

# 疑难危重症肺部感染 3 例患儿的病原宏基因组检测结果分析

曹芳<sup>1</sup>, 王昶<sup>2</sup>, 华山<sup>1</sup>, 金丹群<sup>3</sup>

1. 安徽医科大学附属安徽省儿童医院呼吸科, 安徽 合肥 233000;
2. 安徽医科大学附属安徽省儿童医院影像中心, 安徽 合肥 233000;
- 3 安徽医科大学附属安徽省儿童医院重症医学科, 安徽 合肥 233000

**摘要:** **目的** 对 3 例疑难危重症肺部感染患儿的病原宏基因组检测结果进行分析,探讨其在临床的应用价值。**方法** 对安徽省儿童医院呼吸内科及重症监护室 2019 年 4 月至 6 月收治的 3 例疑难危重症肺部感染患儿进行常规病原检测的同时,进行外周血(1 例患儿同时对肺泡灌洗液标本)进行基于二代测序技术的病原宏基因组检测。**结果** 例 1 外周血宏基因组检测结果为 DNA 病毒人类腺病毒 B;例 2 肺泡灌洗液宏基因检测结果为缓症链球菌、肺炎链球菌、结核分枝杆菌复合群、RNA 病毒人冠状病毒 OC43;外周血宏基因检测结果为结核分枝杆菌复合群;例 3 外周血宏基因组检测结果为人类腺病毒 7 型、鲍氏不动杆菌和铜绿假单胞菌。**结论** 随着病原宏基因组检测技术的逐渐成熟,对于疑难危重症肺部感染患儿在常规病原学检测基础上尽早进行病原宏基因组检测,并结合临床资料进行综合分析确定为定植菌、背景菌还是致病菌,可为临床精准治疗、及时挽救患儿提供重要参考价值,未来可能在临床广泛应用。

**关键词:** 重症肺部感染; 儿童; 病原; 宏基因组检测; 二代测序技术

**中图分类号:** R 446.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2020)04-0539-04

世界卫生组织资料显示,2016 年肺炎造成 92 万 5 岁以下儿童死亡,其中 98% 来自发展中国家,肺炎也是当前我国 5 岁以下儿童死亡的主要原因之一,其中绝大部分儿童肺炎为社区获得性肺炎(community acquired pneumonia, CAP)<sup>[1]</sup>。重症肺部感染起病急、病情进展快、病死率高,目前我国虽然诊疗技术在逐渐提高,但重症肺部感染的高病死率及其后遗症比如气道闭塞等严重影响患儿生命质量,故及时精准诊断及治疗十分重要。本文对 3 例本院收治的重症肺部感染患儿进行基于二代测序技术的病原宏基因组检测,结合患儿临床资料进行综合分析,以及时明确病原,为临床及时提供精准治疗的参考依据。

## 1 资料与方法

**1.1 临床资料** 3 例对象为安徽省儿童医院呼吸内科及重症监护室 2019 年 4 月至 6 月收治的疑难危重症肺部感染患儿。

**1.1.1 例 1** 男,10 个月 8 d,因“发热伴咳喘 4 d”入院,入院次日患儿出现呼吸衰竭进入重症监护病房给予呼吸机支持治疗,同时予阿奇霉素、头孢唑肟抗感染及甲泼尼龙抗炎、硫酸镁平喘及雾化吸入等治

疗,疗效不佳,患儿仍持续高热,肺部 CT 可见大片肺实变影,相关痰液、血液及支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)送检病原学检查均阴性。

**1.1.2 例 2** 女,13 岁,因“间断发热 20 d”入院,患儿入院次日突然出现呼吸困难伴胸痛,立即完善肺部高分辨 CT 检查提示:两肺广泛弥漫间质性改变(图 1),后转入重症监护病房治疗,临床经验考虑肺含铁血黄素沉着症及肺部真菌感染可能,给予复方新诺明、卡泊芬净及阿奇霉素、头孢哌酮舒巴坦、利奈唑胺等抗感染治疗,患儿症状无缓解,常规送检病原学检查均阴性。其 BALF 病理 HE 染色结果见图 2。

**1.1.3 例 3** 女,1 岁 1 个月,因“咳喘伴间断发热 20 d”入院,入院完善肺部 CT 检查示:双肺可见少许片状密度增高影,给予利奈唑胺、头孢哌酮舒巴坦及阿奇霉素抗感染,患儿仍持续高热,精神差,呼吸费力明显,常规送检病原学检查及 BALF 病原学检查均阴性。

## 1.2 方法

**1.2.1 病原微生物宏基因组检测的送检标本** 3 例均取外周血行病原微生物宏基因组检测,例 2 支气管

镜灌注送检 BALF 找肺含铁细胞,并同时 BALF 行病原微生物宏基因组检测(广州赛哲生物科技股份有限公司)。

1.2.2 病原微生物宏基因组检测 以 3 例患儿的外周血及例 2 的 BALF 作为标本提取 DNA,通过免疫磁性微球(MAGEN,广州,中国)提取而得。具体步骤:(1)解冻样本加 20  $\mu$ l SDS 缓冲液,10  $\mu$ l 蛋白酶 K,经过几次洗脱,获得总 DNA 后用 Qubit2.0 定量。(2)扩增后的二代测序 DNA 文库由前述提取的临床核酸通过 Nextera XT(Illumina,美国)建库而得。文库构建包括 DNA 打断(DNA 打断长度为 300 ~ 500 bp)、文库扩增以及 PCR 产物纯化。(3)测序在 illumia NextSeq 测序仪中进行。在去除低质量测序序列后,数据会首先比对到人类参考基因组,剩余序列将比对到美国国家生物技术信息中心(National Center For Biotechnology Information,NCBI)数据库中,为了全面发现细菌、病毒、真菌和寄生虫,序列还会在 GenBank 上进行比对,最终获得识别出的病原体并进行定量,最后生成临床检测报告。

## 2 结果

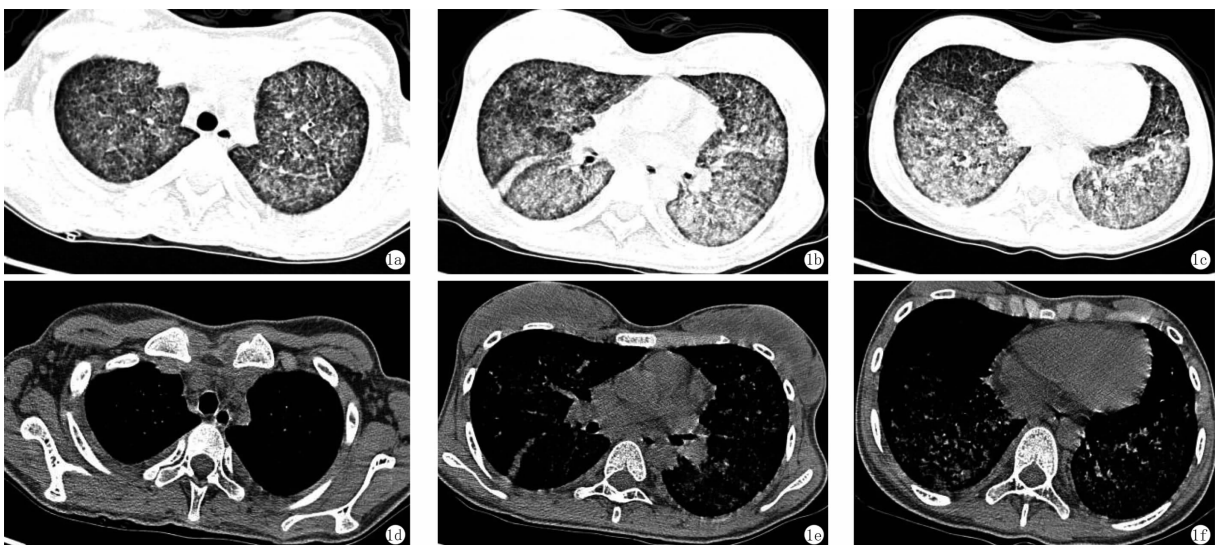
病原微生物宏基因组检测送广州赛哲生物科技股份有限公司进行。(1)例 1 外周血检测结果(图 3、图 4):DNA 病毒为人类腺病毒 B(14544 Total reads)。(2)例 2 BALF 检测结果:细菌为缓症链球菌(44.83%,78 Total reads),肺炎链球菌(35.63%,62 Total reads);结核分枝杆菌为结核分枝杆菌复合群(19.54%,34 Total reads);RNA 病毒为人冠状病毒 OC43(1 Total reads);外周血检测结果:结核分枝杆菌为结核分枝杆菌复合群(1 Total reads)。(3)例 3 外

周血检测结果:DNA 病毒为人类腺病毒 7 型(34794 Total reads),细菌为鲍氏不动杆菌(60.37%,5768 Total reads),铜绿假单胞菌(39.63%,3787 Total reads)。

## 3 讨论

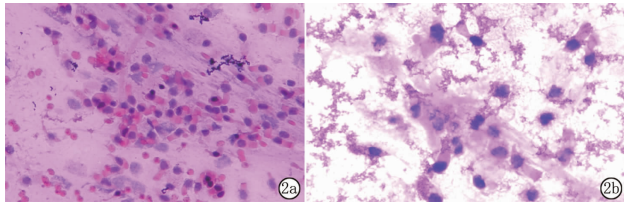
感染是危急重症患儿死亡的主要原因之一,尤其对于儿童及婴幼儿,因其免疫功能尚未发育完善,故更易出现感染后病情进展快,易急剧恶化,临床医生若不能及时准确判断病情提供精准治疗,错过最佳治疗时机,可直接危及患儿生命以及造成严重后遗症。目前就感染而言,病原学的宏基因组检测已经在临床逐渐应用<sup>[2-3]</sup>。人体的皮肤、呼吸道、消化道等部位共生着数量庞大的微生物,成人体表和体内的微生物细胞估计是人类自身细胞的 10 倍,占体重的 1% ~ 2%<sup>[4-5]</sup>。宏基因组的概念为 Handelsman 等<sup>[6]</sup>在 1998 年提出,指的是环境中全部微小生物、遗传物质的总和。近年随着二代测序技术的飞速发展,二代测序结合宏基因组技术不依赖传统病原微生物培养,直接对临床样本中的核酸进行高通量测序,然后与数据库进行对比,有能够快速检测病原微生物的优势<sup>[7]</sup>,2019 年 2 月中华急诊医学杂志发表了关于《宏基因组分析和诊断技术在危急重症感染应用的专家共识》<sup>[8]</sup>,此专家共识目前较多基于成人研究。

本文对本院收治的 3 例疑难危重肺部感染的患儿在进行传统病原学检测结果均阴性的基础上完善外周血和/或 BALF 的病原学宏基因组检测。例 1 检测结果为人类腺病毒 B,目前的文献资料提示人类腺病毒是重症肺炎较常见病原<sup>[3,9]</sup>,结合我国今年腺病毒感染流行趋势以及患儿临床症状及其他辅助化验,



注:1a~1c:肺窗,双肺呈弥漫性间质改变;1d~1f:纵隔窗,双肺散在实质性病变伴双侧胸腔积液。

图 1 例 2 患儿肺部高分辨 CT 提示双肺呈弥漫性改变



注:2a:HE 染色, ×20;2b:HE 染色, ×10;诊断意见:送检“肺泡灌洗液”涂片内可见大量呼吸道上皮细胞及不等量淋巴浆细胞、中性粒细胞,散在巨噬细胞及含铁血黄素,背景较多红细胞、黏液及渗出坏死物。

图 2 例 2 患儿 BALF 送检病理检查结果

细菌					
类型	属	种	拉丁文名	total_reads_percent	Total reads
-	-	-	-	-	-
结核分枝杆菌					
类型	属	种	拉丁文名	total_reads_percent	Total reads
B:G+	分枝杆菌属	结核分枝杆菌复合群	<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>	-	1
真菌					
类型	属	种	拉丁文名	total_reads_percent	Total reads
-	-	-	-	-	-
DNA 病毒					
类型	属	种	拉丁文名	total_reads_percent	Total reads
-	-	-	-	-	-
RNA 病毒					
类型	属	种	拉丁文名	total_reads_percent	Total reads
-	-	-	-	-	-
其他					
类型	属	种	拉丁文名	total_reads_percent	Total reads
-	-	-	-	-	-

图 3 例 2 患儿外周血病原宏基因组检测结果

细菌					
类型	属	种	拉丁文名	total_reads_percent	Total reads
B:G+	链球菌属	缓症链球菌	<i>Streptococcus mitis</i>	44.83%	78
		肺炎链球菌	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	35.63%	62
结核分枝杆菌					
类型	属	种	拉丁文名	total_reads_percent	Total reads
B:G+	分枝杆菌属	结核分枝杆菌复合群	<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>	19.54%	34
真菌					
类型	属	种	拉丁文名	total_reads_percent	Total reads
-	-	-	-	-	-
DNA 病毒					
类型	属	种	拉丁文名	total_reads_percent	Total reads
-	-	-	-	-	-
RNA 病毒					
类型	属	种	拉丁文名	total_reads_percent	Total reads
V:ssRNA (+)	-	人冠状病毒 0C43	<i>Human coronavirus OC43</i>	-	1
其他					
类型	属	种	拉丁文名	total_reads_percent	Total reads
-	-	-	-	-	-

图 4 例 2 患儿 BALF 病原宏基因组检测结果

考虑病原符合,继续给予丙种球蛋白支持及甲泼尼龙抗炎及雾化、氧疗等治疗,患儿病愈出院。例 2 患儿肺部 CT 影像学提示两肺呈广泛弥漫性间质性改变(图 1),此患儿临床医生开始根据临床经验及 BALF 病理结果(图 2),考虑肺含铁血黄素沉着症及肺部真菌感染等可能,并给予相关药物及对症支持治疗,但患儿病情并未缓解,外周血及 BALF 病原宏基因组检测结果(图 3、图 4),因胞内菌/真菌释放入血的含量低,结核分枝杆菌虽然在此患儿 BALF 及外周血浆中检出序列数较低,但仍需考虑结核分枝杆菌感染。进一步查阅文献成人有以肺间质改变为主的重症肺结核病例报告及临床肺结核误诊间质性肺疾病的病例<sup>[10-12]</sup>,影像学高分辨 CT 也有相关资料支持<sup>[13]</sup>,结合患儿外周血及 BALF 病原宏基因组检测结果同时检测到结核分枝杆菌复合群,综合考虑患儿存在结核分枝杆菌感染,虽 BALF 标本病原宏基因组检测到缓症链球菌及肺炎链球菌,但根据《宏基因组分析和诊断技术在危急重症感染应用的专家共识》<sup>[8]</sup>进行解读,这两种细菌检出序列数不高,且可为口咽部的定植菌,故不予考虑,患儿在及时转结核病院给予抗结核规范治疗后病情得到控制,临床症状缓解。例 3 外周血病原宏基因组检测结果 DNA 病毒为人类腺病毒 7 型(34794 Total reads),细菌为鲍氏不动杆菌(60.37%, 5768 Total reads),铜绿假单胞菌(39.63%, 3787 Total reads),结合患儿临床症状及检测结果,仍考虑人类腺病毒 7 型感染及混合相关细菌感染,考虑头孢哌酮舒巴坦抗菌谱可覆盖病原,未予调整抗生素,并予丙种球蛋白输注及氧疗等支持治疗,患儿病愈出院。

目前传统的病原学检测技术在临床应用较局限,体外可培养的病原极少,基于二代测序技术逐渐成熟的病原宏基因组检测目前可及时为临床提供病原参考,为临床精准抗感染治疗提供可靠依据,但目前人体 RNA 转录本身具有更高的复杂度,且 RNA 容易降解,对运输和保存有较高要求<sup>[8]</sup>,否则直接影响检测结果,故病原 RNA 检测还存在一定困难,也导致其应用受限,且虽可检测出病原,但药物敏感的检测应用目前也受限,故临床医生仍需结合多项检测、检查及临床经验并结合当地当时病原的流行病进行综合判断,精准治疗,但随着技术的逐渐成熟,未来这些问题可望被逐渐克服。

综上所述,病原学的宏基因组检测可为临床感染性疾病尤其为疑难危重症感染性疾病的诊治带来精准依据,且快速,未来临床可能会广泛开展应用。

- [4] 孜那提·努尔太,成芳,孟涛. 179 例结直肠癌肝转移初始不可切除的转化治疗疗效及预后分析[J]. 临床肿瘤学杂志,2019,24(5):418-422.
- [5] Baba K, Oshita A, Kohyama M, et al. Successful treatment of conversion chemotherapy for initially unresectable synchronous colorectal liver metastasis [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(6):1982-1988.
- [6] Mohammad, WM, Balaa FK. Surgical management of colorectal liver metastases[J]. Clin Colon Rectal Surg, 2009, 22(4):225-232.
- [7] Palkovics A, Vereczkei A, Kalmár KN, et al. The issue of survival after colorectal liver metastasis surgery: parenchyma sparing vs. radicality[J]. Anticancer Res, 2018, 38(11):6431-6438.
- [8] 张忠涛,蔡军. 结肠癌多学科综合治疗协作组诊疗模式专家共识[J]. 中国实用外科杂志, 2017, 37(1):44-45.
- [9] Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer [J]. Ann Oncol, 2016, 27(8):1386-1422.
- [10] 刘虎,杨家和. 结直肠癌肝转移的转化治疗研究新进展[J]. 肝胆外科杂志, 2018, 26(6):472-475.
- [11] 王崑,邢宝才. 结直肠癌肝转移的转化治疗[J]. 中国实用外科杂志, 2016, 36(4):407-411.
- [12] Fleissig A, Jenkins V, Catt S, et al. Multidisciplinary teams in cancer care: are they effective in the UK? [J]. Lancet Oncol, 2006, 7(11):935-943.
- [13] 国家癌症中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院消化肿瘤 MDT. 国家癌症中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院结直肠癌肝转移 MDT 治疗共识[J]. 肝癌电子杂志, 2016, 3(4):1-8.

收稿日期:2019-08-04 修回日期:2019-09-02 编辑:石嘉莹

(上接第 541 页)

## 参考文献

- [1] 国家卫生健康委办公厅,国家中医药局办公室. 关于印发儿童社区获得性肺炎诊疗规范的通知(2019 版). [EB/OL] (2019-02-11). <http://www.nhc.gov.cn/zyygj/s7653/201902/bfa758ad6add48a599bc74b588a6e89a.shtml>.
- [2] 张益,芑为,王佶,等. 利用二代测序技术在不明原因发热的血液样本中检测到人细小病毒[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2018, 32(2):145-149.
- [3] 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.
- [4] Gill SR, Pop M, DeBoy RT, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome[J]. Science, 2006, 312(5778):1355-1359.
- [5] Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine[J]. Cell, 2006, 124(4):837-848.
- [6] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products[J]. Chem Biol, 1998, 5(10):R245-249.
- [7] 徐智察,赵冬冬,周华,等. 宏基因组测序在感染性疾病病原学诊断中的应用[J]. 中华临床感染病杂志, 2019, 12(4):302-308.
- [8] 宏基因组分析和诊断技术在急危重症感染应用专家共识组. 宏基因组分析和诊断技术在急危重症感染应用的专家共识[J]. 中华急诊医学杂志, 2019, 28(2):151-153.
- [9] 张金李,冯翔. 高通量技术在重症肺炎患者呼吸道病原体快速检测中的应用[J]. 检验医学与临床, 2018, 15(16):2439-2440, 2444.
- [10] 刘佳,高丽丽,王贺丽,等. 以肺以肺间质改变为主的重症肺结核 1 例[J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 17(3):326-329.
- [11] 李林阳,廖江荣,李琦. 肺结核误诊为间质性肺疾病 1 例[J]. 解放军医学杂志, 2018, 43(6):537-539.
- [12] 李宝学,李靖,秦立新,等. 以肺间质改变为主肺结核 HRCT 特征分析[J]. 放射学实践, 2017, 32(4):406-409.
- [13] 梁晓玉,尹金植. 肺间质改变为表现的不典型肺结核研究进展[J]. 中国实验诊断学 2019, 23(2):349-351.

收稿日期:2019-11-12 修回日期:2020-02-10 编辑:石嘉莹