

·临床研究·

肺毛霉菌病的临床特征及诊断方法

陈海红¹, 谭卫平¹, 杨会敏¹, 郭鹏豪², 叶子茵³, 刘杨丽¹, 郭禹标¹

(1. 中山大学附属第一医院呼吸与危重症医学科, 广东 广州 510080; 2. 中山大学附属第一医院医学检验科, 广东 广州 510080; 3. 中山大学附属第一医院病理科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】总结我国南方城市肺毛霉菌病(PM)的临床特征及预后,同时探讨宏基因组二代测序(mNGS)在PM诊断中的价值。【方法】回顾性分析中山大学附属第一医院2019年1月1日至2022年1月31日期间诊断为PM且曾行mNGS检测的病例,共纳入14例,确诊4例,临床诊断10例,收集其临床表现、诊治及预后资料。【结果】所有患者均有基础疾病,血液系统恶性肿瘤和糖尿病最常见。最常见的症状是发热(10例)、咳嗽(9例)和气促(9例)。胸部CT形态以实变影最多见,其次为肿块影,多伴空洞。实验室检查方面,CD4+T淋巴细胞下降、CD8+T淋巴细胞升高以及CD4+/CD8+比下降提示预后不良。CT影像学合并胸腔积液的患者预后更差。mNGS诊断的阳性率为78.5%,明显高于组织病理(50%)及肺泡灌洗液深部真菌快速荧光染色直接镜检(61.5%)、真菌培养(23.1%)。【结论】肺毛霉菌病好发于有基础疾病或免疫功能低下患者,临床表现缺乏特异性,较低的CD4/CD8比率及CT影像学合并胸腔积液的患者预后更差,mNGS诊断PM快速便捷、敏感性高,在诊断PM中具有优势。

关键词:肺毛霉菌病;临床特征;预后;诊断;宏基因组二代测序

中图分类号:R519.8

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2023)01-0175-06

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).20221201.001

Clinical Characteristics and Diagnostic Methods of Pulmonary Mucormycosis

CHEN Hai-hong¹, TAN Wei-ping¹, YANG Hui-min¹, GUO Peng-hao²,

YE Zi-yin³, LIU Yang-li¹, GUO Yu-biao¹

(1. Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3. Department of Pathology, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: GUO Yu-biao, E-mail: guoyb@mail.sysu.edu.cn; LIU Yang-li, E-mail: liuyli3@mail.sysu.edu.cn

Abstract:【Objective】To summarize the clinical features and prognosis of pulmonary mucormycosis (PM) in southern China, and to explore the diagnostic value of metagenomic next generation sequencing (mNGS) in PM.【Methods】The clinical manifestations, diagnosis, treatment and prognosis of patients diagnosed with PM in The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University from January 1, 2019 to January 31, 2022 who had undergone mNGS detection in lung tissue or alveolar lavage fluid were collected retrospectively. A total of 14 patients with PM were included, including 4 patients with confirmed diagnosis and 10 patients with clinical diagnosis.【Results】All patients had underlying medical conditions, with hematological malignancies and diabetes being the most common. The most common symptoms were fever ($n = 10$), cough ($n = 9$) and shortness of breath ($n = 9$). Consolidation was the most common sign of chest CT, followed by mass, mostly

收稿日期:2022-08-07

作者简介:陈海红,硕士,主治医师,研究方向:肺部感染及肺癌的诊治,E-mail: chenhh5@mail.sysu.edu.cn;谭卫平,共同第一作者,硕士,副主任医师,研究方向:肺部感染及气道炎症性疾病,E-mail: tanweip@mail.sysu.edu.cn;郭禹标,通信作者,主任医师,研究方向:气道疾病及肺部感染,E-mail: guoyb@mail.sysu.edu.cn;刘杨丽,共同通信作者,副主任医师,研究方向:气道疾病及肿瘤,E-mail: liuyli3@mail.sysu.edu.cn

with cavity. On laboratory tests, decreased CD4+T lymphocytes, elevated CD8+T lymphocytes, and decreased CD4+/CD8+ ratio, and presentation with pleural effusion indicate poor prognosis. The positive rate of mNGS diagnosis was 78.5%, which was significantly higher than that of histopathology (50%), fungus rapid fluorescence staining (61.5%) and fungal culture (23.1%) of bronchoalveolar lavage fluid.【Conclusions】 Pulmonary mucormycosis is more likely to occur in patients with underlying diseases or who are immunocompromised. The clinical manifestations lack specificity. The low CD4/CD8 ratio and presentation of pleural effusion on CT imaging indicate poor prognosis of patients. mNGS is a rapid, convenient and sensitive method for the diagnosis of PM, which has advantages in the diagnosis of pulmonary mucormycosis.

Key words: Pulmonary mucormycosis; Clinical characteristics; Prognosis; Diagnosis; Metagenomic Next-generation Sequencing

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2023, 44(1): 175-180]

毛霉菌病是由毛霉目真菌引起的一种罕见的侵袭性真菌感染,一般分为鼻眶脑型、肺型、皮肤型、播散型和胃肠型五种。既往认为鼻眶毛霉菌病是最常见的临床类型^[1],但是近年来的文献报道,肺毛霉菌病(pulmonary mucormycosis, PM)在中国可能更常见^[2-3]。肺毛霉菌病进展迅速,但其临床表现缺乏特异性,亦无敏感的血清学标志物,病原学培养阳性率低,病理活检在病情危重患者中难以进行,均给早期诊断带来了极大的挑战。宏基因组下一代测序(Metagenomic Next-generation Sequencing, mNGS)是一种新的分子诊断技术,近年来为危重症或免疫缺陷患者中难以诊断的感染提供了新的诊断手段^[4-5]。然而,目前关于mNGS在PM诊断中的应用研究很少。因此,本研究回顾性总结了在中山大学附属第一医院曾行mNGS检测并最终诊断为PM的14例患者的临床资料,对其临床特征及预后进行分析总结,并探讨mNGS在诊断PM中的价值。

1 材料与方 法

1.1 入选标准及分组

回顾性分析在广东广州中山大学附属第一医院2019年1月1日至2022年1月31日期间诊断为肺毛霉菌病且曾行肺泡灌洗液或组织mNGS检测的成人患者(年龄大于14岁),收集其临床资料,包括:人口统计学信息、基础疾病、临床症状、胸部CT表现、实验室检查、诊断方法、治疗和临床结局等。本研究经中山大学附属第一医院伦理委员会审批通过,因本研究为回顾性研究,故免除知情同意且获得伦理委员会批准。

根据欧洲癌症研究与治疗组织/真菌研究组

(EORTC/MSG)标准及既往文献报道^[6-7],本研究纳入的患者均符合肺毛霉菌病的诊断标准。确诊:肺组织病理学或直接显微镜检确认存在毛霉菌,同时伴组织损伤证据,或肺组织mNGS检测到毛霉菌或培养阳性;临床诊断:存在毛霉菌病相关的危险因素及临床特征(影像学表现),且至少有一项以下毛霉菌病的微生物学证据:痰液、支气管肺泡灌洗液、支气管毛刷或抽吸液中培养阳性、或直接镜检发现毛霉或mNGS检测到毛霉菌。

根据临床表现、实验室检查和影像学改变,在诊断后90 d评估肺毛霉菌病患者的临床结局,分为两组:预后良好(临床好转/治愈)、预后不良(疾病进展/死亡)。

1.2 统计方法

数据采用SPSS 24.0(IBM Corp., Armonk, NY, USA)进行统计分析。具有正态分布的连续变量表示为平均值±标准差,并通过独立样本 t 检验进行比较;非正态分布的连续变量用中位数和四分位数间距表示,用Mann-Whitney U 检验进行比较。描述分类变量用计数和百分比表示,比较采用卡方检验或Fisher精确检验。双侧 $P < 0.05$ 被认为具有统计学差异。

2 结 果

2.1 患者基本情况、基础疾病及临床表现

研究期间,共入组14例患者,其中确诊4例,临床诊断10例;年龄为(49±20, 15~80)岁,男性10例(71.4%)(表1);9例好转或治愈,5例死亡(35.7%)。

所有患者均存在基础疾病,其中血液系统恶性肿瘤5例,糖尿病4例,恶性实体肿瘤治疗后2例,

肾移植和肝移植术后各1例。起病前,有激素使用史8例,化疗后粒缺5例,使用过预防性抗真菌药物治疗有6例,其中4例为伏立康唑。

临床表现无特异性(表1)。急性病程(小于1个月)8例,亚急性病程(1~3个月)6例,发热(10例)、咳嗽(9例)和气促(9例)是最常见的临床症

状。死亡患者均出现气促,此比例高于预后良好组,但未达到统计学意义。入住ICU患者8例,死亡5例。4例合并毛霉菌性败血症(1例同时合并鼻窦毛霉),其中3例死亡(死亡率75%);5例合并其他真菌感染(3例为耶氏肺孢子菌,2例为曲霉菌),8例合并细菌感染,2例合并巨细胞病毒感染。

表1 肺毛霉菌病患者的口统计学和临床表现

Table 1 Demographic, clinical characteristics and laboratory findings in patients with pulmonary mucormycosis

	Total(n= 14)	Good outcome (n=9)	Death (n=5)	P
Age /years	49.00±20.12	48.11±20.90	50.60±20.91	0.835
Male/n	10	5	5	0.126
Symptoms/n				
Fever	10	6	4	1.000
Cough	9	7	2	0.203
hemoptysis	4	3	1	1.000
Chest pain	3	2	1	1.000
Shortness of breath	9	4	5	0.086
Course(acute)	8	5	3	0.657
ICU stay	8	3	5	0.031 ¹⁾
Laboratory tests				
WBC/(×10 ⁹ /L)	5.07(3.00~11.82)	5.07(1.02~10.92)	4.37(3.57~12.87)	0.739
Neutrophil/(×10 ⁹ /L)	3.92(1.45~9.29)	4.13(0.13~8.74)	3.70(2.41~10.37)	0.739
Lymphocyte/(×10 ⁹ /L)	0.83±0.57	0.92±0.65	0.66±0.41	0.429
CD4+ T lymphocyte /% ²⁾	26.09±12.28	35.76±8.04	16.42±6.40	0.003 ¹⁾
CD8 + T lymphocyte /% ²⁾	39.59±21.16	25.40±11.58	53.78±19.24	0.022 ¹⁾
CD4/CD8 ratio ²⁾	0.97±0.80	1.59±0.65	0.35±0.22	0.004 ¹⁾
Hemoglobin/(g/L)	87.14±25.53	80.78±25.92	98.60±22.81	0.224
Procalcitonin/(ng/mL)	0.21(0.15~0.31)	0.19(0.14~0.33)	0.23(0.17~0.54)	0.640
C-reactive protein/(mg/L)	71.92(12.82~138.33)	43.75(9.69~113.06)	116.14(39.93~176.35)	0.317

¹⁾P<0.05; ²⁾Ten cases included (5 in the good outcome group and 5 in the death group).

2.2 实验室检验结果

10例患者进行了淋巴细胞亚群分析,预后良好组的CD4+T淋巴细胞百分比明显高于死亡组,分别为35.76±8.04、16.42±6.40(P=0.003);CD8+T淋巴细胞百分比,两组分别为25.40±11.58、53.78±19.24,预后良好组明显更低(P=0.022);CD4+/CD8+T淋巴细胞比率,预后良好组明显高于死亡组(1.59±0.65对比0.35±0.22,P=0.004;表1)。其余实验室检查,包括白细胞计数、中性粒细胞、淋巴细

胞、嗜酸性粒细胞、血小板、血红蛋白、降钙素原、C-反应蛋白、红细胞沉降率、D-二聚体、纤维蛋白原、乳酸脱氢酶等,两组间均无明显统计学差异。

2.3 影像学表现

肺部病变分布,以双侧多见(11例),局限于一个肺叶的2例;分布以胸膜下为主3例,沿支气管血管束4例,以中央气道为主3例,表现为均有胸膜下和支气管血管束分布的3例,胸膜下和中央气道1例。主要CT征象表现,以实变影(10例)最常见(图

1),其次为肿块影(9例)(图1A)、结节病灶(6例)(图1C)、磨玻璃影(5例)(表2)。肿块多伴空洞(图1A),其中,单发厚壁空洞6例、双发厚壁空洞2例。其他伴随征象有晕征(图1B)(12例),胸腔积液(8

例)、淋巴结肿大(6例)、胸膜增厚(5例)、反晕征(4例)(图1A)。本研究中,结节病灶征象只见于预后良好组($P=0.031$);死亡组均合并胸腔积液,比例明显高于预后良好组(100%对比33.3%, $P=0.031$)。

表2 14例肺毛霉菌病患者的胸部CT表现
Chest CT findings of 14 cases with pulmonary mucormycosis

Items	Total (n=14)	Good outcome(n=9)	Death (n=5)	P
Consolidation	10	7	3	0.580
Nodule	6	6	0	0.031 ¹⁾
Mass	9	6	3	1.000
Ground-glass opacity	5	4	1	0.580
Cavity/Cavities	11	7	4	1.000
Pleural effusion	8	3	5	0.031 ¹⁾
Pleural thickening	5	2	3	0.266
Lymph node enlargement	6	5	1	0.301
Halo sign	12	8	4	1.000
Reversed halo sign	4	2	2	0.580

¹⁾ $P<0.05$.

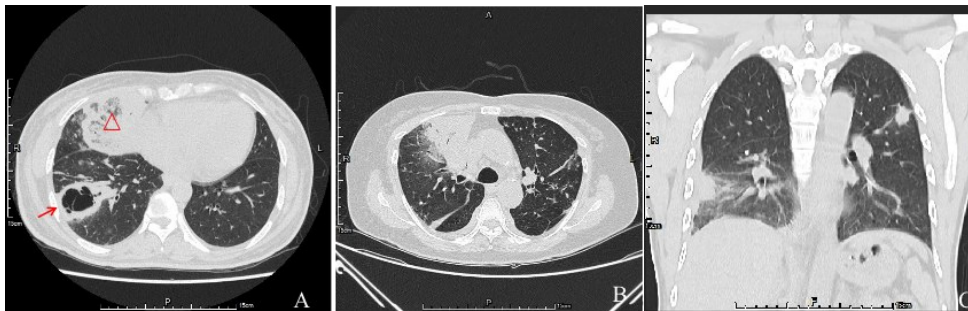


图1 肺毛霉菌病的典型CT图像
A: Chest CT of a 49-year-old woman with diabetes showed reversed halo sign (triangle) in the right middle lobe and a mass with a thick-wall cavity (arrow) in the right lower lobe, with fine septa in the cavity lesion. B: Chest CT of a 77-year-old woman with leukemia revealed consolidation with halo sign in the right upper lobe. C: Chest CT of a 40-year-old man with leukemia after chemotherapy revealed nodules and consolidation lesion with subpleural distribution.

图1 肺毛霉菌病的典型CT图像
Fig. 1 Typical CT images of pulmonary mucormycosis

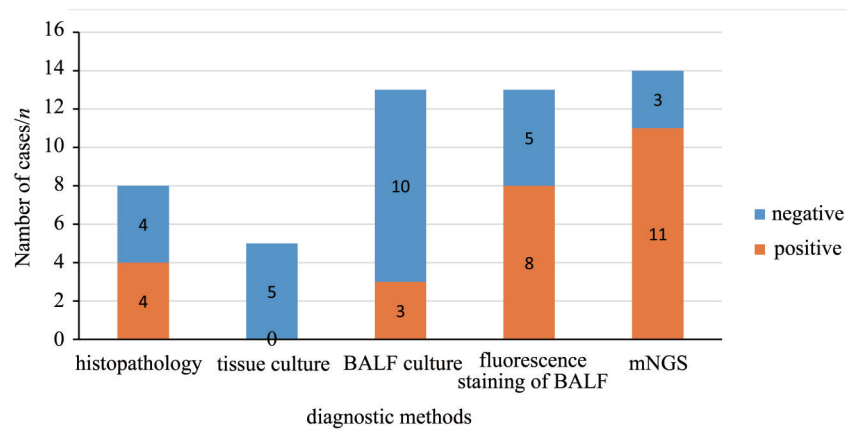
2.4 诊断及结果

14例PM中,8例行组织活检(支气管镜肺组织活检7例,CT引导下经皮肺穿刺活检1例),如图2,病理阳性4例(阳性率50%),行组织培养5例,均为阴性。13例患者进行了支气管镜肺泡灌洗术检查,肺泡灌洗液深部真菌快速荧光染色直接镜检阳性8例(61.5%)、真菌培养阳性3例(23.1%)。所有患者均接受mNGS检测(其中肺泡灌洗液13例,组织1例),11例(78.5%)为阳性。且回顾mNGS阴

性报告的原始数据,发现两例是有痕量,但因为序列数仅为“1”而未予报告。通过mNGS鉴定到的毛霉菌种类包括小孢根霉(7例)、伞枝横梗霉(2例)、微小根毛霉(1例)、小克银汉霉属(1例)。

2.5 治疗及预后

所有患者均接受了相应抗真菌治疗,药物包括两性霉素B、泊沙康唑联合或序贯治疗,1例使用艾莎康唑治疗;1例因反复咯血而行手术、序贯泊沙康唑治疗3月,达到治愈。13例患者使用了两性霉



BALF: Bronchoalveolar lavage fluid.

图2 肺毛霉菌病诊断方法结果比较

Fig. 2 Comparison of different diagnostic methods for pulmonary mucormycosis

素B,出现低钾血症不良反应的7例,肾功能不全3例。14例患者中,5例死亡,其中一例死于脑血管意外(家属放弃治疗,仅抗毛霉感染治疗4d)。

3 讨论

毛霉菌病是一种罕见但病死率极高的真菌感染^[6-9],主要发生于免疫功能低下的患者。早期研究提示PM死亡率高达56~76%^[8],近年来下降至29%~64%^[9-11],但如果诊断和治疗不及时,死亡率可达100%。本研究对肺毛霉菌病的临床特征、预后因素及诊断方法进行探讨,同时提供了近年来我国南方城市肺毛霉菌病流行病学的情况。本研究病例,死亡率为35.7%,主要发生在血液系统恶性肿瘤、糖尿病、器官移植患者中,这与既往研究结果相符^[2-3]。由于我国人口众多,器官移植及糖尿病患者增长迅速,毛霉菌感染人数也相应增加,作为临床医生,应重视其严峻性。

本研究的PM患者临床表现缺乏特异性,最常见的症状是发热、咳嗽和气促。实验室检查方面,CD4+T淋巴细胞下降、CD8+T淋巴细胞升高以及CD4+/CD8+比下降提示预后不良。T细胞亚群通过激活中性粒细胞和巨噬细胞、或产生各种介质^[12]来调节抗真菌免疫。与健康人群相比,毛霉菌病患者中的记忆性CD4+T细胞数量减少^[13],所以此类患者对毛霉菌感染难以产生强大的适应性免疫应答,这也是毛霉菌病进展快、预后差的原因之一。既往研究^[14-15]也表明当CD8+T细胞数量增加时,机体的免疫应答受损、免疫保护作用减弱、免疫记忆

反应减弱或消失,导致机体容易发生感染且感染不易控制;CD4+/CD8+比值较低时,提示细胞免疫功能低下,更容易出现合并症^[16]。

肺毛霉菌病的常见胸部CT征像是实变影或肿块影伴空洞形成,常伴晕征。表现为结节病灶的患者预后更好,这与我国曲俊彦等学者的研究结果一致^[3]。此外,合并胸腔积液的患者预后更差。而既往报道PM较特异的征象-反晕征,在本研究病例出现的比例并不高,可能与行CT检查距离起病的时间较长有关,既往研究提示反晕征多出现在发病第一周内^[10]。因此,早期行胸部CT检查可以为诊断提供重要信息。

可见,PM患者缺乏特异性临床表现,容易被误诊甚至漏诊,而延误诊断和治疗可增加患者的死亡率^[17]。

mNGS也称为高通量测序技术(HTS),具有高效、快速的特点,并且受先前抗生素暴露的影响较小^[4-5]。本研究14例患者中经mNGS诊断的阳性率为78.5%,明显高于组织病理(50%)及肺泡灌洗液深部真菌快速荧光染色直接镜检(61.5%)、真菌培养(23.1%)。此外,mNGS还可以对菌种进行快速鉴定,有助于更好地指导抗真菌药物的选择。本研究检测到的最常见的毛霉菌的属是小孢根霉属,其次是横梗霉,与既往研究一致^[18-19]。然而,mNGS检测及报告解读也面临一些挑战,尤其对于核酸提取过程中破壁困难的微生物,如毛霉菌等,即使检测报告病原体核酸序列数读数低,也要结合临床考虑其为致病微生物的可能。本研究中有两例毛霉菌病患者因序列数过低而mNGS未予报告,修正结果判读后,本研究mNGS诊断PM的敏感性可提高至92.9%(13/14)。因此,对临床怀疑真菌等特殊感染

的病例,应对原始数据详细查看及认真解读。

综上所述,我们的研究发现,PM患者大多合并基础疾病,临床表现缺乏特异性;较低的CD4+T淋巴细胞比例、较高的CD8+T淋巴细胞以及低水平的CD4+/CD8+比率,影像学上合并胸腔积液可能与较差的预后相关。早期诊断是治疗成功的关键。mNGS快速便捷、敏感性更高,较传统的诊断方法

阳性率均有明显的提升,但临床需注意加强对测序报告的解读。然而,本研究存在一定的局限性,作为回顾性研究,存在选择偏倚等固有不足;由于肺毛霉菌病的发病率低,我们的研究纳入的病例数较少,危险因素分布较广,期待后续更多的研究病例,以进一步分析PM的临床特征及诊断方法。

参考文献

- [1] Patel A, Kaur H, Xess I, et al. A multicentre observational study on the epidemiology, risk factors, management and outcomes of mucormycosis in India [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2020, 26(7): 944 e949–944 e915.
- [2] Peng M, Meng H, Sun Y, et al. Clinical features of pulmonary mucormycosis in patients with different immune status [J]. *J Thorac Dis*, 2019, 11(12): 5042–5052.
- [3] Qu J, Liu X, Lv X. Pulmonary mucormycosis as the leading clinical type of mucormycosis in Western China [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 770551.
- [4] 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 e571–574 e576.
- [5] 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, 67(suppl_2): S231–S240.
- [6] Skiada A, Lass FC, Klimko N, et al. Challenges in the diagnosis and treatment of mucormycosis [J]. *Med Mycol*, 2018, 56(suppl_1): 93–101.
- [7] Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA, et al. Revision and update of the consensus definitions of invasive fungal disease from the european organization for research and treatment of cancer and the mycoses study group education and research consortium [J]. *Clin Infect Dis*, 2020, 71(6): 1367–1376.
- [8] Maureen MR, Theoklis EZ, Wendy LB, et al. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. [J]. *Clin Infect Dis*, 2005, 1: 634–653.
- [9] Jeong W, Keighley C, Wolfe R, et al. The epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis: a systematic review and meta-analysis of case reports [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2019, 25(1): 26–34.
- [10] Legouge C, Caillot D, Chretien ML, et al. The reversed halo sign: pathognomonic pattern of pulmonary mucormycosis in leukemic patients with neutropenia? [J]. *Clin Infect Dis*, 2014, 58(5): 672–678.
- [11] Lin E, Moua T, Limper AH. Pulmonary mucormycosis: clinical features and outcomes [J]. *Infection*, 2017, 45(4): 443–448.
- [12] Mahalaxmi I, Jayaramayya K, Venkatesan D, et al. Mucormycosis: an opportunistic pathogen during COVID-19 [J]. *Environ Res*, 2021, 201: 111643.
- [13] Camargo JF, Bhimji A, Kumar D, et al. Impaired T cell responsiveness to interleukin-6 in hematological patients with invasive aspergillosis [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0123171.
- [14] Saule P, Trauet J, Dutriez V, et al. Accumulation of memory T cells from childhood to old age: central and effector memory cells in CD4(+) versus effector memory and terminally differentiated memory cells in CD8(+) compartment [J]. *Mech Ageing Dev*, 2006, 127(3): 274–281.
- [15] Marta CG, Lee WW, Cui DP, et al. T cell subset-specific susceptibility to aging [J]. *Clin Immunol*, 2008, 127(1): 107–118.
- [16] Vanesa GR, Inés HF, María JC, et al. Immunological features beyond CD4 CD8 ratio values in older individuals. [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021 May 26; 13(10): 13443–13459.
- [17] Wang J, Wang Y, Han F, et al. Multiple diagnostic methods for mucormycosis: a retrospective case series [J]. *J Clin Lab Anal*, 2022, 36(8): e24588.
- [18] Anna S, Ioannis P, Apiranthitou MD. Epidemiology and diagnosis of mucormycosis: an update [J]. *J Fungi (Basel)*, 2020, 6(4).
- [19] Prakash H, Ghosh AK, Rudramurthy SM, et al. A prospective multicenter study on mucormycosis in India: epidemiology, diagnosis, and treatment [J]. *Med Mycol*, 2019, 57(4): 395–402.