

病原体靶向测序技术在儿科肺部感染病原学检测中的应用价值

张琼丹¹, 刘孝靖¹, 叶晓霖¹, 李丹华², 韩甜甜^{3*}

¹广州医科大学中西临床学院, 广东 广州

²广州中医药大学第一附属医院检验科, 广东 广州

³广州医科大学附属中医医院, 广东 广州

收稿日期: 2025年6月3日; 录用日期: 2025年6月27日; 发布日期: 2025年7月3日

摘要

背景: 儿童社区获得性肺炎(CAP)是儿科常见的感染性疾病, 其病原体复杂多样, 传统的病原学检测方法如痰液和血液培养在多重病原体感染的识别方面存在局限。靶向二代测序通过高效的基因检测和生物信息分析, 实现了对多种致病病原微生物的快速识别, 特别适用于复杂的病原体检测。目的: 本研究旨在探讨tNGS技术在儿科CAP患者中病原体检测的应用价值, 通过对比tNGS结果与传统实验室检测结果, 评估tNGS在检测敏感性、复合感染识别及耐药基因筛查方面的优势。方法: 选取2023年7月至2024年6月在广州某医院住院的705例儿科CAP患者, 对其支气管肺泡灌洗液进行tNGS检测, 并与肺泡灌洗液常规培养及血清学检测结果进行对比分析。结果: 在传统培养方法中, 110株病原菌被成功培养, 检出率为14.75%, 主要病原体包括流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、肺炎链球菌和鲍曼不动杆菌。相较之下, tNGS阳性检出699例, 检出率高达99.15%; tNGS检测在705例患者中单一感染致病性病原菌或条件致病菌的病例为52例(7.38%), 未检出病原菌的病例数为6例(0.85%), 其余病例均检出双重或多重病原菌感染。tNGS检出的主要致病性病原体依次为肺炎支原体、人呼吸道合胞病毒B型、人类腺病毒B型、鼻病毒A型及人呼吸道病毒3型, 复合感染中最常见的是肺炎支原体和人类腺病毒B型。耐药基因检测结果显示, tNGS检出耐药基因532例, 以肺炎支原体的Mp_23S_rRNA (A2063G)和金黄色葡萄球菌的mecA为主, 分别占比80.3%和8.46%。血清学检测显示, 检出率最高的病原体包括肺炎支原体、呼吸道合胞病毒、甲型流感病毒、腺病毒和嗜肺军团菌。tNGS检测与传统方法的检测结果相比, 差异显著(54.6% vs. 99.1%, $P < 0.01$), 一致性较低(Kappa值 = 0.241, $P = 0.019$)。结论: tNGS技术在儿科肺部感染病原体的检测中表现出显著的敏感性优势, 不仅提高了病原菌的检出率, 特别是在识别儿科肺部感染常见的难培养病原体和复合感染方面具有显著优势, 还提供了耐药基因的高效筛查手段。tNGS技术在复杂感染的早期诊断及精准治疗方案制定中具有较高的临床应用价值。

关键词

儿童社区获得性肺炎, 靶向二代测序, 病原体检测, 肺炎支原体

*通讯作者。

Application Value of Pathogen Targeted Sequencing Technology in Etiological Detection of Pediatric Pulmonary Infection

Qiongdan Zhang¹, Xiaojing Liu¹, Xiaolin Ye¹, Danhua Li², Tiantian Han^{3*}

¹Chinese and Western Clinical College, Guangzhou Medical University, Guangzhou Guangdong

²Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou Guangdong

³The Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou Guangdong

Received: Jun. 3rd, 2025; accepted: Jun. 27th, 2025; published: Jul. 3rd, 2025

Abstract

Background: Children's community-acquired pneumonia (CAP) is a common infectious disease in pediatrics. Its pathogens are complex and diverse. Traditional etiological detection methods, such as sputum and blood culture, have limitations in the identification of multiple pathogen infections. Through efficient gene detection and bioinformation analysis, targeted second-generation sequencing realizes rapid identification of a variety of pathogenic microorganisms, especially for complex pathogen detection. **Objective:** The purpose of this study was to investigate the application value of tNGS technology in pathogen detection in pediatric CAP patients, and to evaluate the advantages of tNGS in detection sensitivity, identification of complex infection and screening of drug resistance genes by comparing the results of tNGS with those of traditional laboratory tests. **Methods:** 705 pediatric patients with CAP admitted to a hospital in Guangzhou from July 2023 to June 2024 were selected for tNGS detection of bronchoalveolar lavage fluid, and compared with the results of routine culture and serological detection of alveolar lavage fluid. **Results:** In the traditional culture method, 110 strains of pathogenic bacteria were successfully cultured, the detection rate was 14.75%, the main pathogens included *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Streptococcus pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii*. In contrast, 699 cases of tNGS were detected, the detection rate was as high as 99.15%. Among the 705 patients, 52 (7.38%) were infected with single pathogenic bacteria or opportunistic pathogens, 6 (0.85%) were not detected by tNGS, and the other cases were detected with double or multiple pathogenic bacteria. The main pathogenic pathogens detected by tNGS were *Mycoplasma pneumoniae*, human respiratory syncytial virus type B, human adenovirus type B, rhinovirus type A and human respiratory virus type 3, and the most common complex infections were *Mycoplasma pneumoniae* and human adenovirus type B. The results of drug resistance gene detection showed that 532 cases of drug resistance genes were detected by tNGS, mainly Mp_23S_rRNA (A2063G) of *Mycoplasma pneumoniae* and *mecA* of *Staphylococcus aureus*, accounting for 80.3% and 8.46% respectively. Serological tests showed that the pathogens with the highest detection rate included *Mycoplasma pneumoniae*, respiratory syncytial virus, influenza A virus, adenovirus and *Legionella pneumophila*. The results of tNGS detection were significantly different from those of traditional methods (54.6% vs. 99.1%, $P < 0.01$), and the consistency was low ($Kappa = 0.241$, $P = 0.019$). **Conclusion:** tNGS technology has a significant sensitivity advantage in the detection of pathogens of pediatric pulmonary infection, which not only improves the detection rate of pathogens, but also has a significant advantage in the identification of common difficult-to-culture pathogens and complex infections in pediatric pulmonary infection, and also provides an efficient screening method for drug-resistant genes. tNGS technology has high

clinical application value in the early diagnosis of complex infection and the formulation of precise treatment plan.

Keywords

Children Community Acquired Pneumonia, Targeted Second Generation Sequencing, Pathogen Detection, *Mycoplasma pneumoniae*

Copyright © 2025 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. 引言

儿童社区获得性肺炎(CAP)是全球范围内儿童感染性疾病发病率和死亡率的主要原因之一,特别是在免疫力相对较低的幼儿中,CAP的高发率和病原体的复杂性对临床管理提出了巨大挑战[1]。CAP的致病病原体涉及多种细菌、病毒、真菌和非典型病原体,病原谱因地域差异、季节变化及年龄分布而呈现高度多样化[2][3]。然而,传统的病原学检测方法如痰液和血液培养技术在识别这些复杂病原体方面存在显著不足[4],其在多重感染检测和难培养病原体识别上灵敏度较低,导致诊断周期长且检出率低。这一局限性可能延误对病原体的识别和治疗的开始,进而增加了病情进展风险和医疗负担。

靶向二代测序(targeted next-generation sequencing, tNGS)技术的发展为复杂感染病原体的快速检测提供了一种新的、有效的工具。tNGS利用高通量基因组测序技术,通过对病原体基因组的靶向捕获和扩增,实现对多种致病微生物的高敏感性检测[5]。与传统培养方法相比,tNGS不仅在检测细菌、病毒和真菌等常见病原体方面显示出更高的阳性检出率,还能够识别传统方法难以检测的非典型病原体及其耐药基因。此外,tNGS技术还可以通过数据分析识别出多重病原体感染,弥补传统方法在复合感染检测方面的不足,为临床提供了多维度的病原学数据支持,有望显著提升感染性疾病的诊断准确性和治疗的精准性。

本研究的目的是评估 tNGS 技术在儿科 CAP 病原学检测中的实际应用效果。我们选取了 2023 年 7 月至 2024 年 6 月间在我院住院的 705 例 CAP 患儿,使用 tNGS 技术对其支气管肺泡灌洗液、痰液、鼻咽拭子等样本进行病原体检测,并与传统培养及血清学检测结果进行对比。通过分析两种方法在病原体阳性检出率、复合感染识别率及耐药基因筛查的差异性,我们希望明确 tNGS 在提升病原学检测灵敏度及优化临床诊疗决策中的潜在价值,为未来复杂感染性疾病的快速、精准诊断提供可靠的技术依据。

2. 资料和方法

2.1. 研究对象

此研究纳入 2023 年 7 月至 2024 年 6 月广州某医院儿科因肺部感染收治住院的患者 705 例。纳入标准:所有患儿均符合《儿童社区获得性肺炎诊疗规范(2019 版)》的诊断标准,年龄 1~16 岁,病程 <1 个月。① 症状:有发热、咳嗽或喘息、呼吸增快等表现;② 体征:肺部可闻及固定的湿性啰音,部分肺炎支原体性肺炎患儿可无啰音;③ 影像学:胸部 X 片或胸部 CT 提示存在实变影,或合并肺不张,或合并胸腔积液;④ 纤维支气管镜适应证:符合《中国儿科可弯曲支气管镜术指南(2018 年版)》的适应症第 9 条胸部影像学异常:a. 气管、支气管发育不良和/或畸形;b. 肺不张;c. 肺气肿;d. 肺部团块状病变;e. 肺部弥漫性疾病;f. 纵隔气肿;g. 气道、纵隔占位;h. 血管、淋巴管、食管发育异常;i. 胸膜腔病变

需鉴别诊断者。第 10 条肺部感染性疾病的病原学诊断及治疗。排除标准：① 合并严重心、肝、肾等疾病；② 影像学检查不支持肺炎；③ 存在纤维支气管镜检查相对禁忌症；④ 家属拒绝行纤维支气管镜检查；⑤ 家属拒绝行 tNGS 检测。该研究已获得广州医科大学附属中医医院伦理委员会批准(批件号：2024NK040)。

2.2. 方法

2.2.1. 支气管镜肺泡灌洗方法

入院后完善支气管镜肺泡灌洗术前检查，排除禁忌证，根据患儿的病情及家属的意愿，在入院的第 2~7 天，征得家属知情同意后，由具有操作资质的医生行支气管镜肺泡灌洗术，术中严格遵守无菌操作，根据镜下所见将支气管镜前端插入至病变部位的肺段，注入 37℃ 灭菌生理盐水每次 5~10 ml，灌洗 2~3 次，收集肺泡灌洗液两份各 5 ml，一份送本院检验科行常规细菌培养，另一份行 tNGS 检测。

2.2.2. 痰标本的留取

留取深部痰液(晨起清水漱口后用力咳出第一口痰)于无菌容器中及时送检。鼻咽拭子培养标本需使用无菌拭子深入鼻咽部(到达咽后壁)旋转擦拭采集分泌物后，置于无菌试管内密封及时送检。

2.2.3. 传统的病原体检测

完善血培养及肺泡灌洗液、痰液、鼻咽拭子等样本培养、肺炎支原体血清学检测、呼吸道病毒八项抗原(嗜肺军团菌、肺炎衣原体、腺病毒、呼吸道合胞病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒、肠道病毒 71 型、柯萨奇病毒 B 组)检测等。其中灌洗液培养为细菌培养法，将标本接种于血琼脂平板培养基、嗜血巧克力培养基、沙保罗平板；血琼脂平板培养基、嗜血巧克力培养基放置于 35℃、5% CO₂ 培养箱中培养 72 小时，沙保罗平板放置于 35℃ 培养箱中培养至 7 天。肺炎支原体抗体、呼吸道病毒八项检测为免疫荧光法，严格按照试剂盒操作说明书进行。

2.2.4. tNGS 检测

肺泡灌洗液、痰液、鼻咽拭子等样本征得家属同意后由检验科外送第三方检测机构(广州达安医学检验有限公司)行呼吸道多重病原体靶向二代测序(tNGS)，98 种病原体及 25 个耐药基因/基因型，其中 40 种细菌，33 种病毒，4 种真菌，及 4 种特殊病原体。根据病原体的致病性分为致病性病原菌和条件致病菌。标本的采集、运输和保存严格按照公司的标准规范执行。检测流程分为以下关键步骤：首先进行核酸提取，随后构建测序文库，并在样本池中进行合并处理(pooling)，接着通过高通量测序获取大量病原体基因组数据，最后进行精确的数据分析与解读。整个检测过程控制在 12 小时以内，从标本送达至报告发布的时限则严格控制在 24 小时内。这一高效的 tNGS 检测流程，为临床提供了快速、精准的病原体识别手段，助力感染性疾病的早期干预和精准治疗。

2.3. 观察指标

病原体检出率：统计 tNGS 和传统细菌培养及血清学检测方法在肺泡灌洗液和血样中检出的病原体类型和数量，计算各方法的病原体检出率，对比分析 tNGS 与传统方法在病原体识别上的差异。

复合感染检出率：分析 tNGS 对复合病原体感染的识别情况，记录多种病原体的同时检出情况，并与传统检测方法的复合感染检出率进行对比，以评估 tNGS 在复合感染识别方面的优势。

耐药基因检测：使用 tNGS 技术对肺泡灌洗液样本中的耐药基因进行分析，记录检出的主要耐药基因类型和检出率。

检测一致性：对比 tNGS 与传统方法的检测结果，评估 tNGS 与传统检测方法之间的检出一致性。

2.4. 统计分析

本研究使用 SPSS 统计软件对数据进行分析。计数资料(如病原体检出率和复合感染检出率)以频数和百分比表示，组间比较采用卡方检验(χ^2 检验)，显著性水平设定为 $P < 0.05$ 。对于 tNGS 与传统方法间的检测一致性，通过 Kappa 一致性检验进行评估。

3. 结果

3.1. 研究对象基线资料

本研究纳入 2023 年 7 月至 2024 年 6 月广州某医院儿科因肺部感染收治住院的患儿 705 例。患者平均年龄为 5.19 ± 3.592 岁，其中小于 1 周岁的患儿占 11.1%，1~3 周岁的占 22.4%，4~6 周岁的占 28.6%，而 6 岁以上的学龄期患儿占 37.9%。性别比例方面，男孩占 52.1%，女孩占 47.9%。见表 1。

Table 1. Baseline data of study subjects
表 1. 研究对象基线资料

	均值/例数	标准差/占比
年龄	5.19	3.592
小于 1 周岁患儿	78	11.1 (%)
1~3 周岁幼儿	158	22.4 (%)
4 岁至 6 周岁的学龄前患儿	202	28.6 (%)
6 岁以上的学龄期患儿	267	37.9 (%)
性别		
男	367	52.1
女	338	47.9
WBC ($10^9/L$)	8.8918	4.50942
NEU ($10^9/L$)	4.988	3.86748
LYM ($10^9/L$)	3.1835	2.81214
PLT ($10^9/L$)	340.0324	128.80478
PCT (ng/ml)	0.3605	2.28117

注：WBC：白细胞计数；NEU：中性粒细胞计数；LYM：淋巴细胞计数；PLT：血小板；PCT：降钙素原。

3.2. 传统培养方法检出病原菌情况

结果共培养出病原菌 110 株，检出率为 14.75%：其中流感嗜血杆菌 > 金黄色葡萄球菌 > 白色念珠菌 > 肺炎链球菌 > 鲍曼不动杆菌。见图 1，其中红色为细菌，绿色为真菌。3 例为金黄色葡萄球菌和流感嗜血杆菌共感染，其他均为单一细菌或真菌感染。检出的真菌有：白色念珠菌、近平滑念珠菌、阿萨丝孢酵母菌、黄曲霉、热带念珠菌、克柔念珠菌、烟曲霉。

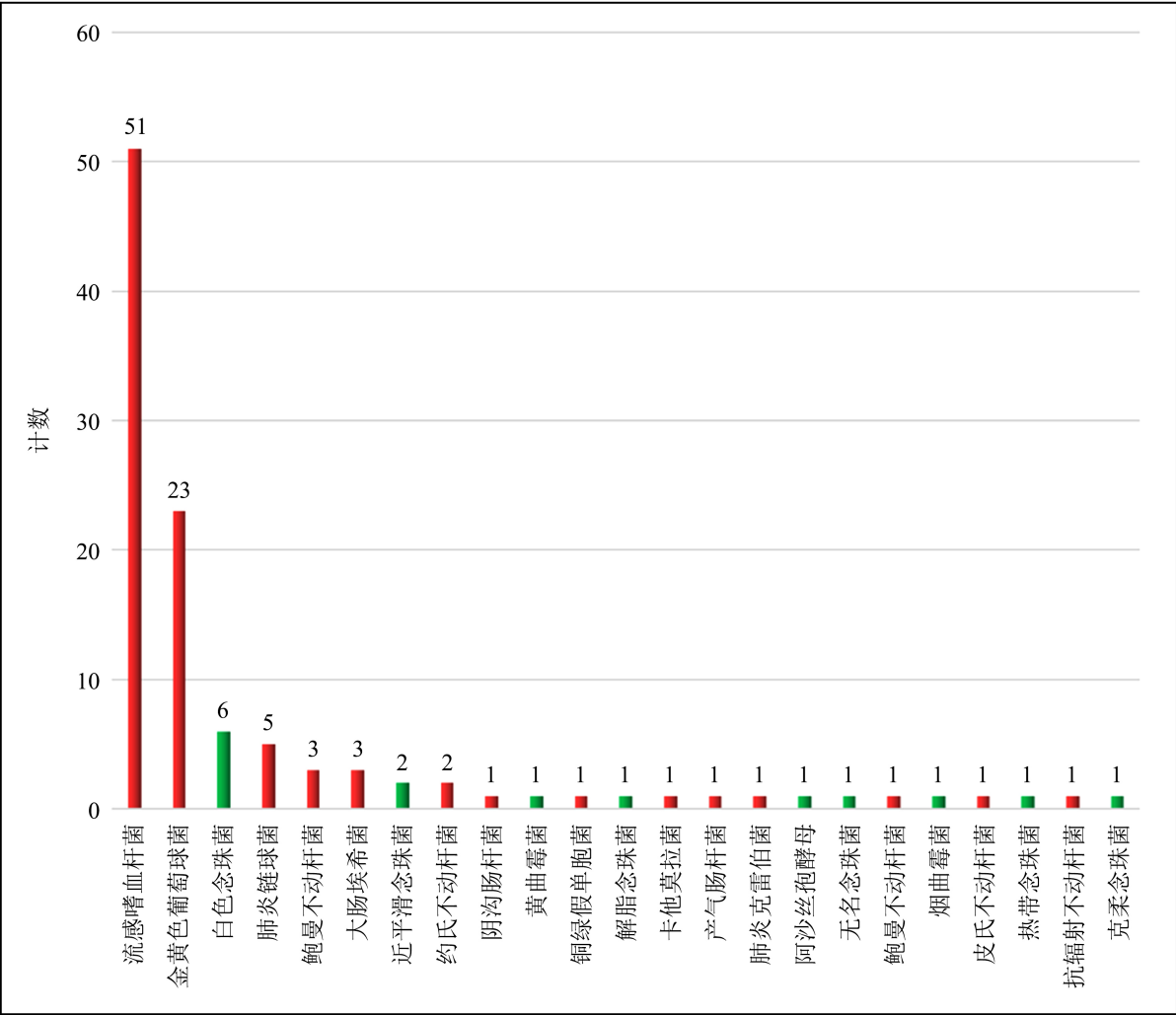


Figure 1. Culture results of alveolar lavage fluid by traditional method
图 1. 肺泡灌洗液传统方法培养结果

3.3. tNGS 检出病原菌情况

tNGS 阳性检出 699 例，检出率高达 99.15%。705 例中单一感染致病性病原菌或条件致病菌为 52 例 (占比 7.38%)，未检出病原菌为 6 例 (占比 0.85%)，其他均为双重或多重病原菌感染。感染致病性病原菌前五位为肺炎支原体，人呼吸道合胞病毒 B 型，人类腺病毒 B 型，鼻病毒 A 型，人呼吸道病毒 3 型；见图 2。混合感染最多的是肺炎支原体和人类腺病毒 B 型混合感染。感染条件致病性病原菌前五位为流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、大肠埃希菌、卡他莫拉菌；另外，惠普尔养障体检出 23 例，真菌检出烟曲霉 5 例、耶氏肺孢子菌 11 例，见图 3。

3.4. 耐药基因

共检出耐药基因 532 例，首位检出的是肺炎支原体 Mp_23S_rRNA (A2063G)，占比 80.3%；其次是金黄色葡萄球菌 mecA，占比 8.46%。见图 4。在检出的 450 例肺炎支原体中，430 例存在 Mp_23S_rRNA (A2063G) 耐药基因，占比高达 95.56%；在检出的 74 例金黄色葡萄球菌中，45 例检出 mecA 耐药基因，占比达 60.00%。

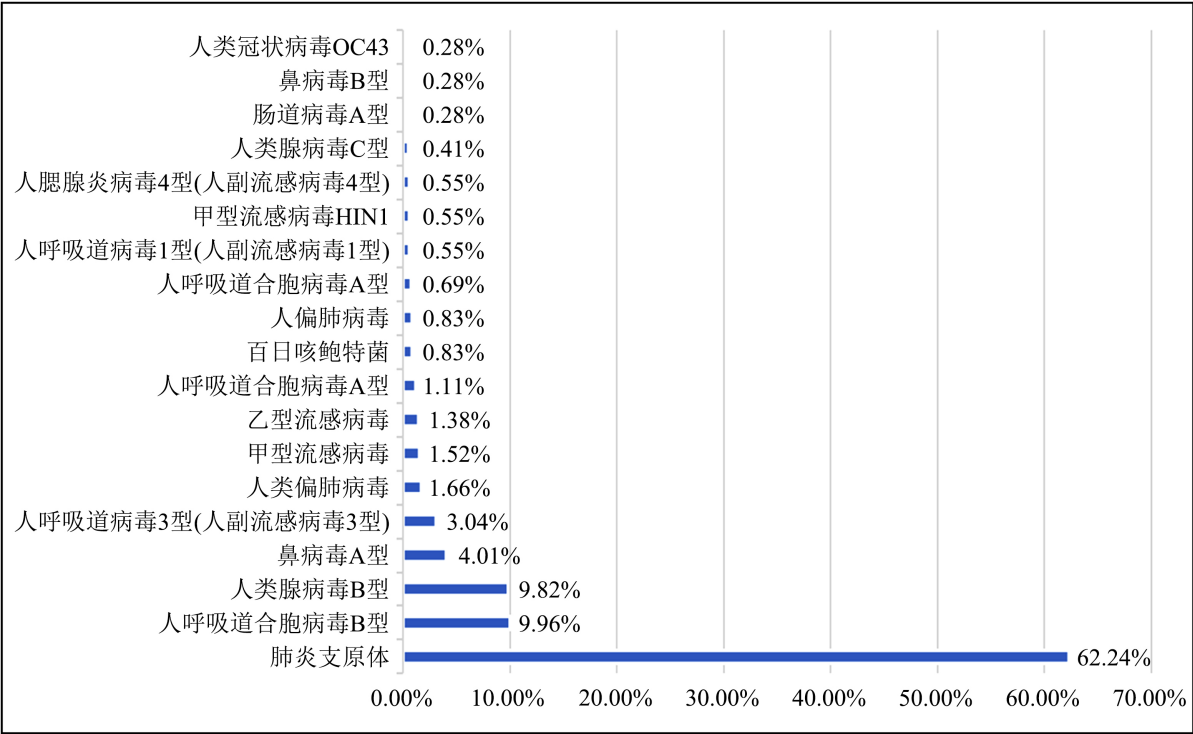


Figure 2. Results of pathogenic bacteria detected by tNGS in alveolar lavage fluid

图 2. 肺泡灌洗液 tNGS 检测出致病性病原菌结果

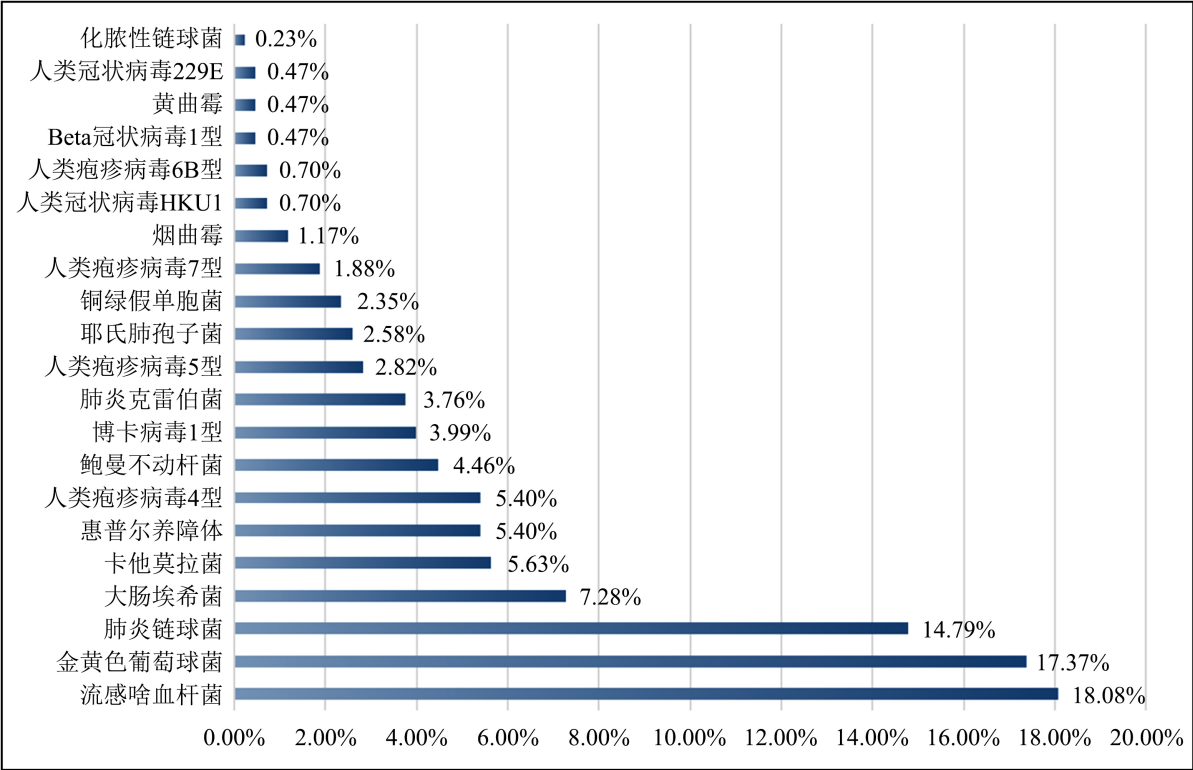
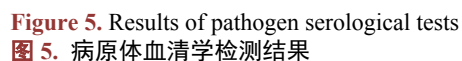
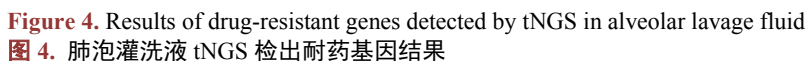


Figure 3. Results of conditional pathogenic bacteria detected by tNGS in alveolar lavage fluid

图 3. 肺泡灌洗液 tNGS 检测出条件致病菌结果



3.5. 血清学检测结果

呼吸道病原体抗原血清学结果显示, 检出排前 5 的是肺炎支原体、呼吸道合胞病毒、甲型流感病毒、腺病毒、嗜肺军团菌, 合并感染常见的有肺炎支原体合并呼吸道合胞病毒; 肺炎支原体合并甲型流感病毒共感染。见图 5。

3.6. 检测性能比较

将传统培养和血清学检测结果与 tNGS 结果进行比较, χ^2 检验结果显示两者检出率存在显著性差异 (54.6% vs 99.1%) ($P < 0.01$); 检出结果一致性占比: 完全一致 9.36%, 部分一致 24.54%, 完全不一致 66.10%。两种方法的检测结果一致性较低(Kappa 值为 0.241, $P = 0.019$)。

4. 讨论

本研究通过比较传统培养、血清学检测与靶向二代测序(tNGS)技术在儿童社区获得性肺炎(CAP)病原体检测中的应用, 探讨了不同方法的检出率、检出内容及耐药基因分析。研究结果显示, tNGS 在病原体的阳性检出率、复合感染识别及耐药基因筛查方面均显著优于传统方法, 尤其在难培养病原体和少见菌的检测上展现出更高的灵敏度和特异性。同时, tNGS 能够快速提供病原体耐药基因信息, 为临床精准用药提供了可靠的数据支持。尽管 tNGS 在病原学检测中展现了明显的优势, 但其高灵敏度也提示呼吸道感染需结合实验室病原学检测、影像学、临床症状、病理学以及生物标记物和急性相炎症反应指标等综合诊断, 以避免过度诊疗。

本研究中, 传统培养方法的病原菌检出率为 14.75%, 在特定细菌(如流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌)和真菌(如白色念珠菌、黄曲霉等)的识别方面具有一定的效果。相关研究对于儿童常见肺部感染细菌的研究表明, 培养细菌前三位分别为流感嗜血杆菌、肺炎链球菌、铜绿假单胞菌[6]。梁学耀[7]等人回顾性分析了 2191 例住院肺炎患儿常见呼吸道病原体, 结果显示最常见的细菌是肺炎链球菌, 占 21.7%。传统培养方法在酵母样真菌方面的检出率高于 tNGS, 这可能由于 NGS 测序技术对真菌破壁提取核酸尚未满足需求, 仍需攻破真菌细胞壁厚破壁难的问题。已有研究指出, 传统培养对难培养或少见真菌的识别敏感性较差, 特别是肺泡灌洗液标本中的非典型真菌[8]。肺部真菌感染在免疫功能低下的儿童中相对常见, 并可能危及生命[9]。因此, 如何提高真菌的检出率, 特别是对临床常见且不易培养的真菌种类的识别, 成为急需解决的临床问题。

tNGS 在病原体检出率及病原体种类的识别上显著优于传统培养, 整体检出率高达 99.15%, 在病原体检测方面, tNGS 在检测包括肺炎支原体在内的难培养细菌方面显示出靶向优势。与传统培养相比, tNGS 能够更为精准且快速地识别多种病原体, 尤其在多重感染的识别上表现突出。耶氏肺孢子菌是人类免疫缺陷病毒和免疫系统减弱儿童中常见的机会性呼吸道感染病原菌[10], 而常规实验室检查对于该菌的检出率极低, 这与该菌的特殊性相关[11]。本研究结果在 705 例患儿中检出了 11 例耶氏肺孢子菌, 这对于临床诊疗具有重要意义[12]。tNGS 的优势在于其对核酸的直接检测, 不依赖于微生物的生长过程, 从而能检测到包括病毒、细菌和非典型病原体在内的广谱病原体。然而, 这也为临床诊断带来了一定的困惑。结果报告将所有的检出菌均罗列出来, 且尚未参考呼吸道标本是否合格, 以及标本涂片结果, 这存在一定的缺陷, 需结合实验室常规细菌涂片及标本上皮细胞及白细胞数量进行综合判断。本研究发现, tNGS 不仅在细菌的检出方面优于传统方法, 还能有效识别肺炎支原体、人呼吸道合胞病毒等难以培养的病原体, 与文献报道一致[6]。这说明, tNGS 技术的应用可有效弥补传统培养的不足, 特别是在传统方法检测阴性但临床怀疑存在感染的情况以及复杂感染的早期诊断中具有较高的临床价值[13], 以及针对儿童社区获得性肺炎这一类病原体与成人肺炎病原体差异较大的人群中更具临床价值[14]。

在耐药基因方面, tNGS 在本研究中检出了 532 例耐药基因, 尤其是肺炎支原体的 *Mp_23S_rRNA* (A2063G) 和金黄色葡萄球菌的 *mecA*, 分别占比 80.3% 和 8.46%。这一结果表明, tNGS 不仅能识别病原体, 还能提供其耐药性信息, 为临床用药提供依据。Lin 等人估计了 tNGS 在检测 47 例儿童支气管肺泡灌洗液标本中呼吸道病原体和抗菌耐药基因方面的表现, 研究成果证明了 tNGS 在病原体检测方面的优越性, 特别是对多种难培养的病原体, 以及在预测对红霉素和四环素的耐药性方面, 对准确诊断病原体感染和指导临床治疗具有重要意义[15]。Chen 的研究对 245 例儿科肺泡灌洗液标本进行检测, 结果显示肺炎支原体对大环内酯类抗菌药物的耐药率 > 70%, 对克拉霉素的耐药率最高, 其次是罗红霉素、克林霉素、乙酰螺旋霉素、红霉素、阿奇霉素。207 例肺炎支原体 DNA 阳性标本中, 41 例(19.8%)无耐药基因突变, 166 例(80.2%)有耐药基因突变, 其中 154 例(74.4%)在 23S rRNA V 区中心环 2063 位点发生 A→G 突变, 7 例(3.4%)在 2064 位点发生 A→G 突变, 5 例(2.4%)在 2063 和 2064 位点均发生突变[16], 这与本研究结果肺炎支原体 *Mp_23S_rRNA* (A2063G) 耐药基因检出达 80.3% 相符。表明该病原体在儿童社区获得性肺炎(CAP)中的耐药性问题较为突出。该突变位点与大环内酯类抗生素的耐药性密切相关, 临床上这类抗生素是治疗肺炎支原体感染的常用药物。因此, 高检出率提示临床在选择抗生素时需慎重, 可能需要避开大环内酯类药物, 转向其他抗菌方案, 或结合耐药基因检测结果, 进行精准的个体化治疗以提升治疗效果并减少无效用药。然而, tNGS 检测到的耐药基因是否完全代表临床实际的耐药情况仍有待进一步探讨。耐药基因的检出需结合具体的感染环境、宿主免疫状态和实际药物暴露情况来综合评估。已有研究提示, 耐药基因的阳性并不完全等同于临床耐药性, 其在耐药机制中具有重要参考价值, 但仍需通过临床表现及药敏实验进行验证。

本研究的血清学检测结果显示, 肺炎支原体合并呼吸道合胞病毒、肺炎支原体合并甲型流感病毒是常见的合并感染类型, 而 tNGS 检测中则发现肺炎支原体和人类腺病毒 B 型的混合感染较为多见, 一项国内的研究亦表明, 腺病毒是最流行的合并感染生物, 且病毒合并感染在 3 岁以下患者中更常见[17]。该差异可能与血清学检测的特异性和灵敏度不足有关, tNGS 则可直接检测病原体基因组, 不受抗体产生时间的限制。Li [18] 等人通过对 47 例儿科重症肺炎患者的 48 份肺泡灌洗液样本进行回顾性研究, 所有样本均采用多重 PCR 检测和 tNGS 检测, 结果显示 48 份样本中发现了呼吸道合胞病毒(RSV)、腺病毒(ADV)、甲型流感病毒(FLUA)、乙型流感病毒(FLUB)、副流感病毒 1-3 (PIV1-3) 和人偏肺病毒(hMPV) 8 种常见呼吸道病毒, 占 31.2%。以培养、直接荧光抗体法和单链聚合酶链反应的常规测试结果作为 tNGS 结果鉴定的“黄金标准”, tNGS 检测病原体的比例为 70.8% (34/48)。tNGS 与常规检测病原体的比例差异无统计学意义 ($P = 0.232$)。tNGS 对基于常规检测病原体检测的敏感性和特异性分别为 87.1% (95%CI, 71.77%~95.18%) 和 100.0% (95%CI, 62.88%~100%), 阳性预测值和阴性预测值分别为 100.0% (95%CI, 87.35%~100%) 和 64.2% (95%CI, 35.62%~86.02%)。而多重 PCR 结果被用作“黄金标准”, tNGS 总病原体检出率为 83.3% (40/48), 与多重 PCR 的总病原体检出率 ($P = 0.003$) 有显著差异。tNGS 与多重 PCR 相比的敏感性和阳性预测值分别为 83.3% (95%CI, 69.23%~92.03%) 和 100.0% (95%CI, 89.08%~100%)。常规检测、多重 PCR 和 tNGS 证明了高的合并感染率。肺炎支原体(MP)和腺病毒是所有三种检测中检测最频繁的两种病原体, 这与本研究血清学检测结果显示合并感染常见的有肺炎支原体合并呼吸道合胞病毒相一致。多个临床回顾性研究表明: 与单纯肺炎支原体感染患儿相比, 肺炎支原体和腺病毒共感染患儿的临床表现和气管黏膜病变更严重, 更需要氧疗, 合并感染可能导致重症肺炎, 但大多数实验室标志物缺乏特异性[6] [19] [20]。

tNGS 检测肺泡灌洗液、痰液、鼻咽拭子等样本中的细菌和病毒病原体具有良好的检测性能, 但需要更多的研究来建立基于 tNGS 读数或分析平台的解释标准。此外, tNGS 在病原体复合感染的识别上更为敏感, 有助于准确了解感染的实际情况。文献中也提到, tNGS 在病毒间的共感染识别上比血清学更为可

靠[21], 为复合感染的病因分析提供了更为全面的数据支持。

在 tNGS 检测中还检出惠普尔养障体检出 23 例。惠普尔养障体是一种少见的细胞内病原体, 通常与 Whipple 病相关[22], 但近年来的研究表明, 它在免疫功能低下的患者中也可能导致肺部感染。惠普尔养障体感染的肺炎症状常不典型, 可能表现为持续性咳嗽、呼吸困难甚至发热等[23], 与其他呼吸道感染难以区分, 给临床诊断带来挑战。由于传统培养方法难以分离该病原体, 靶向二代测序(tNGS)技术在其检出方面展现出独特优势。tNGS 的应用有助于早期识别惠普尔养障体感染, 为临床提供及时的治疗指导, 特别是对免疫抑制患者来说, 这一早期诊断手段具有重要的临床价值。tNGS 技术的优势在于能够检测到这些特殊病原体, 为疑难病例的诊断和治疗提供了更全面的依据。相关研究也显示, tNGS 在检测少见或罕见病原体方面具有显著的临床价值, 特别适用于传统方法难以检出的病原体, 可以成为补充儿童肺炎常规方法的潜在诊断工具[24]。然后, 本研究中, 传统培养出的约氏不动杆菌、皮氏不动杆菌、抗辐射不动杆菌在 tNGS 中未被检出, 这是由于此研究所用的 98 种呼吸道病原体中并未包含这些病原体, 而导致的漏检, 实验室应时刻关注儿科病原谱的变化而对检测靶向病原菌进行相应的调整以更好的为临床提供诊断价值。

综上所述, 本研究通过比较传统培养、血清学检测与靶向二代测序(tNGS)技术在儿童社区获得性肺炎(CAP)病原体检测中的表现, 全面分析了不同检测方法的优势与局限。结果表明, tNGS 技术在提高病原体检出率、识别复合感染及耐药基因筛查方面具有显著的临床价值, 尤其在难培养病原体和少见病原体的检出上展现了独特的优势。同时, tNGS 提供的耐药基因信息为精准抗感染治疗提供了数据支持。然而, tNGS 的高灵敏度也提示在应用时需结合患者的临床表现, 避免过度诊疗。tNGS 作为一种创新的分子诊断工具, 在儿童 CAP 复杂感染的早期诊断和个体化治疗中具有重要的应用前景。然而本研究是回顾性研究, 对于 tNGS 检出结果无法采用其他独立的方法或平台进行验证, 也是本研究的局限性。

基金项目

S202410570099-2024 年广东省大学生创新训练计划项目; 02-408-240603131031-2023 年度广州医科大学学生创新能力提升计划项目。

参考文献

- [1] Chee, E., Huang, K., Haggie, S. and Britton, P.N. (2022) Systematic Review of Clinical Practice Guidelines on the Management of Community Acquired Pneumonia in Children. *Paediatric Respiratory Reviews*, **42**, 59-68. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2022.01.006>
- [2] Wetzke, M., Schütz, K., Kopp, M.V., Seidenberg, J., Vogelberg, C., Ankermann, T., et al. (2022) Pathogen Spectra in Hospitalised and Nonhospitalised Children with Community-Acquired Pneumonia. *ERJ Open Research*, **9**, Article ID: 00286-2022. <https://doi.org/10.1183/23120541.00286-2022>
- [3] Liu, Y., Zhang, Y., Xu, Q., Qiu, Y., Lu, Q., Wang, T., et al. (2023) Infection and Co-Infection Patterns of Community-Acquired Pneumonia in Patients of Different Ages in China from 2009 to 2020: A National Surveillance Study. *The Lancet Microbe*, **4**, e330-e339. [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(23\)00031-9](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(23)00031-9)
- [4] Kumar, S. (2018) *Mycoplasma pneumoniae*: A Significant but Underrated Pathogen in Paediatric Community-Acquired Lower Respiratory Tract Infections. *Indian Journal of Medical Research*, **147**, 23-31. https://doi.org/10.4103/ijmr.ijmr_1582_16
- [5] Tan, J., Chen, Y., Lu, J., Lu, J., Liu, G., Mo, L., et al. (2025) Pathogen Distribution and Infection Patterns in Pediatric Severe Pneumonia: A Targeted Next-Generation Sequencing Study. *Clinica Chimica Acta*, **565**, Article ID: 119985. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2024.119985>
- [6] Chen, Q., Lin, L., Zhang, N. and Yang, Y. (2024) Adenovirus and *Mycoplasma pneumoniae* Co-Infection as a Risk Factor for Severe Community-Acquired Pneumonia in Children. *Frontiers in Pediatrics*, **12**, Article ID: 1337786. <https://doi.org/10.3389/fped.2024.1337786>
- [7] 梁学耀, 葛谦益, 王伟炳, 等. 浙江省东阳市某医院儿童肺炎患者常见呼吸道病原体的共感染分析[J]. 上海预防

- 医学, 2024, 36(9): 888-893.
- [8] Yoo, I.Y., Seok, H.S., Kwon, J.A., Lee, J., Jo, S., Kim, S.Y., *et al.* (2023) Evaluation of the Biofire® Filmarray® Pneumonia Panel with Conventional Bacterial Culture in Conjunction with Leukocyte Esterase Test. *Diagnostics*, **13**, Article No. 1847. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13111847>
- [9] Toma, P., Bertaina, A., Castagnola, E., Colafati, G.S., D'Andrea, M.L., Finocchi, A., *et al.* (2016) Fungal Infections of the Lung in Children. *Pediatric Radiology*, **46**, 1856-1865. <https://doi.org/10.1007/s00247-016-3696-6>
- [10] Zakrzewska, M., Roszkowska, R., Zakrzewski, M., *et al.* (2019) Pneumocystis Pneumonia: Still a Serious Disease in Children. *Developmental Period Medicine*, **23**, 159-162.
- [11] Dellièvre, S., Amar, Y., Hamane, S., Aissaoui, N., Denis, B., Bergeron, A., *et al.* (2023) Bronchial Aspirate Obtained during Bronchoscopy Yields Increased Fungal Load Compared to Bronchoalveolar Lavage Fluid in Patients at Risk of Invasive Aspergillosis and Pneumocystis Pneumonia. *Medical Mycology*, **61**, myad120. <https://doi.org/10.1093/mmy/myad120>
- [12] 林良康, 杨凡, 乔莉娜, 等. 宏基因组二代测序诊断儿童耶氏肺孢子菌肺炎 1 例并文献复习[J]. 重庆医学, 2023, 52(9): 1352-1355.
- [13] 陶锋, 李一荣, 周艳梅, 等. 靶向宏基因组测序技术在不明原因肺部感染病原学诊断中的价值[J]. 中国病原生物学杂志, 2024, 19(11): 1290-1294.
- [14] 徐晓梅. 病原体靶向高通量测序(tNGS)技术在住院患儿感染性疾病的应用价值[D]: [硕士学位论文]. 合肥: 安徽医科大学, 2023.
- [15] Lin, R., Xing, Z., Liu, X., Chai, Q., Xin, Z., Huang, M., *et al.* (2023) Performance of Targeted Next-Generation Sequencing in the Detection of Respiratory Pathogens and Antimicrobial Resistance Genes for Children. *Journal of Medical Microbiology*, **72**. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001771>
- [16] Chen, D., Zhang, N.L., Zhang, T., *et al.* (2021) Detection of Drug-Resistance Genes of *Mycoplasma pneumoniae* in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Children with Refractory *Mycoplasma pneumoniae* Pneumonia. *Chinese Journal of Contemporary Pediatrics*, **23**, 707-712.
- [17] Zhou, Y., Wang, J., Chen, W., *et al.* (2020) Impact of Viral Coinfection and Macrolide-Resistant *Mycoplasma* Infection in Children with Refractory *Mycoplasma pneumoniae* Pneumonia. *BMC Infectious Diseases*, **20**, Article No. 633.
- [18] Li, F., Wang, Y., Zhang, Y., Shi, P., Cao, L., Su, L., *et al.* (2021) Etiology of Severe Pneumonia in Children in Alveolar Lavage Fluid Using a High-Throughput Gene Targeted Amplicon Sequencing Assay. *Frontiers in Pediatrics*, **9**, Article ID: 659164. <https://doi.org/10.3389/fped.2021.659164>
- [19] Peng, L., Zhong, L.L., Huang, Z., *et al.* (2021) Clinical Features of *Mycoplasma pneumoniae* Pneumonia with Adenovirus Infection in Children. *Chinese Journal of Contemporary Pediatrics*, **23**, 1033-1037.
- [20] Gao, J., Xu, L., Xu, B., Xie, Z. and Shen, K. (2020) Human Adenovirus Coinfection Aggravates the Severity of *Mycoplasma pneumoniae* Pneumonia in Children. *BMC Infectious Diseases*, **20**, Article No. 420. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05152-x>
- [21] Miron, V.D., Bănică, L., Săndulescu, O., Paraschiv, S., Surleac, M., Florea, D., *et al.* (2021) Clinical and Molecular Epidemiology of Influenza Viruses from Romanian Patients Hospitalized during the 2019/20 Season. *PLOS ONE*, **16**, e0258798. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258798>
- [22] James, D.G. and Lipman, M.C. (2002) Whipple's Disease: A Granulomatous Masquerader. *Clinics in Chest Medicine*, **23**, 513-519.
- [23] Symmons, D.P., Shepherd, A.N., Boardman, P.L., *et al.* (1985) Pulmonary Manifestations of Whipple's Disease. *Quarterly Journal of Medicine*, **56**, 497-504.
- [24] Yang, A., Chen, C., Hu, Y., Zheng, G., Chen, P., Xie, Z., *et al.* (2022) Application of Metagenomic Next-Generation Sequencing (MNGS) Using Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) in Diagnosing Pneumonia of Children. *Microbiology Spectrum*, **10**, e148822. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01488-22>