

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.18.011

老年细菌性肺炎痰标本的临床应用价值:基于 16S rDNA 测序方法*

穆 汇¹, 邹 盈², 周奇兴², 孙 妍², 胡 江^{1△}

上海市普陀区利群医院:1. 检验科;2. 呼吸科, 上海 200333

摘要:目的 采用 16S rDNA 高通量测序技术,比较不同采集方式获得的老年细菌性肺炎患者呼吸道标本的共有或独有细菌,评估质量合格的呼吸道标本的临床价值。方法 选取该院收治的 10 例诊断为细菌性肺炎且未经治疗的老年患者作为研究对象,分别采集自然咳痰(SH 组)、纤维支气管镜吸痰(XT 组)和纤维支气管镜肺泡灌洗液(XC 组)标本,采用 16S rDNA 高通量测序技术检测并比较 3 组标本细菌组成的相似性和差异性。结果 3 组标本共有菌群 959 个属,3 组标本独有细菌的属比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),但非度量多维尺度分析显示,3 组标本在属水平上总体细菌结构差异不明显。结论 16S rDNA 高通量测序 SH 组标本细菌更丰富,但质量合格的 3 组标本在属水平上总体细菌结构差异不明显,SH 组标本仍有一定的临床价值。

关键词:老年细菌性肺炎; 16S rDNA 高通量测序; 咳痰

中图法分类号:R563.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)18-2667-03

**Clinical application value of sputum specimens for bacterial pneumonia
in the elderly: based on the 16S rDNA sequencing method***

MU Hui¹, ZOU Ying², ZHOU Qixing², SUN Yan², HU Jiang^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Respiration, Shanghai Putuo District Liqun Hospital, Shanghai 200333, China

Abstract: Objective To compare the common or unique bacteria of respiratory tract specimens of elderly patients with bacterial pneumonia obtained by different collection methods by 16S rDNA high-throughput sequencing technology, and to evaluate the clinical value of qualified respiratory tract specimens. **Methods** Ten untreated elderly patients diagnosed with bacterial pneumonia in the hospital were selected as the research objects. The specimens of natural expectoration (SH group), fiberoptic bronchoscopic sputum aspiration (XT group) and fiberoptic bronchoscopic alveolar lavage fluid (XC group) were collected respectively. 16S rDNA high-throughput sequencing technology was used to detect and compare the similarities and differences in bacterial composition of the three groups of specimens. **Results** There were 959 genera of flora in the three groups. There was significant difference in the genera of unique bacteria among the three groups ($P < 0.05$), but nonmetric multidimensional scale analysis showed that there was no significant difference in the overall bacterial structure at the genus level among the three groups. **Conclusion** 16S rDNA high-throughput sequencing SH group specimens are more abundant in bacteria, but the overall bacterial structure of the three groups of qualified specimens is not significantly different at the genus level. SH group specimens still have certain clinical value.

Key words: bacterial pneumonia in the elderly; 16S rDNA high-throughput sequencing; sputum

细菌性肺炎是临床上常见的疾病之一,发病率高,危害性大,是老年人死亡的主要原因^[1-3]。下呼吸道标本取样应用最广泛、最简便的方法为自然咳痰法,尤其老年患者。此法无创、标本易获得,然而其影响因素较多,尤其易受上呼吸道正常定植菌群的影响,且痰培养阳性率不高,因此,目前有学者认为采用

传统方法检测下呼吸道感染患者自然咳痰的标本对临床用药指导意义不大。本研究通过自然咳痰(SH 组)、纤维支气管镜吸痰(XT 组)、纤维支气管镜肺泡灌洗液(XC 组)3 种方式获得老年细菌性肺炎患者呼吸道标本,采用 16S rDNA 高通量测序技术,检测 3 种类型呼吸道标本,并从细菌丰度及其组成结构的角

* 基金项目:上海市普陀区卫生系统自主创新科研项目(Ptkwsw201821)。

作者简介:穆汇,女,技师,主要从事临床微生物和耐药机制方面的研究。△ 通信作者,E-mail:252312793@qq.com。

本文引用格式:穆汇,邹盈,周奇兴,等.老年细菌性肺炎痰标本的临床应用价值:基于 16S rDNA 测序方法[J].检验医学与临床,2021,18

度,比较 3 种呼吸道标本细菌检测结果,评估质量合格的呼吸道标本在临床上的应用价值。现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

随机选取本院 2018 年 7 月至 2019 年 3 月呼吸科收治的肺炎患者作为研究对象,男女性别不限,年龄 ≥ 65 岁,分别留取每个患者的 SH 组、XT 组和 XC 组标本。纳入标准:患者诊断均符合《中国成人社区获得性肺炎诊断和治疗指南(2016 年版)》^[4] 中的细菌性肺炎诊断标准。呼吸道标本质量检测合格标准为:平均每低倍视野鳞状上皮细胞数 < 10 个,白细胞数 > 25 个。筛选出诊断和呼吸道标本质量均符合要求的患者 10 例,均为上海本地西北地区人,其中男 4 例、女 6 例,平均年龄为 (72.5 ± 7.2) 岁,平均体质量指数(BMI)为 $(24.66 \pm 2.75) \text{ kg/m}^2$,患者受试期间均无冶游史。

1.2 检测方法

1.2.1 标本采集

采集初诊为肺炎的老年患者 SH 组、XT 组及 XC 组标本。XT 组和 XC 组标本的采集由气管镜室工作人员行纤维支气管镜检查时吸痰获得,同时给予 100 mL 无菌生理盐水冲洗并回收获得肺泡灌洗液。评估患者呼吸道标本质量,选取符合标准的 10 例患者共 30 份标本于 -80°C 保存,然后送合作公司进行测序并分析。

1.2.2 16S rDNA 高通量测序和生物信息学分析

使用美国 Omega Bio-Tek 公司的 DNA 抽提试剂盒提取 30 份标本的基因组 DNA,在 Illumina 公司的 Miseq PE300 平台对 16S V3~V4 区进行测序,得到优化序列后进行群落聚类(OTU)分析,默认以 97% 的一致性将序列聚类成为 OTUs,获得 OTU 丰度表,进而展开生物信息学分析。

1.3 统计学处理

采用 Excel2016 对数据进行统计。计数资料以频数、率表示,组间比较采用 χ^2 检验;维恩(Venn)图分析采用 R 语言工具统计和作图;非度量多维尺度分析(NMDS)采用 QIIME 计算 BETA 多样性距离矩阵,采用 R 语言 vegan 软件包进行分析和作图,当应力系数(Stress) < 0.2 时可用 NMDS 的二维点图表示,其图形有一定的解释意义;当 Stress < 0.1 时,可认为是一个好的排序;当 Stress < 0.05 时,则具有很好的代表性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 16S rDNA 高通量测序序列分析

本研究细菌 16S rDNA 高通量测序的比对数据库为 Silva,30 例标本的高通量测序一共得到 1 503 515 条有效优化序列,562 872 365 bp 有效碱基数,标本序列的有效长度平均为 374 bp。对 OTU 进行物种分类学注释,统计每个标本所对应的丰度信息,得到 1 个域,1 个界,48 个门,117 个纲,309 个目,558 个科,1 228 个属,2 425

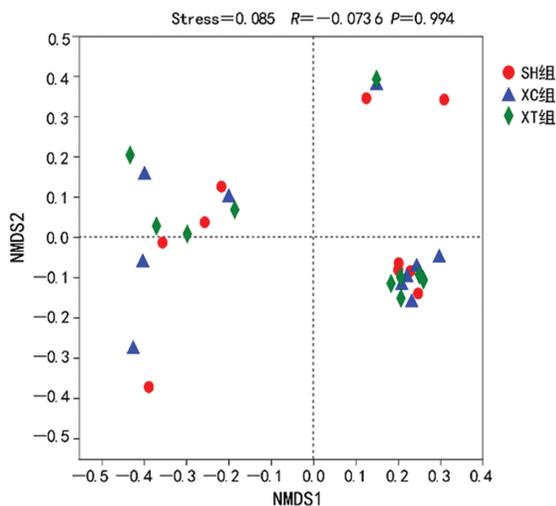
个种的细菌。

2.2 细菌 Venn 图分析

根据聚类得到的物种分析结果,对 SH 组、XT 组、XC 组标本之间共有的、独有的细菌(如属),绘制成 Venn 图。SH 组、XT 组、XC 组标本细菌分别为 1 113、1 111、1 066 个属;3 组标本共有的细菌 959 个属,而各组独有的细菌分别为 SH 组 55 个属,XT 组 47 个属,XC 组 23 个属,3 组独有细菌的属比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);SH 组和 XC 组共有细菌 998 个属,SH 组和 XT 组共有细菌 1 019 个属,XC 组和 XT 组共有细菌 1 004 个属。细菌数目占比较大的属前 3 位依次为假单胞菌属(23.64%)、土杆菌属(2.77%)、链球菌属(2.75%),并且假单胞菌属、链球菌属为 SH 组、XT 组、XC 组的共有菌属。

2.3 NMDS 分析

基于 Bray-Curtis 距离的 NMDS 分析,比较 SH 组、XT 组、XC 组 3 组标本总体细菌组成的相似性或差异性,并用 Qiime 计算 Beta 多样性距离矩阵,采用 R 语言 Vegan 软件进行 NMDS 分析和作图,结果显示,3 组标本没有被明显分开,3 组在属水平上总体细菌结构差异不明显(Stress < 0.2 , $R < 0$, $P > 0.05$),见图 1。



注: $R > 0$,说明组间差异大于组内差异; $R < 0$,说明组间差异小于组内差异。

图 1 SH 组、XT 组、XC 组在 OTU 水平上 NMDS 分析图(anosim 算法后)

3 讨论

下呼吸道标本取样应用最广泛、最简便的方法为自然咳痰法,尤其对于老年患者。痰液中培养出的病原菌种类及药敏试验结果对疾病的诊断和指导用药有着重要的意义^[5]。自然咳痰法无创、标本易获得,然而其影响因素较多,尤其易受上呼吸道正常定植菌群的影响,因此经常出现致病菌与定植菌难以区分的情况^[6],在临床工作中也往往会遇到用药效果和痰培养药物敏感性试验结果不一致的现象^[7]。国内国外学者对痰中分离细菌的价值存在较多质疑,其原因:一方面是阳性率偏低,对临床用药指导意义不大;另

一方面患者有明显的感染症状和体征,而痰培养的结果却是阴性。因此,临床医生认为痰培养结果对临床参考价值不大,一般还是经验性地选用抗菌药物。随着分子生物学技术的发展,新一代的测序技术以其高通量、低成本、快速等优点,为开展大规模物种测序等提供了可能。16S rDNA 测序技术可以分类鉴定出临床上不能或不易培养的细菌,有可能成为鉴定细菌的主流手段。

本研究采用 16S rDNA 高通量测序技术,比较了 10 例 65 岁及以上细菌性肺炎患者的 SH 组、XT 组及 XC 组标本共有的、独有的细菌,以及 3 组标本细菌组成的相似性或差异性。结果发现,3 组标本的细菌组成非常相似,根据物种 Venn 图分析,3 组标本共有的细菌 959 个属;细菌性肺炎的上呼吸道与下呼吸道微生物生态结构可能呈现一个地貌样延续的状态,SH 组、XT 组、XC 组的细菌分别有 1 113、1 111、1 066 个属。CABRERA-RUBIO 等^[8]在一项关于慢性阻塞性肺疾病患者气道微生物多样性的研究中分析了痰、支气管分泌物、支气管肺泡灌洗液、支气管黏膜 4 种标本的细菌多样性,他们认为相对于痰和支气管分泌物,来自下呼吸道的支气管肺泡灌洗液和支气管黏膜具有非常相似的细菌组成。本研究结论也验证了这个观点,但是对于上呼吸道的痰标本,本研究却提出了不一样的观点,从本研究 3 组标本在属水平上的 Venn 图中可以看出,SH 组标本独有细菌的属是最多的,3 组标本独有细菌的属比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),但是在基于 Bray-Curtis 距离的 NMDS 分析中发现,3 组标本没有被明显分开,Stress = 0.085, < 0.2,说明 3 组标本在属水平上总体细菌结构差异不明显。鉴于 SH 组标本取样方便,采用 16S rDNA 高通量测序结果准确、信息量丰富,可以满足对大多数下呼吸道感染性疾病的精准治疗,因此,笔者认为质量合格的 SH 组标本仍然具有一定的临床价值。

在本研究中已经获得了 SH 组、XT 组、XC 组的共有细菌,未来拟通过对下呼吸道非感染人群的 SH 组、XT 组、XC 组标本进行 16S rDNA 高通量测序,研究肺炎患者和下呼吸道非感染人群 3 种类型标本的共有物种,为进一步理解肺炎患者的微生物群落构成和特有病原菌,提供新的认知。这些工作的开展,将

会为优化老年人肺部感染疾病的经验用药、预后评判和临床管理,以及更深入地理解该病的发生、发展机制,奠定重要的理论基础。本研究曾尝试收集下呼吸道未被感染且行纤维支气管镜检查患者的标本,如肺癌患者,由于条件限制,样本例数太少,未果。目前已收集了 18 例健康人的痰液,正在测序中,拟比较细菌性肺炎患者和健康人群的菌群结构和丰度差异。

综上所述,16S rDNA 高通量测序 SH 组标本细菌更丰富,但质量合格的 3 组标本在属水平上总体细菌结构差异不明显,SH 组标本仍有一定的临床价值。

参考文献

- [1] CHANDORKAR G, XIAO A, MOUKSASSI M S, et al. Population pharmacokinetics of ceftolozane/tazobactam in healthy volunteers, subjects with varying degrees of renal function and patients with bacterial infections[J]. J Clin Pharmacol, 2015, 55(2): 230-239.
- [2] SAPTHARISHI L G, BAALAAJI M, SUNIT C S. Ventilator-associated pneumonia or bacterial colonization of the airway, what do probiotics decrease[J]. Intensive Care Med, 2015, 41(6): 1161.
- [3] NORMAN D C. Clinical features of infection in older adults[J]. Clin Geriatr Med, 2016, 32(3): 433-441.
- [4] 中华医学会呼吸病学分会. 中国成人社区获得性肺炎诊断和治疗指南(2016 年版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2016, 39(4): 253-279.
- [5] 樊国斌, 李素娟, 沈钦华. 呼吸内科痰培养阳性率偏低的原因分析及其改进方法[J]. 抗感染药学, 2014, 11(2): 150-152.
- [6] SUZAKI A. Contribution of rapid diagnostic test in the treatment of infectious diseases[J]. Rinsho Biseibutshu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi, 2014, 24(2): 57-61.
- [7] 刘华, 黄学斌, 肖代文, 等. 重症监护病房鲍曼不动杆菌感染/定植情况及耐药性分析[J]. 实用医院临床杂志, 2012, 9(6): 102-104.
- [8] CABRERA-RUBIO R, GARCIA-NÚÑEZ M, SETÓ L, et al. Microbiome diversity in the bronchial tracts of patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(11): 3562-3568.

(收稿日期:2020-09-01 修回日期:2021-06-24)

(上接第 2666 页)

- [7] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 献血不良反应分类指南: WS/T 571-2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [8] 蔡艳, 李亚茹, 刘丽娟, 等. 应用 MCS+LDP 和 UPP 程序单采血小板的效果对比分析[J]. 中国输血杂志, 2019, 32(8): 826-828.
- [9] 陈岑, 曾嘉, 林豪, 等. 钙剂补充改善献血者柠檬酸盐抗凝剂相关副反应的研究[J]. 中国输血杂志, 2010, 23(3):

- 194-197.
- [10] 邸春艳, 陈向东. 机采血小板献血反应荟萃分析[J]. 中国输血杂志, 2014, 27(1): 56-59.
- [11] 曹维娟, 蒋靓, 李维洁. 单采血小板冲红原因分析[J]. 临床输血与检验, 2014, 16(3): 305-306.
- [12] 郑丽萍, 李铁军, 杨文萍. 机采血小板采集失败的原因分析及处理措施[J]. 临床血液学杂志, 2014, 27(8): 702-703.

(收稿日期:2020-12-08 修回日期:2021-07-09)