

mNGS在重症肺炎中的应用

张怡欣, 甘桂芬*

青海大学研究生院, 青海 西宁

收稿日期: 2022年9月15日; 录用日期: 2022年10月2日; 发布日期: 2022年10月11日

摘要

肺部感染是ICU中常见疾病, 诊治过程中最重要的一环为确认肺部感染的病原微生物, 针对该病原微生物对症使用抗生素, 目前肺泡灌洗液传统微生物培养仍为确定病原微生物的金标准。重症肺炎患者病情变化快、病原微生物种类复杂, 而传统微生物检测耗时长, 对罕见微生物的检测有所欠缺, 所以宏基因组二代测序技术(mNGS)逐渐应用于临床检测。mNGS运用于我科重症肺炎病原学检测后, 发现了一些从前传统检测方法未检出的微生物, 而这类病原体的及时、快速确定为治疗病情变化快的重症患者赢得了宝贵的时间。

关键词

宏基因组二代测序, 肺泡灌洗液, 传统病原微生物检测, 病原微生物

Application of mNGS in Severe Pneumonia

Yixin Zhang, Guifen Gan*

Graduate School of Qinghai University, Xining Qinghai

Received: Sep. 15th, 2022; accepted: Oct. 2nd, 2022; published: Oct. 11th, 2022

Abstract

Pulmonary infection is a common disease in ICU. The most important part of the diagnosis and treatment process is to identify the pathogenic microorganisms of pulmonary infection, and antibiotics are used for the pathogenic microorganisms. At present, the traditional microbial culture of alveolar lavage fluid is still the gold standard for identifying pathogenic microorganisms. The condition of patients with severe pneumonia changes rapidly and the types of pathogenic microorganisms are complex. Traditional microbial detection takes a long time, and the detection of rare microorganisms is lacking. Therefore, metagenomic next-generation sequencing (mNGS) technology is gradually applied in clinical detection. After mNGS was applied to the etiological de-

*通讯作者。

tection of severe pneumonia in our department, some microorganisms that were not detected by traditional detection methods were found, and the timely and rapid identification of such pathogens has won precious time for the treatment of critically ill patients whose conditions change rapidly.

Keywords

Metagenomic Next-Generation Sequencing, Bronchoalveolar Lavage Fluid, Traditional Pathogenic Microbial Testing, Pathogenic Microorganisms

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. mNGS 技术概况

1.1. mNGS 技术背景及临床应用

肺部感染在世界范围内广泛存在, 根据世界卫生组织 2020 年统计, 全球每年大约有 3000 万人死于肺部感染。CAP (community-acquired pneumonia) 社区获得性肺炎是肺部感染的主要病因之一, 也是世界上主要传染病死亡原因和世界第三大死因。ICU 重症 CAP 住院患者相关死亡率高达 30%。及时、准确的病原微生物检测对于制定合理治疗方案、缩短住院时间、提高存活率具有重要意义。

基因组学方面的进展有助于开发更有效、更个性化的传染病预防和治疗方法。基因测序技术正在进一步加深我们对人类和病原体基因组因子及其相互作用的理解[1]。病原学诊断是感染性疾病诊断中最重要的一环, 对于提升中重症感染性疾病的诊疗质量至关重要, 其中分子诊断是病原学诊断中的一个重要方向。随着现代分子生物学技术的发展, 出现了很多分子诊断方法, 如 DNA 限制性内切酶分析技术(DNA restriction endonuclease technology)、核酸探针杂交技术(nucleic acid probe hybridization technology)、聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术和环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术等[2], 因此, 由于病原体的多样性, 传统检测手段的局限性, 以及临床医生对目标病原体的判断水平参差不齐, 在临床上超过 2/3 的感染性疾病最终仍无法鉴定其病原体, 导致临床不能针对性地用药, 经验试错情况时有发生。传统的微生物培养目前仍是 CAP 病原学诊断的主要方法, 具有可及性高、花费少的优势, 并常作为评价其他 CAP 病原学检查的金标准[3]。但传统病原学培养主要为 BALF 微生物涂片与培养, 微生物培养通常培养时间较长, 等待结果的同时患者病情加重, 可能错过最佳治疗时机, 而另一个重要问题是检测到的病原体有限, 传统病原学培养对非常见病原体的检测结果常常令人失望[4]。为了提高临床病原学诊断的准确性以及缩短诊断时间, 宏基因组技术应运而生。

宏基因组二代测序(metagenome next-generation sequencing, mNGS)技术: 指采用 NGS 技术对特定标本中所有核酸序列进行测序, 相对于一代可以同时测定几百万甚至上亿条核酸序列。与传统检测技术相比, mNGS 能无偏倚性直接分析出标本中的病原体谱、丰度和分布情况, 能够广泛识别已知和意外的病原体, 甚至发现新生物数量, 改变传统病原学诊断模式。并且与有针对性的方法相结合, 例如使用保存的 16S 核糖核素 RNA(rRNA)和内部转录间隔序列的引物, 分别用于通用细菌和真菌检测, 这可以允许这些生物的物种水平识别。mNGS 可以提供定量或半定量。通过测序读数计数获得的样本中有机物浓度数据, 这对于多微生物样本或已感染一种以上病原体的情况非常有用。而且 mNGS 周转时间快, 能够从研究工作过渡到作为临床微生物学实验室诊断方法, 具有良好应用前景。总之, mNGS 是一项革命性技术,

在多个传统领域打破了传统诊断。来自澳大利亚接受单一供体器官移植的3名患者在移植4~6周后死于发热性疾病。提取患者肝脏及肾脏RNA,通过mNGS技术发现与新型沙粒病毒与淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒有关,这是mNGS技术首次应用于临床病原学诊断[5]。我国mNGS技术的临床应用的开端是关于新型布尼亚病毒,布尼亚病毒被确定为中国其他地区的中国患者FTLS的病因[6]。总之,mNGS是一项革命性技术,在多个传统领域打破了传统诊断。

1.2. mNGS 标本

纤维支气管镜在肺泡灌洗过程中可直达病变部位,可以吸出支气管内的痰液,经支气管镜获得标本一般包括肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)、经支气管镜肺活检组织(transbronchil lung biopsy, TBLB)、支气管针刷标本(bronchial specimen brush, BB),这些标本可最大程度降低口腔及上呼吸道定植菌的干扰的可能性,且防污染支气管肺泡灌洗也减少了污染的机会,因此这些经纤维支气管镜获取的标本均可提高检测结果的准确性。但支气管镜为有创检查,患者的氧饱和度低或肺部情况差,不能耐受支气管镜检查时应选择其他标本进行检测。根据Wang等人[7]的一项研究比较了通过mNGS诊断周围肺部感染在经支气管肺活检组织(TBLB)、支气管肺泡灌洗液(BALF)、支气管针刷标本(BB)、以及TBLB + BALF + BB联合等四种不同标本的诊断效能,结果发现在诊断细菌感染方面,TBLB、BALF、BB以及TBLB + BALF + BB四者敏感性无明显差异;而在诊断真菌感染及未分类病原体感染方面,敏感性TBLB + BALF + BB > BB > BALF > TBLB; TBLB特异性最高,其次是BB、BALF。因此当临床怀疑真菌及不明原因的病原体感染时,可通过支气管镜获取TBLB、BALF、BB进行联合检测,提高病原体检出率。目前研究中mNGS检测肺部感染绝大多数采用肺泡灌洗液,肺泡灌洗液人源性核酸含量最低,对结果干扰最小,而且样本来自深部肺组织,对深部肺部感染有较好的代表性。大量研究也证实肺泡灌洗液检测效率优于血液和痰液。Chen X等人[8]的研究采用配对设计比较了血液和肺部灌洗液在肺部感染中的诊断效能,结果显示肺泡灌洗液检测灵敏度高于血液(81.3% > 25.0%, $P = 0.003$);而特异度血液略高于肺泡灌洗液(84.6% > 76.9%, $P = 0.317$),但差异无统计学意义。综上所述,BALF是肺部感染mNGS检测的最佳标本。另外可在病变部位注入抗生素,治疗具有靶向性,明显提高临床疗效。且在肺泡灌洗液反复冲洗下可以稀释粘稠分泌物,更有利于痰液排出,有效抑制病原体的毒素作用,明显缓解肺部感染情况[9]。

1.3. mNGS 与传统病原学比较

将mNGS与传统病原菌检测方法的敏感性和特异性进行比较,mNGS的敏感性(88.30%)高于传统病原菌检测方法(25.73%),差异为62.57% ($P < 0.001$),mNGS的特异性(81.16%)低于传统方法(88.41%),差异为7.25% ($P = 0.639$)。mNGS的阳性预测值和阴性预测值分别为92.07%和73.68%。mNGS的准确性为86.25%,而传统检测方法的准确性为43.75%。传统病原菌检测的阳性预测值和阴性预测值分别为84.62%和32.45%。

关于mNGS对支气管镜检查获得的介入标本的诊断率,根据Huang, J.等人[10]的研究结果,mNGS在几乎89%的肺部感染患者中鉴定出至少一种微生物,在94.49%的肺部感染患者样本中检测到与人类疾病相关的微生物,这些患者的传统病原体检测结果为阴性。钮月英等人[11]对比肺泡灌洗液mNGS与传统培养的研究,灌洗液mNGS阳性率与传统培养阳性率的比较灌洗液mNGS检测阳性患者39例,阴性患者17例,阳性率69.6%;传统培养检测阳性患者14例,阴性患者42例,阳性率25.0%;灌洗液mNGS检测阳性率明显高于传统培养,差异有统计学意义($\chi^2 = 8.137, P < 0.05$)。但临床医生在诊断过程中应结合患者临床流行病学、病史、体征、实验室检查、胸部影像学等其他方面综合判断。

1.4. mNGS 局限性和未来发展

目前对于mNGS也存在局限性,主要有4点:1) mNGS检测要求技术水平较高,存在去人源化难度

大, 对 RNA 病毒检出率低, 真菌和结核菌提取 DNA 相对困难等问题; 2) 缺乏统一、完善的检测流程和质量控制标准, 结果无法区分定植菌和致病菌; 3) 暂时还无法同时得到抗菌药物药敏结果; 4) 检测费用较高[12]。但 mNGS 技术目前还有许多可以发展的方向, 例如耐药和突变的鉴定、完成样本宏转录组的检测、优化时长等[2]。目前, mNGS 耐药性预测的发展对临床治疗各类感染具有重大意义, 根据 Teresa L. Street 等人[13]对人工关节置换术后引流液微生物物种耐药性研究, 将样本与 8 种抗菌药物(环丙沙星、克林霉素/红霉素、夫西地酸、甲氧林、庆大霉素、利福平、四环素和甲氧苄啶)的表型结果进行了比较, 正确预测 57% 的敏感性, 由于数据不足而无法确定 39% 的敏感性; 正确预测了 87% 的抗性表型以及 100% 易感表型。

2. 重症肺炎致病病原体

目前社区获得性肺炎病原体检出率约 50% 左右, 目前国内多项成人 CAP 流行病学调查结果显示: 肺炎支原体和肺炎链球菌是我国成人 CAP 的重要致病原。其他常见病原体包括流感嗜血杆菌、肺炎衣原体、肺炎克雷伯菌及金黄色葡萄球菌; 但铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌少见。我国社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)肺炎仅有儿童及青少年的少量病例报道。随着病毒检测技术的发展与应用, 呼吸道病毒在我国成人 CAP 病原学中的地位逐渐受到重视我国成人 CAP 患者中病毒检出率为 15.0%~34.9%, 流感病毒占首位, 其他病毒包括副流感病毒、鼻病毒、腺病毒及呼吸道合胞病毒等[14]。非免疫缺陷患者的 HAP/VAP 通常由细菌感染引起, 由病毒或真菌引起者较少, 常见病原菌的分布及其耐药性特点随地区、医院等级、患者人群及暴露于抗菌药物的情况不同而异, 并且随时间而改变。我国 HAP/VAP 常见的病原菌包括鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌及大肠埃希菌等。但需要强调的是, 了解当地医院的病原学监测数据更为重要, 在经验性治疗时应根据及时更新的本地区、本医院甚至特定科室的细菌耐药特点针对性选择抗菌药物。我国 VAP 患者主要见于 ICU, 其中鲍曼不动杆菌分离率高达 35.7%~50.0%, 其次为铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌[15]。

根据 Fuxun Yang [16]等人对中国西南地区鹦鹉热的研究, 结果表明, 宏基因组新一代测序可以提供早期诊断。mNGS 技术运用于青海地区后, 青海大学附属医院重症医学科于 2021 年首次在 BALF 液中检出鹦鹉热衣原体, 由此我们思考一个问题: 难道 2021 年前就没有人感染鹦鹉热吗? 答案当然是否定的。由于传统病原学检测的局限性, 很多病原体还未诊断清楚, 患者就已经好转或者死亡。2021 年青海大学附属医院重症医学科行 mNGS 的 34 例患者, 其中 32 例患者为 CAP 引起的重症肺炎, 这也说明了社区获得性肺炎致病菌的复杂性以及 mNGS 对社区获得性肺炎所致的重症肺炎病原学诊断的重要性。其中罕见病原微生物包括耶氏肺孢子菌 4 例, 鹦鹉热衣原体 4 例, 嗜肺军团菌 2 例。传统病原学检测结果中并不包含耶氏肺孢子菌、鹦鹉热衣原体、嗜肺军团菌等罕见病原体。而这类病原体的及时、快速确定为治疗病情变化快的重症患者赢得了宝贵的时间, 节约了用药成本, 改善了患者愈后。

综上所述, 宏基因组二代测序技术应用于临床病原学诊断, 有效提高病原体的检出阳性率, 缩短了诊断时间, 能早期准确的识别出致病微生物。对于混合性肺部感染, 可将 mNGS 与常规检测方法联合, 从而提高诊断的精准度。

参考文献

- [1] Geller, G., *et al.* (2014) Genomics and Infectious Disease: A Call to Identify the Ethical, Legal and Social Implications for Public Health and Clinical Practice. *Genome Medicine* 6, Article No. 106. <https://doi.org/10.1186/s13073-014-0106-2>
- [2] 李颖, 麻锦敏. 宏基因组学测序技术在中重症感染中的临床应用专家共识(第一版) [J]. *感染、炎症、修复*, 2020, 21(2): 75-81.

- [3] 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. <https://doi.org/10.16766/j.cnki.issn.1674-4152.000418>
- [4] Ding, J., Ma, B., Wei, X. and Li, Y. (2022) Detection of Nocardia by 16S Ribosomal RNA Gene PCR and Metagenomic Next-Generation Sequencing (mNGS). *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **11**, Article ID: 768613. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.768613>
- [5] Palacios, G., et al. (2008) A New Arenavirus in a Cluster of Fatal Transplant-Associated Diseases. *The New England Journal of Medicine*, **358**, 991-998. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa073785>
- [6] Xu, B., et al. (2011) Metagenomic Analysis of Fever, Thrombocytopenia and Leukopenia Syndrome (FTLS) in Henan Province, China: Discovery of a New Bunyavirus. *PLOS Pathogens*, **7**, e1002369. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002369>
- [7] Wang, Q., et al. (2020) Optimal Specimen Type for Accurate Diagnosis of Infectious Peripheral Pulmonary Lesions by mNGS. *BMC Pulmonary Medicine* **20**, Article No. 268. <https://doi.org/10.1186/s12890-020-01298-1>
- [8] Chen, X., et al. (2020) Blood and Bronchoalveolar Lavage Fluid Metagenomic Next-Generation Sequencing in Pneumonia. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, **2020**, Article ID: 6839103. <https://doi.org/10.1155/2020/6839103>
- [9] 吴娜, 李永霞. mNGS 在肺部感染中的诊断标准及标本选择研究进展[J]. 中国老年保健医学, 2021, 19(5): 122-124.
- [10] Huang, J., et al. (2020) Metagenomic Next-Generation Sequencing versus Traditional Pathogen Detection in the Diagnosis of Peripheral Pulmonary Infectious Lesions. *Infection and Drug Resistance*, **13**, 567-576. <https://doi.org/10.2147/IDR.S235182>
- [11] 钮月英, 吴晓虹, 应可净. 肺泡灌洗液宏基因二代测序技术对下呼吸道感染病原体检测的优势[J]. 中国实用内科杂志, 2020, 40(9): 754-758. <https://doi.org/10.19538/j.nk2020090111>
- [12] 陈涔, 李园园, 潘频华, 胡成平, 杨华平. 二代测序技术在重症社区获得性肺炎诊断中的意义[J]. 中国感染控制杂志, 19(4): 335-340.
- [13] Street, T., et al. (2022) Clinical Metagenomic Sequencing for Species Identification and Antimicrobial Resistance Prediction in Orthopedic Device Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, **60**, e02156-21. <https://doi.org/10.1128/jcm.02156-21>
- [14] 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.
- [15] 施毅. 中国成人医院获得性肺炎与呼吸机相关性肺炎诊断和治疗指南(2018 年版) [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2018, 41(4): 255-280.
- [16] Yang, F., et al. (2021) Clinical Symptoms and Outcomes of Severe Pneumonia Caused by *Chlamydia psittaci* in Southwest China. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **11**, Article ID: 727594. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.727594>