

# 肺泡灌洗液高通量测序在肺部感染的诊断价值

汪 艳,李晨辉,刘盛国,金常娥,吴 迪

(深圳市人民医院呼吸疾病研究所呼吸与危重症医学科/南方科技大学附属第一医院, 广东 深圳 518020)

**摘要:**目的 探讨肺泡灌洗液高通量测序在肺部感染的病原学诊断价值。方法 收集 2019 年 2 月~2020 年 3 月深圳市人民医院呼吸与危重症医学科送检的 37 例肺部感染患者的检测结果及临床资料,分析患者的一般临床资料及高通量测序在肺部感染性疾病中的检测结果及临床转归情况。结果 37 例患者中男性多于女性,主要集中于<65 岁年龄段,无吸烟史患者居多,多合并基础疾病,以急性病程为主,CT 表现为单肺病变和双肺病变。肺泡灌洗液标本中高通量病原体阳性率高于常规培养(64.86% vs 24.32%),差异有统计学意义( $P<0.05$ );两者病原体报告时间比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。高通量测序检出单一病原菌感染 19 例,混合感染 5 例,与微生物病原体一致且考虑致病菌 8 例,与常规微生物培养相比,其灵敏度为 88.89%,特异性为 42.86%。13 例根据高通量测序结果调整了治疗方案,临床获益。结论 肺泡灌洗液高通量测序对肺部感染的病原体检测较为敏感、诊断相对准确,可提高肺部感染的病原体检测阳性率,尤其是对于混合及少见、罕见菌感染,对于临床微生物标本培养阴性的人群针对性地使用抗生素有一定的参考价值。

**关键词:**肺泡灌洗液;高通量测序;肺部感染;病原学

中图分类号:R446.5

文献标识码:A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2020.23.047

文章编号:1006-1959(2020)23-0160-04

## Diagnostic Value of High-throughput Sequencing of Alveolar Lavage Fluid in Pulmonary Infection

WANG Yan, LI Chen-hui, LIU Sheng-guo, JIN Chang-e, WU Di

(Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Institute of Respiratory Diseases, Shenzhen People's Hospital/ the First Affiliated Hospital of Southern University of Science and Technology, Shenzhen 518020, Guangdong, China)

**Abstract:** Objective To investigate the etiological diagnostic value of high throughput sequencing of alveolar lavage fluid in pulmonary infection. Methods Collect the test results and clinical data of 37 patients with pulmonary infection sent by the Department of Respiratory and Critical Care Medicine of Shenzhen People's Hospital from February 2019 to March 2020, analyze the general clinical data of patients and the detection results and clinical outcomes of high-throughput sequencing in pulmonary infectious diseases. Results Among the 37 patients, there were more males than females, mainly in the age group <65 years old. The majority of patients had no history of smoking, and most of them had underlying diseases, mainly with acute course. CT showed single lung disease and double lung disease. The positive rate of high-throughput pathogens in alveolar lavage fluid specimens was higher than that in conventional culture (64.86% vs 24.32%), the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ); the comparison of the pathogen reporting time between the two was not statistically significant ( $P>0.05$ ). High-throughput sequencing detected 19 cases of single pathogen infection and 5 cases of mixed infection, which were consistent with microbial pathogens and 8 cases of pathogenic bacteria were considered. Compared with conventional microbial culture, the sensitivity was 88.89% and the specificity was 42.86%. The treatment plan was adjusted in 13 cases based on the results of high-throughput sequencing, and the clinical benefit was achieved. Conclusion High-throughput sequencing of alveolar lavage fluid is more sensitive and accurate for the detection of pathogens in pulmonary infection, which can improve the positive rate of pathogen detection in pulmonary infection, especially for mixed and rare and rare bacterial infections. It has certain reference value for the population with negative culture of clinical microbial specimens to use antibiotics.

**Key words:** Alveolar lavage fluid; High-throughput sequencing; Pulmonary infection; Etiology

肺部感染(pulmonary infection)是指包括终末气道、肺泡腔及肺间质在内的肺实质炎症,病因以感染最为常见,还可由理化、免疫及药物引起,其临床表现、影像学及感染的病原体种类均存在多样性,往往不能通过一些常见的辅助检查和临床表现来确定感染的病原体。当肺部感染的病原体诊断不够明确时,尤其是重症患者,如不能够针对性的采取药物进行治疗,则可能耽误病情,导致治疗不及时引起死亡<sup>[1]</sup>。此外,临床上以渗出或实变为表现的肺部非感染性疾病越来越多见,如肺炎型肺癌、放射性肺炎、肺栓塞等,临床诊治困难。近年来,高通量测序技术,又称二代测序技术,可以实现在短时间内对一个物种的基因组、

转录组和宏基因组进行深入全面的分析,通过序列分析掌握病原微生物群体组成情况。与传统病原检测方法相比,高通量测序技术能够一次性检测获得样品中可能感染的多种病原物基因组序列,对明确混合感染以及少见、罕见或新发病原体感染具有独特优势<sup>[2]</sup>。随着技术的不断进步,高通量测序越来越多的用于临床感染性疾病诊治、传染病病原体检测等方面。支气管肺泡灌洗可以获得气管镜所不能探及下气道的细胞和溶质,能更全面的反映肺部的整体情况。基于高通量测序的支气管肺泡灌洗液的研究可以更加准确全面地反应下呼吸道微生物群的存在,对肺部感染的诊断具有重要的意义。本研究结合 2019 年 2 月~2020 年 3 月深圳市人民医院呼吸与危重症医学科送检的 37 例高通量测序患者的肺泡灌洗液样本结果及临床资料,探讨肺泡灌洗液高通量测序在肺部感染的病原学诊断价值,现报道如下。

**作者简介:**汪艳(1988.2-),女,安徽芜湖人,硕士,主治医师,主要从事肺癌介入工作

**通讯作者:**吴迪(1973.8-),女,黑龙江哈尔滨人,博士,副主任医师,主要从事肺癌介入工作

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 回顾性分析 2019 年 2 月~2020 年 3 月深圳市人民医院呼吸与危重症医学科送检赛哲生物基因检测公司进行基因测序的 37 例肺部感染患者的检测结果及临床资料,所有患者 CT 表现为渗出或实变,均由两名影像学医生及一名呼吸科临床医生共同评估判定。

### 1.2 方法

**1.2.1 资料收集** 收集患者一般资料及影像资料,包括性别、年龄、基础疾病、吸烟史、病程及 CT 表现。

**1.2.2 肺泡灌洗液高通量测序** 采集患者的肺泡灌洗液标本,送检赛哲生物基因检测公司进行高通量测序(使用 illumina nextseq 550 DX 测序平台,肺泡灌洗液  $\geq 5\text{ml}$ ,快速低温保存,冷链运输  $-20^{\circ}\text{C}$  以下,对于肺泡灌洗液样本的高通量测序程序包括核酸提取、文库构建、测序和信息分析),同时送检我院肺泡灌洗液病原学培养和(或)肺组织培养及痰培养,记录病原体的情况。

**1.3 诊断标准** 继发性肺结核:痰涂抗酸杆菌或抗酸杆菌培养阳性;肺组织病理学诊断结核;按中华医学会结核分会制定的肺结核诊断标准诊断为菌阴肺结核。肺曲霉球:金标准为组织真菌培养阳性或组织病理学确诊曲霉感染。肺隐球菌病:金标准为病原学涂片和培养、组织病理检查。血清隐球菌荚膜多糖抗原检测具有快速诊断价值。

**1.4 统计学方法** 采用 SPSS 25.0 统计学软件进行数据分析。计量资料以( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用  $t$  检验;计数资料以[n(%)]表示,采用  $\chi^2$  检验。以  $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 一般临床资料** 37 例患者中男性多于女性,主要集中于  $<65$  岁年龄段,无吸烟史患者居多,多合并基础疾病,以急性病程为主,CT 表现为单肺病变何双肺病变,见表 1。

表 1 患者基本临床资料(n,%)

项目	n	占比	项目	n	占比
性别			吸烟史(包/年)		
男	23	62.16	$\geq 30$	5	13.51
女	14	37.84	$<30$	5	13.51
年龄(岁)			无	27	72.97
$\geq 65$	11	29.73	病程(周)		
$<65$	26	70.27	急性病程( $\leq 3$ )	16	43.24
合并基础疾病			亚急性病程(3~8)	8	21.62
结构性肺病	5	13.51	慢性病程( $\geq 8$ )	13	35.14
心脑血管疾病	3	8.11	CT 表现		
代谢性疾病	4	10.81	单肺病变	17	45.95
风湿免疫性疾病	1	2.70	双肺病变	20	54.05
肿瘤	8	21.62			

**2.2 高通量测序在肺部感染性疾病中的检测结果及临床转归情况**

**2.2.1 肺泡灌洗液高通量测序与常规培养两种方法的病原体阳性率及病原体报告时间比较** 37 例高通量测序中,检出病原体 30 例,结合临床、CT 及病原菌培养,阳性病原体 24 例,假阳性病原体 9 例,3 例临床不能排除。37 例常规微生物培养中,检出病原体 13 例,结合临床及 CT 表现,阳性 9 例。肺泡灌洗液标本中高通量病原体阳性率高于常规培养(64.86% vs 24.32%),差异有统计学意义( $P<0.05$ );两者病原体报告时间比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表 2。

表 2 肺泡灌洗液 NGS 与常规培养的病原体阳性率、病原体报告时间比较[n(%),  $\bar{x}\pm s$ ]

方法	n	病原体阳性率	病原体报告时间(d)
高通量测序	37	24(64.86)	2.10 $\pm$ 0.46
常规培养	37	9(24.32)	2.48 $\pm$ 1.36
统计值		$\chi^2=12.306$	$t=-1.597$
P		0.000	0.118

**2.2.2 高通量病原体检测结果** 24 例阳性结果中单一病原菌感染 19 例(细菌 18 例、病毒 0 例、真菌 1 例),其中细菌感染分别为流感嗜血杆菌 3 例、肺炎链球菌 4 例、肺炎支原体 1 例、铜绿假单胞菌 4 例、肺炎克雷伯菌 1 例、金黄色葡萄球菌 1 例、鲍曼不动杆菌 1 例、伯克霍尔德菌 1 例、产黑普雷沃菌 1 例、玫瑰单胞菌属 1 例,真菌感染以互格交链链格孢为主;混合感染 5 例(细菌合并病毒 2 例、细菌合并真菌 2 例,细菌合并结核 1 例),其中细菌合并病毒感染分别为流感嗜血杆菌+人类乳头瘤病毒(HPV)49 1 例、铜绿假单胞菌+(巨细胞病毒)CMV 1 例,细菌合并真菌感染分别为嗜麦芽窄单胞菌+热带假丝酵母 1 例、伯克霍尔德菌+白色念珠菌 1 例,细菌合并结核感染为诺卡菌属+结核分枝杆菌 1 例。9 例不相符病例,其中继发性肺结核 2 例,肺曲霉菌球 1 例,肺隐球菌病 1 例。

**2.2.3 高通量测序与常规微生物检查阳性结果的一致性比较** 常规微生物培养检出 13 例,阳性 9 例,其中高通量测序与微生物检测一致且考虑致病菌共 8 例,1 例培养化脓诺卡菌(致病菌),高通量测序检出洋葱伯克霍尔德菌见表 3。肺泡灌洗液 NGS 与常规微生物培养相比,其灵敏度为 88.89%(8/9),特异度 42.86%(12/28),见表 4。

**2.2.4 高通量测序与临床抗生素方案调整** 37 例患者中有 13 例患者根据高通量测序结果调整了治疗方案,特殊包括高通量测序阳性及常规阴性的肺炎支原体 1 例、玫瑰单胞菌 1 例、互格交链链格孢 1 例,分别调整治疗方案为左氧氟沙星、美罗培南、伏

表 3 高通量测序与常规微生物检查阳性结果的一致性比较

编号	基因测序检测结果			临床微生物培养结果	临床诊断
	细菌	真菌	病毒		
1	流感嗜血杆菌	无	无	流感嗜血杆菌	肺部感染
2	流感嗜血杆菌	白色念珠菌	巨细胞病毒	白色念珠菌	肺癌,EB 病毒感染
3	鲍曼不动杆菌	无	无	鲍曼不动杆菌	支气管扩张并感染
4	肺炎克雷伯菌	白色念珠菌	无	肺炎克雷伯菌	血播性肺结核可能性大
5	洋葱伯克霍尔德菌	无	无	化脓诺卡菌	肺部感染,肺鳞癌
6	肺炎链球菌	无	无	肺炎链球菌	肺部感染
7	铜绿假单胞菌	无	无	铜绿假单胞菌	肺部感染
8	嗜麦芽窄单胞菌	热带假丝酵母	无	嗜麦芽窄单胞菌、热带假丝酵母	肺部感染
9	肺炎克雷伯菌	无	无	肺炎克雷伯菌	肺曲霉菌球
10	铜绿假单胞菌	无	无	铜绿假单胞菌	肺部感染
11	铜绿假单胞菌	无	无	铜绿假单胞菌	肺部感染
12	无	无	无	放线菌	继发性肺结核可能性大,放线菌待排
13	苛养诺卡菌	无	无	新星诺卡菌复合群、结核分枝杆菌	肺部感染、肺结核

表 4 高通量测序与常规微生物检查的灵敏度与特异度分析(n)

高通量测序	痰培养		合计
	阳性	阴性	
阳性	8	16	24
阴性	1	12	13
合计	9	28	37

立康唑;而高通量测序及常规均阳性的鲍曼不动杆菌 1 例、诺卡菌属 1 例,其高通量测序阳性结果检出时间早于常规培养,提前调整抗生素方案指导临床治疗。

### 3 讨论

肺部感染是临床常见的一种呼吸道感染性疾病,尤其是重症肺炎患者,往往病原菌相对复杂,治疗难度大大增加<sup>[3]</sup>,易引起较为严重的并发症甚至死亡。目前传统检测方法标本的阳性培养率偏低,增加了临床诊疗工作的难度。因此不依赖于微生物培养及常规临床检测的高通量病原菌诊断技术越来越受关注。

高通量测序适用于现有检测技术无法鉴别的病原体的检测,也适用于患者对标准化的抗生素治疗无反应的情况。对于罕见和生长缓慢的细菌,高通量测序在缩短确诊细菌/真菌感染所需的时间、促进靶向抗菌治疗和改善患者预后方面具有相当大的优势<sup>[4]</sup>。刘孝荣等<sup>[5]</sup>针对儿童重症肺部感染肺泡灌洗液应用高通量测序检测病原体的研究中发现,高通量测序的灵敏度较高(86.84%),能检出未知病原菌,优于传统的临床检验方法。Liu J 等<sup>[6]</sup>对危重患者进行支气管肺泡灌洗液高通量测序检测,结果发现与培养法比较,高通量测序诊断敏感性为 88.89%,特异性为 74.07%。任迪等<sup>[7]</sup>研究也提示,肺泡灌洗液及

血高通量测序检测方法对比,肺泡灌洗液高通量测序意义更大。本研究中主要针对非重症肺部感染患者的肺泡灌洗液高通量测序结果进行分析,同样得出肺泡灌洗液高通量测序检出病原体阳性率高于常规微生物培养的结论,其灵敏度为 88.89%,但特异性为 42.86%,考虑可能与以下方面相关:①亚急性和慢性病程者较多,多数患者曾反复多次使用抗生素治疗,常规培养阳性率低,而高通量测序检测肺泡灌洗液中可检测病原微生物群体基因片段,其高通量测序的阳性病例常规培养阴性病例明显增多,而两者阴性病例则减少。②样本病例数偏少,且非重症肺部感染的程度不同可能引起数据结果的偏移,导致特异度降低。

国外研究报道<sup>[8,9]</sup>,多重微生物感染在社区获得性肺炎患者中约占 6%~13%,其中以两种细菌感染或一种细菌合并另一种非典型病原体感染多见。Wang J 等<sup>[10]</sup>研究发现,高通量测序诊断混合肺部感染的敏感性为 97.2%,特异性为 63.2%,真菌的阳性检出率为 56.4%,提示高通量测序是检测混合性肺部感染病原体的有效方法,特别是合并真菌感染,具有快速、灵敏的优点。本研究中合并基础疾病 21 例,以肿瘤、结构性肺病、代谢性疾病为主,多为免疫低下人群,易合并复杂、罕见及少见菌感染,其中混合感染 5 例,覆盖细菌、病毒、真菌等,经对症治疗临床获益;罕见及少见菌 2 例,玫瑰单胞菌属 1 例、互格交链链格孢 1 例,两者多为条件致病菌,合并肺部感染相对少见,对微生物镜检和培养技术要求高,本身缺乏特异性,存在早期诊断率低的特点,针对这两种病原菌调整治疗方案后患者临床症状明显改善。而本研究中 1 例肺隐球菌病,1 例诺卡菌合并结核感染,2 例继发性肺结核,前者高通量测序未检出,后

者仅检出诺卡菌,未检出结核分枝杆菌,考虑高通量测序对隐球菌及结核分枝杆菌检出率较低,可能与隐球菌本身存在的肥厚荚膜及结核杆菌细胞壁特殊,难以像其他细菌通过去污或裂解剂裂解导致破壁不充分等有关,最终影响检测结果。

另外,本研究中 37 例患者中有 13 例患者改变了治疗策略,高通量测序的有限价值可能是因为非重症社区获得性肺炎患者常规经验性抗感染治疗方案能够覆盖可能病原菌,无需进一步调整,且往往针对病毒感染,标准化抗病毒治疗通常在 CT 表现及临床高度怀疑情况下提前使用。本研究中高通量测序与微生物检测一致且考虑致病菌共 8 例,考虑常规方法与高通量测序之间的高符合率进一步验证了高通量测序的有效性和准确性。对于检测能力有限的医院,根据当地的流行病学特征,特别是对于免疫力低下的患者和有严重或复杂感染的患者,高通量测序则可作为推荐检测手段<sup>[11-14]</sup>。然而本研究受到样本数量少和疾病多样性的限制,仍提示高通量测序存在自身局限性,首先判断所检出的微生物为致病菌还是定植菌,往往需要医生结合临床进行综合判断。其次,不同检测平台微生物数据库谱不同,结果也不尽相同,可能会导致一些罕见少见病原体难以测出。同时本研究亦没有进行耐药基因的检测,虽然目前高通量测序已被广泛接受用于临床感染性疾病诊治、传染病病原体检测,但由于缺乏统一的标准指导临床治疗策略,尤其对于一些疑难病例,限制了其在临床研究中的应用。

综上所述,肺泡灌洗液高通量测序对肺部感染的病原体检测较为敏感、诊断相对准确,可提高肺部感染的病原体检测阳性率,尤其是对于混合及少见、罕见菌感染,对于临床微生物标本培养阴性的人群针对性地使用抗生素有一定的参考价值。

#### 参考文献:

- [1]黄畅宇,胡瑞成,张有志,等.应用二代测序技术诊断肺结核病及肺非结核分枝杆菌病各一例并文献复习[J].中国呼吸与危重监护杂志,2019,18(1):21-25.
- [2]刘永杰,王渊,付强,等.高通量测序技术在病原生物学方面

的研究进展[J].口岸卫生控制,2019,24(1):6-9.

[3]洪燕燕,杨芝红.流式细胞术检测肺泡灌洗液 T 淋巴细胞亚群的诊断价值[J].检验医学与临床,2017,14(14):2051-2053.

[4]Seo S,Renaud C,Kuyppers JM,et al.Idiopathic pneumonia syndrome after hematopoietic cell transplantation:evidence of occult infectious etiologies[J].Blood,2015,125(24):3789-3797.

[5]刘孝荣,马东礼,姜含芳,等.高通量测序方法在重症肺炎病原体检测的应用[J].中华检验医学杂志,2017,40(8):609-613.

[6]Liu J,Lu J,Dong F,et al.Low bacterial co-infection in - validates the early use of non-anti-mycoplasm pneumoniae antibiotics in pediatric refractory mycoplasma pneumoniae pneumonia patients[J].Frontiers in Pediatrics,2018,50(6):296.

[7]陆瀚澜,隋明星,赵闻雨,等.高通量二代基因测序技术在器官移植术后肺部感染病原诊断的应用观察[J].中华器官移植杂志,2020,41(7):388-392.

[8]Gutiérrez F,Masiá M,Rodríguez JC,et al.Community-acquired pneumonia of mixed etiology:prevalence,clinical characteristics,and outcome[J].Eur J Clin Microbiol Infect Dis,2005,24(6):377-383.

[9]de Roux A,Ewig S,García E,et al.Mixed community-acquired pneumonia in hospitalized patients [J].Eur Respir J,2006,27(4):795-800.

[10]Wang J,Han Y,Feng J.Metagenomic next-generation sequencing for mixed pulmonary infection diagnosis[J].BMC Pulm Med,2019,19(1):252.

[11]Hu Y,Zhang Y,Ren X,et al.A case report demonstrating the utility of next generation sequencing in analyzing serial samples from the lung following an infection with influenza A (H7N9) virus[J].J Clin Virol,2016(76):45-50.

[12]Petty TJ,Cordey S,Padioulet I,etal.Comprehensive human virus screening using high-throughput sequencing with a user-friendly representation of bioinformatics analysis:a pilot study[J].J Clin Microbiol,2014(52):3351-3361.

[13]Fischer N,Indenbirken D,Meyer T,et al.Evaluation of unbiased next generation sequencing of RNA(RNA-seq)as a diagnostic method in influenza virus-positive respiratory samples[J].J Clin Microbiol,2015(53):2238-2250.

[14]王国安,吴宏成.mNGS 在肺部感染患者病原体诊断中的应用[J].现代实用医学杂志,2019,31(1):9-10,79.

收稿日期:2020-08-04;修回日期:2020-09-03

编辑/刘欢