

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.11.013

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210324.1423.004.html\(2021-03-25\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210324.1423.004.html(2021-03-25))

呼吸道菌群负担和多样性与危重患者预后的相关性分析*

魏立娜¹, 李真玉¹, 张 华², 刘易峰¹

(1. 天津医科大学第二医院, 天津 300211; 2. 天津医科大学护理学院, 天津 300070)

[摘要] **目的** 探讨重症监护室(ICU)患者呼吸道菌群负荷和多样性与死亡率的相关性。**方法** 选取2016年1月至2020年4月天津医科大学第二医院ICU收治的232例患者为研究对象,根据是否于ICU死亡分为存活组($n=165$)和死亡组($n=58$)。比较两组一般资料、血生化检测结果、支气管肺泡冲洗回收液中细菌16S rDNA拷贝数、丰度(采用chao、sobs、ace指数)和多样性(simpson和shannon指数)等。对上述指标行单因素分析,并采用logistic多因素回归分析死亡相关因素。**结果** 死亡组急性生理功能和慢性健康状况评分系统II(APACHE II)评分、序贯器官衰竭估计(SOFA)评分、急性肾损伤比例均高于存活组($P<0.05$);死亡组16S rDNA拷贝数和simpson指数均高于存活组, chao、sobs、shannon、ace指数均低于存活组($P<0.05$); APACHE II评分、SOFA评分、16S rDNA拷贝数为ICU患者死亡危险因素($P<0.05$), chao指数、sobs指数、shannon指数、ace指数为保护因素($P<0.05$)。**结论** ICU患者呼吸道细菌负荷和多样性与死亡率相关,肺部微生物生态紊乱可能影响患者预后。

[关键词] 丰度;多样性;重症监护室;细菌负荷**[中图法分类号]** R563.9**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2021)11-1857-05**Correlation analysis between bacterial load and diversity in respiratory tract with prognosis in critical patients***WEI Lina¹, LI Zhenyu¹, ZHANG Hua², LIU Yifeng¹

(1. Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China;

2. School of Nursing, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

[Abstract] **Objective** To explore the correlation between the bacterial load and diversity in respiratory tract with the mortality rate in the intensive care unit (ICU) patients. **Methods** A total of 232 patients treated in ICU of this hospital from January 2016 to April 2020 were selected as the study subjects and divided into the survival group ($n=165$) and death group ($n=58$) according to whether the patients died in ICU. The general data, blood biochemical test results, bacterial 16S rDNA copy number, richness (by chao, sobs, ace indexes) and diversity (by simpson and shannon indexes) in bronchoalveolar lavage fluid were comparably analyzed between the two groups. The univariate analysis was performed on above indicators, and the logistic multiple factors regression was adopted to analyse the death related factors. **Results** The acute physiology and chronic health evaluation (APACHE II) score, sequential organ failure assessment (SOFA) score and proportion of acute kidney injury in the death group were higher than those in the survival group ($P<0.05$); the 16S rDNA copy number and simpson index in the death group were higher than those in the survival group, the chao, sobs, shannon, ace indexes in the death group were lower than those in the survival group ($P<0.05$); the APACHE II score, SOFA score and 16S rDNA copy number were the risk factors of death in ICU patients ($P<0.05$), while the chao index, sobs index, shannon index and ace index were the protective factors ($P<0.05$). **Conclusion** Bacterial load and diversity in respiratory tract of ICU patients are correlated to the mortality rate, and pulmonary micro-ecological disorder may affect the patients' prognosis.

[Key words] richness; diversity; intensive care unit; bacterial load

随着人们对微生态的认识加深,不同器官部位微生态变化与相应疾病进展的相关性逐渐得到关注,许多有价值的发现给临床工作带来了宝贵的启示^[1]。呼吸道菌群由共生和病原微生物组成,年龄、病情严重程度、机体生理功能可影响肺部菌群的负荷、丰度和多样性^[2],菌群特点变化在许多肺部疾病发生、进展、急性发作中起到重要作用^[3-4],但具体机制尚不明确。研究表明,呼吸道菌群与慢性阻塞性肺疾病(COPD)进展、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)发生和住院病死率相关,微生态平衡对疾病预后的作用不可忽视^[5]。重症监护室(ICU)患者原发病重、全身情况差、常伴有感染,导致肺部微生物群落改变,后者反过来促进病情进展和不良预后发生^[6]。然而,国内目前在这一领域少有相关研究,本文旨在深入探索 ICU 患者呼吸道菌群与死亡率相关性,丰富人体微生态研究,为 ICU 临床工作带来启示,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2016 年 1 月至 2020 年 4 月天津医科大学第二医院 ICU 收治的 232 例患者为研究对象。纳入标准:(1)因呼吸、心血管、神经系统疾病,以及肿瘤、中毒等引起的器官功能障碍、呼吸衰竭、顽固性心力衰竭等病情危重者;(2)年龄大于 18 岁;(3)ICU 住院时间大于 3 d 至小于 28 d;(4)因肺部感染、肺间质性疾病、痰液滞留等原因必要或自愿行支气管肺泡冲洗者;(5)患者或家属已签署知情同意书。排除标准:(1)具有近期活动性大咯血、活动性肺结核等支气管肺泡灌洗禁忌证者;(2)妊娠、近期有糖皮质激素或免疫抑制剂应用史者;(3)预计生存时间小于或等于 24 h 者;(4)严重创伤者。根据是否在 ICU 死亡分为存活组和死亡组。所有患者中男 125 例,女 107 例,平均年龄(49.78±17.26)岁;入 ICU 病因:呼吸系统疾病 95 例(40.95%),神经系统疾病 31 例(13.36%),心血管系统疾病 43 例(18.53%),消化系统疾病 24 例(10.34%),其他 39 例(16.81%)。本研究经过医院伦理委员会审核批准。

1.2 方法

1.2.1 病例采集

排除临床资料不全和自动出院病例,收集患者入院病历中相关资料,包括:年龄、性别、既往史、急性生理功能和慢性健康状况评分系统 II(APACHE II)评分、序贯器官衰竭估计(SOFA)评分、血生化检查结果等。所有患者于入 ICU 第 1 天行支气管肺泡冲洗,回收冲洗液以行 DNA 提取。

1.2.2 APACHE II 和 SOFA 评分^[7]

根据患者年龄、血压、肝肾功能、手术史等资料进行 APACHE II 评分,评分越高表示全身情况越差。

SOFA 评分涉及呼吸、凝血、肝脏、神经、泌尿、循环系统,每个系统 0~4 分,总分 24 分,评分越高则器官功能越差。

1.2.3 呼吸道菌群标本采集与 DNA 提取

入 ICU 24 h 内应用生理盐水对患者行支气管肺泡冲洗操作,回收冲洗液,4℃保存。将冲洗液于 14 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,沉淀物用 200 μL 的无菌磷酸盐缓冲液(PBS)重悬。应用 DNA 提取试剂盒(德国 QIAGEN 公司)和 PCR 扩增试剂盒(加拿大 Fermentas 公司)抽提悬浮物中 DNA,操作依据说明书。

1.2.4 引物设计和 PCR 扩增

细菌基因组 16S rDNA 的 V3~V5 区序列由 GenBank 数据库^[8]提供,片段长度 550 bp,引物由生物工程(上海)股份有限公司合成。应用上述引物进行 PCR 扩增,PCR 反应程序为预变性(95℃、3 min),变性(95℃、30 s),退火(56℃、30 s),延伸(72℃、30 s),行 35 个循环,于 4℃下保存。

1.2.5 测序结果

行 16S rDNA 拷贝数、丰度、多样性分析,扩增产物经纯化后由深圳华大基因研究院完成 16S rDNA 宏基因组测序与定量,在 PCR 产物中加入样品标签序列,然后行混合测序,根据基因表达标签分类细菌物种、分析群落丰度、多样性等。菌落多样性采用 Mothur 软件计算,应用 Alpha 多样性分析根据实际观测到的 OTU 数目评估,群落丰度观察指标选取 chao、sobs、ace 指数,数值越大则丰度越高;群落多样性采用 simpson 和 shannon 指数评估,前者数值越大则多样性越低,后者反之。

1.3 统计学处理

采用 SPSS25.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两独立样本 *t* 检验;计数资料以频数或百分率表示,比较采用 χ^2 检验;采用 logistic 回归分析影响因素,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料比较

存活组和死亡组各排除资料不完整或自动出院者 7 例和 2 例,最终纳入 223 例。58 例(26.01%)于 ICU 内死亡,其中 11 例直接死因为感染,其余死于原发病进展;死亡组 APACHE II 评分、SOFA 评分、急性肾损伤比例均高于存活组($P < 0.05$),见表 1。

2.2 两组呼吸道菌群负荷和多样性比较

死亡组 16S rDNA 拷贝数、simpson 指数高于存活组, chao、sobs、shannon、ace 指数低于存活组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

2.3 ICU 患者死亡相关因素 logistic 回归分析

APACHE II 评分、SOFA 评分、16S rDNA 拷贝数、sobs 指数、shannon 指数、ace 指数为保护因素 ($P < 0.05$); chao 指数、

sobs 指数、shannon 指数、ace 指数为保护因素 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 1 两组一般资料比较

项目	存活组(n=165)	死亡组(n=58)	t/χ ²	P
年龄($\bar{x} \pm s$, 岁)	48.83 ± 14.42	53.27 ± 16.94	-1.925	0.056
男[n(%)]	87(52.73)	33(56.90)	0.300	0.584
BMI($\bar{x} \pm s$, kg/m ²)	21.79 ± 3.57	22.63 ± 3.16	-1.586	0.114
APACHE II 评分($\bar{x} \pm s$, 分)	18.90 ± 5.31	22.46 ± 6.22	-4.195	<0.001
SOFA 评分($\bar{x} \pm s$, 分)	5.20 ± 1.59	6.85 ± 2.24	-6.071	<0.001
急性肾损伤[n(%)]	59(35.76)	30(51.72)	4.562	0.033
糖尿病[n(%)]	21(12.73)	9(15.52)	0.287	0.592
高血压[n(%)]	29(17.58)	15(25.86)	1.861	0.173
ARDS[n(%)]	30(18.18)	17(29.31)	3.195	0.074
肺部感染[n(%)]	46(27.88)	24(41.38)	3.632	0.057
COPD[n(%)]	12(7.27)	5(8.62)	0.111	0.739
ICU 院内感染[n(%)]	24(14.54)	15(25.86)	3.809	0.051
机械通气[n(%)]	127(76.97)	51(87.93)	3.201	0.074
紧急气管插管[n(%)]	43(26.06)	22(37.93)	2.928	0.087
入 ICU 前应用抗生素[n(%)]	27(16.36)	13(22.41)	1.729	0.189
清蛋白($\bar{x} \pm s$, mg/L)	31.62 ± 6.34	29.95 ± 5.17	1.805	0.072
C 反应蛋白($\bar{x} \pm s$, mg/L)	30.62 ± 11.56	33.67 ± 10.31	-1.776	0.077
降钙素原($\bar{x} \pm s$, μg/L)	4.68 ± 1.42	5.14 ± 2.03	-1.884	0.061
ICU 治疗时间($\bar{x} \pm s$, d)	11.59 ± 3.27	12.64 ± 4.16	-1.953	0.052
机械通气时间($\bar{x} \pm s$, d)	8.04 ± 3.24	8.97 ± 2.73	-1.955	0.052
血乳酸($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	3.74 ± 1.05	4.07 ± 1.27	-1.946	0.053
血肌酐($\bar{x} \pm s$, μmol/L)	108.87 ± 36.45	119.78 ± 39.24	-1.922	0.056

表 2 两组呼吸道菌群负荷和多样性比较($\bar{x} \pm s$)

项目	存活组(n=165)	死亡组(n=58)	t	P
16S rDNA 拷贝数(copies/L)	113.46 ± 36.68	145.84 ± 57.92	-4.914	<0.001
chao 指数	186.22 ± 73.72	140.45 ± 63.51	4.210	<0.001
sobs 指数	222.36 ± 81.33	163.74 ± 65.64	4.949	<0.001
simpson 指数	0.63 ± 0.15	0.71 ± 0.18	-3.311	<0.001
shannon 指数	2.26 ± 0.85	1.64 ± 0.67	5.030	<0.001
ace 指数	285.56 ± 87.57	227.84 ± 46.89	4.780	<0.001

表 3 ICU 患者死亡相关因素 logistic 回归分析

项目	β	标准误	wald	P	OR	95%CI
APACHE II 评分	0.184	0.052	12.728	<0.001	1.202	1.087~1.330
SOFA 评分	0.615	0.150	16.806	<0.001	1.849	1.378~2.481
16S rDNA 拷贝数	0.020	0.006	10.366	0.001	1.020	1.008~1.032
chao 指数	-0.012	0.004	7.938	0.005	0.989	0.981~0.996
sobs 指数	-0.011	0.004	9.727	0.002	0.989	0.982~0.996
shannon 指数	-1.084	0.320	11.454	0.001	0.338	0.181~0.634
ace 指数	-0.013	0.004	13.808	<0.001	0.987	0.980~0.994

3 讨 论

呼吸道拥有复杂的菌群系统,越来越多的学者发现肺部微生态平衡遭到破坏后,促进了肺部疾病和不良结局的发生^[9-10]。ICU 患者作为一个预后普遍较差的群体,所具有的病情不稳定、生理紊乱严重、致病机制复杂等因素严重破坏了人体微生态平衡,既往研究多集中于肠道菌群,而失衡的肺部菌群环境推动了 ARDS、呼吸机相关性肺炎、不良预后的发生^[11-12],呼吸道微生态或在促进患者死亡中扮演着特殊的角色^[13]。因此,本文基于此点,挖掘 ICU 患者呼吸道菌群与死亡率的相关性,旨在为干预患者预后带来新的思路。

良好的生理状态和器官功能是支撑 ICU 患者好转的基础,本研究中死亡组 APACHE II 评分和 SOFA 评分均高于存活组,APACHE II 评分和 SOFA 评分为 ICU 患者死亡危险因素。APACHE II 评分和 SOFA 评分可准确反映患者机体状态和器官功能,与预后相关,两者已被广泛应用于许多疾病和危重病患者的预后评估中^[14-15]。王力鹏等^[16]报道 APACHE II 和 SOFA 评分与急诊重症患者死亡风险相关,可有效预测预后,支持了本研究结论。

本研究对比 ICU 内死亡患者和存活患者的呼吸道菌群负荷,观察到死亡组 16S rDNA 拷贝数高于存活组,16S rDNA 拷贝数为 ICU 患者死亡危险因素。ICU 患者在身体机能欠佳、生理状态改变、感染风险高的基础上长时间接触大量病原体,这些都可能是呼吸道细菌数量增多的原因,不论是哪一者都将影响患者预后。DICKSON 等^[17]报道在脓毒症、ARDS、重症疾病状态下,肺部菌群负荷增多、群落组成改变,其中最突出的变化是肺内肠杆菌科成为优势菌群,而本研究未对 ICU 患者呼吸道菌群成分进行分析、未明确呼吸道菌群负荷增多原因,有待完善。

肺部微生态的稳定主要取决于菌群的组成、丰度和多样性,本文中死亡组 simpson 指数高于存活组, chao、sobs、shannon、ace 指数均低于存活组; chao 指数、sobs 指数、shannon 指数、ace 指数为 ICU 内死亡的保护因素。死亡组入 ICU 24 h 内菌群丰度和多样性较低,可能是由致病菌繁殖和共生菌减少引起,并与预后相关。BUDDEN 等^[18]报道发生肺炎、肺囊性纤维化、ARDS 等疾病时,患者呼吸道优势菌群和菌群多样性发生改变,这种改变与感染、病情进展可能存在相互作用的关系。另有研究表明肺部菌群负荷、组成成分、多样性与 ICU 患者未使用呼吸机时间相关,肺内肠杆菌的富集与患者发生 ARDS 有关,肺部菌群负荷、组成成分、多样性可预测 ICU 患者预后^[19]。这些结论均给本研究提供了一定理论支持。

本文通过细菌载量、丰度、多样性证实 ICU 死亡患者肺部菌群变化,升高的细菌载量和降低的多样性反映了菌群组成变动,可能伴随着优势菌群的改变,但本文未探索患者肺部菌群组成,此乃不足之处。同时本研究论证了危重病患者肺内菌群状态与预后相关,关于人体微生态的研究往往集中于肠道菌群,下呼吸道菌群由于采样困难常被忽视,但越来越多的证据指出肺部微生态平衡可能是改善许多疾病患者预后的重要途径^[20]。然而,呼吸道菌群在 ICU 患者发病、进展、死亡过程中的具体机制尚未明确,可能是通过推动感染和 ARDS 发生加重器官功能负担,亦或是危重病情与肺部菌群相互作用的结果,需更多研究加以证实。

综上所述,呼吸道微生态平衡和 ICU 患者病死率相关,深入对肺部菌群变化的探索,有助于为危重病患者提供更多改善方案。

参考文献

- [1] HE Y, WEN Q, YAO F F, et al. Gut-lung axis: The microbial contributions and clinical implications[J]. *Crit Rev Microbiol*, 2017, 43(1): 81-95.
- [2] DICKSON R P, ERB-DOWNWARD J R, MARTINEZ F J, et al. The microbiome and the respiratory tract[J]. *Annu Rev Physiol*, 2016, 78(1): 481-504.
- [3] DEPNER M, EGE M J, COX M J, et al. Bacterial microbiota of the upper respiratory tract and childhood asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 139(3): 826-834.
- [4] KYO M, NISHIOKA K, NAKAYA T, et al. Unique patterns of lower respiratory tract microbiota are associated with inflammation and hospital mortality in acute respiratory distress syndrome[J]. *Respir Res*, 2019, 20(1): 246.
- [5] WANG Z, BAFADHEL M, HALDAR K, et al. Lung microbiome dynamics in COPD exacerbations[J]. *Eur Respir J*, 2016, 47(4): 1082-1092.
- [6] PANZER A R, LYNCH S V, LANGELIER C, et al. Lung microbiota is related to smoking status and to development of acute respiratory distress syndrome in critically ill trauma patients[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018, 197(5): 621-631.
- [7] SEMMLACK S, KAPLAN P W, SPIEGEL R,

- et al. Illness severity scoring in status epilepticus-when STESS meets APACHE II, SAPS II, and SOFA[J]. *Epilepsia*, 2019, 60(2):189-200.
- [8] DUMAIDI K, AL-JAWABREH A. Molecular detection and genotyping of enteroviruses from CSF samples of patients with suspected sepsis-like illness and/or aseptic meningitis from 2012 to 2015 in West Bank, Palestine[J]. *PLoS One*, 2017, 12(2):e0172357.
- [9] WELP A L, BOMBERGER J M. Bacterial community interactions during chronic respiratory disease[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10(4):213.
- [10] 李颖华, 何志义. 慢性气道炎症性疾病的下呼吸道细菌负荷[J]. *国际呼吸杂志*, 2017, 37(13):1010-1012.
- [11] WOLFF N S, HUGENHOLTZ F, WIERSINGA W J. The emerging role of the microbiota in the ICU[J]. *Crit Care*, 2018, 22(1):78.
- [12] ZAKHARKINA T, MARTIN-LOECHES I, MATAMOROS S, et al. The dynamics of the pulmonary microbiome during mechanical ventilation in the intensive care unit and the association with occurrence of pneumonia[J]. *Thorax*, 2017, 72(9):803-810.
- [13] LEITAO F F, ALOTAIBI N M, NGAN D, et al. Sputum microbiome is associated with 1-Year mortality after chronic obstructive pulmonary disease hospitalizations[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019, 199(10):1205-1213.
- [14] 查君敬, 方长太, 白兆青, 等. 白细胞介素 35、降钙素原及 SOFA 评分对脓毒症病情严重程度及预后的评判价值[J]. *重庆医学*, 2019, 48(9):1535-1538.
- [15] OH D H, KIM M H, JEONG W Y, et al. Risk factors for mortality in patients with low lactate level and septic shock[J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2019, 52(3):418-425.
- [16] 王力鹏, 陈军, 罗穆玲, 等. MEWS 评分、APACHE II 评分及 SOFA 评分对急诊重症患者死亡风险的评价[J]. *广东医学*, 2018, 39(6):893-896.
- [17] DICKSON R P, SINGER B H, NEWSTEAD M W, et al. Enrichment of the lung microbiome with gut bacteria in sepsis and the acute respiratory distress syndrome [J]. *Nat Microbiol*, 2016, 1(10):16113.
- [18] BUDDEN K F, GELLATLY S L, WOOD D L, et al. Emerging pathogenic links between microbiota and the gut-lung axis[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15(1):55-63.
- [19] DICKSON R P, SCHULTZ M J, VAN DER P T, et al. Lung microbiota predict clinical outcomes in critically ill patients[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2020, 201(5):555-563.
- [20] BUDDEN K F, SHUKLA S D, REHMAN S F, et al. Functional effects of the microbiota in chronic respiratory disease [J]. *Lancet Respir Med*, 2019, 7(10):907-920.
- (收稿日期:2020-09-22 修回日期:2021-02-11)
- (上接第 1856 页)
- [19] 闻勇, 罗杰, 丰萍璐. 体质指数, 中性粒细胞-淋巴细胞比值对急性胰腺炎病情预测价值的研究[J]. *肝胆外科杂志*, 2019, 27(4):289-292.
- [20] 马小华, 李兰, 金涛, 等. 入院时无害性急性胰腺炎评分可预测轻症急性胰腺炎[J]. *南方医科大学学报*, 2020, 40(2):190-195.
- [21] LIU J X, LI A, ZHOU L Y, et al. Significance of combined preoperative serum Alb and dNLR for diagnosis of pancreatic cancer [J]. *Future Oncol*, 2018, 14(3):229-239.
- [22] CHEN S, YING H J, DU J P, et al. The association between albumin-dNLR score and disease activity in patients with rheumatoid arthritis [J]. *J Clin Lab Anal*, 2019, 33(3):e22695.
- (收稿日期:2020-09-11 修回日期:2021-02-11)