

- tution associated with thrombosis [J]. *Thromb Haemost*, 2000, 84(2): 263-270.
- [17] Koopman J, Haverkate F, Grimbergen J, et al. Abnormal fibrinogens IJmuiden (B beta Arg14----Cys) and Nijmegen (B beta Arg44----Cys) form disulfide-linked fibrinogen-albumin complexes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89(8): 3478-3482. DOI: 10.1073/pnas.89.8.3478.
- [18] Liu CY, Koehn JA, Morgan FJ. Characterization of fibrinogen New York 1. A dysfunctional fibrinogen with a deletion of B beta (9-72) corresponding exactly to exon 2 of the gene[J]. *J Biol Chem*, 1985, 260(7): 4390-4396.
- [19] Engesser L, Koopman J, de Munk G, et al. Fibrinogen Nijmegen: congenital dysfibrinogenemia associated with impaired t-PA mediated plasminogen activation and decreased binding of t-PA[J]. *Thromb Haemost*, 1988, 60(1): 113-120.
- [20] Koopman J, Haverkate F, Lord ST, et al. Molecular basis of fibrinogen Naples associated with defective thrombin binding and thrombophilia. Homozygous substitution of B beta 68 Ala----Thr [J]. *J Clin Invest*, 1992, 90 (1): 238-244. DOI: 10.1172/JCI115841.
- [21] Bentolila S, Samama MM, Conard J, et al. Association of dysfibrinogenemia and thrombosis. Apropos of a family (Fibrinogen Melun) and review of the literature[J]. *Ann Med Interne (Paris)*, 1995, 146(8): 575-580.

(收稿日期:2021-12-22)

(本文编辑:徐茂强)

宏基因组学测序技术诊断单倍体造血干细胞移植后腺病毒感染6例临床分析

吴艳璐¹ 陈峰¹ 赵晔¹ 张彦明² 曹俊杰³ 林国强² 王婷敬¹ 夏晶¹
唐晓文¹ 薛胜利¹ 金正明¹ 吴德沛¹

¹苏州大学附属第一医院血液科,江苏省血液研究所,苏州大学造血干细胞移植研究所,苏州 215006;²江苏省淮安市第二人民医院血液科,淮安 223002;³宁波大学附属人民医院血液科,宁波 315040

通信作者:陈峰, Email: 13584861215@163.com

基金项目:国家血液系统疾病临床医学研究中心转化研究课题(2020ZKMC03)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2022.10.013

A clinical analysis of adenovirus infection diagnosed by metagenomic next-generation sequencing or the diagnosis of adenovirus infection after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation clinical analysis of six cases

Wu Yanjun¹, Chen Feng¹, Zhao Ye¹, Zhang Yanming², Cao Junjie³, Lin Guoqiang², Wang Tingjing¹, Xia Jing¹, Tang Xiaowen¹, Xue Shengli¹, Jin Zhengming¹, Wu Depei¹

¹First Affiliated Hospital of Soochow University, Jiangsu Institute of Hematology, Institute of Blood and Marrow Transplantation, Soochow University, Suzhou 215006, China; ²Department of Hematology, Huai'an Second People's Hospital, Huai'an 223002, China; ³Department of Hematology, Yinzhou People's Hospital, Ningbo 315040, China

单倍体造血干细胞移植(Haplo-HSCT)近年在国内异基因移植(allo-HSCT)中已占比60%,成为最主要的移植模式^[1]。基于“北京方案”的Haplo-HSCT疗效确切,但免疫重

建延迟也相应增加了机会性感染风险。近期国内外陆续有allo-HSCT后发生腺病毒(ADV)感染的病例报道,多数缺乏早期诊断,且预后不良^[2-4]。新兴的宏基因组学测序技术

(mNGS)为免疫缺陷患者的少见、罕见病原学感染事件提供了新的诊断线索和检验效能的补充。我们对国内3个移植中心Haplo-HSCT后通过mNGS诊断的6例ADV感染患者进行了回顾性观察分析,现报道如下。

病例与方法

1. 病例:2019年1月至2021年8月,在苏州大学附属第一医院(3例)、江苏省淮安市第二人民医院(2例)、宁波大学附属人民医院(1例)接受Haplo-HSCT并通过mNGS确诊ADV感染的6例患者。急性白血病5例,再生障碍性贫血1例。白血病诊断符合WHO 2016造血和淋巴组织肿瘤分类标准,再生障碍性贫血诊断符合《再生障碍性贫血诊断与治疗中国专家共识(2017年版)》^[5]。

2. Haplo-HSCT:预处理方案:5例采用改良白消安(Bu)-环磷酰胺(Cy)方案,1例为全身照射(TBI)-Cy方案,均联合抗胸腺细胞球蛋白(ATG)。移植物来源:6例均为G-CSF动员后的供者骨髓+外周血造血干细胞,其中2例联合第三方脐血干细胞。移植物抗宿主病(GVHD)预防:钙调磷酸酶抑制剂+短程甲氨蝶呤+吗替麦考酚酯。其他相关并发症的预防均参考文献[6]方案进行。

3. mNGS检测方法:无菌留取外周血、脑脊液、尿液、肺泡灌洗液样本(至少3 ml)进行微生物mNGS检测,通过核酸提取、文库构建(末端修复、接头连接、PCR扩增、文库质量评估及文库测序池)、测序及数据的对比(NCBI微生物基因组数据库,ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/)和判读,确定检出的ADV序列数(Reads)。

4. ADV感染的判定:通过mNGS检测出的ADV序列数在3/100万及以上为可信^[7],同时患者同种样本的ADV-PCR复检结果为阳性^[8]。

5. 随访:观察起点:患者首次诊断ADV感染。观察终点:患者ADV感染期间死亡或者连续两次检测结果提示ADV DNA转阴。患者临床资料均来自住院记录。

结 果

6例Haplo-HSCT后ADV感染患者的主要临床资料见表1。男4例,女2例。ADV感染的危险因素包括6例患者均为Haplo-HSCT且预处理方案中包含ATG;3例患者有前驱激素耐药(SR)GVHD史,并接受CD25单抗、芦可替尼等二线治疗;2例患者外周血CD3⁺T细胞计数<300个/μl;5例患者合并其他病原体感染,包括巨细胞病毒(CMV)、EB病毒(EBV)、尿多瘤病毒(BKV)等。4例患者诊断ADV血症前持续发热,影像学、常规检验无明显异常,经验性抗感染治疗无效。3例ADV脑炎患者确诊前均有突发的中枢神经系统表现,脑脊液常规检查均无明显异常。2例ADV肝炎患者,表现为肝功能急剧恶化,鉴别诊断困难,常规治疗无效。5例患者接受西多福韦(CDV)抗病毒治疗,4例接受静脉丙种免疫球蛋白(IVIg)治疗,1例接受CDV、IVIg、胸腺肽、低剂量的供者淋巴细胞输注(DLI)等治疗。截至随访终点,

1例患者ADV DNA转为阴性,感染表现好转,但死于原发病复发;余5例均在ADV感染期间死亡。

讨 论

allo-HSCT患者发生病毒感染(活化或疾病),不限于最常见的CMV、EBV等人类疱疹病毒属(HHV)病毒,已报道可感染超过20余种病毒(包括RNA病毒)^[9]。ATG、抗B细胞/T细胞单抗、CD3-CD19双特异性抗体、嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞)及治疗中某些高效免疫抑制剂(如芦可替尼等)的应用,一定程度上会增加allo-HSCT患者病毒感染风险。除CMV、EBV外,目前国内多数移植中心尚未开展其他病毒的常规监测。近年我中心通过mNGS技术,结合其他检验及临床特征,确诊数例Haplo-HSCT后ADV感染病例,汇同另两家中心病例,进行多中心、回顾性观察分析。这也是迄今国内HSCT后ADV感染最大病例数的临床报道。

mNGS是一种基于二代高通量测序平台,快速获取检测样本中的核酸序列(DNA及RNA),经与数据库比对,从而获取样本中微生物种属水平的种类和比例的检测技术。自2014年Wilson等^[10]首次报道了通过mNGS确诊钩端螺旋体脑炎1例,mNGS逐渐广泛应用于临床。近期我中心对149例allo-HSCT后疑诊感染者,对比分析mNGS与传统微生物学检验,显示前者可显著提高allo-HSCT后疑难感染的检验效能^[11]。本研究中6例ADV确诊病例,前驱表现为不明原因的持续发热、急性肝损伤、肺炎、中枢神经系统异常等,常规检验无法明确病因,经验性治疗无效,经mNGS检测结合临床表现而最终确诊。

ADV是一种双链DNA病毒,可通过飞沫、粪-口以及血液传播,多致儿童急性呼吸道感染。但近年发现allo-HSCT等免疫低下人群可发生ADV感染。2019年Takamastu等^[3]个案报道1例脐血移植后患者发生ADV播散性感染(血液、颅内),最终死于多器官衰竭;该作者荟萃分析了26篇报道,共130例ADV感染病例,显示ADV可导致呼吸道及肺部感染、消化道感染/出血性肠炎、肝炎、膀胱炎、视网膜炎、脑膜炎等,病死率可达72%。国内孙于谦等^[2]报道3例allo-HSCT后ADV感染,表现为ADV血症(PCR检测),其中1例合并ADV肠炎,3例均为Haplo-HSCT且合并GVHD。本研究中ADV的感染表现为:ADV血症、肝炎、脑炎、膀胱炎、肺炎。ADV可分为A~G共7型,其中ADV肺炎主要与ADV-B、C、E型感染有关,肝炎主要与C型有关,出血性膀胱炎与B型有关,肠炎与A、F型有关,结膜炎与B、D型有关等^[12]。本研究中4例ADV-C型感染,ADV-B及D型各1例,其中以C型发生系统性感染多见,预后更差,这与文献^[13]报道一致。

已报道的allo-HSCT后感染ADV危险因素有:无关供者移植或脐血移植、移植物去除T细胞、Ⅲ~Ⅳ度GVHD、外周血低淋巴细胞数(CD3⁺T细胞<300个/μl)、应用ATG或抗CD25单抗等^[14]。本研究中病例均具备至少2项上述危险因素。Sánchez-Céspedes等^[15]曾报道61.1%(58/95)的

表1 6例宏基因组学测序技术诊断单倍体造血干细胞移植后腺病毒(ADV)感染患者的临床特征、ADV感染情况与转归

例号	性别	年龄(岁)	基础疾病	干细胞来源	危险因素				合并感染
					Ⅲ~Ⅳ度GVHD	应用CD25单抗/ATG	是否去T细胞	CD3 ⁺ 细胞<300个/ μ l	
1	男	23	AML伴髓外浸润	骨髓+外周血	无	ATG	否	否	BKV、EBV(治疗后均转阴)
2	男	31	ETP-ALL	骨髓+外周血	无	ATG	否	是	结核分枝杆菌、EBV、CMV(治疗后均转阴)
3	女	17	AML	骨髓+外周血+第三方脐血	无	ATG	否	是	CMV(治疗后转阴)
4	男	49	Ph ⁺ ALL	骨髓+外周血	皮肤、肠道	ATG+CD25单抗	否	否	无
5	男	27	AML	骨髓+外周血	皮肤、肠道	ATG+CD25单抗	否	是	CMV、肺炎克雷伯杆菌(治疗后均转阴)
6	女	13	SAA	骨髓+外周血+第三方脐血	皮肤、肠道	ATG+CD25单抗	否	是	CMV(反复感染)、BKV(治疗后转阴)

例号	前驱表现	经验性治疗	ADV样本	影像学	诊断	诊断距移植时间	治疗	转归	确诊ADV感染至死亡时间
1	持续发热、血尿	经验性抗感染无效	外周血、尿ADV-B	CT:肾实质密度略高,伴左肾周渗出性改变	ADV尿道炎、ADV血症	99 d	CDV	ADV转阴,死于肿瘤复发	346 d
2	肝功能急剧恶化,凝血功能异常	保肝治疗无效	外周血ADV-C	腹部CT未见明显异常	ADV血症、ADV肝炎不除外	6个月	IVIg	ADV感染期间死亡	确诊当天死亡
3	癫痫、肝损伤、血便、发热	经验性抗感染及保肝治疗无效	外周血、脑脊液ADV-C	MRI:大脑及小脑多发异常信号	ADV血症、ADV脑炎、ADV肝炎不除外	108 d	CDV、IVIg、胸腺肽、DLI	ADV感染期间死亡	69 d
4	突发意识障碍	停CNI、血浆置换	脑脊液ADV-D	头颅MRI未见明显异常	ADV脑炎	78 d	CDV	ADV感染期间死亡	4 d
5	反复肺部感染,突发意识障碍	经验性抗感染无效	肺泡灌洗液ADV-C、脑脊液ADV-D	MRI:双侧海马及颞叶异常信号	ADV肺炎、ADV脑炎	25个月	CDV、IVIg	ADV感染期间死亡	21 d
6	反复发热	经验性抗感染无效	外周血ADV-C	MRI:颅内多发低密度灶;CT:双肺感染	ADV血症	80 d	CDV、IVIg	ADV感染期间死亡	153 d

注:AML:急性髓系白血病;ETP-ALL:早期前体急性T淋巴细胞白血病;SAA:重型再生障碍性贫血;GVHD:移植物抗宿主病;ATG:抗胸腺细胞球蛋白;BKV:尿多瘤病毒;EBV:EB病毒;CMV:巨细胞病毒;CNI:钙调磷酸酶抑制剂;CDV:西多福韦;IVIg:静脉注射免疫球蛋白;DLI:供者淋巴细胞输注

allo-HSCT患者出现过短暂或持续的ADV血症,虽然部分患者未经干预,自行清除病毒,但结合国内现状,我们建议Haplo-HSCT患者作为ADV感染高危人群,有条件的单位可每周1次进行外周血ADV qPCR检测,评估抢先治疗时机,这也与欧洲白血病感染会议(ECIL)指南^[7]较一致。此外儿童HSCT后ADV感染,病毒多经肠道活化,因此也有推荐基于粪便ADV的qPCR定期筛查结果进行抢先治疗^[16]。有文献显示患者粪便ADV DNA高于 10^6 拷贝数/g至出现ADV血

症的中位时间为11 d^[17]。

目前ADV感染的治疗包括尽快减停免疫抑制剂、抗病毒药物、免疫治疗、支持治疗等。CDV多被视为一线抗病毒药物,对各型ADV均有效。推荐剂量5 mg/kg,每周1次,连续2周ADV载量检测均阴性,可停用。Brincidofovir为CDV口服脂质体,有较高的抗病毒活性和较低肾毒性,可用于肾功异常或CDV疗效不佳患者。利巴韦林对ADV-C型部分有效,可与CDV联用。免疫治疗主要为DLI(多为低剂量)、

ADV 特异性细胞毒性 T 细胞输注等,用于药物疗效不佳者。此外,胸腺肽、IVIg、IL-7 等药物也可应用。本研究中有 5 例接受 CDV 治疗,1 例 ADV 载量转阴,临床好转,但除此例原发病复发死亡外,其余 5 例均对治疗无效,包括联合 IVIg、胸腺肽、DLI 等,均死于 ADV 感染,这也与文献显示的 ADV 感染高病死率一致^[18]。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 吴艳珺:实施研究、分析/统计/解释数据、撰写文章;陈峰:设计研究、审阅文章;赵晔:协助起草文章;张彦明、曹俊杰、林国强、王婷敬、夏晶:收集数据;唐晓文、薛胜利、金正明、吴德沛:协助审阅文章

参 考 文 献

- [1] Lv M, Chang Y, Huang X. Everyone has a donor: contribution of the Chinese experience to global practice of haploidentical hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Front Med*, 2019, 13 (1):45-56. DOI: 10.1007/s11684-017-0595-7.
- [2] 孙于谦, 黄晓军, 韩婷婷, 等. 异基因造血干细胞移植术后腺病毒病毒感染三例临床分析 [J]. *中华血液学杂志*, 2015, 36(2):161-162. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.02.017.
- [3] Takamatsu A, Tagashira Y, Hasegawa S, et al. Disseminated adenovirus infection in a patient with a hematologic malignancy: a case report and literature review [J]. *Future Sci OA*, 2019, 5(8):FSO412. DOI: 10.2144/fsoa-2019-0072.
- [4] Kim NJ, Hyun TS, Pergam SA, et al. Disseminated adenovirus infection after autologous stem cell transplant [J]. *Transpl Infect Dis*, 2020, 22(1):e13238. DOI: 10.1111/tid.13238.
- [5] 中华医学会血液学分会红细胞疾病(贫血)学组. 再生障碍性贫血诊断与治疗中国专家共识(2017年版) [J]. *中华血液学杂志*, 2017, 38 (1): 1- 5. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253- 2727. 2017.01.001.
- [6] 陈峰, 吴德沛, 唐晓文, 等. 异基因造血干细胞移植治疗 18 例阵发性睡眠性血红蛋白尿症疗效分析 [J]. *中华血液学杂志*, 2015, 36 (12):1005- 1010. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253- 2727.2015.12.005.
- [7] 宏基因组测序技术在中重症感染中的临床应用共识专家组, 中国研究型医院学会脓毒症与休克专业委员会, 中国微生物学会微生物毒素专业委员会, 等. 宏基因组测序技术在中重症感染中的临床应用专家共识(第一版) [J]. *中华危重病急救医学*, 2020, 32 (5):531- 536. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430- 20200228-00095.
- [8] Matthes-Martin S, Feuchtinger T, Shaw PJ, et al. European guidelines for diagnosis and treatment of adenovirus infection in leukemia and stem cell transplantation: summary of ECIL-4 (2011) [J]. *Transpl Infect Dis*, 2012, 14 (6):555- 563. DOI: 10.1111/tid.12022.
- [9] Lion T. Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2014, 27 (3): 441-462. DOI: 10.1128/CMR.00116-13.
- [10] Wilson MR, Naccache SN, Samayoa E, et al. Actionable diagnosis of neuroleptospirosis by next-generation sequencing [J]. *N Engl J Med*, 2014, 370 (25):2408- 2417. DOI: 10.1056/NEJ-Moa1401268.
- [11] Wu Y, Zhao Y, Wang T, et al. Evaluation of diagnostic performance of metagenomic next-generation sequencing when applied in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplant [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2021, 56 (11):2860- 2861. DOI: 10.1038/s41409-021-01423-6.
- [12] Ramsay ID, Attwood C, Irish D, et al. Disseminated adenovirus infection after allogeneic stem cell transplant and the potential role of brincidofovir - Case series and 10 year experience of management in an adult transplant cohort [J]. *J Clin Virol*, 2017, 96:73-79. DOI: 10.1016/j.jcv.2017.09.013.
- [13] Lion T. Adenovirus persistence, reactivation, and clinical management [J]. *FEBS Lett*, 2019, 593 (24):3571- 3582. DOI: 10.1002/1873-3468.13576.
- [14] Hiwarkar P, Kosulin K, Cesaro S, et al. Management of adenovirus infection in patients after haematopoietic stem cell transplantation: State-of-the-art and real-life current approach: A position statement on behalf of the Infectious Diseases Working Party of the European Society of Blood and Marrow Transplantation [J]. *Rev Med Virol*, 2018, 28(3):e1980. DOI: 10.1002/rmv.1980.
- [15] Sánchez-Céspedes J, Marrugal-Lorenzo JA, Martín-Gandul C, et al. T-cells immune response controls the high incidence of adenovirus infection in adult allogeneic hematopoietic transplantation recipients [J]. *Haematologica*, 2021, 106(1):275-278. DOI: 10.3324/haematol.2019.240101.
- [16] Redli PM, Wanzenried A, Huder JB, et al. Evaluation of the RIDA®GENE RT-PCR assays for detection of sapovirus, astrovirus, adenovirus, and rotavirus in stool samples of adults in Switzerland [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2020, 96 (2): 114924. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2019.114924.
- [17] Lion T, Kosulin K, Landlinger C, et al. Monitoring of adenovirus load in stool by real-time PCR permits early detection of impending invasive infection in patients after allogeneic stem cell transplantation [J]. *Leukemia*, 2010, 24 (4):706- 714. DOI: 10.1038/leu.2010.4.
- [18] Gu J, Su QQ, Zuo TT, et al. Adenovirus diseases: a systematic review and meta-analysis of 228 case reports [J]. *Infection*, 2021, 49(1):1-13. DOI: 10.1007/s15010-020-01484-7.

(收稿日期:2021-11-16)

(本文编辑:刘爽)