

基于宏基因组二代测序的 ICU 感染性疾病患者病原体分布

吴越^{1,2}, 卓惠长^{1,2}, 杨火保³, 陈存荣⁴, 尤彦菁⁵, 李红艳⁶, 王庆⁷, 林峰⁸

摘要: **目的** 基于宏基因组二代测序(mNGS)数据,分析重症监护室(ICU)感染性疾病患者的病原体分布情况,为临床抗感染治疗提供依据。**方法** 回顾性分析 7 所综合性三甲医院 ICU 感染性疾病标本的 mNGS 报告结果,探讨 ICU 病原体分布情况。**结果** 收集 1 083 份感染性疾病标本的 mNGS 报告,总体检出率为 85.50%。病原体种类 172 种,病原体例数 1 334 例,检出的细菌的种类和数量最多,其次为病毒。革兰阴性菌例数(60.29%)较革兰阳性菌(39.71%)多,检出数前 3 位的革兰阴性菌为肺炎克雷伯菌(114 例,22.75%)、鲍曼不动杆菌(78 例,15.57%)和铜绿假单胞菌(66 例,13.17%);革兰阳性菌为屎肠球菌(68 例,20.61%)、纹带棒状杆菌(46 例,13.94%)和金黄色葡萄球菌(31 例,9.39%)。检出数前 3 位的真菌为白色念珠菌(79 例,40.51%)、耶氏肺孢子菌(32 例,16.41%)和近平滑念珠菌(16 例,8.21%)。DNA 病毒为主要的检出病毒,检出数前 3 位为巨细胞病毒(71 例,27.52%)、人疱疹病毒 1 型(62 例,24.03%)和 EB 病毒(57 例,22.09%);RNA 病毒中检出数前 3 位为 HpgV 病毒(13 例,43.33%)、人冠状病毒 229E 型(4 例,13.33%)、鼻病毒(3 例,10.00%)和人冠状病毒 HKU1 型(3 例,10.00%)。在不典型病原体中,鹦鹉热衣原体检出率最高(11 例,55.00%)。**结论** 革兰阴性菌是 ICU 感染性疾病患者的主要病原体,其次为病毒。动态监测 ICU 病原体分布情况有助于制定合理有效的抗感染治疗策略。

关键词: 宏基因组二代测序;重症监护室;病原体分布

文献标志码: A **文章编号:** 1672-4194(2024)01-0044-08

近年来,埃博拉病毒引起的埃博拉出血热、中东呼吸综合征冠状病毒引起的中东呼吸综合征和新型冠状病毒引起的新型冠状病毒感染等新发传染病在世界范围内频现,给人类的生命、财产和健康带来巨大危害,逐步成为全球公共卫生领域关注的焦点^[1]。同时,一些早该绝迹的传染病如麻疹等,亦有卷土重来的迹象^[2]。目前检测病原体的方法日臻成熟,如病原微生物培养、血清病原体特定抗原抗体检测^[3]、涂片染色镜检和特定病原体的多重聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术^[4]等,但这些传统检测方法存在培养周期长、检测灵敏度低或特异性差等局限性^[5],特别是面对新发传染病的病原体,传统的检测方法难以快速、准确地提供病原学

证据,进而导致疾病周期延长,经济负担加重,甚至造成重大公共卫生事件等不良后果。因此,如何迅速精确地获得病原学证据,成为控制疾病蔓延至关重要的一环。宏基因组二代测序(metagenomics next generation sequencing, mNGS)技术为新型的病原体检测手段,通过对标本中基因片段进行高通量测序,获得病原微生物的遗传信息,具有快速、敏感度高、覆盖范围广且无偏倚的优势^[6-7],已广泛应用于各种感染性疾病的诊疗,尤其是难以通过常规实验室检测确诊的疑难及危重疾病,可在不明原因感染的诊治中起到重要作用。本研究拟通过分析福州地区 7 所综合性三甲医院重症监护室(intensive care unit, ICU)的 1 083 份感染性疾病标本的 mNGS 报告结果,探讨 ICU 病原体的分布情况。

1 对象与方法

1.1 对象 选取 2020 年 7 月 8 日—2021 年 4 月 30 日福州地区 7 所综合性三甲医院 ICU 的感染性疾病患者 1 083 例为研究对象,收集其临床资料,包括住院号、姓名、性别和诊断等。纳入标准:(1)年龄≥18 岁;(2)符合感染性疾病(包括肺部感染、泌尿系感染、腹腔或肠道感染、中枢神经系统感染和血流感染)的诊断标准;(3)确诊感染性疾病 24 h 内留取样本进行二代测序检验。排除标准:(1)入科后 24 h 内自动出院或死亡的患者;(2)样品受到污染;(3)病例数据不全。本研究经福建医科大学附属第一医院

收稿日期: 2023-08-12

资助项目: 福建省自然科学基金项目(2020J01963)

作者单位: 1. 福建医科大学 附属第一医院重症医学科, 福州 350005;

2. 福建医科大学 附属第一医院滨海院区国家区域医疗中心重症医学科, 福州 350212;

3. 福建省立医院 重症医学二科, 福州 350001;

4. 福建医科大学 附属协和医院重症医学科, 福州 350001;

5. 中国人民解放军联勤保障部队第九〇〇医院 呼吸与危重症医学科, 福州 350001;

6. 福建中医药大学 附属人民医院呼吸科, 福州 350004;

7. 福建中医药大学 附属第三人民医院呼吸科, 福州 350108;

8. 福建医科大学 附属福州市第一医院重症医学科, 福州 350009

作者简介: 吴越,男,主治医师,医学硕士

通信作者: 卓惠长, Email: 41266371@qq.com

伦理委员会批准(闽医大附一伦理医研〔2020〕197号),所有患者均签署自费外送 mNGS 检测(北京博奥医学检验所有限公司)的知情同意书。

1.2 主要仪器和试剂 DNA 提取试剂盒(1901)、RNA 提取试剂盒(1907)、DNA 检测试剂盒(2012B)和 RNA 检测试剂盒(1906R-02)(天津金匙医学公司);Agilent2100 生物分析仪(Agilent Technologies,美国 Santa Clara 公司);MGISEQ-2000 测序仪(深圳华大智造公司)。

1.3 样本采集与储存 根据不同的感染性疾病诊断,于确诊后分别取样。肺部感染患者根据病情轻重,能自助咳痰的留取痰液标本,其他留取肺泡灌洗液标本;泌尿系感染患者留取尿液标本;腹腔或肠道感染患者留取腹水或粪便标本;炎性胸水患者留取胸水标本;中枢神经系统感染患者留取脑脊液标本;血流感染患者留取血液标本。标本取样量分别为肺泡灌洗液、尿液和粪便 5 mL,痰液和胸腹水 1 mL,脑脊液 2 mL,血液 4 mL。标本采集后均立即置于 4℃ 冷藏,并于 24 h 内送至测序中心。

1.4 mNGS 检测方法 将血液离心后提取核酸(脑脊液、肺泡灌洗液等样本需先破壁),使用病原微生物检测试剂盒进行片段化、一链合成、二链合成、接头连接、PCR 扩增和磁珠分选。通过文库质控测定 DNA/RNA 文库浓度后进行上机测序,测序长度 SE50,测序数据量不低于 3.5×10^7 Reads,得到高通量原始数据。将原始数据过滤掉低质量、低复杂度和长度较短的序列,去除人的参考基因组序列后得到高质量测序数据,与微生物基因组数据库进行比对,对微生物进行鉴定^[8-10]。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,计数资料采用 $n(\%)$ 表示。

2 结 果

2.1 标本病原体分布总体情况 共收集 1 083 份感染性疾病标本的 mNGS 报告,其中肺泡灌洗液 500 份(46.17%),血液 340 份(31.39%),脑脊液 67 份(6.19%),痰液 104 份(9.60%),胸水 24 份(2.22%),腹水 23 份(2.12%),尿液 21 份(1.94%),粪便 4 份(0.37%)。1 083 份标本中,阴性标本共 157 份,总体阳性检出率为 85.50%。检出病原体种类共 172 种,病原体例数 1 334 例,其中细菌种类 112 种(65.12%),例数 831 例(62.29%);真菌种类 22 种(12.79%),例数 195 例(14.62%);病毒种类 30 种(17.44%),例数 288 例(21.59%);其他病原体(支原体、衣原体、寄生虫、不

典型病原菌)种类 8 种(4.65%),例数 20 例(1.50%)。

2.1.1 细菌分布 在检出的细菌中,革兰阴性菌的种类和例数均较革兰阳性菌多。112 种细菌中,革兰阴性菌 57 种(50.89%),革兰阳性菌 55 种(49.11%);检出的 831 例细菌中,革兰阴性菌 501 例(60.29%),革兰阳性菌 330 例(39.71%)。其中,检出数前 3 位的革兰阴性菌为肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌;检出数前 3 位的革兰阳性菌为屎肠球菌、纹带棒状杆菌和金黄色葡萄球菌(表 1)。

表 1 检出的细菌菌种分布
Tab. 1 Distribution of detected bacteria

革兰阴性菌		革兰阳性菌	
菌株	$n(\%)$	菌株	$n(\%)$
肺炎克雷伯菌	114(22.75)	屎肠球菌	68(20.61)
鲍曼不动杆菌	78(15.57)	纹带棒状杆菌	46(13.94)
铜绿假单胞菌	66(13.17)	金黄色葡萄球菌	31(9.39)
嗜麦芽窄食单胞菌	48(9.58)	粪肠球菌	25(7.58)
大肠埃希菌	35(6.99)	肺炎链球菌	21(6.36)
流感嗜血杆菌	20(3.99)	结核分枝杆菌	20(6.06)
按蚊伊丽莎白菌	9(1.80)	表皮葡萄球菌	19(5.76)
少动鞘氨醇单胞菌	9(1.80)	溶血葡萄球菌	13(3.94)
多噬伯克霍尔德菌	7(1.39)	缓症链球菌	5(1.52)
卡他莫拉菌	7(1.39)	惠普尔养障体	5(1.52)
脆弱拟杆菌	6(1.19)	产气荚膜梭菌	4(1.21)
产吡啶黄杆菌	5(1.00)	大芬戈尔德菌	4(1.21)
肠炎沙门菌	5(1.00)	鸟肠球菌	4(1.21)
多噬伯克霍尔德菌	5(1.00)	脓肿分枝杆菌	4(1.21)
嗜肺军团菌	5(1.00)	头状葡萄球菌	4(1.21)
洋葱伯克霍尔德菌	5(1.00)	其他	57(17.27)
幽门螺杆菌	5(1.00)		
产气克雷伯菌	4(0.80)		
摩氏摩根菌	4(0.80)		
皮氏罗尔斯顿菌	4(0.80)		
奇异变形杆菌	4(0.80)		
医院不动杆菌	4(0.80)		
其他	52(10.38)		

2.1.2 真菌分布 共检出 195 例、22 种真菌样本,检出数前 3 位为白色念珠菌、耶氏肺孢子菌和近平滑念珠菌(表 2)。

2.1.3 病毒分布 在收集的标本中,主要检出病毒为 DNA 病毒,共检出 20 种、258 例,检出数前 3 位为巨细胞病毒、人疱疹病毒 1 型和 EB 病毒;检出 RNA 病毒 10 种、30 例,检出数前 3 位为 Human pegivirus 病毒(HpgV 病毒)、人冠状病毒 229E 型、鼻病毒和人冠状病毒 HKU1 型(表 3)。

表 2 检出的真菌菌种分布

Tab. 2 Distribution of detectedfungi	
菌株	n(%)
白色念珠菌	79(40.51)
耶氏肺孢子菌	32(16.41)
近平滑念珠菌	16(8.21)
热带念珠菌	15(7.69)
光滑念珠菌	12(6.15)
新型隐球菌	7(3.59)
烟曲霉	7(3.59)
黄曲霉	4(2.05)
其他	23(11.80)

表 3 检出的病毒种类分布

Tab. 3 Distribution of detectedviruses

DNA 病毒		RNA 病毒	
菌株	n(%)	菌株	n(%)
巨细胞病毒	71(27.52)	HpgV 病毒	13(43.33)
人疱疹病毒 1 型	62(24.03)	人冠状病毒 229E 型	4(13.33)
EB 病毒	57(22.09)	鼻病毒	3(10.00)
BK 病毒	18(6.98)	人冠状病毒 HKU1 型	3(10.00)
乙型肝炎病毒	14(5.43)	人副流感病毒 3 型	2(6.67)
人细小病毒 B19 型	6(2.32)	其他	5(16.67)
水痘-带状疱疹	5(1.94)		
人疱疹病毒 7 型	5(1.94)		
人类腺病毒 A	4(1.55)		
其他	16(6.20)		

2.1.4 其他病原体分布 检出的其他病原体有衣原体(2 种,12 例),支原体(2 种,4 例),寄生虫(2 种,2 例)和不典型病原菌(2 种,2 例),其中鹦鹉热衣原体检出数最高(表 4)。

表 4 检出的其他病原体种类分布

Tab. 4 Distribution of other pathogens detected		
种类	病原体	n(%)
衣原体	鹦鹉热衣原体	11(55.00)
	流产衣原体	1(5.00)
支原体	Mycoplasma amphoriforme	2(10.00)
	人型支原体	2(10.00)
寄生虫	福氏耐格里阿米巴	1(5.00)
	棘球绦虫	1(5.00)
不典型病原菌	猫立克次体	1(5.00)
	恙虫病东方体	1(5.00)

2.2 不同标本病原体分布情况 在肺泡灌洗液、血液、脑脊液、痰液、胸水、腹水、尿液和粪便 8 种不同

类型的标本中,检出的病原体的种类和例数均有所差异。细菌的种类和例数在不同类型的标本中均居首位,其次是病毒和真菌,但占比在各种类型间有所差异(图 1~2)。

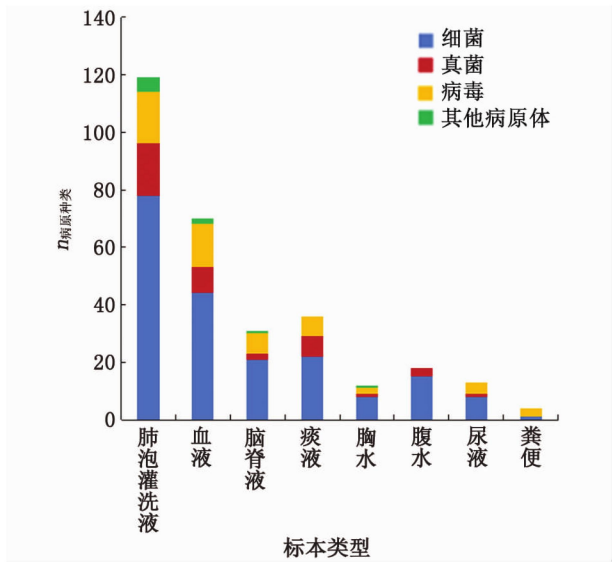


图 1 不同标本检出病原种类分布图

Fig. 1 Distribution map of pathogenic species detected in different specimens

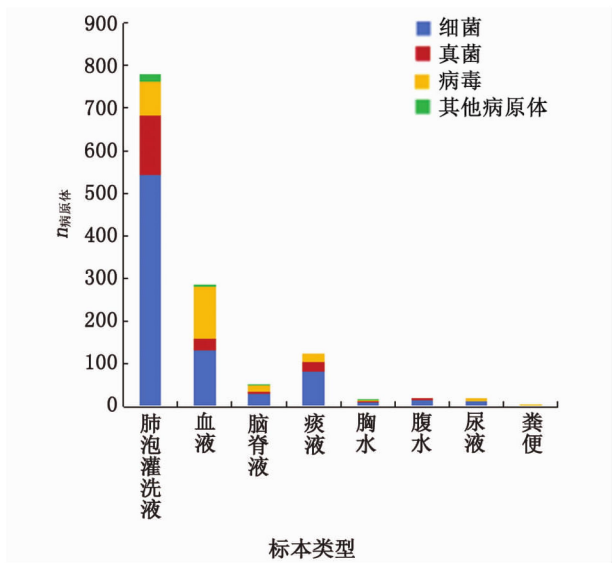


图 2 不同标本检出病原例数分布图

Fig. 2 Distribution map of the number of detected pathogens in different specimens

2.2.1 肺泡灌洗液标本的病原体分布情况 在 500 份肺泡灌洗液标本中,共检出 119 种、814 例病原体,其中细菌 78 种、544 例,为主要检出的病原体;真菌 18 种、139 例;病毒 18 种、115 例;其他病原体(衣原体、支原体和寄生虫)5 种、16 例(表 5)。阴性标本共 25 份,阳性检出率为 95.00%。

表 5 肺泡灌洗液标本的主要病原体分布
Tab. 5 Distribution of main pathogens in bronchoalveolar lavage fluid samples

分类	病原体	n(%)
细菌	肺炎克雷伯菌	66(20.56)
	革兰阴性菌 鲍曼不动杆菌	53(16.51)
	铜绿假单胞菌	45(14.02)
	纹带棒状杆菌	42(18.83)
	革兰阳性菌 屎肠球菌	41(18.39)
真菌	金黄色葡萄球菌	23(10.31)
	白色念珠菌	59(42.45)
	耶氏肺孢子菌	22(15.83)
	热带念珠菌	13(9.35)
病毒	DNA 病毒 人疱疹病毒 1 型	41(40.20)
	EB 病毒	24(23.53)
	巨细胞病毒	22(21.57)
	RNA 病毒 鼻病毒	3(23.08)
	人副流感病毒 3 型	2(15.38)
其他	人冠状病毒 229E 型	2(15.38)
	人冠状病毒 HKU1 型	2(15.38)
	鹦鹉热衣原体	10(62.50)
	Mycoplasma amphoriforme	2(12.50)
	人型支原体	2(12.50)

在检出的细菌中,革兰阴性菌的种类和例数均较革兰阳性菌多,共检出革兰阴性菌 42 种(321 例)和革兰阳性菌 36 种(223 例)。其中检出数前 3 位的革兰阴性菌为肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌;检出数前 3 位的革兰阳性菌为纹带棒状杆菌、屎肠球菌和金黄色葡萄球菌。

在检出的真菌中,检出数前 3 位为白色念珠菌、耶氏肺孢子菌和热带念珠菌。

在检出的病毒中,DNA 病毒为主要检出的病毒类型,共检出 10 种、102 例,检出数前 3 位为人疱疹病毒 1 型、EB 病毒和巨细胞病毒;共检出 RNA 病毒 8 种、13 例,主要为鼻病毒、人副流感病毒 3 型、人冠状病毒 229E 型和人冠状病毒 HKU1 型。

在检出的其他病原体方面,共检出衣原体(2 种,11 例)、支原体(2 种,4 例)和寄生虫(1 种,1 例) 3 类,主要检出的病原体为鹦鹉热衣原体、Mycoplasma amphoriforme 和人型支原体。

2.2.2 血液标本的病原体分布情况 在 340 份血液标本中,共检出 70 种、284 例病原体,其中细菌 44 种、133 例,为主要检出的病原体;真菌 9 种、26 例;病毒 15 种、123 例;其他病原体(不典型病原体) 2 种、2 例(表 6)。阴性标本共 93 份,阳性检出率为 72.65%。

表 6 血液标本的主要病原体分布
Tab. 6 Distribution of main pathogens in blood samples

分类	病原体	n(%)
细菌	肺炎克雷伯菌	27(29.35)
	革兰阴性菌 大肠埃希菌	14(15.22)
	鲍曼不动杆菌	12(13.04)
	革兰阳性菌 屎肠球菌	14(34.15)
	粪肠球菌	5(12.20)
真菌	白色念珠菌	9(34.62)
	耶氏肺孢子菌	7(26.92)
	近平滑念珠菌	3(11.54)
病毒	DNA 病毒 巨细胞病毒	43(39.45)
	EB 病毒	25(22.94)
	BK 病毒	12(11.01)
	RNA 病毒 HpgV 病毒	11(78.57)
其他	恙虫病东方体	1(50.00)
	猫立克次体	1(50.00)

在检出的细菌中,革兰阴性菌的种类和例数均较革兰阳性菌多,共检出革兰阴性菌 25 种(92 例)和革兰阳性菌 19 种(41 例)。其中,检出数前 3 位的革兰阴性菌为肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌和鲍曼不动杆菌;检出数前 2 位的革兰阳性菌为屎肠球菌和粪肠球菌,而表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、马氏棒状杆菌和盲肠肠球菌的检出数一致,为革兰阳性菌中检出数的第 3 位。

共检出 9 种、26 例真菌,其中检出数前 3 位的真菌为白色念珠菌、耶氏肺孢子菌和近平滑念珠菌。

在检出的病毒中,DNA 病毒为主要检出的病毒类型,共检出 11 种、109 例,检出数前 3 位为巨细胞病毒、EB 病毒和 BK 病毒;共检出 RNA 病毒 4 种、14 例,其中 HpgV 病毒(11 例,78.57%)检出率最高。

在检出的其他病原体中,有 1 例恙虫病东方体和 1 例猫立克次体。

2.2.3 脑脊液标本的病原体分布情况 在 67 份脑脊液标本中,共检出 31 种、51 例病原体,其中细菌 21 种、31 例,为主要检出的病原体;真菌 2 种、3 例;病毒 7 种、16 例;其他病原体(寄生虫)1 种、1 例(表 7)。阴性标本共 24 份,阳性检出率为 64.18%。

在检出的细菌中,革兰阳性菌的种类和例数均较革兰阴性菌多,共检出革兰阳性菌 13 种(18 例)和革兰阴性菌 8 种(13 例)。其中检出数前 3 位的革兰阳性菌为肺炎链球菌、头状葡萄球菌和屎肠球菌;革兰阴性菌中,主要为肺炎克雷伯菌。

表 7 脑脊液标本的主要病原体分布

Tab.7 Distribution of main pathogens in cerebrospinal fluid samples

分类		病原体	n(%)
细菌	革兰阳性菌	肺炎链球菌	3(16.67)
		头状葡萄球菌	3(16.67)
		尿肠球菌	2(11.11)
	革兰阴性菌	肺炎克雷伯菌	6(46.15)
真菌	新型隐球菌		2(66.67)
	汉逊德巴利酵母		1(33.33)
病毒	DNA 病毒	水痘-带状疱疹病毒	4(26.67)
		乙型肝炎病毒	4(26.67)
		EB 病毒	3(20.00)
	RNA 病毒	HpgV 病毒	1(100.00)
其他	福氏耐格里阿米巴		1(100.00)

在检出的真菌中,共检出新型隐球菌和汉逊德巴利酵母 2 种真菌。

在检出的病毒中,DNA 病毒为主要检出的病毒类型,共检出 6 种、15 例,检出数前 3 位为水痘带状疱疹病毒、乙型肝炎病毒和 EB 病毒;共检出 RNA 病毒 1 种,为 HpgV 病毒(1 例)。

在检出的其他病原体方面,检出 1 例福氏耐格里阿米巴。

2.2.4 痰液标本的病原体分布情况 在 104 份痰液标本中,共检出 36 种、124 例病原体,其中细菌有 22 种、83 例,为主要检出的病原体;真菌 7 种、21 例;病毒 7 种、20 例;未检测到衣原体、支原体和寄生虫等其他病原体(表 8)。阴性标本共 4 份,阳性检出率为 96.15%。

在检出的细菌中,革兰阴性菌的种类和例数均较革兰阳性菌多,共检出革兰阴性菌 14 种(50 例)和革兰阳性菌 8 种(33 例)。其中,检出数前 3 位的革兰阴性菌为肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌;检出数前 3 位的革兰阳性菌为尿肠球菌、肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌和粪肠球菌。

在检出的真菌中,白色念珠菌、耶氏肺孢子菌、近平滑念珠菌和光滑念珠菌为主要检出的真菌。

在检出的病毒中,DNA 病毒为主要检出的病毒类型,共检出 6 种、19 例,检出数前 3 位为人疱疹病毒 1 型、EB 病毒和巨细胞病毒;共检出人类冠状病毒 229E(1 例) 1 种 RNA 病毒。

2.2.5 胸水标本的病原体分布情况 在 24 份胸水标本中,共检出 12 种、16 例病原体,其中细菌 8 种、11 例,为主要检出的病原体;真菌 1 种、1 例;病毒

表 8 痰液标本的主要病原体分布

Tab.8 Distribution of main pathogens in sputum samples

分类		病原体	n(%)
细菌	革兰阴性菌	肺炎克雷伯菌	11(22.00)
		鲍曼不动杆菌	9(18.00)
		铜绿假单胞菌	8(16.00)
	革兰阳性菌	尿肠球菌	9(27.27)
真菌	革兰阳性菌	肺炎链球菌	6(18.18)
		金黄色葡萄球菌	5(15.15)
		粪肠球菌	5(15.15)
	白色念珠菌		8(38.10)
病毒	DNA 病毒	耶氏肺孢子菌	3(14.29)
		近平滑念珠菌	3(14.29)
		光滑念珠菌	3(14.29)
	RNA 病毒	人类冠状病毒 229E	1(100.00)

2 种、3 例;其他病原体(衣原体)1 种、1 例。阴性标本共 8 份,阳性检出率为 66.67%。

在检出的细菌中,革兰阴性菌的种类和例数均较革兰阳性菌多,共检出革兰阴性菌 5 种(8 例)和革兰阳性菌 3 种(3 例)。其中,检出数前 3 位的革兰阴性菌为肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌,各检出 2 例;检出的革兰阳性菌为产气荚膜梭菌、尿肠球菌和结核分枝杆菌各 1 例。

在检出的病毒中,共检出 DNA 病毒 2 种、3 例,分别为 EB 病毒(2 例,66.67%)和细小病毒 B19(1 例,33.33%)。

在胸水标本中,共检出 1 种真菌和 1 种其他病原体,分别为黄曲霉(1 例)和鹦鹉热衣原体(1 例)。

2.2.6 腹水标本的病原体分布情况 在 23 份腹水标本中,共检出 18 种、20 例病原体,其中细菌 15 种、16 例,为主要检出的病原体;真菌 3 种、4 例;未检出病毒和其他病原体(衣原体、支原体和寄生虫等)。阴性标本共 3 份,阳性检出率为 86.96%。

在检出的细菌中,革兰阳性菌的种类较革兰阴性菌多,两者例数相同,共检出革兰阳性菌 8 种(8 例)和革兰阴性菌 7 种(8 例)。各种类细菌之间检出的例数相近。

真菌共检出白色念珠菌(2 例,50.00%)、光滑念珠菌(1 例,25.00%)和热带念珠菌(1 例,25.00%) 3 种。

2.2.7 尿液标本的病原体分布情况 在21份尿液标本中,共检出13种、21例病原体,其中细菌8种、12例,为主要检出的病原体;真菌1种、1例;病毒4种、8例;未检出其他病原体(衣原体、支原体和寄生虫)。无阴性标本,阳性检出率为100.00%。

在检出的细菌中,革兰阴性菌的种类和例数均较革兰阳性菌多,共检出革兰阴性菌5种(9例)和革兰阳性菌3种(3例)。其中,检出数最多的革兰阴性菌为大肠埃希菌(4例,44.44%);共检出3种革兰阳性菌,为肺炎链球菌、粪肠球菌和缓症链球菌。

共检出1种真菌,为白色念珠菌(1例)。

检出的病毒均为DNA病毒,共检出4种、8例,其中BK病毒(4例,50.00%)检出数最多。

2.2.8 粪便标本的病原体分布情况 在4份粪便标本中,共检出4种、4例病原体,其中病毒3种、3例,为主要检出的病原体;细菌1种、1例;未检出真菌和其他病原体(衣原体、支原体和寄生虫)。无阴性标本,阳性检出率为100.00%。

检出的病毒均为DNA病毒,共检出BK病毒、巨细胞病毒和腺病毒各1例。检出的细菌为1例鲍曼不动杆菌。

3 讨论

既往对传统病原微生物的检测多构建于体外分离培养的基础上,但由于体内、外环境条件差异等因素的干扰,部分致病病原体难以被检出。mNGS技术的优势不仅在于能够发现传统方法无法检测到的病原体^[11],更重要的是能够在短时间内检测较大范围的病原体核酸^[12-13],同时无偏倚地对细菌、病毒、真菌和不典型病原体等进行检测。本研究借助mNGS报告进行统计分析,收集的1083份标本总体的病原体阳性检出率为85.50%,远高于传统检测手段。虽然各类标本检出率存在差异,但病原体阳性检出率均在60%以上。本研究检出病原体种类达172种,例数达1334例,除常见的细菌、真菌和DNA病毒外,也检出较为少见的各类不典型病原体、RNA病毒等。此外,mNGS技术还有利于溯源分析及流行病学调查^[14],针对一些特殊、少见病原体的感染,在疾病暴发初期若能借助mNGS技术及时识别和鉴定出该病原体,可有效地避免公共卫生事件的发生。同样,本研究借助mNGS技术初步掌握福州地区ICU病原体的分布情况,若能以此为依据构建病原检测体系,一旦出现新发、未知的传染

病,未能被此病原检测体系识别,就能够起到有效的预警作用。

在检出的病原体中,细菌的种类和数量最多,其次为病毒。2021年,中国细菌耐药监测网(China antimicrobial surveillance network, CHINET)在全国范围内分离出3万多株细菌,其中革兰阳性菌占28.6%,革兰阴性菌占71.4%^[15]。本研究中革兰阴性菌例数(60.29%)较革兰阳性菌例数(39.71%)多,但革兰阳性菌的占比较CHINET监测的数据更大。检出数量前3位的细菌为肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌和屎肠球菌,而CHINET监测中为大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌和金黄色葡萄球菌,可见CHINET同时收集普通病房和ICU所得的数据,与本研究仅重点调查ICU的数据相比,菌种分布存在差异。本研究中,巨细胞病毒、人疱疹病毒1型和EB病毒为主要检出的病毒。值得注意的是,病毒的种类(17.44%)和例数(21.59%)并不低,而在临床中对病毒的检测手段相当有限,缺乏明确的病原学证据,面对危重症、免疫缺陷等患者时,临床医生有时不得不选择强效、广谱的抗感染方案覆盖,无法做到有的放矢,进而加剧抗生素滥用和耐药的发生。

不同标本检出的细菌种类和数量存在差异,其中肺泡灌洗液、血液、痰液、胸水、尿液和粪便标本以革兰阴性菌为主,脑脊液、腹水标本以革兰阳性菌为主。所有标本检出的病毒均以DNA病毒为主。肺泡灌洗液、血液和痰液3类标本检出的真菌中,耶氏肺孢子菌的例数均仅次于白色念珠菌,检出数居第2位;肺孢子菌肺炎多发生在免疫缺陷人群中,常合并多种条件致病菌混合感染^[16],若不能早期诊断、及时针对性抗感染治疗,易出现呼吸衰竭,危及生命。前期研究发现,肺泡灌洗液mNGS技术在肺孢子菌肺炎的诊治中具有良好的检测效能,早期准确选择合适的抗感染治疗方案,可极大改善患者的预后^[17]。在血液、脑脊液、尿液和粪便标本中,病毒检出例数占比分别为43.31%、31.37%、38.10%和75.00%。虽然mNGS技术的灵敏度高,但其特异度相对较低,因此,无法很好地区分病原体处于定植或致病状态^[18-19]。若患者既往感染某种病毒,处于慢性携带状态,则mNGS技术可从血液等标本中检测出相应的病毒序列。呼吸道具有多种微生物定植,mNGS检测结果中也常出现定植菌的阳性结果。如果不加以区分假阳性结果,亦可能导致抗生素滥用等情况。因此,正如指南提出,mNGS尚不能准

确判断菌群定植或感染状态,仍需依赖临床医师结合患者病情具体分析^[20]。

本研究存在一定局限性:(1)缺乏与传统检测手段如痰培养、血培养等结果进行对比,未通过统计学分析比较 mNGS 与传统检测手段间的差异;(2)采用回顾性研究设计,信息偏倚难以避免,统计时未将单纯感染与混杂感染区分比较。

综上所述,ICU 病房的病原体分布与非 ICU 科室相比存在差异,借助 mNGS 技术可动态监测 ICU 病原体分布,有助于临床抗感染决策的制定,但仍需要依靠临床医师结合患者实际病情进行分析。

参考文献:

- [1] JONES K E, PATEL N G, LEVY M A, et al. Global trends in emerging infectious diseases[J]. *Nature*, 2008, 451(7181): 990-993.
- [2] 李培, 林东昉. 消失 19 年的麻疹疫情在美国卷土重来[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2020, 20(1): 75.
- [3] AGUADO J M, VÁZQUEZ L, FERNÁNDEZ-RUIZ M, et al. Serum galactomannan versus a combination of galactomannan and polymerase chain reaction-based *Aspergillus* DNA detection for early therapy of invasive aspergillosis in high-risk hematological patients: A randomized controlled trial[J]. *Clin Infect Dis*, 2015, 60(3): 405-414.
- [4] SUBRAMONY A, ZACHARIAH P, KRONES A, et al. Impact of multiplex polymerase chain reaction testing for respiratory pathogens on healthcare resource utilization for pediatric inpatients[J]. *J Pediatrics*, 2016, 173: 196-201, e2.
- [5] RHODES A, EVANS L E, ALHAZZANI W, et al. Surviving sepsis campaign: International guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016[J]. *Intensive Care Med*, 2017, 43(3): 304-377.
- [6] MIAO Q, MA Y Y, WANG Q Q, et al. Microbiological diagnostic performance of metagenomic next-generation sequencing when applied to clinical practice[J]. *Clin Infect Dis*, 2018(Sup. 2): 231-240.
- [7] PARIZE P, MUTH E, RICHAUD C, et al. Untargeted next-generation sequencing-based first-line diagnosis of infection in immunocompromised adults: A multicentre, blinded, prospective study[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2017, 23(8): 574, e1-574, e6.
- [8] THURBER R V, HAYNES M, BREITBART M, et al. Laboratory procedures to generate viral metagenomes[J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(4): 470-483.
- [9] WINGET D M, WOMMACK K E. Randomly amplified polymorphic DNA PCR as a tool for assessment of marine viral richness[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(9): 2612-2618.
- [10] HUSON D H, BEIER S, FLADE I, et al. MEGAN community edition-interactive exploration and analysis of largescale microbiome sequencing data[J]. *PLoS Comput Biol*, 2016, 12(6): e1004957.
- [11] BRITTANY G, HEIKE S, CHELSIE G, et al. Making the leap from research laboratory to clinic: Challenges and opportunities for next-generation sequencing in infectious disease diagnostics[J]. *mBio*, 2015, 6(6): e01888-15.
- [12] SIMNER P J, MILLER S, CARROLL K C. Understanding the promises and hurdles of metagenomic next-generation sequencing as a diagnostic tool for infectious diseases[J]. *Clin Infect Dis*, 2018, 66(5): 778-788.
- [13] BROWN J R, BHARUCHA T, BREUER J. Encephalitis diagnosis using metagenomics: Application of next generation sequencing for undiagnosed cases[J]. *J Infect*, 2018, 76(3): 225-240.
- [14] INKSTER T, DODD S, GUNSON R, et al. Investigation of outbreaks of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in two Scottish renal units[J]. *J Hosp Infect*, 2017, 96(2): 151-156.
- [15] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2022 年 CHINET 中国细菌耐药监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2022, 22(5): 521-530.
- [16] YI Z, AI J W, PENG C, et al. A cluster of cases of pneumocystis pneumonia identified by shotgun metagenomics approach[J]. *J Infect*, 2019, 78(2): 158-169.
- [17] LI Y P, DENG X L, HU F Y, et al. Metagenomic analysis identified co-infection with human rhinovirus C and bocavirus 1 in an adult suffering from severe pneumonia[J]. *J Infect*, 2018, 76(3): 311-313.
- [18] HUANG J, JIANG E, YANG D L, et al. Metagenomic next-generation sequencing versus traditional pathogen detection in the diagnosis of peripheral pulmonary infectious lesions[J]. *Infect Drug Resist*, 2020, 13: 567-576.
- [19] LANGE L IER C, KALANTAR K L, MOAZED F, et al. Integrating host response and unbiased microbe detection for lower respiratory tract infection diagnosis in critically ill adults[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(52): E12353-E12362.
- [20] 《中华传染病杂志》编辑委员会. 中国宏基因组学第二代测序技术检测感染病原体的临床应用专家共识[J]. *中华传染病杂志*, 2020, 38(11): 681-689.

Distribution of Pathogens in ICU Patients with Infectious Diseases Based on Metagenomics Next Generation Sequencing

WU Yue^{1,2}, ZHUO Huichang^{1,2}, YANG Huobao³, CHEN Cunrong⁴,
YOU Yanjing⁵, LI Hongyan⁶, WANG Qing⁷, LIN Feng⁸

1. Department of Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China;

2. Department of Critical Care Medicine, National Regional Medical Center, Binhai Campus of The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350212, China;

3. Second Department of Critical Care Medicine, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, China;

4. Department of Critical Care Medicine, Concord Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China;

5. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, The 900th Hospital of the Joint Support Force of The Chinese People's Liberation Army, Fuzhou 350001, China;

6. Department of Respiratory Medicine, People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350004, China;

7. Department of Respiratory Medicine, The Third People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China;

8. Department of Critical Care Medicine, Fuzhou First Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fuzhou 350009, China

ABSTRACT: **Objective** Analysis of pathogen distribution in intensive care unit (ICU) patients with infectious diseases based on metagenomic next generation sequencing (mNGS) data, providing a basis for clinical anti infection treatment. **Method** By reviewing and analyzing the results of mNGS reports of infectious diseases in Fuzhou, the etiological distribution in this area was discussed. **Results** A total of 1 083 mNGS reports of infectious diseases were collected in this study, and the total detection rate was 85.50%. There are 172 kinds of pathogens and 1 334 cases of pathogens. The species and number of bacteria detected are the most, followed by viruses. The number of Gram negative bacteria (60.29%) was more than that of Gram positive bacteria (39.71%). The first three Gram negative bacteria were *Klebsiella pneumoniae* (114 cases, 22.75%), *Acinetobacter baumannii* (78 cases, 15.57%), and *Pseudomonas aeruginosa* (66 cases, 13.17%); Gram positive bacteria were *Enterococcus faecium* (68 cases, 20.61%), *Corynebacterium striatum* (46 cases, 13.94%) and *Staphylococcus aureus* (31 cases, 9.39%).

Candida albicans (79 cases, 40.51%), *Pneumocystis yersii* (32 cases, 16.41%) and *Candida nearly smooth* (16 cases, 8.21%) were the top three fungi detected. DNA virus was the main virus detected, cytomegalovirus (71 cases, 27.52%), human herpesvirus 1 (62 cases, 24.03%) and Epstein-Barr virus (57 cases, 22.09%) were the first three viruses detected; RNA viruses were human pegivirus virus (13 cases, 43.33%), human coronavirus 229E (4 cases, 13.33%), rhinovirus (3 cases, 10.00%) and human coronavirus HKU1 (3 cases, 10.00%). Among atypical pathogens, psittacosis had the highest physical examination rate (11 cases, 55.00%). **Conclusion** Gram negative bacteria are the main pathogen in patients with infectious diseases in ICU, followed by viruses. Dynamic ICU monitoring of pathogen distribution can help achieve reasonable and effective anti infection treatment.

KEY WORDS: metagenomic next generation sequencing; intensive care unit; etiology distribution

(编辑:张慧茹)