

# BALF tNGS 检测及培养对 NSCLC 合并 IPFD 的诊断价值

刘振昆<sup>1</sup>, 吕纪玲<sup>2</sup>, 徐伟伟<sup>3</sup>, 马力天<sup>4,5,6</sup>, 张才擎<sup>1,2</sup>

(1.山东大学齐鲁医学院,山东 济南 250012; 2.山东省第二人民医院呼吸与危重症医学科,山东 济南 250022;

3.山东省第二人民医院儿科,山东 济南 250022; 4.空军军医大学唐都医院胸腔外科,陕西 西安 710038;

5.空军军医大学唐都医院中西医结合肿瘤专科,陕西 西安 710038;

6.陕西省中西医结合肿瘤诊疗重点实验室,陕西 西安 710038)

**摘要:** **目的** 探究支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)病原微生物靶向测序(targeted next generation sequencing, tNGS)技术与传统培养在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)合并侵袭性肺真菌病(invasive pulmonary fungal disease, IPFD)中的诊断价值。**方法** 回顾性分析2022年9月1日至2025年4月1日40例于山东省第二人民医院临床诊断为NSCLC合并IPFD患者的临床资料,收集BALF样本行tNGS检测与传统培养,对比分析病原检出率及诊断效能。**结果** 40例IPFD患者样本中,tNGS和传统培养对真菌的阳性检出率分别为85.0%、52.5%(校正 $\chi^2=6.86, P=0.01$ ),对细菌的阳性检出率分别为70.0%、50.0%(校正 $\chi^2=4.08, P=0.04$ )。tNGS和传统培养对细菌的检测灵敏度分别为95.5%、86.4%(校正 $\chi^2=0.25, P=0.62$ )。所有患者经抗真菌、细菌及抗肿瘤治疗后均好转出院。**结论** tNGS技术在NSCLC合并IPFD的病原检测中,对真菌和细菌的检测效能均显著优于BALF传统培养。临床上可将tNGS作为早期筛查工具,结合BALF培养、临床特征综合判读,以优化诊疗并避免过度治疗。

**关键词:** 非小细胞肺癌;侵袭性肺真菌病;肺泡灌洗液;病原微生物靶向测序;诊断价值

中图分类号:R735.6

文献标志码:A

## Value of tNGS testing and conventional culture for BALF in the diagnosis of NSCLC complicated with IPFD

LIU Zhenkun<sup>1</sup>, LYU Jiling<sup>2</sup>, XU Weiwei<sup>3</sup>, MA Litian<sup>4,5,6</sup>, ZHANG Caiqing<sup>1,2</sup>

(1. Qilu Medical College of Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China;

2. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Shandong Second Provincial General Hospital, Jinan 250022, Shandong, China;

3. Department of Pediatrics, Shandong Second Provincial General Hospital, Jian 250022, Shandong, China;

4. Department of Thoracic Surgery, Tangdu Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi, China;

5. Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Oncology, Tangdu Hospital, Air Force Military Medical University,

Xi'an 710038, Shaanxi, China; 6. Shaanxi Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western

Medicine for Tumor Diagnosis and Treatment, Xi'an 710038, Shaanxi, China)

**Abstract: Objective** To investigate the diagnostic value of targeted next-generation sequencing (tNGS) for pathogens in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) compared with traditional culture in non-small cell lung cancer (NSCLC) complicated with invasive pulmonary fungal disease (IPFD). **Methods** A retrospective analysis was conducted on the clinical data of 40 patients clinically diagnosed with NSCLC complicated with IPFD at Shandong Second Provincial General Hospital from September 1, 2022, to April 1, 2025. BALF samples were collected for tNGS detection and

traditional culture, and the pathogen detection rates and diagnostic efficacy were compared and analyzed. **Results** Among the 40 IPFD patient samples, the positive detection rates for fungi by tNGS and traditional culture were 85.0% and 52.5%, respectively (corrected  $\chi^2 = 6.86$ ,  $P = 0.01$ ), and for bacteria, they were 70.0% and 50.0%, respectively (corrected  $\chi^2 = 4.08$ ,  $P = 0.04$ ). The detection sensitivities for bacteria by tNGS and traditional culture were 95.5% and 86.4%, respectively (corrected  $\chi^2 = 0.25$ ,  $P = 0.62$ ). All patients improved and were discharged after antifungal, antibacterial, and antitumor treatments. **Conclusion** tNGS technology demonstrates significantly superior detection efficacy for both fungi and bacteria in pathogen detection for NSCLC complicated with IPFD compared to traditional BALF culture. Clinically, tNGS can be used as an early screening tool, and combined with BALF culture and clinical features for comprehensive interpretation, to optimize diagnosis and treatment and avoid overtreatment.

**Key words:** Non-small cell lung cancer; Invasive pulmonary fungal disease; Bronchoalveolar lavage fluid; Targeted next-generation sequencing; Diagnostic value

非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 占全球所有肺癌病例的约 85%<sup>[1]</sup>。NSCLC 患者常因免疫功能抑制而易感染病原体,尤其是侵袭性肺真菌病 (invasive pulmonary fungal disease, IPFD),其诊断和治疗复杂。NSCLC 合并 IPFD 患者因肺部受肿瘤影响,更易出现严重并发症,需个性化治疗。传统上,支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 分析是诊断肺部感染性疾病的关键,但其诊断方法(如微生物培养、细胞学分析和免疫化学检测)存在培养周期长、灵敏度低以及无法检测非可培养微生物等局限<sup>[2-4]</sup>。病原微生物靶向测序 (targeted next-generation sequencing, tNGS) 技术通过高通量测序平台捕获样本中的核酸,结合生物信息学分析对病原体基因序列进行比对解析,其核心优势包括高通量覆盖、诊断迅速、灵敏度与特异性较高等<sup>[5-6]</sup>。基于上述特性,tNGS 技术可提供全面的微生物组成序列,为提升诊断的准确性、缩短检测时间以及优化治疗方案奠定基础。本研究通过回顾性收集患者的 BALF 样本 tNGS 的检测结果,通过与传统 BALF 培养方法进行对比,深入探讨 tNGS 技术在 NSCLC 合并 IPFD 患者病原检测中的应用价值。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

#### 1.1.1 研究对象

回顾性收集 2022 年 9 月 1 日至 2025 年 4 月 1 日在山东省第二人民医院呼吸内科住院治疗的临床诊断为 IPFD 的 40 例 NSCLC 患者临床资料和实验室检验结果,所有患者均行 BALF 样本的 tNGS 检测以及 BALF 培养。其中男 30 例(鳞癌 19 例、腺癌 11 例)、女 10 例(腺癌 9 例、鳞癌 1 例);44~88 (68.20±10.85)岁。

#### 1.1.2 纳入排除标准

纳入标准:①符合《2022 年第 3 版非小细胞肺癌 NCCN 临床实践指南》的诊断标准<sup>[7]</sup>,经过组织病理学确诊为 NSCLC;②根据《侵袭性肺真菌病诊断路径专家共识(2024 版)》,通过微生物学检测并结合临床症状、影像学表现和血清学指标,达到 IPFD 的临床诊断标准<sup>[8]</sup>;③提供符合检测标准的 BALF 样本;④临床资料完整。排除标准:①非 NSCLC 类型的肺癌;②BALF 样本未能成功采集,无法进行 tNGS 或 BALF 培养;③临床资料缺失。本研究经山东省第二人民医院医学伦理委员会批准通过(伦理批件号:202203901),患者或家属均签署知情同意书。

## 1.2 方法

### 1.2.1 临床资料收集

临床资料包括姓名、性别、年龄、住院天数、既往病史、临床表现、实验室检查、影像学检查、治疗及预后等。

### 1.2.2 支气管 BALF 采样

患者行支气管镜检查并留取肺泡灌洗液。通过纤维支气管镜对支气管以下肺段、亚肺段水平用无菌生理盐水反复灌洗、回收获取肺泡表面衬液样本,并用无菌容器收集,BALF 采集参照美国胸科学会官方临床实践指南标准<sup>[9]</sup>。

### 1.2.3 BALF 培养及鉴定

质控方法如下。①实验过程质控:通过外源性标准品(人工噬菌体 DNA)监测核酸提取与扩增效率(回收率达标),设置阴/阳性对照,排除假阴性/假阳性;②样本合格性验证:镜检确认 BALF 样本来源可靠性(纤毛柱状上皮细胞>85%,鳞状上皮细胞<5%),排除口咽污染;③检测性能保障:测序数据量 $\geq 20$  Mbps、平均读长>400 bp,最低检出限 100 copies/mL;④结果分层解读:结合病原体

载量、定植菌特征及临床背景综合判读,降低误诊风险。将标本接种于血平板、巧克力平板及沙保罗培养基等,置恒温培养箱培养(细菌 35℃~37℃,真菌 25℃~30℃),定期观察菌落生长及特征。真菌通过菌落形态、乳酸酚棉蓝染色镜检鉴定;酵母菌用 CHROMagar 显色初筛,丝状真菌经小培养镜检分生孢子,辅以尿素酶试验。特殊病原体检测:墨汁染色查隐球菌,六胺银染色查肺孢子菌。细菌经革兰染色区分属性,革兰阳性菌做凝固酶试验,革兰阴性菌行溶血试验及 API 20E 鉴定,氧化酶阳性菌补充 42℃ 生长试验。血清凝集试验鉴定肺炎链球菌和沙门菌。

#### 1.2.4 tNGS 检测和鉴定

将 BALF 样本送至广州市金圻睿生物科技有限公司行 tNGS 检测,检测的主要流程包括样本处理、核酸提取、文库制备、测序和生物信息分析。肺泡灌洗液样本经二硫苏糖醇液化后,加入外源性内参(噬菌体 DNA),经高速离心富集病原体并进行破壁处理,取上清进行核酸提取。随后通过 cDNA 合成、目标区域富集及扩增完成文库制备,最后进行测序和生物信息学分析。

#### 1.2.5 检测性能与质控

依据厂商技术参数,BALF 样本 tNGS 检测的真菌灵敏度为 85.7%~91.2%,特异性 90.3%~95.6%,最低检测限 100 CFU/mL;细菌灵敏度 88.3%~93.5%,特异性 87.9%~92.1%,最低检测限 1 000 CFU/mL。质量控制措施包括:①核酸提取后通过 Qubit 4.0 检测浓度( $A_{260}/A_{280}=1.8\sim 2.0$ );②文库制备后经 Agilent 2100 评估片段分布(目标区域富集效率>80%);③测序深度 $\geq 105$  reads/样本,不足者重测;④关键病原体通过 Sanger 测序验证。

#### 1.2.6 疾病诊断标准判定

①以患者的临床症状、体征、典型影像学表现、G/GM 试验、BALF 培养、tNGS 结果以及抗真菌治疗反应等综合检查结果作为诊断 IPFD 的金标准。②依据患者的临床症状、体征、影像学表现、炎症指标、BALF 培养结果、tNGS 检测结果以及抗细菌治疗反应等综合检查结果作为细菌感染金标准。对于检出链球菌、奈瑟菌等常见定植菌,若无细菌感染证据,判定为污染或定植。真阳性:金标准(+),检测结果(+);假阳性:金标准(-),检测结果(+);真阴性:金标准(-),检测结果(-);假阴性:金标准(+),检测结果(-)。本研究根据以上定义计算 tNGS 与 BALF 培养的诊断灵敏度、特异性等效能指标。

#### 1.2.7 观察指标

记录 BALF 样本培养结果以及 tNGS 检测结果,对比两种检测方法对致病菌的检出情况。

#### 1.2.8 样本量计算

根据既往研究结果,tNGS 对肺部感染病原体的检出率为 89.5%~93.1%,传统检测方法对肺部感染病原体的检出率为 32.5%~58.8%<sup>[10-11]</sup>。tNGS 检出率设为 93.0%,传统病原体培养检出率设为 58.0%,预期差异为 0.35。I 类错误概率  $\alpha$  取 0.1,检验效能  $\beta$  取 0.8,两组样本量等比例分配。使用 PASS 15.0 软件进行样本量计算。

#### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 25.0 软件。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示。计数资料以  $n(\%)$  形式表示。配对设计资料采用配对 McNemar  $\chi^2$  检验进行分析,若不一致对子数 $<40$ ,则通过连续性校正公式计算  $\chi^2$  值。非配对的计数资料组间比较采用  $\chi^2$  检验或 Fisher 精确检验。检验水准  $\alpha=0.05$ (双侧)。

## 2 结果

### 2.1 患者的临床特点与既往史

本研究最终纳入的 40 例 NSCLC 合并 IPFD 患者均出现不同程度发热,其中 30 例伴有咳嗽(75.0%)、25 例伴有咳痰(62.5%)、5 例出现咯血(12.5%)、8 例(20.0%)伴有喘憋。经肺部听诊,患者肺部出现不同程度湿啰音的有 22 例(55.0%),呼吸音减低的有 10 例(25.0%)。所有患者的住院治疗时间为 2.0~27.0(13.73 $\pm$ 5.95)d。

### 2.2 影像学检查结果

所有患者均提示明显肺部感染或炎症迹象,主要的影像学表现为斑片状渗出、高密度影、磨玻璃影、胸腔积液和肺空洞等。IPFD 的典型 CT 表现主要包括空气半月征(病例 7)、肺空洞(病例 12)、磨玻璃影(病例 11)、肺实变影(病例 15)等。见图 1。

### 2.3 BALF 培养和 tNGS 检测结果

#### 2.3.1 真菌检测结果

40 例 NSCLC 合并 IPFD 的患者中,BALF 培养报告真菌阳性检出 21 例(52.5%),其中酵母菌(包含白色念珠菌、白假丝酵母菌、光滑念珠菌和热带念珠菌)16 例,曲霉菌(包含黄曲霉、烟曲霉和杂色曲霉菌)5 例;tNGS 报告真菌阳性检出 34 例(85.0%),主要为白色念珠菌、曲霉菌和耶氏肺孢子菌(表 1)。经 McNemar 校正  $\chi^2$  检验,tNGS 真菌检出率高于 BALF 培养真菌检出率,差异有统计学意义(85.0% vs. 52.5%,校正  $\chi^2=6.86,P=0.01$ ),见表 2。

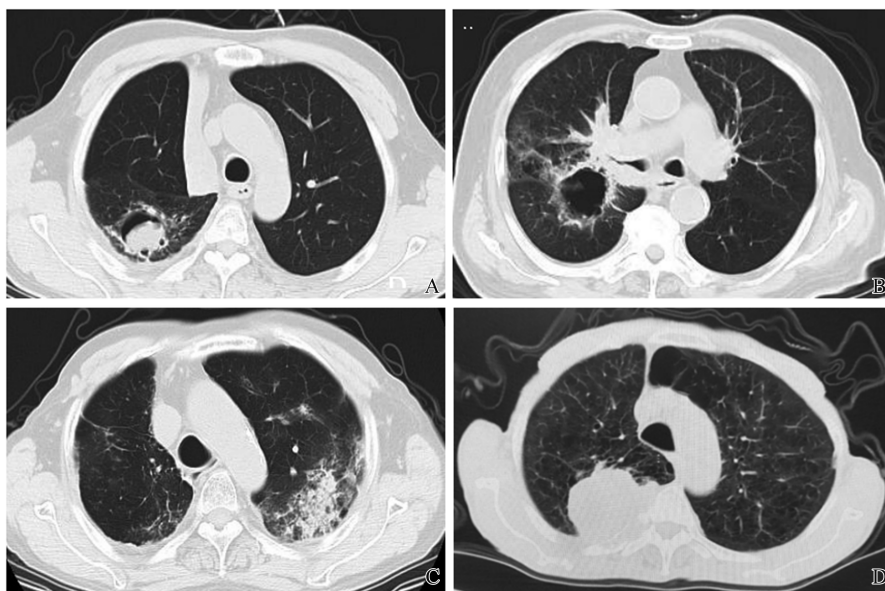


图 1 侵袭性肺真菌病典型肺部 CT 表现

A: 病例 7 CT 影像示肺部空气半月征, tNGS 检出人类疱疹病毒、烟曲霉; B: 病例 12 CT 影像示肺空洞, tNGS 检出人类疱疹病毒、白色念珠菌、肺炎克雷伯菌、肺炎链球菌、铜绿假单胞菌、阴沟肠杆菌复合群; C: 病例 11 CT 影像示肺部磨玻璃影, tNGS 检出人类冠状病毒、白色念珠菌、粪肠球菌; D: 病例 15 CT 影像示肺实变影, tNGS 检出流感嗜血杆菌、路邓葡萄球菌、曲霉、人类疱疹病毒 4 型。

Figure 1 Typical pulmonary CT findings in IPFD

A: CT imaging of Case 7 revealed pulmonary air crescent sign, and *human herpesvirus* and *Aspergillus fumigatus* were detected by tNGS technology; B: CT imaging of Case 12 revealed pulmonary cavity, and *Human herpesvirus*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter cloacae* complex were detected by tNGS technology; C: CT imaging of Case 11 revealed pulmonary ground-glass opacity, and *Human coronavirus*, *Candida albicans*, and *Enterococcus faecalis* were detected by tNGS technology; D: CT imaging of Case 15 revealed pulmonary consolidation shadow, and *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Aspergillus spp.*, and *Human herpesvirus 4* were detected by tNGS technology.

表 1 NSCLC 合并 IPFD 患者病原微生物检测结果  
Table 1 Pathogen detection results in NSCLC patients complicated with IPFD

病例编号	性别	年龄/岁	诊断	BALF 培养结果	tNGS 结果	真菌序列数	肿瘤治疗方式
1	男	70	鳞癌	白色念珠菌	人类冠状病毒、粪肠球菌、白色念珠菌	35 526	放疗、化疗
2	男	66	腺癌	白假丝酵母菌	肺炎克雷伯菌、人类疱疹病毒	0	放疗、化疗、靶向
#3	男	61	腺癌	奈瑟菌属、链球菌属混合生长	耶氏肺孢子菌、曲霉、巨细胞病毒	1 635	—
4	男	48	腺癌	有酵母样真菌生长	肠埃希菌、念珠菌、人类疱疹病毒 4 型、新型冠状病毒	163	—
#5	男	80	鳞癌	无乳链球菌	鲍曼不动杆菌、无乳链球菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌	7	靶向
6	男	69	鳞癌	未测出	人呼吸道合胞病毒、白色念珠菌	61	化疗、免疫
7	男	52	鳞癌	未测出	人类疱疹病毒、烟曲霉	34	化疗
8	男	70	腺癌	未测出	烟曲霉、甲型流感病毒、白色念珠菌	294	化疗、靶向
9	男	77	鳞癌	未测出	耶氏肺孢子菌、烟曲霉、白色念珠菌	55	放疗
#10	男	70	鳞癌	黄曲霉	流感嗜血杆菌、烟曲霉、人类疱疹病毒	553	化疗、免疫

续表

病例编号	性别	年龄/岁	诊断	BALF培养结果	tNGS结果	真菌序列数	肿瘤治疗方式
11	男	70	鳞癌术后	光滑念珠菌	人类冠状病毒、白色念珠菌、粪肠球菌	975	放疗、化疗、靶向
#12	男	88	鳞癌	白色念珠菌、溶血葡萄球菌、黄曲霉	人类疱疹病毒、白色念珠菌、肺炎克雷伯菌、肺炎链球菌、铜绿假单胞菌、阴沟肠杆菌复合群	19 460	—
#13	男	80	腺癌	曲霉菌	鲍曼不动杆菌、烟曲霉、粪肠球菌	2 680	靶向
14	男	61	鳞癌术后	烟曲霉	白色念珠菌、耶氏肺孢子菌	706	放疗、化疗、免疫
#15	男	63	腺癌	奈瑟菌属、链球菌属混合生长	流感嗜血杆菌、路邓葡萄球菌、曲霉、人类疱疹病毒 4 型	11	放疗、化疗
16	男	67	腺癌	白假丝酵母菌	人类疱疹病毒、耶氏肺孢子菌	376	放疗、化疗、免疫
#17	男	48	鳞癌	奈瑟菌属、链球菌属	耶氏肺孢子菌、厚垣镰刀菌、肺炎链球菌	4 778	放疗、化疗
#18	男	71	腺癌	光滑假丝酵母菌、奈瑟菌属、链球菌属	光滑念珠菌、肺炎链球菌	5 737	—
19	男	65	鳞癌	意大利青霉、奈瑟菌属、链球菌属、金黄色葡萄球菌	耶氏肺孢子菌	172	放疗、化疗、免疫
#20	男	58	腺癌	白假丝酵母菌、链球菌属	黄曲霉、肺炎链球菌	110	化疗、免疫
#21	男	55	鳞癌	白假丝酵母菌、草绿色链球菌	耶氏肺孢子菌、肺炎链球菌	2	化疗
#22	男	60	腺癌	链球菌属	黄曲霉、肺炎链球菌	89	放疗、化疗
23	男	63	鳞癌	白假丝酵母菌	白色念珠菌、鲍曼不动杆菌	10 150	化疗、免疫
24	男	81	鳞癌	白假丝酵母菌	人类疱疹病毒	1 659	放疗、化疗
#25	男	74	鳞癌	篮状霉属、奈瑟菌属、链球菌属	肺炎克雷伯菌、曲霉、人类疱疹病毒 4 型	187	—
#26	男	83	鳞癌	肺炎克雷伯菌	肺炎克雷伯菌	0	化疗、靶向
27	男	44	腺癌	白色念珠菌	新型冠状病毒、白色念珠菌、耶氏肺孢子菌、单纯疱疹病毒、烟曲霉	13 476	放疗、化疗、免疫
#28	男	61	鳞癌	奈瑟菌、肺炎链球菌	耶氏肺孢子菌、流感嗜血杆菌、粪肠球菌	20 828	化疗、免疫
29	男	59	鳞癌术后	白假丝酵母菌	肺炎克雷伯菌、耐碳青霉烯肠杆菌	0	化疗、免疫
#30	男	77	鳞癌	屎肠球菌、白色念珠菌混合生长	屎肠球菌、念珠菌、人类疱疹病毒 1 型	1 817	—
31	女	84	鳞癌	曲霉菌、白假丝酵母菌	白色念珠菌、黄曲霉、鲍曼不动杆菌	929	—
#32	女	65	腺癌	奇异变形杆菌	白色念珠菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌	2 277	靶向
33	女	71	腺癌	未测出	白色念珠菌、白假丝酵母菌	288	—
#34	女	86	腺癌	白假丝酵母菌、链球菌属	白色念珠菌、肺炎链球菌	5 358	—
#35	女	77	腺癌	链球菌属	烟曲霉、肺炎链球菌	11 563	—
#36	女	72	腺癌	耶氏肺孢子菌	人类疱疹病毒、耶氏肺孢子菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌	34 623	—
#37	女	59	腺癌	链球菌属	白色念珠菌、脑膜炎奈瑟菌、肺炎链球菌	50 163	放疗、化疗、免疫

续表

病例编号	性别	年龄/岁	诊断	BALF 培养结果	tNGS 结果	真菌序列数	肿瘤治疗方式
#38	女	67	腺癌	热带念珠菌,黏质沙雷菌,大肠埃希菌	人类疱疹病毒、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、耐碳青霉烯肠杆菌	0	放疗、化疗
#39	女	83	腺癌	鲍曼不动杆菌	鲍曼不动杆菌、人类疱疹病毒	0	化疗、免疫、靶向
40	女	73	腺癌	未测出	耶氏肺孢子菌、人类疱疹病毒	6 654	化疗、靶向

注:#代表金标准诊断为 IPFD 合并肺部细菌感染的患者(22 例)。

表 2 tNGS 与 BALF 培养的真菌检出结果

Table 2 Fungal detection results by tNGS and BALF culture

tNGS 检测	BALF 培养		总计
	阳性	阴性	
阳性	17	17	34
阴性	4	2	6
总计	21	19	40

### 2.3.2 细菌检测结果

在全部 40 例 BALF 样本中,BALF 培养报告细菌阳性检出 20 例(阳性率 50.0%),而 tNGS 技术报告细菌阳性检出 28 例(阳性率 70.0%)。为初步比较两种方法的一致性,以传统培养结果为临时参照进行测算:tNGS 的阳性符合率(即与培养结果一致的阳性比例)为 90.0%(18/20),阴性符合率(即与培养结果一致的阴性比例)为 50.0%(10/20),总符合率为 70.0%(28/40)。McNemar 配对检验表明,tNGS 的细菌阳性检出率显著高于传统培养(校正  $\chi^2 = 4.08, P = 0.04$ ),见表 3。

表 3 tNGS 与 BALF 培养的细菌检出结果

Table 3 Bacterial detection results by tNGS and BALF culture

tNGS 检测	BALF 培养		总计
	阳性	阴性	
阳性	18	10	28
阴性	2	10	12
总计	20	20	40

### 2.3.3 诊断效能对比

在诊断效能方面,40 例 NSCLC 合并 IPFD 的患者 tNGS 对真菌的检测灵敏度为 85.0%,高于 BALF 培养的 52.5%,差异有统计学意义(校正  $\chi^2 = 6.86, P = 0.01$ )。

在细菌检出方面,tNGS 对细菌检出的灵敏度为 95.5%,BALF 培养检出细菌的灵敏度为 86.4%,差异无统计学意义(校正  $\chi^2 = 0.25, P = 0.62$ ),见表 4、表 5。

tNGS 对细菌检测的特异度为 61.1%,BALF 培养为 94.4%,差异无统计学意义(校正  $\chi^2 = 4.50, P = 0.07$ ),可能受样本量、检测原理等影响。两种检测

方式在阳性预测值、阴性预测值和一致率方面差异均无统计学意义( $P$  值分别为 0.15、0.99、0.35)。

表 4 tNGS 和 BALF 培养诊断出的细菌感染患者例数

Table 4 Number of cases with bacterial infection diagnosed by tNGS and BALF culture

指标	tNGS 检测	BALF 培养
真阳性	21	19
假阳性	7	1
真阴性	11	17
假阴性	1	3

表 5 tNGS 与 BALF 对细菌感染的诊断效能对比

Table 5 Comparison of diagnostic efficacy of tNGS and BALF for bacterial infections

诊断指标	tNGS 检测/%	BALF 培养/%	$\chi^2$	$P$
灵敏度	95.5(21/22)	86.4(19/22)	0.25	0.62
特异度	61.1(11/18)	94.4(17/18)	4.50	0.07
阳性预测值	75.0(21/28)	95.0(19/20)	2.07	0.15
阴性预测值	91.7(11/12)	85.0(17/20)	0.000 2	0.99
一致率	80.0(32/40)	90.0(36/40)	0.88	0.35

注:灵敏度、特异度计算使用 McNemar 校正  $\chi^2$  检验,其余指标使用独立样本  $\chi^2$  检验。

## 2.4 治疗与转归

针对肺真菌感染,40 例患者均使用相应的抗真菌药物,如伏立康唑、氟康唑、卡泊芬净和两性霉素 B 等;针对敏感细菌,使用哌拉西林钠他唑巴坦钠或头孢哌酮钠舒巴坦钠等;针对耐药菌感染,使用美罗培南或利奈唑胺等;针对病毒感染,使用奥司他韦或对症处理。基于病原学检测结果并结合临床综合判断,为患者制定个体化抗感染方案(包括抗真菌、抗细菌等),同时联合抗肿瘤治疗。治疗后,患者临床症状普遍缓解,感染指标下降,最终全部好转出院。

## 3 讨论

NSCLC 合并 IPFD 的高危因素主要包括免疫系统受损、长期住院史、抗生素或免疫抑制治疗等,尤其在接受放化疗、糖皮质激素和免疫抑制剂等治疗后,常常会增加患者的感染风险<sup>[12-14]</sup>。这些高危因

素的潜在机制在于:免疫系统受损会削弱先天免疫细胞(如肺泡巨噬细胞、中性粒细胞)的吞噬功能及适应性免疫中 Th1/Th17 细胞的抗真菌活性,使曲霉、隐球菌等易定植并侵袭肺部;长期住院及抗生素滥用可破坏肺部微生态平衡,抑制正常菌群而促进真菌过度繁殖,同时抗生素使用时间延长会增加念珠菌等条件致病菌的感染机会;放化疗、糖皮质激素及免疫抑制剂治疗则通过抑制炎症反应、降低吞噬细胞活性和淋巴细胞功能,进一步降低宿主对真菌的清除能力,尤其当合并有创操作(如机械通气)时,会破坏呼吸道屏障,使真菌更易侵入肺组织,继而引发感染<sup>[12-14]</sup>。IPFD 主要由念珠菌属和曲霉属引起,可能严重影响患者预后,增加死亡率<sup>[15]</sup>。长期住院的 IPFD 患者中,大约 80.0%的致病菌为念珠菌,0.3%~19.0%为曲霉属<sup>[16]</sup>。肝硬化住院患者中,感染患者约有 12.7%发生真菌感染,30 d 死亡率达 30.0%<sup>[17]</sup>。另外,IPFD 还常继发于重症病毒性肺炎,例如流感和新型冠状病毒感染<sup>[18]</sup>。这些继发感染主要为侵袭性霉菌感染,如肺曲霉菌感染<sup>[19]</sup>、侵袭性念珠菌感染<sup>[20]</sup>、毛霉菌感染<sup>[21]</sup>等。老年患者和伴有基础疾病(如高血压、糖尿病等慢性疾病)的患者免疫力较弱,更容易遭受真菌感染<sup>[22-23]</sup>。临床上,诊断 IPFD 常需结合影像学检查(如 X 片、CT 等)、微生物学检测(如真菌培养和 PCR 检测)和血清学检测(例如半乳甘露聚糖、1,3- $\beta$ -D-葡聚糖测试)等方法<sup>[24-26]</sup>。尽管传统微生物检测方法使用广泛,但在检测时长和灵敏度上存在不足。

IPFD 具有典型影像学表现,如晕征、实变、空气半月征等<sup>[27-28]</sup>。空气半月征与肺部真菌感染之间存在一定的关联,尤其是在侵袭性肺曲霉病中较为常见。这种影像学特征通常表现为在肺部空腔内,真菌球或坏死组织的形成导致空气在空腔壁与肿块之间形成新月形或环形的透亮影<sup>[29]</sup>。在本研究中,病例 7 为 52 岁男性患者,本次入院 3 周前因确诊晚期鳞癌接受化疗和激素治疗,入院时出现呼吸急促、高热等明显感染症状。CT 结果提示右肺上叶不张,有真菌感染的典型“空气半月征”影像学表现,右肺下叶表现为斑片状渗出。BALF 培养未检测出微生物,但是 tNGS 检测发现了烟曲霉感染的证据。其差异原因可能为:患者接受过激素治疗,激素抑制炎症后,肺内炎性细胞减少,真菌可能更多处于“被细胞包裹”状态,或位于组织深部及血管内;这些微环境不利于其向外排出,因此减少了被 BALF 样本取出的比例,显著降低真菌(如烟曲霉)培养检测的

效能,表现为检出率下降、阳性预测值降低,使得培养作为诊断手段的可靠性在该类患者中明显减弱<sup>[30-31]</sup>。而 tNGS 基于核酸检测,不受病原体活力及培养条件限制,因此更易捕获低载量或非活跃状态的病原体信号。结合 CT 影像学和 tNGS 检测信息,本团队诊断患者为 IPFD,先后使用伏立康唑和两性霉素 B 治疗,患者体温于第 5 天恢复正常,肺部感染灶也逐步吸收,最终病情好转出院。病例 11 为 70 岁男性患者,有长期吸烟史,半年前行鳞癌手术。本次入院时表现为持续高热,呼吸急促,伴有肺部感染症状。入院 CT 提示肺气肿,双肺多发间质性纤维化。听诊发现右肺呼吸音低,双肺底可闻及捻发音。住院期间,BALF 培养初步检测出光滑念珠菌,而 tNGS 发现人类冠状病毒、白色念珠菌及粪肠球菌。

本研究的 40 例患者中,有 22 例确诊为细菌感染。呼吸道本身并非无菌环境,尤其在患有基础肺部疾病和接受相关诊疗操作的患者中,常存在多种细菌定植<sup>[32-34]</sup>。tNGS 技术的高敏感性能够检测出包括低载量细菌在内的广泛微生物信号。本研究中 tNGS 检出肺炎链球菌、鲍曼不动杆菌等常见呼吸道细菌,在不同患者中既可能是致病菌,也可能为定植菌。因此,确诊为细菌感染需要严格的临床综合判读,需同时满足微生物学证据及明确的感染相关临床表现,如新发或加重的发热、脓性痰、呼吸衰竭等,以及炎症指标升高、影像学出现新的或进展的浸润影、实变或空洞等感染征象,并且对抗生素治疗有明确的正向反应。研究表明,BALF 培养虽然阳性率较低且耗时,但其检测到的通常是活菌且载量较高,作为致病的证据权重可能相对更高<sup>[35-36]</sup>。临床中可将 BALF 培养作为 tNGS 阳性结果的验证手段,尤其当 tNGS 检出低载量病原体时,需通过培养确认活菌存在以避免过度诊断。

tNGS 显著提高了病原体检出率,尤其对于难培养、低载量病原体(如真菌、苛养菌)以及混合感染。本研究显示,tNGS 对真菌和细菌的检出率(85.0%、70.0%)高于传统培养(52.5%、50.0%),与 Deng 等<sup>[37]</sup>研究结果一致。此外,tNGS 可在 24~48 h 内提供检测结果,远快于传统培养(通常需数天至数周),并且不受病原体活性状态(如经抗生素/激素预处理后)或可培养性的限制,能检测更多种类的微生物。遗憾的是,tNGS 的高灵敏度易导致其将呼吸道定植菌或背景菌群误判为致病菌,其结果的解读必须结合临床表现、影像学、炎症指标和治疗反应等综合判断<sup>[38-40]</sup>。如本研究中的病例 29,虽经

tNGS 检测出细菌成分,但综合其临床症状、体征、实验室检查结果及经验性抗生素治疗效果欠佳等证据,均不支持细菌感染诊断,故考虑检出的细菌成分为呼吸道定植菌。此外,tNGS 存在检测成本较高、依赖高通量测序平台及基层医院推广受限等问题<sup>[41-43]</sup>。

综上所述,tNGS 技术可快速准确检测多种病原体,特别是难培养的真菌,对 IPFD 诊断至关重要。其快速、全面的检测能力有效弥补了传统培养周期长、灵敏度低的不足,为复杂感染的诊断提供了关键依据<sup>[37,44-45]</sup>。对老年 NSCLC 患者,尤其是住院时间长者,应特别警惕 IPFD 风险。此外,临床需联合传统培养、血清学检测及临床特征建立综合诊断体系。尽管依旧存在局限性,但随着分子生物学技术的持续进步和数据库的不断更新完善,tNGS 检测的敏感性与可靠性有望得到进一步提升。

## 参考文献:

- [1] Popat S, Mok T, Yang JC, et al. Afatinib in the treatment of EGFR mutation-positive NSCLC: a network meta-analysis[J]. *Lung Cancer*, 2014, 85(2): 230-238.
- [2] Zhang RM, Wu Y, Deng GC, et al. Value of sputum Gram stain, sputum culture, and bronchoalveolar lavage fluid Gram stain in predicting single bacterial pathogen among children with community-acquired pneumonia[J]. *BMC Pulm Med*, 2022, 22(1): 427. doi:10.1186/s12890-022-02234-1
- [3] Collins ME, Popowitch EB, Miller MB. Evaluation of a novel multiplex PCR panel compared to quantitative bacterial culture for diagnosis of lower respiratory tract infections[J]. *J Clin Microbiol*, 2020, 58(5): e02013-19. doi:10.1128/JCM.02013-19
- [4] Zhu N, Lin S, Weng X, et al. Performance of the colloidal gold immunochromatography of cryptococcal antigen on bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of pulmonary cryptococcosis[J]. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 2022, 2022: 7876030. doi:10.1155/2022/7876030
- [5] Wang D, Wang WL, Ding YJ, et al. Metagenomic next-generation sequencing successfully detects pulmonary infectious pathogens in children with hematologic malignancy [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 899028. doi:10.3389/fcimb.2022.899028
- [6] Ebinger A, Fischer S, Höper D. A theoretical and generalized approach for the assessment of the sample-specific limit of detection for clinical metagenomics[J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2020, 19: 732-742. doi:10.1016/j.csbj.2020.12.040
- [7] Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL, et al. Non-small cell lung cancer, version 3. 2022, NCCN clinical practice guidelines in oncology [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2022, 20(5): 497-530.
- [8] 世界华人医学真菌专业委员会. 侵袭性肺真菌病诊断路径专家共识(2024 版) [J]. *中华检验医学杂志*, 2025, 48(4): 459-468.  
World Society of Chinese Medical Mycology. Expert consensus on the diagnostic pathway for invasive pulmonary fungal disease (2024) [J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2025, 48(4): 459-468.
- [9] Meyer KC, Raghu G, Baughman RP, et al. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 185(9): 1004-1014.
- [10] 陶锋,李一荣,周艳梅,等. 靶向宏基因组测序技术在不明原因肺部感染病原学诊断中的价值[J]. *中国病原生物学杂志*, 2024, 19(11): 1290-1294.  
TAO Feng, LI Yirong, ZHOU Yanmei, et al. Targeted metagenomic sequencing in the diagnosis of pulmonary infection of unknown etiology [J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2024, 19(11): 1290-1294.
- [11] 颜新生,张丹,王栋,等. 疑似肺炎患者 BALF 样本应用 tNGS 技术进行病原学诊断的价值研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2023, 38(5): 12-16.  
YAN Xinseng, ZHANG Dan, WANG Dong, et al. Value of tNGS in the etiological diagnosis of BALF samples from suspected pneumonia patients [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2023, 38(5): 12-16.
- [12] 母发光,何海兰,李晶. 儿童侵袭性肺部真菌感染危险因素分析[J]. *中国当代儿科杂志*, 2014, 16(8): 779-782.  
MU Faguang, HE Hailan, LI Jing. Risk factors for invasive pulmonary fungal infection in children [J]. *Chinese Journal of Contemporary Pediatrics*, 2014, 16(8): 779-782.
- [13] Jaggi TK, Agarwal R, Tiew PY, et al. Fungal lung disease [J]. *Eur Respir J*, 2024, 64(5): 2400803. doi:10.1183/13993003.00803-2024
- [14] Li Z, Lu G, Meng GX. Pathogenic fungal infection in the lung [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1524. doi:10.3389/fimmu.2019.01524
- [15] Ianiri G, Idnurm A. Essential gene discovery in the basidiomycete *Cryptococcus neoformans* for antifungal drug target prioritization [J]. *mBio*, 2015, 6(2): e02334-14. doi:10.1128/mBio.02334-14
- [16] Bassetti M, Garnacho-Montero J, Calandra T, et al. Intensive care medicine research agenda on invasive fungal infection in critically ill patients [J]. *Intensive Care Med*, 2017, 43(9): 1225-1238.

- [17] Bajaj JS, Reddy RK, Tandon P, et al. Prediction of fungal infection development and their impact on survival using the NACSELD cohort [J]. *Am J Gastroenterol*, 2018, 113(4): 556-563.
- [18] Salazar F, Bignell E, Brown GD, et al. Pathogenesis of respiratory viral and fungal coinfections[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2022, 35(1): e0009421. doi:10.1128/CMR.00094-21
- [19] Marr KA, Platt A, Tornheim JA, et al. Aspergillosis complicating severe coronavirus disease [J]. *Emerg Infect Dis*, 2021, 27(1): 18-25.
- [20] White PL, Dhillon R, Cordey A, et al. A national strategy to diagnose coronavirus disease 2019-associated invasive fungal disease in the intensive care unit[J]. *Clin Infect Dis*, 2021, 73(7): e1634-e1644.
- [21] Patel A, Agarwal R, Rudramurthy SM, et al. Multi-center epidemiologic study of coronavirus disease-associated mucormycosis, India[J]. *Emerg Infect Dis*, 2021, 27(9): 2349-2359.
- [22] Paavai TT, Vasanthi V, Rameshkumar A, et al. Maxillary mucormycotic osteonecrosis as a manifestation of post-COVID-19 infection in non-diabetic patients; report of two cases[J]. *J Microsc Ultrastruct*, 2023, 12(2): 99-103.
- [23] Barchiesi F, Orsetti E, Mazzanti S, et al. Candidemia in the elderly: what does it change? [J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0176576. doi: 10.1371/journal.pone.0176576
- [24] Burguete SR, Maselli DJ, Fernandez JF, et al. Lung transplant infection[J]. *Respirology*, 2013, 18(1): 22-38.
- [25] Boch T, Spiess B, Cornely OA, et al. Diagnosis of invasive fungal infections in haematological patients by combined use of galactomannan, 1, 3- $\beta$ -D-glucan, Aspergillus PCR, multifungal DNA-microarray, and Aspergillus azole resistance PCRs in blood and bronchoalveolar lavage samples; results of a prospective multicentre study [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2016, 22(10): 862-868.
- [26] Linder KA, Kauffman CA, Zhou SW, et al. Performance of the (1, 3)-beta-D-glucan assay on bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis[J]. *Mycopathologia*, 2020, 185(5): 925-929.
- [27] 李晗婷, 韩小雨, 郑雨婷, 等. 肺部侵袭性曲霉菌和白色念珠菌感染的临床与 CT 表现比较[J]. *临床放射学杂志*, 2024, 43(4): 543-548.
- LI Hanting, HAN Xiaoyu, ZHENG Yuting, et al. Comparison of clinical and CT findings of invasive aspergillus and *Candida albicans* infections in the lung [J]. *Journal of Clinical Radiology*, 2024, 43(4): 543-548.
- [28] 谷兴丽, 曹明芹, 徐思成, 等. 肺侵袭性真菌感染患者临床与影像学特征对真菌病原体的提示[J]. *中华急诊医学杂志*, 2016, 25(7): 7. doi:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2016.07.016
- GU Xingli, CAO Mingqin, XU Sicheng, et al. The predictive value of clinical and radiographic features in fungal pathogen identification in immunocompromised patients with pulmonary invasive fungal infection [J]. *Chinese Journal of Emergency Medicine*, 2016, 25(7): 7. doi:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2016.07.016
- [29] Sevilha JB, Rodrigues RS, Barreto MM, et al. Infectious and non-infectious diseases causing the air crescent sign; a state-of-the-art review [J]. *Lung*, 2018, 196(1): 1-10.
- [30] Patterson TF, Thompson GR, Denning DW, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the infectious diseases society of America[J]. *Clin Infect Dis*, 2016, 63(4): e1-e60.
- [31] Kousha M, Tadi R, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical review [J]. *Eur Respir Rev*, 2011, 20(121): 156-174.
- [32] Alsayed AR, Abed A, Khader HA, et al. Molecular accounting and profiling of human respiratory microbial communities; toward precision medicine by targeting the respiratory microbiome for disease diagnosis and treatment[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 4086. doi:10.3390/ijms24044086
- [33] Yagi K, Asai N, Huffnagle GB, et al. Early-life lung and gut microbiota development and respiratory syncytial virus infection[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 877771. doi:10.3389/fimmu.2022.877771
- [34] Paglicci L, Borgo V, Lanzarone N, et al. Incidence and risk factors for respiratory tract bacterial colonization and infection in lung transplant recipients [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2021, 40(6): 1271-1282.
- [35] Vientós-Plotts AI, Ericsson AC, Rindt H, et al. Blood cultures and blood microbiota analysis as surrogates for bronchoalveolar lavage fluid analysis in dogs with bacterial pneumonia[J]. *BMC Vet Res*, 2021, 17(1): 129. doi:10.1186/s12917-021-02841-w
- [36] Zhang XQ, Lei Y, Tan XL, et al. Optimization of early antimicrobial strategies for lung transplant recipients based on metagenomic next-generation sequencing [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 839698. doi: 10.3389/fmicb.2022.839698
- [37] Deng ZF, Li CH, Wang YJ, et al. Targeted next-generation sequencing for pulmonary infection diagnosis in patients unsuitable for bronchoalveolar lavage [J]. *Front Med*, 2023, 10: 1321515. doi: 10.3389/fmed.2023.1321515
- [38] Poulsen SH, Sogaard KK, Fuursted K, et al. Evaluating

- the diagnostic accuracy and clinical utility of 16S and 18S rRNA gene targeted next-generation sequencing based on five years of clinical experience [J]. *Infect Dis*, 2023, 55(11): 767-775.
- [39] Kildow BJ, Ryan SP, Danilkowicz R, et al. Next-generation sequencing not superior to culture in periprosthetic joint infection diagnosis[J]. *Bone Joint J*, 2021, 103-B(1): 26-31.
- [40] Flurin L, Wolf MJ, Greenwood-Quaintance KE, et al. Targeted next generation sequencing for elbow periprosthetic joint infection diagnosis [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2021, 101(2): 115448. doi:10.1016/j.diag-microbio.2021.115448
- [41] Uddin MKM, Cabibbe AM, Nasrin R, et al. Targeted next-generation sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* from patient samples; lessons learned from high drug-resistant burden clinical settings in Bangladesh[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2024, 13(1): 2392656. doi:10.1080/22221751.2024.2392656
- [42] Bagratee TJ, Studholme DJ. Targeted genome sequencing for tuberculosis drug susceptibility testing in South Africa; a proposed diagnostic pipeline [J]. *Access Microbiol*, 2024, 6(2): 000740.v3. doi:10.1099/acmi.0.000740.v3
- [43] Chen QY, Yi J, Liu YW, et al. Clinical diagnostic value of targeted next-generation sequencing for infectious diseases (Review) [J]. *Mol Med Rep*, 2024, 30(3): 153. doi:10.3892/mmr.2024.13277
- [44] Murphy SG, Smith C, Lapierre P, et al. Direct detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* using targeted next generation sequencing[J]. *Front Public Health*, 2023, 11: 1206056. doi:10.3389/fpubh.2023.1206056
- [45] Zhang P, Liu BY, Zhang S, et al. Clinical application of targeted next-generation sequencing in severe pneumonia: a retrospective review [J]. *Crit Care*, 2024, 28(1): 225. doi:10.1186/s13054-024-05009-8

(编辑:相峰)

(上接第 26 页)

- [21] Rani A, Baruah R, Goyal A. Prebiotic chondroitin sulfate disaccharide isolated from chicken keel bone exhibiting anticancer potential against human colon cancer cells [J]. *Nutr Cancer*, 2019, 71(5): 825-839.
- [22] Wang Q, Li SY, Xu C, et al. A novel lonidamine derivative targeting mitochondria to eliminate cancer stem cells by blocking glutamine metabolism [J]. *Pharmacol Res*, 2023, 190: 106740. doi:10.1016/j.phrs.2023.106740
- [23] Xia P, Liu DH. Cancer stem cell markers for liver cancer and pancreatic cancer [J]. *Stem Cell Res*, 2022, 60: 102701. doi:10.1016/j.scr.2022.102701
- [24] Zarebska I, Gzil A, Durślewicz J, et al. The clinical, prognostic and therapeutic significance of liver cancer stem cells and their markers [J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2021, 45(3): 101664. doi:10.1016/j.clinre.2021.101664
- [25] Luo KP, Xu F, Yao TY, et al. TPGS and chondroitin sulfate dual-modified lipid-albumin nanosystem for targeted delivery of chemotherapeutic agent against multidrug-resistant cancer [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 183: 1270-1282. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.05.070
- [26] Moghadam NA, Bagheri F, Eslaminejad MB. Chondroitin sulfate modified chitosan nanoparticles as an efficient and targeted gene delivery vehicle to chondrocytes [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2022, 219: 112786. doi:10.1016/j.colsurfb.2022.112786
- [27] Tan TT, Yang Q, Chen D, et al. Chondroitin sulfate-mediated albumin Corona nanoparticles for the treatment of breast cancer [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2021, 16(4): 508-518.
- [28] Zhang SF, Hu WB, Yan X, et al. Chondroitin sulfate-curcumin micelle with good stability and reduction sensitivity for anti-cancer drug carrier [J]. *Mater Lett*, 2021, 304: 130667. doi:10.1016/j.matlet.2021.130667

(编辑:相峰)