

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.16.023

高通量技术在重症肺炎患者呼吸道病原体快速检测中的应用

张金李¹, 冯 翔^{2△}

(1. 河南省开封市中心医院检验科 475000; 2. 河南省儿童医院检验科, 郑州 450018)

摘 要:目的 探讨不依赖序列的单引物扩增技术结合 Ion Torrent 高通量测序平台对重症肺炎患儿呼吸道肺泡灌洗液进行病毒病原体宏基因组检测的效果。方法 取临床重症肺炎患者肺泡灌洗液标本, 进行病毒基因组核酸 DNA/RNA 的提取, 随机引物扩增建库后, 进行 Ion Torrent 高通量测序分析, 测序结果进行本地 blast 分析筛选病毒序列, 运用 MetaVir 数据库进行病毒归类分析。结果 一共获得 591 593 条序列读长, 病毒序列 3 545 条, 占 0.6%, 其中主要病毒及序列有腺病毒 1 760 条(49.6%), 淋巴囊肿疾病病毒 1 422 条(40.1%), Taterapox 病毒 65 条(1.8%), 智利巨型病毒 37 条(1.0%), 云杉卷蛾雕背姬蜂病毒 33 条(0.9%), 猫白血病毒 32 条(0.9%), 网状内皮组织增生证病毒 30 条(0.8%), RD114 逆转录病毒 18 条(0.5%); 呼吸道病原体荧光定量聚合酶链反应结果为腺病毒 7 型, 提示患者腺病毒 7 型感染。结论 该研究初步建立的病毒宏基因组分析技术平台可用于呼吸道相关已知和未知病毒病原体鉴定。

关键词:重症肺炎; 病原体; 高通量测序; 宏基因组

中图法分类号: R446

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)16-2439-03

Rapid detection of high-throughput techniques for respiratory pathogens in patients with severe pneumonia

ZHANG Jinli¹, FENG Xiang^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Central Hospital of Kaifeng City, Kaifeng, Henan 475000, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Henan Children's Hospital, Zhengzhou, Henan 450018, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of sequence-independent single-primer amplification technology combined with Ion Torrent high-throughput sequencing platform on viral pathogen macro genomic detection in respiratory bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in children with severe pneumonia. **Methods** Total virus DNA/RNA was extracted from BALF specimen of a child with severe pneumonia, a library contained DNA/RNA virus was constructed with the SISPA method and subjected to sequencing with the Ion Torrent PGM. A stand-alone blast was analyzed to filter the reads belong to different species. Using the MetaVir database for virus classification analysis. **Results** A total of 591 593 reads was obtained, of which 3 545 (0.6%) reads belong to virus. Adenovirus, lymphocystis disease virus, Taterapox virus, Chiliensis megavirus, Glypta fumiferanae ichnovirus, feline leukemia virus, reticuloendotheliosis virus and RD114 retrovirus account for 49.6%, 40.1%, 1.8%, 1.0%, 0.9%, 0.9%, 0.8% and 0.5% of the total virus reads, respectively. Further analysis BALF with real time PCR demonstrated that adenovirus type 7 was the pathogen of this severe pneumonia, suggesting adenovirus type 7 infection. **Conclusion** A virus macro genomic analysis technology based on high throughput sequencing platform is initially established which can be used for identification of known and unknown viral pathogens in the respiratory tract.

Key words: severe pneumonia; pathogens; high-throughput sequencing; macro genomic

近年来, 病毒引起的新发传染病逐渐增多, 对人类影响也越来越大, 迅速准确的病原体诊断是治疗和防止暴发流行的最重要的步骤之一^[1]。目前, 病原体的诊断所用到的技术越来越多, 基于不依赖序列扩增技术结合宏基因组的方法已成功用于检测和发现新病毒, 即使在病毒数量很低的情况下, 融合以上技术优势的高通量测序技术具备检测所有病毒的能力^[2-3]。本文应用 Ion torrent 高通量测序平台对儿科 1 例重症肺炎患者进行病毒宏基因组分析, 初步探讨其在临床病原体诊断中的应用, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 肺泡灌洗液标本 (BALF) 来源于开封市中心医院儿科 1 例重症肺炎患儿, 临床诊断为右肺炎, 实验室诊断为肺炎支原体感染。给予红霉素、哌拉西林钠他唑巴坦、阿奇霉素抗感染治疗, 效果不明显, 临床医生怀疑其合并病毒感染。

1.2 仪器与试剂 病毒 DNA/RNA 提取试剂盒购自 MN 公司; Ion torrent 测序配套试剂购自 Thermo 热科学公司; 反转录试剂盒购自天根公司; 长链高保真 PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase 及 Ex Taq

PCR 试剂购自于宝生物工程有限公司;腺病毒荧光定量试剂盒购自达安基因公司;所用聚合酶链反应(PCR)引物由上海英潍捷基公司合成;PCR 产物纯化试剂盒购自 Qiagen 公司。

1.3 方法

1.3.1 肺泡灌洗液标本病毒 DNA/RNA 提取 肺泡灌洗液标本处理:8 000 r/min,离心 15 min,上清用于病毒基因组提取,DNA/RNA 提取:取上清 150 μ L,试剂购于 MN 公司(NucleoSpin[®] RNA Virus 740956.10),按照标准步骤进行。为了同时提取 DNA 病毒核酸,70 $^{\circ}$ C 水浴之前加入 20 mg/mL 蛋白酶 K 溶液 20 μ L。

1.3.2 病毒 DNA/RNA 的随机引物扩增 取 2 μ L 核酸,加入 1 μ L 100 pmol/ μ L 接头引物 FR26RV-N (5'-GCC GGA GCT CTG CAG ATA TCN NNN NN-3'),75 $^{\circ}$ C 作用 5 min 后置冰浴 2 min。按比例加入 FastQuant RT 试剂,42 $^{\circ}$ C 反应 50 min,95 $^{\circ}$ C 反应 2 min 合成 cDNA;加 1 μ L(2.5 U)DNA 聚合酶 Klenow 片段,2 μ L FR26RV-N(10 pmol),2.5 μ L 10 $\times$ buffer,37 $^{\circ}$ C 反应 60 min 合成 dsDNA,75 $^{\circ}$ C 灭活 10 min。取上述反应液模板 5 μ L,加 2 μ L PrimeSTAR GXL DNA 聚合酶,10 μ L 5 $\times$ PrimeSTAR[®] GXL 缓冲液,4 μ L dNTP 混合物,4 μ L 10 pmol/ μ L 的扩增引物 FR20RV (5'-GCC GGA GCT CTG CAG ATA TC-3'),双蒸水补充至 50 μ L,经不依赖序列的单引物扩增:94 $^{\circ}$ C,5 min;94 $^{\circ}$ C,30 s;55 $^{\circ}$ C,30 s;72 $^{\circ}$ C,1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min。扩增产物纯化后采用 Qubit2.0 进行产物定量。

1.3.3 高通量测序 文库构建、文库扩增以及测序 按照试剂盒和仪器说明书进行。取 100 ng 纯化之后的产物,BioRuptor 超声系统随机打断至 200 bp,采用 Ion Xpress[™] Plus DNA Fragment Library kit 试剂盒连接接头;采用 2% E-gel 选择回收大小在 330 bp 的条带并采用 Qubit2.0 进行文库定量。油包水聚合酶链式反应(PCR)和磁珠颗粒(ISP_s)富集采用 Ion OneTouch[™] 200 Template Kit v2 和 Ion OneTouch[™] 进行油包水 PCR;采用 Ion Xpress template kit, MyOne streptavidin C1 beads 和 Ion OneTouch[™] ES 进行模板富集。采用 Ion PGM[™] Sequencing 200 kit 及 Ion 314[™] Chip 进行测序,260 个测序循环,标准压缩氦气进行驱动。

1.3.4 腺病毒荧光定量 PCR 验证 使用达安腺病毒荧光定量检测试剂盒,进行腺病毒验证。

2 结 果

2.1 高通量测序初步结果 芯片有效区域达到 82%,其中连接有文库的有 99%,除去 36%多克隆、4%低质量和 1%测试片段,最终有效的文库占 59%,共 591 593 个读取片段,测序平均读长为 159 bp,最长读长为 333 bp,产生的测序原始数据总量为 93.6

Mb,Q20 为 73.46 Mb。

2.2 本地 Blast 及相关病毒分析结果 Fastq 格式数据文件转换为 fasta 格式,选择一致性大于 70%,E-value<10⁻⁵的序列作为有意义的序列,经本地 Blast 进行序列分类,一共获得 591 593 条读长,其中人类序列 206 469 条,占 41%;细菌序列 76 794 条(15.0%);真菌序列 1 415 条(0.3%),其中病毒序列 3 545 条,占(0.6%);病毒病原体主要有腺病毒序列 1 760 条(49.6%),淋巴囊肿疾病病毒序列 1 422 条(40.1%);Taterapox 病毒 65 条(1.8%),智利巨型病毒 37 条(1.0%),云杉卷蛾雕背姬蜂病毒 33 条(0.9%),猫白血病毒 32 条(0.9%),网状内皮组织增生证病毒 30 条(0.8%),RD-114 逆转录病毒 18 条(0.5%),其他病毒共 148 条(4.2%)。

2.3 腺病毒荧光定量 PCR 结果 呼吸道病原体荧光定量 PCR 结果为腺病毒 7 型,CT 值为 27.04。提示患者腺病毒 7 型感染。

3 讨 论

本研究通过采用不依赖序列的单引物扩增技术的病毒宏基因组方法结合 Ion Torrent 高通量测序平台对儿科重症肺炎患儿呼吸道肺泡灌洗液进行病毒病原体宏基因组分析,快速筛选出了标本中含有的腺病毒及其他病毒基因序列,整个试验只需 2~3 d 就能完成,测序成本也低至几千元,提示这种不依赖序列的病原体鉴定技术由于不需要预先知道病原体基因组信息,也不用专门针对病原体设计多对引物,特别适合于医院、疾病预防控制中心等机构在某种突发传染病的早期采用这种技术手段进行病毒性病原体鉴定,这种技术已成功用于病毒的鉴定、病毒基因组测序、输血制品病原体的筛选等^[4]。

腺病毒 7 型是临床常见的病原体类型,主要引起上呼吸道急性感染,是社区获得性肺炎及重症肺炎的重要病原体^[5],患者肺泡灌洗液标本中也发现其他病毒种类序列的存在,淋巴囊肿病毒-中国株是引起上百种淡、海水鱼产生囊肿的主要病原体,暂无人感染病例的报道,其他如 Taterapox 病毒、智利巨型病毒、云杉卷蛾雕背姬蜂病毒等也暂时无人感染病例^[6]。

本次测序数据中人类基因组序列所占比例较大,病毒序列只占很少一部分,与国内研究相似^[7],分析原因可能因为肺泡灌洗液中含有大量的宿主细胞,标本提取前未经使用过滤系统去除宿主细胞等体积较大的物质,也未加入 DNA 酶和 RNA 酶去除标本提取前存在的裸 DNA 和 RNA 有关。另外也可能与标本中腺病毒浓度有关,标本荧光定量 PCR 结果显示腺病毒 CT 值为 27.04,腺病毒序列拼接基因组覆盖度 79%,测序品均深度 8 $\times$ 。有研究者发现,如果标本中病毒粒子的浓度大于 10⁷ 个/ μ L,则较容易获得相关病毒的全基因组序列及较高的测序深度^[8-9]。相对于 DNA 病毒,高通量技术检测 RNA(下转第 2444 页)

- fectious mononucleosis[J]. *Am Fam Physician*, 2015, 91(6):372-376.
- [2] XIONG G, ZHANG B, HUANG M Y, et al. Epstein-Barr virus(EBV) infection in Chinese children: a retrospective study of age-specific prevalence[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6):e99857.
- [3] HESS R D. Routine Epstein-Barr virus diagnostics from the laboratory perspective; still challenging after 35 years[J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(8):3381-3387.
- [4] 胡荣盛, 徐亚丽, 俞晓春, 等. 全血 EBV DNA 载量检测在儿童 EB 病毒感染中的应用价值[J]. *浙江医学*, 2014, 36(9):766-769.
- [5] CHAN K H, LUO R X, CHEN H L, et al. Development and evaluation of an Epstein-Barr virus (EBV) immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay based on the 18-kilodalton matrix protein for diagnosis of primary EBV infection[J]. *J Clin Microbiol*, 1998, 36(11):3359-3361.
- [6] CHAN K H, NG M H, SETO W H, et al. Epstein-Barr virus(EBV) DNA in sera of patients with primary EBV infection[J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(11):4152-4154.
- [7] ROBERTSON P, BEYNON S, WHYBIN R, et al. Measurement of EBV-IgG anti-VCA avidity aids the early and reliable diagnosis of primary EBV infection[J]. *J Med Virol*, 2003, 70(4):617-623.
- [8] JANANI M K, MALATHI J, APPASWAMY A, et al. A hospital based pilot study on Epstein-Barr virus in suspected infectious mononucleosis pediatric patients in India[J]. *J Infect Dev Ctries*, 2015, 9(10):1133-1138.
- [9] 朱芹, 郭平, 黄雅娟, 等. EB 病毒血清学联合 DNA 定量检测在诊断婴儿传染性单核细胞增多症中的意义[J]. *中国现代医生*, 2014, 52(11):56-58.
- [10] 刘春梅, 张庆, 田文君, 等. EBV DNA 检测在小儿 EBV 感染相关疾病诊断中的意义[J]. *中华检验医学杂志*, 2016, 39(4):256-261.
- [11] AKPOLAT N, GEDIK M, NERGIZ S, et al. Determination of serological profiles and avidity of specific antibodies in the sera of patients with potential Epstein-Barr virus (EBV) infection[J]. *Bratisl Lek Listy*, 2013, 114(8):460-463.
- [12] 陆海英, 魏秀琴, 徐小元, 等. EBV 抗体与 EBV DNA 水平的影响因素及其相关性分析[J]. *临床肝胆杂志*, 2015, 31(5):766-770.
- [13] 王克迪, 吕治, 王铁山, 等. 血液病患者外周血白细胞、血浆和血清中 EB 病毒 DNA 定量分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2014, 35(16):2161-2162.
- [14] 杨细媚, 万祥, 辉段, 等. EBV-IgM、EBV-DNA 在传染性单核细胞增多症急性期的诊断意义研究[J]. *实用检验医师杂志*, 2013, 5(4):233-235.

(收稿日期:2017-12-30 修回日期:2018-02-24)

(上接第 2440 页)

病毒相对容易^[10]。有试验证明, 标本提取核酸之前依次进行高速离心、过滤和酶处理 3 步法处理能够富集病毒粒子, 提高测序数据中病毒序列所占的比例^[11]。

测序过程一个重要的挑战是数据分析, 虽然有一些开放平台给研究者使用, 如 MetaVir 和 Vipie 可免费使用, 但是分析过程及等待时间均较长。因此, 各个实验室及科研平台应该建立适合自己的平台, 提高病原体检测速度。

参考文献

- [1] MOKILI J L, ROHWER F, DUTILH B E. Metagenomics and future perspectives in virus discovery[J]. *Curr Opin Virol*, 2012, 2(1):63-77.
- [2] KARLSSON O E, BELAK S, GRANBERG F. The effect of preprocessing by sequence-independent, single-primer amplification (SISPA) on metagenomic detection of viruses[J]. *Biosecur Bioterror*, 2013, 11(S1):S227-S234.
- [3] TANG P, CHIU C. Metagenomics for the discovery of novel human viruses[J]. *Future Microbiol*, 2010, 5(2):177-189.
- [4] SAUVAGE V, GOMEZ J, BOIZEAU L, et al. The potential of viral metagenomics in blood transfusion safety[J]. *Transfus Clin Biol*, 2017, 24(3):218-222.
- [5] XU L, ZHU Y, REN L, et al. Characterization of the Nasopharyngeal Viral Microbiome from Children with Community-Acquired Pneumonia but Negative for Luminex xTAG Respiratory Viral Panel Assay Detection[J]. *J Med Virol*, 2017, 89(12):2098-2107.
- [6] ZHANG Q Y, XIAO F, GUI J F, et al. Complete genome sequence of lymphocystis disease virus isolated from China[J]. *J Virol*, 2004, 78(13):6982-6994.
- [7] 刘孝荣, 马东礼, 姜含芳, 等. 高通量测序方法在重症肺炎病原体检测的应用[J]. *中华检验医学杂志*, 2017, 40(8):609-613.
- [8] DE VRIES M, MUNNINK B B, DEIJS M, et al. Performance of VIDISCA-454 in Feces-Suspensions and serum[J]. *Viruses*, 2012, 4(8):1328-1334.
- [9] SLEEMAN K, GUO Z, BARNES J, et al. R292K substitution and drug susceptibility of influenza A(H7N9) viruses[J]. *Emerg Infect Dis*, 2013, 19(9):1521-1524.
- [10] WYLIE K M, MIHINDUKULASURIYA K A, ERICA S, et al. Sequence analysis of the human virome in febrile and afebrile children[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6):e27735.
- [11] HALL R J, WANG J, TODD A K, et al. Evaluation of rapid and simple techniques for the enrichment of viruses prior to metagenomic virus discovery[J]. *J Virol Methods*, 2014, 195(1):194-204.

(收稿日期:2017-12-04 修回日期:2018-02-18)