

• 论 著 •

老年哮喘合并肺炎克雷伯菌感染患者毒力基因 与病情严重程度的相关性研究*

郝超国¹, 平 慧^{2△}, 郭洪海¹, 师旭光³

1. 邯郸市人民医院检验科, 河北邯郸 056001; 2. 邯郸市中心医院检验科, 河北邯郸 056000;
3. 邯郸市第一医院检验科, 河北邯郸 056002

摘 要:目的 检测老年哮喘合并肺炎克雷伯菌(Kpn)感染患者毒力基因情况,并探究其与疾病严重程度的相关性。**方法** 选取2016年7月至2020年7月邯郸市人民医院收治的373例哮喘患者作为观察组,另选取同期体检健康者390例作为对照组。采用DL-96Ⅱ系统检测两组Kpn感染情况,采用PCR检测哮喘合并Kpn感染患者痰液中Kpn菌株毒力基因wcaG、rmpA、rmpA2、magA、fimH、mrkD、uge、wabG、aero、iucB、iutA、iroNB、ybtA、kfuBC、ureA、allS,采用Spearman相关分析毒力基因与病情严重程度的相关性。**结果** 观察组Kpn感染率[175(46.92%)]高于对照组[12(3.08%)],差异有统计学意义($P<0.05$)。在175例哮喘合并Kpn感染患者痰液标本分离的175株菌种中,3株复苏失败,172株复苏成功,阳性率最高的前5种毒力基因为uge(100.00%)、ureA(90.70%)、magA(88.95%)、ybtA(86.05%)、mrkD(85.47%)。Spearman分析发现,毒力基因rmpA、rmpA2、magA与疾病严重程度呈正相关($P<0.05$)。**结论** 老年哮喘合并Kpn感染患者毒力基因与疾病严重程度关系密切,及时检测毒力基因具有一定临床意义。

关键词:哮喘; 肺炎克雷伯菌; 毒力基因; 医院感染; 相关性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.13.002

中图法分类号:R562.2+5;R446.5

文章编号:1673-4130(2021)13-1541-04

文献标志码:A

Correlation between virulence genes and disease severity in elderly patients with asthma complicated with *Klebsiella pneumoniae* infection*

HAO Chaoguo¹, PING Hui^{2△}, GUO Honghai¹, SHI Xuguang³

1. Department of Laboratory Medicine, Handan People's Hospital, Handan, Hebei 056001, China;

2. Department of Laboratory Medicine, Handan Central Hospital, Handan,
Hebei 056000, China; 3. Department of Laboratory Medicine, the First Hospital
of Handan, Handan, Hebei 056002, China

Abstract: Objective To detect the virulence genes in elderly patients with asthma complicated with *Klebsiella pneumoniae* (Kpn) infection, and to investigate the correlation between the virulence genes and the severity of the disease. **Methods** A total of 373 patients with asthma admitted to Handan People's Hospital from July 2016 to July 2020 were selected as the observation group, and 390 healthy subjects during the same period were selected as the control group. DL-96Ⅱ system was used to detect the infection of Kpn in the two groups. The virulence genes of Kpn strain wcaG, rmpA, rmpA2, magA, fimH, mrkD, uge, wabG, aero, iucB, iutA, iroNB, ybtA, kfuBC, ureA and allS in sputum of asthmatic patients with Kpn infection were detected by PCR. Spearman analysis was used to analyze the correlation between virulence gene and disease severity. **Results** The Kpn infection rate in the observation group [175(46.92%)] was higher than that in the control group [12(3.08%)], and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Among 175 sputum strains from 175 patients with asthma complicated with KPN infection, 3 strains failed resuscitation and 172 strains succeeded resuscitation. The top five virulence genes with the highest positive rates were uge (100.00%), ureA (90.70%), magA (88.95%), ybtA (86.05%) and mrkD (85.47%). Spearman analysis showed that virulence genes rmpA, rmpA2 and magA were positively correlated with disease severity ($P<0.05$). **Conclusion** The virulence gene is closely relat-

* 基金项目:河北省医学科学研究重点课题计划项目(20181669)。

作者简介:郝超国,女,主管技师,主要从事医学检验研究。△ 通信作者, E-mail: angellssaa@163.com。

本文引用格式:郝超国,平慧,郭洪海,等.老年哮喘合并肺炎克雷伯菌感染患者毒力基因与病情严重程度的相关性研究[J].国际检验医学杂志,2021,42(13):1541-1544.

ed to disease severity in elderly patients with asthma complicated with Kpn infection,so timely detection of virulence gene has certain clinical significance.

Key words:asthma; Klebsiella pneumoniae; virulence gene; hospital infection; correlation

肺炎克雷伯菌(Kpn)属革兰阴性菌,在医院感染致病菌中位居第二,仅次于大肠埃希菌,其在肠道、呼吸道中可引起泌尿系统、呼吸道感染,具有较强的毒力,致病性强,易在医院暴发流行,危害严重^[1-3]。Kpn 感染者往往入院率、住院花费增加,住院时间延长,呼吸道感染 Kpn 是入住重症监护病房的危险因素^[4],但 Kpn 的致病机制尚不明确。有研究显示,Kpn 毒力基因种类不同,菌株黏性、抗白细胞吞噬、侵袭等因素不同,疾病状况不同^[5-6]。但毒力基因与疾病严重程度之间关系鲜见相关研究。因此,本研究以呼吸道疾病哮喘病为研究疾病,探讨老年哮喘合并 Kpn 感染患者毒力基因与疾病严重程度关系,为临床提供一定依据,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 7 月至 2020 年 7 月邯郸市人民医院收治的 373 例哮喘患者作为观察组,其中男 187 例,女 186 例;年龄 61~82 岁,平均(70.58±6.86)岁。纳入标准:(1)符合 2016 年中华医学会呼吸病学分会哮喘学组制定的支气管哮喘诊断标准^[7];(2)年龄≥60 岁;(3)首次确诊且未经治疗;(4)资料完整。排除标准:(1)合并其他细菌感染疾病;(2)近 1 周服用抗菌药物;(3)有家族疾病史。选取同期 390 例体检健康者作为对照组,其中男 195 例,女 195 例;年龄 60~83 岁,平均(71.08±8.47)岁。两组性别、年龄差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。所有受试对象均签署知情同意书,本研究经邯郸市人民医院伦理委员会审核并通过。

1.2 方法

1.2.1 菌株鉴定 收集所有受试对象痰液,细菌分离全程采用无菌操作,经 DL-96 II 细菌鉴定系统(珠海迪尔生物工程有限公司)鉴定为 Kpn,并符合医院感染诊断标准^[8]。

1.2.2 PCR 检测毒力基因情况 对所有哮喘合并 Kpn 感染阳性患者进行毒力基因检测,复苏菌株接种于哥伦比亚血琼脂平板,于 35℃、5% CO₂ 条件下培养过夜后,挑取适量菌落置于裂解液中,经煮沸法提取总 DNA,用于毒力基因 wcaG、rmpA、rmpA2、magA、fimH、mrkD、uge、wabG、aero、iucB、iutA、iroNB、ybtA、kfuBC、ureA、allS 的 PCR 反应。50 μL PCR 反应体系:Premix Taq™ (TaKaRa Taq™ Version 2.0 plus dye)25 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL,DNA 模板 5 μL,ddH₂O 18 μL。反应条件:95℃ 预变性 3 min,95℃ 变性 30 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 60 s,30 个循环,72℃ 延伸 10 min。参考文献[9]

设计毒力基因引物,引物由宝日医生物技术(北京)有限公司合成。PCR 产物采用 0.15 g/L 的琼脂糖凝胶电泳,100 V 恒定电压下电泳 100 min 后,采用 Gel Doc™ XR 及凝胶成像仪(美国伯乐公司)观察结果。

1.2.3 疾病严重程度 参考《支气管哮喘防治指南(2016 年版)》中关于哮喘急性发作时疾病严重程度分级标准^[7]。轻度:活动时气短,讲话可连续,肺部散在哮鸣音,动脉血氧分压(PaO₂)正常、动脉血二氧化碳分压(PaCO₂)≤45 mm Hg;中度:稍活动即出现气短现象,讲话时断续,肺部有响亮、弥散哮鸣音,PaO₂≥60 mm Hg、PaCO₂≤45 mm Hg;重度:休息时即出现气短,讲话单字,焦虑、烦躁,有三凹征,肺部有响亮、弥散哮鸣音,PaO₂<60 mm Hg、PaCO₂>45 mm Hg;危重:不能讲话,嗜睡或意识模糊,呼吸弱或无,PaO₂<60 mm Hg、PaCO₂>45 mm Hg、血氧饱和度≤90%。

1.3 统计学处理 采用统计学软件 SPSS25.0 对数据进行处理。计数资料以率或构成比表示,行 χ² 检验。采用 Spearman 分析毒力基因与疾病严重程度的相关性。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 Kpn 检出情况 观察组检出 Kpn 175 例,感染率为 46.92%,对照组检出 Kpn 12 例,感染率为 3.08%,观察组 Kpn 感染率高于对照组,差异有统计学意义($\chi^2=198.050,P<0.001$)。

2.2 哮喘合并 Kpn 感染患者临床分离菌株毒力基因检出率 复苏从 175 例哮喘合并 Kpn 感染患者痰液标本中分离的 175 株菌种。其中,3 株菌种复苏失败,故检测了 172 株菌种的毒力基因情况。阳性率最高的前 5 种毒力基因为 uge (100.00%)、ureA (90.70%)、magA (88.95%)、ybtA (86.05%)、mrkD (85.47%)。见表 1。

表 1 哮喘合并 Kpn 感染患者临床分离菌株毒力基因检出情况

基因	n	占比(%)
荚膜多糖合成和合成调控基因		
wcaG	54	31.40
rmpA	132	76.74
rmpA2	115	66.86
magA	153	88.95
菌毛合成相关基因		
fimH	89	51.74
mrkD	147	85.47

续表 1 哮喘合并 Kpn 感染患者临床分离菌株毒力基因检出情况		
基因	<i>n</i>	占比(%)
脂多糖相关基因		
uge	172	100.00
wabG	146	84.88
铁摄取系统相关基因		
aero	72	41.86
iucB	0	0.00
iutA	0	0.00
iroNB	0	0.00
ybtA	148	86.05
kfuBC	51	29.65
尿素酶相关基因		
ureA	156	90.70
allS	41	23.84

2.3 毒力基因与病情严重程度的相关性 172 例哮喘合并 Kpn 感染患者中轻度 102 例,中度 42 例,重度 20 例,危重 8 例。Spearman 相关分析显示,毒力基因 rmpA、rmpA2、magA 与疾病严重程度呈正相关($P<0.05$)。见表 3。

表 3 毒力基因 rmpA、rmpA2、magA、fimH、wabG、aero、ybtA、ureA、allS 与疾病严重程度的相关性		
基因	疾病严重程度	
	<i>r</i>	<i>P</i>
rmpA	0.486	<0.001
rmpA2	0.512	<0.001
magA	0.398	<0.001
fimH	0.217	0.358
wabG	0.186	0.521
aero	-0.158	0.410
ybtA	0.049	0.951
ureA	0.156	0.638
allS	0.058	0.874

3 讨 论

Kpn 作为机会致病菌,是世界范围内最重要的医院感染病原体之一,其易在医院暴发流行,可引起患者多器官感染,增加死亡风险,威胁患者生命安全^[10-12]。Kpn 致病的原因可能是多种毒力基因的共同作用。根据类型,Kpn 毒力基因可分为荚膜多糖合成和合成调控基因、菌毛合成相关基因、脂多糖相关基因、铁摄取系统相关基因、尿素酶相关基因。本研究结果发现,与健康体检者相比,哮喘患者 Kpn 感染率较高,提示可能受机体本身和环境等影响,导致哮喘患者更易受 Kpn 感染,且感染 Kpn 会加重患者病

情,从而影响患者健康。

荚膜多糖合成和合成调控基因为 Kpn 主要致病因子,可促进生物膜生成,具有抗调理素效应,主要逃避宿主机体的免疫应答过程,增加其抗吞噬能力^[13-14]。rmpA、rmpA2 均作为编码黏液表型调节因子,且二者具有高度同源性,可参与自身新陈代谢,是增强毒力的铁载体,可与铁摄取系统相关基因气杆菌素 iutA 等共同作用、相互促进,增强细胞黏性,加重病情^[15-16]。有研究显示,通过建立 magA 突变体可降低菌株血清抵抗和抗吞噬能力,存在 magA 的菌株侵袭性感染能力更强^[17]。本研究结果发现,荚膜多糖合成和合成调控基因 magA 在 Kpn 菌种中携带率较高,rmpA、rmpA2、magA 与疾病严重程度呈正相关($P<0.05$),提示荚膜多糖合成相关基因影响菌种生物膜合成,而不同形态的生物膜表现出黏附性、侵袭性、抗吞噬能力均不相同,rmpA、rmpA2、magA 表达可能提高 Kpn 黏附性、侵袭性、提高抗吞噬能力,从而加重病情,临床上检测荚膜多糖合成和合成调控基因可能反映 Kpn 致病强度。菌毛合成相关基因影响菌株黏附性,其中黏附因子 fimH 可使菌毛穿过荚膜向外延伸,促进菌株黏附;脂多糖相关基因可以抵抗机体天然免疫,对宿主有较强的防御作用;铁摄取系统相关基因影响铁离子的摄取,Kpn 在生长代谢过程中需要铁离子的参与,在高致病性菌种中表现出特异性^[18-19]。本研究结果显示,脂多糖相关基因 uge、wabG 在 Kpn 中阳性表达率较高,提示 Kpn 均对宿主天然免疫的作用较强,菌株之间可能差异性不强。aero、kfuBC 在 Kpn 中可以检测到阳性,可能受样本量影响,铁摄取系统相关基因在本研究中只检测到 3 种。尿素酶相关基因作为尿酸衍生物,可为 Kpn 生长提供碳源和氮源,尿素酶相关基因缺失株小鼠中 Kpn 毒力受到影响^[20]。本研究还发现,ureA、allS 均在 Kpn 中部分出现阳性表达,且 ureA 阳性表达率较高,原因可能为 ureA 阳性表达为 Kpn 提供了生长所需碳源和氮源,从而促进 Kpn 生长,加重其毒力,但 Kpn 的毒力基因较多,更全面的毒力基因及其表达情况有待进一步研究。

综上所述,毒力基因在哮喘合并 Kpn 感染患者痰液培养中表现出不同程度的表达,这些毒力基因共同影响 Kpn 的致病性,但荚膜多糖合成和合成调控基因在与疾病严重程度相关性较强,临床上可以作为一定参考依据。

参考文献

[1] 谭福燕,庞载元,胡雪飞. 1084 株肺炎克雷伯菌的临床分布特点及耐药性变迁[J]. 重庆医学,2019,48(11):1948-1955.

[2] CHANG H, WEI J, ZHOU W, et al. Risk factors and mortality for patients with bloodstream infections of

- Klebsiella pneumoniae during 2014—2018; clinical impact of carbapenem resistance in a large tertiary hospital of China[J]. J Infect Public Health, 2020, 13(5): 784-790.
- [3] CHEN D, LI H, ZHAO Y, et al. Characterization of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in a tertiary hospital in Fuzhou, China[J]. J Appl Microbiol, 2020, 129(5): 1220-1226.
- [4] WANG Y, LUO C, DU P, et al. Genomic epidemiology of an outbreak of Klebsiella pneumoniae ST471 producing extended-spectrum β -lactamases in a neonatal intensive care unit[J]. Infect Drug Resist, 2020, 13(1): 1081-1090.
- [5] 孙凯莉, 刘周, 陈昊然, 等. 安徽地区高黏液表型肺炎克雷伯菌的耐药基因型、荚膜血清型和毒力基因[J]. 中华传染病杂志, 2019, 37(7): 408-413.
- [6] REMYA PA, SHANTHI M, SEKAR U. Characterisation of virulence genes associated with pathogenicity in Klebsiella pneumoniae[J]. Indian J Med Microbiol, 2019, 37(2): 210-218.
- [7] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(2016 年版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2016, 39(9): 675-697.
- [8] 中华人民共和国卫生部. 医院感染诊断标准(试行方案)[J]. 中华医学杂志, 2001, 81(5): 314-320.
- [9] 徐水宝, 杨思宇, 翁珊珊, 等. 高毒力肺炎克雷伯菌血清型、毒力基因分布及分子标志物探索[J]. 微生物与感染, 2019, 14(6): 338-344.
- [10] FRANCESCO C, DAVIDE S, BAYLISS S C, et al. Gene composition as a potential barrier to large recombinations in the bacterial pathogen Klebsiella pneumoniae[J]. Genome Biol Evol, 2019, 11(11): 3240-3251.
- [11] RAJKUMARI J, CHAKRABORTY S, PANDEY P, et al. Distinctive features gleaned from the comparative genomes analysis of clinical and non-clinical isolates of Klebsiella pneumoniae[J]. Bioinformation, 2020, 16(3): 256-268.
- [12] JAGGI N, CHATTERJEE N, SINGH V, et al. Carbapenem resistance in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae among Indian and international patients in North India[J]. Acta Microbiol Immunol Hung, 2019, 66(3): 367-376.
- [13] 蒋胡艳. OmpT 对禽致病性大肠杆菌生物学特性和致病性影响的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41(10): 1009-1013.
- [14] WANG Z, QIN R R, HUANG L, et al. Risk factors for carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae infection and mortality of Klebsiella pneumoniae infection[J]. Chin Med J, 2018, 131(1): 56-62.
- [15] YANG L, YU F, ALAN M N, et al. Occurrence of colistin-resistant hypervirulent Klebsiella variicola[J]. J Antimicrob Chemother, 2018, 73(11): 3001-3004.
- [16] 孙巧玲, 舒玲斌, 胡洁, 等. MALDI-TOF MS 技术快速区分携带 rmpA2 毒力基因的高毒力肺炎克雷伯菌[J]. 中华检验医学杂志, 2018, 41(8): 571-576.
- [17] 吕丹, 邓在春, 马红映, 等. 42 株耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药元件与菌株亲缘性研究[J]. 中华传染病杂志, 2019, 37(4): 230-234.
- [18] 赵位, 喻东, 程建国, 等. 肺炎克雷伯氏菌毒力因子及其基因组学研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2019, 46(6): 942-949.
- [19] 杜帅先, 李辰, 马红玲, 等. 菌血症中耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌的同源性及其侵袭力分析[J]. 临床血液学杂志(输血与检验), 2019, 32(5): 760-764.
- [20] RICCI A, COPPO E, BARBIERI R, et al. The effect of sub-inhibitory concentrations of rifaximin on urease production and on other virulence factors expressed by Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus[J]. J Chemother, 2017, 29(2): 67-73.
- (收稿日期: 2020-11-05 修回日期: 2021-05-07)
- (上接第 1540 页)
- [22] BRIGGS C, MELLORS I, RODERICK A, et al. Quality counts: new parameters in blood cell counting[J]. Int J Lab Hematol, 2009, 31(3): 277-297.
- [23] RIEDL J, HELL L, KAIDER A, et al. Association of platelet activation markers with cancer-associated venous thromboembolism[J]. Platelets, 2016, 27(1): 80-85.
- [24] CUI M M, LI N, LIU X, et al. Platelet distribution width correlates with prognosis of non-small cell lung cancer[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 3456.
- [25] ZUO X, KONG W, FENG L, et al. Elevated platelet distribution width predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Biomark, 2019, 24(3): 307-313.
- [26] CHENG S, HAN F Y, WANG Y, et al. The red distribution width and the platelet distribution width as prognostic predictors in gastric cancer[J]. BMC Gastroenterol, 2017, 17(1): 163.
- [27] YAYLACI S, TOSUN O, SAHIN O, et al. Lack of variation in inflammatory hematological parameters between benign nodular goiter and papillary thyroid cancer[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2016, 17(4): 2321-2323.
- [28] OKUTURLAR Y, GUNALDI M, TIKEN E E, et al. Utility of peripheral blood parameters in predicting breast cancer risk[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(6): 2409-2412.
- [29] ONCEL M, KIYICI A, ONCEL M, et al. Evaluation of platelet indices in lung cancer patients[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(17): 7599-7602.
- [30] GUO F, ZHU X, QIN X. Platelet distribution width in hepatocellular carcinoma[J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 2518-2523.
- (收稿日期: 2021-01-12 修回日期: 2021-04-17)