

## • 临床研究 •

## 基于宏基因组学的二代测序技术在肾移植术后重症肺炎诊治中的应用

卓惠长<sup>1</sup> 林建东<sup>1</sup> 尤彦菁<sup>2</sup><sup>1</sup>福建医科大学附属第一医院重症医学科,福州 350005;<sup>2</sup>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 350025

通信作者:尤彦菁,Email:905437225@qq.com

**【摘要】目的** 探讨基于宏基因组学的二代测序技术(mNGS)在肾移植术后重症肺炎诊治中的应用价值。**方法** 以解放军第九〇〇医院 2017 年 10 月至 2018 年 12 月收治的 38 例肾移植术后重症肺炎受者为研究对象,根据是否行肺泡灌洗液(BALF)mNGS 检测病原微生物,分为实验组(A 组,15 例),对照组(B 组,23 例),比较两组病原学检测阳性率、临床采信率及住院天数、住院费用和病死率等指标。**结果** 实验组 mNGS 法病原学检测阳性率、临床采信率高于实验组传统法和对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),实验组住院天数、住院费用、28 天病死率均小于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),两组 90 天病死率差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** 肾移植术后重症肺炎受者 BALF 行 mNGS 检测,可提高病原学检测阳性率、临床采信率,减少住院天数,降低住院费用和 28 天病死率。

**【关键词】** 肾移植;肺炎;病原微生物

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2019.06.009

**Value of metagenomic next-generation sequencing in the diagnosis and treatment of severe pneumonia after renal transplantation**Zhuo Huichang<sup>1</sup>, Lin Jiandong<sup>1</sup>, You Yanjing<sup>2</sup><sup>1</sup>Intensive Care Unit, The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China; <sup>2</sup>Pulmonary and Critical Care Medicine Department, The 900th Hospital of Joint Logistic Support Force, PLA, Fuzhou 350025, China

Corresponding author: You Yanjing, Email: 905437225@qq.com

**【Abstract】Objective** To explore the value of metagenomic next-generation sequencing(mNGS) in the diagnosis and treatment of severe pneumonia after renal transplantation. **Methods** A total of 38 patients with severe pneumonia after renal transplantation from October 2017 to December 2018 were selected and divided into experimental group(A,  $n = 15$ ) and control group(B,  $n = 23$ ) based upon whether mNGS of bronchoalveolar lavage fluid was employed for detecting pathogenic microorganisms. Positive rate, clinical acceptance rate, hospitalization time, hospitalization expenses and 28-day mortality rate of two methods were compared. **Results** Positive rate and clinical acceptance rate of mNGS were higher in experimental group than those in traditional experimental and control groups ( $P < 0.05$ ). Hospitalization time, hospitalization expenses and 28-day mortality of experimental group were lower than those of control group ( $P < 0.05$ ). No significant inter-group difference existed in 90-day mortality ( $P > 0.05$ ). **Conclusions** For patients with severe pneumonia after renal transplantation, mNGS of bronchoalveolar lavage fluid can improve positive rate of etiological diagnosis and clinical acceptance rate and reduce hospitalization time, hospitalization expenses and 28-day mortality.

**【Key words】** Renal transplantation; Pneumonia; Pathogenic microorganism

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2019.06.009

肾移植术是终末期尿毒症的主要治疗手段之一。肾移植术后因长期服用免疫抑制剂,受者免疫力低下,容易合并机会性感染<sup>[1]</sup>。肺部感染发生率 9%~16%,是肾移植术后受者最常见的感染<sup>[2-3]</sup>,并常导致死亡<sup>[4]</sup>,特别是混合感染的死亡率达 50%<sup>[5]</sup>,短时间内明确病原微生物是治疗的关键。

传统培养、革兰氏染色、免疫检测和核酸检测等效率较低,其准确性和及时性欠缺,不利于指导抗感染<sup>[6]</sup>。基于宏基因组学的二代测序技术(metagenomic next-generation sequencing, mNGS)是新一代的病原微生物鉴定方式。2010 年开始, mNGS 从实验室过渡到临床<sup>[7]</sup>。该技术直接对核酸序列进

行比对,可能有助于提高肾移植术后重症肺炎受者病原微生物检测的阳性率,进而指导治疗,改善其预后。基于上述考虑,我科开展了本研究,以探讨肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)mNGS 检测在肾移植术后重症肺炎诊治中的应用价值。

## 对象与方法

### 一、研究对象

收集解放军第九〇〇医院 2017 年 10 月至 2018 年 12 月收治的肾移植术后长期口服免疫抑制剂后罹患重症肺炎入院的受者为研究对象。排除儿童、孕妇、哺乳期以及非感染性肺炎、心源性肺水肿的受者,共收集 38 例,随机分为实验组(A 组,15 例)入院 24 h 内行气管镜检查,留取 BALF 行 mNGS 检测,同时也送检传统的病原学检测项目,包括 BALF 行革兰氏染色及细菌、真菌培养,抽血查 1,3- $\beta$ -D 葡聚糖(1,3-beta-D-glucan, G)试验、半乳甘露聚糖(galactomannan, GM)试验、呼吸道病原抗体谱、肺炎支原体血清学试验、隐球菌荚膜抗原、曲霉菌抗体、细胞病毒抗体 IgG/IgM 及 DNA、血培养,对照组(B 组,23 例)只行传统方法检测,其中实验组男 11 例,女 4 例,中位年龄 40.9 岁(27~59)岁,中位检测时间为肾移植术后 50.7 个月(3.6~145)个月。对照组男 18 例,女 5 例,中位年龄 45.3 岁(25~69)岁,中位检测时间为肾移植术后 62.4(2.6~170.2)个月。两组受者的一般资料比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。重症肺炎诊断标准采取中华医学会呼吸病学分会《中国成人社区获得性肺炎诊断和治疗指南(2016 年版)》<sup>[8]</sup>中重症肺炎的诊断标准:符合下列 1 项主要标准或 $\geq 3$ 项次要标准者可诊断为重症肺炎。主要标准:(1)需要气管插管行机械通气治疗;(2)脓毒症休克经积极液体复苏后仍需要血管活性药物治疗。次要标准:(1)呼吸频率 $\geq 30$ 次/min;(2)氧合指数 $\leq 250$  mmHg;(3)多肺叶浸润;(4)意识障碍和(或)定向障碍;(5)血尿素氮 $\geq 7.14$  mmol/L;(6)收缩压 $<90$  mmHg需要积极的液体复苏。

### 二、方法

两组受者入院后即经验性给予抗革兰氏阳性( $G^+$ )菌、抗革兰氏阴性( $G^-$ )菌、抗真菌、抗病毒的广谱抗感染策略。入院后 24 h 内行纤维支气管镜检查,留取 BALF,对照组只行传统方法检测,实验组行 BALF 的 mNGS 及传统方法检测。其中肺泡灌洗规定灌洗部位:根据影像学选取肺炎最明显的叶段。方法:一次性快速推注 10 ml 生理盐水,保留 15s 后,用 200 mmHg 的负压回收 3 ml 以上 BALF

于标本管中。交由深圳华大基因股份有限公司收集和检测,与该公司病原数据库进行比对,得出报告结果序列数。根据两组检测结果,如能明确病原微生物,则判定结果可采信,并据此结果调整抗感染方案为靶向治疗,如不能明确病原微生物,则判定结果不采信,并给予经验性治疗,视用药效果调整抗感染方案。

### 三、观察指标与评价标准

根据 mNGS 结果中某类病原微生物序列数为评价指标,如检出某种(些)病原微生物序列数的,则判定检测结果为阳性。传统方法中有一项阳性,则判定检测结果为阳性。比较 A 组 mNGS 法, A 组传统法和 B 组病原微生物检出阳性率,及临床采信度(临床认定阳性结果有意义并调整为靶向治疗的比例),同时比较两组受者住院天数、住院费用、28 d 病死率、90 d 病死率。

### 四、统计学处理

应用 SPSS22.0 统计学软件进行数据处理和分析,计量资料用均数 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示,组间比较采用  $t$  检验;计数资料采用率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验,以  $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 结 果

### 一、两组受者检测结果

A 组 mNGS 法检测出  $G^+$  菌 4 例(26.7%),  $G^-$  菌 10 例(66.7%), 耶氏肺孢子菌 3 例(20.0%), 病毒 3 例(20.0%), 真菌 0 例, 其他 1 例(6.7%), 两项以上检出阳性的 5 例(33.3%)。A 组传统法 BALF 培养阳性 3 例(20.0%), 涂片阳性 6 例(40.0%), G/GM 试验阳性 2 例(13.3%), 细胞病毒抗体 IgG/IgM 或病毒 DNA 阳性 3 例(20.0%), 余项目检出无阳性, 两项以上检出阳性的 2 例(13.3%)。B 组 BALF 培养阳性 11 例(47.8%), 涂片阳性 10 例(43.5%), G/GM 试验阳性 6 例(26.1%), 呼吸道病原抗体谱阳性 1 例(4.3%), 细胞病毒抗体 IgG/IgM 或病毒 DNA 阳性 6 例(26.1%), 余项目检出无阳性, 两项以上检出阳性的 12 例(52.2%, 表 1)。

### 二、两组受者检测结果阳性率的比较

A 组 mNGS 法检测结果为阳性的 15 例, 阳性率 100%, A 组传统法检测结果为阳性的 9 例, 阳性率 60.0%, B 组检测结果阳性 16 例, 阳性率 69.6%, A 组 mNGS 法的阳性率高于同组传统法和 B 组, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ), A 组传统法阳性率与 B 组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

表 1 两组传统方法检测结果分布 [例(%)]

组别	例数	BALF 培养	BALF 涂片	G/GM 试验	呼吸道病原抗体谱	肺炎支原体血清学试验	隐球菌荚膜抗原	曲霉抗体	细胞病毒抗体 IgG /IgM 或病毒 DNA	血培养	两项及以上
A 组	15	3(20.0%)	6(40.0%)	2(13.3%)	0	0	0	0	3(20.0%)	0	2(13.3%)
B 组	23	11(47.8%)	10(43.5%)	6(26.1%)	1(4.3%)	0	0	0	6(26.1%)	0	12(52.2%)

三、两组受者检测结果临床采信率的比较

A 组 mNGS 法有 4 例未采信,原因为检出序列数较少,病原种类多且分散,再结合临床(病史、影像、症状、其他等),无法分辨致病菌、定植菌、污染菌。A 组传统法和 B 组不采信原因为结合临床后,考虑与临床不符,包括考虑 BALF 培养到呼吸道定植菌或病毒 IgG 阳性,但病毒 IgM 和 DNA 阴性,无法判断是否病毒感染,或 G/GM 试验呈弱阳性,无法判断是否真菌感染等情况。综上所述,A 组 mNGS 法无法明确病原体 4 例(26.7%),可明确病原体 11 例,包括 G<sup>+</sup> 菌 3 例(20.0%),G<sup>-</sup> 菌 7 例(46.7%),耶氏肺孢子菌 3 例(20.0%),病毒 2 例(13.3%),混合感染 4 例(26.7%);A 组传统法无法明确病原体 11 例(73.3%),可明确病原体 4 例,包括 G<sup>+</sup> 菌 2 例(13.3%),G<sup>-</sup> 菌 2 例(13.3%),病毒 1 例(6.7%),混合感染 1 例(6.7%);B 组无法明确病原体 19 例(82.6%),可明确病原体 4 例,包括 G<sup>+</sup> 菌 2 例(8.7%),G<sup>-</sup> 菌 2 例(8.7%),真菌 1 例(4.3%),病毒 2 例(8.7%),混合感染 2 例(8.7%,表 2)。A 组采信 mNGS 结果 11 例,采信率 73.3%,传统法采信 4 例,采信率 26.7%,A 组 mNGS 法采信率高于本组传统法和 B 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),A 组传统法采信率与 B 组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

四、两组受者 28 天病死率、90 d 病死率的比较

A 组 28 d 内死亡 0 例,90 d 内死亡 1 例(此例受者因治疗费用原因放弃治疗,出院后 7 d 家中死亡),病死率 6.7%,B 组 28 d 内死亡 6 例,病死率 26.1%,90 d 内死亡 7 例,死亡率 30.4%,A 组 28 d 病死率低于 B 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),两组 90 d 病死率差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

五、两组受者平均住院天数、平均治疗费用的比较

A 组的平均住院天数(14.73 ± 6.26)d,小于 B 组的(22.52 ± 8.22)d,差异有统计学意义( $P =$

0.002);其治疗费用(53430.41 ± 29457.34)元也低于 B 组的(93515.51 ± 45246.03)元,差异有统计学意义( $P = 0.005$ )。

讨 论

肾移植术后重症肺炎常起病隐匿,进展迅速<sup>[9]</sup>,感染的常见病原微生物包括细菌、真菌、病毒、耶氏肺孢子菌、支原体、结核杆菌等<sup>[10]</sup>,病原微生物呈多样性,多为混合感染<sup>[11]</sup>。本研究结果也证实细菌、真菌、病毒、耶氏肺孢子菌等为肾移植术后重症肺炎常见的病原微生物,部分为混合感染。受者入院后通常行广谱抗感染治疗(抗细菌、真菌、病毒,必要时同时抗耶氏肺孢子菌、衣原体、支原体),后续再根据病原微生物检测结果,进一步调整成针对性的抗感染治疗<sup>[12]</sup>。是否能尽快明确病原微生物类型,是肾移植术后重症肺炎受者治疗的关键。

传统的微生物检测技术,时效性、敏感性、特异性不理想<sup>[13]</sup>,特别是细菌培养易受正常菌群的干扰<sup>[14]</sup>,抗感染药物的使用对传统方法检测结果也有一定影响。研究表明,受培养条件限制,99% 以上的病原微生物无法在现有的实验室条件下进行培养,大多数肾移植术后重症肺炎受者为混合感染,培养有难度。本研究实验组传统法、对照组检测结果阳性率明显低于 A 组 mNGS 法,同时 B 组根据阳性检测结果调整为靶向治疗的比率也明显低于实验组,这也证实了传统方法的阳性率低,假阳性率高,影响了临床医生对检测结果的采信。mNGS 技术能同时对几十万到几百万条 DNA 分子进行测序,并可实现对同一物种的转录组和基因组进行细致全貌的分析<sup>[14]</sup>,它直接提取标本中的全部核酸片段并加以检测,将微生物专用数据库参考病原微生物序列与标本序列进行比对和智能化算法分析,分别得出与各种参考病原微生物有相同序列数的个数,避免了难培养的病原微生物的漏检,也避免培养的假阳(阴)性等<sup>[15]</sup>。它的特点为检测速度快、准确率高、

表 2 两组两方法明确病原体情况 [例(%)]

组别	n	G <sup>+</sup> 菌	G <sup>-</sup> 菌	真菌	耶氏肺孢子菌	病毒	其他	混合	不明
A 组 mNGS 法	15	3(20.0%)	7(46.7%)	0	3(20.0%)	2(13.3%)	0	4(26.7%)	4(26.7%)
A 组传统法	15	2(13.3%)	2(13.3%)	0	0	1(6.7%)	0	1(6.7%)	11(73.3%)
B 组	23	2(8.7%)	2(8.7%)	1(4.3%)	0	2(8.7%)	0	2(8.7%)	19(82.6%)



覆盖度广等,抗感染药物对其结果的影响也较小<sup>[16]</sup>,mNGS 检出潜在致病微生物,在速度和灵敏度上也具有优势<sup>[17]</sup>,mNGS 为明确病原微生物的类型提供了较好的技术支持。在呼吸系统感染性疾病中,mNGS 已经应用于包括痰、咽拭子、肺泡灌洗液等的病原微生物检测,并有良好的诊断意义<sup>[18-19]</sup>。本研究中实验组 mNGS 法的病原微生物检出阳性率高于本组传统法和对照组,证实 mNGS 有助于提高此类受者病原微生物检测的阳性率。同时实验组根据 mNGS 法的检测结果调整为靶向治疗的比率明显高于同组传统法和对照组,证实 mNGS 结果更易经临床医生采信。

本研究根据 mNGS 检测结果及时调整抗感染方案,获得满意疗效,对比传统方法,实验组降低了住院费用,缩短了住院天数,减少了 28 天病死率。已有研究表明,通过 mNGS 早期明确病原微生物后,临床据此结果调整受者抗感染方案,可改善重症肺炎受者的病死率。另有报道称,结合 mNGS 结果指导治疗,重症肺炎受者 28 天和 90 天的存活率均有提高,90 天存活率更是从 57.7% 提高到 83.3%。因此考虑 mNGS 可能间接降低此类受者病死率。

尽管 mNGS 在阳性率、采信率、改善预后等方面存在优势,但仍存在无法明确背景菌、定植菌、污染菌、致病菌等情况。本研究中实验组 mNGS 方法不采信的 4 例均因无法判定是否为致病菌。且目前的 mNGS 技术无法同步给出相应的药敏结果,故采信结果后只能经验性调整抗感染方案;mNGS 技术作为新型的病原微生物检测技术,费用较传统病原微生物检测技术昂贵,难以实现多次送检,对于病情反复,治疗期间合并新的院内感染的受者,难以通过本方法监测致病菌的变化。

综上所述,在肾移植术后重症肺炎的诊治中,BALF mNGS 检测可提高阳性率和临床采信率,减少住院天数,节约费用,对肾移植术后重症肺炎受者预后的改善有重要的价值,它作为一种新的检测手段,仍存在局限性,有赖于技术的进一步完善,以更好的为患者服务。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参 考 文 献

- [1] 郑军华,闵志廉,等. 移植肾感染的病理学研究[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,1997(1):43.
- [2] Chang GC, Wu CL, Pan SH, et al. The diagnosis of pneumonia in renal transplant recipients using invasive and noninvasive procedures[J]. Chest,2004,125(2):541-547. DOI:10.1378/chest.125.2.541.
- [3] 范连慧,刘龙,向军,等. 187 例肾移植受者死亡原因分析[J]. 中华器官移植杂志,2005,26(8):461-463. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2005.08.004.
- [4] 阮钧,徐卓群,胡礼炳,等. 肾移植术后肺炎的诊断和治疗[J]. 江苏医药,2006,32(8):794. DOI:10.3969/j.issn.0253-3685.2006.08.045.
- [5] 罗晓辉,薛武军,田普训,等. 98 例肾移植受者术后肺部感染的临床分析[J]. 现代泌尿外科杂志,2011,16(6):490-492. DOI:10.3969/j.issn.1009-8291.2011.06.003.
- [6] 李林海,陈丽丹,肖斌,等. 宏基因组测序在感染性疾病病原体检测中的应用[J]. 传染病信息,2018,31(1):15-18. DOI:10.3969/j.issn.1007-8134.2018.01.004.
- [7] Perlejewski K, Popiel M, Laskus T, et al. Next-generation sequencing (NGS) in the identification of encephalitis-causing viruses: Unexpected detection of human herpesvirus 1 while searching for RNA pathogens[J]. J Virol Methods,2015,226:1-6. DOI:10.1016/j.jviromet.2015.09.010.
- [8] 中华医学会呼吸病学分会. 中国成人社区获得性肺炎诊断和治疗指南(2016 年版)[J]. 中华结核和呼吸杂志,2016,39(4):253-279. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2016.04.005.
- [9] 王继征,马凤巧,扬立新. 四联疗法治疗肾移植术后肺部感染 15 例治疗体会[J]. 医学信息,2006,(5):884-885. DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2006.05.070.
- [10] Rubin RH, Wolfson JS, Cosimi AB, et al. Infection in the renal transplant recipient[J]. Am J Med,1981,70(2):405-411.
- [11] 李昱霖,梁志欣,骆海伦,等. 77 例肾移植术后患者并发肺部感染的临床分析[J]. 解放军医学院学报,2014,35(6):538-540. DOI:10.3969/j.issn.2095-5227.2014.06.005.
- [12] 陆菲婕,任义峰. 肾移植术后重症肺炎 21 例临床分析[J]. 现代实用医学,2016,28(12):1590-1592,封 2. DOI:10.3969/j.issn.1671-0800.2016.12.024.
- [13] Nath A. Neuroinfectious diseases; a crisis in neurology and a call for action[J]. JAMA Neurol,2015,72(2):143-144. DOI:10.1001/jamaneurol.2014.3442.
- [14] Barlow G, Nathwani D, Williams F, et al. Reducing door-to-antibiotic time in community-acquired pneumonia: Controlled before-and-after evaluation and cost-effectiveness analysis[J]. Thorax,2007,62(1):67-74. DOI:10.1136/thx.2005.056689.
- [15] Pan Q, Shai O, Lee LJ, et al. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing[J]. Nat Genet,2008,40(12):1413-1415. DOI:10.1038/ng.259.
- [16] 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.
- [17] Miao Q, Ma Y, Wang Q, et al. Microbiological diagnostic performance of metagenomic next-generation sequencing when applied to clinical practice[J]. Clin Infect Dis,2018,13,67(suppl\_2):S231-S240. DOI:10.1093/cid/ciy693.
- [18] Li H, Gao H, Meng H, et al. Detection of pulmonary infectious pathogens from lung biopsy tissues by metagenomic next-generation sequencing[J]. Front Cell Infect Microbiol,2018,25,8:205. DOI:10.3389/fcimb.2018.00205.
- [19] Thorburn F, Bennett S, Modha S, et al. The use of next generation sequencing in the diagnosis and typing of respiratory infections[J]. J Clin Virol,2015,69:96-100. DOI:10.1016/j.jcv.2015.06.082.
- [20] 韩娜,强裕俊,张婷婷,等. 基于 454 高通量测序平台血液、呼吸道、消化道临床样本的快速检测[J]. 中国医药指南,2016,14(17):39-41.

(收稿日期:2019-3-20)