

〔文章编号〕 1007-0893(2022)23-0057-03

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2022.23.018

# BALF mNGS 对传统培养及涂片阴性的难治性肺炎患者的病原学检查结果分析

邱振宁 黄孝云

(平潭综合实验区医院, 福建 福州 350400)

〔摘要〕 **目的:** 分析支气管肺泡灌洗液 (BALF) 宏基因组二代测序 (mNGS) 对传统培养及涂片阴性的难治性肺炎患者的病原学检查结果。**方法:** 回顾性分析 2022 年 1 月至 8 月平潭综合实验区医院收治的 30 例传统培养及涂片阴性的难治性肺炎患者的临床资料, 患者均已进行 mNGS 检查。传统培养标本为痰、血、BALF; 涂片标本为痰、BALF; mNGS 标本均为 BALF。观察并分析患者的 BALF mNGS 检查病原学结果。**结果:** mNGS 阳性 26 株 (86.67%), 阴性 4 株 (13.33%)。结核分枝杆菌 4 株 (13.33%), 诺卡菌 2 株 (7.69%), 苛养菌 8 株 (30.77%), 厌氧菌 2 株 (7.69%), 真菌 4 株 (13.33%), 不典型病原体 6 株 (23.08%)。**结论:** 传统培养及涂片阴性的难治性肺炎患者采用 BALF mNGS 进行病原学检查有较高的阳性率。

〔关键词〕 难治性肺炎; 支气管肺泡灌洗液; 宏基因组二代测序; 病原学分析

〔中图分类号〕 R 563.1 〔文献标识码〕 B

## Analysis of the Etiological Test Results of BALF mNGS in Patients with Refractory Pneumonia with Traditional Culture and Smear Negative

QIU Zhen-ning, HUANG Xiao-yun

(Pingtan Comprehensive Experimental Area Hospital, Fujian Fuzhou 350400)

〔Abstract〕 **Objective** To analyze the etiological test results of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) metagenomic next-generation sequencing (mNGS) on refractory pneumonia patients with traditional culture and smear negative. **Methods** The clinical data of 30 patients with refractory pneumonia with traditional culture and smear negative admitted to Pingtan Comprehensive Experimental Area Hospital from January to August 2022 were retrospectively analyzed. All patients had undergone mNGS examination. The traditional culture specimens were sputum, blood and BALF. The smears were sputum and BALF. All mNGS samples were BALF. The etiological results of BALF mNGS were observed and analyzed. **Results** mNGS 26 positive strains (86.67%), 4 negative strains (13.33%). 4 strains of mycobacterium tuberculosis (13.33%), 2 strains of nocardia (7.69%), 8 strains of caustic bacteria (30.77%), 2 strains of anaerobic bacteria (7.69%), 4 fungi (13.33%) and 6 strains of atypical pathogens (23.08%). **Conclusion** The traditional culture and smear negative patients with refractory pneumonia have a high positive rate of using BALF mNGS for etiological examination.

〔Keywords〕 Refractory pneumonia; Bronchoalveolar lavage fluid; Metagenomic next-generation sequencing; Etiological analysis

难治性肺炎指的是: 因为患者机体免疫力下降, 抵抗力减弱, 所以在原支原体肺炎的基础上, 可能身体会再次感染其他如细菌、病毒等病原微生物, 导致病情加重、反复, 在采取了全面、有效的措施, 如较为合理的药物应用后, 临床仍然不能获得明显疗效或理想结果的肺炎<sup>[1]</sup>。难治性肺炎的症状表现较多, 大多数患者有炎症反应及肺外并发症、发热、胸闷咳嗽等不良表现, 严重者甚至出现坏死性肺炎及胸腔积液、或者是肺栓塞、脑栓塞等

一系列病症。一直以来, 难治性肺炎都是呼吸科诊治难点, 对医师的知识及经验提出了严峻的挑战。难治性肺炎通常在排除了血管炎、风湿性相关性肺疾病、放射性肺炎、免疫性肺炎、间质性肺炎、肺恶性肿瘤、淋巴瘤后, 才考虑感染所致<sup>[2-4]</sup>, 因此加强对该病诊疗的研究有着重要的意义。为此, 本研究回顾性分析平潭综合实验区医院 2022 年 1 月至 8 月平潭综合实验区医院收治的 30 例传统培养及涂片阴性的难治性肺炎患者的临床资料, 观

〔收稿日期〕 2022 - 10 - 15

〔作者简介〕 邱振宁, 男, 副主任医师, 主要从事呼吸内科工作。

察采用支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 宏基因组二代测序 (metagenomic next-generation sequencing, mNGS) 技术对该病的病原学检查结果, 旨在为临床提供理论参考, 现报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

回顾性分析 2022 年 1 月至 8 月平潭综合实验区医院收治的 30 例传统培养及涂片阴性的难治性肺炎患者的临床资料。其中, 男性 19 例, 占比 63.33%; 女性 11 例, 占比 36.66%; 年龄 47~78 岁, 平均年龄 (59.83 ± 2.45) 岁; 肺炎病程 1~5 个月, 平均病程 (1.25 ± 0.31) 个月。本研究通过平潭综合实验区医院伦理委员会审批 (2022KY001-1)。

1.1.1 诊断标准 病情严重或病程延长, 对感染虽然采取了全面通常有效的措施 (包括应用了抗菌药物) 积极治疗, 肺炎仍无改善、迁延不愈甚至恶化, 类型包括: 无反应性肺炎、进展性肺炎、不吸收的肺炎、重症肺炎等<sup>[3]</sup>。

1.1.2 纳入标准 (1) 痰培养、血培养、BALF 培养均阴性; (2) 痰、BALF 抗酸杆菌涂片阴性。

1.1.3 排除标准 (1) 痰、血、BALF 三种标本之一培养有阳性; (2) 痰、BALF 两样本之一结核涂片阳性。

### 1.2 采样方法

1.2.1 痰培养 在采样前, 患者先进行温水漱口, 同时深咳将痰液咳出, 随后送检培养及涂片, 培养基使用血液琼脂培养基, 涂片为结核抗酸染色。

1.2.2 血培养 患者入院前未使用抗菌药物, 则及时采集静脉血; 若使用过抗菌药物, 则在寒战或刚开始发热时采集 2 套约 20 mL 静脉血, 培养瓶使用含吸附抗菌药物的活性炭。

1.2.3 BALF 经电子支气管镜对肺部病灶行肺泡灌洗, 回收液同时送检培养、涂片及 mNGS, mNGS 送阿吉安或金匙基因医学检验执行。

### 1.3 观察指标

统计患者的 BALF mNGS 病原学检查结果情况, 并进行描述性分析。

## 2 结果

30 例患者均只有一种病原菌感染, BALF mNGS 共检出阳性株 26 株, 占比 86.67% (26/30); 阴性 4 株, 占比 13.33% (4/30)。具体的阳性病原菌分布情况见表 1。

表 1 病原菌的分布情况

菌种	数量/株	占比/%
结核分枝杆菌	4	15.38
诺卡菌	2	7.69
苛养菌	8	30.77
肺炎链球菌	4	15.38
流感嗜血杆菌	4	15.38
厌氧菌	2	7.69
牙龈卟啉单胞菌	1	3.85
普雷沃氏菌	1	3.85
真菌	4	15.38
耶氏孢子菌	3	11.54
马尔尼菲青霉菌	1	3.85
不典型病原体	6	23.08
鹦鹉热衣原体	2	7.69
支原体	3	11.54
立克次	1	3.35
合计	26	100.00

## 3 讨论

难治性肺炎在临床上具有较高的发生率, 中老年男性群体更为多见, 男、女性别比一般在 2:1 左右。难治性肺炎发病率受到多种主客观因素的影响, 呈现出逐年上升和年轻化的趋势, 极大地威胁到了人们的健康乃至生命安全, 早已引起临床乃至全社会的广泛关注。鉴于难治性肺炎的反复性、严重性等特点, 临床必须高度重视该病的诊疗。然而, 在难治性肺炎的诊疗过程中, 传统血、痰培养甚至 BALF 培养及抗酸杆菌涂片常阴性, 导致病原学不明, 诊断起来存在困难, 而该病的病情的变化发展较快, 一旦未及时诊治, 危险系数极高。因此, 临床检验应进一步寻找更为科学、高效且安全的诊断方式, 以更好地满足患者诊疗的实际需求。

3.1 BALF mNGS 在传统培养及涂片阴性的难治性肺炎患者中有较高的阳性率

传统的微生物检测方法包括: (1) 直接抗原快速检测, 如咽拭子五项、尿肺炎链球菌抗原、尿军团菌抗原、G 试验、GM 试验。(2) 血清特异性抗体检测: 呼吸道病原体抗体免疫球蛋白 M (immunoglobulin M, IgM) 8 项检测等。(3) 涂片检查: 对结核、寄生虫、真菌、细菌 (吞噬微生物的白细胞) 敏感。(4) 培养。(5) 多重聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 及基因芯片。基层医院除尿肺炎链球菌、尿军团菌抗原及多重 PCR 外, 其余检测方法均有开展, 但抗体免疫学方法可靠性差, 而传统培养阳性率又比较低 (约 20%)。在难治性肺炎中, 常见的致病菌包括: 肺炎链球菌、流感嗜血杆菌, 均为苛养菌等, 培养时一般需要 5% CO<sub>2</sub> 培养箱, 然而基层医院一般性的实验室普遍未配置, 且抗菌药物使用后培养率更低。厌氧培养则需厌氧缸或厌氧袋, 或庖肉培养基, 液面封凡士林, 设备多, 操作相对复杂, 基层医院较少开展。结核及不典型病原体 (支原体、衣原体、

立克次体) 为胞内寄生, 培养营养要求更高, 实验室条件更苛刻, 培养周期长, 结核培养甚至达到 4~8 周。而 BALF mNGS 不依赖于传统的微生物培养, 直接对临床样本中的核酸进行高通量测序<sup>[5-8]</sup>, 通过与数据库中已有的微生物的核酸序列进行比对来鉴定微生物种类。

BALF mNGS 若检出霍乱、鼠疫、百日咳、类鼻疽伯克霍尔德菌、布鲁菌、结核分枝杆菌、诺卡菌属、球孢子菌、隐球菌、钩端螺旋体、寄生虫、鹦鹉热衣原体、流感病毒, 即使序列数少, 仍需考虑致病微生物<sup>[9]</sup>。BALF mNGS 诊断感染性疾病的诊断效能高于传统检测方法, 尤其对于苛养菌、厌氧菌、结核分枝杆菌复合群、诺卡菌、真菌、立克次体、衣原体优势明显, 适用于急危重症和疑难感染的诊断。这与 BALF mNGS 最新共识接近<sup>[9]</sup>。

### 3.2 提高临床诊治思维, 为难治性肺炎的经验性治疗提供借鉴

难治性肺炎的诊治最考验呼吸科医生的基础知识及临床思维。思维的提升, 需要临床的不断实践总结。既往检验医师遇到病原体常规培养阴性的难治性肺炎, 结合临床、影像, 考虑也是熟悉的病原体, 基本联合用药, 部分最后好转, 但具体哪种药物在其中起着关键性的作用并不明确, 因此无法总结临床、影像及病原学的规律。BALF mNGS 的病原学诊断, 则有助于医师提供总结规律。

难治性肺炎开始的经验性治疗基本上覆盖常见的苛养菌(肺炎链球菌、流感嗜血杆菌), 患者治疗多日后症状无好转, 且影像学有进展, 可能与细菌耐药或毒力较大有关, 抗菌药物还未完全起效, 若此时无病原学诊断, 可能导致治疗思路改变并调整药物; 而有 BALF mNGS 的及时诊断, 临床医师便有依据续用原有抗菌药物或联用敏感抗菌药物, 并治疗足够的时间。近年来, 有多篇文献报道采用 BALF mNGS 确诊鹦鹉热病株, 特别是在重症肺炎病株, 为及时诊断和调整提供了依据<sup>[10-14]</sup>。分析临床、影像及病原的关联, 不仅有助于提高临床思维, 也为经验性的治疗提供了帮助, 防止难治变重症。

### 3.3 对新项目的开展有参考意义

经过大量的 BALF mNGS 数据积累后, 临床常见病原体就一两百种, mNGS 病原谱范围明确<sup>[15]</sup>, 与多达万种的大海捞针式宏基因组比, 性价比大大提高, 每株检测费用也随之下降, 使得测序临床应用范围更广, BALF mNGS 推广成为可能。

### 3.4 BALF mNGS 的局限性

(1) BALF mNGS 检查准确的前提是检验标本的合格, 其次要排除定植、污染等情况。(2) 患者对气管镜的耐受程度、经济条件均会在一定程度上限制 BALF mNGS 的推广, 因此在该方面还有待进一步深入探究并予以更好地应对与解决。

综上所述, 传统培养及涂片阴性的难治性肺炎患者采

用 BALF mNGS 进行病原学检查有较高的阳性率。BALF mNGS 尤其对于苛养菌、厌氧菌、结核分枝杆菌复合群、诺卡菌、真菌、不典型病原体优势明显, 适用于急危重症和疑难肺部感染的诊断。

### [参考文献]

- (1) 胡成平. 拓展临床思维, 提高难治性肺炎的诊断水平 (J). 中国感染控制杂志, 2007, 6(6): 365-367.
- (2) 儿童社区获得性肺炎诊疗规范 (2019 年版) 编写审定专家组. 儿童社区获得性肺炎诊疗规范 (2019 年版) (J). 全科医学临床与教育, 2019, 17(9): 771-777.
- (3) 王宇明. 感染病学 (M). 北京: 人民卫生出版社, 2010: 520-523.
- (4) Wilmott RW, Bush A, Deterding R, et al. Kendig's disorders of the respiratory tract in children (J). 2018, 20(15): 1414-1419.
- (5) Blauwkamp TA, Thair S, Rosen MJ, et al. Analytical and clinical validation of a microbial cell-free DNA sequencing test for infectious disease (J). Nat Microbiol, 2019, 4(4): 663-674.
- (6) Gu W, Miller S, Chiu CY. Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection (J). Annu Rev Pathol, 2019, 14(2): 319-338.
- (7) Xie Y, Du J, Jin W, et al. Next generation sequencing for diagnosis of severe pneumonia: China, 2010-2018 (J). J Infect, 2019, 78(2): 158-169.
- (8) Zhang HC, Ai JW, Cui P, et al. Incremental value of metagenomic next generation sequencing for the diagnosis of suspected focal infection in adults (J). J Infect, 2019, 79(5): 419-425.
- (9) 宏基因组分析和诊断技术在急危重症感染应用专家共识组. 宏基因组分析和诊断技术在急危重症感染应用的专家共识 (J). 中华急诊医学杂志, 2019, 12(2): 151-155.
- (10) 陈蓉, 陈虹, 周敏, 等. 二代测序诊断鹦鹉热衣原体血流感染二株 (J). 中华结核和呼吸杂志, 2020, 43(9): 796-798.
- (11) 赵仁淹, 柴海娜, 郑瑞强. 病原体二代测序辅助诊断鹦鹉热衣原体重症肺炎一株 (J). 中华内科杂志, 2020, 59(12): 989-991.
- (12) Chen X, Cao K, Wei Y, et al. Metagenomic next-generation sequencing in the diagnosis of severe pneumonias caused by Chlamydia psittaci (J). Infection, 2020, 48(4): 535-542.
- (13) Zhang H, Zhan D, Chen D, et al. Next-generation sequencing diagnosis of severe pneumonia from fulminant psittacosis with multiple organ failure: a case report and literature review (J). Ann Transl Med, 2020, 8(6): 401-409.
- (14) 朱贞贞, 张宜文. 伐木工人感染鹦鹉热衣原体导致多脏器功能衰竭一例 (J). 中华临床感染病杂志, 2020, 13(3): 218-220, 227.
- (15) Li S, Tong J, Liu Y, et al. Targeted next generation sequencing is comparable with metagenomic next generation sequencing in adults with pneumonia for pathogenic microorganism detection (J). Journal of Infection, 2022, 15(6): 2610-2615.