

• 临床研究 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2025.11.022

网络首发 <https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20250923.1312.004>(2025-09-23)tNGS 在甲型流感患者中的应用^{*}孙青¹, 冯颖², 仇亚莉^{2△}, 郑国军³

(南京医科大学常州医学中心常州市第三人民医院:1. 临床技能教研室;2. 呼吸与危重症医学科;3. 检验科, 江苏常州 213000)

[摘要] 目的 探讨靶基因二代测序(tNGS)在检测甲型流感病毒中的应用价值。方法 回顾性分析2024年10月至2025年2月该院116例疑似甲型流感患者的临床资料。所有患者因发热及肺部感染进行痰液tNGS及咽拭子流感核酸检测,比较两种检测方法的诊断效能。结果 在116例患者中确诊93例甲型流感患者。在93例甲型流感患者中,tNGS的检出率高于流感核酸检测,差异有统计学意义($P<0.05$)。tNGS、流感核酸检测甲型流感结果与确诊结果有明显的一致性($P<0.05$)。流感核酸阳性组和阴性组tNGS序列数差异有统计学意义($P<0.05$)。将23例被排除甲型流感诊断的患者设为对照组,流感核酸阳性组、阴性组、对照组WBC比较差异有统计学意义($P<0.05$),C反应蛋白(CRP)和血清淀粉样蛋白A(SSA)比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 tNGS在检测甲型流感病毒方面具有明显优势,联合外周血感染相关指标进行综合诊断,可能为流感病毒感染性疾病的早期诊断和治疗提供更有效的手段。

[关键词] tNGS; 流感核酸; 甲型流感; 病原体; 诊断**[中图法分类号]** R511.7**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2025)11-2612-04Application of tNGS in patients with influenza A^{*}SUN Qing¹, FENG Ying², QIU Yali^{2△}, ZHENG Guojun³

(1. Clinical Skills Teaching and Research Office; 2. Department of Respiratory and Critical Care Medicine; 3. Laboratory Department, Nanjing Medical University Changzhou Medical Center / Third People's Hospital of Changzhou, Changzhou, Jiangsu 213000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the application value of targeted next-generation sequencing (tNGS) in the detection of influenza A virus. **Methods** A retrospective analysis was conducted on the clinical data of 116 patients suspected of having influenza A at our hospital from October 2024 to February 2025. All patients underwent sputum tNGS and throat swab influenza nucleic acid tests due to fever and pulmonary infection, and the diagnostic efficacy of the two methods was compared. **Results** Among 116 patients, 93 were diagnosed with influenza A. Among these 93 influenza A patients, the detection rate of tNGS was higher than that of influenza nucleic acid testing ($P<0.05$). The results of tNGS and influenza nucleic acid testing for influenza A showed significant consistency with the confirmed diagnosis ($P<0.05$). There was a statistically significant difference in tNGS sequence counts between the influenza nucleic acid-positive and negative groups ($P<0.05$). Twenty-three patients excluded from influenza A diagnosis served as the control group. Comparisons of white blood cell (WBC) counts among the influenza nucleic acid-positive group, negative group, and control group showed statistically significant differences ($P<0.05$), whereas comparisons of C-reactive protein (CRP) and serum amyloid A (SAA) showed no statistically significant differences ($P>0.05$). **Conclusion** tNGS demonstrates significant advantages in detecting influenza A virus. Combined with peripheral blood infection-related indicators for comprehensive diagnosis, it may provide a more effective approach for early diagnosis and treatment of influenza virus infectious diseases.

[Key words] tNGS; influenza nucleic acid; influenza A; pathogens; diagnosis

甲型流感是一种高致病性的急性呼吸道传染病,由甲型流感病毒引发,该病毒传播速度快、波及范围广,对公众健康构成了严重的威胁^[1]。在全球范围内,甲型流感的周期性爆发常常导致大量人群感染患

^{*} 基金项目:南京医科大学常州医学中心项目(CMCB202323)。[△] 通信作者, E-mail: quiyali2002@163.com。

病,尤其在冬、春季节发病率明显上升,且有致死性,给医疗卫生系统带来沉重负担^[2]。及时且精准地检测出甲型流感病毒,对于患者的有效治疗、疫情的防控及降低疾病传播风险至关重要。传统的甲型流感病毒检测方法在临床实践中应用已久,但各有优劣。因此,本研究通过对比传统咽拭子流感核酸检测,探讨靶基因二代测序(targeted next generation sequencing,tNGS)技术在甲型流感病毒检测中的应用价值,评估其诊断准确性,旨在为临床诊疗提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

回顾性分析 2024 年 10 月至 2025 年 2 月本院 116 例疑似甲型流感患者的临床资料,所有患者因发热及肺部感染进行痰液 tNGS 及咽拭子流感核酸检测。纳入标准:符合《流行性感冒诊疗方案(2019 版)》的诊断标准^[2]。排除标准:(1)仅进行 tNGS 检测,未行咽拭子流感核酸检测;(2)仅进行咽拭子流感核酸检测,未行 tNGS 检测;(3)合并其他病毒感染。本研究已通过本院伦理委员会批准(审批号:02AA024004),免除患者知情同意。

1.2 试剂与仪器

核酸纯化试剂盒(广州市金圻睿生物科技有限责任公司,KS118-BYTQ-96),基因测序仪(广州市金圻睿生物科技有限责任公司,km miniseqdx-cn),自动核酸-蛋白质分析仪(光鼎电子股份有限公司,Qsep100),病原微生物数据分析和管理系统 1.0(广州市金圻睿生物科技有限责任公司),全自动核酸检测分析仪及配套试剂(北京尤卡迪生物科技股份有限公司,Flash10)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集

收集患者痰液和咽拭子,严格按标准采集流程操作,将标本分别送检进行 tNGS 检测和流感核酸检测。通过电子病历系统查询患者同期全血细胞计数、C 反应蛋白(C reactive protein,CRP)及血清淀粉样蛋白 A(serum amyloid A protein,SSA)检测结果,这些指标可以反映患者的感染状态及炎症反应程度,为后续的综合分析提供重要依据^[3]。

1.3.2 传统检测及其他相关检查

采用荧光 PCR 法进行 3 种呼吸道病原菌核酸检测,包括新型冠状病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒。荧光 PCR 法是成熟且广泛应用的核酸检测技术,通过荧光信号实时监测 PCR 扩增,与标准品对比实现病原体核酸定量检测^[4-6]。同时,所有患者行流感病毒抗原快速检测(胶体金法)作为参照;胸部 DR 或 CT 资料由影像科 2 名高年资医师盲法复核。最终确诊以荧光 PCR 阳性为参考标准;荧光 PCR 阴性但 tNGS 阳性者,经 2 名高年资医师结合临床表现复核

后亦归入确诊。

1.3.3 tNGS 检测

采集的标本使用 tNGS 技术对 198 种微生物进行平行检测,通过生物信息技术鉴定样本中的可疑病原体^[7-9],并行 DNA 及 RNA 检测。

1.4 统计学处理

采用 SPSS25.0 软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,两两比较采用 *t* 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。以 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 基本特征

116 例患者中确诊甲型流感 93 例,其中男 51 例,女 42 例,平均年龄(47.40 ± 0.72)岁;患者均表现为发热、咳嗽、咽痛等典型流感症状,其中 28%(26/93)合并咳痰、呼吸困难等肺部并发症。年龄分布显示,>50 岁患者占 53%(49/93),≤50 岁患者占 47%(44/93)。

在流感核酸阳性的 54 例患者中,男性占比明显高于女性(70% vs. 30%, $\chi^2 = 9.24, P = 0.002$),且吸烟者的阳性率为 46%(25/54),略低于非吸烟者 54%(29/54)。合并基础疾病的患者中,高血压(67%,36/54)、冠心病(41%,22/54)、糖尿病(35%,19/54)及慢性阻塞性肺疾病(44%,24/54)的流感核酸阳性率比较差异有统计学意义($\chi^2 = 12.37, P = 0.006$)。tNGS 检测在 93 例患者中均成功检出甲型流感病毒。

2.2 流感核酸和 tNGS 检测对甲型流感的准确性

在 93 例甲型流感患者中,tNGS 的检出率明显高于流感核酸($P < 0.05$),见表 1。tNGS 与流感核酸检测结果均与确诊结果存在明显一致性,见表 2、3。

表 1 两种检测方式诊断甲型流感比较(%)

项目	灵敏度	特异度	阳性预测值	阴性预测值
tNGS 检测	100	100	100	100
流感核酸检测	58	100	100	37

表 2 tNGS 检测结果与确诊结果的一致性(n)

项目	确诊甲型流感阳性	确诊甲型流感阴性	总计
tNGS 阳性	93	0	93
tNGS 阴性	0	23	23
χ^2		124.580	
<i>P</i>		0.001	

2.3 流感核酸阳性组和阴性组 tNGS 序列数比较

流感核酸阳性组 tNGS 序列数($18.816.9 \pm 3.447.7$)多于阴性组($12.348.8 \pm 3.278.9$),差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 外周血感染相关指标比较

将 23 例被排除甲型流感诊断的患者设为对照组, 流感阳性组、阴性组、对照组 WBC 比较差异有统计学意义 ($F = 10.960, P = 0.032$), CRP 和 SSA 比较差异无统计学意义 ($F = 6.300, P = 0.067; F = 32.880, P = 0.059$), 见表 4。

表 3 流感核酸检测结果与确诊结果的一致性(n)

项目	确诊甲型流感阳性	确诊甲型流感阴性	总计
流感核酸阳性	54	0	54
流感核酸阴性	39	23	62
χ^2		24.090	
P		0.001	

表 4 外周血感染相关指标比较($\bar{x} \pm s$)

项目	n	WBC($\times 10^9/L$)	CRP(mg/L)	SSA(mg/L)
流感阳性组	54	5.30 \pm 1.11	26.90 \pm 7.23	224.50 \pm 30.88
流感阴性组	39	4.60 \pm 1.63	24.90 \pm 8.11	189.70 \pm 47.41
对照组	23	6.89 \pm 3.22	20.40 \pm 6.21	145.50 \pm 44.08
P		0.032	0.067	0.059
F		10.960	6.300	32.880

3 讨 论

本研究结果表明, 痰液 tNGS 在甲型流感检出率明显高于咽拭子流感核酸检测, 证实了其在流感病毒诊断方面的重要价值^[10]。tNGS 技术的突出优势在于其高通量检测能力, 能够同时对多种微生物进行平行检测, 突破了传统检测方法仅针对已知病毒核酸序列设计引物和探针的限制^[11]。在甲型流感病毒发生抗原漂移或抗原转变时, 传统核酸检测可能因引物和探针的不匹配而出现漏检, 但 tNGS 凭借其全面的检测范围和对未知序列的检测能力, 能及时发现变异的病毒株^[11]。此外, tNGS 不仅可以检测到病毒, 还能对病毒的基因序列进行深度分析^[12]。通过对病毒基因序列的解读, 可以获取病毒的亚型信息、溯源病毒的传播路径, 为流感防控提供关键线索, 有助于及时采取防控措施, 阻断病毒的传播链条, 降低疫情的传播风险^[13-20]。

尽管 tNGS 在甲型流感病毒的检测中展现出诸多优势, 但其局限性也不容忽视。tNGS 检测所需时间相对较长, 从标本采集到最终得到检测结果, 一般需要 1~2 d。对于那些急需快速诊断并及时治疗的患者来说, 这一不足可能会延误病情^[19]。tNGS 的检测成本较高, 这是限制 tNGS 广泛应用的重要因素之一。在医疗资源相对匮乏的地区或基层医疗机构, 难以大规模开展 tNGS 检测^[21]。tNGS 检测结果的解读需要专业的生物信息学知识和技术支持, 对实验室人员的专业素养要求较高。若缺乏专业的解读能力,

会导致对检测结果的误判, 影响临床诊断和治疗决策^[22]。此外, tNGS 检测还面临着假阳性和假阴性结果的问题。因此, tNGS 在甲型流感病毒检测中虽有巨大潜力, 但要得到广泛应用, 必须克服检测时间长、成本高、结果解读困难等问题。

本研究发现流感核酸阳性和阴性患者的 tNGS 序列有差异, 这一现象可能由多种因素共同导致。标本采集环节是影响检测结果的重要因素之一, 不同的采集位置, 如痰液和咽拭子, 其病毒的含量和分布可能会存在明显差异。此外, 采集人员的操作差异, 如采集的深度、力度、采集量等不一致, 也会导致标本中病毒的含量不同, 影响 tNGS 检测到的病毒序列数。标本的运输和保存条件同样对检测结果有着重要影响。此外, 在实验室检测过程中, 实验操作的规范性、仪器设备的稳定性及数据分析算法的准确性等因素, 都可能对 tNGS 的检测结果造成干扰, 影响病毒序列数的准确性和可靠性。因此, tNGS 序列数高的患者甲型流感核酸阳性率可能更高, 这与病毒载量可能有一定相关性, 需要进一步的研究。

本研究也表明, 分子检测手段联合外周血感染相关指标, 对于流感病毒感染性疾病的早期诊断具有重要意义。在临床实践中, 单一的检测方法往往存在局限性, 难以全面、准确地诊断疾病。流感核酸检测虽然具有较高的特异性, 但存在一定的假阴性率; tNGS 检测虽然灵敏度高, 但存在检测时间长、成本高的问题^[23-24]。将二者联合使用, 并结合外周血感染相关指标, 如 WBC、CRP 和 SSA 等, 可以从不同角度综合评估患者的感染情况^[25-28]。对于甲型流感核酸检测阴性但临床症状高度怀疑为甲型流感的患者, 结合 tNGS 检测结果及外周血 WBC 等指标, 可以更准确地判断患者是否感染甲型流感病毒, 避免漏诊。同时, 外周血感染相关指标的变化还可以反映患者的炎症反应程度及病情严重程度^[29-32], 为临床治疗方案的制订提供重要参考依据, 从而实现精准治疗, 提高治疗效果。

虽然 tNGS 在甲型流感病毒检测方面具有优势, 但单一检测技术往往存在局限性。为提升检测效能, 探索 tNGS 与其他检测技术的联合应用具有重要意义。例如, tNGS 与免疫检测技术联用可快速初筛并精准诊断流感, 提高检测效率、减少成本; tNGS 与即时检验(point-of-care testing, POCT)技术联用能构建多层次检测体系, 满足不同临床需求。但实现有效联用需建立标准化方案、考虑成本效益并加强人员培训。未来可将 tNGS 技术与其他新兴技术, 如人工智能、大数据分析等相结合, 打造更加智能化、精准化的诊断体系, 为临床医生提供更全面、准确的诊断信息, 推动临床诊断水平不断提高, 更好地应对甲型流感等感染性疾病的挑战^[23]。

综上所述, tNGS 在检测甲型流感病毒方面展现出明显优势, 为临床诊断和流感防控提供了有力的技术支持。尽管目前仍面临一些挑战, 但随着技术的不断发展和完善, tNGS 有望在流感的诊断和防控中发挥更加重要的作用。联合外周血感染相关指标进行综合诊断, 也将为流感病毒感染性疾病的早期诊断和治疗提供更有效的手段。

参考文献

- [1] 国家卫生健康委员会, 国家中医药管理局. 流行性感冒诊疗方案(2020 年版)[J]. 传染病信息, 2020, 33(5):385-390.
- [2] 于学忠, 陈玉国, 赵晓东, 等. 中国成人流行性感冒诊疗规范急诊专家共识[J]. 中国急救医学, 2019, 39(10):915-928.
- [3] REN Y, SANG X, LIU X, et al. Predictive value of BALF IL-6, serum IL-6, CRP and SSA on pleural effusion in children with MPP[J]. Open J Clin Med Case Rep, 2024, 2024:2229.
- [4] 张亚旭, 刘紫烟. 荧光 PCR 扩增相关技术[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2021, 37(7):890-899.
- [5] 刘宇, 吴蕴怡, 王潇潇, 等. 含有内部阳性对照的支原体荧光 PCR 检测方法的建立及验证[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2024, 44(9):792-800.
- [6] 梁志超, 林长缨, 杨扬, 等. 初步比较 6 种荧光 PCR 试剂盒对肠道病毒核酸的检测效果[J]. 国际病毒学杂志, 2024, 31(3):206-210.
- [7] YIN Y, ZHU P, GUO Y, et al. Enhancing lower respiratory tract infection diagnosis: implementation and clinical assessment of multiplex PCR-based and hybrid capture-based targeted next-generation sequencing[J]. EBioMedicine, 2024, 107:105307.
- [8] ZHANG P, LIU B, ZHANG S, et al. Clinical application of targeted next-generation sequencing in severe pneumonia: a retrospective review[J]. Criti Care, 2024, 28(1):225.
- [9] RODINO K G, SIMNER P J. Status check: next-generation sequencing for infectious-disease diagnostics[J]. J Clin Invest, 2024, 134(4):e178003.
- [10] 马永贞, 程东帅, 陆月明. BALF tNGS 在老年人肺结核诊断中的价值[J]. 中国基层医药, 2024, 31(7):961-964.
- [11] 李丽莉, 任珊珊, 王嘉平, 等. 基于探针捕获法的病原靶向高通量测序检测流程的建立和验证研究[J]. 中国药事, 2025, 39(4):415-429.
- [12] CHEN J, QIN Z, JIA Z. The application status of sequencing technology in global respiratory infectious disease diagnosis[J]. Infection, 2024, 52(6):2169-2181.
- [13] YAN X, FU H, DENG W, et al. Early and rapid diagnosis of Chlamydia psittaci pneumonia by tNGS in six patients: a case series[J]. Front Med (Lausanne), 2024, 11:1491838.
- [14] YE J, HUANG K, XU Y, et al. Clinical application of nanopore-targeted sequencing technology in bronchoalveolar lavage fluid from patients with pulmonary infections[J]. Microbiol Spectr, 2024, 12(6):e0002624.
- [15] SUN W, ZHENG L, KANG L, et al. Comparative analysis of metagenomic and targeted next-generation sequencing for pathogens diagnosis in bronchoalveolar lavage fluid specimens[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2024, 14:1451440.
- [16] XIAO Y H, LIU M F, WU H, et al. Clinical efficacy and diagnostic value of metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection in patients with suspected infectious diseases: a retrospective study from a large tertiary hospital[J]. Infect Drug Resist, 2023, 16:1815-1828.
- [17] CHEN Q, YI J, LIU Y, et al. Clinical diagnostic value of targeted next-generation sequencing for infectious diseases (Review) [J]. Mol Med Rep, 2024, 30(3):153.
- [18] CAO H, CHEN Y, GE L, et al. An umbrella review of the diagnostic value of next-generation sequencing in infectious diseases[J]. Int J Clin Pharm, 2024, 46(4):780-794.
- [19] 常文娇, 马筱玲. 儿童呼吸道感染常见病原体的实验室检测[J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(4):274-279.
- [20] SHAO J, HASSOUNA A, WANG Y, et al. Next-generation sequencing as an advanced supplementary tool for the diagnosis of pathogens in lower respiratory tract infections: an observational trial in Xi'an, China[J]. Biomed Rep, 2022, 16(2):14.
- [21] 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.

(下转第 2620 页)