

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671-9638. 20222213

· 病例报告 ·

高通量测序在 2 例肾病综合征并发感染患者病原诊断中的应用

陈树娟¹, 李虎才², 王立新²

(1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广东 广州 510000; 2. 广州中医药大学第二附属医院肾内科, 广东 广州 510120)

[摘要] 感染是肾病综合征患者常见的并发症之一,也是导致患者死亡的重要原因。对感染病原菌进行早期、准确的诊断,可利于针对性治疗,改善患者预后。目前病原菌检测主要手段为培养法,由于受到患者免疫功能低下及取样、检测方式等影响,病原菌检测阳性率偏低。高通量测序技术以快速、灵敏、覆盖度广的优点有效补充了传统培养法的不足。本文通过报告利用高通量测序技术明确诊断肾病综合征并发隐球菌感染及嗜麦芽窄食单胞菌脑膜炎各 1 例,提示高通量测序技术对于诊断传统病原菌培养阴性的肾病综合征并发感染具有显著的优势和极大的应用价值。

[关键词] 高通量测序; 肾病综合征; 感染; 隐球菌; 嗜麦芽窄食单胞菌脑膜炎

[中图分类号] R515 R519

Application of high-throughput sequencing in pathogenic diagnosis of 2 cases of nephrotic syndrome complicated infection

CHEN Shu-juan¹, LI Hu-cai², WANG Li-xin² (1. The Second Clinical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China; 2. Department of Nephrology, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] Infection is one of the common complications in patients with nephrotic syndrome, and it is also an important cause of death. Early and accurate diagnosis of infectious pathogens is helpful for targeted treatment and improving the prognosis of patients. Nowadays, the main method of pathogen detection is culture method, the positive rate of pathogen detection is low because of immunosuppression of patients and the influence of different sampling and detection methods. High-throughput sequencing technique effectively complements the shortcomings of traditional culture methods with its advantages of rapidness, sensitivity and wide coverage. This paper reports one case of nephrotic syndrome complicated with cryptococcal infection and one case complicated with *Stenotrophomonas maltophilia* meningitis confirmed by high-throughput sequencing, suggesting that high-throughput sequencing technique has significant advantages and great application value in the diagnosis of nephrotic syndrome complicated with infection which is negative through traditional pathogen culture.

[Key words] high-throughput sequencing; nephrotic syndrome; infection; *Cryptococcus*; *Stenotrophomonas maltophilia* meningitis

肾病综合征(nephrotic syndrome, NS)患者由于免疫功能受损及使用糖皮质激素、免疫抑制剂等导致其免疫功能低下,常出现严重的细菌、真菌、病毒等

混合性感染。感染起病隐匿,临床症状不典型,病情进展迅速,是导致 NS 患者全因死亡的主要原因^[1]。由于检测技术的限制、抗菌药物的使用及免疫功能

[收稿日期] 2021-12-08

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(82104779)

[作者简介] 陈树娟(1995-),女(汉族),广东省揭阳市人,硕士研究生,主要从事中西医结合治疗慢性肾脏病研究。

[通信作者] 王立新 E-mail: wanglixin1210@163.com

低下等,传统检测技术对致病菌总体检出率偏低,且检测耗时长,给临床诊断及治疗带来困难。分子诊断和基因诊断是目前感染性疾病病原学诊断中的一个重要方向和研究热点,高通量测序即下一代测序技术(next-generation sequencing, NGS),利用现有微生物群基因信息群,采用生物信息学方法,与测序结果比对,进而鉴别微生物种类,具有检测耗时短、覆盖面广等优点。近年来 NGS 广泛应用于血流感染、肺部感染、中枢神经系统感染等多种感染性疾病,因其可快速检测和全面识别病原菌,且病原菌阳性检出率远高于传统检测,具有显著的优势及应用价值^[2-4]。目前关于 NGS 在 NS 并发感染中的研究报道较少。本文通过分析某院利用 NGS 明确诊断 NS 并发隐球菌感染及嗜麦芽窄食单胞菌脑膜炎各 1 例,探讨 NGS 在 NS 并发感染中的应用。

1 病历资料

1.1 病例 1 患者女性,58 岁,2021 年 10 月 25 日因“发现双下肢浮肿 6 个月余,发热咳嗽 10 d”收入我科,既往有高血压病史。6 个月余前,患者因 NS 行肾穿活检诊断为Ⅲ期膜性肾病,予足量糖皮质激素及环磷酰胺治疗。10 天前患者出现咳嗽、咯痰伴发热,体温最高达 39.5℃,于外院行实验室检查:血白细胞计数 $12.49 \times 10^9/L$,中性粒细胞百分比 88.5%,C 反应蛋白(CRP)205.56 mg/L,降钙素原(PCT)0.129 ng/mL,血沉 104 mm/h;尿白细胞计数 158 个/ μL ;痰培养检出白念珠菌。胸部 CT 提示左肺下叶见斑片状高密度影,考虑左肺下叶炎症。先后予头孢呋辛、哌拉西林钠/他唑巴坦钠抗感染,病情无好转,为进一步治疗,入我科。

入院时患者精神疲倦,咳嗽,干咳少痰,发热,双颞部及颈部轻度疼痛。查体:体温 38.6℃,听诊双肺呼吸音粗,双下肺可闻及散在湿啰音,颈软,无抵抗,凯尔尼格征及布鲁津斯基征阴性,生理反射存在,病理反射未引出。实验室检查:血白细胞计数 $6.35 \times 10^9/L$,中性粒细胞百分比 74.5%,淋巴细胞百分比 15.5%,CRP 45.38 mg/L,PCT 0.06 ng/mL,血沉 72 mm/h,血肌酐 38 $\mu mol/L$;尿白细胞计数 70.6 个/ μL ;淋巴细胞亚群:CD4⁺ T 淋巴细胞(CD3⁺ CD4⁺)31.39%,CD4⁺ T 淋巴细胞亚群/CD8⁺ T 淋巴细胞亚群 0.97。胸部 CT 平扫提示双下肺感染,诊断为 NS 并发感染。患者长期使用糖皮质激素及免疫抑制治疗,外院抗感染无效,考虑存

在细菌、真菌、病毒等混合感染可能,经验性予舒普深(3 g,q12h)+氟康唑(0.2 g,qd)+更昔洛韦(0.3 g,q12h)静脉滴注抗感染治疗。留取浅部痰、尿、血标本行细菌、真菌病原学培养以及肺炎支原体、抗巨细胞病毒(CMV)-IgM、CMV、呼吸道病毒、曲霉菌 GM 抗原等检测均为阴性。遂完善支气管镜检查,留取深部痰及肺泡灌洗液行病原菌培养,肺泡灌洗液行 NGS 检测,深部痰及肺泡灌洗液培养均为阴性,NGS 结果提示隐球菌感染。患者脑膜刺激征阴性,但存在双颞部及颈部疼痛,考虑隐球菌与中枢神经系统有高度亲和性,行腰椎穿刺检测回报脑脊液常规:白细胞计数 $106 \times 10^6/L$,中性粒细胞 13%,淋巴细胞 87%;脑脊液生化:葡萄糖 1.87 mmol/L,蛋白 550 mg/L;血清、脑脊液隐球菌荚膜多糖抗原阳性;脑脊液墨汁染色、细菌培养均阴性。患者 NS 并发隐球菌性肺炎及脑膜炎可诊断。调整抗感染方案,氟康唑加量(0.4 g,qd)+舒普深(3 g,q8h)静脉滴注,患者发热趋势较前下降,病情平稳后出院,门诊规律复诊。

1.2 病例 2 患者女性,73 岁,2021 年 10 月 15 日因“反复腹痛半月余”入我院外科,既往有高血压、糖尿病病史。患者半月余前无明显诱因出现上腹部及脐周隐痛,无腹胀、腹泻、恶心、呕吐、发热及恶寒等,入院查体:肺部听诊呼吸音粗,双肺未闻及啰音,腹部无压痛及反跳痛,余查体阴性。实验室检查:血白细胞 $32.37 \times 10^9/L$,中性粒细胞百分比 87.9%,CRP 89.6 mg/L,血清蛋白 20.2 g/L,PCT 0.69 ng/mL,血肌酐 118 $\mu mol/L$;24 h 尿蛋白 5.874 g,尿白细胞 280.5 个/ μL 。入院后患者出现发热,体温最高达 38℃,我科会诊后诊断为 NS 并发感染,转入我科进一步治疗。10 月 26 日转入后查胸部 CT 平扫提示双肺感染,双侧胸腔积液。NS 并发感染可诊断,取浅部痰、尿、血行病原学培养以及肺炎支原体、抗 CMV-IgM、CMV、呼吸道病毒、曲霉菌 GM 抗原等检测均为阴性,予舒普深经验性抗感染。31 日患者突然出现高热、寒战,体温最高达 39.9℃,呼吸急促,肢体颤动,意识障碍。查体:脑膜刺激征阳性,余病理征未引出。血气分析提示 I 型呼衰,提示患者感染加重,抗感染方案调整为亚胺培南(1 g,qd)+利奈唑胺(600 mg,q12h)静脉滴注。完善支气管镜及腰椎穿刺,留取肺泡灌洗液及脑脊液行 NGS 检测。11 月 2 日脑脊液 NGS 检测提示嗜麦芽窄食单胞菌。脑脊液常规:白细胞计数 $22 \times 10^6/L$,中性粒细胞 67%,潘氏蛋白 2+;脑脊液生化:氯离子 142.9 mmol/L,蛋

白 1 212 mg/L, 墨汁染色阴性。复查胸部 CT 提示: 双肺感染较前吸收, 双侧胸腔积液较前减少。影像学提示肺部感染较前好转, 细菌性脑膜炎可诊断, 考虑嗜麦芽窄食单胞菌对亚胺培南、美罗培南等碳青霉烯类抗生素天然耐药, 停用亚胺培南及利奈唑胺, 单用舒普深 (1.5 g, q12h, 静脉滴注) 抗感染治疗, 后患者体温渐恢复正常, 肢体颤动消失, 查体脑膜刺激征阴性, 复查脑脊液白细胞正常, 维持足疗程抗菌药物治疗后, 患者病情稳定出院, 门诊随访。

2 讨论

隐球菌是最常见的机会性侵袭性真菌之一, 由于自身免疫疾病、肾功能不全等易感人群增多以及糖皮质激素、免疫抑制剂等使用, 隐球菌感染率呈上升趋势^[5]。尤其免疫抑制患者对隐球菌感染的免疫反应更差, 临床症状更隐蔽, 传统检测阳性率偏低^[6]。本文中病例 1 患者感染症状及影像学表现无特异性, 取痰、血等标本行传统病原学检测均为阴性, 行肺泡灌洗液 NGS 检测明确诊断为肺部隐球菌感染。患者神经系统方面仅存在双颞部、颈部疼痛症状, 考虑隐球菌与中枢神经系统有高度亲和性, 行脑脊液检测进一步诊断为隐球菌性脑膜炎。隐球菌性脑膜炎是一种极为凶险的中枢神经系统感染性疾病, 即使积极治疗, 病死率仍高达 60%^[7]。隐球菌抗原检测的灵敏度和特异度都较高, 但是由于临床表现多样性及典型症状出现延迟性, 从而导致隐球菌感染易漏诊。有研究^[8]表明隐球菌感染漏诊率可达 27%, 且漏诊患者 90 天病死率显著升高。因此, 临床工作中应加强重视免疫抑制患者隐球菌感染风险及多种病原学检测诊断技术的应用价值。

嗜麦芽窄食单胞菌是一种机会性病原体, 以侵犯肺部最为常见, 导致中枢神经系统感染相对少见^[9]。目前对嗜麦芽窄食单胞菌脑膜炎的了解来源于世界各地散在病例报道, 这些患者在感染之前往往有神经外科手术相关的病史^[10], 目前尚无 NS 患者颅内感染嗜麦芽窄食单胞菌的报道。本文中病例 2 患者出现意识障碍等神经系统表现, 脑脊液传统病原学检测阴性, 感染致病菌不明, 虽然积极给予经验性抗感染治疗, 患者病情仍持续进展, 甚至危及生命。后行脑脊液 NGS 检测明确诊断为嗜麦芽窄食单胞菌感染, 经调整抗感染治疗方案后患者病情得到控制, 并逐渐好转。

NGS 是一种新兴的病原体检测方法, 通过对标

本中的所有微生物进行测序, 能够同时识别细菌、真菌、病毒等多种致病病原体, 避免传统病原检测效率低、时间长的缺点, 对于混合性感染、疑难重症感染的检测具有重要作用^[11]。Duan 等^[12]比较 NGS 和传统培养的诊断价值, 发现 NGS 的灵敏度高于传统检测方法 (67.4% VS 23.6%), 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。中枢神经系统感染性疾病是神经系统重症疾病, 具有高病死率和致残率等特点。因病原微生物检测手段有限, 极易延误诊断及治疗^[13]。NGS 不需要假设潜在感染病原体类型, 克服了 PCR、培养、免疫标志物等靶向诊断方法的局限性, 在检测新发、少见和诊断困难的病原体上呈现了巨大优势^[14]。

NGS 越来越多地应用于临床实践, 但目前 NGS 检测的成本仍显著高于传统实验室检测方法, 因此, 对于 NS 并发轻症感染性疾病或传统微生物检测能够明确病原体的感染, 尚不能作为一线检测手段^[15]。二代测序的优势在于其能检测到其他传统手段无法检测到的病原体, 对于传统病原学检测不能明确病原体、规范性经验抗感染无效的患者, 推荐在完善常规病原学检测同时开展 NGS。严重感染常存在病原体不明的情况, 若感染危及生命, 表现为脓毒性休克、血流感染、脑膜炎、严重肺炎等, 除了传统检测方法, 建议开展 NGS 尽快明确病原体^[16-17]。研究^[18]表明经验性抗感染不能完全覆盖病原体, 使用 NGS 之后超过一半的患者需要进行抗菌药物调整或降级。因此, 若传统病原学检测的结果不能完全解释临床表现的全貌或抗感染治疗的反应, 怀疑同时存在其他病原体感染, 在完善更多检测技术的同时, 专家共识推荐进一步完善 NGS 检测^[16]。

虽然检测准确性及时效性较传统病原微生物检测技术存在很大优势, 但 NGS 技术作为新型的病原微生物检测技术, 也面临许多挑战, 包括价格昂贵, 提供检验的机构多元而检测质量良莠不齐, 无法对于检出的致病性病原微生物予以药敏结果指导等^[19]。但是, 随着测序成本的降低及技术的改进, 相信 NGS 在感染性疾病的应用会有更光明的前景。

在 NS 的诊治过程中处理感染相关问题, 是临床医生面临的一个挑战。本文报告 NGS 技术在 2 例 NS 并发感染患者中的成功应用, 提示临床医生应关注新型病原检测技术在免疫低下人群中的应用, 特别是对传统培养阴性的患者标本进行 NGS 检测, 有助于早期诊断及治疗, 对原发病的治疗及长期预后的改善, 具有重要意义。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

[参 考 文 献]

- [1] Yamamoto R, Imai E, Maruyama S, et al. Incidence of remission and relapse of proteinuria, end-stage kidney disease, mortality, and major outcomes in primary nephrotic syndrome; the Japan Nephrotic Syndrome Cohort Study (JNSCS) [J]. *Clin Exp Nephrol*, 2020, 24(6): 526 - 540.
- [2] Xie GJ, Zhao B, Wang X, et al. Exploring the clinical utility of metagenomic next-generation sequencing in the diagnosis of pulmonary infection [J]. *Infect Dis Ther*, 2021, 10(3): 1419 - 1435.
- [3] Piantadosi A, Mukerji SS, Ye S, et al. Enhanced virus detection and metagenomic sequencing in patients with meningitis and encephalitis [J]. *mBio*, 2021, 12(4): e0114321.
- [4] Xing XW, Zhang JT, Ma YB, et al. Metagenomic next-generation sequencing for diagnosis of infectious encephalitis and meningitis: a large, prospective case series of 213 patients [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 88.
- [5] Chen RC, Zhang YY, Zhou PC, et al. Cryptococemia according to immune status: an analysis of 65 critical cases [J]. *Infect Dis Ther*, 2021, 10(1): 363 - 371.
- [6] 汪群智, 郭安, 盛美玲. 免疫抑制和非免疫抑制患者肺隐球菌病临床特征分析 [J]. *中国全科医学*, 2017, 20(15): 1839 - 1844.
Wang QZ, Guo A, Sheng ML. Clinical features of pulmonary cryptococcosis in immunocompromised and immunocompetent patients [J]. *Chinese General Practice*, 2017, 20(15): 1839 - 1844.
- [7] Dangarembizi R. Reimagining the future of African brain health: Perspectives for basic research on the pathogenesis of cryptococcal meningitis [J]. *Brain Behav Immun Health*, 2021, 18: 100388.
- [8] Salazar AS, Keller MR, Olsen MA, et al. Potential missed opportunities for diagnosis of cryptococcosis and the association with mortality: a cohort study [J]. *EclinicalMedicine*, 2020, 27: 100563.
- [9] Brooke JS. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2012, 25(1): 2 - 41.
- [10] Khanum I, Ilyas A, Ali F. *Stenotrophomonas maltophilia* meningitis - a case series and review of the literature [J]. *Cureus*, 2020, 12(10): e11221.
- [11] Zhong YM, Xu F, Wu JH, et al. Application of next generation sequencing in laboratory medicine [J]. *Ann Lab Med*, 2021, 41(1): 25 - 43.
- [12] Duan HX, Li X, Mei AH, et al. The diagnostic value of metagenomic next-generation sequencing in infectious diseases [J]. *BMC Infect Dis*, 2021, 21(1): 62.
- [13] Saba Villaruel PM, Castro Soto MDR, Melendres Flores O, et al. A clinical, aetiological, and public health perspective on central nervous system infections in Bolivia, 2017 - 2018 [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 23235.
- [14] Gu W, Miller S, Chiu CY. Clinical metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection [J]. *Annu Rev Pathol*, 2019, 14: 319 - 338.
- [15] 《中华传染病杂志》编辑委员会. 中国宏基因组学第二代测序技术检测感染病原体的临床应用专家共识 [J]. *中华传染病杂志*, 2020, 38(11): 681 - 689.
Editorial board of Chinese Journal of Infectious Diseases. Clinical practice expert consensus for the application of metagenomic next generation sequencing [J]. *Chinese Journal of Infectious Diseases*, 2020, 38(11): 681 - 689.
- [16] 中华医学会检验医学分会临床微生物学组, 中华医学会微生物学与免疫学分会临床微生物学组, 中国医疗保健国际交流促进会临床微生物与感染分会. 宏基因组高通量测序技术应用于感染性疾病病原检测中国专家共识 [J]. *中华检验医学杂志*, 2021, 44(2): 107 - 120.
Clinical Microbiology Group, Branch of Laboratory Medicine, Chinese Medical Association, Clinical Microbiology Group, Microbiology and Immunology Branch, Chinese Medical Association, Clinical Microbiology and Infection Branch of China Association for the Promotion of International Exchanges in Health Care. Chinese expert consensus on metagenomics next-generation sequencing application on pathogen detection of infectious diseases [J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2021, 44(2): 107 - 120.
- [17] 陈乐波, 董建华, 许书添, 等. 肾病综合征合并重症感染的临床特征与危险因素 [J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2018, 27(1): 18 - 23.
Chen LB, Dong JH, Xu ST, et al. Clinical characteristics and risk factors of severe infections in hospitalized adult patients with primary nephrotic syndrome [J]. *Chinese Journal of Nephrology, Dialysis & Transplantation*, 2018, 27(1): 18 - 23.
- [18] Sun T, Wu XJ, Cai Y, et al. Metagenomic next-generation sequencing for pathogenic diagnosis and antibiotic management of severe community-acquired pneumonia in immunocompromised adults [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 661589.
- [19] Zheng Y, Qiu XJ, Wang T, et al. The diagnostic value of metagenomic next-generation sequencing in lower respiratory tract infection [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 694756.

(本文编辑:陈玉华)

本文引用格式:陈树娟, 李虎才, 王立新. 高通量测序在 2 例肾病综合征合并感染患者病原诊断中的应用 [J]. *中国感染控制杂志*, 2022, 21(4): 395 - 398. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20222213.

Cite this article as: CHEN Shu-juan, LI Hu-cai, WANG Li-xin. Application of high-throughput sequencing in pathogenic diagnosis of 2 cases of nephrotic syndrome complicated infection [J]. *Chin J Infect Control*, 2022, 21(4): 395 - 398. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20222213.