

RDS 合并呼吸机相关性肺炎新生儿肺部菌群多样性分析

田甜, 韦海林, 陆敦, 陆岩

(河池市妇幼保健院儿科, 广西省河池市 547000)

[关键词] 新生儿呼吸窘迫综合征; 呼吸机相关性肺炎; 肺部菌群; 菌群丰度

[摘要] 目的 研究呼吸窘迫综合征(RDS)合并呼吸机相关性肺炎(VAP)新生儿的机械通气时间与其肺部菌群多样性之间的关系。方法 选择行气管插管 RDS 新生儿 70 例, 根据是否并发 VAP 分为 VAP 组和对照组。气管插管第 1~5 天采集两组患儿痰液标本, 进行细菌 DNA 提取、PCR 扩增以及变性梯度凝胶电泳试验, 比较两组患儿肺部菌群丰度以及香农-维纳指数。结果 VAP 组患儿机械通气时间、拔管后吸氧时间、重复插管上机率及死亡率高于对照组($P<0.05$)。VAP 组 30 例患儿中共检出 36 株菌株, 以革兰氏阴性菌为主(72.22%), VAP 组第 2~4 天肺部菌群丰度和香农-维纳指数均小于对照组($P<0.05$)。结论 RDS 患儿机械通气过程中 VAP 发生率高, 机械通气过程中肺部菌群多样性降低可提示 VAP 的发生。

[中图分类号] R725.6

[文献标识码] A

Analysis of pulmonary flora diversity in neonatal respiratory distress syndrome complicated with ventilator-associated pneumonia

TIAN Tian, WEI Hailin, LU Dun, LU Yan

(Department of Pediatrics, Hechi Maternal and Child Health Hospital, Hechi, Guangxi 547000, China)

[KEY WORDS] neonatal respiratory distress syndrome; ventilator-associated pneumonia; pulmonary flora; species richness

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between mechanical ventilation time and pulmonary flora diversity in neonatal respiratory distress syndrome (RDS) complicated with ventilator-associated pneumonia (VAP).

Methods Seventy neonates with RDS receiving endotracheal intubation and ventilation were enrolled, and divided into two groups according to the presence or absence of VAP, VAP group and control group. Sputum specimens were collected on the 1st to 5th day of endotracheal intubation (D1~D5) for bacterial DNA extraction, polymerase chain reaction (PCR) amplification and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) test. Then the species richness and Shannon-Wiener index of two groups were compared.

Results The mechanical ventilation time, oxygen inhalation time after extubation, repetition intubation, rate mortality rate of VAP group was significantly higher than that of control group ($P<0.05$). A total of 36 strains were isolated in VAP group, which were dominated by Gram-negative bacteria (72.22%).

The species richness and Shannon-Wiener index at D2~D4 were significantly lower in VAP group than in control group, with statistical difference (all $P<0.05$).

Conclusion Neonates with RDS are at high risk of VAP during mechanical ventilation, and a reduction in pulmonary flora diversity during mechanical ventilation may suggest the development of VAP.

随着新生儿重症监护室(neonatal intensive care unit, NICU)技术的不断完善,新生儿呼吸窘迫综合征(respiratory distress syndrome, RDS)的抢救效果得到明显提高,机械通气等呼吸支持治疗能有效改善其临床症状,但也带来了呼吸机相关性肺炎(ventilator associated pneumonia, VAP)问题, VAP 不

仅会增加治疗时间与费用,还可导致呼吸系统后遗症^[1-3]。了解 RDS 合并 VAP 患儿肺部菌群特征,以指导临床抗生素选择,对尽早控制感染、改善患儿预后具有重要意义。随着抗生素的广泛使用致病菌菌种不断变迁,为了解近年 VAP 患儿肺部主要致病菌及菌群多样性特点,本研究对 RDS 合并 VAP

[收稿日期] 2021-06-12

[修回日期] 2021-11-23

[基金项目] 河池市科学技术局项目(河科 AB200742)

[作者简介] 田甜,副主任医师,研究方向为新生儿疾病诊治, E-mail 为 318798079@qq.com。

新生儿肺部致病菌分布以及菌群多样性特征进行了分析,现报道如下。

1 资料和方法

1.1 研究对象

选择本院 2017 年 1 月—2021 年 1 月行气管插管 RDS 新生儿 70 例,根据是否并发 VAP 分为 VAP 组(30 例)和对照组(40 例)。VAP 诊断标准参考文献^[4]。纳入标准:符合新生儿 RDS 诊断标准^[5],

患儿具有发生 RDS 的高危因素,临床有呼吸窘迫相关表现,体格检查可见胸廓扁平,听诊呼吸音低,偶可闻及细湿啰音,联合胸部 X 线片、血气分析、泡沫试验即可确诊;均参考文献^[6]进行 RDS 评分。排除标准:排除新生儿湿肺、胎粪吸入、产时窒息致 RDS,合并呼吸系统先天发育畸形;合并先天性心脏病。本研究经本院伦理委员会批准,家长知情同意。新生儿 RDS 评分 VAP 组高于对照组($P < 0.05$),两组其他临床资料比较差异无显著性($P > 0.05$;表 1)。

表 1 两组临床资料的比较

分组	n	母亲孕期合并症/[例(%)]		新生儿出生抢救史/[例(%)]			新生儿 RDS 评分/分
		妊娠期高血压	妊娠期糖尿病	吸氧	气管插管	心脏按压	
对照组	40	8(20.00)	5(12.50)	7(17.50)	2(5.00)	3(7.50)	5.34±1.03
VAP 组	30	7(23.33)	4(13.33)	5(16.67)	1(3.33)	2(6.67)	5.61±1.16 ^a

注:a 为 $P < 0.05$,与对照组比较。

1.2 细菌分离与鉴定

于患儿机械通气 48 h 后,应用抗生素治疗前,采集痰液标本,制备痰液震荡液,接种于哥伦比亚血平板与流感嗜血杆菌分离平板,MicroScan WalkAway-40 全自动细菌鉴定/药敏测试仪鉴定细菌种属。

1.3 菌群丰度和香农-维纳指数的测定

分别于气管插管第 1、2、3、4、5 天采集患儿痰液标本。应用细菌微量 DNA 提取试剂盒提取 DNA,PCR 扩增反应采用细菌 16SrDNA V3 区基因片段设计通用引物,引物设计由上海生工公司合成。上游引物 5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCAGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3',下游引物 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'。反应体系包括 DNA 原液 6 μ L,预混液 25 μ L,上游引物 0.5 μ L,下游引物 0.5 μ L,ddH₂O 18 μ L。循环程序 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共循环 10 次;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,

共循环 25 次;72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。参考文献^[7]进行 DGGE 检测,PCR 产物序列为 195 bp,采用 Decode 系统进行 DGGE 分析。采用 Quantity One (BIO-RAD, America) 软件对 DGGE 条带数目(丰度)与相似度进行检测,并将数据导入 BIO-DAP 软件计算香农-维纳指数^[8]。

1.4 统计学方法

采用 SPSS19.0 统计软件处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内不同时间比较采用方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。计数资料以例(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患儿机械通气和预后情况的比较

VAP 组机械通气时间、拔管后吸氧时间、重复插管上机率、死亡率均高于对照组($P < 0.05$;表 2)。

表 2 两组患儿机械通气和预后情况的比较

分组	n	机械通气时间/天	拔管后吸氧时间/h	重复插管上机/[例(%)]	死亡/[例(%)]
对照组	40	4.61±1.47	73.41±16.53	2(5.00)	2(5.00)
VAP 组	30	7.63±2.16 ^a	98.41±17.41 ^a	7(23.33) ^a	9(30.00) ^a

注:a 为 $P < 0.05$,与对照组比较。

2.2 病原菌分布情况

VAP 组 30 例患儿共检出 36 株菌株,以革兰氏

阴性菌为主;检出率前 3 位的病原菌分别为肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌和肺炎链球菌(表 3)。

表 3 VAP 病原菌分布的情况 ($n=36$)

单位:株(%)

革兰氏阴性菌	分布	革兰氏阳性菌	分布
肺炎克雷伯菌	9(25.00)	肺炎链球菌	4(11.11)
鲍曼不动杆菌	8(22.22)	金黄色葡萄球菌	2(5.56)
铜绿假单胞菌	3(8.33)	表皮葡萄球菌	3(8.33)
大肠埃希菌	3(8.33)	液化沙雷菌	1(2.78)
产气肠杆菌	3(8.33)		
合计	26(72.22)	合计	10(27.78)

2.3 两组菌群丰度的比较

两组患儿菌群丰度均从治疗第 2 天即上升,且在第 3~5 天时维持较高水平,且 VAP 组第 2~4 天菌群丰度低于对照组($P<0.05$;表 4)。

2.4 两组香农-维纳指数的比较

对照组肺部菌群香农-维纳指数从第 2 天即上升,且在第 3~5 天维持较高水平,VAP 组从第 3 天开始上升,在第 4~5 天维持较高水平;且 VAP 组第 2~4 天香农-维纳指数显著低于对照组($P<0.05$;表 5)。

表 4 两组患儿菌群丰度的比较

分组	n	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
对照组	40	21.79±3.36	35.79±8.06 ^a	42.16±7.15 ^a	42.09±7.88 ^a	41.74±6.78 ^a
VAP 组	30	22.03±4.46	27.98±5.69 ^{ab}	36.41±8.16 ^{ab}	37.11±6.85 ^{ab}	40.15±7.15 ^a

注:a 为 $P<0.05$,与同组第 1 天比较;b 为 $P<0.05$,与同时间对照组比较。

表 5 两组患儿痰液菌群香农-维纳指数的比较

分组	n	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
对照组	40	2.61±0.46	3.11±0.41 ^a	3.46±0.37 ^a	3.42±0.13 ^a	3.31±0.16 ^a
VAP 组	30	2.59±0.39	2.79±0.43 ^b	3.01±0.33 ^{ab}	3.13±0.25 ^{ab}	3.23±0.19 ^a

注:a 为 $P<0.05$,与同组第 1 天比较;b 为 $P<0.05$,与同时间对照组比较。

3 讨 论

机械通气等呼吸支持治疗可有效改善 RDS 患儿临床症状,改善患儿预后,但长期使用呼吸机将引起 VAP,VAP 已成为撤机困难、延长患儿住院时间的主要原因。VAP 的发生将增加 RDS 的治疗难度,并增加不良预后发生风险。本研究中 70 例 RDS 患者共 30 例发生 VAP,VAP 发生率为 42.86%。VAP 组患儿死亡率远高于对照组,提示 VAP 的发生将增加不良预后发生风险,这与谢朝云等^[9]研究结论一致。VAP 组患儿治疗前 RDS 评分更高、机械通气时间和拔管后吸氧时间更长,重复插管次数也更多,提示以上因素可能是增加 VAP 风险的危险因素。

明确 VAP 常见致病菌,在早期经验性用药和改善患儿预后中具有重要意义。本研究采集 VAP 组患儿痰液行细菌培养发现,VAP 组 30 例患儿中共检出 36 株菌株,以革兰氏阴性菌为主,检出率排前 3 位的病原菌分别为肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌和肺炎链球菌,鉴于药敏试验结果,建议临床经验性选择亚胺培南、环丙沙星等药物进行治疗。

既往研究认为,VAP 的发病机制主要包括气管

插管表面细菌吸入或外界环境中病原菌入侵两方面,且很长一段时间内,肺部被认为是无菌的。随着研究技术的不断进步,高通量测序技术不断促进微生物组学的发展,该认知逐渐被颠覆。16S rRNA 是现临床应用范围最广的基因测序技术,可鉴别出不能培养的细菌^[10],Guss 等^[11]利用 16S rRNA 技术,在囊性纤维化患者痰液中发现了 60 多种细菌,提示肺部菌群是一个复杂的微生态系统,且有研究提出,机械通气患者肺部微生态失衡,正常负反馈机制被破坏,是导致感染的重要原因^[12]。彭纯颖等^[13]研究报道,VAP 患儿肺部菌群物种多样性及丰度均发生明显改变。基于以上研究,说明 RDS 合并 VAP 患儿也可能存在肺部微生态失衡。

本研究借助 16S rRNA 技术,对 VAP 患儿肺部菌群多样性进行研究,并凭借 DGGE 技术对细菌丰度以及香农-维纳指数进行定量。结果提示,气管插管初期,VAP 组患儿及对照组患儿肺部菌群多样性均较低,而随着插管时间的不断延长,两组肺部菌群多样性不断增高,说明随着插管时间的延长,患儿肺部细菌种类逐渐增多。但在插管治疗第 2~4 天时,感染 VAP 的患儿肺部菌群丰度明显低于对照组患儿,说明并发 VAP 患儿肺部细菌多样性具有降

低趋势,肺部细菌多样性下降可能是导致 VAP 的重要原因。在插管第 5 天,两组肺部菌群丰度以及香农-维纳指数间差异无显著性,可能与随着插管治疗时间的延长,部分 VAP 患儿病情不断好转,或 VAP 患儿对抗生素的耐药增加,对照组患儿受到抗生素抑制等因素相关^[14-15]。

综上所述,RDS 患儿机械通气过程中 VAP 发生率高,引起 VAP 的主要致病菌包括肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌以及肺炎链球菌,机械通气过程中肺部菌群多样性降低对提示 VAP 具有重要警示作用。

[参考文献]

- [1] CONFALONIERI M, SALTON F, FABIANO F. Acute respiratory distress syndrome[J]. *Eur Respir Rev*, 2017, 26(144): 160116.
- [2] DERWALL M, MARTIN L, ROSSAINT R. The acute respiratory distress syndrome: pathophysiology, current clinical practice, and emerging therapies[J]. *Expert Rev Respir Med*, 2018, 12(12): 1021-1029.
- [3] TONIATI P, PIVA S, CATTALINI M, et al. Tocilizumab for the treatment of severe COVID-19 pneumonia with hyperinflammatory syndrome and acute respiratory failure; a single center study of 100 patients in Brescia, Italy[J]. *Autoimmun Rev*, 2020, 19(7): 102568.
- [4] 管向东, 刘紫锰. 2013《呼吸机相关性肺炎诊断、预防和治疗指南》目标性治疗的解读[J]. *中华医学杂志*, 2014, 94(5): 333-334.
- [5] 庄依亮. 新生儿呼吸窘迫综合征的诊断与治疗[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 1997, 13(4): 198-199.
- [6] 陈巧俊, 叶梅珍, 钱铃, 等. 盐酸氨溴索联合纳洛酮治疗新生儿呼吸窘迫综合征的疗效[J]. *中国妇幼保健*, 2021, 36(4): 841-843.
- [7] 王春敏, 佟丽波, 韩桂华, 等. 利用 PCR-DGGE 技术分析抗生素对小鼠肠道菌群多样性的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2014(8): 2154-2155.
- [8] HILL TC, WALSH KA, HARRIS JA, et al. Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol*, 2003, 43(1): 1-11.
- [9] 谢朝云, 熊芸, 蒙桂鸾, 等. 新生儿呼吸窘迫综合征合并呼吸机相关性肺炎患儿死亡相关因素 Logistic 回归分析[J]. *湖北民族大学学报(医学版)*, 2020, 37(1): 35-38.
- [10] 彭龙, 张立平. 16S Rrna 高通量测序研究柴芪汤对代谢综合征大鼠肠道菌群的影响[J]. *世界中医药*, 2021, 16(5): 758-764.
- [11] GUSS AM, ROESELERS G, NEWTON IL, et al. Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria associated with cystic fibrosis. *ISME J*, 2011, 5(1): 20-9.
- [12] 陈洪娇, 谭春苗, 王玉芸, 冼丽娜. 危重症患者发生呼吸机相关性肺炎肺部微生态及高危因素分析[J]. *中华肺部疾病杂志(电子版)*, 2020, 13(3): 376-378.
- [13] 彭纯颖, 陆国平. 儿童呼吸机相关性肺炎的下呼吸道微生态研究进展[J]. *中国小儿急救医学*, 2020, 27(1): 55-58.
- [14] LUYT C E, SAHNOUN T, GAUTIER M, et al. Ventilator-associated pneumonia in patients with SARS-CoV-2-associated acute respiratory distress syndrome requiring ECMO: a retrospective cohort study[J]. *Ann Intensive Care*, 2020, 10(1): 158.
- [15] 雷萌萌, 张小亚, 杨小娟, 等. 基于 16S rRNA 测序技术分析呼吸机相关性肺炎患者粪便与肺泡灌洗液菌群的相关性[J]. *中华危重病急救医学*, 2021, 33(2): 169-173.

(此文编辑 朱雯霞)