

· 论著 · 胸部 ·

宏基因组二代测序技术在肺部感染病原体检测中的应用价值*

刘珍珍^{1,*} 刘 谡¹ 贾永庆¹ 房 翠²

1.商丘市第一人民医院(河南 商丘 476000)

2.河北医科大学(河北 石家庄 050011)

【摘要】目的 研究和分析宏基因组二代测序技术在肺部感染患者病原体检测中的应用价值。方法 选择我院呼吸内科于2022年10月至2023年9月期间收治的肺部感染患者196例进行研究,采用随机数字表法将患者分为两组,即对照组(n=98,行实验室传统病原学检测)和研究组(n=98,行宏基因组二代测序检测)。比较两组检测结果。结果 研究组肺部感染诊断准确率72.45%,明显高于对照组的24.49%,差异具有统计学意义($P<0.05$)。研究组细菌、病毒的检出率分别67.34%、12.93%,明显高于对照组的39.29%、0.00%;对照组的真菌检出率60.71%,明显大于研究组19.73%,差异具有统计学意义($P<0.05$)。研究组在肺结核、支气管扩张、胸腔积液中的病原体检出率分别53.66%、73.33%、62.96%、检查满意度97.96%,均明显高于对照组的22.50%、28.13%、26.92%、检查满意度85.71%,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。结论 在肺部感染患者病原体检测中,科学、正确的应用宏基因组二代测序,能获得更高的病原体检出率,为医师的临床诊断提供更丰富的临床依据,有助于患者的疾病治疗,以便身体尽早康复,临床推广价值较高。

【关键词】宏基因组二代测序;肺部感染;病原体检测;应用价值

【中图分类号】R563

【文献标识码】A

【基金项目】国家自然科学基金面上项目(81871749)

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2025.7.028

Application Value of Metagenomic Second-generation Sequencing Technology in Pathogen Detection of Patients with Pulmonary Infection*

LIU Zhen-zhen^{1,*}, LIU Man¹, JIA Yong-qing¹, FANG Cui².

1.Shangqiu First People's Hospital, Shangqiu 476000, Henan Province, China

2.Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei Province, China

Abstract: Objective To study and analyze the application value of metagenomic second-generation sequencing technology in pathogen detection of patients with pulmonary infection. **Methods** A total of 196 patients with pulmonary infection admitted to the respiratory Department of our hospital from October 2022 to September 2023 were selected for study. The patients were divided into two groups by random number table method: control group (n=98, traditional laboratory etiology detection) and study group (n=98, metagenomic second-generation sequencing detection). The results of the two groups were compared. **Results** The diagnostic accuracy of pulmonary infection in the study group was 72.45%, which was significantly higher than 24.49% in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The detection rates of bacteria and virus in the study group were 67.34% and 12.93%, respectively, which were significantly higher than those in the control group (39.29% and 0.00%). The fungal detection rate of the control group was 60.71%, which was significantly higher than that of the study group 19.73%, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The pathogen detection rates of pulmonary tuberculosis, bronchiectasis and pleural effusion in the study group were 53.66%, 73.33%, 62.96% and 97.96%, respectively, which were significantly higher than those of the control group (22.50%, 28.13%, 26.92% and 85.71%). The differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** In pathogen detection of patients with pulmonary infection, scientific and correct application of metagenomic second-generation sequencing can obtain a higher pathogen detection rate, provide a richer clinical basis for doctors' clinical diagnosis, contribute to the treatment of patients' diseases, so that the body can recover as soon as possible, and have high clinical promotion value.

Keywords: Metagenomic Second-generation Sequencing; Lung Infection; Pathogen Detection; Application Value

现有流行病学数据表明,传染性疾患在全球范围内构成重大致死性因素^[1]。其中,肺部感染占较高的比例,此患者因并发症多、病情严重,病死率颇高。临床上,正确识别感染病原体的种类,能够帮助医师更有针对性的用药,以便有效控制患者的肺部感染,提高患者的预后^[2]。当前,对于肺部感染的检测,既往多使用常规微生物培养、聚合酶链反应等,但受限干特异度、灵敏度不高,已逐渐不能满足临床诊断所需。宏基因组高通量测序代表了一种创新的病原学检测方法,通过提取样

本中的所有微生物遗传序列,再从得到的数据中与数据库中的病原菌特异性基因序列比对,以此来确定病原体的种属,具有检测快、广覆盖、无偏倚等优势^[3]。目前,该技术已成为临床上检测病原微生物的一种新兴方式,其应用范围也愈发广泛。本研究重点评估宏基因组高通量测序技术对肺部感染病原学诊断的临床效用,相关研究结果陈述如下。

1 资料与方法

【第一作者】刘珍珍,女,主治医师,主要研究方向:呼吸危重症、肺部肿瘤、肺康复。E-mail: lzz9868632@126.com

【通讯作者】刘珍珍

1.1 一般资料 对我院呼吸内科2022年10月至2023年9月期间收治的肺部感染患者196例进行研究,采用随机数字表法将患者分为对照组(n=98例)与研究组(n=98例)。对照组中,男56例,女42例。年龄:19~78岁,平均(49.75±9.40)岁。肺结核、支气管扩张、胸腔积液各40、32、26例。研究组中,男53例,女45例。年龄:17~80岁,平均(50.06±9.29)岁。肺结核、支气管扩张、胸腔积液各41、30、27例。

纳入标准:符合肺部感染诊断标准,胸部影像学检查后,结果显示斑片状、片状浸润性阴影或间质性改变^[4];符合宏基因组二代测序适应症。排除标准:患者存在肺间质性疾病或肺部肿瘤、肺不张等病症;患者行实验室传统病原学检测或宏基因组二代测序前,已被明确为非肺部感染患者。两组受试者的基线特征具有可比性(P>0.05)。

1.2 方法 对照组用标准微生物检验流程进行病原学诊断。标本采集阶段要求患者在抗菌药物治疗前完成,晨起时指导其使用无菌生理盐水清洁口腔后,通过深咳法获取下呼吸道分泌物。对于咳痰困难病例,可借助支气管镜辅助采集。所获标本立即转入无菌容器,并于采集后60分钟内转运至实验室。由专业技术人员进行标本质量评估,显微镜下观察要求上皮细胞与中性粒细胞比值低于1:2.5,且每低倍视野白细胞计数超过25个。合格标本接种于特定培养基,在严格控制的环境条件下培养48~72小时。对生长菌落进行分离纯化后,采用自动化微生物分析系统进行菌种鉴定。最终结果需结合患者临床表现综合分析,排除定植菌及污染菌干扰后,方可确定为致病微生物。

研究组实行宏基因组二代测序检测,具体步骤如下:(1)支气管肺泡灌洗液采集:开始前为患者做好常规检查,确保患者无心脑血管疾病。术前,禁食水4h,结合胸部CT结果,选择目标肺段,开始支气管肺泡灌洗。回收的样本量应多于5mL,送检。取450μL样本加入1.0% 11.5μL皂素,充分涡旋混匀15s,室温静置5min。再加入75μL去宿主反应,再次涡旋混匀,37℃温浴10min。离心5min,吸弃上清450μL,试管内约留70~80μL液体。管中再次加入800μL磷酸缓冲盐溶液,充分吹吸,重复离心处理。吸弃上清800μL,约留70~80μL液体。管中加入7.2L Lyticase溶壁酶。酶破壁反应之后,再加入0.5mm玻璃珠250μL作物理破壁。混合震荡后,去样本300μL。(2)核酸提取:严格按照TIANMi-crobe磁珠法核酸提取试剂盒操作规范逐步实施^[5]。(3)文库构建后,以BGISEQ-50/MGISEQ-2000测序仪完成测序。(4)数据分析:去

除测序结果中的质量低、接头污染的数据,将重新得到的数据,比对BWA,去除人参考基因组序列,去除低复杂度序列。再比对华大基因PMDB病原数据库,获取与特定病原微生物相对应的基因序列读数。(5)结果判读:相较其它微生物,若细菌、病毒、寄生虫检出序列数高出10倍,可判为阳性;真菌检出序列数比其它真菌高出5倍,判定为阳性;结核分枝杆菌序列数再种或属水平上,至少有一个序列数与参考基因组一致时,判定为阳性;传统培养检测到病原菌,宏基因组二代测序reads数>50,也可判定为阳性^[6]。以最终临床诊断为金标准。

1.3 观察指标 (1)比较两组的肺部感染诊断准确率。(2)比较两组对不同病原体的检出情况。(3)比较两组在3种合并肺部基础疾病中的病原体检出率。(4)评估两组受试者对检查过程的满意程度,采用三级评价标准(非常满意、满意、不满意)。

1.4 统计学方法 数据处理以SPSS 24.0统计软件进行,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间对比行t检验;计数资料以[n(%)]表示,组间对比行 χ^2 检验,以P<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺部感染诊断准确率 相较于研究组,对照组的肺部感染诊断准确率明显更低(P<0.05)。详见表1。

表1 两组患者肺部感染诊断准确率对比[n(%)]

组别	例数	符合肺部感染诊断	诊断准确率
对照组	98	24	24.49
研究组	98	71	72.45
χ^2 值			4.068
P值			0.031

2.2 对不同病原体的检出率 研究组共检出147株病原体,对照组共检出56株病原体。相较于研究组,对照组对细菌、病毒的检出率明显较低,真菌的检出率明显更高(P<0.05)。两组方法的非典型病原体检出率相比,差异无意义(P>0.05)。详见表2。

2.3 在3种合并肺部基础疾病中的病原体检出率 相较于对照组,研究组在肺结核、支气管扩张、胸腔积液中的病原体检出率均明显更高(P<0.05)。详见表3。

2.4 检查满意度 相较于研究组,对照组患者的检查满意度明显更低(P<0.05)。详见表4。

表2 两组对不同病原体的检出率对比[n(%)]

组别	细菌	真菌	病毒	非典型病原体	合计
对照组(56)	22(39.29)	34(60.71)	0(0.00)	0(0.00)	56(100.00)
研究组(147)	99(67.34)	29(19.73)	19(12.93)	0(0.00)	147(100.00)
χ^2 值	4.920	4.083	4.251		4.266
P值	0.017	0.035	0.029		0.039

表3 两组在3种合并肺部基础疾病中的病原体检出率对比[n(%)]

组别	肺结核	支气管扩张	胸腔积液
对照组	22.50(9/40)	28.13(9/32)	26.92(7/26)
研究组	53.66(22/41)	73.33(22/30)	62.96(17/27)
χ^2 值	4.901	6.628	6.053
P值	0.021	0.000	0.007

表4 两组患者的检查满意度对比[n(%)]

组别	例数	非常满意	满意	不满意	检查满意度
对照组	98	46(46.93)	38(38.78)	14(14.29)	84(85.71)
研究组	98	62(63.27)	34(34.69)	2(2.04)	96(97.96)
χ^2 值					4.295
P值					0.027

3 讨论

肺部感染是临床常见疾病,可由多种病原微生物诱发。因累及患者的气道、肺泡腔、肺间质,将对患者的机体健康状态产生明显不良影响^[7]。尤其是对合并其他重症的患者,一旦出现肺部感染,将会增加其病死风险。然而,肺部感染的病原类型具有较大差异,临床治疗方式迥异。当前,经验性抗感染治疗仍为救治肺部感染性疾病的常用方式,由此可能会造成抗生素滥用引起不良反应、联合用药造成生态失衡等风险,降低临床治疗效果^[8-9]。为更好的挽救患者生命,正确、快速识别肺部感染的病原体类型非常关键,能极大地提高患者地生存率,缩短住院时间。实验室传统培养虽然是病原诊断地金标准,由于微生物群落动态变化、抗菌药物使用差异及宿主免疫特征演变等因素干扰,临床实践中易出现特定致病微生物所致病例的鉴别诊断偏差,进而影响诊疗时效性^[10]。而且,该方式的诊断时间长,通量低,已逐渐无法满足现代医学中个体化、精准医疗的需求。宏基因组二代测序是一种高通量测序方法,不仅可以同时检测、识别多种病原体,也能快速、准确地提供病原体鉴定、分型结果^[11]。该方法突破了传统培养技术的局限性,无需临床医师预先推测可能的病原体种类。尤其是在常规检测持续阴性、感染病程长等病例的治疗中,宏基因组二代测序往往能为医师提供更多的诊断信息,且不会遭受抗生素暴露的影响^[12]。该种检测方式也能辅助提示微生物耐药趋势,指导抗感染药物地合理使用,尽可能避免抗生素滥用地问题发生。但宏基因组二代测序目前也有其不足,首先,其花费更高,临床应用存在经济制约;其次,该技术难以有效鉴别呼吸道共生菌群、过路菌与致病微生物;最后,支气管镜作为侵入性操作,存在诱发医源性感染风险,且受患者接受度与耐受性限制,因此,这也要求在标本采集、运输过程中,应严格执行无菌操作,提高标本质量,尽量避免宿主基因组污染、干扰的情形^[13]。总的来说,宏基因组二代测序与实验室传统检测方式相比,前者更有利于复杂、未知感染地早期诊断、精准治疗。由以往的经验性抗感染治疗方式向精准、个性化的诊疗模式转变,对改善患者的身体健康状况有利^[14]。

本次研究显示,研究组的肺部感染诊断准确率72.45%,明显高于对照组24.49%($P<0.05$)。结果提示,宏基因组二代测序的

应用优势明显,检出率、敏感度更高,为肺部感染患者的治疗提供更准确的治疗方式。在该检测方式之下,能一次性对上百万条DNA分子进行测序,且结果不受激素、抗生素使用的影响,外界因素对结果准确度的影响也更小。其次,研究组的细菌、病毒的检出率67.34%、12.93%,明显高于对照组39.29%、0.00%;对照组的真菌检出率60.71%,明显大于研究组19.73%($P<0.05$)。结果表明,宏基因组二代测序得到更准确的微生物种属信息,经信息解析后,理论上能检测出所有病原体,对罕见、非典型病原体的检测更为适用。检测之时,将肺泡灌洗液作为标本,能够从中获取细胞因子、可溶性蛋白、酶类等多种信息,面对肺部感染病原的鉴定有积极意义。在肺部感染的病原体中,相比于病毒、真菌,细菌占比更多,处主要地位。因而,应用宏基因组二代测序,有利于提高肺部感染患者的病原体检出率。当考虑患者可能为非典型病原体、真菌、病毒感染时,可根据其经济、病史等情况,酌情选用宏基因组二代测序。另外,研究组在肺结核、支气管扩张、胸腔积液中的病原体检出率53.66%、73.33%、62.96%、检查满意度97.96%,均明显高于对照组22.50%、28.13%、26.92%、检查满意度85.71%,差异具有统计学意义($P<0.05$)。数据指出,宏基因组二代测序更具时效性,从样本送检至出结果,时间不超过48h。在更早期就能明确病原菌,以此为患者完成针对性治疗。有效控制感染,防止疾病进一步进展。因结果的超高准确度,让患者得以更快治疗、痊愈,其对宏基因组二代测序的接受度也较高。

综上所述,在肺部感染患者病原体检测中,科学、正确的应用宏基因组二代测序,能获得更高的病原体检出率,为医师的临床诊断提供更丰富的临床依据。有助于患者的疾病治疗,以便身体尽早康复,临床推广优势明显。但该检测方式的花费较高,基层医院难以普及,当前仍不能撼动实验室传统检测方式的地位,临床上还需根据患者的实际情况斟酌选用。

参考文献

- [1]任靖宜,苏莹莹,康小文.宏基因组测序诊断支气管扩张症合并肺部感染病原微生物价值[J].中华实用诊断与治疗杂志,2022,36(8):849-851.
- [2]武永利,鲁炳怀.实验室传统检测与宏基因组二代测序在肺部真菌感染诊断中的应用价值[J].华西医学,2022,37(8):65-67.
- [3]孙莉,马艳,厉小梅,等.宏基因组二代测序对结缔组织病并发肺部感染的病原学诊断价值研究[J].现代检验医学杂志,2023,38(5):1-4.
- [4]牛凯,刘斌.宏基因组二代测序技术在2型糖尿病合并肺部感染患者中的临床应用[J].临床肺科杂志,2023,20(12):1840-1845.
- [5]刘淑敏,宋黄波,许云敏,等.基于宏基因组二代测序技术诊断多育节英孢菌致肺部感染一例[J].华西医学,2022,37(8):218-219.
- [6]张晓辉,秦玉红,黄建安,等.宏基因组二代测序辅助诊断耶氏孢子菌合并巨细胞病毒感染3例并文献复习[J].临床急诊杂志,2022,19(5):22-23.
- [7]翟磊磊.美罗培南与亚胺培南-西司他丁治疗重症肺部感染的效果比较[J].罕少疾病杂志,2022,29(2):34-35,45.
- [8]濮阳娟,张宇峰,马苗,等.宏基因组二代测序在间质性肺病伴感染患者中的应用[J].国际呼吸杂志,2022,42(8):80-82.
- [9]王伟,王蔚,赵燕燕.宏基因组二代测序技术在结核性脑膜炎诊断中的应用价值[J].重庆医学,2023,52(S01):280-283.
- [10]考吾沙尔·巴合提江,夏宇,穆坎代斯·吐尔迪.宏基因组二代测序技术在免疫功能低下肺部感染患者诊断中的应用研究进展[J].山东医药,2023,63(5):100-102.
- [11]吴振华,上官文静,王传光,等.宏基因组下一代测序技术检测肺部感染病原体研究进展[J].中国病原生物学杂志,2023,18(7):864-867.
- [12]何邦立,林亚发,符名勇,等.宏基因组二代测序技术检测不明原因肺部感染病原体的临床应用价值[J].中华医院感染学杂志,2023,33(7):1001-1005.
- [13]田瑞,王静.肺部感染住院患者肾功能及肾漏渗情况研究[J].罕少疾病杂志,2023(11):41-42.
- [14]陈婷婷,江文洁,华晓兰,等.宏基因组二代测序在肺部感染患者病原体检测中的应用价值[J].广西医科大学学报,2022,19(5):39-40.

(收稿日期:2024-03-23)

(校对编辑:赵望淇 姚丽娜)