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。mNGS 联合传统方法检测后, 75.44% (43/57) 患者确诊, 43.86% (25/57) 患者根据 mNGS 检测结果调整了治疗方案。**结论** 在初治失败的社区获得性肺炎 BALF 病原学检测中, mNGS 的检出率高于传统方法, 尤其是对于细菌感染的诊断价值更高, 可早期识别病原体, 有效指导诊治。

关键词 宏基因组二代测序技术 肺泡灌洗液 社区获得性肺炎 病原体

中图分类号 R446

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2022.12.020

Value of Metagenomic Next - generation Sequencing in Detection of Pathogens in Adults with Community - acquired Pneumonia. ZHANG Juanjuan, YAN Xiaopei, LI Ning. Suzhou Municipal Hospital, The Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University, Jiangsu 215002, China

Abstract Objective To explore the diagnostic value of metagenomic next - generation sequencing in detection of pathogens of BALF in patients with community - acquired pneumonia. **Methods** We retrospectively analyzed the clinical data of 57 patients with community - acquired pneumonia after initial treatment failure in Suzhou Municipal Hospital from November 2018 to July 2021, and the BALFs obtained were tested by both traditional methods and mNGS to compare the diagnostic efficacy of the two methods. **Results** The detection rate of pathogen in the BALFs of all 57 patients by mNGS was significantly higher than that by the traditional detection methods (80.70% vs 33.33%) ($P < 0.05$). In community - acquired pneumonia, the acceptance rate, the sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of mNGS for pathogenic diagnosis were 84.78%, 90.70%, 50.00%, 84.78% and 63.64% respectively. The detection rate of bacteria in the BALFs by mNGS was higher than that by the traditional detection methods (43.86% vs 15.79%), and the difference was statistically significant ($P < 0.05$), but there was no difference in the rate of fungal, tuberculosis and viral positivity between the two methods ($P > 0.05$). The combination of mNGS with traditional methods resulted in a definitive pathogenic diagnosis in 75.44% of patients. 43.86% of patients with a definitive diagnosis by mNGS had their treatment regimen adjusted. **Conclusion** In the pathogenic detection of BALFs of patients with community - acquired pneumonia after initial treatment failure, the positive rate of mNGS is higher than that of traditional methods, especially for bacterial infection, which can identify the pathogen early and effectively guide the diagnosis and treatment.

Key words Metagenomic next - generation sequencing; BALF; Community - acquired pneumonia; Pathogen

社区获得性肺炎是呼吸系统常见病、多发病。起始治疗以经验性抗感染治疗为主, 部分患者治疗失败后出现病情延误及进展, 对于初始治疗失败及重症患

者而言, 明确病原体有利于精确指导治疗, 改善患者预后。传统病原学检测方法检出阳性率低, 病原学培养周期长, 非典型病原体难以被培养。宏基因组二代测序技术 (metagenomic next - generation sequencing, mNGS) 是运用高通量基因测序、不依赖传统的微生物培养而明确样本中所有微生物的分类和功能的技术, 能够快速、客观地检测临床样本中的病原微生物, 包括细菌、真菌、病毒及寄生虫等, 广泛应用于感染性

基金项目: 江苏省苏州市“科教兴卫”青年科技项目 (KJXW2019027)

作者单位: 215002 南京医科大学附属苏州医院 (苏州市立医院) 呼吸与危重症医学科

通信作者: 李宁, 电子信箱: chopperzoro@126.com

疾病的诊治,较传统的检测手段更有优势,能明显提高感染性疾病的诊治效率和优化抗生素的管理^[1,2]。mNGS 在成人社区获得性肺炎的报道相对较少,本研究对苏州市立医院初治失败的社区获得性肺炎患者的支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)进行 mNGS 检测,探讨 mNGS 检测技术在成人社区获得性肺炎中的应用价值。

对象与方法

1. 研究对象:招募 2018 年 11 月~2021 年 7 月苏州市立医院收治的 57 例初始治疗效果不佳的社区获得性肺炎患者为研究对象。纳入标准:①符合中国成人社区获得性肺炎的诊断标准^[3];②抗生素治疗 72h 后出现咳嗽、咳痰或胸闷、气急等症状未见好转,仍有发热,体温大于 38℃,白细胞计数、降钙素原或 C 反应蛋白等炎性指标持续升高,机械通气;③抗感染 2 周后复查胸部 CT,肺部病灶未吸收或较前进展,所有患者抗生素治疗失败后均接受支气管镜检查,采集 BALF 同时进行了传统方法和 mNGS 检测。排除标准:①年龄 < 18 岁;②临床资料不完整。

2. 资料收集:通过住院电子病历系统,收集入选患者的性别、年龄、基础疾病、血常规、C 反应蛋白、G 试验、GM 试验、痰培养、抗生素使用情况、BALF 病原学检测结果、影像学资料、治疗前后的症状及体征、出院诊断等一般信息。

3. 检测方法:抗生素治疗失败后,57 例患者均接受支气管镜检查,所得 BALF 同时进行传统方法和 mNGS 检测。传统方法包括细菌、真菌培养、利福平耐药实时荧光定量核酸扩增技术(Xpert MTB/RIF)以及呼吸道病毒聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)检测等。Xpert MTB/RIF kit 购自美国 Cepheid 公司。BALF 的 mNGS 检验由广州微远基因科技有限公司进行,包括 DNA 和 RNA 两部分测序。BALF 的采集、保存及运输均符合标准^[4]。将 BALF 进行灭活处理,提取总核酸后,文库制备包括随机引物建库、PCR 扩增等,对合格文库进行上机测序,然后去除人源宿主序列,再与病原数据库中的参考序列进行比对,来确定 BALF 中可能致病的微生物。参考疑似背景微生物库及阴性对照检测结果,并结合所提供临床信息,最终生成检测报告。所有患者行支气管镜及 mNGS 检测前均签署知情同意书。本研究通过苏州市立医院医学伦理学委员会审批(伦理审批号:K-2020-077-K01)。

4. 临床分析:57 例患者的临床病史、炎性指标、

胸部 CT、病原学结果等资料均由两位呼吸内科主任医师独立分析并判断病原菌。意见不统一的结果,共同讨论后再决定。

5. 统计学方法:应用 SPSS 22.0 统计学软件对数据进行统计分析。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验。计数资料以例数(百分数)[*n*(%)]表示,组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法,两种方法诊断的差异性采用配对 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 一般临床资料:57 例社区获得性肺炎患者中,男性 29 例(50.88%),女性 28 例(49.12%),患者平均年龄为 59.23 ± 15.76 岁,重症肺炎 4 例(7.02%),入院平均白细胞计数为(7.65 ± 3.85) × 10⁹/L,中性粒细胞百分比为 66.88% ± 13.67%,合并基础疾病 42 例(73.68%)。

2. 两种检测方法检出结果比较:在 57 例社区获得性肺炎的 BALF 中,传统方法检测 19 例标本阳性,检出率为 33.3%;BALF 培养 14 例阳性,Xpert MTB/RIF 7 例阳性,PCR 检测出 1 例 H1N1。mNGS 共检出病原体 46 例,检出率为 80.7%。mNGS 检出率明显高于传统方法,两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。将两种方法检测结果比较,两种方法均检测出阳性 15 例(26.32%),阴性出 7 例(12.28%),mNGS 检测阳性而传统方法检测阴性者 31 例(54.39%),mNGS 检测阴性而传统方法检测阳性者 4 例(7.02%),两种方法检测结果的差异有统计学意义($P < 0.05$),两种方法均检测阳性的 15 例中,结果完全一致有 7 例(12.28%),部分一致有 4 例(7.02%),不一致有 4 例(7.02%),详见图 1。在结核诊断方面,传统方法检测 7 例阳性,mNGS 检测 4 例阳性;其中 4 例 Xpert MTB/RIF 和 mNGS 均检测阳性,3 例 Xpert MTB/RIF 检测阳性而 mNGS 检测阴性。在细菌感染方面,mNGS 检出率 43.9%,明显高于传统方法的检出率 15.8%,两者比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),但是在检测真菌、结核及病毒感染方面,两种方法比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),详见表 1。

3. 诊断和治疗的调整:将患者临床表现、辅助检查、mNGS 结果及传统方法检测结果综合分析,由两位年资高的呼吸科医生独立分析并判断是否确诊及其病原体。46 例患者 mNGS 检测阳性,其中 39 例(84.78%)予采信并确诊,而 7 例因检测结果与临床

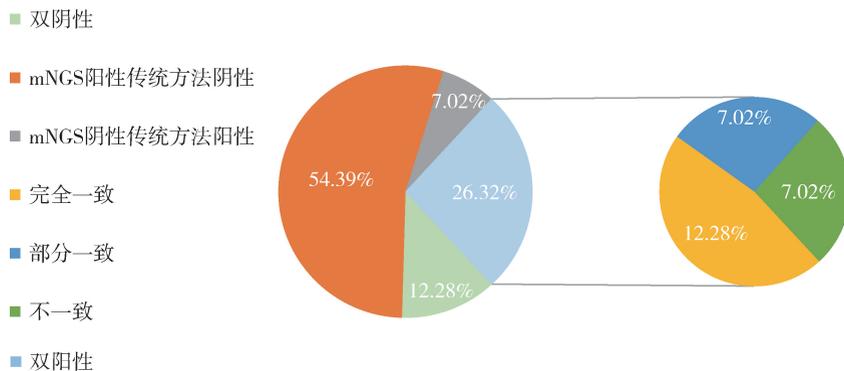


图1 mNGS与传统方法检测结果比较

表1 两种方法检出不同种类病原体的比较[n(%)]

种类	mNGS 检测 (n = 57)	传统方法 (n = 57)	P
细菌	25 (43.86)	9 (15.79)	0.001
真菌	6 (10.53)	9 (15.79)	0.406
结核	4 (7.02)	7 (12.28)	0.341
病毒	5 (8.77)	1 (1.75)	0.206

表2 mNGS检测在确诊和未确诊患者中的结果[n(%)]

mNGS 结果	确诊	未确诊	合计
mNGS 阳性	39 (68.42)	7 (12.28)	46 (80.70)
mNGS 阴性	4 (7.02)	7 (12.28)	11 (19.30)
合计	43 (75.44)	14 (24.56)	57 (100.00)

表现、影像学结果不符合,未采信。在初治失败的社区获得性肺炎中,mNGS联合传统方法检测后,共有43例患者确诊。mNGS结果在确诊和未确诊患者中的情况详见表2。由此计算出mNGS的敏感度为90.70%,特异性为50.00%,阳性预测值为84.78%,阴性预测值为63.64%。43例确诊患者中,细菌性肺炎17例,肺结核7例,非结核分枝杆菌(non-tuberculous Mycobacteria, NTM)肺炎6例,肺真菌感染5例,衣原体肺炎和支原体肺炎各1例,病毒性肺炎1例;其余5例为混合感染:细菌合并病毒感染3例,细菌合并真菌感染2例。57例患者中,25例患者根据mNGS结果调整了抗生索的治疗方案。

讨 论

社区获得性肺炎是呼吸系统常见病及多发病,住院患者的病死率为2%~15%^[5(7)]。初治失败的肺炎患者需要重复行病原学检查明确致病病原体,并及时开始精准治疗,以降低其病死率、避免抗生素滥用及遏制细菌耐药。文献报道传统方法检测的社区获得性肺炎病原学阳性率为38%^[7]。mNGS是一项新型核酸检测技术,能快速、客观、全面地检测临床标本中

的细菌、支原体、衣原体、螺旋体、真菌、病毒及寄生虫等所有微生物,已广泛应用于感染性疾病中^[8]。本研究中,mNGS检测出46例阳性,其中有39例确诊,最后43.86%的患者根据mNGS检测结果调整了抗生素方案。由此可见,对于社区获得性肺炎患者,若初治失败的患者,推荐留取呼吸道标本进行mNGS检测,可以早期识别病原体及时指导抗生素治疗^[4]。

Wang等^[9]回顾性分析了55例血液系统恶性肿瘤患者的肺活检和BALF送检mNGS结果,其病原学检出率明显高于传统方法,敏感度为97.2%,特异性为63.2%。Chen等^[10]回顾了40例疑似肺炎患者的BALF mNGS,敏感度为81.3%,特异性为76.9%。本研究57例病例,BALF mNGS的病原学检出率为80.70%,明显高于传统方法检出率为33.33%。mNGS敏感度为90.70%,特异性为50.00%,敏感度与研究报道相似,特异性略低。

研究显示,在感染性疾病中,mNGS较传统方法对真菌、结核和病毒的检出敏感度更高^[11,12]。然而本研究中肺泡灌洗液mNGS的细菌检出率明显高于传统培养,但真菌、结核和病毒的检出率无差异,这可能与本组病例特点有关。本研究除了4例重症肺炎外,其余均是普通社区获得性肺炎,总体病情较轻,并且大部分是免疫正常的社区获得性肺炎,常见的病原体是以肺炎链球菌为主的细菌和支原体,真菌、结核和病毒感染较少见。

本研究中Xpert MTB/RIF检出7例结核分枝杆菌,mNGS检出3例,两种方法检测结核分枝杆菌的结果无差异。由于结核分枝杆菌是胞内菌,释放到体液中的含量少,核酸不容易被提取,所以mNGS检测的敏感度偏低^[2]。当BALF mNGS的结核分枝杆菌序列数和丰度很低时,也要考虑肺结核的可能。研究

显示,将疑似结核患者的标本同时送检 mNGS 和 Xpert MTB/RIF, mNGS 检出结核分枝杆菌的敏感度和特异性与 Xpert MTB/RIF 类似^[13-15]。若将两种方法联合检测,敏感度和特异性会明显升高, mNGS 还可以同步检出结核患者伴随感染的其他病原体,但检测前的试验性抗结核治疗会降低 mNGS 的阳性率^[13]。

本研究 mNGS 共检出 9 例 NTM, 6 例诊断为 NTM 肺病,其余 3 例因序列数较少且与临床表现不符合而未采信。文献报道, NTM 的发生率和患病率呈逐年增加的趋势^[16,17]。在社区获得性肺炎患者初治失败后,需要警惕 NTM 感染可能,尤其是有结构性基础肺病的老年患者^[18]。因为 NTM 广泛存在于环境中,可能造成标本的污染, mNGS 送检标本排除环境污染后,若 NTM 序列数位于前 10 位时,需要考虑为 NTM 感染^[12]。相比传统培养耗时长、阳性率低, mNGS 检测 NTM 的优势更明显,从采样到完成数据分析的周转时间平均 48h,还可以确定 NTM 的具体种类^[4,14]。

mNGS 也有自身的局限性,无法区分感染和定植,耐药检测困难,其敏感度高可能存在假阳性,缺乏统一的解读标准,临床实践中可能存在错误解读,临床工作者必须综合考虑患者的临床症状、影像学特点、自身免疫情况等,才能得出最终的结论。

综上所述,在初始治疗失败的社区获得性肺炎患者中, BALF mNGS 的检出率高于传统方法,尤其是对于细菌感染的诊断价值更高,可早期识别病原体,有效指导诊治。由于本研究是回顾性研究,纳入样本量少,无法避免选择性偏倚;因住院资料局限性,无法比较调整抗生素方案后的治疗效果;因选择的样本是社区获得性肺炎患者且大部分是轻症,无法全面反映 mNGS 的检测效能,还需要开展大量前瞻性研究予以进一步证实。

参考文献

- 1 周永召, 李亚伦, 范红, 等. 临床宏基因组学在呼吸感染性疾病精准诊疗中的疑问解析 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2018, 17(6): 539 - 543
- 2 宏基因组分析和诊断技术在急危重症感染应用的专家共识 [J]. 中华急诊医学杂志, 2019, 28(2): 151 - 155
- 3 成人社区获得性肺炎基层诊疗指南(2018 年) [J]. 中华全科医师杂志, 2019, 18(2): 117 - 126
- 4 《中华传染病杂志》编辑委员. 中国宏基因组学第二代测序技术

- 检测感染病原体的临床应用专家共识 [J]. 中华传染病杂志, 2020, 38(11): 681 - 689
- 5 Lanks CW, Musani AI, Hsia DW. Community - acquired pneumonia and hospital - acquired pneumonia [J]. Med Clin North Am, 2019, 103(3): 487 - 501
- 6 Mandell LA. Community - acquired pneumonia: an overview [J]. Postgrad Med, 2015, 127(6): 607 - 615
- 7 Jain S, Self WH, Wunderink RG, et al. Community - acquired pneumonia requiring hospitalization among U. S. adults [J]. N Engl J Med, 2015, 373(5): 415 - 427
- 8 Westblade LF, van Belkum A, Grundhoff A, et al. Role of clinicogenomics in infectious disease diagnostics and public health microbiology [J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(7): 1686 - 1693
- 9 Wang J, Han Y, Feng J. Metagenomic next - generation sequencing for mixed pulmonary infection diagnosis [J]. BMC Pulm Med, 2019, 19(1): 252
- 10 Chen X, Ding S, Lei C, et al. Blood and bronchoalveolar lavage fluid metagenomic next - generation sequencing in pneumonia [J]. Can J Infect Dis Med Microbiol, 2020, 2020: 1 - 9
- 11 Huang C, Chen H, Ding Y, et al. A microbial world: could metagenomic next - generation sequencing be involved in acute respiratory failure? [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 1 - 10
- 12 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
- 13 Zhou X, Wu H, Ruan Q, et al. Clinical evaluation of diagnosis efficacy of active mycobacterium tuberculosis complex infection via metagenomic next - generation sequencing of direct clinical samples [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9: 351
- 14 Shi CL, Han P, Tang PJ, et al. Clinical metagenomic sequencing for diagnosis of pulmonary tuberculosis [J]. J Infect, 2020, 81(4): 567 - 574
- 15 Liu X, Chen Y, Ouyang H, et al. Tuberculosis diagnosis by metagenomic next - generation sequencing on bronchoalveolar lavage fluid: a cross - sectional analysis [J]. Int J Infect Dis, 2021, 104: 50 - 57
- 16 陈忠南, 易松林, 胡培磊, 等. 2012 - 2017 年湖南省非结核分枝杆菌感染的特征分析 [J]. 中国防痨杂志, 2019, 41(2): 217 - 221
- 17 余斐, 陈晓, 嵇仲康, 等. 杭州地区 2009 - 2014 年非结核分枝杆菌流行状况分析 [J]. 中国微生物学杂志, 2016, 28(7): 808 - 810
- 18 中华医学会结核病学分会. 非结核分枝杆菌病诊断与治疗指南 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2020, 43(11): 918 - 946

(收稿日期: 2022 - 05 - 05)

(修回日期: 2022 - 05 - 27)