

本文引用:韩李周,靳妍玉.支气管肺泡灌洗液宏基因组学二代测序对侵袭性肺真菌病的诊断价值[J].新乡医学院学报,2022,39(9):871-873,877. DOI:10.7683/xyxyxb.2022.09.015.

### 【临床研究】

# 支气管肺泡灌洗液宏基因组学二代测序对侵袭性肺真菌病的诊断价值

韩李周，靳妍玉

(焦作市人民医院呼吸与危重症医学科,河南 焦作 454002)

**摘要:** **目的** 探讨支气管肺泡灌洗液(BALF)宏基因组学二代测序(mNGS)对侵袭性肺真菌病(IPFD)的诊断价值。**方法** 选择焦作市人民医院2020年5月至2022年5月收治的23例IPFD患者为研究对象。患者均行BALF真菌涂片镜检与培养(传统检测)和mNGS检测,比较BALF传统检测与BALF mNGS检测的阳性率。**结果** BALF传统检测阳性率为30.43%(7/23),BALF mNGS检测阳性率为95.65%(22/23);mNGS检测的阳性率显著高于传统检测( $\chi^2=20.538, P<0.05$ )。**结论** BALF mNGS检测诊断IPFD的敏感性高于传统检测。

**关键词:** 支气管肺泡灌洗液;宏基因组学二代测序;侵袭性肺真菌病

中图分类号: R446 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2022)09-0871-04

# Diagnostic value of metagenomics next-generation sequencing of bronchoalveolar lavage fluid in invasive pulmonary fungal diseases

HAN Lizhou, JIN Yanyu

(Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, Jiaozuo People's Hospital, Jiaozuo 454002, Henan Province, China)

**Abstract: Objective** To investigate the diagnostic value of metagenomics next-generation sequencing (mNGS) of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in invasive pulmonary fungal diseases (IPFD). **Methods** A total of 23 patients with IPFD admitted to Jiaozuo People's Hospital from May 2020 to May 2022 were selected as the research objects. All patients underwent BALF fungal smear microscopy and culture (traditional detection) and mNGS detection. The positive rates of BALF traditional detection and BALF mNGS detection were compared. **Results** The positive rate of BALF traditional detection and mNGS detection in IPFD was 30.43% (7/23), 95.65% (22/23), respectively; the positive rate of BALF mNGS detection was significantly higher than that of BALF traditional detection ( $\chi^2 = 20.538, P < 0.05$ ). **Conclusion** The sensitivity of BALF mNGS detection is higher than that of the BALF traditional detection in diagnosis of IPFD.

**Key words:** bronchoalveolar lavage fluid; metagenomics next-generation sequencing; invasive pulmonary fungal disease

近年来,随着造血干细胞移植、放化疗、器官移植、免疫抑制剂和糖皮质激素的应用,慢性结构性肺病患者和免疫缺陷人群的增多,以及人口老龄化,使侵袭性肺真菌病(invasive pulmonary fungal diseases, IPFD)发病率呈上升趋势<sup>[1]</sup>。由于 IPFD 临床表现缺乏特异性,导致早期诊断较困难。此类疾病进展迅速、预后差,以侵袭性肺曲霉病(invasive pulmonary aspergillosis, IPA)为代表的 IPFD 病死率可达 50% ~ 100%<sup>[2]</sup>。为尽早救治、改善预后,临床采取分层诊治的策略,分为拟诊、临床诊断和确诊,对应经验性治疗、先发治疗和靶向治疗。拟诊需满足真菌感染的危险因素和临床特征,临床诊断除前 2 项外还需要微生物学证据,确诊必需有组织病理学证据<sup>[3]</sup>。而 IPFD

患者常因病情危重无法取得组织病理学证据,有时甚至无微生物学证据,给临床诊治带来挑战。宏基因组学二代测序(metagenomics next-generation sequencing, mNGS)技术的应用为 IPFD 的诊断打开了突破口。该技术不依赖样本镜检和微生物培养,允许无差别检测样本中所有微生物的核酸信息,具有高通量和迅速报告结果的优势,有望改变 IPFD 的传统诊断模式。本研究回顾性分析焦作市人民医院呼吸与危重症医学科采用支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF) mNGS 检测诊治的 IPFD 患者的临床资料,探讨 mNGS 检测的诊断价值,现将结果报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择 2020 年 5 月至 2022 年 5 月焦作市人民医院呼吸与危重症医学科收治的 23 例 IPFD 患者为研究对象。病例纳入标准:(1)符合 IPFD 诊断标准<sup>[3]</sup>,达到临床诊断或确诊标准;(2)

DOI:10.7683/xxvxxxb.2022.09.015

收稿日期:2022-06-04

作者简介:韩李周(1982-),男,河南济源人,硕士,副主任医师,研究方向:呼吸系统感染性疾病。

接受支气管镜检查及 BALF 的传统微生物学和 mNGS 检测。排除标准:(1)年龄 < 18 岁;(2)孕产妇;(3)伴有严重心肺功能不全、不稳定心绞痛、高血压危象、急性脑血管病等不能耐受支气管镜检查者;(4)血小板计数 <  $20 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$  者。23 例患者中男 15 例,女 8 例;年龄 24 ~ 87 岁,中位年龄 67 岁;有 2 种以上基础疾病者 15 例,1 种基础疾病者 7 例,无基础疾病者 1 例(有潮湿发霉环境工作史)。

1.2 病原菌检测方法

1.2.1 BALF 留取方法 BALF 的留取参照《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)》<sup>[4]</sup> 进行操作。由临床医生在常规电子支气管镜检查气道后,防污染采样刷检查前,取 60 ~ 120 mL 无菌生理盐水灌洗目标肺段或亚段,取第 2 瓶灌洗液送检 mNGS,其余灌洗液进行传统检测。

1.2.2 BALF 传统检测 包括 BALF 真菌涂片显微镜检查与培养。BALF 离心,将沉淀物涂片进行显微镜检查。低倍镜下鳞状上皮细胞占全部细胞(不包括红细胞)的比例 < 1%,柱状上皮细胞占全部细胞的比例 < 5% 判定为合格标本。革兰染色、抗酸染色、六胺银染色等处理后行显微镜检查。取 100  $\mu\text{L}$  沉淀物混匀后接种于沙堡弱琼脂培养基培养。涂片镜检与培养结果一致判定为阳性结果。

1.2.3 BALF mNGS 检测 将 BALF 送微远基因公司检测,分为样本处理、高通量基因测序、生物信息分析、报告解读等流程。取 600  $\mu\text{L}$  肺泡灌洗液(黏稠的样本加入酶液化液进行液化),使用预设的破壁仪程序进行破壁处理,然后吸取 300  $\mu\text{L}$ ,使用微量样品基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取 DNA,严格按照试剂盒说明书进行操作。提取的 DNA 经转座酶建文库给待测核酸加上标签序列,制备好的文库经过纯化、扩增、再纯化后,使用 Qsep1 和 Qubit 分别对文库片段大小和文库浓度进行定量。然后依据预设的上机数据量将文库进行定量混合后,使用美国 illumina 公司的 Nextseq 550Dx 基因测序仪进行测序。去除低质量以及长度小于 40 bp 的序列后获得高质量的数据。通过 Burrows-Wheeler-Alignment (BWA; <http://bio-bwa.sourceforge.net/>) 软件将获得的高质量数据与人参考基因序列(hg38)进行比对,去除高质量数据中的人源序列。剩余的非人源序列在去除低复杂度序列后与专用的微生物大数据库比对,并将比对后的数据按照病毒、细菌、真菌和寄生虫等进行分类和排列。序列数 3 条以上者为阳性结果。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,2 种检测方法阳性率比较采用  $\chi^2$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

BALF 传统检测检出烟曲霉 1 例,白色念珠菌 5 例,热带念珠菌 1 例,检测阳性率为 30.43% (7/23)。BALF mNGS 检出耶氏肺孢子菌 4 例,耶氏肺孢子菌 + 白色念珠菌 3 例,耶氏肺孢子菌 + 烟曲霉 1 例,耶氏肺孢子菌 + 热带念珠菌 + 白色念珠菌 1 例,烟曲霉 + 黄曲霉 2 例,黑曲霉 1 例,烟曲霉 + 热带念珠菌 + 白色念珠菌 1 例,白色念珠菌 6 例,光滑念珠菌 1 例,新生隐球菌 2 例,检测阳性率为 95.65% (22/23)。另外,9 例患者合并细菌感染,1 例患者合并结核分枝杆菌感染。mNGS 检测的阳性率显著高于传统检测,差异有统计学意义( $\chi^2 = 20.538$ ,  $P < 0.05$ );见表 1。

表 1 23 例侵袭性肺真菌病患者 BALF 病原学检测结果  
Tab.1 Pathogenic detection results of BALF in 23 patients with IPFD

病原体	传统检测( $n = 23$ )	mNGS 检测( $n = 23$ )
耶氏肺孢子菌	0	9
曲霉菌		
烟曲霉	1	4
黄曲霉	0	2
黑曲霉	0	1
念珠菌		
白色念珠菌	5	11
热带念珠菌	1	2
光滑念珠菌	0	1
新生隐球菌	0	2
毛霉菌	0	0

注:混合感染时以菌种分别计算。

3 讨论

IPFD 的诊断是临床难点,痰或 BALF 涂片与培养、G 试验和半乳甘露聚(galactomannan, GM) 试验是临床常用的手段。痰或 BALF 培养的阳性率较低且耗时较长,特殊病理染色(六胺银染色、过碘酸-雪夫液染色、革兰染色等)能够提高诊断率<sup>[5]</sup>,但受限于检测人员的诊断水平。G 试验诊断 IPA、侵袭性念珠菌病、肺孢子菌肺炎的敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值各不相同,且引起假阳性的影响因素众多<sup>[6]</sup>。血清 GM 试验主要用于 IPA 的诊断,在非粒细胞缺乏患者并发 IPA 中的诊断敏感度较低,阴性预测值较高,联合 BALF GM 试验可提高诊断效能<sup>[7-8]</sup>,在马尔尼菲青霉菌病的诊断中也具有较大价值<sup>[9]</sup>。隐球菌无细胞壁,无法通过 G 试验检测细胞壁上的 1-3- $\beta$ -D-葡聚糖抗原,常依赖组织病理学或隐球菌荚膜抗原检测<sup>[10]</sup>。毛霉菌是一种接合菌,细胞壁不含 1-3- $\beta$ -D-葡聚糖,毛霉菌病的诊断主要依赖组织病理学,镜检常见透明宽大菌丝,少隔或无隔,呈直角或不规则分支<sup>[11]</sup>,与曲霉有不同的镜下

特征。在现行的诊治策略中 G 试验与 GM 试验均不能代替微生物学或组织病理学依据。IPFD 常见于免疫力受损患者,就诊时多已存在呼吸功能不全,采用经皮肺穿刺、气管镜活检或开胸肺活检等侵入性方法取组织病理标本的风险往往较大,因此确诊困难。北京协和医院 4.5 a 诊断的 152 例 IPFD 者中仅 38 例(25%)取得组织病理学证据<sup>[12]</sup>。因此,临床亟待新的诊断方法。

气管镜肺泡灌洗术与活检相比,操作快、风险低。病原宏基因组学是一种新的不依赖于培养的广泛分析临床样本中微生物组的高通量测序方法<sup>[13]</sup>。本研究留取 BALF 进行传统检测与 mNGS 检测,结果发现,传统检测对念珠菌最敏感,曲霉菌次之,而 mNGS 对二者均较敏感。耶氏肺孢子菌难以通过培养诊断,常依赖 BALF 六胺银染色等检验技术<sup>[14]</sup>,虽常规送检 BALF 六胺银染色,但本组 9 例耶氏肺孢子菌肺炎均通过 mNGS 诊断。XIE 等<sup>[15]</sup>报道的 7 例肾移植术后耶氏肺孢子菌肺炎全部通过 BALF 或血液 mNGS 检测发现其序列确诊,提示该方法在耶氏肺孢子菌肺炎的诊断中较敏感。以往认为耶氏肺孢子菌肺炎常见于艾滋病患者,本组 9 例中仅 1 例证实为艾滋病患者,8 例为风湿性多肌痛、系统性红斑狼疮、免疫性血小板减少症等长期应用糖皮质激素的患者,提示这类免疫受损患者中耶氏肺孢子菌肺炎发生率并不低,传统检查漏诊率较高。2 例肺隐球菌病经 mNGS 确诊,避免了穿刺活检,亦有文献报道通过相同的方法确诊肺隐球菌病<sup>[16]</sup>。1 例 24 岁急性淋巴细胞白血病患者合并肺毛霉菌病最终依赖 CT 引导经皮肺穿刺活检确诊。但由于肺隐球菌病和肺毛霉菌病的发病率低、病例数较少,尚无法评估 mNGS 对其的诊断价值。

BALF mNGS 的应用也受到一些因素的影响。首先是 BALF 的留取,气管镜检查前清洁患者鼻腔与口腔,气管镜检查时应尽量减少皮肤、鼻腔、上呼吸道菌群的污染,大气道抽吸物弃去或留作他用,气管镜嵌入目标肺段取第 2 瓶灌洗液送检等<sup>[4]</sup>。这些细节均可能影响检测结果。由于 mNGS 能无差别地检测样本中的微生物,要求在实验室检验阶段即能对人体皮肤、口腔或上呼吸道微生物生态菌群建库比对。另外,结核或某些真菌为胞内菌或有夹膜或细胞壁较厚,核酸提取技术就显得尤为重要<sup>[17]</sup>,不同检验公司的提取技术可能有差别。需要指出的是,因为结核或某些真菌核酸提取难度大,检出较少的序列数也需引起重视。

由于 mNGS 检测无法区分病原微生物定植与感染,IPED 的确诊仍需要结合临床,尤其是白色念珠菌感染的诊断,因为其是上呼吸道或口腔常见的定植菌,需综合考虑患者是否有真菌感染的危险因素(主要是免疫状况)、CT 影像特征以及 G 试验、GM

试验等检验结果。肺部恶性肿瘤患者下呼吸道可有曲霉和念珠菌的定植,而其他真菌少有定植<sup>[18]</sup>。除需要考虑上述因素协诊外,笔者认为也可以通过 DNA 与 RNA 检测流程的相互对照、分析检出序列数多少和相对丰度等协助判读。

综上所述,BALF mNGS 检测为 IPFD 的诊断提供了新的快速高效的检验方法,尤其是耶氏肺孢子菌、曲霉和念珠菌肺炎,对肺隐球菌病和毛霉菌病的诊断尚需要大样本研究证实。该方法至少在“临床诊断”要求的“微生物学证据”层面具有高敏感性的优势,但能否完全等同于传统的“微生物学证据”,甚至代替“组织病理学证据”,目前尚无定论。此外,真菌、细菌混合感染或不同种类真菌混合感染比较常见,传统微生物学检查漏诊较多。总之,该技术的应用正在改变临床实践。

参考文献:

[1] PFALLER M A, PAPPAS P G, WINGARD J R. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends [J]. *Clin Infect Dis*, 2006, 43 (Suppl 1): S3-S14.

[2] 王蔚, 周恩, 赵灵, 等. 侵袭性肺曲霉菌感染诊治进展 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2011, 10 (5): 500-504.  
WANG W, ZHOU Y, ZHAO L, et al. Advances in diagnosis and treatment of invasive pulmonary *Aspergillus* infection [J]. *Chin J Respir Crit Care Med*, 2011, 10 (5): 500-504.

[3] 中华医学会呼吸病学分会感染学组. 肺真菌病诊断和治疗专家共识 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2007, 30 (11): 821-834.  
INFECTION GROUP, CHINESE THORACIC SOCIETY. Experts' common understanding of the diagnosis and treatment of pneumo-mycosis [J]. *Chin J Tuberc Respir Dis*, 2007, 30 (11): 821-834.

[4] 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.  
CHINESE THORACIC SOCIETY. Chinese expert consensus on pathogen detection in bronchoalveolar lavage of pulmonary infectious diseases (2017 edition) [J]. *Chin J Tuberc Respir Dis*, 2017, 40 (8): 578-583.

[5] 赵瑾, 李梦诗, 付琳, 等. 肺泡灌洗液中肺部真菌的鉴定及诊断价值评估 [J]. 中国临床医生杂志, 2021, 49 (4): 436-439.  
ZHAO J, LI M S, FU L, et al. Identification and diagnostic value of pulmonary fungi in alveolar lavage fluid [J]. *Chin J Clin*, 2021, 49 (4): 436-439.

[6] PERSAT F, RANQUE S, DEROUIN F, et al. Contribution of the (1,3)- $\beta$ -D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections [J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46 (3): 1009-1013.

[7] 林鹏程, 赖茜茜, 周颖, 等. 半乳糖甘露聚糖试验对非粒细胞缺乏患者侵袭性肺曲霉病的诊断价值 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2016, 39 (12): 929-933.  
LIN P C, LAI Q Q, ZHOU Y, et al. The diagnostic value of galactomannan detection of invasive pulmonary aspergillosis in non-neutropenic hosts [J]. *Chin J Tuberc Respir Dis*, 2016, 39 (12): 929-933.

[8] WU Z, WANG L, TAN L, et al. Diagnostic value of galactomannan in serum and bronchoalveolar lavage fluid for invasive pulmonary aspergillosis in non-neutropenic patients [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2021, 99 (4): 115274.

*BMC Health Serv Res*,2019,19(1):843-850.

[8] JEONG S,BARRETT T,OHR S O,*et al.* Study protocol to investigate the efficacy of normalisation of advance care planning (ACP) for people with chronic diseases in acute and community settings;a quasi-experimental design [J]. *BMC Health Serv Res*, 2019, 19(1):286-295.

[9] KAPP S,SANTAMARIA N. The financial and quality-of-life cost to patients living with a chronic wound in the community[J]. *Int Wound J*,2017,14(6):1108-1119.

[10] 周秀华,黄会英,程艮,等.北京市城乡结合地区老年人健康状况及居家护理服务需求调查[J].中华现代护理杂志,2021,27(9):1142-1146.

[11] ZHOU X H,HUANG H Y,CHENG G,*et al.* Health status and home care service demand of elderly people in urban-rural joint areas in Beijing[J]. *Chin J Mod Nurs*,2021,27(9):1142-1146.

[12] CAMPBELL D J,MANNS B J,WEAVER R G,*et al.* Financial barriers and adverse clinical outcomes among patients with cardiovascular-related chronic diseases;a cohort study[J]. *BMC Med*, 2017,15(1):33-45.

[13] 李正禹,武继磊,李佳佳,等.慢性病对中国65岁及以上老年人日常活动能力影响的队列研究[J].中华流行病学杂志,2019,40(1):33-40.

[14] LI Z Y,WU J L,LI J J,*et al.* A cohort study on the influence of the chronic diseases on activities of daily living of the elderly aged 65 years and over in China[J]. *Chin J Epidemiol*,2019,40(1):33-40.

[15] COHEN-STAVI C J,GIVEON S,KEY C,*et al.* Guideline deviation and its association with specific chronic diseases among patients with multimorbidity;a cross-sectional cohort study in a care management setting[J]. *BMJ Open*,2021,11(1):e040961.

[16] 程杨杨,曹志,侯洁,等.中国中老年人慢性现状调查与共病关联分析[J].中华疾病控制杂志,2019,23(6):625-629.

[17] CHENG Y Y,CAO Z,HOU J,*et al.* Investigation and association analysis of multimorbidity in middle-aged and elderly population in China[J]. *Chin J Dis Contr Prev*,2019,23(6):625-629.

[18] YU D S F,LI P W C,YUE S C S,*et al.* The effects and cost-effectiveness of an empowerment-based self-care programme in patients with chronic heart failure;a study protocol[J]. *J Adv Nurs*, 2019,75(12):3740-3748.

[19] 李潇,蔡乐,王旭明,等.云南省农村老年人五种常见慢性病及共病的流行现状及与社会经济地位的关系[J].中华疾病控制杂志,2019,23(6):630-634.

[20] LI X,CAI L,WANG X M,*et al.* The prevalence of five common chronic diseases and multi-morbidity and its relationship with socioeconomic position among rural older adults in Yunnan Province [J]. *Chin J Dis Contr Prev*,2019,23(6):630-634.

[21] YANG J,HU H L,LI Y M. Effect of dual-track interactive nursing intervention model on anxiety and depression in patients with coronary heart disease[J]. *Psychiatr Danub*, 2020,32(2):197-204.

[22] MA C H,ZHOU W. Predictors of rehospitalization for community-dwelling older adults with chronic heart failure;a structural equation model[J]. *J Adv Nurs*,2020,76(6):1334-1344.

[23] 李嘉琦,刘森,吕宪玉,等.80岁以上男性保健人群慢性病患病情况及其与日常生活活动能力的关联分析[J].中华流行病学杂志,2019,40(5):537-541.

[24] LI J Q,LIU M,LYU X Y,*et al.* Prevalence of chronic diseases and associate factors on daily activities in male oldest-olds[J]. *Chin J Epidemiol*,2019,40(5):537-541.

[25] BOOKEY-BASSETT S,MARKLE-REID M,MCKEY C A,*et al.* Understanding interprofessional collaboration in the context of chronic disease management for older adults living in communities;a concept analysis[J]. *J Adv Nurs*,2017,73(1):71-84.

( 本文编辑:徐自超)

(上接第873页)

[9] 何凯茵,冯理智,梁志伟,等.血清半乳甘露聚糖试验在诊断艾滋病合并马尔尼菲青霉菌病中的价值探讨[J].广州医科大学学报,2016,44(3):21-24.

[10] HE K Y,FENG L Z,LIANG Z W,*et al.* Value of serum galactomannan test in diagnosis of AIDS complicated with penicilliosis marneffeii[J]. *Acad J Guangzhou Med Col*,2016,44(3):21-24.

[11] WANG H S,WANG L,LUO Z N,*et al.* Performance of rapid on-site evaluation of touch imprints of lung tissue biopsies for the diagnosis of pulmonary cryptococcosis in patients without HIV infection[J]. *Mycoses*,2022,65(6):635-642.

[12] CORNELLY O A,ARIKAN-AKDAGLI S,DANNAOUI E,*et al.* ESCMID and EMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of mucormycosis 2013 [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2014,20( Suppl 3):5-26.

[13] 曹彬,蔡柏蔷,王辉,等.肺部真菌感染152例病原谱再评价[J].中华结核和呼吸杂志,2007,30(4):279-283.

[14] CAO B,CAI B Q,WANG H,*et al.* A study of 152 cases of pulmonary fungal infection:reevaluation of the microbiological spectra [J]. *Chin J Tuberc Respir Dis*,2007,30(4):279-283.

[15] WILSON M R,NACCACHE S N,SAMAYOA E,*et al.* Actionable diagnosis of neuroleptospirosis by next-generation sequencing [J]. *N Engl J Med*,2014,370(25):2408-2417.

[16] 黄汉莲,代小燕,周林涛,等.6例耶氏肺孢子菌肺炎的临床特征和实验室检测分析[J].热带医学杂志,2021,21(2):181-183.

[17] HUANG H L,DAI X Y,ZHOU L T,*et al.* Clinical features and laboratory tests of 6 pneumocystis pneumonia cases[J]. *J Trop Med*,2021,21(2):181-183.

[18] XIE D,XU W,YOU J,*et al.* Clinical descriptive analysis of severe *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in renal transplantation recipients[J]. *Bioengineered*,2021,12(1):1264-1272.

[19] 曹磊,刘澄英,赵洪达.经肺泡灌洗液宏基因组测序诊断肺隐球菌病一例并文献复习[J].中华肺部疾病杂志(电子版),2021,14(1):125-127. DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-6902.2021.01.031.

[20] CAO L,LIU C Y,ZHAO H D. Diagnosis of pulmonary cryptococcosis by metagenomic sequencing of alveolar lavage fluid;a case report and literature review[J]. *Chin J Lung Dis (Electronic Edition)*, 2021,14(1):125-127. DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-6902.2021.01.031.

[21] 李颖,麻锦敏.宏基因组学测序技术在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.

[22] LI Y,MA J M. Expert consensus for the application of metagenomic next generation sequencing in the pathogen diagnosis in clinical moderate and severe infections (first edition) [J]. *Chin Crit Care Med*,2020,32(5):531-536.

[23] NILSSON J R,RESTREPO C S,JAGIRDAR J. Two cases of endobronchial carcinoid masked by superimposed aspergillosis;a review of the literature of primary lung cancers associated with aspergillus[J]. *Ann Diagn Pathol*,2013,17:131-136.

( 本文编辑:孟月)