



一对紫绀型先天性心脏病患儿肠道菌群动态变化及阴沟肠杆菌耐药性研究

魏文婷¹, 洪小杨², 潘志远¹, 张惠玲², 赵喆², 葛燕¹, 王珍¹, 刘颖悦², 杨瑞馥¹, 刘昌娥^{2*}, 毕玉晶^{1*}

1 军事医学研究院, 微生物流行病学研究所, 北京 100071

2 解放军总医院第七医学中心, 北京 100700

魏文婷, 洪小杨, 潘志远, 张惠玲, 赵喆, 葛燕, 王珍, 刘颖悦, 杨瑞馥, 刘昌娥, 毕玉晶. 一对紫绀型先天性心脏病患儿肠道菌群动态变化及阴沟肠杆菌耐药性研究. 微生物学报, 2022, 62(9): 3658–3669.

Wei Wenting, Hong Xiaoyang, Pan Zhiyuan, Zhang Huiling, Zhao Zhe, Ge Yan, Wang Zhen, Liu Yingyue, Yang Ruifu, Liu Chang'e, Bi Yujing. Dynamic changes of the gut microbiota in a pair of newborn twins with cyanotic congenital heart disease and drug resistance of *Enterobacter cloacae*. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(9): 3658–3669.

摘要:【目的】观察一对紫绀型先天性心脏病双胞胎新生儿在接受手术及抗生素治疗前后的肠道菌群的动态变化, 探究患儿肠道内阴沟肠杆菌在治疗期间耐药性如何发生改变。【方法】通过采集患儿在不同治疗阶段的粪便样本, 进行培养组学和 16S rRNA 基因测序分析。同时, 从双胞胎哥哥不同治疗阶段的粪便样本中分离得到 10 株阴沟肠杆菌进行体外药敏试验。【结果】培养组学结果显示使用抗生素导致术前粪便样本丰富度降低, 仅可分离获得肠球菌属、不动杆菌属和肠杆菌属; 长期医院环境暴露后, 能分离出多种条件致病菌属, 包括肠杆菌属、克雷伯菌属、不动杆菌属和假单胞菌属; 母乳喂养 4 个月后, 粪便菌群丰富度增加、构成发生改变, 可分离获得乳杆菌属和双歧杆菌属等有益细菌。16S rRNA 基因测序结果显示, 在多种因素影响下不同治疗时间点 α 多样性指数和相对丰度最高的菌属不同。细菌耐药实验结果显示, 治疗期间阴沟肠杆菌对哌拉西林逐渐产生耐药性。【结论】接受抗生素治疗、院内环境暴露和母乳喂养共同影响患儿治疗和康复期间的肠道菌群组成; 在不同治疗阶段仅使用一种抗生素, 也会导致阴沟肠杆菌对不同药物的耐药性发生改变。

关键词: 肠道菌群; 培养组学; 16S rRNA 基因测序; 紫绀型先天性心脏病; 细菌耐药性

基金项目: 国家自然科学基金(81790632, 31970863)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81790632, 31970863)

*Corresponding authors. E-mail: LIU Chang'e, akliuchange@163.com; BI Yujing, byj7801@sina.com

Received: 6 February 2022; Revised: 10 March 2022; Published online: 1 April 2022

Dynamic changes of the gut microbiota in a pair of newborn twins with cyanotic congenital heart disease and drug resistance of *Enterobacter cloacae*

WEI Wenting¹, HONG Xiaoyang², PAN Zhiyuan¹, ZHANG Huiling², ZHAO Zhe², GE Yan¹, WANG Zhen¹, LIU Yingyue², YANG Ruifu¹, LIU Chang'e^{2*}, BI Yujing^{1*}

1 Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

2 The Seventh Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100700, China

Abstract: [Objective] To observe the dynamic changes of gut microbiota in a pair of newborn twins with cyanotic congenital heart disease after surgery and antibiotic treatment and explore the variation of drug resistance of *Enterobacter cloacae* during treatment. [Methods] The fecal samples of the twins were collected at different stages of treatment and analyzed by culturomics and 16S rRNA gene sequencing. The susceptibility of ten *Enterobacter cloacae* strains isolated from the elder twin at different stages to antibiotics was determined. [Results] Culturomics results suggested that antibiotics decreased the flora richness of fecal samples before surgery and only *Enterococcus*, *Acinetobacter* and *Enterobacter* were isolated. Upon the long-time exposure to the hospital environment, opportunistic pathogens of several genera were isolated, including *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Acinetobacter* and *Pseudomonas*. After 4 months of breast feeding, richness of fecal flora increased and the composition changed. To be specific, probiotics such as *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* were isolated. 16S rRNA gene sequencing results showed that α diversity indexes and the genus with highest relative abundance were different depending on treatment stages under the influence of various factors. The susceptibility tests indicated that *E. cloacae* strains gradually developed resistance to piperacillin during treatment. [Conclusion] Antibiotic treatment, exposure to hospital environment, and breast feeding all changed the gut microbiota structure of the twins during treatment and recovery. Even if only one antibiotic was used at different stages of treatment, the resistance of *E. cloacae* to different drugs might change.

Keywords: gut microbiota; culturomics; 16S rRNA gene sequencing; cyanotic congenital heart disease; antibiotic resistance

新生儿主要从母体、分娩过程中和出生时所在的环境接受并获得肠道微生物^[1-2]。肠道微生物群的建立、成熟和构成对人的健康和免疫有终生影响,并在整个幼儿期影响健康。在患有紫绀型先天性心脏病(cyanotic congenital heart disease, CCHD)的足月儿中,肠系膜血流量的急性减少(低灌注)和慢性紫绀(缺氧)可能会改变肠道微生物群的发育和肠道屏障的完整性,从而使这些婴儿处于生长不良的高风险

中^[3]。此外,肠道屏障完整性的破坏可能导致肠道微生物产物(如脂多糖)发生移位,导致CCHD患儿易发生坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis, NEC)^[4-6]。正因如此,CCHD患儿通常在接受手术前服用多种抗生素以预防NEC的发生,这可能导致肠道微生物群出现紊乱,增加患儿发生肺炎或其他系统性感染(如败血症)的发病率^[7]。

接受抗生素治疗会明显降低人体肠道菌群

多样性、干扰肠道微生物丰度，甚至在短时间内发生物种的快速更替，最终导致病原体的大量繁殖^[8-9]。此外，患者治疗期间长期使用抗生素造成的细菌耐药已成为最重要的健康问题之一。然而，很少有人关注从住院患者中分离出的条件致病菌经长期住院后发生的耐药性变化。本文基于培养组学和 16S rRNA 基因测序方法观察一对紫绀型先天性心脏病双胞胎新生儿在接受手术及抗生素治疗前后肠道菌群的动态变化，探究患儿在不同治疗时间点分离到的阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*, EC)在治疗期间耐药性如何发生改变，为关注患儿住院期间抗生素的临床使用和肠道菌群动态变化提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验样本

研究对象是在解放军总医院第七医学中心住院治疗的双胞胎新生儿，诊断为紫绀型先天性心脏病(CCHD)。此实验通过解放军总医院第七医学中心伦理委员会的伦理审批(审批号: 2021034)。入院时，双胞胎哥哥体重 2.1 kg，身长 44 cm，双胞胎弟弟体重 1.8 kg，身长 44 cm，后续两患儿均接受完全型肺静脉异位引流术并痊愈出院，治疗期间部分实验室检查和临床监

测数据见表 1。采集这对患儿不同治疗时间点的粪便样本，双胞胎哥哥所有样本记为 C1，双胞胎弟弟所有样本记为 C2。采集两位患儿入院当天(以下简称入院)、术前 1 d(以下简称术前)、术后首个粪便样本(以下简称术后)以及转出 ICU 至普通病房当天(以下简称转出)、出院 4 个月返院复诊时(以下简称复诊)粪便样本，依次记为 A、B、C、D、E 样本(图 1)。

1.1.2 培养基

YCFA 培养基，MPYG 培养基，TSB 培养基，哥伦比亚血平板，LB 培养基均购自赛默飞公司。

1.1.3 试剂及仪器设备

上机血培养瓶(BC120, 郑州安图)，澄清瘤胃液(A386-01, 上海 ELITE-MEDIA)，无菌脱纤维羊血(H0011, 北京宝特医疗有限公司)，肠杆菌药敏检测试剂盒(30061303MB01, 郑州安图)，麦氏比浊仪(Densi CHEK Plus, 梅里埃)，厌氧培养箱(Concept 400, Ruskinn)，恒温振荡培养箱(HZQ-F160, 宿州培英实验设备有限公司)，MALDI-TOF 质谱仪及检测试剂(Autof MS1000, 郑州安图)。

1.2 样本采集和预培养

新鲜收集的粪便样本，用 10 mL 无菌 PBS 混悬，取上清 1 mL 分别加入需氧和厌氧预增菌

表 1 双胞胎患儿治疗期间临床和实验室检查结果

Table 1 Clinical and laboratory values of the twins during treatment

Inspection items	C1A	C1B	C1C	C1D	C2A	C2B	C2C	C2D
Heart rate	154.0	134.0	155.0	135.0	153.0	171.0	168.0	163.0
Breath	42.0	40.0	40.0	35.0	30.0	61.0	40.0	46.0
SBP	80.0	70.0	65.0	79.0	63.0	73.0	79.0	82.0
DBP	38.0	45.0	48.0	40.0	37.0	40.0	58.0	46.0
PaO ₂	46.4	34.7	92.9	103.8	48.9	60.4	64.9	97.0
PaCO ₂	47.2	44.7	35.1	50.9	45.6	50.4	31.0	51.5
SaO ₂	88.8	85.8	97.9	97.3	87.3	86.2	94.6	97.7

Heart rate: beats/min; Breath: breaths/min; SBP: systolic blood pressure, mmHg; DBP: diastolic blood pressure, mmHg; PaO₂: mmHg; PaCO₂: mmHg; SaO₂: %.

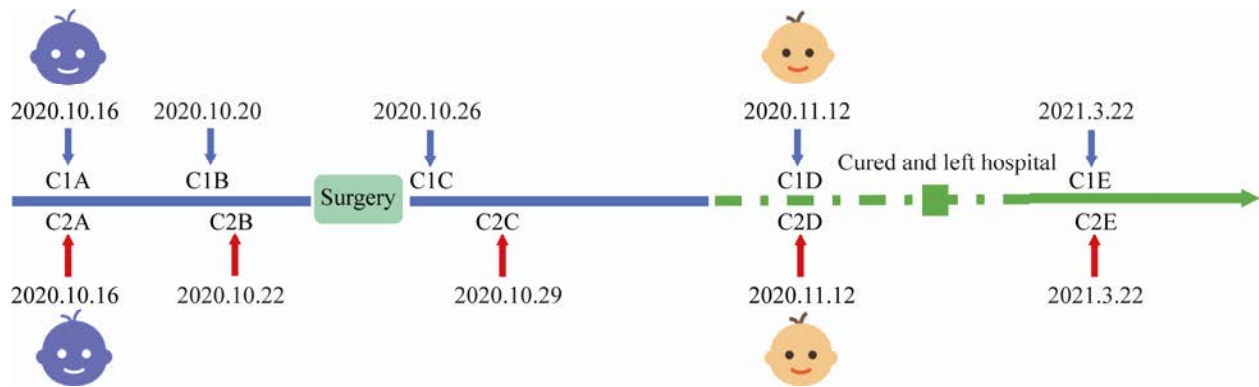


图 1 双胞胎粪便样本采集日期

Figure 1 Collection date of the fecal samples of the twins.

培养瓶(40 mL 上机血瓶+5 mL 澄清瘤胃液+5 mL 无菌脱纤维羊血)中。最后根据对气体不同的需求, 将预增菌血培养瓶放入 37 °C 恒温振荡培养箱或厌氧培养箱中培养共计 35 d (图 2)。

1.3 稀释涂布、挑取单克隆

从第 0 天(取样当天)开始, 在 0、3、6、9、12、15、18、21、24、27、30 和 35 d 共 12 个时间点从预增菌体系中均匀取样, 进行梯度稀释, 涂布在固体 YCFA、MPYG 和哥伦比亚血平板上, 随后将平板置于需氧和厌氧条件下进

行分离培养。其中需氧条件下培养 24 h, 厌氧条件下培养 48–72 h。待培养到相应时间后, 选取单克隆数目在 50–500 个的固体平板进行单克隆挑取和液体培养基扩增。

1.4 细菌保菌及其鉴定

蘸取 1 μL 菌液在对应固体平板上进行三区划线, 继续放入 37 °C 恒温培养箱或厌氧培养箱中培养。待相应培养时间后对长出的纯菌落进行细菌 MALDI-TOF 质谱鉴定或 16S rRNA 基因测序鉴定。取 1 mL 液体扩增菌液按照 0.3 mL

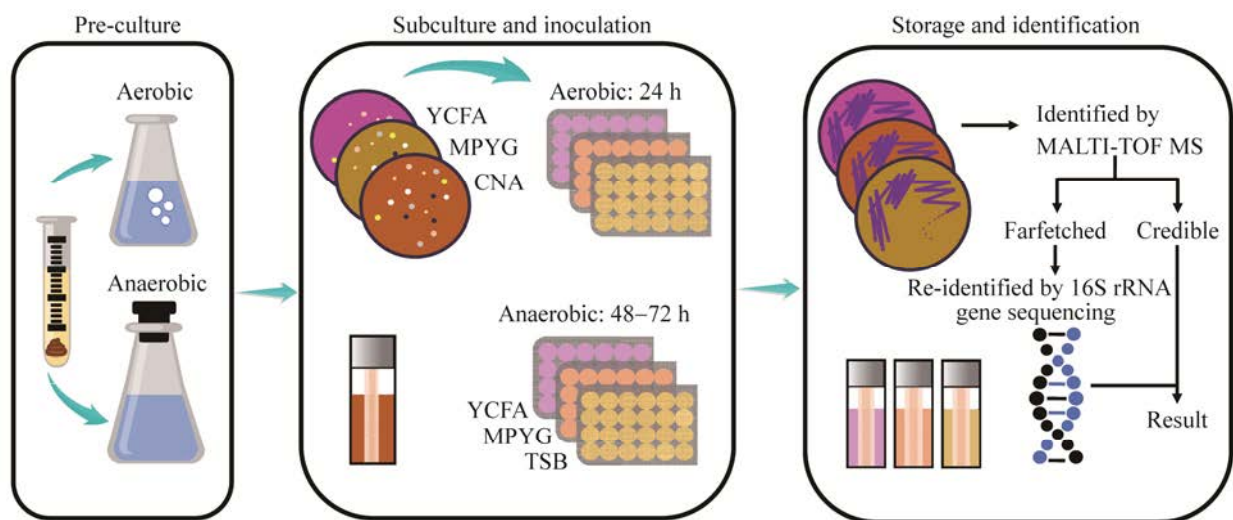


图 2 培养组学流程图

Figure 2 Protocol of culturomics.

甘油+1 mL 菌液的比例进行甘油保菌, 每株细菌保存 1 支, 充分混匀后冻存于 -80°C 。纯菌落按照拓展法进行 MALDI-TOF 质谱鉴定, 2 h 内上机检测。检测结果评分大于 9 则为种水平可信。

1.5 粪便样本 DNA 提取及 16S rRNA 基因测序

由深圳华大基因科技服务有限公司对所有粪便样本进行 16S rRNA 基因测序并进行分析。使用 MagPure Stool DNA KF kit B (Magen) 试剂盒提取粪便基因组, 使用 Qubit Fluorometer: Qubit[®] dsDNA BR Assay kit (Invitrogen) 进行总 DNA 质量检查。使用 V3-V4 区域的通用引物进行 PCR 扩增完成文库构建。检测合格的文库选择 HiSeq 2500 平台进行测序。使用软件 FLASH (Fast Length Adjustment of short reads, v1.2.11) 进行序列拼接, 利用重叠关系将双末端测序得到的成对 reads 组装成一条序列, 得到高变区的 Tags。利用软件 USEARCH (v7.0.1090) 将拼接好的 Tags 在 97% 相似度下聚类为 OTU。利用 UCHIME (v4.2.40) 将 PCR 扩增产生的嵌合体 and 已有的嵌合体数据库进行比对, 将其中的嵌合体序列从 OTU 代表序列中去除。同时选取 OTUs 的代表性序列。将该代表性序列与 RDP 数据库进行比对, 最小置信阈值为 0.6, 根据比对结果对每个样本的 OTU 进行物种分类, 得到物种丰度进行后续分析。使用 Qiime 软件 (v1.9.1) 计算 Shannon 指数。16S rRNA 基因测序数据已上传至 NCBI 中 SRA 数据库, Submission ID: SUB10209395, BioProject ID: PRJNA755453。

1.6 阴沟肠杆菌耐药性检测

在液体 LB 培养基中复苏冻存于 -80°C 的 C1 患儿入院、术前、术后和转出 4 个治疗时间点分离到的共 10 株阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*, EC), 标记为 EC1-EC10。其中 EC1 来自 C1A, EC2-EC5 来自 C1B, EC6-EC8 来

自 C1C, EC9 和 EC10 来自 C1D。配制 EC1-EC10 的纯菌悬液, 按照肠杆菌药敏检测试剂盒操作说明进行药敏检测。EC1-EC10 均做 3 次技术重复。读取并记录药敏板上哌拉西林、亚胺培南和头孢哌酮的 MIC 值。参考 CLSI (clinical and laboratory standards institute) 发布的最新 MIC 折点解释标准进行药物敏感性判读, 无 MIC 折点解释标准的抗菌药物只报告 MIC 值。

2 结果与分析

2.1 不同治疗阶段双胞胎肠道菌群组成明显改变

对该对患儿在 5 个治疗时间点采集的 10 个粪便样本在属水平上的组成同时进行了培养组学 (图 3) 和测序分析 (图 4), 并计算每个样本的 α 多样性指数 (图 5)。2 种分析方法得出的结果都显示出在抗生素治疗、医院环境暴露和母乳喂养等条件共同作用下, 该对双胞胎患儿在不同治疗时间点粪便样本的细菌组成发生了明显变化。

该对患儿入院后接受抗生素治疗 (哌拉西林) 是改变术前时间点粪便样本细菌组成和多样性的主要因素。培养组学结果显示, 入院粪便样本中可分离到的葡萄球菌属和乳杆菌属, 因为手术前使用抗生素治疗, 在术前粪便样本中无法分离获得, 导致每个术前粪便样本仅可分离到 2 个菌属, 表明肠道细菌丰富度降低 (图 3)。术前样本 C1B 只能分离到肠球菌属和肠杆菌属, C2B 只能分离到肠球菌属和不动杆菌属。测序结果显示, 术前的 C1B 和 C2B 样本中葡萄球菌属相对丰度分别低于入院的 C1A 和 C2A 样本, 而肠球菌属相对丰度则在 C1B 和 C2B 中较高 (图 4)。同时 C1A 和 C2A 样本 Shannon 指数高于 C1B 和 C2B 样本 (图 5)。以上结果说明入院后抗生素治疗改变了该对患儿肠道菌群的丰富度和多样性。

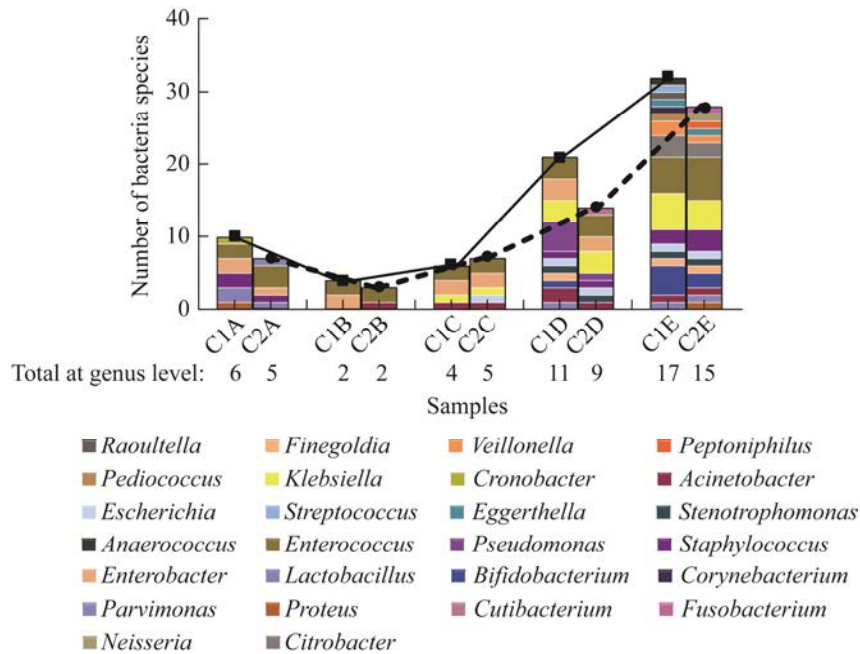


图 3 10 个粪便样本的培养组学属水平组成图

Figure 3 Bacteria composition of the 10 fecal samples identified by culturomics at genus level. The thickness of the column represents the number of species of each genus.

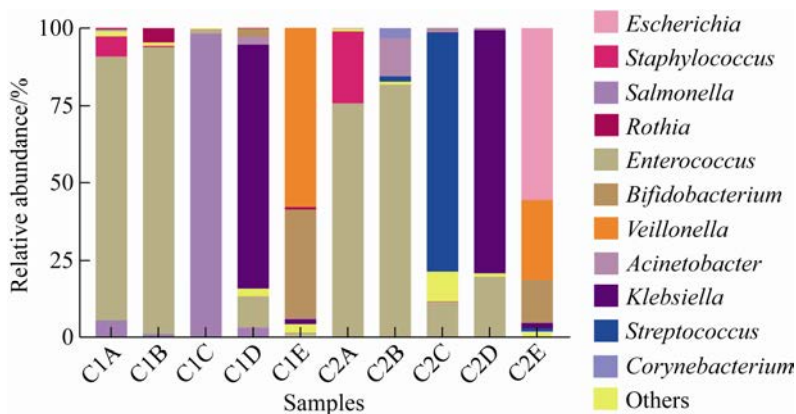


图 4 10 个粪便样本的 16S rRNA 基因测序属水平组成图

Figure 4 Bacteria composition of the 10 fecal samples detected by 16S rRNA gene sequencing at genus level.

随着住院时间延长，培养组学方法可从术后 (C1C、C2C)和转出(C1D、C2D)样本分离出医院常见的几种条件致病菌属，包括肠杆菌属、克雷伯菌属、不动杆菌属和假单胞菌属(图 3)。截止术后样本采集当天，C1 患儿(哌拉西林 6 d，停哌拉西林改亚胺培南 2 d)和 C2 患儿(哌拉西林 6 d，

停哌拉西林改万古霉素 5 d)用药种类并不完全相同，对肠道菌群造成扰动并不完全一致，所以二者术后的样本测序结果有存在差异，C1C 样本中沙门氏菌属相对丰度最高，而 C2C 样本中链球菌属相对丰度最高(图 4)。术后该对患儿长时间暴露在同一院内环境中，2 个转出的样本(C1D 和 C2D)

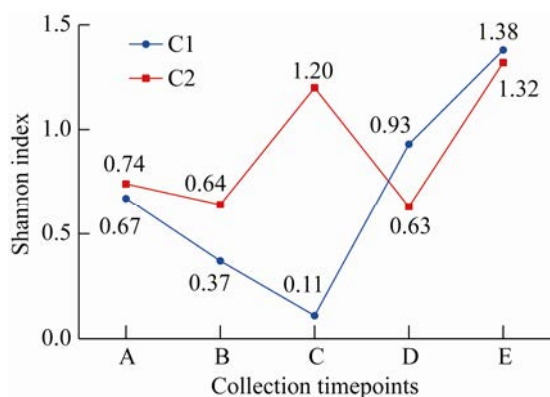


图5 10个粪便样本菌群 Shannon 指数

Figure 5 Shannon index of bacterial community in the 10 fecal samples.

测序结果均显示常见的条件致病菌属——克雷伯菌属相对丰度最高，且两个样本 Shannon 指数无差异。

在离开医院环境和母乳喂养的共同影响下，培养组学结果显示复诊的 C1E 和 C2E 两个样本可以分离培养到的细菌增加到 15 个属以上。与转出的 C1D 和 C2D 两个样本不同的是，在离开医院环境且母乳喂养 4 个月后，在 C1E 中无法分离到肠杆菌属和假单胞菌属，在 C2E 中无法分离到肠杆菌属和丙酸杆菌属(图 3)。同时，C1E 和 C2E 中可分离出乳杆菌属和双歧杆菌属的细菌，表明肠道内有益菌属开始定殖。测序结果和培养组学结果相一致的是，C1E 和 C2E 中均可测到双歧杆菌属。另外，C1E 中还可测到一定丰度的韦荣氏球菌属，C2E 中还可测到一定丰度的埃希氏菌属和韦荣氏球菌属(图 4)。双歧杆菌属、埃希氏菌属和韦荣氏球菌属在 C1E 和 C2E 中的总相对丰度超过 90% (在 C1E 和 C2E 中分别为 93.20% 和 95.36%)。另外，克雷伯菌属相对丰度在 C1E 和 C2E 样本中分别为 1.56% 和 1.66%，远低于 C1D (78.87%) 和 C2D (78.41%) 样本。同时，相比于转出样本，复诊样本的 Shannon 指数有所提高(图 5)。

上述结果表明，培养组学方法可分离到细菌种类较多的 2 个治疗时间点是转出(D)和复诊(E)。我们比较了这 2 个时间点从双胞胎中分离出的细菌，如图 6 所示。在 D 时间点(图 6A)，双胞胎患儿可分离到 9 种共同的细菌，在 E 时间点(图 6B)可分离到 18 种共同的细菌。还可以观察到，即使母乳成分相同，该对双胞胎复诊时粪便样本也可分离到不同的细菌。

2.2 测序结果与培养组学结果比较

我们比较了该对患儿 5 个治疗时间点共计 10 个样本培养组学和测序结果在属水平之间的差异(图 7)。对比结果显示，6 个样本仅能通过 16S rRNA 基因测序检测到的菌属种类数多于仅通过培养组学分离出的菌属种类属，其余 4 个样本则相反。韦恩图结果显示，两种检测方法各具优势，采用培养组和测序共同分析同一份样本能够更为全面地获得样本中细菌菌属的信息。

2.3 阴沟肠杆菌药物敏感试验结果

在入院、术前、术后和转出 4 个时间点中，C1 患儿均可分离获得阴沟肠杆菌，为了研究不同治疗时间点的阴沟肠杆菌菌株(EC1–EC10)的药物敏感性，我们将这些菌株进行了复苏、培养和质谱鉴定。体外耐药性检测显示，4 个治疗阶段的 EC1–EC10 菌株对亚胺培南(术前 1 d 开始连续服用 8 d)的敏感性相似(图 8A)，结果均为对亚胺培南敏感；从 C1B 分离的一株 EC 菌株(EC3)对头孢哌酮(停亚胺培南后连续服用 13 d)耐药，其他 EC 菌株对头孢哌酮的药物敏感性处于敏感或中介(图 8B)。另外，C1 患儿在入院和术后分别接受 2 次哌拉西林治疗，共计 14 d，但这 10 株 EC 对哌拉西林的敏感性不同(图 8C)。随着住院时间的延长，入院的 C1A、术前的 C1B 和术后的 C1C 样本中分离到的 EC1–EC8 对哌拉西林的药物敏感性从敏感逐渐

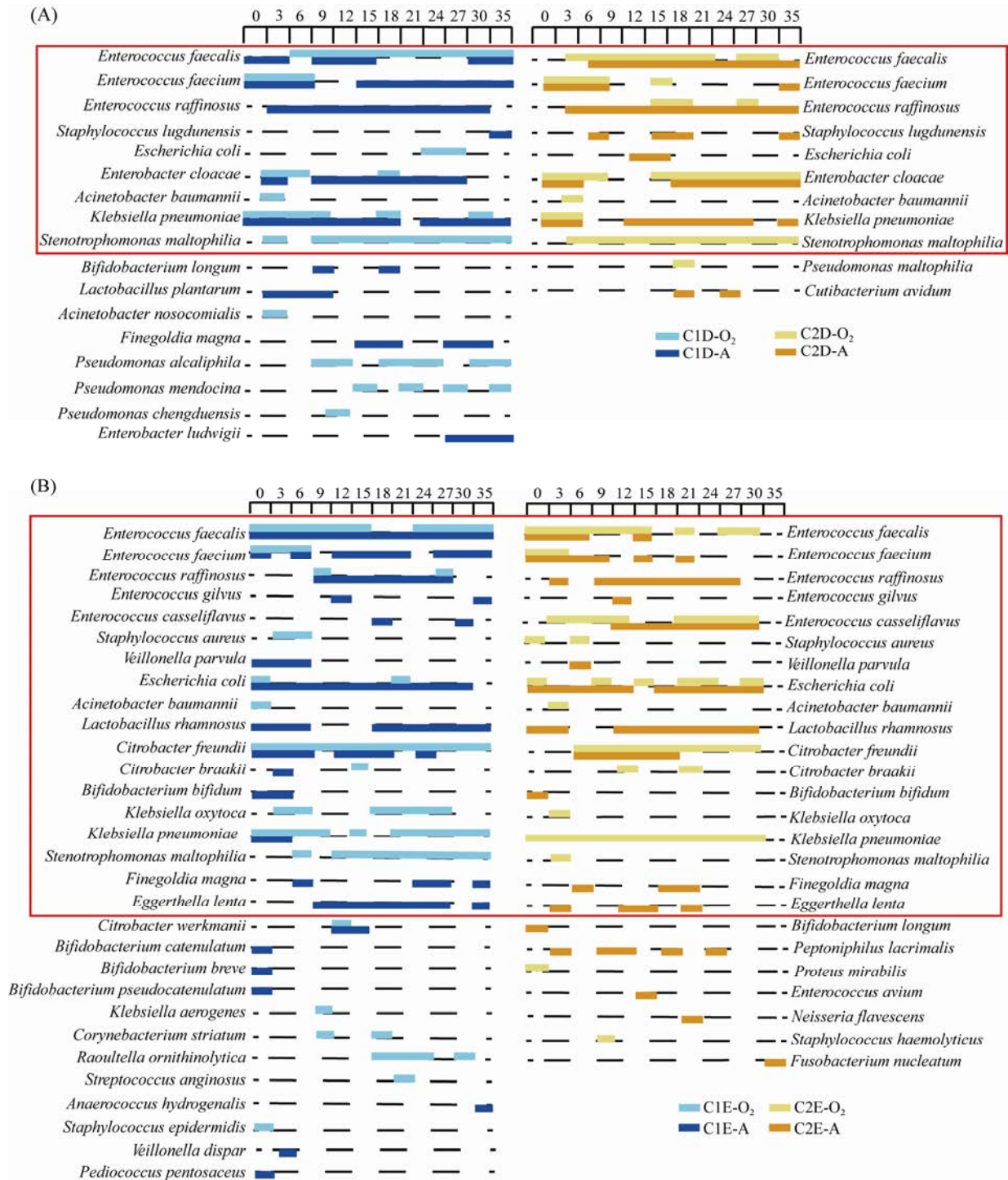


图 6 双胞胎患儿转出和复诊样本培养组学分离到的共同和差异菌株

Figure 6 Common and different species isolated by culturomics at the D and E timepoints from the twins. A: the bacteria isolated under different conditions at the D timepoint from the twins; B: the bacteria isolated under different conditions at the E timepoint from the twins. The red square indicated the bacteria existed both in C1 and C2. The bacteria isolated under different culture conditions at each timepoint were represented by horizontal lines of different colors.

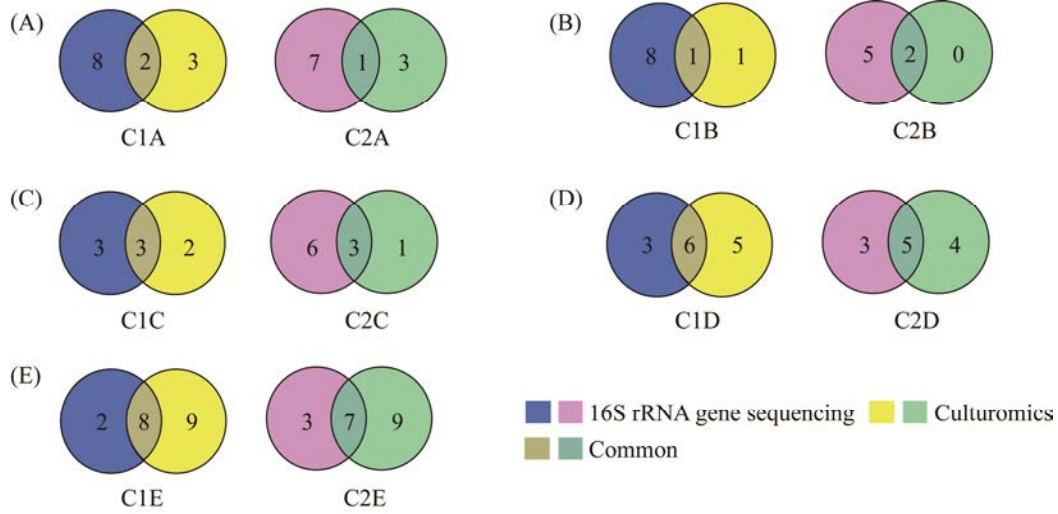


图 7 属水平培养组学和 16S rRNA 基因测序结果对比

Figure 7 Comparison of 16S rRNA gene sequencing and culturomics at genus level. A–E represent the comparison between the genera identified by 16S rRNA gene sequencing and the genera isolated by culturomics from the fecal samples at A–E timepoints.

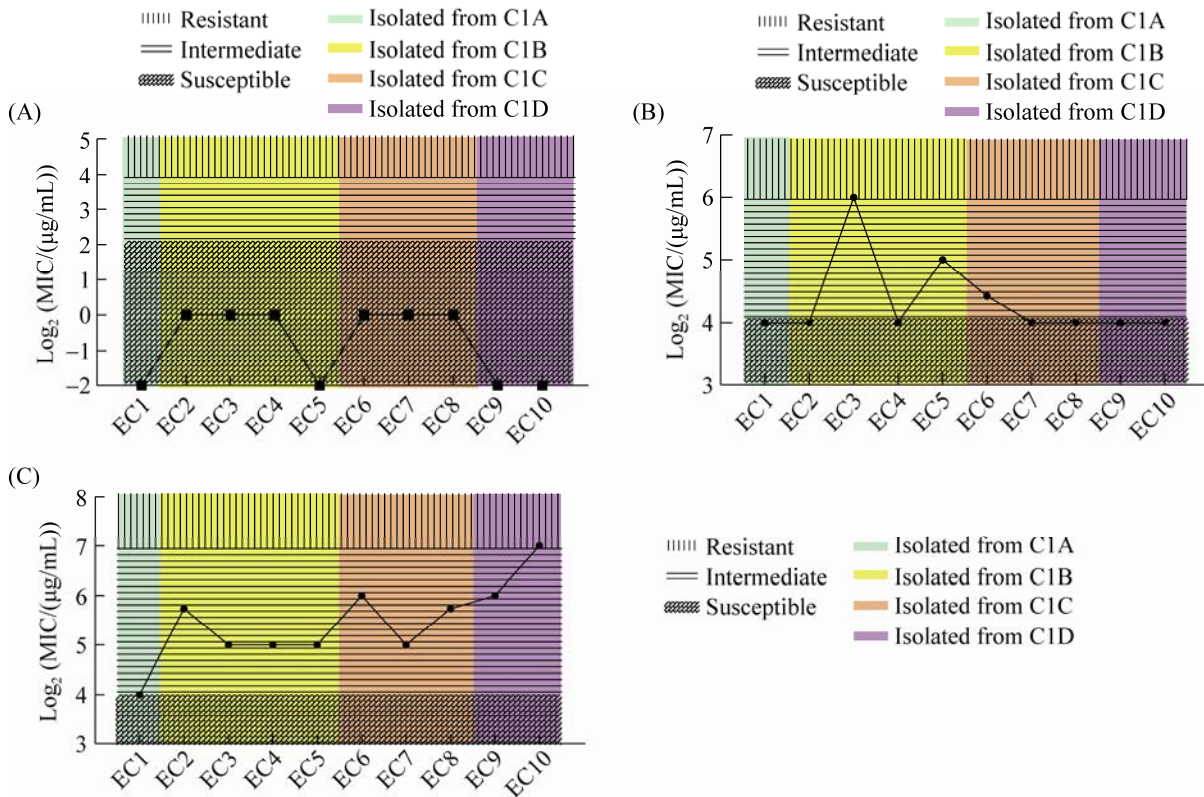


图 8 10 株阴沟肠杆菌体外药敏试验检测结果

Figure 8 Detection of antibiotic resistance of the 10 *E. cloacae* strains. A: detection of antibiotic resistance to imipenem; B: cefoperazone; C: piperacillin of the 10 *E. cloacae* strains.

变为中介；而从转出的 C1D 样本分离得到的 EC10 表现出对哌拉西林耐药。这些结果表明，即使在不同的治疗阶段仅使用一种抗生素，也会导致 EC 对不同药物的耐药性发生改变。

3 讨论与展望

微生物培养对于表型、生态学和抗菌药物敏感性的实验验证是非常宝贵的资源^[10]。所以将微生物从环境或人类肠道分离并接种到合适的培养基和培养环境中使其生长并获得纯培养物是至关重要的，这可以进一步深入了解细菌的生长特性、代谢和其他功能^[11]。测序技术是研究肠道菌群的重要手段，可同时处理大量样本、进行差异菌群的检测以及分析无法培养的细菌，极大地促进了肠道菌群的研究。培养组学方法通过预培养和采用多种培养条件，可以分离获得样本中实际存在的活菌培养物，使该方法同样适合分析新生儿粪便等细菌初始相对丰度较低的样本^[12]。同时，延长预培养时间、设立多个取样时间点、使用上机血培养瓶等多种优化策略，可以显著提高这些细菌的相对丰度和检出率^[13]。因此在本研究中，我们采用了 2 种方法共同分析粪便样本，以提高这 2 名新生儿粪便样本中所反映的肠道细菌的检出率。从所得结果看出，培养组学和测序方法在分析中存在差异且各具优势。预增菌体系内存在细菌的相互作用，使得体系内各种细菌相对丰度和检出菌种类出现改变。例如，初始相对丰度较低的细菌随预增菌时间延长不断增殖，直至达到可检出的丰度；生长速率较快的细菌大量消耗营养物质而取代生长速率缓慢的细菌，使后者不易被检出。而测序方法仅反映样本采集后即时的细菌构成和相对丰度情况，所以两种方法的分析结果存在异同。

抗生素、喂养方式和外界环境等许多因素

都会影响婴儿的肠道微生物群。本研究通过观察该对患儿整个治疗过程的肠道菌群动态变化，可以很好地反映这 3 个因素的共同作用，为新生儿住院期间肠道菌群的扰动和恢复提供参考。医院环境是影响肠道微生物群的重要因素。通常，低出生体重和/或患有严重疾病的新生儿将在新生儿重症监护病房的培养箱中接受护理^[14]。其中的大多数患者需要接受抗生素治疗、长期卧床休息和营养支持，甚至进行外科治疗，这些都是增加条件致病菌定殖和感染率的因素。由于这对双胞胎患有 CCHD 而在新生儿重症监护病房接受护理，肠道微生物群组成的变化可能是由医疗器械、皮肤、空气或其他环境因素引起的。因此，在住院期间从粪便样本中分离出常见的条件致病菌。

研究显示，不同的喂养模式似乎不会在出生后的第一周对新生儿的肠道菌群产生显著影响^[15]，但母乳喂养 1 个月后，新生儿肠道菌群与母亲的母乳成分关系就更为密切^[16]。本研究也发现，该对患儿离院居家母乳喂养 4 个月后肠道菌群构成发生了明显改变，部分常见条件致病菌属无法通过培养组学方法分离获得，同时可分离获得多种益生菌，如鼠李糖乳杆菌、长双歧杆菌和双歧双歧杆菌等。测序结果显示复诊样本中克雷伯菌属相对丰度减低，代表肠道细菌丰富度的 Shannon 指数增高，说明该对患儿经过近 4 个月的母乳喂养，正在恢复和逆转短期抗生素治疗对肠道菌群的影响。

我们还检测了阴沟肠杆菌的耐药性是否在抗生素使用过程中发生变化，这对于改善住院患者抗生素治疗期间逐渐表现出对所用抗生素耐药的临床现状至关重要。据报道，细菌所携带的抗生素耐药基因在抗生素治疗后大量增加，并可持续保留至少 1 年^[17-18]。接受抗生素治疗的患者中检测到的抗生素耐药基因的总相

对丰度显著高于健康个体^[19-20]，其中部分基因可以在 ICU 住院 5 或 12 d 后检测到^[20]。研究显示，抗生素治疗 3 d 后，肠道微生物群的组成和多样性即可发生急剧变化，这种肠道菌群失调的状态可能会促进耐药基因的水平转移，促进耐药病原体的进化和抗生素耐药性的传播^[21]。阴沟肠杆菌是一种经常从临床环境中分离的条件致病菌，在 C1 患儿治疗期间的 4 个时间点均可分离获得，因此，我们测定了不同治疗阶段分离到的阴沟肠杆菌的耐药性。C1D 样本中分离到的 EC10 表现出对哌拉西林的耐药，提示我们应该重视新生儿抗生素的临床应用，避免长期使用单一抗生素从而引发肠道细菌产生耐药性。

综上所述，该对患儿住院期间肠道菌群构成和多样性发生明显改变，在接受母乳喂养后肠道菌群内益生菌开始定殖，肠道菌群多样性水平恢复。另外治疗期间患儿体内阴沟肠杆菌逐渐对哌拉西林耐药，为以后关注新生儿抗生素的临床应用和肠道菌群动态变化提供参考。

参考文献

- [1] Wang SP, Ryan CA, Boyaval P, Dempsey EM, Ross RP, Stanton C. Maternal vertical transmission affecting early-life microbiota development. *Trends in Microbiology*, 2020, 28(1): 28–45.
- [2] Ferretti P, Pasolli E, Tett A, Asnicar F, Gorfer V, Fedi S, Armanini F, Truong DT, Manara S, Zolfo M, Beghini F, Bertorelli R, De Sanctis V, Bariletti I, Canto R, Clementi R, Cologna M, Crifò T, Segata N. Mother-to-infant microbial transmission from different body sites shapes the developing infant gut microbiome. *Cell Host & Microbe*, 2018, 24(1): 133–145.e5.
- [3] Ellis CL, Rutledge JC, Underwood MA. Intestinal microbiota and blue baby syndrome: probiotic therapy for term neonates with cyanotic congenital heart disease. *Gut Microbes*, 2010, 1(6): 359–366.
- [4] Lu Q, Cheng SP, Zhou M, Yu JL. Risk factors for necrotizing enterocolitis in neonates: a retrospective case-control study. *Pediatrics & Neonatology*, 2017, 58(2): 165–170.
- [5] Giannone PJ, Luce WA, Nankervis CA, Hoffman TM, Wold LE. Necrotizing enterocolitis in neonates with congenital heart disease. *Life Sciences*, 2008, 82(7/8): 341–347.
- [6] Yang YH, Yau KI, Wu MH, Tang JR. Cyanotic congenital heart disease and necrotizing enterocolitis: report of three cases. *Acta Paediatrica Taiwanica = Taiwan Er Ke Yi Xue Hui Za Zhi*, 1999, 40(5): 348–350.
- [7] Greenwood C, Morrow AL, Lagomarcino AJ, Altaye M, Taft DH, Yu ZT, Newburg DS, Ward DV, Schibler KR. Early empiric antibiotic use in preterm infants is associated with lower bacterial diversity and higher relative abundance of *Enterobacter*. *The Journal of Pediatrics*, 2014, 165(1): 23–29.
- [8] Hildebrand F, Moitinho-Silva L, Blasche S, Jahn MT, Gossmann TI, Huerta-Cepas J, Hercog R, Luetge M, Bahram M, Pryszyk A, Alves RJ, Waszak SM, Zhu AN, Ye LM, Costea PI, Aalvink S, Belzer C, Forslund SK, Sunagawa S, Hentschel U, Merten C, Patil KR, Benes V, Bork P. Antibiotics-induced monodominance of a novel gut bacterial order. *Gut*, 2019, 68(10): 1781–1790.
- [9] Fassarella M, Blaak EE, Penders J, Nauta A, Smidt H, Zoetendal EG. Gut microbiome stability and resilience: elucidating the response to perturbations in order to modulate gut health. *Gut*, 2021, 70(3): 595–605.
- [10] Thrash JC. Culturing the uncultured: risk versus reward. *mSystems*, 2019, 4(3): e00130-19.
- [11] Lewis WH, Tahon G, Geesink P, Sousa DZ, Ettema TJG. Innovations to culturing the uncultured microbial majority. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19(4): 225–240.
- [12] Roswall J, Olsson LM, Kovatcheva-Datchary P, Nilsson S, Tremaroli V, Simon MC, Kiilerich P, Akrami R, Krämer M, Uhlén M, Gummesson A, Kristiansen K, Dahlgren J, Bäckhed F. Developmental trajectory of the healthy human gut microbiota during the first 5 years of life. *Cell Host & Microbe*, 2021, 29(5): 765–776.e3.
- [13] Chang YX, Hou FY, Pan ZY, Huang ZY, Han N, Bin L, Deng HM, Li ZC, Ding L, Gao H, Zhi FC, Yang RF, Bi YJ. Optimization of culturomics strategy in human fecal samples. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2891.
- [14] Tauchi H, Yahagi K, Yamauchi T, Hara T, Yamaoka R,

- Tsukuda N, Watanabe Y, Tajima S, Ochi F, Iwata H, Ohta M, Ishii E, Matsumoto S, Matsuki T. Gut microbiota development of preterm infants hospitalised in intensive care units. *Beneficial Microbes*, 2019, 10(6): 641–651.
- [15] Bäckhed F, Roswall J, Peng YQ, Feng Q, Jia HJ, Kovatcheva-Datchary P, Li Y, Xia Y, Xie HL, Zhong HZ, Khan MT, Zhang JF, Li JH, Xiao L, Al-Aama J, Zhang DY, Lee YS, Kotowska D, Wang J. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host & Microbe*, 2015, 17(5): 690–703.
- [16] Pannaraj PS, Li F, Cerini C, Bender JM, Yang SX, Rollie A, Adisetiyo H, Zabih S, Lincez PJ, Bittinger K, Bailey A, Bushman FD, Sleasman JW, Aldrovandi GM. Association between breast milk bacterial communities and establishment and development of the infant gut microbiome. *JAMA Pediatrics*, 2017, 171(7): 647–654.
- [17] Forslund K, Sunagawa S, Kultima JR, Mende DR, Arumugam M, Typas A, Bork P. Country-specific antibiotic use practices impact the human gut resistome. *Genome Research*, 2013, 23(7): 1163–1169.
- [18] Yassour M, Vatanen T, Siljander H, Hämmäläinen AM, Härkönen T, Ryhänen SJ, Franzosa EA, Vlamakis H, Huttenhower C, Gevers D, Lander ES, Knip M, Group DS, Xavier RJ. Natural history of the infant gut microbiome and impact of antibiotic treatment on bacterial strain diversity and stability. *Science Translational Medicine*, 2016, 8(343): 343ra81.
- [19] Duan YJ, Chen ZY, Tan L, Wang XL, Xue YG, Wang SP, Wang Q, Das R, Lin H, Hou J, Li LY, Mao DQ, Luo Y. Gut resistomes, microbiota and antibiotic residues in Chinese patients undergoing antibiotic administration and healthy individuals. *Science of the Total Environment*, 2020, 705: 135674.
- [20] Buelow E, Bello González TDJ, Fuentes S, De Steenhuijsen Pijters WAA, Lahti L, Bayjanov JR, Majoor EAM, Braat JC, Van Mourik MSM, Oostdijk EAN, Willems RJL, Bonten MJM, Van Passel MWJ, Smidt H, Van Schaik W. Comparative gut microbiota and resistome profiling of intensive care patients receiving selective digestive tract decontamination and healthy subjects. *Microbiome*, 2017, 5(1): 88.
- [21] Stecher B, Maier L, Hardt WD. ‘Blooming’ in the gut: how dysbiosis might contribute to pathogen evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(4): 277–284.