

DOI:10.13350/j.cjpb.250209

• 论著 •

基于高通量测序技术对脑卒中相关性肺炎多重耐药病原微生物分析

陶智*, 李仙丽, 刘琼

(武汉市新洲区人民医院检验科, 湖北武汉 431400)

【摘要】 **目的** 通过高通量测序技术分析脑卒中相关性肺炎(SAP)感染组织中病原微生物特点,明确多重耐药(MDR)的情况,为临床肺组织感染病原菌的鉴定及治疗提供快速、准确的方法。 **方法** 从2022年1月-2023年12月于本院治疗的SAP患者中,选取130例发生MDR者作为研究对象,采集所有患者呼吸道样本,应用高通量测序技术进行病原微生物的鉴定,明确菌群特点,同时进行药敏试验,分析MDR情况;另选取30例SAP未发生MDR的患者作SAP组,比较分析诱发SAP患者发生MDR的危险因素。 **结果** 130例SAP发生MDR患者,共检出189株病原菌,其中革兰阴性杆菌99株,革兰阳性球菌占30.16%,真菌占11.64%及其他类型的细菌或微生物占5.82%。革兰阴性杆菌主要耐药性:嗜麦芽窄食单胞菌对头孢他啶、替卡西林、美罗培南的耐药率均在60%以上,其中对替卡西林的耐药率达80%;粘质沙雷菌对头孢他啶、头孢噻吩氨曲南的耐药率>60%;肺炎克雷伯菌对头孢他啶、头孢噻吩、头孢曲松和头孢吡肟超过60%;革兰阳性球菌主要耐药性:金黄色葡萄球菌对青霉素G、苯唑西林、氨苄西林、替考拉宁的耐药率均在60%以上,其中青霉素G耐药率最高占(75%);屎肠球菌对青霉素G、苯唑西林、红霉素、氨苄西林、万古霉素的耐药率均超过75%,其中对青霉素G、氨苄西林、红霉素、万古霉素的耐药率大于80%;肺炎链球菌对青霉素G、苯唑西林、红霉素、复方磺胺甲噁唑、氨苄西林的耐药率均超过65%,对青霉素G、苯唑西林耐药率占比高(83.33%)。经Logistic回归分析结果显示,年龄(大)、预防抗生素使用(有)、感染菌种类型(≥ 2 种)、糖尿病史是诱发SAP患者发生MDR的危险因素($P < 0.05$)。 **结论** 高通量测序技术可较准确的鉴定出SAP感染组织中病原微生物及菌群特征,耐药位点检测全面,且有扩展性,优势显著,临床应用推广性高。

【关键词】 高通量测序技术;脑卒中;脑卒中相关性肺炎;多重耐药;病原微生物

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2025)02-0176-06

[Journal of Pathogen Biology. 2025 Feb.;20(02):176-181.]

The multi-drug resistant pathogenic microorganisms of stroke-associated pneumonia will be analyzed using high-throughput sequencing technology

TAO Zhi, LI Xianli, LIU Qiong (Department of Clinical Laboratory, Xinzhou District People's Hospital, Wuhan 431400, China)*

【Abstract】 **Objective** This study aims to employ high-throughput sequencing technology to analyze the characteristics of pathogenic microorganisms in stroke-associated pneumonia (SAP) infected tissues, elucidate the extent of multi-drug resistance (MDR), and establish a rapid and accurate method for identifying and treating pathogens in clinical lung tissue infections. **Methods** From January 2022 to December 2023, a total of 130 patients with MDR infections were selected as the subjects for this study. Respiratory tract samples were collected from all patients, and high-throughput sequencing technology was utilized to identify pathogenic microorganisms to elucidate bacterial characteristics. Additionally, drug sensitivity testing was conducted to analyze the MDR profiles. Another group of 30 SAP patients without MDR infections was selected as the control group, allowing for comparison and analysis of risk factors associated with MDR in SAP patients. **Results** A total of 189 strains of pathogens were detected in 130 SAP patients with MDR, including 99 strains of gram-negative bacilli, accounting for 30.16% of Gram-positive cocci, accounting for 11.64% of fungi, and accounting for 5.82% of other types of bacteria or microorganisms. Primary drug resistance of Gram-negative bacilli: The rates of drug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* to ceftazidime, ticarcillin, and meropenem exceeded 60%, with the resistance rate to ticarcillin reaching up to 80%. The resistance rate of *Serratia marcescens* to ceftazidime and ceftiozanone was greater than 60%. Over 60% of *Klebsiella pneumoniae* isolates exhibited resistance towards ceftazidime, cephalothin, ceftriaxone, and cefepime. Primary resistance of Gram-positive cocci: The resistance rates of *Staphylococcus aureus* to penicillin G, oxacillin, ampicillin, and teicoplanin exceeded 60%, with the highest resistance rate

* **【通讯作者(简介)】** 陶智(1970-),男,武汉新洲人,本科,副主任技师,研究方向:微生物鉴定及药敏。E-mail:tao15392866988@163.com

observed for penicillin G (75%). The resistance rates of *Enterococcus faecium* to penicillin G, oxacillin, erythromycin, ampicillin, and vancomycin were over 75%, while the resistance rates to penicillin G, ampicillin, erythromycin, and vancomycin surpassed 80%. *Streptococcus pneumoniae* exhibited drug resistance rates exceeding 65% against penicillin G, oxacillin, erythromycin compound sulfamethoxazole, and ampicillin; notably high drug resistance was observed for penicillin G and oxacillin (83.33%). The results of the Logistic regression analysis revealed that advanced age, positive use of prophylactic antibiotics, presence of two or more types of infection bacteria, and a history of diabetes were identified as significant risk factors for MDR infections in patients with SAP ($P < 0.05$). **Conclusion** High-throughput sequencing technology can precisely identify pathogenic microorganisms and bacterial flora characteristics in SAP-infected tissues, comprehensively detecting drug-resistance sites. With significant advantages and expandability, it is highly recommended for clinical applications.

【Keywords】 high-throughput sequencing technology; stroke; stroke-associated pneumonia; multi-drug resistance; pathogenic microorganisms

脑卒中相关性肺炎 (Stroke-associated pneumonia, SAP)是由脑卒中后吞咽困难、意识障碍、反射减弱等引误吸导致的严重并发症,常发生在卒中后1周内,不仅增大了治疗难度,还会增加脑卒中患者的住院时间和病死率^[1-2]。临床资料显示^[3],脑卒中患者中约50%的患者并发相关性肺炎,病死率高达30%~50%,而内科抗感染治疗可有效降低SAP患者的死亡率和死亡风险。但不少研究表示^[4-5],由于广谱抗生素在临床的广泛使用,甚至不合理应用,多重耐药 (multi-drug resistance, MDR)菌检出率增高,导致SAP的治疗变得复杂且困难。因此,及时诊断和有效抗感染治疗,对改善脑卒中患者预后至关重要,而感染组织中病原菌及抗生素敏感性的鉴定是其中关键一环。据报道^[6],现临床99%以上的细菌和真菌均无法通过人工培养获得,而传统微生物培养法在鉴定MDR菌病原微生物方面存在局限性,导致临床治疗缺乏有效的指导。高通量测序是继第一代测序后出现的新测序方法,该技术可以在短时间内测定数百万个DNA序列,具有高通量、高速度、高准确度等特点,是目前研究微生物多样性和鉴定病原微生物的重要工具^[7]。Li等^[8]基于高通量测序技术的研究显示,该技术能够对临床样本中的微生物群落进行全面分析,揭示微生物的组成和多样性,为MDR病原微生物的鉴定提供了新的视角。但临床发现病原菌的分布和耐药模式存在显著的地域和时间差异,关于高通量测序技术分析SAP患者MDR的病原微生物仍在探索阶段,鉴于此,本研究旨在利用高通量测序技术,对SAP患者的临床样本进行深入分析,以期揭示MDR病原微生物的分布特点和耐药机制,为临床提供更为精准的诊断和治疗依据。

对象与方法

1 研究对象

回顾性分析2022年1月-2023年12月于本院治

疗的130例SAP发生MDR患者,其中男性73例,年龄41~85岁,平均(63.68±8.83)岁,女性57例,年龄43~86岁,平均(64.12±9.14)岁。诊断标准符合:(1)结合CT或磁共振检查、血清学检查结果等符合脑卒中诊断标准者;(2)符合《卒中相关性肺炎诊治中国专家共识》中SAP诊断标准,确诊为SAP者;(3)对常用三类或三类以上的抗菌药物进行抗菌药物敏感性测试,确诊为MDR者。纳入标准:①确诊为脑卒中,符合《卒中相关性肺炎诊治中国专家共识》^[9]中SAP诊断标准;②治疗中出现常用3类或以上抗菌药物同时出现耐药;③相关临床资料完整者。排除标准:①脑卒中发生前,已经存在肺部感染者;②合并有肺结核、肺部肿瘤、慢阻肺等肺功能不良者;③伴随大面积外伤(烧伤、烫伤等)诱发全身感染者;④临床相关资料及病史不全者。

本研究获本院伦理委员会审核批准。

2 方法

2.1 资料收集 收集所有患者临床相关资料,包括年龄、性别、血压[收缩压(SBP,120~139 mmHg)、舒张压(DBP,60~89 mmHg)]、呼吸频率(16~18次/min)、脑卒中类型(脑梗死/脑出血)、卒中相关性肺炎类型(早发型/晚发型)、预防抗生素使用情况(有/无)、NIHSS评分、血清白蛋白(Albumin, Alb)、血红蛋白(Hemoglobin, Hb)、免疫球蛋白A(Immunoglobulin A, IgA)、免疫球蛋白M(Immunoglobulin M, IgM)、免疫球蛋白G(Immunoglobulin G, IgG)、白细胞计数(White blood cell Count, WBC)、血小板计数(Platelet, PLT)、微小核糖核酸RNA-29c(Microribonucleic acid RNA-29c, miR-29c)、B7族同源性3蛋白(B7 homology 3 protein, B7-H3)、白介素-17(Interleukin-17, IL-17)、肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)表达水平、感染菌种(≥ 2 种, <2种)、糖尿病史、慢阻肺史、抽烟史、多发性外伤史。

2.2 样本收集 在生物安全条件下收集患者呼吸道样本,结合患者具体情况选择合适的样本类型,包括咽拭子、鼻拭子、痰液、支气管肺泡灌洗液或肺组织样本,并进行样本预处理。每份样本均分为3份,其中两份分别立即送检验科进行培养鉴定和病理科进行病理组织学检查,另一份保存于 -80°C 中以进行高通量测序。患者标本编号:PCR001I~PCR00136I。

2.3 微生物培养 在无菌条件下,采用划线接种、涂布接种、穿刺接种等方式,将处理过的样本接种到不同的培养基上,放置在恒温培养箱中进行培养,培养条件(温度、气体环境、时间等)根据疑似病原体的特性进行优化。培养期间定期观察培养基的生长情况(菌落的形态、颜色、大小等);对于可疑菌落进行分离纯化,以获得纯净的微生物群体,再通过生化实验、免疫学方法、分子生物学技术对分离的微生物进行鉴定,同时对培养出的病原体进行抗生素敏感性测试。微生物及药敏鉴定采用 BDphonex 血培养分析仪和 BD100 全自动细菌鉴定药敏系统。微生物培养标本的接种、分离等过程均由专业的检验科人员参照全国临床检验操作规程进行。

2.4 高通量测序 将样本放入含有 Trizol 的离心管中,加入裂解缓冲液破坏细胞结构,使组织充分裂解,释放核酸,加入氯仿,剧烈震荡后离心,分离水相和有机相,吸取上层水相,加入异丙醇,混匀后静置,使核酸沉淀,离心后弃上清液,用预冷的 75% 无水乙醇洗涤沉淀,二次离心后弃去上清液,将沉淀物晾干,使用 DEPC 水重悬核酸,提取样本中的 DNA 或 RNA,再用 NanoDrop 等仪器测定核酸的浓度和纯度(评估 RNA 的质量(A_{260}/A_{280} 比值应在 1.8~2.0 之间)。将提取的 DNA 片段化,可通过酶切或物理方法打断 DNA 片段,用末端修复酶将 DNA 片段的末端进行修复,将 DNA 片段连接到测序适配体上,形成 DNA 适配体复合物,根据 PCR 试剂盒使用特异性引物序列(MPF: 5'-TGTAACCNTCTCTTGNCTGTCT-3' 和 R: 5'-CGATTNCTCCTACCTNTTCTCTA-3')对基因片段运用 ABI GeneAmp 9700 PCR 仪进行扩增。再用 PCR 扩增技术对 DNA 适配体复合物进行扩增,获得足够的文库量构建适合测序平台的文库;随即用 1% 琼脂糖凝胶电泳、凝胶柱等方法对文库进行纯化,去除杂质和未连接的适配体,在文库构建的每个步骤中,都需要进行质量控制,以确保文库的质量符合测序的要求;并在测序前,对文库进行定量,以确定上机测序的文库浓度,将准备好的文库加载到高通量测序平台(Illumina HiSeq2500 测序平台)上进行测序,测序完成后,对产生的大量原始数据进行质量控制、序列比对、变异检测、注释等生物信息学分析。

2.5 灵敏度检测 将临床标本分成3份,一份均匀涂布在血平板上,培养 12~24 h 后取主要单菌落进行纯培养。使用 VITEK2 全自动微生物鉴定系统进行病原微生物鉴定,灵敏度检测以金黄色葡萄球菌 ATCC1.3.543300、肺炎链球菌 ATCC49619、鲍曼不动杆菌 ATCC 19606、大肠杆菌 ATCC 35150、白色念珠菌 ATCC10231 为目标,通过 PCR 方法从目标基因组中获取目标扩增片段。然后将扩增片段依次梯度稀释为 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 copy/ μL ,取 5 μL 模板进行多重 PCR 扩增,每个梯度设置重复试验 3 组。空白对照组模板均为无菌水。

3 统计学分析

采用 Excel2024 版统计学表格软件分析软件数据,数据中病原菌以株数(n)和百分率(%)表示。测序数据根据 Barcode 序列和 PCR 扩增引物序列从下机数据中拆分读取,基于 Clean Tags 进行 OTUs 聚类分析根据 OTUs 聚类结果,一方面对每个 OTU 的代表序列做物种注释,得到对应的物种注释信息和基于物种的丰度分布情况。同时,对 OTUs 进行丰度(统计,可视化)Alpha 多样性分析等,以得到样品内物种丰富度和均匀度信息、不同样品间的共有和特有 OTUs 信息等。其中符合正态分布的计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验,计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 SAPMDR 患者的病原菌分布情况

130 例 SAP 发生 MDR 的患者,共检出 189 株病原菌,其中革兰阴性杆菌 99 株,占 52.38%,以嗜麦芽窄食单胞菌(35 株,18.52%)、粘质沙雷菌(27 株,14.29%)、肺炎克雷伯菌为主(22 株,11.64%)为主,鲍曼不动杆菌 8 株(占 4.23%)、铜绿假单胞菌 5 株(占 2.65%)、大肠埃希菌 2 株(占 1.06%);革兰阳性球菌 57 株,占 30.16%,以金黄色葡萄球菌(20 株,10.58%)、屎肠球菌(16 株,8.47%)、肺炎链球菌(12 株,6.35%)为主,表皮葡萄球菌 6 株(占 3.17%)、化脓性链球菌 3 株(占 1.59%);真菌 22 株,占 11.64%,分别为光滑念珠菌 10 株(占 5.29%)、耳念珠菌 7 株(占 3.70%)、热带念珠菌 3 株(占 1.59%)、烟曲霉 2 株(占 1.06%);其他类型的细菌或微生物 11 株,占 5.82%。

2 主要革兰阴性杆菌对不同抗菌药物的耐药性

嗜麦芽窄食单胞菌、粘质沙雷菌、肺炎克雷伯菌对头孢他啶的耐药率在 60% 以上,对哌拉西林均超过 70%;粘质沙雷菌、肺炎克雷伯菌对头孢噻吩的耐药率在 60% 以上;嗜麦芽窄食单胞菌、肺炎克雷伯菌对替

卡西林的耐药率大于60%，嗜麦芽窄食单胞菌达到80%；肺炎克雷伯菌对头孢曲松和头孢吡肟、嗜麦芽窄食单胞菌对美罗培南、粘质沙雷菌对氨曲南的耐药率均在60%以上。见表1。

表1 主要革兰阴性杆菌对不同抗菌药物的耐药性(n,%)
Table 1 Resistance of major Gram-negative bacteria to different antimicrobials (n,%)

抗菌药物	嗜麦芽窄食单胞菌 (n=35)		粘质沙雷菌 (n=27)		肺炎克雷伯菌 (n=22)	
	n	耐药率 (%)	n	耐药率 (%)	n	耐药率 (%)
庆大霉素	10	28.57	2	7.41	6	27.27
哌拉西林	27	77.14	21	77.78	17	77.27
万古霉素	14	40.00	1	3.70	0	0.00
替卡西林	28	80.00	5	18.52	15	68.18
左氧氟沙星	19	54.29	4	14.81	5	22.73
头孢他啶	22	62.86	18	66.67	15	68.18
头孢噻吩	12	34.29	17	62.96	14	63.64
头孢曲松	13	37.14	3	11.11	16	72.73
头孢吡肟	9	25.71	6	22.22	14	63.64
美罗培南	23	65.71	0	0.00	4	18.18
环丙沙星	13	37.14	4	14.81	8	36.36
妥布霉素	2	5.71	6	22.22	13	59.09
氨曲南	9	25.71	18	66.67	11	50.00
亚胺培南	3	8.57	0	0.00%	1	4.55

3 主要革兰阳性球菌对不同抗菌药物的耐药性

金黄色葡萄球菌对青霉素 G、苯唑西林、氨苄西林、替考拉宁的耐药率均在60%以上，其中青霉素 G 耐药率最高占(75%)；屎肠球菌对青霉素 G、苯唑西林、红霉素、氨苄西林、万古霉素的耐药率均超过75%，其中对青霉素 G、氨苄西林、红霉素、万古霉素的耐药率大于80%；肺炎链球菌对青霉素 G、苯唑西林、红霉素、复方磺胺甲噁唑、氨苄西林的耐药率均超过65%，对青霉素 G、苯唑西林耐药率占比高，均占83.33%。见表2。

表2 主要革兰阳性球菌对不同抗菌药物的耐药性(n,%)
Table 2 Resistance of major Gram-positive coccus to different antibiotics (n,%)

抗菌药物	金黄色葡萄球菌 (n=20)		屎肠球菌 (n=16)		肺炎链球菌 (n=12)	
	n	耐药率 (%)	n	耐药率 (%)	n	耐药率 (%)
庆大霉素	9	45.00	8	50.00	1	8.33
青霉素 G	15	75.00	13	81.25	10	83.33
苯唑西林	12	60.00	14	87.50	10	83.33
红霉素	6	30.00	13	81.25	9	75.00
环丙沙星	4	20.00	1	6.25	5	41.67
复方磺胺甲噁唑	10	50.00	6	37.50	8	66.67
氨苄西林	14	70.00	12	75.00	9	75.00
呋喃妥因	3	15.00	3	18.75	1	8.33
万古霉素	10	50.00	13	81.25	0	0.00
替考拉宁	13	65.00	5	31.25	0	0.00

4 影响脑卒中患者诱发 SAP 患者 MDR 的相关因素分析

两组性别占比、血压水平、脑卒中类型、发病类型占比比较，差异无统计学意义($P > 0.05$)；耐药组年龄、呼吸频率、预防抗生素使用占比、血清 Alb、WBC、PLT、B7-H3、TNF- α 水平、感染菌种 ≥ 2 种占比、糖尿病史占比、慢阻肺史占比、抽烟史占比、多发性外伤史占比高于 SAP 组($P < 0.05$)；耐药组血清 Hb、IgA、IgM、IgG、miR-29c 水平、感染菌种 < 2 种、低于 SAP 组($P < 0.05$)。见表3。

表3 影响脑卒中患者诱发 SAP 患者 MDR 的相关因素分析
Table 3 Analysis of related factors affecting MDR in patients with SAP induced by stroke

因素	SAP组 (n=30)	耐药组 (n=130)	χ^2/t 值	P 值
年龄($\bar{x} \pm s$, 岁)	65.51 \pm 5.83	68.79 \pm 4.67	3.403	0.001
性别[n(%)]			0.559	0.455
男	16(53.33)	79(60.77)		
女	14(46.67)	51(39.23)		
血压($\bar{x} \pm s$, mmHg)				
SBP	139.67 \pm 4.51	141.49 \pm 5.67	1.641	0.103
DBP	83.65 \pm 2.38	84.45 \pm 2.45	1.621	0.107
呼吸频率($\bar{x} \pm s$, 次/min)	21.36 \pm 2.78	23.23 \pm 2.61	3.494	0.001
脑卒中类型[n(%)]			0.112	0.738
脑梗死	17(56.67)	78(60.00)		
脑出血	13(43.33)	52(40.00)		
发病类型[n(%)]			0.257	0.612
早发型	13(43.33)	63(48.46)		
晚发型	17(56.67)	67(51.54)		
预防抗生素使用[n(%)]			11.736	0.001
有	22(73.33)	42(38.18)		
无	8(26.67)	68(61.82)		
Alb($\bar{x} \pm s$, g/L)	35.63 \pm 3.62	33.02 \pm 4.14	3.182	0.002
Hb($\bar{x} \pm s$, g/L)	125.16 \pm 15.66	113.08 \pm 11.54	4.810	<0.001
IgA($\bar{x} \pm s$, g/L)	1.62 \pm 0.66	1.14 \pm 0.70	3.420	0.001
IgM($\bar{x} \pm s$, g/L)	1.63 \pm 0.54	1.05 \pm 0.63	4.660	<0.001
IgG($\bar{x} \pm s$, g/L)	11.62 \pm 1.76	9.86 \pm 1.53	5.518	<0.001
WBC($\bar{x} \pm s$, $\times 10^9/L$)	11.06 \pm 1.41	12.68 \pm 1.67	4.921	<0.001
PLT($\bar{x} \pm s$, $\times 10^9/L$)	199.50 \pm 20.69	215.47 \pm 22.85	3.509	0.001
miR-29c($\bar{x} \pm s$)	1.29 \pm 0.42	1.06 \pm 0.31	3.411	0.001
B7-H3($\bar{x} \pm s$, $\mu g/L$)	6.31 \pm 1.69	7.12 \pm 1.24	2.998	0.003
IL-17($\bar{x} \pm s$, ng/L)	311.69 \pm 45.24	340.37 \pm 50.66	2.848	0.005
TNF- α ($\bar{x} \pm s$, pg/L)	23.81 \pm 5.16	28.54 \pm 6.68	3.633	<0.001
感染菌种类[n(%)]			89.488	<0.001
<2种	27(90.00)	11(8.46)		
≥ 2 种	3(10.00)	119(91.54)		
NIHSS 评分($\bar{x} \pm s$, 分)	20.36 \pm 2.13	23.16 \pm 2.36	5.960	<0.001
糖尿病史[n(%)]	4(13.33)	46(35.38)	4.538	0.033
慢阻肺史[n(%)]	3(8.05)	51(39.23)	6.246	0.012
抽烟史[n(%)]	13(43.33)	89(68.46)	6.660	0.010
多发性外伤史[n(%)]	2(6.67)	38(29.23)	5.470	0.019

5 Logistic 回归分析影响脑卒中患者诱发 SAP 患者 MDR 的危险因素

将有统计学意义的指标作为自变量(X)，发生 MDR 作为因变量(Y)；发生记为 1、未发生记为 0，进

行 Logistic 回归分析赋值。Logistic 回归分析结果显示,年龄、预防抗生素使用(无)、感染菌种类型(≥ 2 种)、糖尿病史是诱发 SAP 患者发生 MDR 的危险因素($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 Logistic 回归分析影响脑卒中患者诱发 SAP 患者 MDR 的危险因素

Table 4 Logistic regression analysis of the risk factors affecting stroke patients induced SAP patients MDR

变量	β 值	SE	Wald χ^2 值	OR 值	95%CI		P 值
					下限	上限	
常量	-1.115	0.091	149.592	-	-	-	-
年龄	1.316	0.271	23.582	3.728	0.968	6.489	<0.001
预防抗生素使用(无)	1.102	0.312	12.475	3.010	1.271	4.749	<0.001
感染菌种类型(≥ 2 种)	1.003	0.351	8.166	2.726	1.001	4.452	<0.001
糖尿病史(是)	0.891	0.215	17.174	2.438	0.996	3.879	0.035

讨 论

病原微生物耐药性的发生机制复杂,且其耐药机制会被各种耐药基因获得与传播,导致 MDR 的发生,而 MDR 是导致 SAP 死亡的危险因素之一^[10-11]。据报道^[12],发生 SAP 的脑卒中患者 30 d 病死率是未发生 SAP 的 3 倍,而当 SAP 患者发生 MDR,大大增加了治疗难度及复杂性,继而增加患者的住院时间和死亡率。根据病原菌培养及药敏结果给予精准抗生素治疗是目前临床的常用治疗手段,已经取得一定成就。既往临床主要依据痰培养加药敏实验结果制定抗生素治疗方案,但不少学者发现^[13-15],病原菌培养时间较长,对于急性发作的肺炎患者存在一定局限性,且痰培养易受口腔其他菌群的污染,影响结果的精准度,进而影响抗生素选择,增加耐药的发生风险及死亡风险,延长住院时间。多项药敏试验报告显示^[16-17],卒中相关性肺炎的病原体耐药率高达 40%,且存在 MDR 和交叉耐药的情况。故寻找其他更准确、方便、快捷的手段优化诊断,及时明确肺部感染病原生物菌群的多样性及分布特点,对于指导抗生素的使用有着重要的意义。

近年来,随着人类对微生物研究的不断深入,不少学者发现^[18-19],病原微生物虽然基因组较小,但临床利用率较高,通过基因测序明确耐药菌的耐药位点,可大大提高治疗精准度。高通量测序是在第一代测序的基础上更新的一种测序手段,结合了生物信息学分析技术,可在短时间内测定数百万个 DNA 序列,不仅可以检测已知的所有耐药基因,还可以预测新型耐药基因的存在,利用耐药基因的存在情况可进一步预测细菌的耐药情况,在临床广泛应用^[20-21]。本研究共纳入 130 例发生 MDR 的 SAP 患者作为研究对象,应用高通量测序技术探究其病原微生物分布及耐药性情况,结果显示,130 例患者 SAPMDR 患者,共检出 189 株病原菌,其中革兰阴性杆菌 99 株,革兰阳性球菌 57

株真菌 22 株及其他类型的细菌或微生物 11 株。提示本次测序的深度和广度基本覆盖样本的所有物种,各样本病原微生物分类丰度较高,另外,SAPMDR 患者的病原菌以革兰阴性杆菌为主,优势菌属在各样本中的分布并不均匀,这可能是因为:(1)革兰阴性杆菌广泛分布在自然环境和医院环境中,尤其是嗜麦芽窄食单胞菌、肺炎克雷伯菌等对多种抗生素均表现出耐药性,使得其在抗生素压力下更易生存和传播,增加了住院期间的感染风险。并且,临床研究已证实^[22-23],革兰阴性杆菌是医院内感恩的重要病原体,尤其在重症监护病房。(2)由于 SAP 患者群体多为老年群体,此类患者年龄较大,支气管黏膜纤毛功能降低,而革兰阴性杆菌对呼吸道黏膜上皮粘附性强,导致检出率较高;加上老年患者多伴随基础疾病,需吃药或反复住院,致使格兰阴性杆菌定植率高。

本研究结果还显示,嗜麦芽窄食单胞菌对头孢他啶、替卡西林、美罗培南的耐药率均在 60% 以上,其中对替卡西林的耐药率达 80%;粘质沙雷菌对头孢他啶、头孢噻吩氨曲南的耐药率 $> 60%$;肺炎克雷伯菌对头孢他啶、头孢噻吩、头孢曲松和头孢吡肟超过 60%;金黄色葡萄球菌对青霉素 G、苯唑西林、氨苄西林、替考拉宁的耐药率均在 60% 以上,其中青霉素 G 耐药率最高占(75%);屎肠球菌对青霉素 G、苯唑西林、红霉素、氨苄西林、万古霉素的耐药率均超过 75%,其中对青霉素 G、氨苄西林、红霉素、万古霉素的耐药率大于 80%;肺炎链球菌对青霉素 G、苯唑西林、红霉素、复方磺胺甲噁唑、氨苄西林的耐药率均超过 65%,对青霉素 G、苯唑西林耐药率占比高(83.33%)。说明了高通量测序能在混合感染情况可无偏倚性的识别多种病原微生物,检测与耐药性相关的基因,进而鉴别出耐药菌群,直接明确对现存药物的敏感性,优势显。不少研究证实^[24-25],高通量测序技术能够提供大量的微生物组数据,有助于理解病原体的流行病学特征和传播模式,从而为公共卫生干预提供科学依据。但需要注意的是不同病原微生物对各种抗生素展现出不同程度的耐药性,在 SAP 患者的临床治疗中,及时明确其病原微生物分布特征及耐药性,选择敏感性较高的抗菌药物,制定针对性个性化治疗方案,对于发生 MDR 的 SAP 患者,可选择多种抗生素联合用药。另外,本研究对诱发 SAP 患者发生 MDR 的危险因素进行分析,结果显示,年龄、预防抗生素使用(无)、感染菌种类型(≥ 2 种)、糖尿病史是诱发 SAP 患者发生 MDR 的危险因素,医务工作者可对伴有上述危险因素的 SAP 患者重点关注,及时给予针对性预防干预,增加治疗有效性,降低 MDR 性的发生,提高整体治疗效果。

相关性肺炎感染组织中病原微生物及菌群特征,

耐药位点检测全面,且有扩展性,优势显著,临床应用推广性高。SAP 病灶组织中病原微生物分布丰富,以革兰阴性致病菌为主,致病优势菌株分别对多种抗菌药物有不同程度的耐药性,可根据病原特征,加强抗菌药物的合理使用,保证整体效果。另外,年龄(大)、预防抗生素使用(有)、感染菌种类型(≥ 2 种)、糖尿病史是诱发 SAP 患者发生 MDR 的危险因素,临床早期监测,为 SAP 患者早期防治提供数据支持。

【参考文献】

- [1] Chaves ML, Gittins M, Bray B, et al. Variation of stroke-associated pneumonia in stroke units across England and Wales: A registry-based cohort study[J]. *Int J Stroke*, 2022, 17(2): 155-162.
- [2] Tinker RJ, Smith CJ, Heal C, et al. Predictors of mortality and disability in stroke-associated pneumonia[J]. *Acta Neurol Belg*, 2021, 121(2): 379-385.
- [3] Assefa M, Tadesse A, Adane A, et al. Factors associated with stroke associated pneumonia among adult stroke patients admitted to university of Gondar hospital, Northwest Ethiopia [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 12724.
- [4] Rabaneda-Lombarte N, Faura J, Ezcurra-Díaz G, et al. Stroke-associated pneumonia according to mCDC criteria: impact on prognosis and antibiotic therapy[J]. *Front Neurol*, 2024, 15: 1358628.
- [5] Xu Q, Zhuang H, Xie Y. Study on the related risk factors and targeted nursing effects in multi-drug resistant bacteria infections in elderly patients with stroke-associated pneumonia [J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(8): 9860-9865.
- [6] 金海森, 金信春, 周海金, 等. 脑卒中相关性肺炎患者多药耐药菌感染影响因素及其耐药基因型[J]. *中华医院感染学杂志*, 2023, 33(7): 1025-1029.
- [7] Núñez-Delgado A, Bontempi E, Coccia M, et al. SARS-CoV-2 and other pathogenic microorganisms in the environment [J]. *Environ Res*, 2021, 201: 111606.
- [8] Li S, Tong J, Liu Y, et al. Targeted next generation sequencing is comparable with metagenomic next generation sequencing in adults with pneumonia for pathogenic microorganism detection [J]. *J Infect*, 2022, 85(5): e127-e129.
- [9] 卒中相关性肺炎诊治中国专家共识组. 卒中相关性肺炎诊治中国专家共识[J]. *中华内科杂志*, 2010, 49(12): 1075-1078.
- [10] Denissen J, Reyneke B, Waso-Reyneke M, et al. Prevalence of ESKAPE pathogens in the environment: Antibiotic resistance status, community-acquired infection and risk to human health [J]. *Int J Hyg Environ Health*, 2022, 244: 114006.
- [11] 曹霞, 李丹, 杨琴, 等. 2019-2021 年医院获得性肺炎和呼吸机相关性肺炎的多重耐药菌分布特征及耐药性分析[J]. *临床药物治疗杂志*, 2023, 21(5): 45-50.
- [12] 赵丽娜, 雷贤英, 高晓岚, 等. ICU 脑卒中相关性肺炎患者多药耐药菌感染的病原学特点及影响因素分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2020, 30(1): 67-71.
- [13] Shi W, Zhu S. The Application of metagenomic next-generation sequencing in detection of pathogen in bronchoalveolar lavage fluid and sputum samples of patients with pulmonary infection [J]. *Comput Math Methods Med*, 2021, 2021: 7238495.
- [14] Cabibbe AM, Spitaleri A, Battaglia S, et al. Application of targeted next-generation sequencing assay on a portable sequencing platform for culture-free detection of drug-resistant tuberculosis from clinical samples[J]. *J Clin Microbiol*, 2020, 58(10): e00632-20.
- [15] Lin T, Tu X, Zhao J, et al. Microbiological diagnostic performance of metagenomic next-generation sequencing compared with conventional culture for patients with community-acquired pneumonia [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1136588.
- [16] 梁忆华, 钟海波, 汪得喜, 等. 卒中相关性肺炎的病原菌耐药性分析[J]. *临床肺科杂志*, 2021, 26(2): 215-217, 222.
- [17] Diaz-Marugan L, Gallizioli M, Marquez-Kisinousky L, et al. Poststroke lung infection by opportunistic commensal bacteria is not mediated by their expansion in the gut microbiota [J]. *Stroke*, 2023, 54(7): 1875-1887.
- [18] Diao Z, Han D, Zhang R, et al. Metagenomics next-generation sequencing tests take the stage in the diagnosis of lower respiratory tract infections[J]. *J Adv Res*, 2021, 38: 201-212.
- [19] Wang P, Wang J, Wang L, et al. High throughput sequencing technology reveals alteration of lower respiratory tract microbiome in severe aspiration pneumonia and its association with inflammation[J]. *Infect Genet Evol*, 2023, 116: 105533.
- [20] 周燕琳, 陈亚娟. 感染病原二代高通量基因测序技术诊断肾移植术后非 HIV 型肺孢子菌肺炎一例[J]. *临床内科杂志*, 2020, 37(1): 47-48.
- [21] Chen S, Kang Y, Li D, et al. Diagnostic performance of metagenomic next-generation sequencing for the detection of pathogens in bronchoalveolar lavage fluid in patients with pulmonary infections: Systematic review and meta-analysis[J]. *Int J Infect Dis*, 2022, 122: 867-873.
- [22] Meschiari M, Asquier-Khati A, Tiseo G, et al. Treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli: A practical approach by the Italian (SIMIT) and french (SPILF) societies of infectious diseases [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2024, 64(1): 107186.
- [23] Mohamed A, Daef E, Nafie A, et al. Characteristics of carbapenem-resistant gram-negative bacilli in patients with ventilator-associated pneumonia [J]. *Antibiotics (Basel)*, 2021, 10(11): 1325.
- [24] Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding [J]. *Lancet*, 2020, 395(10224): 565-574.
- [25] Gaston DC, Miller HB, Fissel JA, et al. Evaluation of metagenomic and targeted next-generation sequencing workflows for detection of respiratory pathogens from bronchoalveolar lavage fluid specimens [J]. *J Clin Microbiol*, 2022, 60(7): e0052622.