

早期抗生素应用对早产儿肠道菌群建立的影响

范礼英, 李素萍, 龚瑾, 刘赛红
湖南省妇幼保健院, 长沙 410008

摘要:目的 应用 16S 核糖体 DNA(16S ribosome DNA, 16S rDNA)高通量测序技术探讨抗生素对早产儿肠道菌群建立的影响。**方法** 收集 2019 年 8 月—2020 年 2 月在湖南省妇幼保健院出生、重症监护室住院的胎龄在 30~36⁺⁶ 周早产儿 60 例进行临床研究,根据临床治疗需要将早产儿分为两组,分别为抗生素暴露组 35 例(应用抗生素 ≥ 7 d)、抗生素非暴露组 25 例(住院期间未用抗生素),分别于生后 2 h 内、出生后 14 d 收集其粪便,采用 16S rDNA 测序技术对粪便菌群进行分析。利用操作分类单位(operational taxonomic units, OTU)对原始数据进行处理,获得最终的有效数据,对所有样品的全部有效数据序列进行聚类,形成 OTU;应用韦恩图(Venn)结合 OTU 所代表的物种找出不同环境的核心微生物。**结果** 两组患儿出生 2 h 内肠道均有大量细菌存在,以产气荚膜杆菌、链球菌和葡萄球菌为主,肠道菌群间比较差异无统计学意义($P > 0.05$);抗生素暴露组出生 2 h 内及第 14 天肠道菌群排名前 3 位的均是产气荚膜杆菌、链球菌、肠球菌,差异无统计学意义($P > 0.05$);嗜糖假单胞菌在出生 14 d 明显减少、大肠埃希菌在出生 14 d 明显增多,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);抗生素非暴露组肠道菌群出生 2 h 内及第 14 天排名前 3 位的均是产气荚膜杆菌、葡萄球菌、肠球菌,差异无统计学意义($P > 0.05$)。由 OTU 分布的 Venn 图显示,抗生素暴露组出生 2 h 内生物多样性多于出生第 14 天;出生第 14 天抗生素非暴露组生物多样性多于抗生素暴露组。**结论** 早产儿出生时肠道内就有大量菌群存在,使用抗生素后可显著降低肠道菌群丰度,大肠埃希菌明显增多,出生第 14 天两组均未检出乳酸杆菌,建议临床尽量缩短抗生素使用时间。

关键词: 早产儿; 抗生素; 肠道菌群; 高通量测序; 序列分析

DOI: 10.19757/j.cnki.issn1674-7763.2021.06.017

Impact on the development of intestinal microbiota of early antibiotics utilization in preterm neonates

FAN Li Ying, LI Su Ping, GONG Jin, LIU Sai Hong

Hunan Provincial Maternal and Child Health Care Hospital, Changsha 410008, Hunan Province, China

Abstract: Objective To investigate the effects of antibiotics on the development of intestinal microflora in preterm neonates by 16S ribosome DNA(16S rDNA) high throughput sequencing technology. **Methods** Totally 60 preterm neonates with gestational age of 30-36⁺⁶ weeks hospitalized in the intensive care unit of Hunan Maternal and Child Health Hospital from August 2019 to February 2020 were enrolled. According to the clinical treatment needs, preterm neonates were divided into two groups: feces of 35 patients in the antibiotic exposure group (antibiotics utilization ≥ 7 d) and 25 patients in the antibiotic non-exposure group (no use of antibiotics during hospitalization) were collected within 2 hours and 14 days after birth, respectively. Fecal flora was analyzed by 16S rDNA sequencing technology. Operational taxonomic units (OTU) were used to process the original data to obtain the final effective data, and all the effective data sequences of whole samples were clustered to form OTU. Venn diagram was used to identify the core microorganisms in different environments in combination with the species represented by OTU. **Results** There were a large amount of intestinal bacteria in both groups within 2 h after birth, mainly including bacillus perfringens, streptococcus and staphylococcus, and the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). The top 3 intestinal flora were all perfringens, streptococcus and enterococcus within 2 h after birth and at 14th day of birth in the antibiotic exposure group ($P > 0.05$). But pseudomonas saccharophil decreased significantly and escherichia coli increased significantly at 14th day of birth ($P < 0.05$). The top 3 intestinal microflora were all bacillus perfringens, staphylococcus and enterococcus within 2 h after birth and at 14th day of birth in antibiotic non-exposure group ($P > 0.05$). According to the Venn diagram of OTU distribution, the biodiversity within 2 h after birth was more than that at 14th day

基金项目: 中国疾病预防控制中心妇幼保健中心母婴营养与健康研究项目(2019FYH007)

收稿日期: 2021-09-15

of birth in antibiotic exposure group; but at 14th day of birth, the biodiversity of the antibiotic non-exposed group was higher than that of the antibiotic exposed group. **Conclusion** There are a large amount of intestinal flora in premature infants at birth. Antibiotics can significantly reduce the abundance of intestinal flora, leading to the development of more escherichia coli. Lactobacillus are not found in both groups at day 14 of birth. It is suggested to reduce the period of antibiotics utilization.

Key words: preterm neonates; antibiotic; intestinal microflora; high throughput sequencing; sequence analysis

正常肠道微生态对于新生儿肠道发育、维持肠道黏膜的完整性以及宿主营养状态都有不可或缺的作用^[1],而婴幼儿疾病与肠道菌群的变化密切相关。新生儿肠道菌群的稳态受多种因素的影响,如分娩方式、胎龄、喂养方式、环境因素,以及抗生素使用等^[2-3]。因此,研究生命早期肠道菌群的影响因素意义重大。肠道微生态系统在人类健康与疾病中的重要作用已成为近年来的研究热点^[4]。早产出生的患儿母亲可能患有宫内感染、绒毛膜羊膜炎、妊娠期高血压综合征(妊高征)、营养不良,临产前有胎膜早破等病理情况,产科、新生儿科医生为避免胎儿感染,往往给予经验性抗生素治疗,且不敢停用,导致抗生素使用时间较长。有文献报道,抗生素应用可能增加新生儿坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis, NEC)和晚发型败血症等的发生,其原因可能与抗生素导致肠道菌群结构改变、潜在致病菌增多及耐药菌出现等有关^[5]。应用 16S 核糖体 DNA(16S ribosome DNA, 16S rDNA)高通量测序技术是目前用于肠道微生物研究最前沿的检测技术^[6],可以发现低丰度细菌或未知细菌,进而全面、准确地获得菌群的信息。鉴于早产儿使用抗生素比例较高、抗生素使用时间较长和使用级别较高的现象,本研究拟利用 16S rDNA 测序技术检测早产儿肠道微生态在抗生素应用前后的变化,以期为临床诊疗提供参考依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

收集 2019 年 8 月—2020 年 2 月在湖南省妇幼保健院分娩且入住新生儿科的 80 例早产儿作为研究对象。

纳入标准:①生后 1 h 内收住新生儿重症监护室;②住院时间 ≥ 14 d;③出生胎龄 30~36 周。排除标准:①母亲分娩前 1 周内使用抗生素;②生后有重度窒息、各种遗传代谢病的早产儿;③存在先天畸形、先天发育异常的早产儿。在遴选的过程中共有 15 例新生儿在 7~10 d 出院,未留取出生 14 d 样本,还有 5 例新生儿在住院期间并发败血症,剔除这

20 例新生儿后,本研究共入选 60 例住院新生儿。

按照研究对象是否使用抗生素分为暴露组(使用抗生素)和非暴露组(未使用抗生素),其中暴露组 35 例,非暴露组 25 例。本研究获得患儿父母或法定监护人的知情同意,且经过医院伦理委员会审批(快 201907 号)。

1.2 研究方法

1.2.1 抗生素使用指征及药物选择:①临床疑似早发败血症^[7]:有异常临床表现或胎膜早破 ≥ 18 h 或母亲有绒毛膜羊膜炎中的任何一项立即经验性静脉使用抗生素哌拉西林舒巴坦 50 mg/kg,每 12 h 给药 1 次;生后 6~12 h 及间隔 24 h 分别查炎症指标,如白细胞、血小板、C 反应蛋白、降钙素原、成熟中性粒细胞/总中性粒细胞。②药物选择:选用抗生素前所有早产儿生后均行血培养。生后 48 h 内无感染表现(包括症状和实验室感染指标)及血培养无阳性报告者,则在生后 48 h 停用抗生素;如血液非特异性检查有 2 项及以上异常,合并临床表现,临床诊断败血症,则抗生素继续使用共计 7 d;如血培养阳性,则根据血培养复查结果决定抗生素使用时间,总疗程 10~14 d。

1.2.2 粪便样本收集及冻存:用带螺帽盖子保存液的无菌小瓶采集受试者一次性纸尿裤上新鲜粪便标本(至少 1 g),采样时间分别为生后 2 h 未用抗生素前和出生第 14 天。取样后迅速冰冻至 -20 °C 冰箱,1 周内转移至 -80 °C 冰箱中。

1.2.3 粪便分析方法:应用 16S rRNA 测序技术进行粪便样本分析。取质量合格的基因组 DNA 样品 30 ng 及对应的融合引物配置聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)体系,设置 PCR 参数进行 PCR 扩增,使用 Agencourt AMPure XP 磁珠对 PCR 扩增产物进行纯化并溶于洗脱液(elution buffer)后贴上标签,完成建库。使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 对文库的片段范围及浓度进行检测。检测合格的文库根据插入片段大小,选择因美纳(Illumina)公司 hiseq 2500 型号测序仪 HiSeq 平台进行测序。

1.2.4 物种分类及生物信息分析:利用操作分类单

位(operational taxonomic units, OTU)对原始数据进行处理后获得最终的有效数据,对所有样品的全部有效数据序列进行聚类,形成 OTU。与此同时,应用韦恩图(Venn)结合 OTU 所代表的物种找出不同环境的核心微生物。结果包括菌群多样性、丰度,每个样本在种、属水平的组成,组间菌群的差异。

1.3 统计学方法

使用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。计量资料均经正态性检验,符合正态分布,用均数 ± 标准差表示,采用独立样本 *t* 检验。计数资料用百分比

表示,采用 χ^2 或 Fisher 精确概率法检验。检验水准设置为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 两组早产儿的一般情况

60 例早产儿出生后喂养方式为母乳喂养或混合喂养,胎龄为 30 ~ 36 周,出生体重为 900 ~ 3 170 g,男女比例为 29:31。抗生素暴露组与抗生素非暴露组比较,在胎龄、出生体重、分娩方式、喂养方式等方面差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。见表 1。

表 1 两组早产儿一般情况比较

组别	例数	胎龄(周, $\bar{x} \pm s$)	出生体重(g, $\bar{x} \pm s$)	喂养方式(例)		分娩方式(例)	
				母乳	混合	阴道分娩	剖宫产
抗生素暴露组	35	34.5 ± 0.9	2 305.0 ± 263.1	19	16	26	9
抗生素非暴露组	25	33.9 ± 1.2	2 279.0 ± 282.1	16	9	18	7
t/χ^2 值		1.985	1.245	1.456		1.754	
<i>P</i> 值		0.069	0.278	0.787		0.754	

2.2 物种丰度及分类分析

2.2.1 肠道细菌分布趋势在抗生素应用前后发生改变:出生 2 h 内和第 14 天肠道菌群占前 3 位的均以产气荚膜杆菌、链球菌和肠球菌为主,差异无统计学意义($P > 0.05$)。而嗜糖假单胞菌在出生 2 h 内、第 14 天分别占 6.13% 和 0.01%,差异有统计学意义($P < 0.05$);大肠埃希菌在出生 2 h 内和第 14 天分别占 0.92% 和 10.95%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.2.2 肠道细菌分布趋势随着出生日龄增加发生改变:抗生素非暴露组在出生 2 h 内和第 14 天肠道菌种占前 3 位的均以产气荚膜杆菌、肠球菌、葡萄球菌为主,差异无统计学意义($P > 0.05$);大肠埃希菌在出生 2 h 内和第 14 天分别是 9.82% 和 0.62%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 2 抗生素暴露组 35 例早产儿在出生 2 h 内和第 14 天肠道菌群改变情况(%)

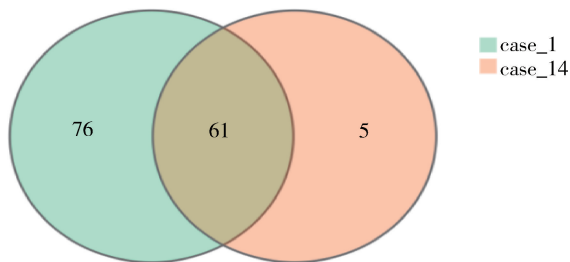
丰度排名前 10 位的细菌	出生 2 h 内 相对丰度	第 14 天 相对丰度	<i>P</i> 值
产气荚膜杆菌	10.94	34.22	0.067
链球菌	26.39	10.91	0.679
肠球菌	12.94	14.71	1.000
解脲脲原体	10.88	0.01	1.000
大肠埃希菌	0.92	10.95	0.039
双歧杆菌	2.04	6.38	0.513
嗜糖假单胞菌	6.13	0.01	0.021
葡萄球菌	2.42	1.98	0.140
罗斯菌	2.03	1.28	0.953
分枝杆菌	1.80	2.36	0.736

表 3 抗生素非暴露组 25 例早产儿在出生 2 h 内和第 14 天肠道菌群改变情况(%)

丰度排名前 10 位的细菌	出生 2 h 内 相对丰度	第 14 天 相对丰度	<i>P</i> 值
产气荚膜杆菌	23.37	37.05	0.481
肠球菌	1.56	22.00	0.372
葡萄球菌	22.39	0.20	0.902
链球菌	6.61	8.82	0.232
大肠埃希菌	9.82	0.62	0.009
罗斯菌	5.90	0.54	0.443
解脲脲原体	6.09	6.84	0.604
不动杆菌	6.04	0.01	0.095
多形杆状菌	2.23	3.56	0.821
嗜糖假单胞菌	5.51	0.04	0.034

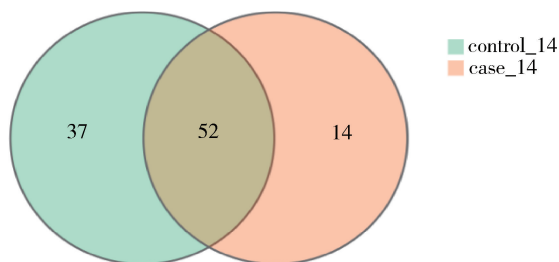
2.2.3 OTU 分布的 Venn 图:结果显示,抗生素暴露组早产儿出生第 14 天、出生 2 h 内 OTU 数量分别

是 66、137 个,共有 OTU 数量 61 个,证明抗生素暴露组出生 2 h 内生物多样性多于出生第 14 天。见图 1。出生第 14 天抗生素暴露组 OTU 数量 66 个,抗生素非暴露组 OTU 数量 89 个,共有 OTU 数量 52 个,证明出生第 14 天抗生素非暴露组生物多样性多于抗生素暴露组。见图 2。



注:case_1 表示出生 2 h 内;case_14 表示出生第 14 天

图 1 抗生素暴露组早产儿出生 2 h 内、第 14 天 OTU 分布的 Venn 图



注:control_14 表示抗生素非暴露组;case_14 表示抗生素暴露组

图 2 抗生素暴露组和抗生素非暴露组早产儿出生第 14 天 OTU 分布的 Venn 图

3 讨论

新生儿肠道菌群的建立是一个逐渐进展的动态演变过程,其中经历了初始期、哺乳期、辅食添加期、断奶期 4 个阶段^[8],直至 2 岁时逐渐趋于稳定状态,并与成人肠道微生态相似^[9]。胎儿肠道无菌的观点已不成立,许多学者证实肠道微生态发育发生于出生前,因为在新生儿脐静脉血中检出脂多糖,且早产儿脐血脂多糖水平显著高于足月儿^[10]。近年来有许多学者利用高通量测序技术从脐带血、羊水、胎盘和胎膜中检测到细菌微生物基因,也表明新生儿肠道微生态的建立始于母亲子宫内^[11-12]。本研究的患儿均在出生 2 h 内未喂奶的情况下留取大便标本,不论是抗生素暴露组还是抗生素非暴露组都发现肠道有大量细菌存在,如产气荚膜杆菌、链球菌、肠球菌、葡萄球菌等,可以推断肠道菌群的

建立在宫内已进行。在出生 2 h 内检测到脲原体和大肠埃希菌,考虑与母体羊水存在细菌有关,要注意防止坏死性小肠结肠炎、晚发型败血症、支气管肺发育不良的发生。因没有同时取羊水、母亲大便进行 16S rDNA 检测,无法分析新生儿与母亲肠道菌群之间的联系。

早产儿早期感染常由大肠埃希菌等革兰阴性菌引起,但也不能完全除外革兰阳性菌,故常选择针对革兰阳性及阴性菌的广谱抗生素经验性治疗^[13]。本研究证实生命初期肠道菌群排名前 3 位的是产气荚膜杆菌、链球菌、肠球菌等革兰阳性菌,另外有大肠埃希菌存在,考虑与母亲炎症、先天感染有关,经验性选择广谱抗生素是合理的。用药后肠道菌群组成仍以链球菌、肠球菌、产气荚膜杆菌为主;嗜糖假单胞菌明显减少,大肠埃希菌明显增多。随着早产儿出生日龄的增加,抗生素非暴露组出生第 14 天肠道菌群多于出生 2 h 内,出生第 14 天非暴露组早产儿肠道菌群多于暴露组早产儿,提示抗生素会导致肠道菌群的种类减少,与 Arboleya 等^[14]研究一致。建议根据相关指南^[7]合理经验性地使用抗生素,排除感染后及时停用,防止抗生素对肠道菌群的影响。

益生菌被认为是定植在肠道内对机体有益的微生物,有研究表明益生菌制剂可降低早产儿 NEC 的发生率,出生后随着需氧菌的定植消耗肠道内的氧气,才使得益生菌等厌氧菌得以生存,肠道内常见的益生菌主要是乳酸杆菌及双歧杆菌,且双歧杆菌在肠道内的出现与胎龄相关,多出现在 ≥33 周早产儿中^[15]。本研究中不论是出生 2 h 内还是出生第 14 天均检测到少量双歧杆菌、无乳酸杆菌,说明早产儿肠道益生菌少,与其肠道功能不成熟、细菌定植延迟有关,而用抗生素后大肠埃希菌明显增多,但应注意防止 NEC 的发生。

综上所述,早产儿应合理使用抗生素,不能因担心住院期间可能再次感染而延长抗生素的使用时间。需要指出的是,本研究样本量较小,难以代表所有婴儿肠道菌群特征,且未进行羊水、母亲大便检查对照。未来研究应与母亲菌群对照,且样本量应更大、分组更细致,以进一步明确围生期因素与早产儿肠道菌群的关系。

参考文献

[1] 孙玄,专晨昱,肖均萍,等. 生后抗生素暴露对早产儿肠道微生态的影响[J]. 中华围产医学杂志,2018,21

- (7):458-464.
- [2] Groer MW, Gregory KE, Louis-Jacques A, et al. The very low birth weight infant microbiome and childhood health[J]. *Birth Defects Res*, 2015,105(4):252-264.
- [3] Jakobsson HE, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, et al. Decreased gut microbiota diversity, delayed bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section [J]. *Gut*, 2014, 63 (4) : 559-566.
- [4] Unger S, Stintzi A, Shah P, et al. Gut microbiota of the very-low-birth-weight infant [J]. *Pediatr Res*, 2015, 77 (1/2) : 205-213.
- [5] Greenwood C, Morrow AL, Lagomarcino AJ, et al. Early empiric antibiotic use in preterm infants is associated with lower bacterial diversity and higher relative abundance of *Enterobacter* [J]. *J Pediatr*, 2014, 165 (1) : 23-29.
- [6] 秦楠, 栗东芳, 杨瑞馥. 高通量测序技术及其在微生物学研究中的应用 [J]. *微生物学报*, 2011, 51 (4) : 445-457.
- [7] 余加林, 俞惠民. 新生儿败血症诊断与治疗专家共识 [J]. *中华儿科杂志*, 2019, 57 (4) : 252-257.
- [8] 孙玄, 陈玲. 抗生素使用对早产儿肠道微生态及晚期疾病的影响 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2018.
- [9] Gritz EC, Bhandari V. The human neonatal gut microbiome: a brief review [J]. *Front Pediatr*, 2015, 25 (3) : 17.
- [10] Martinez-Lopez DG, Funderburg NT, Cerissi A, et al. Lipopolysaccharide and soluble CD14 in cord blood plasma are associated with prematurity and chorioamnionitis [J]. *Pediatr Res*, 2014, 75 (1) : 67-74.
- [11] Aagaard K, Ma J, Antony KM, et al. The placenta harbors a unique microbiome [J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6 (23) : 237-240.
- [12] Chu DM, Ma J, Prince AL, et al. Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery [J]. *Nat Med*, 2017, 23 (3) : 314-326.
- [13] 朱丹萍, 杜立中, 余加林, 等. 早产儿早期经验性应用抗生素对其肠道菌群的近期影响 [J]. *中国循证儿科杂志*, 2016, 11 (2) : 26-29.
- [14] Arboleya S, Sánchez B, Milani C, et al. Intestinal microbiota development in preterm neonates and effect of perinatal antibiotics [J]. *J Pediatr*, 2015, 166 (3) : 538-544.
- [15] Butel MJ, Suau A, Campeotto F, et al. Conditions of bifidobacterial colonization in preterm infants: a prospective analysis [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2007, 44 (5) : 577-582.