

支气管肺泡灌洗液病原体检测在异基因造血干细胞移植后肺部并发症中的诊断价值

李肃 万理萍 谢国刚 包爱华 孙懿 舒文 姜杰玲 杨隽 宋献民 王椿

上海交通大学附属第一人民医院血液科 200080

通信作者:王椿, Email: wangchunshg@126.com

【摘要】 目的 评估支气管肺泡灌洗术(BAL)在异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)患者肺部并发症中的诊断价值及安全性。**方法** 采用BAL获取肺泡灌洗液(BALF)进行微生物涂片/培养、巨细胞病毒/EB病毒及结核分枝杆菌DNA检测、宏基因组新一代测序对allo-HSCT后肺部并发症进行病因学分析。**结果** 纳入73例allo-HSCT患者,男47例,女26例,中位年龄41(15~64)岁。共发生86例次肺部并发症事件,进行132例次BAL。BALF检测病因学诊断率为88.4%(76/86)。感染性肺部并发症共67例次(77.9%),包括真菌感染29例次(33.7%)、混合感染18例次(20.9%)、病毒感染11例次(12.8%)、细菌感染9例次(10.5%)。非感染性肺部并发症共9例次(10.5%),包括特发性肺炎综合征8例、淋巴瘤肺部浸润1例。另有10例次未能明确病因(11.6%)。血小板计数低于 $50 \times 10^9/L$ 的33例次BAL术中及术后均未发生严重出血,在BAL后一过性发热10例次,其中4例次血培养为葡萄球菌,抗感染治疗有效,无其他严重并发症。**结论** 对有肺部病变的allo-HSCT患者,BALF病原体检测具有较高的诊断价值,安全性良好。

【关键词】 异基因造血干细胞移植; 肺部并发症; 支气管肺泡灌洗液; 巨细胞病毒肺炎

基金项目:上海市科委西医引导项目(17411968300)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.10.005

Application of bronchoalveolar lavage fluid in patients with pulmonary complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Li Su, Wan Liping, Xie Guogang, Bao Aihua, Sun Yi, Shu Wen, Jiang Jieliang, Yang Juan, Song Xianmin, Wang Chun

Department of Hematology, Shanghai Jiao Tong University Affiliated Shanghai General Hospital, Shanghai 200080, China

Corresponding author: Wang Chun, Email: wangchunshg@126.com

【Abstract】 Objective To evaluate the diagnostic value of bronchoalveolar lavage (BAL) for pulmonary complications in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) and its safety. **Methods** Patients with pulmonary complications after allo-HSCT underwent BAL. Microbiological smears, culture, PCR of CMV-DNA, EBV-DNA and TB-DNA, macro genomes new generation sequencing (mNGS) techniques were performed to detect pathogens in BAL fluid (BALF). **Results** A total of 73 allo-HSCT patients with 86 times of pulmonary complications enrolled this prospective study. They underwent 132 times of BAL procedures. The clinical diagnoses of 88.4% cases were made based on BALF analysis. Of them, 67 cases (77.9%) had infectious pulmonary complications, including 29 cases (33.7%) of fungal infection, 18 cases (20.9%) of mixed infection, 11 cases (12.8%) of viral infection and 9 cases (10.5%) of bacterial infection. The other 9 cases (10.5%) of non-infectious pulmonary complications included 8 cases (9.3%) of idiopathic pneumonia syndrome (IPS) and 1 case (1.2%) of pulmonary infiltration of lymphoma. The diagnoses of the remaining 10 cases (11.6%) were not determined. The platelet counts of 33 patients were less than $50 \times 10^9/L$ before BAL. None of them developed severe bleeding complications during or after BAL. Transient fever occurred in 10 patients after BAL. Blood cultures showed staphylococcal bacteremia in them and anti-infection therapies were effective. No life-threatening complications occurred in all of the patients during or after BAL. **Conclusion** BALF analysis was informative for the diagnosis of pulmonary complication and safe for patients with pulmonary complications after allo-HSCT.

【Key words】 Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; Pulmonary complication; Bronchoalveolar lavage fluid; Pneumonia, cytomegalovirus

Fund Program: Shanghai Science and Technology Commission Western Medicine Guidance Project (17411968300)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.10.005

异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)是血液系统恶性肿瘤、骨髓衰竭性疾病、部分先天性免疫和代谢缺陷等疾病的有效治疗方法。肺感染是移植后死亡的主要原因^[1]。通过支气管肺泡灌洗术(BAL)气管镜获取肺部病灶的肺泡衬液,对肺泡灌洗液(BALF)分析,可明确肺部病变性质。然而,出于操作安全性和临床价值的顾虑,BAL尚未在allo-HSCT患者中得到广泛应用。本研究通过BAL获取allo-HSCT肺部并发症患者的BALF,对此进行病因学分析并评估BAL在allo-HSCT患者中的安全性。

病例与方法

1. 病例:本研究纳入在上海交通大学附属第一人民医院血液科接受支气管镜检查的allo-HSCT后肺部并发症患者。支气管镜检查指征:①新发呼吸道症状(咳嗽、咳痰、呼吸困难)且高分辨CT检查发现1个或多个肺叶存在斑片或毛玻璃影,或经验治疗后症状/影像学无改善的患者;②存在排痰困难、气道引流不畅等结构性因素的患者,利用BAL辅助排痰治疗。本研究获得我院医学伦理委员会批准,所有患者在BAL前均签署知情同意书。

2. 方法:所有患者在BAL前、后进行痰液、血液微生物及感染标志物检查,BAL按《肺部感染性疾病支气管肺泡灌洗病原体检测中国专家共识(2017年版)》^[1]进行操作,灌洗部位根据胸部CT确定,选择病灶部位灌洗或右肺中叶/左肺舌段灌洗。对BALF进行脱落细胞学、病原学涂片、抗酸染色涂片、细菌和真菌培养、PCR检测结核分枝杆菌DNA、巨细胞病毒(CMV)及EB病毒(EBV)DNA检测,部分标本采用宏基因组新一代测序技术(mNGS)进行微生物学检测。

3. 诊断标准:感染性肺部并发症定义为发热(体温 $\geq 38\text{ }^{\circ}\text{C}$)、咳嗽/咳痰、呼吸困难以及不能以非感染原因解释的新发或进行性肺部浸润病变。肺感染根据病原学结果分为细菌感染、真菌感染、病毒感染以及未明确病原体的感染,若同一患者在一次肺部事件期间同时或先后在BALF和痰液中检出

多种不同类型病原体,则判定为混合感染。深部真菌感染的诊断参照《血液病/恶性肿瘤患者侵袭性真菌病的诊断标准与治疗原则(第五次修订版)》^[14]。CMV肺炎的诊断需结合临床症状、间质性肺炎的影像学改变以及BALF CMV-DNA定量检测确定,同时排除其他病因所致间质性肺炎^[1-2]。非感染肺部并发症主要包括特发性肺炎综合征(IPS)^[3]、肿瘤浸润(BALF中检出肿瘤细胞)。

4. 随访:采用查阅病历和电话联系进行随访。

5. 统计学处理:采用SPSS22.0进行数据分析,非正态分布计量资料以中位数描述,计数资料以计数(构成比)描述,计量资料两个样本均数比较用 t 检验。双侧检验 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 一般资料:2016年3月1日至2018年9月1日,我院allo-HSCT患者共204例,其中73例患者发生86例次肺部并发症,共接受132例次BAL。初次BAL距移植中位时间为127(18~1460)d。其中,45例患者接受1次BAL,16例患者接受2次BAL,12例接受 ≥ 3 次BAL。73例患者临床资料详见表1。

2. allo-HSCT患者肺部并发症病因及BALF病原谱分析:86例次肺部并发症事件中,76例次(88.4%)获得病因学诊断,10例次(11.6%)未能明确病因。76例次(88.4%)获得病因学诊断的患者中,感染性、非感染性并发症分别为67例次(77.9%)、9例次(10.5%)。感染性并发症中,真菌感染29例次(33.7%),CMV感染11例次(12.8%),细菌感染9例次(10.5%),混合感染18例次(20.9%,真菌与细菌混合感染10例次,真菌与病毒混合感染8例次)。非感染性并发症中,IPS8例次(9.3%),淋巴瘤浸润1例次(1.2%)。

在67例次感染并发症中,BALF标本共检出有致病意义的病原体79株。真菌33株(41.8%),包括丝状真菌21株[曲霉菌15株(19%)、未分类丝状真菌6株(7.6%)]、酵母菌4株(5.1%)、耶氏肺孢子菌8株(10.1%)。检出病毒23株(29.1%),其中CMV

表1 73例因肺部并发症行支气管肺泡灌洗术allo-HSCT患者的一般资料

指标	结果
性别(例,男/女)	47/26
年龄[岁,M(范围)]	41(15~64)
原发病[例(%)]	
急性淋巴细胞白血病	24(32.9)
急性髓系白血病	22(30.1)
骨髓增生异常综合征	17(23.3)
淋巴瘤	4(5.5)
重型再生障碍性贫血	3(4.1)
慢性髓性白血病	2(2.7)
原发性骨髓纤维化	1(1.4)
供者[例(%)]	
单倍型	38(52.1)
亲缘HLA全相合	16(21.9)
非亲缘HLA全相合	10(13.7)
非亲缘HLA不全相合	9(12.3)
预处理方案[例(%)]	
清髓	58(79.4)
减低剂量	15(20.5)
GVHD预防方案[例(%)]	
含ATG	59(80.8)
不含ATG	14(19.2)

注:ATG:抗胸腺细胞球蛋白

18株(22.8%),EBV 4株(5.1%),人类腺病毒C型1株(1.3%)。检出细菌23株,其中革兰阴性杆菌21株(26.6%主要为非发酵菌,依次为铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、嗜麦芽窄食单胞菌、肺炎克雷伯菌),革兰阳性球菌2株(2.5%,均为金黄色葡萄球菌)。病原体分布详见表2。

3. allo-HSCT后肺部并发症的发生(诊断)时间:29例次真菌感染患者的中位诊断时间为移植后194(40~1460)d,其中移植后3个月内6例次(20.7%),移植后4~12个月21例次(72.4%),2例次(11.1%)发生于移植12个月后。8例次耶氏肺孢子菌肺炎的中位诊断时间为移植后173(127~220)d。18例次混合感染的中位诊断时间为移植后170(30~870)d,其中移植后3个月内5例次(29.4%),移植后4~12个月11例次(58.8%),2例次发生于移植12个月后。11例次CMV肺炎的中位诊断时间为移植后62(44~216)d,其中10例次(90.9%)发生于移植后100d内(单倍型移植8例次,非亲缘HLA不全相合移植2例次),仅1例次发生于移植后216d(非亲缘HLA全相合移植)。此

表2 67例次感染性肺部并发症患者支气管肺泡灌洗液检出病原体分布

病原体类型	株(%)
真菌	
丝状真菌	
青霉菌	6(7.6)
黄曲霉	5(6.3)
烟曲霉	1(1.3)
土曲霉	1(1.3)
禾谷镰刀霉	1(1.3)
暗色真菌属	1(1.3)
未分类	6(7.6)
酵母菌	
光滑假丝酵母菌	3(3.8)
白色假丝酵母菌	1(1.3)
耶氏肺孢子菌	8(10.1)
细菌	23(29.1)
革兰阴性杆菌	
铜绿假单胞菌	10(12.5)
鲍曼不动杆菌	3(3.8)
嗜麦芽窄食单胞菌	2(2.5)
肺炎克雷伯菌	2(2.5)
阴沟肠杆菌	1(1.3)
大肠埃希菌	1(1.3)
皮氏罗尔斯顿菌	1(1.3)
支气管炎伯德特菌	1(1.3)
革兰阳性球菌	
金黄色葡萄球菌	2(2.5)
病毒	
疱疹病毒	
巨细胞病毒	18(22.8)
EB病毒	4(5.1)
呼吸道病毒	
人类腺病毒C型	1(1.3)
合计	79(100)

外,单纯CMV肺炎的中位发生时间明显早于合并真菌感染CMV肺炎[(77.0±48.5)d对(179.6±140.3)d, $P<0.05$]。9例次细菌感染的中位发生时间为移植后180(42~730)d,在移植后各阶段均有分布。非感染性肺部并发症中,8例次IPS患者的中位发生时间是移植后231(78~373)d(移植后78d1例次,移植后4~12个月6例次,移植12个月后1例次)。

4. 生存分析:中位随访240(2~2072)d,治疗有效49例次(67.1%),另有1例霍奇金淋巴瘤患者在移植后12个月经BAL检查诊断为淋巴瘤肺部浸润,停用免疫抑制剂后带瘤生存至今已36个月。死亡23例,因肺部并发症死亡16例(21.9%,均为肺部

感染),因疾病复发死亡6例(8.2%),另有1例死因不明(在移植后4个月诊断IPS,治疗后好转,移植后6个月于家中不明原因猝死)。16例死于肺感染的患者中,混合感染6例(曲霉菌合并细菌感染4例,耶氏肺孢子菌合并腺病毒肺炎1例,CMV合并曲霉感染1例),CMV肺炎5例,细菌感染3例(2例均检出铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯菌,1例检出嗜麦芽窄食单胞菌),单纯耶氏肺孢子菌感染1例,1例移植后7个月经BALF诊断为IPS,治疗后好转,但移植后15个月因肺感染死亡,病原体不明。

5. 安全性:全部132例次BAL中,33例次(25.0%)BAL前患者血小板计数低于 $50 \times 10^9/L$,其中4例次血小板计数为 $(10 \sim 20) \times 10^9/L$,术中及术后均未发生严重出血。7例患者有严重低氧血症,转入监护室在高流量吸氧支持下行BAL,术中有一过性低氧血症加重情况发生,但恢复吸氧后迅速改善,未发生危及生命的并发症。132例次BAL中,发生BAL后发热10例次,其中4例次(3%)术后血培养阳性,分别为表皮葡萄球菌2例次,人葡萄球菌亚种2例次,均排除肺部细菌感染。

讨 论

肺部并发症是allo-HSCT后非复发死亡的重要原因之一^[4]。本研究对合并肺部病变的73例患者进行了132例次BAL,在传统的微生物镜检、培养等病原体检测基础上,增加了新近发展成熟的非培养检测方法(病毒DNA的PCR检测、mNGS等),诊断率达88.4%,未发生出血等危及生命的并发症。

BAL对肺部并发症的病因诊断有重要价值。本组病例肺部并发症以感染性病变为主(77.9%),真菌感染(33.7%)和CMV肺炎(12.7%)居前两位,其次为细菌感染(10.5%)。Kasow等^[5]报道,BAL对移植后肺部并发症的诊断率为67.9%,细菌感染占52.3%,其次是病毒感染(13.6%)和真菌感染(6.8%)。与本研究结果存在差异,考虑与本组病例中单倍型移植患者较多有关。国内外的多项研究表明,病毒和曲霉菌是allo-HSCT后肺感染的主要病原体,与移植后粒细胞缺乏、移植植物抗宿主病以及长期使用糖皮质激素等因素有关^[8]。本研究中,8例检出耶氏肺孢子菌,这些患者均因不耐受未用复方磺胺甲噁唑进行预防治疗。国外研究报道显示,耶氏肺孢子菌肺炎在未接受预防治疗allo-HSCT患者中的发生率为5%~16%^[10],也提示药物

预防的重要性。细菌感染9例次中,8例次为革兰阴性杆菌,且非发酵菌常见。Zhu等^[7]报道,非粒细胞缺乏血液病患者呼吸道分泌物中,革兰阳性球菌检出率最高,而粒细胞缺乏患者革兰阴性杆菌尤其是非发酵菌的检出率最高。这与本研究结果不一致,可能是造血干细胞移植患者多数曾经应用左氧氟沙星和碳青霉烯类等抗生素有关。

allo-HSCT后不同病因肺部并发症有不同的发生时间分布规律。CMV肺炎是allo-HSCT后最严重的并发症之一。本组病例中,CMV肺炎主要发生于移植后3个月内,HLA不全相合移植患者CMV肺炎发生率明显高于HLA全相合移植患者,且发生时间更早。Forslöv等^[4]研究显示,CMV肺炎发生于移植后3个月或更晚,与本组病例结果不同,可能与本研究中单倍型移植患者较多有关。本研究中检出4例EBV感染,其致病意义尚不明确,与Costa等^[12]报道相似。此外,我们采用mNGS技术在BALF中检出1例人类腺病毒C型感染,未检出其他社区常见的呼吸道病毒(流感病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒等),低于国外相关报道^[5-6]。可能与移植患者自我保护意识较强、社区接触人员少等有关。国外研究报道显示,耶氏肺孢子菌肺炎主要发生于移植后9周,移植后6个月内发病患者的死亡率高于移植6个月后发病患者(89%对40%)^[10]。在本研究中,耶氏肺孢子菌肺炎中位发病时间为移植后173(127~220)d,较国外文献报道的时间晚,死亡率也较低(2例),主要与早期明确诊断、早期精准治疗有关。作为非感染肺部并发症,IPS大多发生于移植后3~6个月^[15]。在本中心2015年的报道中,IPS的发生率为7%^[13]。在本研究中,IPS主要发生于移植后4~12个月,与免疫抑制剂减量和停药有关。

本研究中16例患者死于肺部并发症,均为感染性病变,主要为真菌为主的混合感染和CMV肺炎。Yu等^[11]报道耶氏肺孢子菌合并CMV感染的死亡率高达70.5%。在本研究中,有2例发生耶氏肺孢子菌合并CMV感染,但均在抗感染治疗后获得痊愈,考虑与早期明确诊断及治疗有关。

BAL的安全性倍受关注。本研究中,25.0%(33例次)BAL前患者血小板计数低于 $50 \times 10^9/L$,均未发生严重出血并发症。但在临床实践中,我们建议对 $PLT < 50 \times 10^9/L$ 的患者,尤其是 $PLT < 20 \times 10^9/L$ 的患者,在实施BAL前输注单采血小板,以降低出

血风险。BAL后有4例次发生血流感染,均为葡萄球菌,而且都不是患者肺部感染的病原体,考虑与BAL有关。此外,对伴有低氧血症的患者,BAL中密切监测并缩短操作时间,均未发生危及生命的并发症。

综上所述,本研究结果初步显示,BALF病原学检测对明确allo-HSCT后肺部并发症病因有重要价值,且安全性较高。

参考文献

- [1] 中华医学会呼吸病学分会. 肺部感染性疾病支气管肺泡灌洗病原体检测中国专家共识(2017年版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2017, 40(8): 578-583. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2017.08.007.
- [2] Ljungman P, Boeckh M, Hirsch HH, et al. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant patients for use in clinical trials[J]. Clin Infect Dis, 2017, 64(1): 87-91. DOI: 10.1093/cid/ciw668.
- [3] Cathomas G, Morris P, Pekle K, et al. Rapid diagnosis of cytomegalovirus pneumonia in marrow transplant recipients by bronchoalveolar lavage using the polymerase chain reaction, virus culture, and the direct immunostaining of alveolar cells[J]. Blood, 1993, 81(7): 1909-1914.
- [4] Forslöv U, Remberger M, Nordlander A, et al. The clinical importance of bronchoalveolar lavage in allogeneic SCT patients with pneumonia[J]. Bone Marrow Transplant, 2010, 45(5): 945-950. DOI: 10.1038/bmt.2009.268.
- [5] Kasow KA, King E, Rochester R, et al. Diagnostic yield of bronchoalveolar lavage is low in allogeneic hematopoietic stem cell recipients receiving immunosuppressive therapy or with acute graft-versus-host disease: the St. Jude experience, 1990-2002[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2007, 13(7): 831-937. DOI: 10.1016/j.bbmt.2007.03.008.
- [6] Lucena CM, Torres A, Rovira M, et al. Pulmonary complications in hematopoietic SCT: a prospective study[J]. Bone Marrow Transplant, 2014, 49(10): 1293-1299. DOI: 10.1038/bmt.2014.151.
- [7] Zhu J, Zhou K, Jiang Y, et al. Bacterial pathogens differed between neutropenic and non-neutropenic patients in the same hematological ward: an 8-year survey[J]. Clin Infect Dis, 2018, 67(suppl_2): S174-S178. DOI: 10.1093/cid/ciy643.
- [8] Liu YC, Chien SH, Fan NW, et al. Incidence and risk factors of probable and proven invasive fungal infection in adult patients receiving allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2016, 49(4): 567-574. DOI: 10.1016/j.jmii.2015.01.002.
- [9] Yong MK, Slavin MA, Kontoyannis DP. Invasive fungal disease and cytomegalovirus infection: is there an association?[J]. Curr Opin Infect Dis, 2018, 31(6): 481-489. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000502.
- [10] Cordonnier C, Alanio A, Cesaro S, et al. Pneumocystis jirovecii pneumonia: still a concern in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients- authors' response[J]. J Antimicrob Chemother, 2017, 72(4): 1266-1268. DOI: 10.1093/jac/dkw580.
- [11] Yu Q, Jia P, Su L, et al. Outcomes and prognostic factors of non-HIV patients with pneumocystis jirovecii pneumonia and pulmonary CMV co-infection: a retrospective cohort study[J]. BMC Infect Dis, 2017, 17(1): 392. DOI: 10.1186/s12879-017-2492-8.
- [12] Costa C, Elia M, Astegiano S, et al. Quantitative detection of Epstein-Barr virus in bronchoalveolar lavage from transplant and nontransplant patients[J]. Transplantation, 2008, 86(10): 1389-1394. DOI: 10.1097/TP.0b013e3181890415.
- [13] 李肃, 杨隽, 姜杰玲, 等. 5例异基因外周血造血干细胞移植术后特发性肺炎诊治体会[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2016, 36(1): 138-142. DOI: 10.3969/j.issn.1674-8115.2016.01.028.
- [14] 中国侵袭性真菌感染工作组. 血液病/恶性肿瘤患者侵袭性真菌病的诊断标准与治疗原则(第五次修订版)[J]. 中华内科杂志, 2017, 56(6): 453-459. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1426.2017.06.015.
- [15] Huisman C, van der Straaten HM, Canninga-van Dijk MR, et al. Pulmonary complications after T-cell-depleted allogeneic stem cell transplantation: low incidence and strong association with acute graft-versus-host disease[J]. Bone Marrow Transplant, 2006, 38(8): 561-566. DOI: 10.1038/sj.bmt.1705484.

(收稿日期:2019-02-28)

(本文编辑:徐茂强)