

• 临床研究 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2025.04.027
网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20250115.1658.010\(2025-01-15\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20250115.1658.010(2025-01-15))

支气管肺泡灌洗液宏基因组二代测序在老年重症肺炎中的应用价值

宋爱琳,赵春刚[△],柳 颖,曹昌萌,宁书蔚
(大连市友谊医院老年医学中心,辽宁大连 116001)

[摘要] **目的** 研究支气管肺泡灌洗液(BALF)宏基因组二代测序(mNGS)在老年重症肺炎中的应用价值。**方法** 选取 2024 年 1—8 月该院重症病房收治的老年重症肺炎患者 48 例,按照随机数字表法将其分为观察组及对照组,每组 24 例。对照组和观察组均在入住 ICU 24 h 内留取 BALF,结合影像学检查选择病变最明显的部位进行灌洗。对照组标本于该院行传统培养;观察组一份标本外送基因检测机构行 mNGS 检测,另一份标本于该院行传统培养。比较观察组 mNGS 与同组传统培养、对照组的检测结果,病原体分布情况,患者入住 ICU 第 4、7 天的感染指标,预后情况。**结果** 观察组 mNGS 检测阳性标本率、2 种以上病原体标本率均高于同组传统培养和对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。除鲍曼不动杆菌、白色念珠菌、光滑假丝酵母菌、植生拉乌尔菌外,观察组在真菌、病毒及少见病原体方面的检出量高于对照组。入住 ICU 后第 4、7 天,观察组体温、WBC、C 反应蛋白、降钙素原水平均低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。观察组 ICU 住院时间、机械通气时间短于对照组,住院费用少于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** BALF mNGS 有助于早期明确混合病原体和少见病原体,提高阳性检测率、拓宽微生物的范围且缩短检测时间。

[关键词] 支气管肺泡灌洗液;肺炎;宏基因组学;老年患者

[中图法分类号] R563 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2025)04-0944-05

The application value of metagenomic next-generation sequencing of bronchoalveolar lavage fluid in severe pneumonia in the elderly

SONG Ailin, ZHAO Chungang[△], LIU Ying, CAO Changmeng, NING Shuwei
(Geriatric Medicine Center, Dalian Friendship Hospital, Dalian, Liaoning 116001, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the application value of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) metagenomic next-generation sequencing (mNGS) in elderly patients with severe pneumonia. **Methods** A total of 48 elderly patients with severe pneumonia admitted to the intensive care unit from January to August 2024 were selected and randomly divided into an observation group and a control group, with 24 patients in each group. BALF samples were collected within 24 hours of ICU admission from both groups, with lavage performed at the most radiologically evident lesion site. The control group underwent traditional culture at the hospital, while the observation group had one specimen sent for mNGS testing and another specimen subjected to traditional culture at the hospital. Comparison of detection results between mNGS and traditional culture in the observation group, pathogen distribution, infection markers (on days 4 and 7 of ICU admission), and prognostic outcomes were compared between the groups. **Results** The observation group showed higher positive detection rates and higher rates of detecting ≥ 2 pathogens by mNGS compared to both traditional culture in the same group and the control group ($P<0.05$). Excluding *Acinetobacter baumannii*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Raoultella planticola*, the observation group detected higher quantities of fungi, viruses, and rare pathogens than the control group. On days 4 and 7 of ICU admission, the observation group had significantly lower body temperature, white blood cell count, C reactive protein, and procalcitonin levels compared to the control group ($P<0.05$). The observation group also demonstrated shorter ICU stays, reduced mechanical ventilation duration, and total lower hospitalization costs than the control group ($P<0.05$). **Conclusion** BALF mNGS facilitates early identification of mixed and rare pathogens, improves detection rates, broadens microbial

[△] 通信作者, E-mail: spin5214@hotmail.com。

coverage, and shortens testing time.

[Key words] bronchoalveolar lavage fluid; pneumonia; metagenomics; elderly patients

老年重症肺炎患者的病情复杂,病程进展迅速,累及多个系统,容易发展成急性呼吸窘迫综合征、呼吸衰竭,病死率居高不下。如何在综合支持治疗的基础上快速寻找有效病原体并予以针对性抗感染治疗仍然是关键问题。传统的病原学检测在灵敏度、特异度、时效性方面存在局限性,较难快速识别未知或者罕见的病原微生物。宏基因组二代测序(metagenomics next generation sequencing, mNGS)是一种新兴的检测手段,具有覆盖广、检测时间短、测序结果准确等优点,可以无偏移地检测标本中潜在的病原体,弥补传统检测手段的不足^[1-2]。随着人口老龄化的加剧,老年重症肺炎的发病率也在急剧升高^[3]。本研究主要针对这一特殊群体应用支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF) mNGS 检测病原体,快速达到精准治疗,动态对比感染指标变化,以期提高治疗效果,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2024 年 1—8 月本院重症病房收治的老年重症肺炎患者 48 例,按照随机数字表法将其分为观察组及对照组,每组 24 例。两组患者一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性,见表 1。纳入标准:(1)年龄 ≥ 65 岁;(2)符合重症肺炎诊断标准^[4],主要标准符合 1 项或次要标准符合 ≥ 3 项;(3)能够留取 BALF。排除标准:(1)患有心力衰竭、肿瘤、免疫相关的肺部病变;(2)7 d 内放弃治疗或要求出院;(3)不能耐受支气管镜检查。重症肺炎诊断主要标准:(1)需要气管插管行机械通气治疗;(2)脓毒性休克后经积极液体复苏,仍需要血管活性药物治疗。重症肺炎诊断次要标准:(1)呼吸频率 >30 次/min;(2)氧合指数 <250 mmHg;(3)多肺叶浸润;(4)意识障碍和(或)定向障碍;(5)血尿素氮 >7.14 mmol/L;(6)收缩压 <90 mmHg,需要积极进行液体复苏。本研究经本院医学伦理委员会批准(审批号:LL-2024-016),患者均知情同意。

表 1 患者一般资料比较

项目	观察组($n=24$)	对照组($n=24$)	$\chi^2/t/Z$	P
性别(男/女, n/n)	17/7	16/8	0.097	0.755
年龄($\bar{x}\pm s$, 岁)	74.96 $\pm$ 8.59	74.04 $\pm$ 10.60	2.934	0.093
平均动脉压($\bar{x}\pm s$, mmHg)	97.22 $\pm$ 21.74	96.20 $\pm$ 16.52	0.796	0.377
体温[$M(Q_1, Q_3)$, $^{\circ}C$]	36.50(36.00, 38.50)	36.60(36.00, 37.50)	-0.031	0.975
WBC($\bar{x}\pm s$, $\times 10^9/L$)	9.17 $\pm$ 2.85	9.14 $\pm$ 4.39	3.572	0.065
PLT[$M(Q_1, Q_3)$, $\times 10^9/L$]	186.55(48.00, 449.00)	155.50(29.00, 473.00)	-1.134	0.257
C 反应蛋白[$M(Q_1, Q_3)$, mg/L]	103.27(5.07, 237.00)	105.22(7.29, 318.00)	-1.155	0.248
降钙素原[$M(Q_1, Q_3)$, ng/mL]	0.23(0.02, 44.14)	0.22(0.02, 5.01)	-0.650	0.516
氧分压[$M(Q_1, Q_3)$, mmHg]	58.50(41.00, 92.00)	64.00(43.00, 172.00)	-1.011	0.312
APACHE II ($\bar{x}\pm s$, 分)	18.083 $\pm$ 5.679	19.917 $\pm$ 7.717	0.743	0.393
CURB65[$M(Q_1, Q_3)$, 分]	5.00(4.00, 5.00)	5.00(5.00, 5.00)	-1.607	0.108
SOFA($\bar{x}\pm s$, 分)	8.71 $\pm$ 1.90	8.67 $\pm$ 1.31	1.879	0.177
心脑血管病(n)	6	7	0.105	0.745
慢性肾病(n)	1	2	<0.001	>0.999

APACHE II:急性生理与慢性健康评估 II; CURB65:意识障碍(C)、尿素氮 >7 mmol/L(U)、呼吸 ≥ 30 次/min(R)、收缩压 <90 mmHg 和舒张压 ≤ 60 mmHg(B)、年龄 ≥ 65 岁的合并评分; SOFA:序贯器官衰竭评估。

1.2 方法

1.2.1 治疗与检查方法

对照组和观察组均在入住 ICU 24 h 内留取 BALF,结合影像学检查选择病变最明显的部位进行灌洗。支气管镜头端置于目标灌洗肺段后,使用 0.9%生理盐水通过气管镜操作孔快速注入 30~40

mL,回收液体到标本瓶中。对照组标本于本院行传统培养;观察组一份标本外送基因检测机制行 mNGS 检测,检测项目为送检标本的 DNA 测序+RNA 测序(包括细菌、真菌、分枝杆菌、病毒),另一份标本于本院行传统培养。mNGS 检测结果反馈时间 <24 h,本院传统培养反馈时间为 3~4 d。对照组依据 BALF

传统培养结果调整抗菌药物使用情况,观察组依据 mNGS 结果调整抗菌药物使用情况,待 BALF 传统培养回报结果后再次综合调整抗菌药物使用情况。患者入 ICU 1 h 内予经验性抗感染治疗,支持治疗方案无差异。

1.2.2 mNGS 检测程序

mNGS 检测由沈阳金域医学检验所有限公司完成。标本采集后当天冷藏运输回实验室。取 1.3 mL 混匀后的标本加入已编号的离心管中,12 000 r/min 离心 5 min,将各标本管内上层液体弃 700 μ L,并将离心管内剩余吹打混匀,取混匀后的 500 μ L 富集标本和 50 μ L 的十二烷基硫酸钠加入研磨管进行生物化学及物理破壁,取破壁后的 200 μ L 标本进行全自动核酸提取。提取后使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit 测定核酸浓度,通过核酸浓度测定后分别进行逆转录和 目标区域富集,对目标区域富集的 PCR 产物进行纯化,将第一轮纯化后的 PCR 产物加入文库扩增体系。将扩增后的文库进行第二轮纯化,纯化后的文库使用 dsDNA HS Assay Kit 测定文库浓度。文库池化后使用 dsDNA HS Assay Kit 测定其浓度,使用全自动核酸蛋白分析仪(Qsep100,光鼎生物科技股份有限公司)检测文库片段大小。质量控制合格后使用 KM MiniSeqDx-CN 测序仪(广州市金圻睿生物科技有限责任公司)上机测序。使用《病原微生物数据分析管理系统》进行自动分析。数据质量要求:Q30 $\geq$ 75%,最低有效数据量 $\geq$ 50 kbp,内参基因扩增 reads 数 $\geq$ 200。对符合质量要求的结果进行判断,如果该病原体存在至少 1 个靶标的均一化 reads 数 $\geq$ 20,则判断该病原体为阳性,反之则判断为阴性。本研究中检测病原体包含 80 种细菌、32 种真菌、79 种病毒和 7 种其他支原体/衣原体。

1.2.3 观察指标

(1)比较观察组 mNGS 与同组传统培养、对照组的检测结果,包括病原体检测阳性标本率、2 种以上病原体检测率。(2)比较两组病原体分布情况。(3)比较两组患者入住 ICU 第 4、7 天的感染指标(包括体温、WBC、C 反应蛋白、降钙素原)。(4)比较两组预后情况,包括 ICU 住院时间、机械通气时间、住院费用。

1.3 统计学处理

采用 SPSS27.0 软件进行数据分析。符合正态分布和方差齐性检验的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。不符合正态分布和方差齐性的计量资料以 $M(Q_1,Q_3)$ 表示,组间比较采用秩和检验。计数资料以例数或百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组 BALF 检测结果比较

观察组 mNGS 检测阳性标本率、2 种以上病原体标本率均高于同组传统培养 and 对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 两组 BALF 检测结果比较[n(%)]

项目	观察组($n=24$)		对照组($n=24$)
	mNGS	传统培养	
阳性标本	24(100.0) ^{ab}	5(20.8)	14(58.3)
2 种以上病原体标本	19(79.2) ^{ab}	0	9(37.5)

^a: $P<0.05$,与同组传统培养比较;^b: $P<0.05$,与对照组比较。

2.2 两组病原体检出情况比较

观察组中检出量最高的细菌为金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌,检出率最高的真菌为白色念珠菌,检出率最高的病毒为人类疱疹病毒;对照组中检出率最高的细菌为鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌,检出率最高的真菌为白色念珠菌,未检出病毒;除鲍曼不动杆菌、白色念珠菌、光滑假丝酵母菌、植生拉乌尔菌外,观察组在真菌、病毒及少见病原体方面的检出量高于对照组,见图 1。

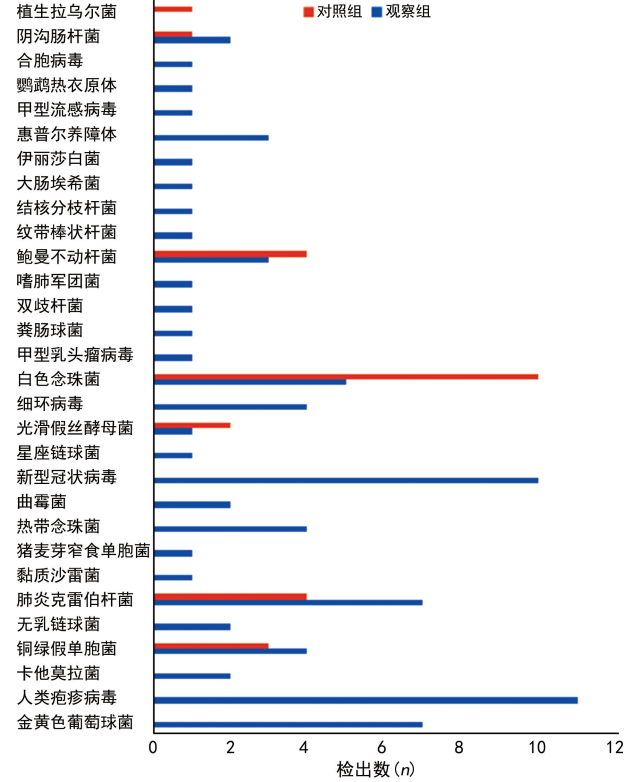


图 1 观察组 mNGS 与对照组传统培养病原体检出情况比较

2.3 两组入住 ICU 后第 4、7 天感染指标比较
入住 ICU 后第 4、7 天,观察组体温、WBC、C 反应蛋白、降钙素原水平均低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3、4。

2.4 两组住院相关情况比较

观察组 ICU 住院时间、机械通气时间短于对照组,住院费用少于对照组,差异有统计学意义($P<$

0.05),见表 5。

表 3 两组入住 ICU 后第 4 天感染指标比较

项目	观察组(<i>n</i> =24)	对照组(<i>n</i> =24)	<i>t</i> / <i>Z</i>	<i>P</i>
体温($\bar{x}\pm s$,℃)	36.55±0.20	36.76±0.45	−2.089	0.042
WBC($\bar{x}\pm s$,×10 ⁹ /L)	9.52±3.66	13.56±6.75	−12.862	<0.001
C 反应蛋白($\bar{x}\pm s$,mg/L)	46.70±38.41	64.05±58.03	4.498	0.039
降钙素原[<i>M</i> (<i>Q</i> ₁ , <i>Q</i> ₃),ng/mL]	0.17(0.05,0.71)	0.65(0.19,5.03)	−2.542	0.010

表 4 两组入住 ICU 后第 7 天感染指标比较

项目	观察组(<i>n</i> =24)	对照组(<i>n</i> =24)	<i>t</i> / <i>Z</i>	<i>P</i>
体温($\bar{x}\pm s$,℃)	36.44±0.22	36.85±0.45	−15.128	<0.001
WBC($\bar{x}\pm s$,×10 ⁹ /L)	9.11±2.88	13.92±6.57	−12.862	<0.001
C 反应蛋白($\bar{x}\pm s$,mg/L)	42.83±31.48	68.80±55.60	−6.951	0.010
降钙素原[<i>M</i> (<i>Q</i> ₁ , <i>Q</i> ₃),ng/mL]	0.13(0.06,0.30)	1.05(0.45,5.46)	−3.848	<0.001

表 5 两组住院相关情况比较

项目	观察组(<i>n</i> =24)	对照组(<i>n</i> =24)	<i>t</i> / <i>Z</i>	<i>P</i>
ICU 住院时间[<i>M</i> (<i>Q</i> ₁ , <i>Q</i> ₃),d]	12(2,30)	17(5,42)	−2.023	0.043
机械通气时间($\bar{x}\pm s$,d)	7.417±2.185	11.167±3.656	5.940	0.019
住院费用[<i>M</i> (<i>Q</i> ₁ , <i>Q</i> ₃),元]	52 494(23 474,307 893)	143 909(25 861,358 340)	1.969	0.049

3 讨 论

老年重症肺炎患者病情隐匿且进展迅速,临床表现不典型,常无明显咳嗽、咳痰、发热、胸痛等症状,且由于老年患者全身和呼吸道局部的防御和免疫功能降低,心、肺、肝、肾等重要脏器的功能储备减弱,导致随时可能出现急性呼吸窘迫综合征、脓毒症甚至多脏器损伤,治疗难度大,预后差,给临床诊断及治疗带来诸多挑战^[5-6]。细菌感染、支原体感染、过敏或免疫损伤等都有可能 导致重症肺炎^[7],而有时传统病原体培养结果显示阴性让临床医生难以判断,耽误最佳诊疗时机,因此,临床早期确定患者病原体感染类型有利于加强用药针对性和安全性,提高患者病情控制效果,改善患者预后质量^[8-9]。目前,临床常见的检测方法包括涂片检测、传统培养、呼吸道病原抗体谱等,但临床诊出率较低。研究发现,mNGS 技术在病原检测中具有重要意义,能够通过宏基因组核酸序列分析病原体基因信息,快速得到患者病原体情况,节省病情诊断时间,提高病情诊断准确率,具有较高的临床应用价值^[10-13]。

老年重症肺炎患者可能存在多个接触多重耐药性病原体的危险因素^[14],例如患有多种基础病、免疫力低下、不合理用药等^[15]。有研究表明,老年重症肺炎患者存在较大比例的耐药菌群感染现象,这也成为该种疾病治疗难度高的主要原因^[16]。mNGS 不受抗

菌药物使用影响,能够有效检测出传统培养阴性病例的病原体^[17-18],且 mNGS 通过比较不同病原的相对序列数,筛选出可能的致病菌,早期识别混合感染、罕见病原体及新型病原体^[19-21]。本研究观察组中 mNGS 阳性检测率 100.0%,2 种以上病原体检测率 79.2%,高于同组传统培养及对照组检测结果,且观察组较对照组检测出更多种类的病原微生物,能大大提高临床抗感染治疗效率。

FERRER 等^[22]对 17 990 例脓毒症患者进行研究,发现从诊断脓毒症后第 1~6 小时,抗菌药物使用每延迟 1 h,病死率呈线性增加。有研究显示,重症肺炎在脓毒症中占比最高^[23]。老年患者存在高龄、身体功能衰退、免疫力差、能力不足、合并多种基础疾病等情况,在此情况下出现肺炎,可能因临床症状不典型而诱发误诊或漏诊,致使治疗时机延误,影响预后^[24]。因此,针对老年重症肺炎患者,病原体的尽早认定可以帮助临床医生尽早、合理地优化抗菌药物使用方案^[25-26],而抗菌药物方案应用 3 d 后即可体现其有效性^[27]。本研究纳入 48 例符合标准的老年重症肺炎患者,观察组治疗第 4、7 天的体温、WBC、C 反应蛋白、降钙素原低于对照组,提示尽早对老年重症肺炎患者行 mNGS 检测寻找责任病原体,能实现早期精准抗感染治疗,改善预后。

老年重症肺炎患者诊治困难、病情迁延不愈,随

着病程进展常常合并多种并发症,病死率极高,给临床医生带来极大挑战,也给患者家庭带来沉重的经济负担^[28-30],本研究结果显示,早期行 BALF mNGS 检测,及时精确调整抗菌药物方案,患者住院时间、机械通气时间短于对照组,住院费用少于对照组,提示了 mNGS 技术早期鉴定感染病原体的必要性。综上所述,BALF mNGS 有助于早期明确混合病原体 and 少见病原体,提高阳性检测率、拓宽微生物的范围且缩短检测时间,将会为临床医生对于老年重症肺炎患者实现早期精准抗感染治疗、争取更多治疗时间提供有力帮助。

参考文献

- [1] 钟珊,杨明华. 宏基因组二代测序在儿童血液肿瘤合并感染中的应用[J]. 中国当代儿科杂志, 2023,25(7):718-725.
- [2] HAN D, LIZ, LI R, et al. mNGS in clinical microbiology laboratories: on the road to maturity [J]. Crit Rev Microbiol, 2019, 45(5): 668-685.
- [3] 张晓曦, 王国兴. 老年重症肺炎继发脓毒性休克患者预后不良危险因素分析[J]. 中国医刊, 2024, 59(3): 333-336.
- [4] 中华医学会. 中国成人社区获得性肺炎诊断和治疗指南(2016 版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2016, 39(4): 253-279.
- [5] 王亮亮, 王凯, 曹继飞, 等. 两种抗感染药物治疗重症肺炎的效果及炎症因子水平预后比较[J]. 河北医学, 2024, 30(1): 153-157.
- [6] 陈晓珊, 李希, 杨荀. 影响老年重症肺炎合并急性呼吸衰竭预后的危险因素分析[J]. 实用老年医学, 2019, 33(11): 1117-1120.
- [7] MICHELET R, URSINO S, BOULET S, et al. The use of translational modelling and simulation to develop immunomodulatory therapy as an adjunct to antibiotic treatment in the context of pneumonia[J]. Pharmaceutics, 2021, 13(5): 601.
- [8] 潘春熹, 吕立文. 基于宏基因组的二代测序技术在重症肺炎患者病原体快速检测中的应用价值探讨[J]. 中国临床新医学, 2020, 13(4): 370-373.
- [9] 周永召, 李亚伦, 范红, 等. 临床宏基因组学在呼吸感染性疾病精准诊疗中的疑问解析[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2018, 3(6): 539-543.
- [10] 陈涔, 李园园, 潘频华, 等. 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, 2020, 19(4): 335-340.
- [11] 张彩霞, 刘新年, 杜川, 等. mNGS 技术和血清 G 试验在判断耶氏肺孢子菌感染与定植中的价值及二者相关性研究[J]. 中国全科医学, 2023, 26(11): 1355-1360.
- [12] 程长昆, 姜长舟. 宏基因组二代测序在下呼吸道感染患者支气管肺泡灌洗液液中的病原学诊断价值[J]. 安徽医学, 2024, 45(3): 326-330.
- [13] 陈佳怡, 梁晓, 夏铨冬, 等. 宏基因组二代测序在非 HIV 感染型肺孢子菌肺炎中的应用研究[J]. 重庆医学, 2023, 52(1): 91-96.
- [14] ALIBERTI S, DI PASQUALE M, ZANABONI A M, et al. Stratifying risk factors for multi-drug-resistant pathogens in hospitalized patients coming from the community with pneumonia[J]. Clin Infect Dis, 2012, 54: 470-478.
- [15] 熊丽荣, 李海明, 方海川, 等. 老年重症肺炎多耐药菌感染临床特点及头孢哌酮/舒巴坦联合胸腺肽 a1 的治疗效果[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(10): 1474-1478.
- [16] 谢仁女, 王娟, 郑云威, 等. 老年重症肺炎病原菌及其影响因素[J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 31(6): 842-846.
- [17] WANG Q, WU B, YANG D L, et al. Optimal specimen type for accurate diagnosis of infectious peripheral pulmonary lesions by mNGS [J]. BMC Pulm Med, 2020, 20(1): 268.
- [18] 钮月英, 吴晓虹, 应可净. 肺泡灌洗液宏基因组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.
- [19] MIAO Q, MAY Y, WANG Q Q, et al. Microbiological diagnostic performance of metagenomic next-generation sequencing when applied to clinical practice [J]. Clin Infect Dis, 2018, 67 (Suppl. 2): 231-240.
- [20] VANRIJIN A L, VAN BOHEEMEN S, SIDOROV I, et al. The respiratory virome and exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. PLoS One, 2019, 14 (10): e0223952.
- [21] ZOU X H, TANG G P, ZHAO X, et al. Simultaneous virus identification and characterization of severe unexplained pneumonia cases using a metagenomics sequencing technique [J]. Sci China Life Sci, 2017, 60(3): 279-286.
- [22] FERRER R, MARTIN-LOECHES I, PHILLIPS G, et al. Empiric antibiotic (下转第 953 页)