

# mNGS辅助诊断耶氏肺孢子菌肺炎在17例肺癌患者中的临床价值评估

陈璐瑶<sup>1</sup>, 曲斌斌<sup>2</sup>, 许亚慧<sup>2</sup>, 张春玲<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>青岛大学医学部, 山东 青岛

<sup>2</sup>青岛大学附属青岛市中心医院呼吸与危重症医学科, 山东 青岛

收稿日期: 2023年9月17日; 录用日期: 2023年10月11日; 发布日期: 2023年10月17日

## 摘要

目的: 本研究旨在比较肺泡灌洗联合宏基因组二代测序(mNGS)与传统的病原检测方法在诊断肺癌合并耶氏肺孢子菌肺炎(PJP)方面的价值。方法: 我们纳入了青岛大学附属青岛市中心医院2020年12月至2022年8月期间住院的17例肺癌患者的临床数据, 这些患者通过mNGS辅助并经临床复合诊断为PJP。我们分析了这些患者的临床特征, 并评估了mNGS在肺癌患者中诊断PJP的价值。结果: 与1-3- $\beta$ -D-葡聚糖测定和传统的病原菌涂片培养相比, mNGS对于耶氏肺孢子菌(Pj)的检出率明显更高。这表明mNGS可以作为辅助诊断肺癌患者PJP的工具。Pj序列数与CRP呈正相关( $r_s = 0.537, P = 0.026$ )。结论: 肺泡灌洗联合mNGS在诊断肺癌患者PJP方面具有一定优势。相比传统的检测方法, mNGS更快速、检出率更高, 并且在识别Pj共感染方面表现出明显的优越性。因此, mNGS在临床治疗上具有更大的指导作用, 并可为患者预后带来一定的收益。

## 关键词

宏基因组二代测序, 耶氏肺孢子菌肺炎, 肺癌, 免疫功能受损

## Evaluation of the Clinical Value of mNGS in the Auxiliary Diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in 17 Patients with Lung Cancer

Luyao Chen<sup>1</sup>, Binbin Qu<sup>2</sup>, Yahui Xu<sup>2</sup>, Chunling Zhang<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Medical College of Qingdao University, Qingdao Shandong

<sup>2</sup>Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Affiliated Qingdao Central Hospital of Qingdao

\*通讯作者。

文章引用: 陈璐瑶, 曲斌斌, 许亚慧, 张春玲. mNGS 辅助诊断耶氏肺孢子菌肺炎在 17 例肺癌患者中的临床价值评估 [J]. 临床医学进展, 2023, 13(10): 16135-16141. DOI: 10.12677/acm.2023.13102255

## Abstract

**Objective:** This study aims to compare the value of bronchoalveolar lavage combined with metagenomic next-generation sequencing (mNGS) and traditional pathogen detection methods in diagnosing lung cancer complicated with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PJP). **Methods:** We included clinical data from 17 hospitalized lung cancer patients at the Affiliated Qingdao Central Hospital of Qingdao University from December 2020 to August 2022. These patients were diagnosed with PJP through mNGS assistance and clinical composite diagnosis. We analyzed the clinical characteristics of these patients and evaluated the value of mNGS in diagnosing PJP in lung cancer patients. **Results:** Compared with 1-3- $\beta$ -d-glucan assay and traditional pathogenic microorganism smear culture, mNGS showed a significantly higher detection rate for *Pneumocystis jirovecii* (Pj). This indicates that mNGS can be used as an auxiliary tool for diagnosing PJP in lung cancer patients. The number of Pj sequences was positively correlated with CRP levels ( $r_s = 0.537$ ,  $P = 0.026$ ). **Conclusion:** Bronchoalveolar lavage combined with mNGS has certain advantages in diagnosing PJP in lung cancer patients. Compared to traditional detection methods, mNGS is faster, has a higher detection rate, and demonstrates significant superiority in identifying co-infections by Pj. Therefore, mNGS plays a greater guiding role in clinical treatment and can bring certain benefits to patient prognosis.

## Keywords

Metagenomic Next-Generation Sequencing (mNGS), *Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*) Pneumonia, Lung Cancer, Impaired Immune Function

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

耶氏肺孢子虫肺炎(PJP)常见于晚期人类免疫缺陷病毒(HIV)患者,但随着医疗技术的进步,免疫抑制的人群逐渐增加,非 HIV PJP 患者数量也呈现明显的上升趋势。与 HIV-PJP 相比,非 HIV PJP 更易导致肺泡损伤和呼吸衰竭,可迅速发展为重症肺炎,导致极高的死亡率[1] [2] [3]。肺癌是全球发病人数及死亡人数最高的肿瘤[4],尽管由于新型靶向疗法的应用和规范医疗的普及,存活率有所提高,1 年内生存率由 30 年前的 20%左右提高至目前的 30%以上[5]。但治疗引起的免疫功能低下所导致的肺炎同肺癌进展本身均影响患者的生存及预后[6]。基于非 HIVPJP 的非特异性、进展迅速且易合并混合感染特点,快速准确的病原体诊断和及时的治疗对于预后改善极为重要[7]。宏基因组二代测序(mNGS)作为一种无偏倚、高通量的病原检测方法,近些年越来越多地应用于临床肺部感染性疾病的诊断[8],尤其在混合性、罕见性肺部感染病原微生物的检测中独具优势[9]。本研究分析了青岛大学附属青岛市中心医院收治的 17 例通过 mNGS 辅助且经临床复合诊断为 PJP 的肺癌患者的临床症状、常规生化检测、微生物培养和 mNGS 结果,评估与传统病原检测方法相比,肺泡灌洗联合 mNGS 对于 PJP 在肺癌患者中的诊断价值。此外,我

们还旨在对肺癌合并 PJP 患者相关特点进行分析。

## 2. 资料与方法

### 2.1. 研究对象

2020 年 12 月至 2022 年 08 月, 在青岛大学附属青岛市中心医院住院治疗的 17 例患者符合以下入组标准: 1) 年龄 > 18 岁; 2) 排除 HIV 感染; 3) 在本院住院治疗; 4) 经病理确诊为肺癌; 5) 进行肺泡灌洗且灌洗液经 mNGS 检测检出耶氏肺孢子菌(Pj)序列并经临床复合诊断为 PJP。

### 2.2. 研究方法

#### 2.2.1. 临床数据收集

采用回顾性分析方法, 收集并分析入组患者的各项临床资料, 包括性别、年龄、基础疾病、症状、传统呼吸道标本病原体检测结果、宏基因组二代测序结果、实验室化验、影像学检查、治疗及预后等。

#### 2.2.2. BALF 采集及 mNGS 送检

所有患者均进行支气管镜检查, 在病变部位行支气管肺泡灌洗, 并按照标准流程留取灌洗液 5~10 mL, 然后将样本于 24 小时内专人送至第三方测序中心(因美纳-illumina)。将送检样本提取微生物群落 DNA 后, 通过质量控制(QC)鉴定, 将 DNA 随机片段化并制成测序文库, 然后在 NextSeqTM550Dx (因美纳-illumina)上进行测序。对于原始数据超过 10 万的样品, 进行生物信息学分析以去除低质量和低复杂性的区域。使用 Burrows-Wheeler 比对将人源基因组序列去除, 然后通过 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/>)的四个微生物基因组数据库(包括病毒、细菌、真菌和寄生虫)比对进行分类和排列。

### 2.3. 统计分析

所有连续变量均表示为中位数, 采用 Mann-Whitney U 检验比较两组间连续变量的差异, 采用卡方检验比较两组间离散变量的差异, 采用 Spearman 等级相关分析相关性。P 值 < 0.05 的连续变量具有统计学意义, 所有检验均为双尾。所有统计分析均使用 SPSS 26.0 软件进行。

## 3. 结果

### 3.1. 基本信息

入组患者共 17 例。患者中 13 例为男性(76.47%), 4 例为女性(23.53%)。中位年龄为 63 岁(47 岁至 76 岁), 且均在 3 个月内进行过放化疗或免疫治疗, 其中肺鳞癌 4 例, 肺腺癌 8 例, 肺小细胞癌 4 例, 肺大细胞癌 1 例。

### 3.2. 临床特征、检查结果及预后

进行性呼吸困难(58.82%)、咳嗽(70.59%)、咳痰(70.59%)、发热(58.82%)是肺癌合并 PJP 患者的常见症状, 其中发热均为中高热, 咳痰均为咳少量粘痰。患者均有不同程度的血氧饱和度降低。其中 15 例患者入院后通过 CD4+T 细胞计数行免疫功能评估, 其中 9 例 CD4+T 细胞计数 < 200/ $\mu$ L, 水平中位数为 161/ $\mu$ L (9~2702/ $\mu$ L)。CRP 水平中位数为 56.99 mg/L, (14.09~209.13 mg/L)、PCT 水平中位数为 0.225 ng/mL, (0.07~3.99 ng/mL)。PJP 在影像学上 13 例呈双肺弥漫分布斑片影或磨玻璃影; 其余呈间质性改变。所有患者在采样前均进行抗感染药物治疗, 但仅有 3 例(17.65%)患者在采样前经验性应用抗肺孢子菌药物治疗。

### 3.3. mNGS

患者自出现相关症状至行支气管镜肺泡灌洗送检的中位天数为 10 天(4~66 天)。在通过 mNGS 诊断为 PJP 的 17 例患者中, Pj DNA 基因组的序列数从 3 到 76540 不等, Pj 序列的水平中位数为 371, 丰度从 0.2 至 100 (见图 1)。个体间 Pj 序列存在较大差异, 且不同个体的序列数与 G 试验数值、CD4+T 细胞计数、CD8+T 细胞计数、血氧饱和度、症状出现支气管镜灌洗送检天数、PCT 均无明显相关性( $P > 0.05$ ), 与 CRP 呈正相关( $P < 0.05$ ) (见表 1)。PJP 常见于免疫低下患者, 常并发混合感染, 混合感染情况如下(见图 2), 排除定植病原体后, ngs 检出其他微生物情况如下(见图 3), Pj 最常合并感染的 3 种病原体为 EB 病毒、巨细胞病毒、细环病毒。

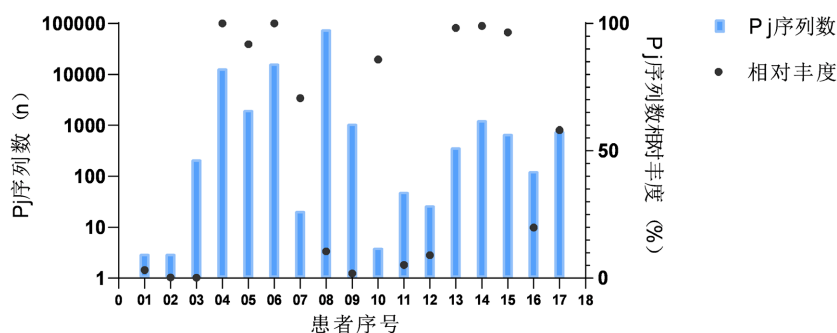


Figure 1. Pj sequence number and relative abundance in 17 patients

图 1. 17 例患者 Pj 序列数及相对丰度

Table 1. Correlation analysis between *Pneumocystis* sequences and laboratory tests

表 1. 肺孢子菌序列与实验室检查相关性分析

项目	rs	P
1-3-β-D-测定(pg/mL)	0.359	0.157
CD4+T 淋巴细胞计数(个/μL)	0.440	0.101
CD8+T 淋巴细胞计数(个/μL)	0.232	0.405
血氧饱和度(%)	0.252	0.328
自出现症状至标本送检时间(天)	0.356	0.161
CRP (mg/L)	0.537	0.026*
PCT (ng/mL)	0.111	0.683

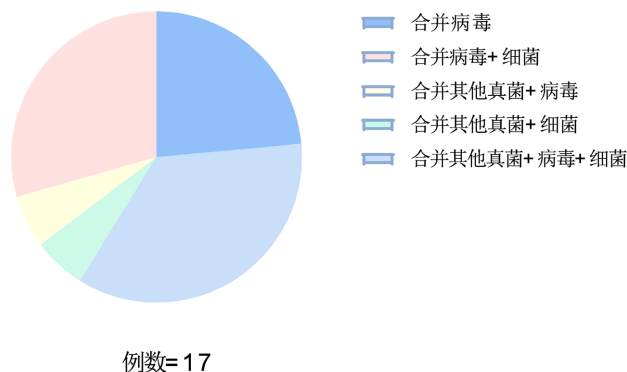
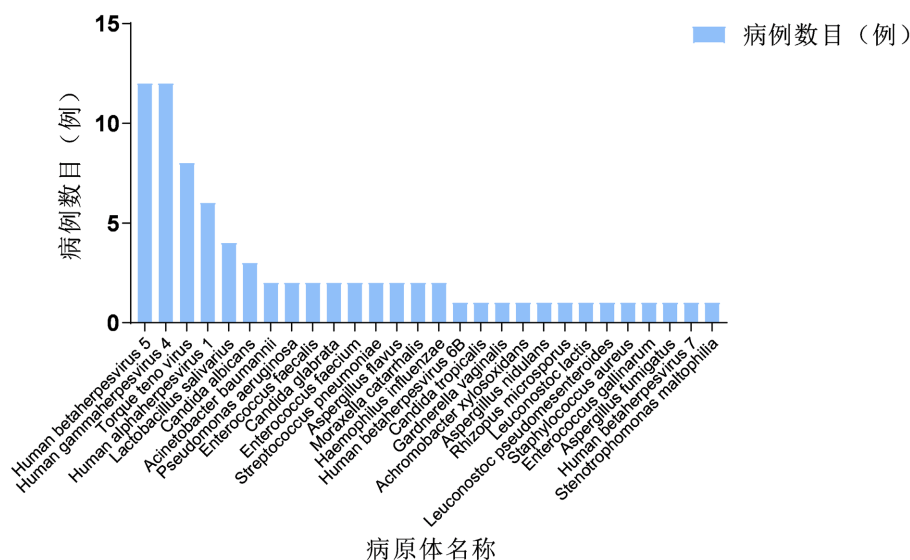


Figure 2. Mixed infection of 17 patients with lung cancer and PJP

图 2. 17 例肺癌合并耶氏肺孢子菌肺炎患者混合感染情况



**Figure 3.** Co-infectious pathogens identified by mNGS  
**图 3.** 通过 mNGS 识别出的共感染病原体情况

### 3.4. 血清 1-3- $\beta$ -D-葡聚糖、传统病原涂片及培养、mNGS 对 PJP 诊断价值比较

我们比较了血清 1-3- $\beta$ -D-葡聚糖、病原体涂片及培养、mNGS 在 17 例 PJP 患者中的诊断价值，其中 1-3- $\beta$ -D-葡聚糖检测阳性为 9 例(52.94%)。病原体涂片及培养仅有 1 例在痰液培养中检出酵母样真菌，1 例在肺泡灌洗液涂片及培养中检出酵母样真菌，但均受限于实验室条件未行进一步区分，因此对临床指导作用较小。然而，我们通过 mNGS 在 17 例(100%)中患者均检测到 Pj。因此研究表明，mNGS 对耶氏肺孢子菌感染的检出率较高，这也证实了临床 mNGS 性能有助于感染诊断，可有效指导临床用药。

## 4. 讨论

PJP 在过去常见于 HIV 患者，但由于免疫损害原因的流行，非 HIV 感染患者中的 PJP 发病率逐年增加[10]。相对于非 HIV 患者，患有 PJP 的患者通常年龄更大，病情进展更快，治疗开始更晚，且需要更多的重症监护和有创呼吸支持，因此死亡率更高[2]，所以早期诊断和治疗就变得非常重要。

肺癌是全球发病率和死亡率最高的恶性肿瘤[4]，尽管由于新型靶向疗法的应用和规范医疗的普及，存活率有所提高，1 年内生存率由 30 年前的 20% 左右提高至目前的 30% 以上[5]。然而，肺癌治疗引起的免疫功能低下和肺炎本身对患者的生存和预后都有影响[6]。

然而，PJP 的临床表现并不具有特异性，特别是在合并肺癌时症状更加隐匿，确诊需要依赖于传统检测方法，如培养、乌洛托品银染色、免疫荧光染色，以及 1-3- $\beta$ -D-葡聚糖检测可以提示耶氏肺孢子菌的存在[11]。传统的 PJP 诊断方法主要依赖于样本中生物体形态的染色和可视化，已经被证明不够敏感且存在偏见[12]。而血清-1-3- $\beta$ -D-葡聚糖的测定虽然具有一定的敏感性，但其特异性不够[13]。由于传统方法诊断的不确定性和低效率，临床治疗经常会被延误，对患者的预后产生不良影响。因此，对于合并肺癌的 PJP 患者，一种准确率高、检测时间短、不带主观性的检测方法非常重要[14]。mNGS 具备了上述优点，同时还具有高通量的特点，对于感染性疾病的准确诊断起着非常重要的作用[15]。此外，本研究发现与 CRP 呈正相关( $r_s = 0.537, P = 0.026$ )，可能意味着患者体内病原体载量越大，其致病力越强，肺部的炎症性损伤也更严重。

而与免疫功能正常的患者相比，肺癌放化疗后免疫功能低下的患者更容易发生混合感染，并且感染



的病原体数量更多[16]。传统的病原学检测方法通常只能检测到单一的病原体，而 mNGS 由于其无偏倚的高通量技术，可以同时检测多种病原体，因此在合并感染的诊断中更具有优势[17] [18]。本研究发现，与 CMTs 相比，mNGS 在识别混合感染和检测 PJP 合并感染的其他病原体方面具有更高的检出率和更广泛的病原体检测谱，这与之前的研究结果相似[14]。这些结果都表明，相比于 CMTs，mNGS 在检测混合肺部感染和 PJP 的共病原体方面具有更大的优势。

非 HIV PJP 患者的院内死亡率明显高于 HIV 患者，通常超过 30%，包括肺癌在内的实体器官肿瘤患者合并 PJP 的死亡率甚至可以达到 40%以上[2] [3] [19]。在我们的研究中，通过肺泡灌洗联合宏基因组二代测序技术进行早期诊断，肺癌合并 PJP 患者的院内死亡率为 11.76%，这表明该辅助诊断方法确实对患者的治疗和预后有一定的好处。

我们的研究也有一些局限性。首先，作为一项单中心回顾性研究，由于入组患者较少，可能存在一定的偏倚，需要进一步开展多中心研究。其次，对于 PJP 的诊断，缺乏六胺银染色和 PCR 评估 CMTs 和 mNGS 的诊断价值，因此只能在讨论中通过已有文献补充相关信息。最后，由于研究中病例数量的限制，无法进一步探索针对于肺癌患者 PJP 诊断的 mNGS 序列阈值，需要进行进一步的研究。

总之，肺泡灌洗联合 mNGS 对于肺癌患者合并 PJP 的诊断具有一定的优势，它比传统检测方法更快，检出率更高，同时在识别 PJP 的共病原体方面表现出明显的优势，因此在临床治疗中具有更大的指导作用，并对患者的预后带来一定的好处。

## 声明

本试验获得伦理委员会批准(受理号为 KY202206601)及受试者知情同意。

## 参考文献

- [1] Varas Vicente, P., Parra Fariñas, R., Alonso-Sardón, M., Benítez Andrés, E., Rodríguez Alonso, B., Romero-Alegría, Á., *et al.* (2023) Impact of Pneumocystosis on the Spanish Health Care System, 1997-2020: Profile of HIV and non-HIV Immunocompromised Patients. *Journal of Infection and Public Health*, **16**, 831-840. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.03.022>
- [2] Rego de Figueiredo, I., Vieira Alves, R., Drummond Borges, D., Torres, M., Lourenço, F., Antunes, A.M., *et al.* (2019) Pneumocystosis Pneumonia: A Comparison Study between HIV and Non-HIV Immunocompromised Patients. *Pulmonology*, **25**, 271-274. <https://doi.org/10.1016/j.pulmoe.2019.04.003>
- [3] Kolbrink, B., Scheikholeslami-Sabzewari, J., Borzikowsky, C., von Samson-Himmelstjerna, F.A., Ullmann, A.J., Kunzendorf, U., *et al.* (2022) Evolving Epidemiology of *Pneumocystis* Pneumonia: Findings from a Longitudinal Population-Based Study and a Retrospective Multi-Center Study in Germany. *The Lancet Regional Health—Europe*, **18**, 100400. <https://doi.org/10.1016/j.lanepe.2022.100400>
- [4] Oliver, A.L. (2022) Lung Cancer: Epidemiology and Screening. *Surgical Clinics of North America*, **102**, 335-344. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2021.12.001>
- [5] Jones, G.S. and Baldwin, D.R. (2018) Recent Advances in the Management of Lung Cancer. *Journal of Clinical Medicine* (Lond), **18**, s41-s46. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.18-2-s41>
- [6] Abdel-Rahman, O. (2021) Influenza and Pneumonia-Attributed Deaths Among Cancer Patients in the United States; a Population-Based Study. *Expert Review of Respiratory Medicine*, **15**, 393-401. <https://doi.org/10.1080/17476348.2021.1842203>
- [7] Zhang, F., Chen, J., Huang, H., Deng, X., Zhang, W., Zeng, M., *et al.* (2021) Application of Metagenomic Next-Generation Sequencing in the Diagnosis and Treatment Guidance of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in Renal Transplant Recipients. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **40**, 1933-1942. <https://doi.org/10.1007/s10096-021-04254-x>
- [8] Zheng, Y., Qiu, X., Wang, T. and Zhang, J. (2021) The Diagnostic Value of Metagenomic Next-Generation Sequencing in Lower Respiratory Tract Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **11**, 694756. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.694756>
- [9] Wang, J., Han, Y. and Feng, J. (2019) Metagenomic Next-Generation Sequencing for Mixed Pulmonary Infection Di-

- agnosis. *BMC Pulmonary Medicine*, **19**, Article No. 252. <https://doi.org/10.1186/s12890-019-1022-4>
- [10] Gaborit, B.J., Tessoulin, B., Lavergne, R.A., Morio, F., Sagan, C., Canet, E., *et al.* (2019) Outcome and Prognostic Factors of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in Immunocompromised Adults: A Prospective Observational Study. *Annals of Intensive Care*, **9**, Article No. 131. <https://doi.org/10.1186/s13613-019-0604-x>
- [11] Li, X., Li, Z., Ye, J. and Ye, W. (2023) Diagnostic Performance of Metagenomic Next-Generation Sequencing for *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. *BMC Infectious Diseases*, **23**, Article No. 455. <https://doi.org/10.1186/s12879-023-08440-4>
- [12] Bateman, M., Oladele, R. and Kolls, J.K. (2020) Diagnosing *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia: A Review of Current Methods and Novel Approaches. *Medical Mycology*, **58**, 1015-1028. <https://doi.org/10.1093/mmy/myaa024>
- [13] Del Corpo, O., Butler-Laporte, G., Sheppard, D.C., Cheng, M.P., McDonald, E.G. and Lee, T.C. (2020) Diagnostic Accuracy of Serum (1-3)- $\beta$ -D-Glucan for *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical Microbiology and Infection*, **26**, 1137-1143. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.05.024>
- [14] Jiang, J., Bai, L., Yang, W., Peng, W., An, J., Wu, Y., *et al.* (2021) Metagenomic Next-Generation Sequencing for the Diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in Non-HIV-Infected Patients: A Retrospective Study. *Infectious Diseases and Therapy*, **10**, 1733-1745. <https://doi.org/10.1007/s40121-021-00482-y>
- [15] Gu, W., Deng, X., Lee, M., Sucu, Y.D., Arevalo, S., Stryke, D., *et al.* (2021) Rapid Pathogen Detection by Metagenomic Next-Generation Sequencing of Infected Body Fluids. *Nature Medicine*, **27**, 115-124. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1105-z>
- [16] Sun, T., Wu, X., Cai, Y., Zhai, T., Huang, L., Zhang, Y., *et al.* (2021) Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogenic Diagnosis and Antibiotic Management of Severe Community-Acquired Pneumonia in Immunocompromised Adults. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **11**, 661589. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.661589>
- [17] Xie, G., Zhao, B., Wang, X., Bao, L., Xu, Y., Ren, X., *et al.* (2021) Exploring the Clinical Utility of Metagenomic Next-Generation Sequencing in the Diagnosis of Pulmonary Infection. *Infectious Diseases and Therapy*, **10**, 1419-1435. <https://doi.org/10.1007/s40121-021-00476-w>
- [18] Qian, Y.Y., Wang, H.Y., Zhou, Y., Zhang, H.C., Zhu, Y.M., Zhou, X., *et al.* (2020) Improving Pulmonary Infection Diagnosis with Metagenomic Next Generation Sequencing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **10**, 567615. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.567615>
- [19] Schmidt, J.J., Lueck, C., Ziesing, S., Stoll, M., Haller, H., Gottlieb, J., *et al.* (2018) Clinical Course, Treatment and Outcome of *Pneumocystis* Pneumonia in Immunocompromised Adults: A Retrospective Analysis over 17 Years. *Critical Care*, **22**, Article No. 307. <https://doi.org/10.1186/s13054-018-2221-8>