

- 8 苏久龙,潘翠环,曹腾飞,等. 抗阻呼吸训练对乳腺癌术后上肢淋巴水肿的疗效[J]. 中国康复理论与实践,2016,22(11):1318-1321.
- 9 潘波洋,雷龙鸣,邱石源,等. 背部循经推拿对亚健康模型大鼠HPA轴及下丘脑CRH蛋白表达的影响[J]. 中华中医药学刊,2018,36(12):2903-2906.
- 10 洪荣庆,李莲英,关锦贞. 中医综合治疗老年脑卒中后癫痫的疗效观察[J]. 中国临床新医学,2018,11(9):925-928.
- 11 赵承坤,曲峰. 肌内效贴在运动生物力学领域应用研究进展[J]. 中国运动医学杂志,2015,34(6):609-613.
- 12 卢战,唐艳,胡凤丹. 触发式功能性电刺激训练结合肌内效贴对脑卒中偏瘫足下垂患者步行能力的影响[J]. 中国康复医学杂志,2018,33(9):1102-1104.
- 13 姜文君,史佩佩,王盛. 肌内效贴在中枢神经系统损伤康复中的应用进展[J]. 中国康复理论与实践,2014,20(11):1047-1049.
- 14 刘生发,张锋. 肌内效贴结合淋巴引流手法治疗全膝关节置换后下肢肿胀[J]. 中国组织工程研究,2017,21(11):1647-1651.
- 15 刘阳,李建华,陶静琰,等. 运动贴布联合徒手淋巴引流术对脑卒中后肩手综合征及上肢功能疗效观察[J]. 中国康复医学杂志,2019,34(9):1094-1096.
- [收稿日期 2019-11-18][本文编辑 余军 吕文娟]

课题研究·论著

基于宏基因组的二代测序技术在重症肺炎患者病原体快速检测中的应用价值探讨

潘春熹, 吕立文

基金项目: 广西卫健委科研课题(编号:Z2016620)

作者单位: 530021 南宁,广西壮族自治区人民医院急诊科

作者简介: 潘春熹(1984-),女,医学硕士,主治医师,研究方向:急危重症诊治。E-mail:1316013670@qq.com

通讯作者: 吕立文(1972-),女,医学博士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:急危重症诊治。E-mail:lyliwen@126.com

【摘要】 目的 探讨基于宏基因组的二代测序技术(mNGS)在重症肺炎患者病原学检测中的应用价值。**方法** 纳入2018-07~2019-05收治的重症肺炎患者26例,比较mNGS与传统检测方法对病原菌的诊断效能,同时评价抗生素暴露对检出率的影响。**结果** mNGS检出病原菌的阳性率为92.3%,高于传统培养方法的42.3%,差异有统计学意义($P<0.05$)。在使用抗生素的前提下,mNGS的阳性率(91.3%)显著高于传统方法(43.5%),差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** mNGS对病原菌鉴定具有较高的灵敏度,而且使用抗生素对mNGS检测结果影响小,对感染患者的诊治及疗效有着重要的临床应用价值。

【关键词】 宏基因组二代测序技术; 诊断; 感染

【中图分类号】 R 446.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1674-3806(2020)04-0370-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2020.04.12

Application value of metagenomic next-generation sequencing in rapid detection of pathogens in patients with severe pneumonia PAN Chun-xi, LYU Li-wen. Department of Emergency, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

【Abstract】 Objective To explore the application value of metagenomic next-generation sequencing(mNGS) in detection of pathogens in patients with severe pneumonia. **Methods** Twenty-six patients with severe pneumonia were enrolled from July 2018 to May 2019. The diagnostic efficacies of the mNGS and the traditional detection method on the pathogenic bacteria were compared, and the impact of antibiotic exposure on the detection rate was evaluated. **Results** The positive rate of pathogenic bacteria detected by mNGS(92.3%) was significantly higher than that detected by the traditional culture method(42.3%) ($P<0.05$). Under the premise of using antibiotics, the positive rate of pathogenic bacteria detected by mNGS(91.3%) was significantly higher than that detected by the traditional

method(43.5%)($P<0.05$). **Conclusion** mNGS has a high sensitivity to the identification of pathogenic bacteria, and the use of antibiotics has little effect on the detection results of mNGS, which has an important clinical application value for the diagnosis and treatment of infected patients.

[Key words] Metagenomic next-generation sequencing(mNGS); Diagnosis; Infection

呼吸道感染是感染性疾病的主要部分^[1]。早期快速确定病原微生物从而选择有效的抗生素是治疗重症感染的关键。快速获取精准的病原学有助于临床医师及时调整抗生素方案,从而加快康复,提高治愈率,改善预后。目前微生物培养和聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)检测等方法已经广泛应用到重症肺炎的诊断中,但培养的方法阳性率低,并且耗时长,难以快速诊断,对于危重症患者感染很难做到早期精准治疗,已经不能满足临床需求。基于宏基因组的二代测序技术(metagenomic next-generation sequencing,mNGS),具有病原菌阳性检出率高、快速等优点,已经成为微生物检测的研究热点^[2]。本研究对我科 2018-07~2019-05 收治 26 例重症肺炎患者开展 mNGS 以来收集到的数据进行分析,探讨抗生素对病原体检出的影响,并与传统病原学培养法相比较,以期为临床抗感染治疗提供指导。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性分析 2018-07~2019-05 广西壮族自治区人民医院急诊重症监护室收治的 26 例重症肺炎患者的临床资料。重症肺炎诊断标准^[3]:

表 1 26 例重症肺炎患者的临床特征(n)

项 目	发热	咳嗽	肺炎变	WBC 异常	典型胸片异常病灶	降钙素原(procalcitonin,PCT)异常 ^[7]	入院前使用抗生素	院外住院治疗
有	20	21	16	19	26	23	23	22
无	6	5	10	7	0	3	3	4

1.2 方法与仪器

1.2.1 肺泡灌洗 所有患者入院后行肺泡灌洗术,同时留取肺泡灌洗液 10~20 ml 进行传统病原学培养及 mNGS 送检,并同时送检静脉血培养(3 个不同部位×3 d)、呼吸道病原学检测^[4]。肺泡灌洗液按《下呼吸道感染细菌培养操作指南》^[5]进行细菌培养分离。血液按《临床微生物学血培养操作规范》^[6]进行培养分离。

1.2.2 细菌生化鉴定 所有培养阳性标本使用德国布鲁克质谱仪进行鉴定,法国生物梅里埃公司 VITEK-2、美国 BD 公司 M-50 进行细菌生化鉴定和药敏试验。

1.2.3 高通量测序 上述患者的肺泡灌洗液及血液标本由华大基因公司进行高通量测序。(1)血液样本处理和 DNA 提取:取 300 μl 血浆,使用 TIANamp Micro DNA Kit[DP316,天根生化科技(北京)有限公

司],根据试剂盒说明书提取 DNA。(2)呼吸道样本处理和 DNA 提取:取患者的痰液或肺泡灌洗液 0.5~3 ml,经玻璃珠混合震荡后按照 TIANamp Micro DNA Kit[DP316,天根生化科技(北京)有限公司]试剂盒步骤提取 DNA。提取的 DNA 用作 DNA 文库构建。(3)文库构建和测序:使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 质控文库插入片段大小,使用 QubitdsDNA HS Assay Kit(Thermo Fisher Scientific Inc.)质控 DNA 文库浓度,经环化形成单链环形结构。环化后的文库经滚环复制生成 DNA 纳米球。制备好的 DNA 纳米球加载到测序芯片,使用 BGISEQ-50 进行测序。(4)数据分析:测序数据下机后去除低质量的和长度<35 bp 的数据以获得高质量的数据。通过 BWA(<http://bio-bwa.sourceforge.net/>)比对将高质量数据中能比对上人参考基因组序列的数据去除。剩下的数据在去

除低复杂度 reads 后与专用的微生物大数据库进行比对,并将比对后的数据按照病毒、细菌、真菌和寄生虫等进行分类和排列。

1.2.4 检测结果判定 mNGS 阳性结果判定标准:(1)传统检测方法和 mNGS 都鉴定出微生物;(2)存在肺部病变的影像学表现;(3)高通量检测方法得到的微生物读数至少比其他微生物的高 2 倍,则鉴定的微生物被分类为确认的病原体。单独使用 mNGS 鉴定微生物并且符合(2)和(3),则微生物被认为是新的潜在病原体^[7]。

1.3 统计学方法 应用 SPSS23.0 统计软件进行数据分析,计数资料以百分率(%)表示,组间比较采用 Fisher's 确切概率法;采用 McNemar 检验分析两种检测结果的差异。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种方法病原体检出种类数比较 在 26 例重症肺炎患者中,24 例患者的肺泡灌洗液标本的高通量测序结果为阳性,灵敏度为 92.3%,其中 11 例(42.3%)检测到 1 种病原体,8 例(30.8%)检测到 2 种病原体。见表 2。

表 2 两种方法病原体检出种类数比较[n(%)]

病原体种类数	mNGS	传统方法	P
0	2(7.7)	15(57.7)	0.000
1	11(42.3)	11(42.3)	1.000
2	8(30.8)	0(0.0)	0.004
3	5(19.2)	0(0.0)	0.051
总阳性数	24(92.3)	11(42.3)	0.000

2.2 两种方法阳性与阴性检出结果比较 在 26 例患者标本中,发现 11 例(42.3%)标本双阳性,2 例(7.7%)均为阴性,仅 mNGS 阳性为 13 例(50.0%),仅传统检测方法阳性为 0 例(0.0%),两种检验方法所得结果差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 3 两种方法阳性与阴性检出结果比较(n)

mNGS	传统方法		合计
	阳性	阴性	
阳性	11	13	24
阴性	0	2	2
合计	11	15	26

注:经 McNemar 检验, $P=0.000$

2.3 两种方法检测病原菌情况 在分离到的 27 种微生物中,以鲍曼不动杆菌(9/53)最为常见,其次是病毒(7/53),再次是肺炎链球菌、肺炎克雷伯菌、

铜绿假单胞菌和烟曲霉(均为 3/53)。见表 4。

表 4 两种方法检测病原菌情况

病原菌	高通量检测株数	传统检测株数
鲍曼不动杆菌	9	5
人类疱疹病毒 1 型	3	
肺炎链球菌	3	
肺炎克雷伯菌	2	1
铜绿假单胞菌	2	1
烟曲霉	2	1
白色念珠菌	2	
食酸菌	2	
肺炎支原体	1	1
葡萄球菌属	1	
头葡萄球菌	1	
屎肠球菌	1	
假肺炎链球菌	1	
副流感嗜血杆菌	1	
脱氮假单胞菌	1	
假单胞菌属	1	
嗜肺军团菌	1	
热带念珠菌	1	
耶氏肺孢子虫	1	
危害罗尔斯顿菌	1	
普雷沃菌属	1	
勒舍普氏菌	1	
人类腺病毒 7 型	1	
人类疱疹病毒 6B 型	1	
人类疱疹病毒 5 型	1	
新型隐球菌		1
副流感病毒		1

2.4 抗生素对两种方法结果检出率的影响 26 例患者中有 23 例在检测前使用抗生素(使用特殊级抗生素 20 例,使用限制级抗生素 3 例,检测前均用药超过 3 d);另 3 例未使用抗生素的患者中,mNGS 的阳性率与传统培养法的阳性率比较差异无统计学意义($P=0.400$)。对于已使用抗生素的患者,mNGS 的阳性率显著高于传统培养法(91.3% vs 43.5%, $P=0.001$)。见表 5。

表 5 抗生素对两种方法结果检出率的影响[n(%)]

组别	例数	mNGS		传统方法		P
		阳性	阴性	阳性	阴性	
已使用抗生素组	23	21(91.3)	2(8.7)	10(43.5)	13(56.5)	0.001
未使用抗生素组	3	3(100.0)	0(0.0)	1(33.3)	2(66.7)	0.400

3 讨论

3.1 重症肺炎是临床危重病患者的常见疾病,早期明确患者病原菌对于指导临床用药、减少高危因素并制定切实有效的治疗措施具有十分重要的临床意义。传统的微生物检测是通过生化、免疫、培养等实验方法来鉴别样本中微生物的种类和定量信息,临

床中常用的检测方法包括涂片镜检法、PCR 扩增法、微生物培养法等。微生物检出率常常受抗生素治疗的影响,且培养时间长。提高检测的精准度和效率是病原微生物检测的重要目标。基于 mNGS 技术的微生物检测方法,通过对宏基因组样本进行大规模的完全测序,得到宏基因组的核酸序列,再利用生物信息学工具对核酸序列数据进行分析,从而进一步得到微生物基因信息等,具有无需培养样本、灵敏度高、能够检测未知微生物的优点,弥补了传统微生物检测方法的不足,为临床提供了新的决策依据^[8~10]。

3.2 目前临床常用检测方法只能根据已知病原体的特点进行检测,而 mNGS 能检测未知病原体,可以对标本进行无差别测序和生物信息分析,临床医师可根据临床症状确定病原体。目前,已有超过 38 000 个细菌基因组和超过 5 000 个病毒基因组的序列被测定,其中包括了绝大部分呼吸道感染性疾病相关的病原体。同时 mNGS 可以有效回避细菌培养结果相似而难以区分的问题。因此,mNGS 在临床医疗中发挥着越来越重要的作用^[11,12]。

3.3 本研究发现 mNGS 在以下方面优于传统检测方法:首先,mNGS 的灵敏度高,可以准确指导临床治疗;其次,根据我们的研究结果,mNGS 受抗生素使用情况的影响较小,有助于危重症患者的临床诊断。本次研究中 mNGS 的阳性率(92.3%)较传统检测方法高,以往的研究报告中 mNGS 的阳性率为 36.0%~99.4%^[13]。有可能是我们将所有疑似感染性疾病的患者都纳入了研究。另外也可能与本研究所包含的样本类型有关,本研究有纳入来自呼吸道的样本,而呼吸道通常受到口腔正常菌群、共生生物等污染,导致其纯度相对低于其他样本类型^[14]。在研究结果中,最常见的病原体是鲍曼不动杆菌,这与此次样本来自下呼吸道有关,如果将其推广到其他部位的临床感染性疾病,可能会有不同的结论。本次研究与相关文献报道相似,发现革兰阴性菌是重症患者感染的主要致病菌^[15,16]。本研究仍存在一些不足:(1)检测标本被送到了院外实验室,而非本院的微生物实验室;(2)从床边到工作台的时间增加,微生物生存能力降低,因此可能会降低灵敏度,也可能会导致假阳性结果^[13];(3)检测标本量、病人范围仍然需要扩大。

3.4 本研究结果提示,mNGS 对早期识别微生物具有较高的灵敏度,并有助于临床决定抗生素治疗方案。对于急危重症患者,我们应该更早使用 mNGS 检测细菌、真菌、病毒、寄生虫等病原微生物,实现精

准治疗,减少不必要和不适当的抗生素使用情况,避免抗生素滥用^[17]。此外,mNGS 受抗生素使用情况影响较小,在临床中遇到诊断困难的感染性病例,特别是脓毒症患者的时候,我们可以考虑使用 mNGS。通过对病人选择、样本处理和数据分析,mNGS 可以协助临床对感染患者进行精确诊断和精准治疗。

参考文献

- 1 Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010[J]. *Lancet*, 2012, 380(9859):2095-2128.
- 2 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.
- 3 中国医师协会急诊医师分会.中国急诊重症肺炎临床实践专家共识[J]. *中国急救医学*, 2016, 36(2):97-107.
- 4 中华医学会呼吸病学分会.肺部感染性疾病支气管肺泡灌洗病原体检测中国专家共识(2017年版)[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2017, 40(8):578-583.
- 5 WS/T499-2017,下呼吸道感染细菌培养操作指南[S].中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,2017.
- 6 中华医学会检验医学分会.临床微生物学血培养操作规范[J]. *中华检验医学杂志*, 2004, 27(2):124-126.
- 7 Langelier C, Zinter MS, Kalantar K, et al. Metagenomic Sequencing Detects Respiratory Pathogens in Hematopoietic Cellular Transplant Patients[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017, 197(4):524-528.
- 8 朱星成,王冬菊.降钙素原检测在感染性疾病中的临床应用[J]. *中国临床新医学*, 2016, 9(2):128-132.
- 9 周子寒,彭绍亮,伯晓晨,等.基于高通量测序技术的微生物检测数据分析方法[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2017, 44(1):58-69.
- 10 Chiu CY, Miller SA. Clinical metagenomics[J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(6):341-355.
- 11 邓少丽,陈鸣.关注基因检测在临床实践中的伦理学问题[J]. *中华检验医学杂志*, 2016, 39(7):481-483.
- 12 徐锦,徐梦华.下一代测序技术在临床病毒学检验中的应用[J]. *中华检验医学杂志*, 2017, 40(5):338-340.
- 13 Long Y, Zhang Y, Gong Y, et al. Diagnosis of Sepsis with Cell-free DNA by Next-Generation Sequencing Technology in ICU Patients[J]. *Arch Med Res*, 2016, 47(5):365-371.
- 14 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.
- 15 梁志斌,卢运照.我院重症医学科耐药细菌分布及耐药性分析[J]. *中国临床新医学*, 2016, 9(6):528-530.
- 16 刘超梅,贾宇杰,其其格,等.住院患者 2014-2016 年医院感染现患率调查分析[J]. *中国消毒学杂志*, 2018, 35(10):773-775, 778.
- 17 Trotter AJ, Aydin A, Strinden MJ, et al. Recent and emerging technologies for the rapid diagnosis of infection and antimicrobial resistance[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2019, 51:39-45.

[收稿日期 2019-06-13][本文编辑 余军 吕文娟]