

宏基因二代测序在肺部感染病原菌检测的应用

刘静¹, 闫莉莉¹, 赵淑贤¹, 王永², 郝玉峰³, 李家斌³, 王保贵¹

摘要 目的 分析研究宏基因二代测序技术(mNGS)在肺部感染病原菌检测中的应用价值,为临床诊断提供理论依据。方法 回顾性选取疑似肺部感染患者161例为研究对象,采集肺泡灌洗液标本、痰液、肺组织活检标本、胸水和血液同时进行常规培养、呼吸道病原体核酸检测及病原微生物mNGS检测,分别计算3种检测方法的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值,评估mNGS的临床应用价值。结果 161例疑似肺部感染患者中,确定为肺部感染的有113例。入组的161例患者中,mNGS灵敏度、阴性预测值相比常规培养及呼吸道病原体核酸检测提高,差异有统计学意义($P < 0.001$)。mNGS的特异度虽然高于呼吸道病原体核酸检测,但差异无统计学意义。mNGS阳性预测值最高,高于呼吸道病原体核酸检测,但是与常规培养相比差异无统计学意义。结论 mNGS在肺部感染病原微生物诊断中灵敏度均超过了常规培养及呼吸道病原体核酸检测,降低了诊断的假阴性率,综合评价较好;常规培养检测灵敏度低,但特异度较高;呼吸道病原体核酸检测灵敏度相较常规培养有所提高,但其特异度下降。

关键词 肺部感染;病原菌检测;mNGS;检测效能

中图分类号 R 563.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)06-1046-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.029

肺部感染临床十分常见,病原体种类繁多,可导致多种并发症,是全世界感染性疾病死亡的主要原因^[1]。因此,准确识别感染的病原体并进行针对性治疗尤为重要,目前微生物检测的方法有常规微生物培养、基于聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)的核酸检测等^[2-3]。仍有近一半肺部感染患者的病原学诊断尚不清楚^[4]。因此,迫切需要

具有更高诊断效率的病原体检测和鉴定方法,以克服敏感性、特异性、检测周期和诊断谱的局限性。

宏基因二代测序(metagenomics next-generation sequencing, mNGS)是一种直接利用患者标本进行泛核酸检测,提取样本中的所有核酸并测序,以获得宿主和微生物的序列,并通过特定生物信息分析软件包来鉴定病原体的方法^[5]。目前,mNGS在临床病原学的检测中得到广泛应用。该研究回顾性选取临床疑似肺部感染患者为研究对象,旨在评价mNGS检测技术在病原学检查诊断中的效能及与传统检测方法之间的效能差异。

1 材料与方法

1.1 病例资料 研究对象为2020年1月—2022年6月在阜阳市人民医院、阜阳市第五人民医院、安徽医科大学第一附属医院收治的疑似肺部感染患者161例,并对患者的病历进行审查,以收集基线信息,包括年龄、性别、是否合并基础疾病、临床表现、入院前抗生素使用情况、全血细胞计数、C反应蛋白(CRP)和降钙素原(PCT)水平、常规培养和呼吸道病原体核酸检测结果。

1.2 主要试剂与仪器 琼脂培养基(济南百博生物技术股份有限公司);病原菌核酸检测试剂盒、恒温核酸扩增微流控芯片核酸分析仪(成都博奥晶芯生物科技有限公司);Agilent2100生物分析仪(美国Agilent Technologies公司)。

1.3 纳入、排除标准和诊断依据

1.3.1 纳入标准 ①年龄不小于14周岁;②经胸部CT检查有肺部阴影,无法排除肺部感染诊断;③临床症状包括咳嗽、咳痰、发热等;④送检样本符合mNGS检测要求;⑤可在入院或发病后24 h内收集痰液,或病情允许下48 h内的可获得的不同标本,包括:BALF、肺组织活检标本、胸水、血液;⑥签署知情同意书。

1.3.2 排除标准 ①合并严重精神疾患;②伴意识障碍;③拒绝配合研究;④合并心、肝、肾等器官功能不全;⑤标本污染;⑥临床信息不全。

1.3.3 诊断依据 肺部感染临床诊断标准(确诊

2023-03-26 接收

基金项目:阜阳市自筹经费科技计划项目(编号:FK202081002);安徽高校协同创新项目(编号:GXXT-2020-018)

作者单位:¹安徽医科大学附属阜阳市人民医院感染科,阜阳 236000

²阜阳市第五人民医院呼吸科,阜阳 236000

³安徽医科大学第一附属医院感染科,合肥 230022

作者简介:刘静,女,硕士,主治医师;

王保贵,男,主任医师,责任作者,E-mail: wangbaogui99@163.com

标准)。(1)肺炎相关临床表现:①新近出现的咳嗽、咳痰或原有呼吸道疾病症状加重,伴或不伴脓痰、胸痛、呼吸困难及咯血;②发热;③肺实变体征和(或)闻及湿性啰音;④外周血白细胞计数 $>10 \times 10^9/L$ 或 $<4 \times 10^9/L$,伴或不伴细胞核左移。(2)胸部影像学检查显示,新出现的斑片状浸润影、叶或段实变影、磨玻璃影或间质性改变,伴或不伴胸腔积液。符合(1)中任何一项及第(2)项^[6]。

非肺部感染入选标准。入院后积极完善相关检查,经临床明确诊断为其他肺部疾病如肺恶性肿瘤、肺结节病等。

1.3.4 伦理学 纳入研究的所有患者签署知情同意书,并通过阜阳市人民医院伦理委员会批准,伦理批号:[2021]38号。

1.4 标本采集 根据患者病情收集入院或发病后24 h内的痰液,或病情允许下48 h内的可获得的不同标本,包括:BALF、肺组织活检标本、胸水、血液;按标准采集流程操作。将每种类型标本同时进行常规培养、呼吸道病原体核酸检测及病原微生物mNGS检测。

1.5 方法

1.5.1 常规培养 采用琼脂培养基对送检标本进行培养及药敏试验分析,首先将琼脂培养基进行复温,温度接种前接近室温,然后将采集的标本划线接种或涂布平板,最后将培养基放置培养箱培养,最后根据美国临床实验室标准协会2019年规定的标准进行培养结果判读。

1.5.2 呼吸道病原体核酸检测 采用呼吸道病原菌核酸检测试剂盒(恒温核酸扩增芯片法)及恒温核酸扩增微流控芯片核酸分析仪对13种常见下呼吸道病原菌的核酸一步完成定性检测,包括肺炎链球菌、铜绿假单胞菌、流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、嗜肺军团菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、嗜麦芽窄食单胞菌、鲍曼不动杆菌、肺炎支原体、衣原体、结核分枝杆菌复合群。病毒类PCR未纳入该项研究中。按照试剂盒说明书进行核酸提取、加样、检测,之后进行结果判读。

1.5.3 mNGS实验 将无菌密封的标本破壁离心后,取600 μ l上清液,并使用DNA提取试剂盒提取DNA。并经超生破碎至200~300 bp大小的片段后,进行DNA末端修复、接头连接和PCR扩增。使用Agilent2100生物分析仪和Qubit分别对DNA文库片段大小及浓度进行质控。在相关平台进行mNGS,将得到的原始数据进行生物信息学数据处

理。

生物信息学分析:原始测序数据需剔除接头序列、低质量、短读长序列以及人源序列。将获得的高质量测序数据与微生物基因组数据库进行比对,进而鉴定微生物。

mNGS结果解释的阈值标准 SMRN:在物种水平上严格序列数。对于不同类型的微生物,阈值设置如下:细菌、病毒、真菌、支原体、衣原体 SMRN >3 ,寄生虫 SMRN ≥ 100 ,结核分枝杆菌 SMRN ≥ 1 。肺部感染致病的病原体:不包括口腔、呼吸道或皮肤的正常菌群(通过大量文献检索)。满足3位经验丰富的资深临床医师的临床判断。通过mNGS检测到的符合所有标准的微生物被鉴定为疑似病原体。

1.5.4 观察指标 采用临床诊断为金标准,计算常规培养、呼吸道病原体核酸检测及病原微生物mNGS检测诊断肺部感染的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值。

1.6 统计学处理 采用SPSS 19.0软件对该研究数据进行统计学分析。计数资料以率或构成比(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。采用 χ^2 检验或Fisher确切概率法比较mNGS和常规培养及呼吸道病原体核酸检测。以临床诊断为金标准,比较常规培养、呼吸道病原体核酸检测和mNGS对肺部感染的诊断效能,正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人口资料及患者特征 161例患者中,年龄16~86(64.13 \pm 14.75)岁;其中男性99例,女性62例。入院前症状:发热106例,咳嗽156例,咳痰148例,呼吸困难15例。其中83例(83/161, 51.55%)患者合并基础疾病。在所有患者中,获取标本类型最多的是BALF,占有患者的68.32%,其余依次为痰、肺组织、血液及胸腔积液(表1)。

2.2 肺部感染患者的临床特征 161例患者中有113例确诊为肺部感染,具体临床特征见表2。

2.3 3种检测方法诊断性能比较及与临床诊断结果一致性 在161例患者中,常规培养、呼吸道病原体核酸检测、mNGS诊断肺部感染的阳性率依次为9.94%(16/161)、21.12%(34/161)、60.87%(98/161)(表3)。mNGS检测肺部感染病原菌相对常规培养和呼吸道病原体核酸检测法,其灵敏度、阴性预测值差异有统计学意义($P < 0.001$);mNGS相对常规培养,其特异度差异有统计学意义($P < 0.05$)相

表 1 161 例患者入组患者的人口资料及患者特征 [n(%) $\bar{x} \pm s$]

指标	数值
性别	
男	99 (61.49)
女	62 (38.51)
年龄(岁)	64.13 ± 14.75
临床症状	
发热	106 (65.84)
咳嗽	156 (96.89)
咳痰	148 (91.93)
呼吸困难	15 (9.32)
基础疾病	
2 型糖尿病	20 (12.42)
结缔组织病	5 (3.11)
支气管扩张	12 (7.45)
慢性阻塞性肺病	24 (14.91)
支气管哮喘	8 (4.97)
陈旧性肺结核	2 (1.24)
肺恶性肿瘤	5 (3.11)
肺外恶性肿瘤	2 (1.24)
其他疾病	5 (3.11)
标本类型	
BALF	110 (68.32)
痰	20 (12.42)
肺组织	14 (8.70)
血液	9 (5.59)
胸腔积液	8 (4.97)

表 2 肺部感染患者临床特征 (n = 113)

临床特征	有	无
发热	98	15
咳嗽	105	8
肺部啰音	87	26
合并胸腔积液	18	95
合并基础疾病	67	46
WBC 升高	73	40
中性粒细胞比率升高	91	22
CRP 升高	87	26
PCT 升高	18	95
入院前使用抗生素	72	41

表 3 3 种检测方法与临床诊断结果一致性比较

检测方法	临床诊断		合计
	阳性	阴性	
常规培养			
阳性	16	2	18
阴性	97	46	143
呼吸道病原体核酸			
阳性	34	14	48
阴性	79	34	113
mNGS			
阳性	98	9	107
阴性	15	39	54
合计	113	48	161

对呼吸道病原体核酸检测差异无统计学意义; mNGS

相对常规培养,其阳性预测值差异无统计学意义,相对呼吸道病原体核酸检测差异有统计学意义($P = 0.001$) (表 4)。

表 4 mNGS 相比常规培养和呼吸道病原体核酸检测在肺部感染中的诊断性能

检测方法	灵敏度 (%)	特异度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)
常规培养	14.16	95.83	88.89	32.17
呼吸道病原体核酸检测	30.09	70.83	70.83	30.09
mNGS	86.73	81.25	91.59	72.22
χ^2 值 ^a	119.018	5.031	0.140	25.637
P 值 ^a	<0.001	0.025	0.708	<0.001
χ^2 值 ^b	74.605	1.429	11.296	26.363
P 值 ^b	<0.001	0.232	0.001	<0.001

^a: 常规培养与 mNGS 比较; ^b: 呼吸道病原体核酸检测与 mNGS 比较

2.4 3 种方法检出病原学种类 综合所有标本检测结果, mNGS 检出细菌数目高于其余 2 种方法,特别是在分枝杆菌、衣原体、放线菌的检测具有明显优势。但是对于铜绿假单胞菌的检测不及常规培养和呼吸道病原体核酸检测。mNGS 在曲霉属真菌及病毒的检测具有明显优势,这些病原体在其余 2 种检测方法中均未能检出(图 1)。此外,在所有检测阳性的标本中,检出 2 种及其以上病原体占比 57.14%。

3 讨论

肺部感染临床常见的致病微生物为细菌、真菌、病毒、支原体、衣原体等,可单独或联合导致感染,在住院患者中常因病原菌无法明确,致使治疗延误,甚至增加了疾病的复发率及病死率。而快速准确地检测病原体、精准使用抗菌药物、减少耐药菌的发生等一系列急需解决的医疗难题一直是感染性疾病领域的一大挑战。

由于病原菌常规培养流程过于复杂、耗时较长,同时由于广谱抗生素不合理应用,培养的阳性率降低。该研究采用的常规培养鉴定病原微生物虽然同样体现较高的特异度,但敏感度较低,因此急需新型的检测手段提高病原菌检测。

呼吸道病原体核酸检测利用恒温核酸扩增芯片法进行^[7],整个检测过程可以在 15 ~ 60 min 内完成^[8]。该组研究数据显示,呼吸道病原体核酸检测的灵敏度远高于常规培养法,但特异度低于常规培养。此外,其恒温核酸扩增芯片法操作简便、结果获

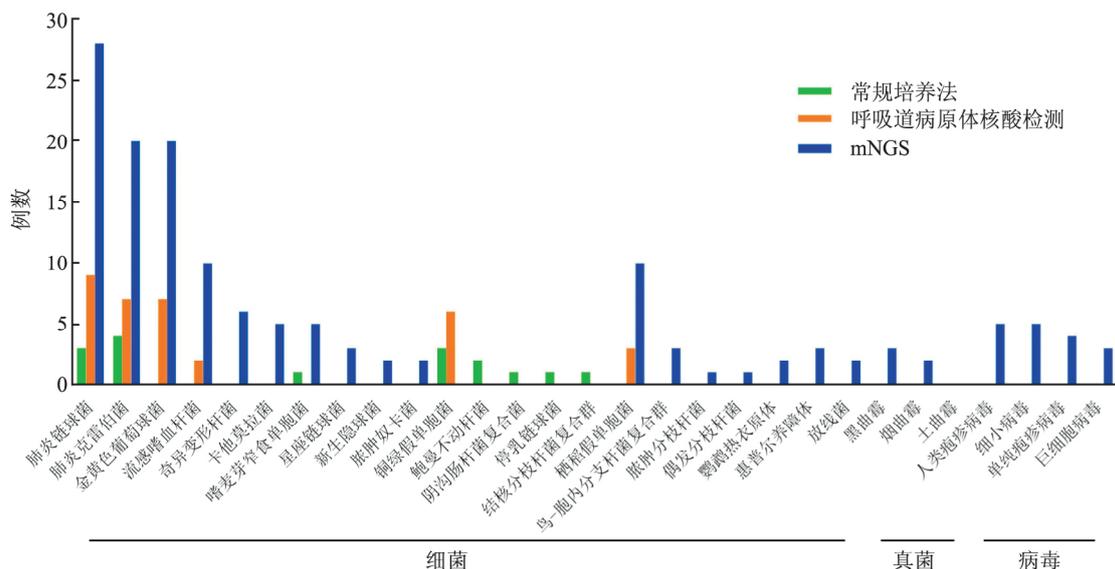


图1 常规培养、呼吸道病原体核酸检测、mNGS 3种方法在BALF、痰、肺组织、血液和胸腔积液中检出不同病原体的患者例数

取快速^[9],具备快速诊断呼吸道感染性疾病的能力。在检测下呼吸道感染病原体中应用,远优于常规培养。但呼吸道病原体核酸检测仅能对已知的病原体如金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌等进行检测,可能遗漏少见病原体、真菌、病毒等微生物,这降低了检测^[10]的敏感性。

mNGS是一种快速、客观、全面、准确的病原微生物分子诊断方法。与以上介绍的2种诊断技术相比,mNGS无需预设、无需培养、无偏倚采样分析,建库过程中系直接对整个检测标本进行核酸测序,无需对样本进行扩增,可广泛鉴定已知、潜在、常规难以检测甚至发现新的病原体^[11]。在同时检测细菌、真菌和病毒方面具有明显优势。该研究显示,mNGS检测的病原学种类较常规培养及呼吸道病原体核酸检测明显更多,除常见的呼吸道常见致病菌外,也能检出少见病原菌,如隐球菌、奴卡菌、细小病毒、鹦鹉热衣原体、鸟-胞内分支杆菌复合群等,提高了病原学检出的阳性率,利于指导临床抗生素的使用。mNGS的另一个优点是可以鉴定菌株种类和耐药^[12]预测,提供必要的辅助基因组信息。mNGS可以通过测序 reads 的计数来提供关于样本中生物体浓度的定量或半定量数据,这对多微生物样本或在疾病过程^[13]中涉及多个病原体的情况下很有用。

在该院收治的感染性疾病中,肺部感染约占40%,但大部分患者缺乏精准的病原学诊断,这与入院前接受广谱抗生素的应用、标本获取不当、常规检测或已有的实验室检测方法无法获取病原菌等多种因素有关。然而,mNGS作为一种新型的检测手段,

具有较高的灵敏度及特异度,目前已被广泛应用于临床病原学诊断。该研究数据显示,mNGS灵敏度相比常规培养及呼吸道病原体核酸检测有提高,且差异有统计学意义。mNGS的阴性预测值远高于前两者检测方法,且差异有统计学意义($P < 0.001$)。可见mNGS检出假阴性的比例很低。mNGS的特异度虽然高于呼吸道病原体核酸检测,但差异无统计学意义,且低于常规培养($P < 0.05$)。mNGS的这项属性体现了其高假阳性率,尽管研究人员一直试图提高mNGS在临床诊断应用^[14]中的特异性,但目前该缺点仍不容忽视。

mNGS检测过程中的污染菌可能来自3个方面:标本采集时的污染菌、人类常规定植菌群、实验室试剂和环境中的背景微生物。可采用定量或半定量的统计分析以便区分感染菌与定植菌。临床工作中,通过mNGS检测到的微生物需要结合疾病的临床特点进一步评估确定,特别是对于未经常规检测确诊的病例。mNGS的另一个局限性是它无法区分检测到的病原菌的致病性状态。该研究mNGS在98份样本中鉴定出130种致病细菌、真菌和19种病毒,其中部分属于呼吸道共生菌或污染菌。检测到的大量微生物信息对临床医师作出诊断时可能会产生困扰,甚至误诊。因此,在做出决策前,一定要结合患者的病情,综合判断。

参考文献

- [1] Langelier C, Kalantar K L, Moazed F, et al. Integrating host response and unbiased microbe detection for lower respiratory tract

- infection diagnosis in critically ill adults [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018 ,115(52) : E12353 – 62.
- [2] Loeffelholz M ,Chonmaitree T. Advances in diagnosis of respiratory virus infections [J]. *Int J Microbiol* 2010 2010: 126049.
- [3] Labelle A J ,Arnold H ,Reichley R M et al. A comparison of culture-positive and culture-negative health-care-associated pneumonia [J]. *Chest* 2010 ,137(5) : 1130 – 7.
- [4] Zhu Y G ,Tang X D ,Lu Y T ,et al. Contemporary situation of community-acquired pneumonia in China: a systematic review [J]. *J Transl Int Med* ,2018 6(1) : 26 – 31.
- [5] Gu W ,Miller S ,Chiu C Y. Clinical metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection [J]. *Annu Rev Pathol* ,2019 , 14: 319 – 38.
- [6] 中华医学会,中华医学杂志社,中华医学会全科医学分会,等. 成人社区获得性肺炎基层诊疗指南(2018年) [S]. *中华全科医师杂志* ,2019 ,18(2) : 117 – 26.
- [7] 王咏红,郭雅洁,陈玉莹,等. 恒温扩增芯片法在儿童下呼吸道感染性疾病中的应用价值评估 [J]. *中国循证儿科杂志* , 2018 ,13(3) : 176 – 9.
- [8] 康蓓佩,周磊,付晓蕊,等. 恒温扩增芯片法在下呼吸道病原体检测的临床价值 [J]. *国际检验医学杂志* ,2018 ,39(22) : 2767 – 70.
- [9] 陈愉生,林晓红,李鸿茹,等. 下呼吸道感染住院患者病原学分析及判别模型的建立 [J]. *中华结核和呼吸杂志* ,2017 ,40(12) : 909 – 14.
- [10] Wilson M R ,Naccache S N ,Samayoa E et al. Actionable diagnosis of neuroleptospirosis by next-generation sequencing [J]. *N Engl J Med* 2014 ,370(25) : 2408 – 17.
- [11] Chiu C Y. Viral pathogen discovery [J]. *Curr Opin Microbiol* , 2013 ,16(4) : 468 – 78.
- [12] Salipante S J ,Hoogstraal D R ,Abbott A N et al. Coinfection of fusobacterium nucleatum and actinomyces israelii in mastoiditis diagnosed by next-generation DNA sequencing [J]. *J Clin Microbiol* , 2014 ,52(5) : 1789 – 92.
- [13] Burnham P ,Gomez-Lopez N ,Heyang M et al. Separating the signal from the noise in metagenomic cell-free DNA sequencing [J]. *Microbiome* 2020 8(1) : 18.
- [14] Deurenberg R H ,Bathoorn E ,Chlebowicz M A et al. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention [J]. *J Biotechnol* 2017 243: 16 – 24.

Application of metagenomic next-generation sequencing in the detection of pathogenic bacteria of pulmonary infection

Liu Jing¹ ,Yan Lili¹ ,Zhao Shuxian¹ ,Wang Yong² ,Gao Yufeng³ ,Li Jiabin³ ,Wang Baogui¹
 (¹Dept of Infection ,Fuyang People's Hospital of Anhui Medical University ,Fuyang 236000;
²Dept of Respiratory ,Fuyang Fifth People's Hospital ,Fuyang 236000;
³Dept of Infection ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230022)

Abstract Objective To analyze the application value of metagenomic next-generation sequencing (mNGS) in the detection of pathogenic bacteria in pulmonary infection , and to provide a theoretical basis for clinical diagnosis.

Methods A retrospective study was conducted on 161 patients with suspected pulmonary infection , and samples of bronchoalveolar lavage fluid , sputum and lung tissue were collected specimens , pleural effusion and blood were simultaneously subjected to routine culture , respiratory pathogen nucleic acid detection and pathogenic microorganism mNGS detection. The sensitivity , specificity , positive predictive value , and negative predictive value of the three detection methods were calculated respectively to evaluate the clinical application value of mNGS. **Results**

Among 161 patients with suspected pulmonary infection , 113 cases were finally confirmed as pulmonary infection. Among the 161 patients enrolled , the sensitivity and negative predictive value of mNGS were improved compared with routine culture and nucleic acid detection of respiratory pathogens , and the difference was statistically significant ($P < 0.001$) . Although the specificity of mNGS was higher than that of respiratory pathogen nucleic acid detection , the difference was not statistically significant. The positive predictive value of mNGS was the highest , and was higher than that of respiratory pathogen nucleic acid detection , but had no statistical significance compared with conventional culture. **Conclusion** The sensitivity of mNGS in the diagnosis of pathogenic microorganisms in pulmonary infection is higher than that of conventional culture and nucleic acid detection of respiratory pathogens , which reduces the false negative rate of diagnosis and has a better comprehensive evaluation; conventional culture detection has low sensitivity , but high specificity; respiratory pathogen nucleic acid detection compared with conventional culture , the sensitivity is improved , but the specificity decreased.

Key words pulmonary infection; pathogen detection; mNGS; detection efficiency