

宏基因二代测序协助诊断毛霉菌病一例 并文献复习

宋瑛¹ 宋江勤¹ 胡福英² 李华顺³ 田友军⁴ 丁妍⁵ 周君阳¹

【摘要】目的 探讨宏基因二代测序(mNGS)协助诊断侵袭性真菌病的临床应用价值,为临床诊断和治疗毛霉菌病提供病原学依据。**方法** 通过mNGS技术检测1例患有不明原因肺部感染者的肺泡灌洗液以确定病原体,并根据mNGS检测报告调整其治疗方案。**结果** 患者间断胸痛、咳嗽5月余,胸部CT示双肺呈多发性阴影伴空洞形成,肺组织活检提示凝固性坏死,常规实验室及病原学检查均未见异常,行多种抗感染治疗方案均未见明显好转,后取肺泡灌洗液送检mNGS提示病原体为总状横梗霉菌,改用两性霉素B行抗感染治疗后,患者感染病灶缩小,症状明显缓解。**结论** mNGS是鉴定罕见病原体的重要辅助诊断方法,对协助诊断肺部侵袭性真菌病具有重要意义。

【关键词】 宏基因二代测序; 侵袭性真菌病; 毛霉菌病; 总状横梗霉菌

Metagenomics next-generation sequencing for assisting the diagnosis of mucormycosis: a case report and literature review Song Ying¹, Song Jiangqin¹, Hu Fuying², Li Huashun³, Tian Youjun⁴, Ding Yan⁵, Zhou Junyang¹. ¹Laboratory Department, ²Respiratory Department, ³Pathology Department, ⁴Imaging Department, the First People's Hospital of Tianmen City, Tianmen 431700, China; ⁵Hubei Key Laboratory of Embryonic Stem Cell Research, Hubei University of Medicine, Shiyian 442000, China
Corresponding author: Song Jiangqin, Email: 25248447@qq.com

【Abstract】Objective To explore the clinical application value of metagenomics next-generation sequencing (mNGS) in assisting the diagnosis of invasive fungal diseases, and to provide pathogenic evidence for the clinical diagnosis and treatment of mucormycosis. **Methods** The alveolar lavage fluid of a patient with unexplained lung infection was detected by mNGS to determine the pathogen, and the treatment plan was adjusted according to the mNGS test report. **Results** The patient had intermittent chest pain and cough for longer than 5 months. The chest CT showed multiple shadows and cavities in both lungs. There was no abnormality in routine laboratory and pathogenic examinations, and no significant improvement was found after various anti-infection treatments. The mNGS of alveolar lavage fluid submitted for examination revealed that the pathogen was *Lichtheimia ramosa*. After switching to amphotericin B for anti-infection treatment, the patient's infected lesions shrank and the symptoms relieved significantly. **Conclusions** mNGS is an important auxiliary diagnostic method to identify rare pathogens, which is of great significance to assist the diagnosis of lung invasive mycosis.

【Key words】 Metagenomic next-generation sequencing; Invasive fungal pneumonia; Mucormycosis; *Lichtheimia ramosa*

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2022.01.008

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(No. 81602297); 广西自然科学基金项目青年科学基金项目(No. 2018JJB140322); 2018年度湖北医药学院自由探索基金面上项目(No. FDFR201803)

作者单位: 431700 天门市, 天门市第一人民医院检验科¹、呼吸内科²、病理科³、影像科⁴; 442000 十堰市, 湖北医药学院胚胎干细胞湖北省重点实验室⁵

通信作者: 宋江勤, Email: 25248447@qq.com

侵袭性真菌病在临床上相对少见,其起病隐匿、临床症状不典型、病情进展迅速,早期病原学诊断较困难,病死率较高。总状横梗霉菌(*Lichtheimia ramosa*)是一种隶属于横梗霉属、毛霉目、接合菌门的真菌生物,免疫功能低下者易感^[1],可导致毛霉菌病,其特征为菌丝侵犯血管,引起血栓形成及坏死,可导致鼻、脑、消化道及呼吸道等处病变^[2]。毛霉目真菌很少感染免疫功能正常的宿主^[3]。由于毛霉菌病发病急、进展快,传统检测方法阳性率低,一般抗菌治疗无效,预后差、病死率较高,而通常在患者病死后尸检才明确诊断,因此尽早确定病原菌对于改善预后、降低病死率,具有重要意义。

近年来,宏基因组二代测序(metagenomic next-generation sequencing, mNGS)筛查病原体技术快速发展,mNGS测序通量高、速度快,理论上能检测所有已知病原体,对危重及疑难感染性疾病,可早期、快速、精准鉴定其病原体,为临床治疗提供依据^[4-6]。现报道采用mNGS协助诊断毛霉菌病1例,以期为临床诊断和治疗侵袭性真菌病提供借鉴。

一、病例资料

1. 病史与体格检查:患者,男性、51岁,因“间断胸痛、咳嗽5月余”于2020年9月21日于天门市第一人民医院呼吸内科治疗。患者曾于2020年3月26日因“胸痛3 d”于本院呼吸内科治疗,查体:咽不红,双侧扁桃体不大,表浅淋巴结不大,双肺呼吸音粗糙,未闻及干湿啰音。结合病史、体格检查、辅助检查临床诊断为“病毒性肺炎,支气管扩张”,予以抗感染(莫西沙星)、抗病毒(阿比多尔)及对症支持治疗,住院12 d,胸痛、胸闷、气促以及咳嗽等症状减轻出院。

患者因“胸痛不适伴活动后胸闷气短”,多次入院治疗,疗效欠佳。9月3日通过NGS检测其肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)(表2),结合病史、临床表现、辅助检查结果,确诊为毛霉菌病。患者于2020年9月21日入本院继续治疗。

体格检查:患者神志清楚,咽部无充血,双侧扁桃体不大,表浅淋巴结未及肿大,右肺呼吸音稍减弱,未闻及干湿啰音,心界不大、心音可、律齐、无杂音。

既往史:伴急性肾功能不全史;无高血压、冠心病、糖尿病、肺结核、肝炎病史;有参麦过敏史。发病以来,食欲减退、精神稍差。

2. 辅助检查:患者3月21日入院后查血常规,中性粒细胞比率:78.5%(正常值:40%~75%),淋巴细胞比率:14.70%(正常值:40%~75%)。白细胞介素6(interleukin-6, IL-6):28.68 pg/ml(正常值:<7 pg/ml);肝肾功能、凝血功能、红细胞沉降率(erythrocyte sedimentation rate, ESR)、呼吸道病毒(嗜肺军团菌、肺炎支原体、肺炎衣原体、Q热立克次体、腺病毒、呼吸道合胞病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒、副流感病毒)无明显异常,新型冠状病毒核酸检测阴性。自4月3日起,患者ESR开始升高。8月18日查抗可溶性抗原(extractable nuclear antigen, ENA)、免疫球蛋白IgG、IgA、IgM,补体C3、C4,无明显异常。患者病程中血常规指标变化详见表1。

该患者首次入院胸部X线计算机断层摄影(computed tomography, CT)(图1A)提示双肺感染性病变,双肺见多发斑片状磨玻璃影,边缘模糊,以右下肺病灶较为明显,双侧胸膜增厚黏连。患者出院后反复胸痛不适,4月23日再次入院,复查胸部CT(图1B)提示:双肺见多发斑片状及条片状高密度灶,部分病灶边缘模糊,右肺下叶病灶较前稍增大,右肺上叶前段新增小片状磨玻璃密度灶,左肺下叶病灶体积稍缩小。5月29日复查胸部CT(图1C)提示双肺见多发斑片状及条索状高密度灶,边界不清,邻近胸膜增厚、粘连,右上肺及下肺病灶范围无明显缩小。8月29日复查胸部CT(图1D)提示:双肺内见多发斑片状及条索状高密度灶,双肺下叶部病灶范围稍缩小,右肺上叶及左肺下叶可见新增磨玻璃样及片状实性高密度影,边界欠清晰。10月1日复查胸部CT(图1E)右上肺部分病灶内见

表1 患者2020年住院期间血常规、C-反应蛋白和ESR

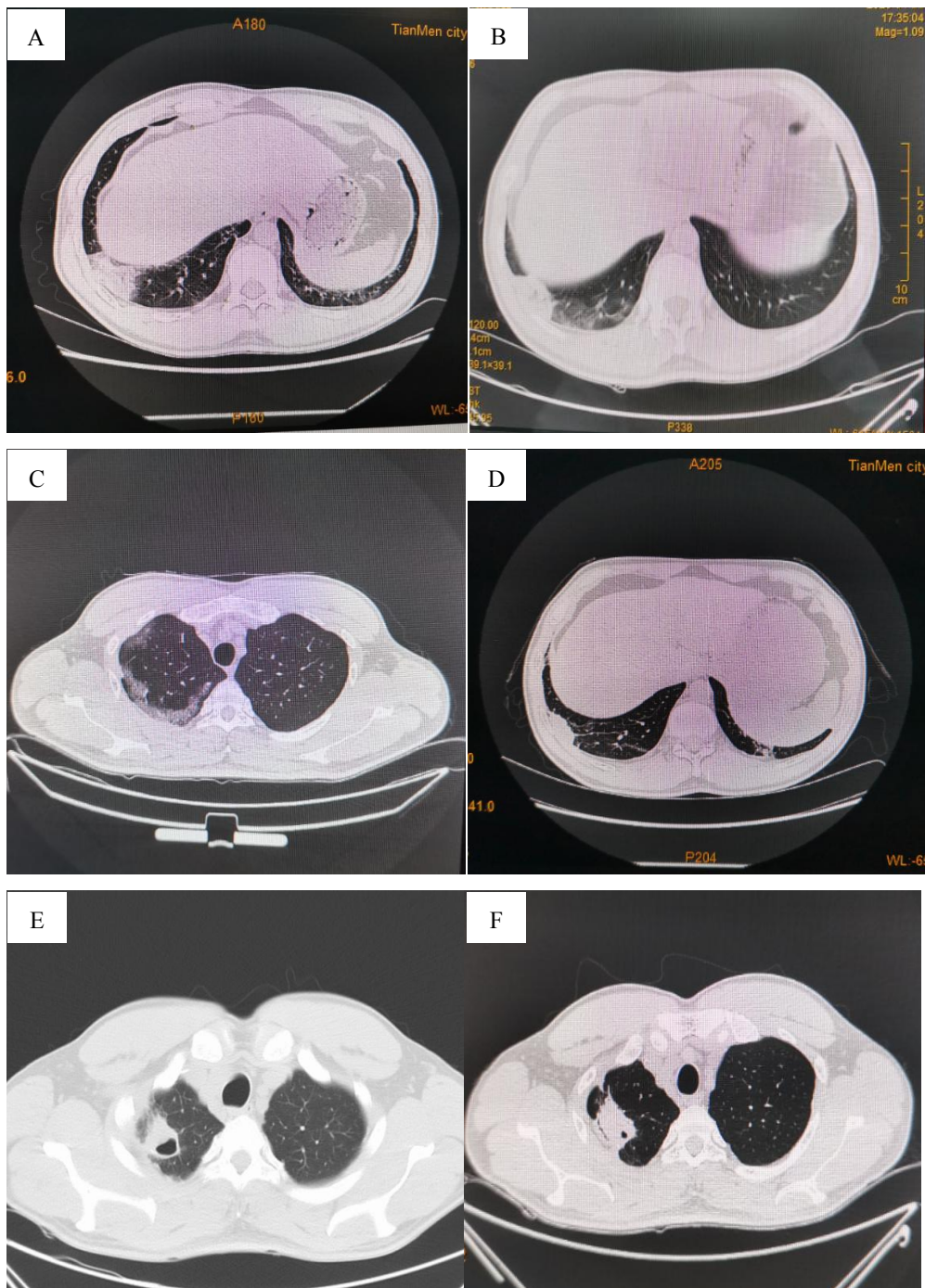
指标	正常参考值	3月26日	3月27日	4月3日	4月24日	8月18日	8月29日	9月23日
白细胞($\times 10^9/L$)	3.5~9.5	8.02	6.76	5.57	5.16	10.54	7.54	6.02
中性粒细胞($\times 10^9/L$)	1.8~6.3	6.29	5.36	3.98	3.61	9.42	5.87	4.45
中性粒细胞比率(%)	40~75	78.50	79.20	71.40	69.90	89.30	77.90	74.00
淋巴细胞($\times 10^9/L$)	1.1~3.2	1.18	0.83	0.84	0.68	0.67	1.13	0.83
淋巴细胞百分比(%)	20~50	14.70	12.30	16.90	13.20	6.40	15.00	13.80
CRP(mg/L)	≤ 6	9.99	11.32	5.15	8.96	35.08	5.77	35.94
ESR(mm/h)	0~20	—	11.00	68.2	—	56.00	30.00	45.00

注:“—”未检测

空洞形成，双肺下叶部分病灶范围扩大，右侧胸腔积液增多，磨玻璃影未见。10月12日复查胸部CT（图1F）示：较前片（10月1日），大部分病灶范围缩小，右上肺空洞较前稍缩小，右侧胸腔积液基本消失。

3. 病理学：4月24日患者行CT引导下经皮肺活检术，组织活检提示：部分肺泡组织凝固性坏死（见图2）；真菌荧光染色为阴性。

4. 肺组织病原学检查：4月24日患者肺组织革兰染色示



注：A：3月26日CT示双肺感染性病变。B：4月22日CT示右下肺见斑片状高密度灶，病灶范围较前明显增大。C：5月29日CT示右上肺及下肺病灶范围无明显缩小。D：8月29日CT示右肺上叶及左肺下叶可见新增磨玻璃样及片状实性高密度影。E：10月1日CT示部分病灶内见空洞形成，磨玻璃影未见。F：10月12日CT示大部分病灶范围稍缩小，右上肺空洞较前缩小

图1 患者胸部CT

未发现细菌、真菌菌丝及孢子；组织培养（普通细菌、厌氧菌、真菌）示无细菌生长。

5. 肺泡灌洗液宏基因二代测序：检出微生物主要为横梗霉属总状横梗霉菌，序列数为260，相对丰度为52.95%；耐药基因未检出，见表2。

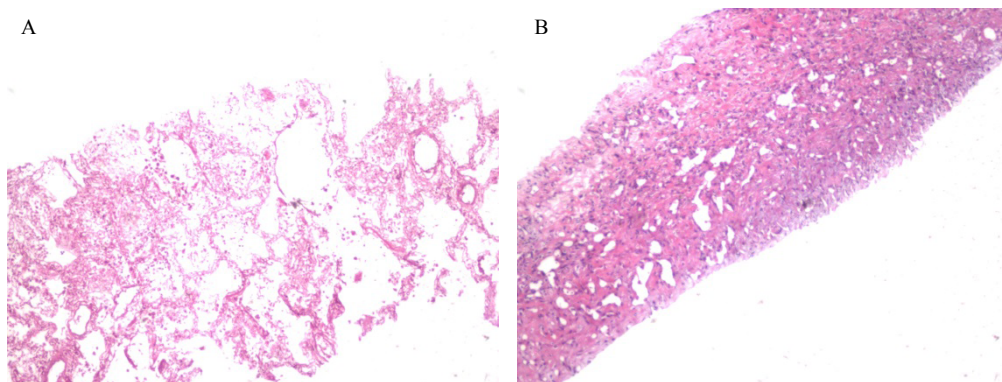
二、诊疗过程

患者于2020年9月21日转入本院继续治疗，根据患者病史、临床表现，NGS以及CT等结果，考虑患者为肺部真菌感染，病原菌为总状横梗霉菌，自2020年9月5日开始使用两性霉素B抗真菌治疗，剂量为30 mg/10 h，静脉泵入。住院期间多次查血钾偏低，尿素、肌酐增高，行补钾、护肾等对症治疗。10月12日复查胸部CT示大部分病灶范围缩小，右上肺空洞减小（图1F），患者咳嗽、胸闷等症状缓解出院，后转为门诊治疗，期间定期复查胸部CT、血常规及肝肾功能，至2021年6月疗程结束。

表2 患者肺泡灌洗液宏基因二代测序

名称	序列数	相对丰度 (%)
属 (Genus)		
诺卡菌属	1	0.20
横梗霉属	264	53.77
小克银汉霉属	4	0.82
葡萄球菌属	25	5.09
叶单胞菌属	31	6.31
种 (Species)		
奶牛乳房炎性诺卡菌	1	0.20
总状横梗霉菌	260	52.95
灰色小克银汉霉菌	4	0.82
表皮葡萄球菌	24	4.89
牙龈叶单胞菌	30	6.11

注：①序列数：通过高通量测序和生物信息学分析，可以唯一一对到某微生物属或种的特异性序列数目。②相对丰度：某微生物属或种在整个标本中检测到的微生物中所占的比例，丰度越高表示其所占比例越高。



注：A：肺泡腔内见组织细胞有纤维素样渗出物；B：坏死肺泡组织边缘见纤维、血管增生

图2 患者肺组织HE染色 (×20)

表3 患者2020年住院期间血钾、尿素和肌酐 (mmol/L)

指标	正常参考值	9月21日	9月23日	9月25日	9月27日	9月29日	10月1日	10月5日
血钾	3.5~5.3	4.61	3.22	3.02	2.72	2.91	3.34	3.56
尿素 (mmol/L)	3.1~8	4.55	8.63	7.73	7.25	6.35	8.11	8.75
肌酐 (mmol/L)	57~97	90.1	140.1	132.7	136.4	127.1	163.4	138.3

讨论 毛霉目真菌在土壤、粪便、禾草及空气等环境中广泛存在^[7]。尸检研究表明，毛霉真菌是侵入性真菌感染中常见的致病菌^[8-9]；据统计，2007至2015年，欧洲毛霉菌病发病率不断上升，其中以根霉属最常见^[10]。毛霉菌病是一种发病急、进展快、病死率极高的系统性条件致病性真菌感染。免疫功能低下者易感，尤其是患有糖尿病、白血病、免疫功能缺陷性疾病、恶性肿瘤患者；大剂量使用抗菌药物、皮质类固醇激素患者最易感染^[11]。该病起初多发于鼻黏膜或鼻窦，继而扩展至眼眶软组织、面腭及脑，也可全

身性播散，预后较差。毛霉目真菌感染肺部的病例罕见^[12]，本例患者既往体健，无高血压、冠心病、糖尿病、肺结核病史等慢性病史，未大剂量使用抗菌药物、激素，不属毛霉目真菌易感人群，且发病特点及临床表现不典型，因此不能忽视免疫功能正常的人群也能发生毛霉菌病。

侵袭性真菌病的诊断通常依赖于真菌培养和活组织检查，但阳性率较低，毛霉菌病患者易错过最佳治疗时间^[13]；尸检有助于明确诊断，但因其滞后性，对临床治疗意义较小^[14-15]。G试验是临床检测真菌抗原的常规方法^[16]，但毛霉

菌不产生抗原物质,故G试验对毛霉菌诊断价值较低。对于侵入性真菌感染的诊断,真菌培养(传统“金标准”)检测周期长,阳性率较低;G试验和GM试验的结果缺乏特异性,灵敏度较差。本例患者在发病初期行组织真菌荧光染色、组织培养、组织革兰染色,结果均为阴性,未能明确病原体。相比传统基因检测方法,mNGS检测具有明显技术优势和广泛的临床用途^[17-18]。mNGS可一次性产生覆盖基因组特定区域(从数个基因到数百个基因以至全外显子组或全基因组)的高通量测序数据^[19],可同时检测多种细菌、病毒、真菌或寄生虫的DNA/RNA序列,且准确率高^[20]。mNGS检测费用较高,但相比传统检测方法,单基因单位点的平均检测费用更低,大部分患者可负担^[21]。mNGS灵敏度高于传统临床检验方法^[22]。mNGS可为复杂感染的诊断提供直接线索^[23]。考虑到毛霉菌病的高病死率,对于不明原因的重症肺炎,可将mNGS作为常规检测^[24]。本例患者于2020年3月出现右侧胸痛,运动后疼痛加重,气促明显,无头痛发热,无咳嗽咯痰。时值新型冠状病毒肺炎流行,患者为湖北医务工作者,胸部CT示感染性病变,根据病史、临床表现及CT结果,行抗病毒、抗感染治疗,疗效欠佳。患者后因“胸痛”多次住院,给予多种抗感染治疗方案,病情均无明显改善,并于8月份加重,出现磨玻璃影及胸腔积液,胸痛不适加重,伴活动后胸闷气短。利用mNGS检测其BALF提示总状横梗霉菌感染,临床考虑毛霉菌病,经两性霉素B治疗后,患者双肺病灶减小,胸痛症状减轻,咳嗽完全缓解,疗效明显。两性霉素B可导致药物性低钾以及肾脏损伤,患者住院期间多次查血钾偏低,尿素、肌酐增高,提示应定期监测服用两性霉素B患者的电解质、肾功能指标(尿素和肌酐),注意补钾和保护肾功能。

毛霉菌病发病急、进展快、病死率极高,早期诊断和选择敏感抗真菌药物治疗是患者获得良好预后的关键^[25]。本例通过mNGS检测确定不明原因肺部感染者的病原体(总状横梗霉菌),并根据mNGS检测报告调整其治疗方案,疗效较好。因侵入性真菌感染诊断困难,对于不明原因肺炎患者(特别是高度怀疑毛霉菌病患者),mNGS应成为常规检测手段。可根据mNGS及其他检查结果,确定感染病原体,选用敏感药物,提高毛霉菌病的治愈率。总之,mNGS可对侵袭性真菌病做出准确快速的病原学诊断并提供治疗依据。

参 考 文 献

- [1] Kutlu M, Ergin C, Bir F, et al. Pulmonary mucormycosis due to *Lichtheimia ramosa* in a patient with HIV infection[J]. *Mycopathologia*,2014,178(1-2):111-115.
- [2] Trastoy R, Manso T, Garcia X, et al. Pulmonary co-infection due to *Nocardia cyriacigeorgica* and *Aspergillus fumigatus*[J]. *Rev Esp Quimioter*,2017,30(2):123-126.
- [3] Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ. Zygomycetes in human disease[J]. *Clin Microbiol Rev*,2000,13(2):236-301.
- [4] Sintchenko V, Holmes EC. The role of pathogen genomics in assessing disease transmission[J]. *BMJ*,2015,350:h1314.
- [5] 林爱清,张璐,成宝涛,等.二代测序技术应用于脑脊液检测在结核性脑膜炎中的早期诊断价值[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*,2020,14(4):291-295.
- [6] 杨理,顾佳,龙筱露,等.利用高通量宏基因组测序技术检测血液病患者感染性病原体的横断面研究[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*,2020,14(2):99-103.
- [7] Alastruey-Izquierdo A, Hoffmann K, de Hoog GS, et al. Species recognition and clinical relevance of the zygomycetous genus *Lichtheimia* (syn. *Absidia* pro parte, *Mycocladius*)[J]. *J Clin Microbiol*,2010,48(6):2154-2170.
- [8] Kurosawa M, Yonezumi M, Hashino S, et al. Epidemiology and treatment outcome of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies[J]. *Int J Hematol*,2012,96(6):748-757.
- [9] Shimodaira K, Okubo Y, Nakayama H, et al. Trends in the prevalence of invasive fungal infections from an analysis of annual records of autopsy cases of Toho University[J]. *Mycoses*,2012,55(5):435-443.
- [10] Guinea J, Escribano P, Vena A, et al. Increasing incidence of mucormycosis in a large Spanish hospital from 2007 to 2015: Epidemiology and microbiological characterization of the isolates[J]. *PLoS One*,2017,12(6):e179136.
- [11] Zhang Q, Liu H, Qiu S, et al. A rare case of pulmonary coinfection by *Lichtheimia ramosa* and *Aspergillus fumigatus* in a patient with delayed graft function after renal transplantation[J]. *Transplant Proc*,2019,51(2):551-555.
- [12] Gerlach MM, Lippmann N, Kobelt L, et al. Possible pulmonary *Rhizopus oryzae* infection in a previously healthy child after anear-drowning incident[J]. *Infection*,2016,44(3):361-364.
- [13] Zhang K, Yu C, Li Y, et al. Next-generation sequencing technology for detecting pulmonary fungal infection in bronchoalveolar lavage fluid of a patient with dermatomyositis: a case report and literature review[J]. *BMC Infect Dis*,2020,20(1):608.
- [14] Szelnyi H, Foss HD, Kreuser ED, et al. Fatal *Mucor* pneumonia after treatment with 2-chlorodeoxyadenosine for non-Hodgkin's lymphoma[J]. *Ann Hematol*,1996,73(3):145-147.
- [15] Hamdi T, Karthikeyan V, Alangaden GJ. Mucormycosis in a renal transplant recipient: case report and comprehensive review of literature[J]. *Int J Nephrol*,2014,2014:950643.
- [16] Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis[J]. *Lancet Infect Dis*,2005,5(10):609-622.
- [17] 郑微,赵鹏,张永宏,等.宏基因组测序技术分析原发性肝癌患者肠道菌群特征[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*,2021,15(3):149-157.
- [18] 刘鑫喆,滑明溪,王慧珠,等.基于全基因组序列的耐碳青霉烯类不动杆菌的耐药与毒力研究[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*,2020,14(5):367-373.
- [19] Zhang X, Liang Z, Wang S, et al. Application of next-generation

- sequencing technology to precision medicine incancer: joint consensus of the Tumor Biomarker Committee of the Chinese Society of Clinical Oncology[J]. *Cancer Biol Med*,2019,16(1):189-204.
- [20] Long Y, Zhang Y, Gong Y, et al. Diagnosis of sepsis with cell-free DNA by next-generation sequencing technology in ICU patients[J]. *Arch Med Res*,2016,47(5):365-371.
- [21] 周彩存, 王洁, 程颖, 等. 二代测序技术在NSCLC中的临床应用中国专家共识(2020版)[J]. *中国肺癌杂志*,2020,23(9):741-761.
- [22] 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.
- [23] Yohe S, Thyagarajan B. Review of clinical next-generation sequencing[J]. *Arch Pathol Lab Med*,2017,141(11):1544-1557.
- [24] Boers SA, Jansen R, Hays JP. Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*,2019,38(6):1059-1070.
- [25] Kaneko Y, Oinuma KI, Terachi T, et al. Successful treatment of intestinal mycosis caused by a simultaneous infection with *Lichtheimia ramosa* and *Aspergillus calidoustus*[J]. *Intern Med*,2018,57(16):2421-2424.

(收稿日期: 2021-03-28)

(本文编辑: 孙荣华)

宋瑛, 宋江勤, 胡福英, 等. 宏基因组二代测序协助诊断毛霉菌病一例并文献复习[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*, 2022,16(1):54-59.