

基于宏基因组二代测序技术检测社区获得性肺炎患者病原体的分布特征研究

乔薇¹

[摘要] 目的:利用宏基因组二代测序(mNGS)检测社区获得性肺炎(CAP)患者的感染病原体,分析其分布特征,为此类患者初始经验性抗感染策略的制定提供依据。方法:分析2020年7月—2022年2月我院呼吸内科、ICU收治的CAP患者痰液及支气管肺泡灌洗液的mNGS结果,归纳此类患者的病原体种类特征。结果:共纳入45例患者,mNGS检出阳性患者44例,细菌检出率最高(33/45,73.33%),其次为病毒(22/45,48.89%)、非典型病原体(12/45,26.67%)、真菌(6/45,13.33%)及分枝杆菌(2/45,4.44%)。入选患者中,CAP 20例(CAP组),重症社区获得性肺炎(SCAP)25例(SCAP组),两组患者呈现出与总体情况相似的病原学分布特征。结论:利用mNGS技术检测到CAP患者非典型病原体占比有增高趋势,特别是SCAP患者,在初始经验性选择抗生素时应考虑覆盖G⁻、G⁺细菌及非典型病原体。

[关键词] 宏基因组二代测序;社区获得性肺炎;重症社区获得性肺炎;病原体

DOI:10.13201/j.issn.1009-5918.2022.09.010

[中图分类号] R563.1 **[文献标志码]** A

Distribution characteristics of pathogens in patients with community-acquired pneumonia were detected by metagenomic sequencing

QIAO Wei

(Department of Critical Care Medicine, Daxing Teaching Hospital, Capital Medical University, Beijing, 102600, China)

Corresponding author: QIAO Wei, E-mail: qiaowei8010@163.com

Abstract Objective: Detect infectious pathogens in patients with community-acquired pneumonia (CAP) by metagenomic sequencing (mNGS), and to analyze their distribution characteristics, so as to provide evidence for the development of initial empirical anti-infection strategies for these patients. **Methods:** mNGS results of sputum and bronchoalveolar lavage fluid from patients with CAP admitted to the Department of Respiratory Medicine and ICU of Daxing Hospital, Capital Medical University from July 2020 to February 2022 were analyzed, and the pathogen characteristics of these patients were summarized. **Results:** A total of 45 patients were included in the study, of which 44 were positive for mNGS, with the highest bacterial detection rate (33/45, 73.33%). The second was virus (22/45, 48.89%), atypical pathogen (12/45, 26.67%), fungus (6/45, 13.33%) and mycobacterium (2/45, 4.44%). There were 20 cases of CAP and 25 cases of severe community-acquired pneumonia (SCAP). The etiological distribution characteristics of the two groups were similar to the general situation. **Conclusion:** The proportion of atypical pathogens in patients with CAP was increased by mNGS technique, especially in patients with SCAP. The coverage of G⁻, G⁺ bacteria and atypical pathogens should be considered in the initial empirical antibiotic selection.

Key words metagenomic sequencing; community-acquired pneumonia; severe community-acquired pneumonia; pathogens

社区获得性肺炎 (community-acquired pneumonia, CAP) 是临床常见的呼吸系统感染性疾病,明确病原微生物种类特征对于 CAP 的治疗有积极意义。《中国成人社区获得性肺炎诊断和治疗指南 (2016 年版)》^[1] 显示混合感染在 CAP 中占重要地

位,以细菌合并非典型病原体居多。近年来,随着病毒检测技术的广泛应用,呼吸道病毒如流感病毒、副流感病毒、腺病毒、呼吸道合胞病毒等在 CAP 病原学中的地位逐渐受到重视。但以往的这些病原学谱系特征均建立在病原学培养、抗原检测、血清特异性抗体检测或基于聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术的核酸筛查

¹首都医科大学大兴教学医院 ICU (北京, 102600)
通信作者: 乔薇, E-mail: qiaowei8010@163.com

等传统病原学检测方法的基础上,随着微生物测序分析技术的成熟,特别是宏基因组二代测序(metagenomic sequencing, mNGS)技术为呼吸道微生物病原学的检测带来了重大变革^[2]。本研究立足于临床,创新性的利用 mNGS 技术对 CAP 患者感染病原学种类特征进行归纳分析,为临床医生早期经验性抗微生物治疗提供依据。

1 资料和方法

1.1 研究对象

按序贯入组纳入 2020 年 7 月—2022 年 2 月首都医科大学大兴医院呼吸科、ICU 住院治疗的 CAP 患者共 45 例, CURB-65 评分均 ≥ 2 分,符合住院标准,严格按照 CUROX 评分筛选出 CAP 组 20 例,其中男 12 例,女 8 例;平均年龄(57.85 \pm 15.50)岁;重症社区获得性肺炎(SCAP)患者 25 例(SCAP 组),其中男 16 例,女 9 例;平均年龄(64.92 \pm 17.76)岁,诊断及治疗原则均符合《中国成人社区获得性肺炎诊断和治疗指南(2016 年版)》^[1]。本研究经首都医科大学大兴教学医院伦理委员会审核批准(No. LLKYLX-1-202),所有患者均知情并签署知情同意书。

纳入标准:①符合成人 CAP 或 SCAP 诊断标准;②临床资料完善;③知情同意,并进行了 mNGS 测序。排除标准:①年龄 < 18 岁;②中途放弃或转诊治疗患者。

1.2 mNGS 检测及数据分析

取患者深部痰、气管抽吸痰或支气管肺泡灌洗液为送检样本,置于 cf DNA 试管(cell-free DNA tube)中,并将采集好的样本置于 4℃ 冰箱内保存,在 24 h 内,样本由专人送往天津金匙医学检验实验室进行样本处理、核酸提取、文库构建及测序宏基因组二代测序。mNGS 标本的采集、保存和运输严格按照金匙基因 Illumina 平台标准流程进行测序。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件对数据进行分析,用偏度系数及丰度系数来检测计量资料的正态性,正态分布计量资料以 $\bar{X} \pm S$ 表示,计数资料以例(%)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 两组患者细菌、真菌、病毒病原学分布特征

共送检临床样本 45 份,其中深部痰 6 份,气管抽吸痰 17 份,支气管肺泡灌洗液 22 份。mNGS 检测结果呈阳性的共 44 例,检出率 97.78%;共检出微生物 29 种,111 株;平均序列数细菌最高,为 81795.91 条,其次为非典型病原菌 16228 条,病毒为 437.58 条,分枝杆菌为 128.5 条;平均序列数最低的为真菌(85.86 条)。两组患者 mNGS 检测出

菌株数及占比见表 1。

总检出率最高的为细菌(33/45, 73.33%),其次为病毒(48.89%, 22/45)、非典型病原体(12/45, 26.67%)(包括鹦鹉热衣原体及嗜肺军团菌)、真菌(6/45, 13.33%),检出率最低的是分枝杆菌(2/45, 4.44%),两组患者呈现出与总体情况相似的病原学分布趋势。但 SCAP 组病原学分布状况更为复杂,检测出菌株更多,混合感染率也更高。CAP 组共检出病原体 18 种,共 37 株,除病毒外鹦鹉热衣原体检出率最高,其次是流感嗜血杆菌及铜绿假单胞菌;SCAP 组共检出病原体 25 种,共 74 株,细菌方面以肺炎克雷伯菌、嗜肺军团菌及金黄色葡萄球菌检出率最高。另外,两组均呈现出较高的病毒检出率,最常见的混合感染的病毒为 EBV、HSV 及 CMV。

2.2 两组患者混合感染特征

基于 mNGS 检测结果,15 例患者为单纯细菌感染;3 例患者单纯病毒感染;1 例患者为单纯真菌感染,3 例为单纯鹦鹉热衣原体感染。其余 22 为混合感染病例。两组患者混合感染情况见表 2。SCAP 组混合感染的占比更高,但组间差异无统计学意义($P = 0.286$)。

3 讨论

CAP 病原学的早期认定一直是治疗过程中最为重要的一环,目前已有大量证据显示, mNGS 技术在病原学检测的全面性、敏感性、准确性、时效性方面均存在巨大优势^[3-5],特别是该技术应用于感染性疾病病原学检测的相关专家共识^[6-7]的发表,更极大范围内、极大程度上推进 mNGS 在临床上的应用。

以往的研究表明,我国 CAP 病原学在不同地区、不同年龄的分布特点差异很大^[8-10]。这些研究中病原学检测方法多为传统手段,本研究根据 mNGS 检测结果对 CAP 患者病原学分布情况进行总结。其一, CAP 细菌感染的病原学仍以 G-性菌为主,在 SCAP 中肺炎克雷伯菌占比高,金黄色葡萄球菌及肺炎链球菌感染引发的成人 SCAP 也较为常见,这一结果提示对于 SCAP 患者经验性抗生素选择上的“广覆盖”是有必要的。其二,非典型病原体检出率高,其中 5 例嗜肺军团菌感染者均为重症,目前临床上多应用尿抗原检测早期鉴定嗜肺军团菌,但仅能可靠检测军团菌 I 型,对其他血清型仍不能做到快速诊断,军团菌感染的金标准仍是培养阳性,事实上,目前军团菌培养条件苛刻,阳性率低,应用抗生素后对其检出影响大,且该病原学的检出一定程度上取决于临床医生的诊疗水平,所以如果依靠传统检测方法及诊疗思路检出率极低。另外,还有 7 例鹦鹉热衣原体患者被明确诊断,这些患者均有家禽接触史,在不同时段发病,无聚集

性发病特征,其中有 2 例患者为重症。有相关研究显示,非典型病原体在 CAP 中所占比例逐渐升高,特别是在青壮年、无基础疾病的患者中^[11]。近期国内也有学者利用 mNGS 技术诊断多例鹦鹉热衣原体肺炎^[12-14],对于成人重症肺炎应考虑非典型病原菌感染的可能性,四环素类、大环内酯类及喹诺

酮类抗生素的选择应有所侧重。其三,两组患者均检出了较高比率的病毒,主要集中在 EBV、HSV1、CMV 等病毒类型上,未检测到流感病毒、腺病毒、鼻病毒及呼吸道合胞病毒等传统意义上病毒性肺炎的病原体。

表 1 两组患者 mNGS 检测出菌株数及占比

例(%)

| 类型 | CAP 组(20 例) | SCAP 组(25 例) | 合计(45 例) |
|---------------|-------------|--------------|-----------|
| 细菌 | | | |
| 肺炎克雷伯菌 | 1(5.00) | 10(40.00) | 11(24.44) |
| 金黄色葡萄球菌 | 2(10.00) | 6(24.00) | 8(17.78) |
| 肺炎链球菌 | 2(10.00) | 4(16.00) | 6(13.33) |
| 流感嗜血杆菌 | 3(15.00) | 3(12.00) | 6(13.33) |
| 尿肠球菌 | 0 | 3(12.00) | 3(6.67) |
| 惠尔普养障体 | 1(5.00) | 3(12.00) | 4(8.89) |
| 铜绿假单胞菌 | 3(15.00) | 2(8.00) | 5(11.11) |
| 鲍曼不动杆菌 | 1(5.00) | 2(8.00) | 3(6.67) |
| 嗜麦芽窄食假单胞菌 | 0 | 2(8.00) | 2(4.44) |
| 粪肠球菌 | 0 | 2(8.00) | 2(4.44) |
| 成团泛菌 | 0 | 1(4.00) | 1(2.22) |
| 医院不动杆菌 | 0 | 1(4.00) | 1(2.22) |
| 大肠埃希菌 | 0 | 1(4.00) | 1(2.22) |
| 孔明串珠菌 | 0 | 1(4.00) | 1(2.22) |
| 纹带棒状杆菌 | 0 | 1(4.00) | 1(2.22) |
| 非典型病原体 | | | |
| 嗜肺军团菌 | 0 | 5(20.00) | 5(11.11) |
| 鹦鹉热衣原体 | 5(25.00) | 2(8.00) | 7(15.56) |
| 病毒 | | | |
| EBV | 8(40.00) | 6(24.00) | 14(31.11) |
| HSV1 | 3(15.00) | 5(20.00) | 8(17.78) |
| HHV7 | 1(5.00) | 4(16.00) | 5(11.11) |
| CMV | 1(5.00) | 3(12.00) | 4(8.89) |
| HHV6 | 0 | 3(12.00) | 3(6.67) |
| TTV | 1(5.00) | 0 | 1(2.22) |
| 真菌 | | | |
| 卡氏肺孢子菌 | 1(5) | 2(8) | 3(6.67) |
| 黄曲霉 | 1(5) | 1(4) | 2(4.44) |
| 黑曲霉 | 1(5) | 0 | 1(2.22) |
| 烟曲霉 | 1(5) | 0 | 1(2.22) |
| 特殊菌 | | | |
| 结核分枝杆菌 | 0 | 1(4) | 1(2.22) |
| 蟾蜍分枝杆菌 | 1(5) | 0 | 1(2.22) |
| 菌株总数/株 | 37 | 74 | 111 |

表 2 CAP 组及 SCAP 组混合感染情况 例

| 感染类型 | CAP 组 | SCAP 组 | 合计 |
|----------|----------|-----------|-----------|
| 细菌+病毒 | 4 | 9 | 13 |
| 细菌+真菌+病毒 | 0 | 3 | 3 |
| 细菌+衣原体 | 1 | 2 | 3 |
| 衣原体+病毒 | 1 | 0 | 1 |
| 真菌+病毒 | 2 | 0 | 2 |
| 合计/例(%) | 8(40.00) | 14(56.00) | 22(48.89) |

对重症感染的相关研究发现,病毒载量与不良预后相关^[15],国内也有报道,脓毒症患者的血样本疱疹病毒核酸阳性是预后不良的高危因素,且序列数检出值定为 100/样本,判断患者的预后,有显著的临床价值^[16]。本研究中,SCAP 组混合感染率更高,但两组患者差异无统计学意义,CAP 组也有较高比率的病毒被检出,这可能与以往的研究对象、观察指标与本研究存在差异,且样本量少有关。基

于 mNGS 结果定义“混合病毒感染”也存在疑问: ①混合感染的概念是基于 mNGS 检测结果确定的, 这些病毒是否致病尚不能确定, 诊断的阈值影响因素较多, 目前尚无统一公认的指标, 应结合患者标本类型、临床背景、影像学资料、其他的实验室检查结果综合判断, 如简单刻板的根据 NGS 报告治疗, 将会带来抗微生物治疗的滥用^[8]。②本研究中单纯检测到病毒的病例罕见, 大部分病例均为病毒与其他病原菌混合感染, 病毒核酸的检出是否与宿主免疫状态遭到破坏导致其被激活有关尚不能明确, 本研究中检测出的病毒核酸序列数一般不高, 临床应用抗病毒药物对预后是否能产生积极意义也缺乏循证医学证据。因此, 是否对检测到病毒的患者进行抗病毒治疗应综合考虑, 我们在整个诊治过程中并未尝试抗病毒治疗, 联合抗病毒治疗能否缩短病程、改善预后也应做进一步临床研究。

总之, 本研究结果提示, CAP 感染病原体应考虑到非典型病原菌, 特别是重症肺炎, 早期应结合病史及检验检查结果, 对 G⁻、G⁺ 细菌及非典型病原菌进行抗感染的“广覆盖”治疗, 并积极寻找病原学, 尽早针对性应用抗生素。

利益冲突 作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] 瞿介明, 曹彬. 中国成人社区获得性肺炎诊断和治疗指南(2016年版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2016, 39(4):253-279.
- [2] 宋元林, 侯东妮. 社区获得性肺炎病原学检测新进展[J]. 中华全科医学, 2018, 16(9):1530-1534.
- [3] Abril MK, Barnett AS, Wegermann K, et al. Diagnosis of Capnocytophaga canimorsus Sepsis by Whole-Genome Next-Generation Sequencing [J]. Open Forum Infect Dis, 2016, 3(3):144.
- [4] Somasekar S, Lee D, Rule J, et al. Viral surveillance in serum samples from patients with acute liver failure by metagenomic next-generation sequencing [J]. Clin Infect Dis, 2017, 65(9):1477-1485.
- [5] 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.
- [6] 中华医学会检验医学分会临床微生物学组, 中华医学会微生物学与免疫学分会临床微生物学组, 中国医疗保健国际交流促进会临床微生物与感染分会. 宏基因组高通量测序技术应用于感染性疾病病原检测中国专家共识 [J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(2):107-120.
- [7] 中华医学会神经病学分会感染性疾病与脑脊液细胞学学组. 中枢神经系统感染性疾病的脑脊液宏基因组学第二代测序应用专家共识 [J]. 中华神经科杂志, 2021, 54(12):1234-1240.
- [8] 余小丽, 俞婷, 陈愉生, 等. 80 岁以上老年人社区获得性肺炎的临床特点及病原学分析 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2022, 21(2):90-95.
- [9] 王玫, 赵建玉, 李雪, 等. 2015 至 2019 年北京某医院住院患者成人社区获得性肺炎病原学特点及防控研究 [J]. 中华预防医学杂志, 2021, 55(12):1410-1418.
- [10] 刘策, 叶芳, 姜巧巧, 等. 北京东南部地区成人社区获得性肺炎 620 例病原学分析 [J]. 中国当代医药, 2022, 29(7):139-142, 150.
- [11] Arnold FW, Summersgill JT, Ramirez JA. Role of Atypical Pathogens in the Etiology of Community-Acquired Pneumonia [J]. Semin Respir Crit Care Med, 2016, 37(6):819-828.
- [12] 邱晨辉, 叶健. 二代测序辅助诊断鹦鹉热衣原体肺炎 3 例报道并文献复习 [J]. 浙江医学, 2021, 43(18):2030-2033.
- [13] 王艳泓, 邱玉英, 唐健, 等. 结合宏基因组二代测序诊断的八例鹦鹉热患者临床分析 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2021, 20(7):472-478.
- [14] 戴彬湾, 朱林霄, 韩晓黎, 等. 鹦鹉热衣原体感染致全身多器官功能障碍综合征一例 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2022, 21(1):55-58.
- [15] Duan LW, Qu JL, Wan J, et al. Effects of viral infection and microbial diversity on patients with sepsis: A retrospective study based on metagenomic next-generation sequencing [J]. World J Emerg Med, 2021, 12(1):29-35.
- [16] 赵英珺, 邝中淑, 童朝阳, 等. 脓毒症患者血疱疹病毒核酸检测阳性的高危因素和临床特征 [J]. 中华急诊医学杂志, 2019, 28(8):1017-1022.

(收稿日期:2022-05-05)

(本文编辑:张蓉)