

· 论著 ·

16S rDNA 测序在呼吸机相关性肺炎痰液细菌多样性分析中的应用

杨晓军 王晓红 梁志娟 张小亚 王妍柏 王振海

【摘要】 目的 用 16S rDNA 测序研究呼吸机相关性肺炎(VAP)患者痰液中致病菌的种类和丰度,探讨 VAP 病原学诊断的新方法。方法 对 31 例 VAP 患者进行支气管肺泡灌洗,提取痰液标本细菌 DNA,进行聚合酶链反应(PCR)鉴定,同时进行痰液细菌培养。利用 16S rDNA 测序技术进行宏基因组测序及生物信息学分析,并将测序结果与细菌培养结果比较。结果 ① 31 例 VAP 患者中 27 例患者的痰液标本 550 bp 处扩增出特异的 DNA 产物用于测序分析。16S rDNA 测序共得到 103 856 条序列,39 Mb 的原始数据。Tag 物种注释 27 份样本均可注释到属的水平。② 样本复杂度分析:Alpha 多样性分析显示 27 份样本 Shannon 指数约为 1.20, Simpson 指数约为 0.48,表明 VAP 痰液样本中细菌物种丰富且较为复杂。稀释曲线趋势分析提示部分 VAP 痰液样本还存在较多未被测序检测到的物种。③ 样本多样性分析:VAP 痰液样本 16S rDNA 测序分析共出现放线菌门、拟杆菌门、硬壁菌门和变形菌门 4 个细菌门。以属为分类标准,优势菌属为链球菌属 88.9%(24/27),变性菌属 77.8%(21/27),不动杆菌属 70.4%(19/27),鞘氨醇单胞菌属 63.0%(17/27),普氏菌属 63.0%(17/27),克雷伯菌属 55.6%(15/27),假单胞菌属 55.6%(15/27),水杆菌属 55.6%(15/27),棒状杆菌属 55.6%(15/27)。④ 16S rDNA 测序法与细菌培养结果比较:测序法检测可发现普通细菌培养未检测到的普氏菌属、变性菌属、水杆菌属、鞘氨醇单胞菌属;两种方法共同检测到的 7 种菌属中,测序法检测到的链球菌属[88.9%(24/27)]、克雷伯菌属[55.6%(15/27)]、不动杆菌属[70.4%(19/27)]、棒状杆菌属[55.6%(15/27)]的阳性率均高于普通细菌培养[分别为 18.5%(5/27)、18.5%(5/27)、37.0%(10/27)、7.4%(2/27), $P<0.05$ 或 $P<0.01$],假单胞菌属阳性率较普通细菌培养法有增高趋势[55.6%(15/27)比 25.9%(7/27), $P=0.050$];而测序法与细菌培养检测到葡萄球菌属[7.4%(2/27)比 11.1%(3/27)]、奈瑟菌属[18.5%(5/27)比 3.7%(1/27)]的阳性率则均无差异(均 $P>0.05$)。结论 16S rDNA 测序分析证实 VAP 患者的痰液致病菌种复杂多样,物种丰富,多种多重耐药菌株定植。与普通细菌培养比较,16S rDNA 宏基因组测序发现病原体阳性率更高。16S rDNA 基因测序技术可能成为 VAP 病原学诊断的新方法。

【关键词】 呼吸机相关性肺炎; 痰液; 细菌培养; 16S rDNA; 测序

The use of 16S rDNA sequencing in species diversity analysis for sputum of patients with ventilator-associated pneumonia Yang Xiaojun*, Wang Xiaohong, Liang Zhijuan, Zhang Xiaoya, Wang Yanbo, Wang Zhenhai. *Department of Critical Care Medicine, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchun 750004, Ningxia, China

Corresponding author: Yang Xiaojun, Email: yxjcu@163.com

【Abstract】 Objective To study the species and amount of bacteria in sputum of patients with ventilator-associated pneumonia (VAP) by using 16S rDNA sequencing analysis, and to explore the new method for etiologic diagnosis of VAP. **Methods** Bronchoalveolar lavage sputum samples were collected from 31 patients with VAP. Bacterial DNA of the samples were extracted and identified by polymerase chain reaction (PCR). At the same time, sputum specimens were processed for routine bacterial culture. The high flux sequencing experiment was conducted on PCR positive samples with 16S rDNA macro genome sequencing technology, and sequencing results were analyzed using bioinformatics, then the results between the sequencing and bacteria culture were compared. **Results** ① 550 bp of specific DNA sequences were amplified in sputum specimens from 27 cases of the 31 patients with VAP, and they were used for sequencing analysis. 103 856 sequences were obtained from those sputum specimens using 16S rDNA sequencing, yielding approximately 39 Mb of raw data. Tag sequencing was able to inform genus level in all 27 samples. ② Alpha-diversity analysis showed that sputum samples of patients with VAP had significantly higher variability and richness in bacterial species (Shannon index values 1.20, Simpson index values 0.48). Rarefaction curve analysis showed that there were more species that were not detected by sequencing from some VAP sputum samples. ③ Analysis of 27 sputum samples with VAP by using 16S rDNA sequences yielded four phyla: namely *Acetivobacteria*,

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.05.002

基金项目:宁夏回族自治区自然科学基金(NZ11189);宁夏医科大学重点科研项目(XZ2012002)

作者单位:750004 银川,宁夏医科大学总医院重症医学科(杨晓军、王晓红、张小亚);750004 银川,宁夏颅脑疾病重点实验室(梁志娟、王妍柏、王振海) 通信作者:杨晓军,Email:yxjcu@163.com

Bacteroidetes, *Firmicutes*, *Proteobacteria*. With genus as a classification, it was found that the dominant species included *Streptococcus* 88.9% (24/27), *Limnohabitans* 77.8% (21/27), *Acinetobacter* 70.4% (19/27), *Sphingomonas* 63.0% (17/27), *Prevotella* 63.0% (17/27), *Klebsiella* 55.6% (15/27), *Pseudomonas* 55.6% (15/27), *Aquabacterium* 55.6% (15/27), and *Corynebacterium* 55.6% (15/27). ④ Pyrophosphate sequencing discovered that *Prevotella*, *Limnohabitans*, *Aquabacterium*, *Sphingomonas* might not be detected by routine bacteria culture. Among seven species which were identified by both methods, pyrophosphate sequencing yielded higher positive rate than that of ordinary bacteria culture [*Streptococcus*: 88.9% (24/27) vs. 18.5% (5/27), *Klebsiella*: 55.6% (15/27) vs. 18.5% (5/27), *Acinetobacter*: 70.4% (19/27) vs. 37.0% (10/27), *Corynebacterium*: 55.6% (15/27) vs. 7.4% (2/27), $P < 0.05$ or $P < 0.01$]. Sequencing positive rate was found to increase positive rate for culture of *Pseudomonas* [55.6% (15/27) vs. 25.9% (7/27), $P = 0.050$]. No significant differences were observed between sequencing and ordinary bacteria culture for detection *Staphylococcus* [7.4% (2/27) vs. 11.1% (3/27)] and *Neisseria* bacteria genera [18.5% (5/27) vs. 3.7% (1/27), both $P > 0.05$]. **Conclusions** 16S rDNA sequencing analysis confirmed that pathogenic bacteria in sputum of VAP were complicated with multiple drug resistant strains. Compared with routine bacterial culture, pyrophosphate sequencing had higher positive rate in detecting pathogens. 16S rDNA gene sequencing technology may become a new method for etiological diagnosis of VAP.

[Key words] Ventilator-associated pneumonia; Sputum; Bacterial culture; 16S rDNA; Sequencing

呼吸机相关性肺炎(VAP)是机械通气常见的并发症,可延长机械通气时间,增加患者住院费用及病死率。VAP 预后与早期准确的诊断、细菌的致病力及抗菌药物的治疗密切相关^[1-2]。痰液细菌培养是诊断 VAP 致病菌的“金标准”,但由于细菌培养耗时较长、经验性抗菌药物的使用、菌种变迁、混合感染等问题,导致结果常呈假阴性^[3]。目前应用分子生物学技术对细菌微生物的分类鉴定,可从鉴定表型特征深化到基因特征的分类。16S rDNA 是编码原核生物核糖体小亚基 rRNA(16S rRNA)的基因,长度约为 1 500 bp,细菌分类学研究常以此为依据。16S rDNA 测序分析具有测序通量高,获得数据量大,周期短,能更加全面反映微生物群体物种组成、真实的物种分布及丰度信息等特点^[4]。本研究拟采用 16S rDNA 测序分析 VAP 患者痰液中细菌种群构成,并与传统细菌培养的阳性结果进行比较,通过高通量测序技术对 16S rDNA 序列阳性的痰液样本进行菌种的区分和鉴定,以寻找 VAP 临床感染的常见致病细菌,探索 VAP 病原学诊断的新方法。

1 资料与方法

1.1 病例选择:选择本院综合重症监护病房(ICU)收住的 31 例 VAP 患者,均符合 VAP 诊断标准^[5-6],且机械通气时间均 ≥ 48 h。排除机械通气前已有下呼吸道感染的患者。本组患者男性 24 例,女性 7 例;年龄 30~86 岁,平均(63 \pm 13)岁。

本研究符合本院伦理委员会制定的医学伦理学标准,受试者或其家属均知情同意。

1.2 标本采集和病原学检测:选择肺部 CT 示炎性渗出最重的肺段进行支气管肺泡灌洗术,采集下呼吸道痰液标本,再负压吸引回收灌洗液至无菌集痰器中,分装两管^[7],分别进行细菌培养和测序分析。

1.3 实验材料:DNA 提取试剂盒(QIAGEN 公司,德国),聚合酶链反应(PCR)扩增试剂盒(Fermentas 公司,加拿大)。生物安全柜、离心机、分光光度计、电泳仪、凝胶成像仪、PCR 仪(BIO-RAD 公司,美国),454 测序仪(Roche 公司,德国)。

1.4 实验方法

1.4.1 痰液中 DNA 的提取:按 TRIzol 说明书提取 DNA,置于 -80 °C 冰箱中保存备用。

1.4.2 引物的设计与合成:登录 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),获得细菌基因组 16S rDNA 的 V3~V5 区的序列片段长度为 550 bp。引物由上海生物工程科学技术服务有限公司合成。

1.4.3 PCR 扩增:以提取的 DNA 为模板,采用 16S rDNA 的 V3~V5 区引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系:预混液 12.5 μ L,上下游引物各 1 μ L,模板 DNA 1 μ L,去离子水 9.5 μ L。扩增条件:95 °C 变性 3 min; 随后 95 °C 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 35 个循环。

1.4.4 PCR 产物鉴定:将扩增的 PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后,用紫外检测仪进行观察。

1.4.5 16S rDNA 宏基因组测序:16S rDNA 宏基因组测序由深圳华大基因研究院完成。采用 16S rDNA 的高变区测序技术,在 PCR 产物中加入样品标签序列(barcode)后进行混合测序,并根据基因表达标签(Tag)进行物种分类、运转分类单位(OTU)分析、多样性分析等。本组 31 例患者痰液 DNA 样本经 PCR 扩增,有 27 份样本可用于上机测序,所采用的测序策略为 454 焦磷酸高通量测序 V3~V5 区域。

1.4.6 Tag 物种注释和 OTU 分析:27 份样本的 Tag 序列用 Mothur (v1.27) 软件比对到核糖体数据库(RDP)中,进行物种注释,并绘制稀释曲线,根据

Tag 的注释信息,对 OTU 进行物种注释。采用 Alpha 多样性对单个样本中物种多样性进行分析;将不同样本中属于同一物种的 Tag 数量汇总,生成物种概况表,找出不同样本中差异显著的物种。

1.4.7 细菌培养:将痰液样本接种于血琼脂平板上,37 °C 需氧培养 3 ~ 5 d。进行革兰染色镜检,观察菌落染色特性和菌落形态,使用法国梅里埃 VITEK2 全自动细菌鉴定仪进行细菌鉴定。

1.5 统计学分析:应用 SPSS 17.0 软件,对细菌培养和 16S rDNA 测序结果采用配对资料的 χ^2 检验 (McNemar 检验) 进行统计分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 痰液微生物宏基因组 DNA 提取结果:共提取 31 份总 DNA 样本,分光光度仪测定样本 260/280 nm 处吸光度值 (A_{260}/A_{280}) 均介于 1.8 ~ 2.0,说明提取的 DNA 纯度较高,无蛋白污染;测定其平均浓度为 35.56 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,说明样本质量较高,无降解,可用于后续实验。

2.2 16S rDNA 的 PCR 扩增结果(图 1):31 例患者的痰液总 DNA 样本有 27 例扩增得到 16S rDNA 基因,扩增产量较大,无明显副带,与 Marker 对照,产物片段约为 550 bp,与目的片段大小一致,可用于测序分析。

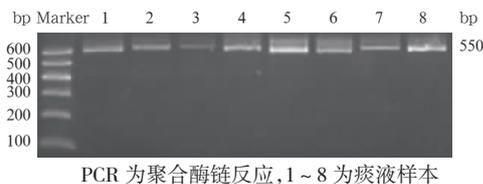


图 1 呼吸机相关性肺炎患者部分痰液样本 16S rDNA PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果

2.3 16S rDNA 宏基因组测序:对 27 份样本添加 barcode 后进行 PCR 扩增,将所有样本后进行 PCR 产物纯化后等量混匀,经过 454 焦磷酸高通量测序平台共得到 103 856 条序列,39 Mb 的原始数据。

2.3.1 Tag 物种注释:把过滤后的 Tag 比对到 RDP 数据库中,27 份样本均可注释到属的水平。

2.3.2 OTU 物种注释:注释到各分类等级的 OTU 比例分别为:门 91.4%,纲 84.3%,目 79.0%,科 72.7%,属 58.2%,种 31.5%。

2.3.3 样品复杂度分析:① 绘制 Shannon 及 Simpson 指数的箱线图(图 2)了解 Alpha 多样性,27 份样本 Shannon 指数约为 1.20, Simpson 指数约为 0.48,表明痰液样本中细菌物种丰富且较为复杂。② 从稀释

曲线(图 3)可以看出,随着取样量的增加,大多数样本中的菌群 OTU 趋于稳定,表明测序量较大,取样量接近饱和。样本量可以覆盖 VAP 感染细菌种类。但 T5、T16、T26、T25 等样本曲线仍未达到平台期,提示 VAP 痰液样本与其他环境物种相比,含有的物种种类相对较多,还存在未被测序检测到的物种。

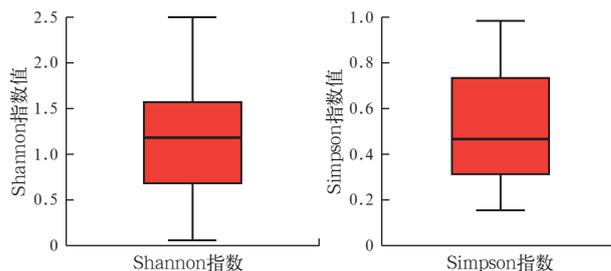
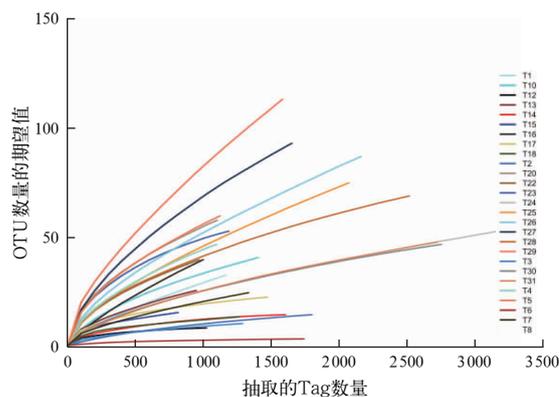


图 2 呼吸机相关性肺炎患者可用于上机测序的 27 份痰液样本 Alpha 多样性分布



注:Tag 为基因表达标签,OTU 为运转分类单位

图 3 呼吸机相关性肺炎患者可用于上机测序的 27 份痰液样本在 0.03 距离下的稀释曲线图

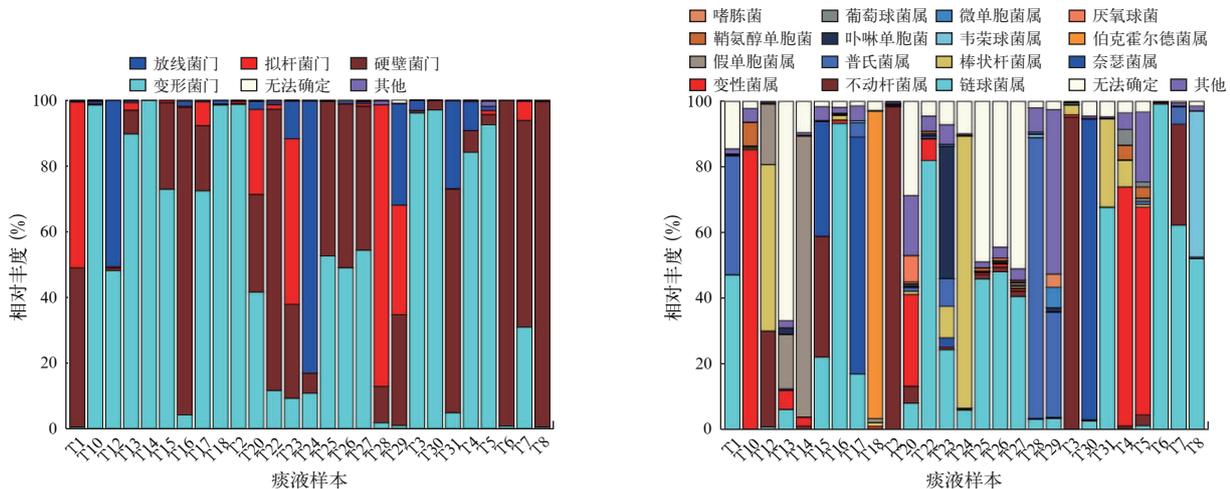
2.3.4 多样品比较分析:在门水平和属水平上绘制样本群落分布图(图 4),以此来直观地反映各样本的群落组成。无法确定的群落包含虽有分类信息但未分类的。图中只显示了部分丰度较高的群落,其余群落的累计显示为其他。通过图 4A 发现:27 份样本所有的序列中共出现 4 个已知的细菌门,即放线菌门(*Actinobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、硬壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)。通过图 4B 发现有 15 种致病菌属,但尚有大量难以鉴定到的致病菌。以属为分类标准,27 份样本中菌属检出率出现较高的依次为链球菌属 88.9%(24/27),变性菌属 77.8%(21/27),不动杆菌属 70.4%(19/27),鞘氨醇单胞菌属 63.0%(17/27),普氏菌属 63.0%(17/27),克雷伯菌属 55.6%(15/27),假单胞菌属 55.6%(15/27),水杆菌属 55.6%(15/27),棒状杆菌属

55.6%(15/27)。

27 份 VAP 痰液样本中具体菌属的分布及其丰度信息见表 1。当某个属、种等水平上的物种出现 14 份以上样本,即可认为该物种出现次数较高。

2.4 测序与细菌培养结果比较(表 2):16S rDNA 宏基因组测序可发现普通细菌培养未检测到的普氏菌

属、变性菌属、水杆菌属、鞘氨醇单胞菌属,其中前两者为厌氧菌属。两种方法共同检测到的 7 种菌属中,16S rDNA 宏基因组测序链球菌属、克雷伯菌属、不动杆菌属、棒状杆菌属的阳性率均高于普通细菌培养($P<0.05$ 或 $P<0.01$),假单胞菌属测序法阳性率较普通细菌培养法有增高趋势($P=0.050$);两种方



注:T1、T2……T31 为患者痰液样本的序号

图 4 31 例呼吸机相关性肺炎患者 27 份痰液样本中门水平(左)和属水平(右)的群落分布

表 1 31 例呼吸机相关性肺炎患者 27 份痰液样本中菌属的分布及其丰度信息

样本 序号	丰度值								
	棒状杆菌属	普氏菌属	链球菌属	鞘氨醇单胞菌属	水杆菌属	变性菌属	克雷伯菌属	不动杆菌属	假单胞菌属
T1	0	36.285 469	47.205 503	0	0	0	0.429 923	0	0
T10	0.500 715	0	0	7.296 137	1.216 023	85.193 133	0.071 531	0.143 062	0.429 185
T12	50.736 016	0	0.785 083	0	0	0.098 135	0	29.146 222	18.547 596
T13	0	0.423 729	6.144 068	0.105 932	0.211 864	5.826 271	0	0	16.631 356
T14	0	0	0	0.312 695	0.125 078	2.751 720	0.187 617	1.063 164	85.616 010
T15	0	0.246 609	22.071 517	0	0	0.123 305	0	36.744 760	0
T16	1.407 035	0.100 503	93.266 332	0.201 005	0	1.005 025	0	0	0.100 503
T17	0	4.362 645	16.973 415	0	0	0	0	0	0
T18	1.193 317	0	0.159 109	0	0.079 555	0.795 545	0	0	1.193 317
T2	0	0.278 862	0	0	0	0.278 862	0	98.326 827	0.055 772
T20	1.001 821	1.092 896	8.014 572	0.637 523	1.001 821	27.959 927	0.637 523	5.191 257	0.182 149
T22	0	0.620 476	82.006 205	0.723 888	0.206 825	6.514 995	0	0	0
T23	9.628 378	8.445 946	24.324 324	0	0	0.591 216	0	0.168 919	0
T24	82.872 928	0	5.893 186	0.368 324	0.061 387	0.030 694	0.092 081	0.521 793	0.030 694
T25	0	0	45.885 770	1.064 860	0.242 014	0.532 430	0.726 041	1.403 679	0.290 416
T26	0.232 019	0.139 211	48.074 246	0.881 670	0.603 248	0.881 671	1.299 304	1.438 515	0.417 633
T27	0.546 448	0.425 015	40.558 591	0.546 448	0.182 149	0.607 165	1.153 612	1.639 344	0.607 165
T28	0.079 713	85.571 941	3.148 665	0.039 857	0	0	0	0.079 713	0
T29	0	32.065 906	3.422 053	0	0.063 371	0	0.063 371	0.063 371	0
T3	3.037 383	0	0.155 763	0.155 763	0	0.700 935	0	95.093 458	0
T30	0.036 430	0	2.622 951	0.109 290	0.036 430	0.072 860	0.473 588	0.291 439	0.036 430
T31	26.767 305	0.036 819	67.673 049	0.110 457	0.036 819	0.036 819	0.257 732	0.147 275	0.036 819
T4	8.043 876	0	0.274 223	4.478 976	1.553 930	72.851 920	0.365 631	0.822 669	0
T5	0.803 571	0.982 143	1.160 714	3.303 571	3.482 143	63.303 571	0.803 571	3.303 571	0.892 857
T6	0	0	99.250 720	0	0	0.576 369	0.115 274	0	0
T7	0	5.271 084	62.274 096	0.075 301	0	0	0	30.798 193	0
T8	0	0.425 985	52.183 174	0	0	0	0.106 496	0	0

注:当某个 OTU 或者属、种等水平上的物种在 14 份以上样本中出现,即认为该物种出现的次数较高

表 2 16S rDNA 宏基因组测序和普通细菌培养两种方法对 27 例呼吸机相关性肺炎患者 27 份痰液样本检出率的比较

检测 方法	样本 数(份)	链球菌属 [% (份)]	假单胞菌属 [% (份)]	克雷伯菌属 [% (份)]	不动杆菌属 [% (份)]	棒状杆菌属 [% (份)]	葡萄球菌属 [% (份)]	奈瑟菌属 [% (份)]
普通细菌培养	27	18.5(5)	25.9(7)	18.5(5)	37.0(10)	7.4(2)	11.1(3)	3.7(1)
宏基因组测序	27	88.9(24)	55.6(15)	55.6(15)	70.4(19)	55.6(15)	7.4(2)	18.5(5)
P 值		0.000	0.050	0.013	0.004	0.000	1.000	0.125

法检测到的葡萄球菌属、奈瑟菌属的阳性率无差异(均 $P>0.05$)。本组普通细菌培养出 2 例窄食单胞菌属、3 例念珠菌属测序均为阴性。

3 讨论

本研究采用 16S rDNA 宏基因组测序技术并利用生物信息学分析流程研究 VAP 痰液细菌的菌种和丰度,并与普通细菌培养进行比较。16S rDNA 宏基因组测序技术是目前研究的热点,是一种先进的、完全的定量分析工具,它不仅可以对每种细菌在样本中所占的百分比做出定量,还可以对感染细菌种类做出鉴别,即通过对测序结果中单条序列的测序次数来反映物种在环境中的数量和丰度,避免了传统细菌培养技术需要活菌、耗时较长(通常 3~4 d)、抗菌药物使用使细菌生长受抑、微生物生长条件特殊等缺点^[8-9]。

本实验提取临床判断为 VAP 的患者 31 例,提取痰液标本 DNA,有 27 例患者的 16S rDNA 基因得到较好的扩增,扩增产量大,无明显副带。说明本研究选取的 DNA 提取方法、引物及 PCR 条件较好,能对痰液中 16S rDNA 进行良好的扩增。27 份痰液样本 DNA 的 16S rDNA V3~V5 区进行 454 测序共得到 103 856 条序列、39 Mb 的原始数据,得到 638 个 OTU。但稀释曲线可见大部分样本中的菌群 OTU 随着取样量的增加趋于稳定,即测序量较大,曲线趋于平台期,取样量接近饱和,基本可以覆盖样本中大部分感染细菌种类。提示 VAP 痰液样本与其他环境物种相比,含有的物种种类相对较多,但仍存在较多未被测序检测到的物种。Shannon 和 Simpson 指数是基于样本的所有 OTU 丰度和均匀度及其注释物种信息,反映痰液菌群中所有物种的种类数及每个物种个体数占群落中总个体数比例,Shannon 指数越大,Simpson 指数越接近于 0,则表示该样品中的物种越丰富^[10]。本研究 Shannon 指数约为 1.20,Simpson 指数约为 0.48,表明 VAP 痰液样本中细菌种类较丰富。

对于 16S rDNA 基因序列,通常认为序列之间有 97% 以上的相似性为同一菌种,95% 以上的相似性为同一菌属,80% 以上的相似性为同一个门^[11]。本研究以序列之间 97% 的相似性为分割依据,统计

各个样本中的 OTU,27 份痰液样本中有多于 79.0% 的 tag 序列注释到目的水平,58.2% 的 tag 序列能够注释到属的水平,而注释到种水平的 tag 序列低于 50%,选择属作为痰液样本的最佳分类水平,具体菌属的分布及其丰度信息可见,共出现放线菌门、拟杆菌门、硬壁菌门、变形菌门 4 个菌门。以属水平分类,优势菌属分别为棒状杆菌属、水杆菌属、假单胞菌属、克雷伯菌属、普氏菌属、链球菌属、不动杆菌属、变性菌属、鞘氨醇单胞菌属等。本研究得到的下呼吸道感染优势菌群结果与国内部分研究结果^[12-15]一致。但本研究仍有部分 VAP 患者痰液中存在较多未知及不能明确的病原菌,提示 VAP 痰液致病菌的复杂性和多样性。本研究 VAP 患者支气管肺泡灌洗液致病菌株不动杆菌属、克雷伯菌属、假单胞菌属的检出率分别高达 70.4%、55.6%、55.6%,结果表明多重耐药菌株可能长期定植,由于广谱抗菌药物筛选导致其成为致病菌株,Papadomichelakis 等^[16]研究结果支持本研究。本研究证实 VAP 常为多种多重耐药菌混合感染所致,与国内杨同宏^[17]的研究结果也一致。

在 16S rDNA 宏基因组测序与细菌培养结果的比较中,测序可发现普通细菌培养未检测到的普氏菌属、变性菌属、水杆菌属、鞘氨醇单胞菌属,其中前两者为厌氧菌属。分析其原因可能为普通细菌培养为需氧培养,未提供特殊厌氧培养基,无法鉴定出厌氧菌属。水杆菌属、鞘氨醇单胞菌属为近 10 余年新发现的菌种,其中鞘氨醇单胞菌属仅少动型可以致病^[18-19],且两菌属丰度均较低,普通细菌培养鉴定菌种是依据细菌生化特性和表型特征,故可能暂时无法获取阳性培养结果。但水杆菌属、鞘氨醇单胞菌属在临床 VAP 发病中的意义仍需探讨。在两种方法共同检测到的 7 种菌属中,测序法检测细菌阳性率亦高于普通细菌培养。本组 VAP 患者的痰液样本经普通细菌培养的 2 例为窄食单胞菌属、3 例为念珠菌属经 16S rDNA 测序分析均为阴性。本实验提取细菌 DNA,未提取真菌 DNA,故无法发现念珠菌属。2 例用测序法检测窄食单胞菌属为阴性,其原因:其一可能与样本数少有关;其二是由于分析的数据量有限,只能将本次研究得到的数据与现有的数据库

(RDP) 比对, 可能导致物种注释的结果失败^[20]。

综上所述, 本研究将 16S rDNA 宏基因组测序技术应用于 VAP 痰液病原学分析, 发现 VAP 痰液致病菌种复杂多样, 物种丰富, 多种多重耐药菌株定植于痰液中。与普通细菌培养比较, 测序法检测病原体阳性率更高。16S rDNA 基因测序技术以其高敏感度、高特异性、检测耗时短等多项优点, 未来可能替代微生物培养, 成为 VAP 病原学诊断的新方法。

参考文献

[1] Cook D. Ventilator associated pneumonia: perspectives on the burden of illness [J]. Intensive Care Med, 2000, 26 Suppl 1: S31-37.

[2] 蔡少华, 张进川, 钱桂生. 呼吸机相关肺炎的诊断研究进展[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12(9):566-569.

[3] 贾超, 邹晋梅, 朱伦刚. 呼吸机相关性肺炎病原学及临床相关因素分析[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(8):490.

[4] 马章林, 唐曙明, 楼许柏. 16SrRNA 在医学微生物鉴定中的应用探讨[J]. 吉林医学, 2011, 32(12):2291-2292.

[5] Craven DE, Chroneou A, Zias N, et al. Ventilator-associated tracheobronchitis: the impact of targeted antibiotic therapy on patient outcomes[J]. Chest, 2009, 135(2):521-528.

[6] 中华医学会呼吸病学分会. 医院获得性肺炎诊断和治疗指南(草案)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1999, 22(4):201.

[7] 杨国辉, 盛忠燕. 支气管肺泡灌洗液(1,3)-β-D 葡聚糖检测对重症监护病房患者侵袭性肺部真菌感染的诊断价值 [J]. 中国危重病急救医学, 2012, 24(2):90-95.

[8] Armougom F, Bittar F, Stremmler N, et al. Microbial diversity in the sputum of a cystic fibrosis patient studied with 16S rDNA pyrosequencing [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009, 28(9): 1151-1154.

[9] Price LB, Liu CM, Melendez JH, et al. Community analysis of chronic wound bacteria using 16S rRNA gene-based

pyrosequencing: impact of diabetes and antibiotics on chronic wound microbiota[J]. PLoS One, 2009, 4(7):e6462.

[10] Kemp PF, Aller JY. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2004, 47(2):161-177.

[11] Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology [J]. Int J Syst Bacteriol, 1994, 44(4):846-849.

[12] 刘克强, 司进, 张菊英, 等. 肺炎链球菌所致下呼吸道感染的耐药性分析[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11(4):242-244.

[13] 付静. 中西医结合治疗老年医院获得性肺炎的临床观察[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2002, 9(5):275.

[14] Thakuria B, Singh P, Agrawal S, et al. Profile of infective micro-organisms causing ventilator-associated pneumonia: A clinical study from resource limited intensive care unit [J]. J Anaesthesiol Clin Pharmacol, 2013, 29(3):361-366.

[15] Park DR. The microbiology of ventilator-associated pneumonia[J]. Respir Care, 2005, 50(6):742-763.

[16] Papadomichelakis E, Kontopidou F, Antoniadou A, et al. Screening for resistant gram-negative microorganisms to guide empiric therapy of subsequent infection [J]. Intensive Care Med, 2008, 34(12): 2169-2175.

[17] 杨同宏. ICU 呼吸机相关性肺炎患者病原菌的检测分析[J]. 中国实用医药, 2013, 8(11):78-79.

[18] Kalmbach S, Manz W, Wecke J, et al. Aquabacterium gen. nov., with description of Aquabacterium citratiphilum sp. nov., Aquabacterium parvum sp. nov. and Aquabacterium commune sp. nov., three in situ dominant bacterial species from the Berlin drinking water system[J]. Int J Syst Bacteriol, 1999, 49 Pt 2:769-777.

[19] 徐志康, 吴雄君, 童明华. 从血液中分离出一株少动鞘氨醇单胞菌[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(1):49.

[20] Maidak BL, Cole JR, Lilburn TG, et al. The RDP- II (Ribosomal Database Project) [J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29(1):173-174.

(收稿日期:2013-10-24)

(本文编辑:李银平)

• 科研新闻速递 •

维生素 D 缺乏不会增加严重脓毒症和创伤患者继发急性肺损伤的风险

最近, 美国学者进行了一项巢式病例对照研究, 旨在了解维生素 D 缺乏是否会增加脓毒症或创伤患者继发急性肺损伤 (ALI) 的风险。研究对象为来自美国一家三级医院重症监护病房 (ICU) 的 478 例脓毒症或创伤患者, 病例组为伴有 ALI/急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 的脓毒症或创伤患者, 对照组为相同数量的单纯脓毒症或创伤患者。主要检测指标为患者入院时血清中 25 羟维生素 D (25-OHD) 的水平。结果发现, 病例组与对照组患者的 25-OHD 水平并无明显差异。脓毒症患者在冬季更容易继发 ALI/ARDS (比值比为 1.68, 95% 可信区间为 1.05 ~ 2.69, P=0.03)。脓毒症和创伤患者的院内病死率与 25-OHD 水平无关, 但 25-OHD 缺乏的创伤患者 1 年内的死亡风险增加 (风险比为 0.50, 95% 可信区间为 0.35 ~ 0.72, P=0.001)。因此, 研究人员据此得出结论: 维生素 D 缺乏不会增加严重脓毒症和创伤患者继发 ALI 的风险, 但维生素 D 缺乏可能会增加创伤患者 1 年内的死亡风险。

罗红敏, 编译自《Ann Intensive Care》, 2014, 4(1):5

质子泵抑制剂不会增加患者社区获得性肺炎的发生风险

以往的一些观察性研究显示, 质子泵抑制剂 (PPI) 会增加患者社区获得性肺炎 (CAP) 的发生风险, 但这些研究均存在一些缺陷, 因而其结论并非十分可靠。因此, 加拿大学者进行了一项队列研究, 旨在了解 PPI 与 CAP 之间的关系。研究对象为来自加拿大、美国和英国 8 个数据库中使用 PPI 来预防非甾体类抗炎药 (NSAID) 所致消化性溃疡的患者 (年龄 > 40 岁), 评价指标为患者用药 6 个月内因社区获得性肺炎而住院 (HCAP) 的比例。结果显示: 8 个数据库中共有 4 238 504 例新服用 NSAID 的患者, 其中有 2.3% 的患者同时预防性地服用了 PPI; PPI 治疗组患者 HCAP 的比例为 0.17%, 对照组为 0.12%, 两组患者发生 HCAP 的风险相当 (比值比为 1.05, 95% 可信区间为 0.89 ~ 1.25)。研究人员据此得出结论: PPI 并不会增加患者发生 CAP 的风险。

罗红敏, 编译自《Gut》, 2014, 63(4): 552-558