

· 论 著 ·

严重爆炸致烧伤患者感染病原微生物的特征及宏基因组学第二代测序技术在病原微生物检测中的应用

罗汝斌¹ 黄曼² 胡行³ 张嵘⁴ 韩春茂³

¹浙江大学医学院附属第二医院外科重症医学科, 杭州 310009; ²浙江大学医学院附属第二医院综合 ICU, 杭州 310009; ³浙江大学医学院附属第二医院烧伤与创面修复科, 浙江省严重创伤与烧伤诊治重点实验室, 杭州 310009; ⁴浙江大学医学院附属第二医院检验科, 杭州 310009

通信作者: 韩春茂, Email: zrsk@zju.edu.cn

【摘要】 目的 分析严重爆炸致烧伤患者在不同时间段感染病原微生物的特征, 同时探讨宏基因组学第二代测序(mNGS)技术在病原微生物检测中的应用价值。方法 采用回顾性观察性研究方法。2020年6月13日—9月13日浙江大学医学院附属第二医院收治符合入选标准的23例严重爆炸致烧伤患者, 其中男21例、女2例, 年龄(64±5)岁, 烧伤总面积(86±14)%体表总面积。统计入院时, 患者的简明烧伤严重指数(ABSI)评分、修订Baux评分、急性生理学和慢性健康状况评价II(APACHE II)评分和序贯器官衰竭(SOFA)评分。记录患者入院后≤7 d、8~20 d、21~30 d并发症及病原微生物感染来源分布情况, 统计病原微生物检出情况并比较微生物培养法与mNGS检测效能的差异。统计患者入院后感染的病原微生物来源分布总体情况并比较微生物培养法与mNGS检测效能差异。对数据行McNemar和Fisher确切概率法检验。结果 入院时, 患者ABSI评分、修订Baux评分、APACHE II评分和SOFA评分分别为(12.6±2.4)、(91±22)、(26±4)和(10.3±2.3)分。入院后≤7 d, 患者的并发症主要为吸入性损伤、脓毒症休克和低蛋白血症; 患者感染病原微生物的来源主要为创面、血流和肺部。入院后8~20 d, 患者脓毒症休克的发生率最高, 吸入性损伤的发生率明显低于入院后≤7 d($P<0.01$); 病原微生物感染来源仍然以创面、肺部和血流为主, 其中创面和血流感染发生率均明显低于入院后≤7 d($P<0.01$)。入院后21~30 d, 患者仅有多器官功能衰竭和急性呼吸窘迫综合征存在且发生率低, 吸入性损伤的发生率明显低于入院后≤7 d($P<0.01$), 脓毒症休克的发生率明显低于入院后≤7 d($P<0.01$)和入院后8~20 d($P<0.01$); 仅存在较低的血流感染, 创面感染发生率明显低于入院后≤7 d($P<0.01$)和入院后8~20 d($P<0.05$), 肺部和血流感染发生率明显低于入院后≤7 d($P<0.01$)。入院后≤7 d, 革兰阳性菌以金黄色葡萄球菌为主; 革兰阴性菌以肺炎克雷伯菌和嗜麦芽窄食单胞菌为主; 真菌中仅含念珠菌。入院后8~20 d, 革兰阳性菌仍以金黄色葡萄球菌为主, 肠球菌的检出率明显低于入院后≤7 d($P<0.01$); 革兰阴性菌以铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌为主, 且其检出率均明显高于入院后≤7 d($P<0.01$); 新检出了镰刀菌。入院后21~30 d, 革兰阳性菌仍以金黄色葡萄球菌为主, 肠球菌和芽孢杆菌的检出率明显低于入院后≤7 d($P<0.01$); 革兰阴性菌仍以铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌为主, 且随呈时间依赖性增高趋势, 铜绿假单胞菌检出率明显高于入院后≤7 d($P<0.01$)和入院后8~20 d($P<0.01$), 鲍曼不动杆菌的检出率明显高于入院后≤7 d($P<0.01$), 肺炎克雷伯菌检出率均明显低于入院后≤7 d

DOI: 10.3760/ema.j.cn501120-20201017-00440

本文引用格式: 罗汝斌, 黄曼, 胡行, 等. 严重爆炸致烧伤患者感染病原微生物的特征及宏基因组学第二代测序技术在病原微生物检测中的应用[J]. 中华烧伤杂志, 2021, 37(10): 946-952. DOI: 10.3760/ema.j.cn501120-20201017-00440.

Luo RB, Huang M, Hu H, et al. Microbiological characteristics of patients with severe burns caused by blast and application of metagenomics next-generation sequencing in the detection of pathogenic microorganisms[J]. Chin J Burns, 2021, 37(10): 946-952. DOI: 10.3760/ema.j.cn501120-20201017-00440.



($P<0.01$)和入院后 8~20 d($P<0.01$);念珠菌、霉菌、镰刀菌均有检出。在入院后 ≤ 7 d和入院后 8~20 d, mNGS和微生物培养法检出病原微生物的一致性较高($\kappa=0.659, 0.596$);而在入院后 21~30 d, mNGS和微生物培养法检出病原微生物的一致性为中度($\kappa=0.407$)。不同时间段, mNGS的病原微生物阳性检验率是基本恒定的,而微生物培养法呈时间依赖性下降。入院后,创面、血液、痰液和留置导管中共分离出 506 株病原微生物,以金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌为主。创面标本以金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌最为多见,血液标本中以肺炎克雷伯菌多见,在痰液标本中以铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌为主,留置导管标本中以鲍曼不动杆菌最为多见。铜绿假单胞菌在创面和痰液中的检出率均分别显著高于血液($P<0.05$ 或 $P<0.01$)和留置导管($P<0.01$)。mNGS和微生物培养法检测病原微生物总体结果的一致性为中度($\kappa=0.556$),其中血液和留置导管标本的 mNGS与微生物培养法检测病原微生物结果的一致性为高度($\kappa=0.631, 0.619$);而痰液和创面检测结果的一致性为中度($\kappa=0.558, 0.528$)。 **结论** 该研究中的严重爆炸致烧伤患者最常见的感染是创面感染和血流感染。随入院时间的延长,患者感染的病原微生物由金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌和嗜麦芽窄食单胞菌为主转为以鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌为主;mNGS检测与微生物培养法相比,表现出更高的病原微生物阳性检出率。

【关键词】 烧伤; 感染; 宏基因组; 爆炸伤; 微生物学特征; 二代测序

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81601687)

Microbiological characteristics of patients with severe burns caused by blast and application of metagenomics next-generation sequencing in the detection of pathogenic microorganisms

Luo Rubin¹, Huang Man², Hu Hang³, Zhang Rong⁴, Han Chunmao³

¹Department of Surgery Intensive Care Unit, the Second Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, China; ²Department of General Intensive Care Unit, the Second Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, China; ³Department of Burn and Wound Repair, the Second Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Key Laboratory of the Diagnosis and Treatment of Severe Trauma and Burn of Zhejiang Province, Hangzhou 310009, China; ⁴Department of Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, China

Corresponding author: Han Chunmao, Email: zrssh@zju.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To analyze the microbiological characteristics of patients with severe burns caused by blast in different periods and explore the application value of metagenomics next-generation sequencing (mNGS) in detecting pathogenic microorganisms. **Methods** The retrospective observational study was applied. From June 13 to September 13, 2020, twenty-three patients (21 males and 2 females) with severe burns caused by blast who met the inclusion criteria were admitted to the Second Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine, with age of (64±5) years and total burn area of (86±14) % total body surface area. Abbreviated burn severity index (ABSI) score, revised Baux score, acute physiology and chronic health status evaluation (APACHE) II score, and sequential organ failure assessment (SOFA) score were counted on admission. Within 7, 8–20 and 21–30 d after admission, the complications, infection source and distribution of pathogenic microorganisms in patients were recorded. The detection of pathogenic microorganisms was analyzed, and the difference in detection efficiency between microbial culture method and mNGS was compared. After admission, the infection of overall source distribution of pathogenic microorganisms in patients was analyzed, and the difference in detection efficiency between microbial culture method and mNGS was compared. Data were statistically analyzed with McNemar and Fisher exact probability test. **Results** On admission, ABSI score, revised Baux score, APACHE II score and SOFA score were (12.6±2.4), (91±22), (26±4), and (10.3±2.3) respectively. Within 7 d after admission, the main complications of patients were inhalation injury, septic shock, and hypoproteinemia. Patients were mainly infected with pathogenic microorganism on wound, blood stream, and lung. Within 8–20 d after admission, the incidence of septic shock was the highest. The incidence of inhalation injury was significantly lower than that of ≤ 7 d after admission ($P<0.01$), the main source of infection were wound, lung, and blood stream, and the incidence of wound and blood stream infection were significantly lower than that of ≤ 7 d after admission ($P<0.01$). Within 21–30 d after admission, the incidences of multiple organ failure and acute respiratory distress syndrome were low, the incidence of inhalation injury was significantly lower than that of ≤ 7 d after admission ($P<0.01$), and the incidence of septic shock was significantly lower than that of ≤ 7 d after admission ($P<0.01$) and 8–20 d after admission ($P<0.01$). There were only low bloodstream infections, and the incidence of wound infection was significantly lower than that of ≤ 7 d after admission ($P<0.01$) and 8–

20 d after admission ($P<0.05$), and the incidences of lung and blood stream infection were significantly lower than those of ≤ 7 d after admission ($P<0.01$). Within ≤ 7 d after admission, gram-positive bacteria were mainly *Staphylococcus aureus*. Gram-negative bacteria were mainly *Klebsiella pneumoniae* and *Stenotrophomonas maltophilia*. The fungi contained only *Candida*. Within 8–20 d after admission, *Staphylococcus aureus* was mainly the gram-positive bacteria, and the detection rate of *Enterococcus* was significantly lower than that of ≤ 7 d after admission ($P<0.01$). *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* were the main gram-negative bacteria, and their detection rates were significantly lower than those of ≤ 7 d after admission ($P<0.01$). There was a new detection of *Fusarium*. Within 21–30 d after admission, *Staphylococcus aureus* was the mainly gram-positive bacteria, and the detection rates of *Enterococcus* and *Bacillus* were significantly lower than those of ≤ 7 d after admission ($P<0.01$). *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* were still the main gram-negative bacteria, and increased with the extension of time after admission. The detection rate of *Pseudomonas aeruginosa* was significantly higher than that of ≤ 7 d after admission ($P<0.01$) and 8–20 d after admission ($P<0.01$), and the detection rate of *Acinetobacter baumannii* was significantly higher than that of ≤ 7 d after admission ($P<0.01$). The detection rate of *Klebsiella pneumoniae* was significantly lower than those of ≤ 7 d after admission ($P<0.01$) and 8–20 d after admission ($P<0.01$). All *Candida*, *Mould*, *Fusarium* were detected. Within ≤ 7 d and 8–20 d, the consistency between mNGS and bacterial culture was high ($\kappa=0.659, 0.596$). Within 21–30 d after admission, the consistency between mNGS and bacterial culture was moderate ($\kappa=0.407$). In different time periods, the positive test rate of mNGS was basically constant, while that of microbial culture showed a decline with the extension time after admission. Five hundred and six strains of pathogenic microorganisms were isolated from wound, blood, sputum, and indwelling catheter, and *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* were the main pathogenic microorganisms. *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* were the most common in the wound samples, *Klebsiella pneumoniae* was more often seen in blood samples while *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in sputum samples, and *Acinetobacter baumannii* in indwelling catheter samples were the most common. The detection rates of *Pseudomonas aeruginosa* in wound and sputum were significantly higher than those of blood ($P<0.05$ or $P<0.01$) and indwelling catheter ($P<0.01$), respectively. The consistency between the overall results of mNGS and microbial culture were moderate ($\kappa=0.556$). The consistency between mNGS and microbial culture was high in samples of blood and indwelling catheter ($\kappa=0.631, 0.619$), but those were moderate in sputum and wound ($\kappa=0.558, 0.528$).

Conclusions The most common infections of patients with severe burn caused by blast injury were wound infection and blood stream infection. With the extension of time after admission, the main pathogenic bacterial strains of patients changed from *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Stenotrophomonas maltophilia* to *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. mNGS showed a higher positive rate of detecting pathogenic microorganisms than conventional microbial culture.

【Key words】 Burns; Infection; Metagenome; Blast injury; Microbiological characteristics; Next-generation sequencing

Fund program: National Natural Science Foundation of China for Youth (81601687)

当烧伤患者度过休克期后,感染成为最常见和最严重的并发症,也是患者死亡的主要原因。在以往的治疗过程中,由于对病原微生物的检测技术有限,无法早期针对性地给予抗菌药物治疗,导致部分患者病情加重甚至死亡^[1]。伴随宏基因组学第二代测序(mNGS)等分子生物技术的发展,病原微生物培养的时效性得到了改善^[2]。但是由于mNGS是在没有培养扩增的情况下对临床样本中的病原微生物进行全基因组测序,因此不能完全取代微生物培养法检测^[3]。本研究重点分析了温岭爆炸伤事件导致的严重爆炸致烧伤患者在不同时间和不同感染来源的临床特征及病原微生物分布情况,通过与微生物培养法对比,分析mNGS检验的潜在优势。

1 对象与方法

本回顾性研究获浙江大学医学院附属第二医院伦理委员会批准,批号:(2020)伦审研(1000)。根据该医院伦理委员会相关政策,所使用患者病历资料可在不泄漏患者身份的前提下进行分析研究。

1.1 入选标准

纳入标准:(1)温岭爆炸伤事故致伤者。(2)烧伤总面积 $>50\%$ TBSA或Ⅲ度烧伤面积 $>20\%$ TBSA的特重度烧伤患者。(3)年龄 ≥ 18 岁。排除标准:入院后1个月内死亡的患者。

1.2 临床资料

2020年6月13日—9月13日,浙江大学医学院附属第二医院综合ICU收治23例符合入选标准的严重爆炸致烧伤患者,其中男21例、女2例,年龄

(64±5)岁,烧伤总面积为(86±14)%TBSA。17例患者深Ⅱ度烧伤面积>50%TBSA,其中10例患者深Ⅱ度烧伤面积>90%TBSA。患者入院时间为伤后18~24 h,有既往高血压病史者4例、糖尿病3例、呼吸系统疾病5例。

1.3 治疗方法

患者入院后根据“中国新九分法”估算烧伤总面积,所有患者给予气管切开后行机械通气治疗,常规行纤维支气管镜检查、吸痰,中心静脉置管给予液体复苏,视病情给予血管活性药物支持。对于深度烧伤患者,加强换药同时积极行扩创术+逐步自体皮移植或混合移植术。所有患者均单间隔离,常规给予经验性抗菌药物治疗。待病原微生物结果回执后,根据药物敏感试验结果进行抗感染治疗。其中6例给予体外膜氧合治疗。

1.4 样本采集及测定

入院后,患者出现寒战、高热或感染症状时抽取肘静脉血20 mL;收集留置导管近心端标本,操作过程中需避免污染留置导管尖端;使用无菌水冲洗创面表面渗出物后,使用咽拭子采集创面底部分泌物样本。入院后每日常规收集尿液,对患者进行纤维支气管镜辅助吸痰时,采集痰液。将采集到的痰液、尿液、血液标本均分为2份,1份送检至浙江大学附属第二医院实验室,采用全自动微生物鉴定分析系统(法国生物梅里埃公司)进行双瓶微生物培养法检测;另1份送至上海贞固医学检验实验室进行mNGS检测。对以上采集到的标本剔除同一来源的重复菌株和疑似污染菌株。

1.5 观察指标

(1)统计患者入院时,简明烧伤严重指数(ABSI)评分^[4]、修订Baux评分^[5]、急性生理学和慢性健康状况评价Ⅱ(APACHEⅡ)评分、序贯器官衰竭(SOFA)评分。(2)记录患者入院后≤7 d、入院后8~20 d、21~30 d并发症及mNGS法检出病原微生物感染来源分布情况。(3)统计入院后≤7 d、8~20 d、21~30 d mNGS法检出病原微生物情况并比较微生物培养法与mNGS的检测效能。(4)统计患者入院后感染的病原微生物来源分布总体情况并进行微生物培养法与mNGS检测效能的比较。上述3个时间段的样本量依次为213、228和193。

1.6 统计学处理

采用SPSS 23.0统计软件进行分析。计数资料数据用频数(百分率)描述,采用McNemar和Fisher

确切概率法进行检测(软件自动略去该统计量值), $P<0.05$ 为差异有统计学意义。分析不同感染来源和不同时间段mNGS检测和微生物培养之间的一致性, $\kappa<0.400$ 的一致性为差,0.400~0.600为中度,>0.600且≤0.800为高度,>0.800为极好。

2 结果

2.1 患者评分情况

入院时,患者ABSI评分、修订Baux评分、APACHEⅡ评分、SOFA评分分别为(12.6±2.4)、(91±22)、(26±4)、(10.3±2.3)分。

2.2 并发症及病原微生物感染来源分布情况

入院后≤7 d,患者并发症发生率从高到低依次为吸入性损伤、脓毒症休克和低蛋白血症,无MOF、消化道出血、凝血功能障碍、ARDS的发生;病原微生物感染来源的分布从多到少依次为创面感染、血流感染和肺部感染,无尿路、留置导管来源的感染。入院后8~20 d,患者的脓毒症休克发生率最高,然后是消化道出血,MOF、凝血功能障碍、低蛋白血症的发生率相同且较高,ARDS发生率较低,无吸入性损伤的发生,其中吸入性损伤的发生率明显低于入院后≤7 d($P<0.01$);病原微生物感染来源从多到少依次为创面感染、肺部和血流感染、留置导管感染尿路感染,其中创面和血流感染显著少于入院后≤7 d($P<0.01$)。入院后21~30 d,仅有MOF和ARDS存在且发生率低,无前述其他并发症,其中吸入性损伤的发生率明显低于入院后≤7 d($P<0.01$),脓毒症休克的发生率的明显低于入院后≤7 d($P<0.01$)和入院后8~20 d($P<0.01$);仅存在较低的血流感染,无前述其他来源的感染,其中创面感染发生率明显少于入院后≤7 d($P<0.01$)和入院后8~20 d($P<0.05$),肺部和血流感染明显少于入院后≤7 d($P<0.01$)。见表1。

2.3 病原微生物检出情况及微生物培养法与mNGS检测效能的比较

入院后≤7 d,革兰阳性菌中以金黄色葡萄球菌为主,其次依次为肠球菌和芽孢杆菌;革兰阴性菌以肺炎克雷伯菌和嗜麦芽窄食单胞菌为主,其次依次为鲍曼不动杆菌、黏质沙雷菌、铜绿假单胞菌、阴沟肠杆菌和洋葱伯克霍尔德菌;真菌中仅含念珠菌,无霉菌和镰刀菌。入院后8~20 d,革兰阳性菌仍以金黄色葡萄球菌为主,肠球菌的检出率明显低于入院后≤7 d($P<0.01$);革兰阴性菌以铜绿假单胞菌

表 1 入院后不同时间段 23 例严重爆炸致烧伤患者的并发症发生情况及病原微生物感染来源分布情况 [例 (%)]

时间 段(d)	并发症						感染来源					
	吸入性 损伤	脓毒症 休克	MOF	消化道 出血	凝血功 能障碍	ARDS	低蛋白 血症	尿路	留置 导管	肺部	创面	血流
≤7	14(60.87)	8(34.78)	0	0	0	0	4(17.39)	0	0	8(34.78)	17(73.91)	16(69.57)
8~20	0 ^a	7(30.43)	3(13.04)	5(21.74)	3(13.04)	1(4.35)	3(13.04)	1(4.35)	3(13.04)	4(17.39)	6(26.09) ^a	4(17.39) ^a
21~30	0 ^a	0 ^{ab}	1(4.35)	0	0	1(4.35)	0	0	0	0 ^a	0 ^{ac}	1(4.35) ^a

注:MOF为多器官功能衰竭,ARDS为急性呼吸窘迫综合征;与入院<7 d比较,^aP<0.01;与入院后8~20 d比较,^bP<0.01,^cP<0.05

和鲍曼不动杆菌为主,且其检出率均明显高于入院后≤7 d($P<0.01$),嗜麦芽窄食单胞菌的检出率也较高;真菌中除念珠菌外,还出现了镰刀菌。入院后21~30 d,革兰阳性菌也仍以金黄色葡萄球菌为主,肠球菌和芽孢杆菌的检出率明显低于入院后≤7 d($P<0.01$);革兰阴性菌仍以铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌为主,且铜绿假单胞菌的检出率明显高于入院后≤7 d($P<0.01$)和入院后8~20 d($P<0.01$),鲍曼不动杆菌的检出率明显高于入院后≤7 d($P<0.01$),肺炎克雷伯菌检出率均明显低于入院后≤7 d($P<0.01$)和入院后8~20 d($P<0.01$);真菌中同时检出了镰刀菌、霉菌和念珠菌。见表2。

在入院后≤7 d和8~20 d,mNGS和微生物培养法检出病原微生物的一致性为中、高度($\kappa \geq 0.400$ 且 ≤ 0.800);而在入院后21~30 d后,mNGS和微生物培养法检出病原微生物的一致性为中度($\kappa \geq 0.400$ 且 ≤ 0.600)。mNGS在不同时间段,病原微生物的阳性检出率是基本恒定的,均在70%左右,而微生物培养法的病原微生物阳性检出率呈时间依赖性下降。见表3。

2.4 病原微生物来源分布的总体情况及微生物培养法与mNGS检测效能的比较

患者入院后,病原微生物在不同来源分布不同,从高到低依次为痰液、创面、血液和留置导管;包含378株革兰阴性细菌、103株革兰阳性细菌和25株真菌,以铜绿假单胞菌(93株,占18.38%)、鲍

曼不动杆菌(89株,占17.59%)、金黄色葡萄球菌(72株,占14.23%)、肺炎克雷伯菌(71株,占14.03%)和嗜麦芽窄食单胞菌(70株,占13.8%)为主。其中,铜绿假单胞菌在创面和痰液中的检出率均分别显著高于血液($P<0.05$ 或 $P<0.01$)和留置导管($P<0.01$)。见表4。mNGS和微生物培养法检测病原微生物的总体结果一致性为中度($\kappa \geq 0.400$ 且 ≤ 0.600)(表5)。血液和留置导管的mNGS检测结果与微生物培养法的一致性为高度($\kappa > 0.600$ 且 ≤ 0.800);而在痰液、创面标本的一致性为中度($\kappa \geq 0.400$ 且 ≤ 0.600),见表6。

3 讨论

临床上,以微生物培养法双份血流感染标本呈阳性作为“金标准”^[6-7]。但相较于微生物培养法,mNGS检测所需时间更短,更能适应烧伤患者迅速发展的病情,及时明确病原微生物种类进而根据药物敏感试验结果有针对性地用药。本研究显示,mNGS检测总体病原微生物的结果和微生物培养法的一致性为中度,这与既往研究^[8-9]基本一致。

本研究结果显示,有近70%(16/23)的患者在入院1周内发生血流感染且以金黄色葡萄球菌为主。这与既往研究中87%的烧伤患者住院第1周内发生血流感染并以革兰阳性菌最为常见,尤其是金黄色葡萄球菌的结果^[10-12]基本一致。本研究团队认为,入院早期的血流感染可能与创面失活导致渗出液

表 2 入院后不同时间段 23 例严重爆炸致烧伤患者感染病原微生物的检出株 [频数 (%)]

时间 段(d)	菌株 数 (株)	革兰阳性菌				革兰阴性菌					真菌			
		金黄色 葡萄球菌	肠球菌	芽孢 杆菌	铜绿 假单胞菌	鲍曼 不动杆菌	SM	阴沟 肠杆菌	肺炎 克雷伯菌	BC	黏质 沙雷菌	念珠菌	霉菌	镰刀菌
≤7	192	33(17.19)	15(7.81)	10(5.21)	12(6.25)	14(7.29)	35(18.23)	11(5.73)	38(19.79)	6(3.12)	14(7.29)	4(2.08)	0	0
8~20	150	20(13.33)	2(1.33) ^a	3(2.00)	26(17.33) ^a	31(20.67) ^a	22(14.67)	6(4.00)	24(16.00)	3(2.00)	8(5.33)	2(1.33)	0	3(2.00)
21~30	164	19(11.59)	1(0.61) ^a	0 ^a	55(33.54) ^{ab}	44(26.83) ^a	13(7.93)	3(1.83)	9(5.49) ^{ab}	2(1.22)	2(1.22)	3(1.83)	5(3.05)	8(4.88)
P值		0.642	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.072	0.412	<0.001	0.621	0.221	0.898	0.346	0.116

注:SM为嗜麦芽窄食单胞菌,BC为洋葱伯克霍尔德菌;念珠菌包括白色念珠菌、热带念珠菌、近平滑念珠菌,霉菌包括根霉菌、毛霉菌、曲霉菌;P值为不同时间段微生物总体比较所得;与入院后≤7 d比较,^aP<0.01;与入院后8~20 d比较,^bP<0.01

表 3 入院后不同时间段 23 例严重爆炸致烧伤患者感染病原微生物的宏基因组学第二代测序(mNGS)法和微生物培养法结果一致性比较

时间段(d)与微生物培养法结果	mNGS法结果		κ 值
	阳性	阴性	
≤7			
阳性	140	18	0.659
阴性	11	44	
8~20			
阳性	139	18	0.596
阴性	21	50	
21~30			
阳性	110	14	0.407
阴性	35	34	

注:3个不同时间段的样本数依次为190、150、164

中细菌繁殖、患者局部和全身防御功能受损、留置导管感染有关。金黄色葡萄球菌的毒性会导致机体免疫反应、凝血功能障碍和内皮细胞受损进而诱发脓毒症^[13]。入院21 d后,铜绿假单胞菌等革兰阴性菌的检出比例明显升高,这与Sousa等^[14]研究结果——患者入院4周后,铜绿假单胞菌的发生率超过了金黄色葡萄球菌和克雷伯菌属细菌相似。这种差异的可能原因是伴随着抗菌药物的使用及早期清创术,感染减少,创面不再作为唯一的感染源^[15]。入院8 d后,部分患者血流感染中出现了新的耐药微生物,如曲霉菌、镰刀菌,可能与院内感染有关;还可能是细菌易位(bacteria translocation)导

致,如当肠道细菌过度生长或肠道黏膜上皮存在物理损伤时,细菌会从肠道黏膜上皮转移到血液中,进而导致革兰阴性菌的血液感染^[16]。机体对革兰阴性菌的免疫反应失调也可导致血管内皮和微血管功能障碍以及细胞代谢重编程^[17-18],甚至可发展为脓毒症休克、MOF和死亡^[19]。本研究对患者采取ICU集中救治策略。治疗3周后,8例患者出现顽固的脓毒血症,采用mNGS检测显示8个创面、1个血液、2个痰标本均存在镰刀菌(另文发表)。镰刀菌感染多见于免疫力低下人群,由于其易形成生物膜产生抗药性,常导致治疗失败。Grumaz等^[20]在连续7个时间点对48例脓毒症患者的256个血浆样本进行mNGS分析,结果显示脓毒症发作7 d内微生物培养的阳性检出率为33%,mNGS的阳性检出率为72%;28 d时,微生物培养法的阳性检出率仅为11%,而mNGS鉴定的阳性检出率高达71%。本研究也得到了前述类似结果,分析原因,可能与微生物培养过程中的标本采集、抗生素使用、周围环境的高污染率等有关,最终导致微生物培养检测的敏感度和特异度较低;而mNGS检测主要是通过分子和质谱技术直接检测,是在没有培养扩增的情况下对临床样本中的病原微生物进行全基因组测序,因而阳性检测率较高。基于此,本研究认为早期可根据微生物培养法和mNGS检测结果进行综合评估,后期应更加重视mNGS检测结果。

本研究存在一定的局限性。首先本研究为单

表 4 入院后 23 例严重爆炸致烧伤患者不同来源标本的病原微生物分布[株(%)]

标本来源	菌株数(株)	革兰阳性菌					革兰阴性菌					真菌		
		金黄色葡萄球菌	肠球菌	芽孢杆菌	铜绿假单胞菌	鲍曼不动杆菌	SM	阴沟肠杆菌	肺炎克雷伯菌	BC	黏质沙雷菌	念珠菌	霉菌属	镰刀菌
创面	150	27(18.00)	7(4.67)	10(6.67)	30(20.00)	7(4.67)	21(14.00)	7(4.67)	18(12.00)	2(1.33)	5(3.33)	3(2.00)	5(3.33)	8(5.33)
血液	58	8(13.79)	0	0	3(5.17) ^a	9(15.52)	10(17.24)	2(3.45)	15(25.86)	3(5.17)	5(8.62)	2(3.45)	0	1(1.72)
痰液	269	32(11.90)	11(4.09)	3(1.12)	55(20.45) ^b	60(22.30) ^{ab}	38(14.13)	11(4.09)	33(12.27)	6(2.23)	14(5.20)	4(1.49)	0	2(0.74)
留置导管	29	5(17.24)	0	0	5(17.24) ^{cd}	13(44.83) ^{cd}	1(3.45)	0	5(17.24)	0	0	0	0	0
P值		0.572	0.571	0.564	<0.001	<0.001	0.438	0.686	0.386	0.425	0.278	0.519	0.608	0.397

注:SM为嗜麦芽窄食单胞菌,BC为洋葱伯克霍尔德菌;念珠菌包括白色念珠菌、热带念珠菌、近平滑念珠菌,霉菌包括根霉菌、毛霉菌、曲霉菌;P值为各标本来源微生物总体比较所得;与创面标本比较,^aP<0.05,^bP<0.01;与血液标本比较,^cP<0.01;与痰液标本比较,^dP<0.01

表 5 入院后严重爆炸致烧伤患者感染病原微生物的宏基因组学第二代测序(mNGS)法和微生物培养法总体结果一致性比较

微生物培养法结果	mNGS法结果		κ 值
	阳性	阴性	
阳性	389	50	0.556
阴性	67	128	

中心且样本量较小,需要进一步进行多中心研究证实结论。其次,本研究中微生物培养法结果存在一定程度的假阳性和假阴性,导致分析mNGS的准确性存在一定的误差。最后,本研究为回顾性研究,仅评估了不同时间段内的病原微生物变化情况,未能分析抗菌药物对结果的影响,在患者的治疗过程

表 6 入院后不同来源的严重爆炸致烧伤患者感染病原微生物宏基因组学第二代测序(mNGS)法和微生物培养法结果一致性比较

标本来源与微生物培养法结果	mNGS法结果		κ 值
	阳性	阴性	
创面			
阳性	124	16	0.558
阴性	20	39	
血液			
阳性	54	0	0.631
阴性	8	9	
痰液			
阳性	185	34	0.528
阴性	36	77	
留置导管			
阳性	26	0	0.619
阴性	3	3	

注:创面、血液、痰液、留置导管的样本数依次为 150、58、269、29

中可根据微生物培养结果,遵循已有的专家共识给予抗菌治疗。

总之,本研究中最常见的感染是创面感染和血流感染。最常见的病原微生物是金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌和肺炎克雷伯菌。严重烧伤患者存在异体植皮等有创操作及留置导管等高危险因素,病情发展快。mNGS 技术可明显缩短检测时间(6~48 h),迅速获得病原体感染或入血证据,及时给临床医师提供用药依据。由于烧伤患者创面病原体的载量较高,送检标本应尽量选取深部组织或体液,进行冷链运输以提高 mNGS 检测的可靠性。尽管 mNGS 检测的最佳时间窗仍未确定,但随着入院时间的延长,mNGS 检测比常规微生物培养法具有更高的阳性检出率,尤其适用于微生物培养法阴性检测结果的患者。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Giannella M, Bartoletti M, Gatti M, et al. Advances in the therapy of bacterial bloodstream infections[J]. Clin Microbiol Infect, 2020, 26(2):158-167. DOI:10.1016/j.cmi.2019.11.001.
- [2] Lamy B, Sundqvist M, Idelevich EA. Bloodstream infections-standard and progress in pathogen diagnostics[J]. Clin Microbiol Infect, 2020, 26(2):142-150. DOI:10.1016/j.cmi.2019.11.017.
- [3] Greninger AL, Naccache SN. Metagenomics to assist in the diagnosis of bloodstream infection[J]. J Appl Lab Med, 2019, 3(4): 643-653. DOI:10.1373/jalm.2018.026120.
- [4] Bartels P, Thamm OC, Elrod J, et al. The ABSI is dead, long live the ABSI-reliable prediction of survival in burns with a modified Abbreviated Burn Severity Index[J]. Burns, 2020, 46(6):1272-1279. DOI:10.1016/j.burns.2020.05.003.

- [5] Osler T, Glance LG, Hosmer DW. Simplified estimates of the probability of death after burn injuries: extending and updating the baux score[J]. J Trauma, 2010, 68(3):690-697. DOI: 10.1097/TA.0b013e3181c453b3.
- [6] Blanton RE. Population structure and dynamics of helminthic infection: schistosomiasis[J]. Microbiol Spectr, 2019, 7(4):10.1128/microbiolspec.AME-0009-2019. DOI:10.1128/microbiolspec.AME-0009-2019.
- [7] Diallo K, Thilly N, Luc A, et al. Management of bloodstream infections by infection specialists: an international ESCMID cross-sectional survey[J]. Int J Antimicrob Agents, 2018, 51(5): 794-798. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2017.12.010.
- [8] 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. DOI: 10.1038/s41564-018-0349-6.
- [9] 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. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.02.006.
- [10] Timsit JF, Ruppé E, Barbier F, et al. Bloodstream infections in critically ill patients: an expert statement[J]. Intensive Care Med, 2020, 46(2):266-284. DOI:10.1007/s00134-020-05950-6.
- [11] Seymour CW, Gesten F, Prescott HC, et al. Time to treatment and mortality during mandated emergency care for sepsis[J]. N Engl J Med, 2017, 376(23):2235-2244. DOI:10.1056/NEJMoa1703058.
- [12] Patel BM, Paratz JD, Mallet A, et al. Characteristics of bloodstream infections in burn patients: an 11-year retrospective study[J]. Burns, 2012, 38(5):685-690. DOI:10.1016/j.burns.2011.12.018.
- [13] Kwiecinski JM, Horswill AR. Staphylococcus aureus bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms[J]. Curr Opin Microbiol, 2020, 53:51-60. DOI:10.1016/j.mib.2020.02.005.
- [14] Sousa D, Ceniceros A, Galeiras R, et al. Microbiology in burns patients with blood stream infections: trends over time and during the course of hospitalization[J]. Infect Dis (Lond), 2018, 50(4):289-296. DOI:10.1080/23744235.2017.1397738.
- [15] Altparlak U, Erol S, Akcay MN, et al. The time-related changes of antimicrobial resistance patterns and predominant bacterial profiles of burn wounds and body flora of burned patients[J]. Burns, 2004, 30(7):660-664. DOI:10.1016/j.burns.2004.03.005.
- [16] Nagpal R, Yadav H. Bacterial translocation from the gut to the distant organs: an overview[J]. Ann Nutr Metab, 2017, 71 (Suppl 1): S11-16. DOI:10.1159/000479918.
- [17] Pool R, Gomez H, Kellum JA. Mechanisms of organ dysfunction in sepsis[J]. Crit Care Clin, 2018, 34(1): 63-80. DOI: 10.1016/j.ccc.2017.08.003.
- [18] Bermejo-Martin JF, Martin-Fernandez M, LopezMestanza C, et al. Shared features of endothelial dysfunction between sepsis and its preceding risk factors (aging and chronic disease)[J]. J Clin Med, 2018, 7(11):1-15. DOI: 10.3390/jcm7110400.
- [19] Conway-Morris A, Wilson J, Shankar-Hari M. Immune activation in sepsis[J]. Crit Care Clin, 2018, 34(1): 29-42. DOI: 10.1016/j.ccc.2017.08.002.
- [20] Grumaz S, Grumaz C, Vainshtein Y, et al. Enhanced performance of next-generation sequencing diagnostics compared with standard of care microbiological diagnostics in patients suffering from septic shock[J]. Crit Care Med, 2019, 47(5):e394-e402. DOI: 10.1097/CCM.0000000000003658.

(收稿日期:2020-10-17)