

DOI:10.13350/j.cjpb.221016

• 临床研究 •

慢性阻塞性肺疾病患者肺泡灌洗液宏基因组测序分析

肖雄,许毅娇,陈志盛,张清伟,黄锦贤,张辉军*

(复旦大学附属中山医院厦门医院呼吸科,福建厦门 361000)

【摘要】 **目的** 评价 PMseq 病原微生物宏基因组测序检测用于慢性阻塞性肺疾病(COPD)合并肺部感染患者诊断的价值。**方法** 以 2019 年 11 月至 2022 年 5 月在呼吸科确诊的 67 例稳定期 COPD 患者(合并肺部感染 47 例)为研究对象,同时采用肺泡灌洗液培养和 PMseq 病原微生物宏基因组测序,对培养及测序鉴定出的病原体进行描述性分析,并对检测结果进行比较分析。**结果** 67 例稳定期 COPD 患者中,宏基因组测序阳性 65 例、肺泡灌洗液培养阳性 28 例,差异有统计学意义($\chi^2 = 48.11, P < 0.01$)。其中,宏基因组测序和肺泡灌洗液培养均阳性 27 例。该 27 例患者中,宏基因组测序和肺泡灌洗液培养检测结果完全一致 8 例、部分一致 12 例、不一致 7 例($Kappa$ 值 = 0.46)。28 例肺泡灌洗液培养阳性患者中以细菌感染多见,其中链球菌属及奈瑟菌感染分别为 19 例和 17 例,肠球菌感染 5 例,金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌各 1 例;真菌感染以念珠菌多见(5 例),土曲霉菌感染 1 例。65 例高通量测序阳性 COPD 患者细菌感染以链球菌属为主,真菌感染以曲霉菌为主(5 例)。高通量测序患者中,46 例为 2 种及以上病原体感染,21 例为单一病原体感染。**结论** COPD 合并肺部感染患者病原体谱广,并存在混合感染。PMseq 病原微生物宏基因组测序法敏感、特异,可用于 COPD 患者感染的病原体精准诊断,值得临床推广应用。

【关键词】 慢性阻塞性肺疾病;宏基因组;高通量测序;肺泡灌洗液;临床价值

【中图分类号】 R378

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)10-1188-04

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Oct.;17(10):1188-1191.]

Metagenomic sequencing of bronchoalveolar lavage fluids among patients with chronic obstructive pulmonary disease***

XIAO Xiong, XU Yi-jiao, CHEN Zhi-sheng, ZHANG Qing-wei, HUANG Jin-xian, ZHANG Hui-jun
(Department of Respiration, Zhongshan Hospital (Xiamen), Fudan University; Xiamen, Fujian 361000, China)

【Abstract】 **Objective** To evaluate the value of PMSeq high-throughput pathogenic tests for detection of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients. **Methods** A total of 67 patients with stable COPD that were definitively diagnosed at department of respiration during the period from November 2019 to May 2022 (including 47 cases complicated by pulmonary infections) were enrolled as the study subjects, and received cultures and PMSeq high-throughput pathogenic tests of bronchoalveolar lavage fluids. The pathogens identified by culturing and sequencing were descriptively analyzed, and the detection results were compared between the two methods. **Results** Among the 67 patients with stable COPD, there were 65 patients positive for PMSeq high-throughput pathogenic tests and 28 culture-positive patients ($\chi^2 = 48.11, P < 0.01$), including 27 patients positive for both high-throughput pathogenic tests and bronchoalveolar lavage fluid cultures. Among these 27 patients, there were 8 patients with completely consistent results between high-throughput pathogenic tests and bronchoalveolar lavage fluid cultures, 12 patients with partial consistence and 7 patients with inconsistent results ($Kappa$ value = 0.46). Among the 28 culture-positive COPD patients, *Streptococcus* (19 patients) and *Neisseria* (17 patients) were the most common bacterial species, followed by *Enterococcus* (5 patients), and *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Nocardia* were detected in one patient. There were 6 COPD patients detected with *Candida* infection, and 5 patients with *Aspergillus fumigatus* and *Mycobacterium* infections each. Of the 65 patients positive for PMSeq high-throughput pathogenic tests, *Streptococcus* was the predominant bacterial species and *Aspergillus* was the predominant fungal species;. Among all patients receiving PMSeq high-throughput pathogenic tests, there were 46 patients with infections of two and more pathogens, and 21 patients with a single pathogen infection. **Conclusion** There are a wide range of pathogens identified in COPD patients complicated by pulmonary infections, among whom mixed infections are detected. PMSeq high-throughput pathogenic testing is a sensitive and specific method for precision diagnosis of pathogens among COPD patients, which deserves widespread clinical applications.

* **【基金项目】** 厦门市科学技术局医疗卫生指导性项目(No. 3502Z20199037)。

** **【通讯作者】** 张辉军, E-mail: hjzhang021@163.com

【作者简介】 肖雄(1984-),男,江西于都人,本科,副主任医师,主要研究方向:慢性气道疾病、肺部感染。E-mail: xiaoxiong8411@163.com

【Key words】 Chronic obstructive pulmonary disease; metagenomics; high-throughput sequencing; bronchoalveolar lavage fluid; clinical value

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是一种常见、多发的严重危害人类健康的慢性炎症性肺部疾病,是健康保健的主要研究课题^[1]。全球一般人群 COPD 患病率为 12.0%,其中男性患病率为 15.7%、女性为 9.9%,造成的疾病负担高达 6400 万伤残调整寿命年(DALYs)^[2]。2019 年,COPD 导致全球 323 万人死亡,是全球第三大死因^[3]。据推测,2030 年全球有 450 万人死于 COPD 及其相关疾病,2060 年全球有 540 万人死于 COPD 及其相关疾病^[4]。我国 COPD 患者高达 1 亿人,其中成人 COPD 患病率达 8.6%、40 岁以上人群 COPD 患病率达 13.6%^[5],每年约 100 万人死于 COPD^[6]。

COPD 可导致呼吸道感染、心脏疾病、肺癌、抑郁等多种并发症^[1]。目前,COPD 尚无有效治愈方法^[7]。早期诊断、早期干预是改善患者 COPD 症状、提升患者生活质量的重要措施^[1]。COPD 是常见成人肺部疾病,肺部微生物组在 COPD 发病中发挥重要作用,而呼吸道微生物组构成与 COPD 严重性相关^[8-10]。本研究采用 PMseq 病原微生物宏基因组测序检测 COPD 患者肺泡灌洗液微生物组表达谱,旨在为 COPD 精准治疗提供参考依据。

对象与方法

1 病例

收集 2019 年 11 月至 2022 年 5 月在本院呼吸科确诊的稳定期 COPD 患者 67 例,均符合《慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013 年修订版)》^[11]的诊断标准。患者均处于病情缓解稳定期,近 3 个月内患者咳痰、呼吸困难或喘息症状稳定,近 2 个月未出现急性上呼吸道感染,近 4 周内未使用抗菌药物或全身性激素,排除哮喘、肺癌、支气管扩张症、肺结核及严重心、肝、脑肾、癌症、血液系统疾病、自身免疫系统疾病患者。根据是否合并肺部感染将患者分为两组:COPD 合并肺部感染组和单纯 COPD 组。

本研究获得复旦大学附属中山医院厦门医院医学伦理审查委员会批准,所有患者均签署知情同意书。

2 方法

2.1 呼吸道标本采集 用 1%利多卡因液雾化进行呼吸道局部麻醉,静脉推注咪达唑仑 2 mg,患者取仰卧位。用电子支气管镜行肺泡灌洗,单纯 COPD 组患者将气管镜嵌入右肺中叶的一个亚段,合并肺部感染组灌洗病变所在亚段,灌洗过程中,将气管镜顶端要紧密嵌顿亚段支气管开口,防止大气道分泌物混入和灌

洗液外渗。共注入加热至 37 °C 的灭菌生理盐水 150 mL,每次 20~50 mL,总回收率 $\geq 30\%$ 。回收后进行初步质控。标本合格要求:(1)灌洗液中无大气道分泌物混入;(2)回收率 $> 40\%$,活细胞比例占 95%以上;(3)红细胞比例 $< 10\%$,上皮细胞比例 $< 5\%$;(4)细胞形态完整、无变形,分布均匀。然后将标本分装,高速离心,留取沉淀物,放置 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。同时留取 5~10 mL 灌洗液做细菌培养。

2.2 肺泡灌洗液培养 第 0~8 d 每日观察肺泡灌洗液培养情况,若出现阳性则随访至第 14 d,记录灌洗液培养阳性时间、细菌种类。取 2 mL 培养阳性的肺泡灌洗液标本进行宏基因组测序。

2.3 PMseq 病原微生物宏基因组测序

2.3.1 标本处理及 DNA 提取 取 600 μL 患者肺泡灌洗液,经玻璃珠混合震荡后采用 TIANamp Micro DNA Kit (天根生物科技有限公司产品)按说明书步骤提取 DNA。提取的 DNA 超声破碎至 200~300 bp 大小的片段备用。

2.3.2 文库构建和测序 使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 质控文库插入片段大小,使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)质控 DNA 文库浓度,经环化形成单链环形结构。环化后的文库经滚环复制生成 DNB 纳米球。制备的 DNB 纳米球加载到测序芯片,使用 MGISEQ-200 高通量基因测序仪进行宏基因组测序。

2.3.3 数据分析 测序数据去除低质量和长度小于 35 bp 的数据后,获得高质量数据。通过 BWA 网站 (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>) 比对将高质量数据中比对上人参考基因组序列的数据去除^[12]。剩余数据在去除低复杂度 reads 后与专用细菌(6 350 种)、真菌(1 064 种)、病毒(4 945 种)和寄生虫(234 种)4 个微生物数据库比对,获得能够匹配到某种病原体的序列数,根据序列数及其他临床检测以判断可能的病原体。

2.4 数据分析 实验结果采用 SAS 8.0 软件建立数据库,应用 PASW 18.0 软件进行统计分析。组间率或百分比(%)的比较采用 χ^2 检验,采用 *Kappa* 值评价检测方法的一致性, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

结果

1 病例特征

67 例 COPD 患者中合并肺部感染 47 例,单纯 COPD 20 例,分别占 70.15%和 29.85%;年龄 32~91 岁,平均(64.9 \pm 10.1)岁;轻度肺部阻塞 22 例,中度阻

塞4例,重度阻塞7例,分别占32.84%、57.90%和10.45%。两组患者性别构成、年龄构成及肺部阻塞程度差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)(表1)。

表1 COPD合并肺部感染组和单纯COPD组患者人口学和临床特征比较

特征 Clinical features	COPD合并肺部感染组 (n=47) COPD-pulmonary infection combination group		单纯COPD组 (n=20) COPD alone group		χ^2	P	
	例数 No.	占比(%) Rate	例数 No.	占比(%) Rate			
性别 (例)	男	31	65.96	17	85.00	2.50	>0.05
	女	16	34.04	3	15.00		
年龄 (岁)	<60	9	19.15	3	15.00	2.38	>0.05
	60~<75	31	65.96	15	75.00		
	≥75	7	14.89	2	10.00		
肺功能 (例)	轻度阻塞	18	38.30	4	20.00	1.99	>0.05
	中度阻塞	3	6.38	1	5.00		
	重度阻塞	6	12.76	1	5.00		
	不详	20	42.55	14	70.00		

2 肺泡灌洗液培养结果

COPD患者中28例肺泡灌洗液培养阳性,其中细菌感染以链球菌属及奈瑟菌多见(分别为19例和17例),考虑为气道定植菌可能;肠球菌感染5例,金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、诺卡菌及分枝杆菌感染各1例。真菌感染以念珠菌多见(5例),不除外口腔污染可能;土曲霉菌感染1例。

3 宏基因组测序结果

宏基因组测序共检出65例阳性患者,感染细菌以链球菌属(27例)、普雷沃菌属(14例)、嗜血杆菌属(13例)、假单胞菌属(10例)、放线菌属(6例)多见(图1);分枝杆菌感染5例,其中2例为副胞内分枝杆菌感染、2例为结核分枝杆菌感染、1例为脓肿分枝杆菌感染。感染真菌以烟曲霉多见(5例)(图2)。高通量测序患者中,46例为2种及以上病原体感染,21例为单一病原体感染。

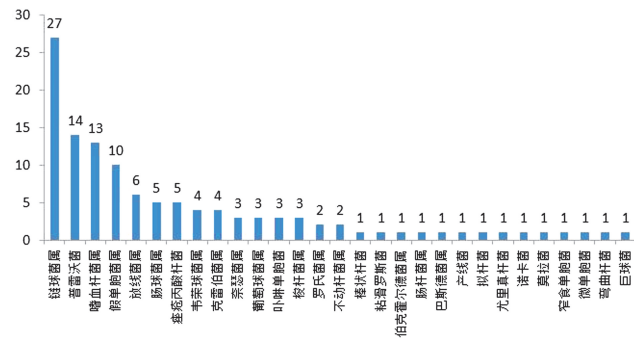


图1 宏基因组测序检出的细菌种类和感染者数量

Fig. 1 Detection of bacteria species and number of infected COPD patients using metagenomic sequencing

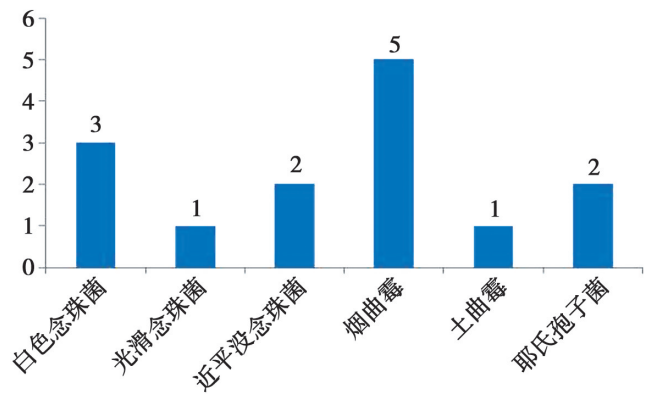


图2 宏基因组测序检出的真菌种类和感染者数量

Fig. 2 Detection of fungi species and number of infected COPD patients using metagenomic sequencing

4 宏基因组测序和肺泡灌洗液培养结果的一致性

67例COPD患者中,宏基因组测序阳性65例、肺泡灌洗液培养阳性28例,差异有统计学意义($\chi^2=48.11, P<0.01$)。其中,宏基因组测序和肺泡灌洗液培养均阳性27例。该27例患者中,检测结果完全一致8例,部分一致12例、不一致7例(Kappa值=0.46)(图3)。

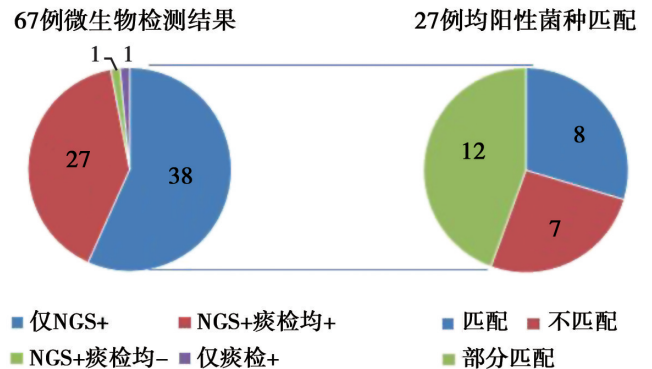


图3 宏基因组测序和肺泡灌洗液培养结果比较

Fig. 3 Comparison of metagenomic sequencing and bronchoalveolar lavage fluid culture results

讨论

作为一种无需微生物分离培养的快速检测技术,高通量测序技术近年来得到快速发展,其不仅可以检出难以培养的优势微生物,还能确定标本中多数微生物的相对丰度^[13]。因此,高通量测序技术已广泛应用于水土环境检测、人体肠道微生物检测、食品生产加工等多个领域^[14-16]。在感染性疾病分子诊断方面,高通量测序克服了多数病原体不能培养的弊端,且能够准确高效地获得全部病原体遗传物质信息,直接检测出感染性疾病的病原体,对未知感染性疾病诊断具有重要参考价值,因此在感染性疾病中得到广泛应用^[17]。

Duan等^[18]对109份临床标本同时进行高通量测序和培养法检测,结果显示高通量测序法的敏感性显

著高于培养法(67.4%和23.6%, $P<0.01$),特别是对于肺泡灌洗液($P<0.01$)、血液($P<0.01$)和痰液培养($P<0.05$)的检测,但两种方法的特异性差异无统计学意义(68.8%和81.3%, $P>0.05$)。Miao等^[19]对347份感染性疾病患者临床标本、119份非感染性疾病临床标本和34份未知临床标本同时进行高通量测序和培养检测,结果显示高通量测序诊断感染性疾病的敏感性和特异性分别为50.7%和85.7%,高于培养法,特别是用于检测结核分枝杆菌(比值比=4, $P<0.01$)、病毒($P<0.01$)、厌氧菌($P<0.01$)和真菌(比值比=4, $P<0.01$)。此外,高通量测序对于未接受抗生素治疗的COPD患者病原体感染诊断的敏感性高于培养法(52.5%和34.2%, $P<0.01$)。Xie等^[20]采用高通量测序技术对159例社区获得性肺炎患者进行检测,发现高通量测序技术较其他方法可在更多社区获得性肺炎患者中检出更多病原体,且检出大量多种微生物感染。此外,高通量测序检出结果可使59.3%(35/59)的患者诊疗方案得以确认或更改,并使这些患者的临床结局得到显著改善。

肺泡灌洗液和痰液标本培养在COPD诊断中具有重要价值^[21],但由于肺泡灌洗液和痰液标本存在定植菌污染,目前成熟的分子诊断方法较少。高通量测序技术能够准确鉴定肺泡灌洗液和痰液标本中的已知病原体、鉴定新的未知病原体,分析标本中病原体的物种丰度和分布,无须构建文库,极大缩减了分析周期及检测成本^[17-19]。齐玉晶等^[22]通过基于16S rRNA高通量测序分析发现,COPD急性加重患者诱导痰微生物多样性低于稳定期患者,急性加重患者诱导痰菌群丰度高于稳定期患者,而急性加重患者诱导痰常见致病菌构成比较稳定期患者增多。此外,相对于轻、中度COPD患者,重度、极重度COPD患者肠道细菌多样性显著下降,特别是变形菌门和后壁菌门细菌^[23]。

本研究采用PMseq病原微生物宏基因组测序检测COPD患者肺泡灌洗液微生物组表达谱,65例高通量测序阳性COPD患者中检出的细菌以链球菌属为主,真菌以烟曲霉为主,并检出5例分枝杆菌感染、1例支原体感染和1例巨细胞病毒感染,表明PMseq病原微生物宏基因组测序较肺泡灌洗液培养可检出更多阳性者及更多病原体,与文献^[18-20]报道的结果一致,因此可用于COPD患者病原体感染的精准诊断,值得临床推广应用。

【参考文献】

[1] Christenson SA, Smith BM, Bafadhel M, et al. Chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Lancet*, 2022, 399 (10342): 2227-2242.
[2] Ruvuna L, Sood A. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Clin Chest Med*, 2020, 41(3): 315-327.

[3] Halpin DMG, Criner GJ, Papi A, et al. Global initiative for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease. The 2020 GOLD science committee report on COVID-19 and chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2021, 203(1): 24-36.
[4] Gupta N, Agrawal S, Chakrabarti S, et al. COPD 2020 Guidelines - what is new and why? [J]. *Adv Respir Med*, 2020, 88(1): 38-40.
[5] Fang L, Gao P, Bao H, et al. Chronic obstructive pulmonary disease in China: a nationwide prevalence study [J]. *Lancet Respir Med*, 2018, 6(6): 421-430.
[6] Zhu B, Wang Y, Ming J, et al. Disease burden of COPD in China: a systematic review [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2018 (13): 1353-1364.
[7] Negewo NA, Gibson PG, McDonald VM. COPD and its comorbidities: Impact, measurement and mechanisms [J]. *Respirology*, 2015, 20(8): 1160-1171.
[8] Mammen MJ, Sethi S. COPD and the microbiome [J]. *Respirology*, 2016, 21(4): 590-599.
[9] Wang Z, Bafadhel M, Haldar K, et al. Lung microbiome dynamics in COPD exacerbations [J]. *Eur Respir J*, 2016, 47(4): 1082-1092.
[10] Man WH, de Steenhuijsen Piters WA, Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15(5): 259-270.
[11] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013年修订版) [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2013, 36(4): 255-264.
[12] Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(14): 1754-1760.
[13] Fox S, Filichkin S, Mockler TC. Applications of ultra-high-throughput sequencing [J]. *Methods Mol Biol*, 2009 (553): 79-108.
[14] Quijada NM, Hernandez M, Rodriguez-Lazaro D. High-throughput sequencing and food microbiology [J]. *Adv Food Nutr Res*, 2020(91): 275-300.
[15] Chan AW, Naphtali J, Schellhorn HE. High-throughput DNA sequencing technologies for water and wastewater analysis [J]. *Sci Prog*, 2019, 102(4): 351-376.
[16] Hu J, Zhong X, Yan J, et al. High-throughput sequencing analysis of intestinal flora changes in ESRD and CKD patients [J]. *BMC Nephrol*, 2020, 21(1): 12.
[17] Boyd SD. Diagnostic applications of high-throughput DNA sequencing [J]. *Annu Rev Pathol*, 2013(8): 381-410.
[18] Duan H, Li X, Mei A, et al. The diagnostic value of metagenomic next-generation sequencing in infectious diseases [J]. *BMC Infect Dis*, 2021, 21(1): 62.
[19] Miao Q, Ma Y, Wang Q, et al. Microbiological diagnostic performance of metagenomic next-generation sequencing when applied to clinical practice [J]. *Clin Infect Dis*, 2018, 67(suppl 2): S231-S240.
[20] Xie F, Duan Z, Zeng W, et al. Clinical metagenomics assessments improve diagnosis and outcomes in community-acquired pneumonia [J]. *BMC Infect Dis*, 2021, 21(1): 352.
[21] Riley CM, Sciruba FC. Diagnosis and outpatient management of chronic obstructive pulmonary disease: A review [J]. *JAMA*, 2019, 321(8): 786-797.
[22] 齐玉晶, 王哲, 孙雪皎, 等. 基于16S rRNA基因高通量测序分析慢性阻塞性肺疾病急性加重患者的诱导痰微生物多样性 [J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2020, 19(4): 359-365.
[23] Millares L, Ferrari R, Gallego M, et al. Bronchial microbiome of severe COPD patients colonised by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2014, 33(7): 1101-1111.