

• 短篇论著 •

过敏性紫癜患儿增殖诱导配体的表达及相关机制初探*

曾艳云, 龚霞, 周延[△]

重庆医科大学附属第一医院大足医院/重庆市大足区人民医院儿童中心, 重庆 402360

摘要:目的 探究增殖诱导配体(APRIL)在过敏性紫癜(HSP)中的表达及相关发病机制。方法 选取 2021 年 1—10 月在该院诊断为 HSP 的 51 例患儿作为 HSP 组, 将其进一步分为 4 个亚组: 皮肤型亚组(20 例)、关节型亚组(8 例)、腹型亚组(12 例)、肾型亚组(11 例)。另招募 57 例体检健康儿童作为对照组。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定血浆 APRIL 和半乳糖缺陷型 IgA1(Gd-IgA1)水平, 采用荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 B 细胞成熟抗原(BCMA)mRNA 的表达。结果 HSP 组血浆 APRIL 水平平均高于对照组($P < 0.05$), 各亚组中, 肾型亚组最高, 皮肤型亚组最低。Spearman 相关分析显示, HSP 患儿血浆 APRIL 与 Gd-IgA1、BCMA mRNA 表达及 HSP 疾病严重程度评分呈正相关($P < 0.001$)。与对照组相比, 外源性 APRIL 可诱导 HSP 组患儿产生更多 Gd-IgA1($P < 0.05$), 且诱导 BCMA mRNA 表达上调($P < 0.05$)。结论 HSP 患儿血浆 APRIL 水平普遍升高, 这可能与 Gd-IgA1 的过度产生有关。

关键词:过敏性紫癜; 增殖诱导配体; 半乳糖缺陷型 IgA1; B 细胞成熟抗原

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.10.024

中图法分类号:R446.11; R725.5

文章编号:1673-4130(2023)10-1270-04

文献标志码:A

过敏性紫癜(HSP)是一种以免疫球蛋白 A1(IgA1)型免疫复合物沉积为主的系统性小血管炎^[1], 其典型的临床三联征包括紫癜、关节痛/关节炎和胃肠道受累, 此外肾脏表现在受累患者中也十分常见^[2]。目前研究认为半乳糖缺陷型 IgA1(Gd-IgA1)在 HSP 发病过程中发挥重要作用^[3]。然而, HSP 导致血管壁损伤的机制尚不清楚。一项大型 IgA 全基因组关联研究发现了一个包含 TNFSF13 基因的位点, 该基因与 B 细胞激活因子(BAFF)具有高度同源性(48%), 被认为是与 IgA 相关的易感基因, 编码增殖诱导配体(APRIL)^[4]。APRIL 是肿瘤坏死因子超家族(TNF)成员^[5], 除了影响人类 B 细胞的存活和增殖外, 也可以与 B 细胞成熟抗原(BCMA)结合, 促使人类 B 细胞诱导 Ig 重链亚类转化为 IgA^[6-7]。在 APRIL 缺陷小鼠中, 观察到 IgA 选择性缺陷^[8], 这表明 APRIL 在 IgA 产生过程中发挥重要作用。为了探索 APRIL 在 HSP 中的潜在机制, 本研究检测了不同临床表现的 HSP 患者血浆 APRIL、Gd-IgA1 水平及外周血 B 细胞 BCMA mRNA 表达差异, 并进一步评估了其对 IgA1 分子糖基化和 BCMA mRNA 表达的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2021 年 1—10 月在本院初次诊断为 HSP 的 51 例门诊和住院患儿作为 HSP 组, 年龄 2~14 岁, 男 27 例, 女 24 例, 病程 2~60 d。纳入标准: (1)依据 2012 年中华中医药学会 HSP 诊断

标准^[9]; (2)处于疾病活动期; (2)血小板计数和凝血功能正常, 未合并其他过敏性疾病、感染、自身免疫性疾病或其他严重的全身性疾病; (3)未服用糖皮质激素、抗氧化剂、免疫抑制剂或其他药物。51 例 HSP 患儿按 HSP 疾病严重程度评价标准^[10-11]进行评分。根据临床表现和实验室检查将患儿分为 4 个亚组: (1)皮肤型亚组(20 例): 典型的皮肤紫癜, 无腹痛、关节痛、肾脏受累, 常规尿检及 24 h 尿蛋白定量未见异常; (2)关节型亚组(8 例): 典型的皮肤紫癜伴关节肿胀疼痛; (3)腹型亚组(12 例): 典型的皮肤紫癜伴腹痛, 粪便隐血试验阳性; (4)肾型亚组(11 例): 典型的皮肤紫癜伴不同程度的肾损害, 尿蛋白尿和(或)血尿阳性。同时, 招募年龄和性别与 HSP 患儿匹配的健康体检儿童作为对照组, 年龄 2~14 岁, 男 27 例, 女 30 例。本研究已获得本院伦理委员会批准, 以及所有患儿及家属的知情同意。

1.2 仪器与试剂 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪购自 ABI 公司(美国), Multiskan FC 全自动酶标检测仪购自 Thermo Fisher 公司(美国)。人外周血淋巴细胞分离液 Ficoll Paque plus 购自 GE 公司(美国), CD19⁺ 磁珠购自 Becton Dickinson(美国), Trizol 试剂购自 Invitrogen(美国), First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Thermo Scientific(美国), TransStart Green qPCR SuperMix 购自北京全式金生物技术股份有限公司(中国), 人血浆 Gd-IgA1 ELISA 检测试剂盒和人 APRIL 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试

* 基金项目: 重庆市科技计划项目(2021032)。

[△] 通信作者, E-mail: 598447694@qq.com。

剂盒购自北京东革生物科技有限公司(中国),人重组 APRIL 蛋白购自 Peprotech 公司(美国)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 于 HSP 组就诊时及对照组体检时,采用乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝真空采集管采集患儿血液标本约 5 mL。离心取血浆,分成三等份,置于-80℃冰箱保存。

1.3.2 外周血 B 细胞中 BCMA mRNA 表达检测 使用 Ficoll Paque plus 通过密度梯度离心制备外周血单个核细胞(PBMC),以磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后,再悬浮于含 1% 牛血清清蛋白(BSA)的 PBS 中。用 CD19⁺ 磁珠分选 B 细胞。根据 Trizol 使用说明提取总 RNA。采用 Nano Drop 2000c 分光光度计的说明测量总 RNA 纯度和浓度。按照 First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书,取 1 μg 总 RNA 逆转录为 cDNA,总反应体积为 12 μL。引物序列: GAPDH 正向引物为 5'-CAGTCAGCCGCATCT-TCTTTT-3',反向引物为 5'-GTGACCAGGCGC-CCAATAC-3'; BCMA 正向引物为 5'-TTT-GAAGGGTGTGATGCTTG-3',反向引物为 5'-AT-GCGCTCATCTCTGAAAT-3'。PCR 反应体积为 20 μL,反应条件为 95℃ 15 s,60℃ 30 s,72℃ 15 s,共 45 个循环。BCMA mRNA 的相对表达量通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。

1.3.3 血浆 APRIL 和 Gd-IgA1 水平测定 根据 ELISA 测试试剂盒的说明步骤检测血浆 APRIL 水平和 Gd-IgA1 水平。血浆标本采用酶免疫试验缓冲液按 1:50 的比例稀释,培养 60 min;然后,用标记抗体的洗涤缓冲液洗涤 4 次,孵育 30 min,清洗平板并添加 50 μL 三甲基铝(TMA)溶液,避光培养 30 min。最后,停止显色反应,并测量 450 nm 及 625 nm 处的吸光度。

1.3.4 B 淋巴细胞体外培养及处理 为检测外源性 APRIL 对体外试验中 Gd-IgA1 和 BCMA mRNA 表达的影响,采用贴壁法从 HSP 组和对照组的 PBMC

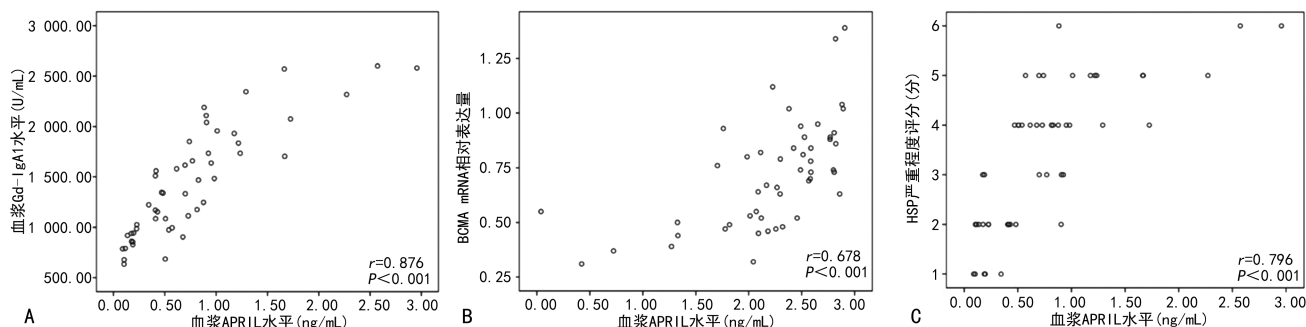
中去除单核细胞,剩余大部分细胞为淋巴细胞。在补充有 10% 胎牛血清、2 mmol/L L-谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基中于 37℃ 培养。将 B 淋巴细胞以 3×10^5 /孔密度接种到 96 孔板中,并与 25 ng/mL 外源性 APRIL^[12] 孵育 48 h。800 r/min 离心 10 min 后,收集上清液用于检测 Gd-IgA1 水平。此外,用 CD19⁺ 磁珠分选 B 细胞,用荧光定量 PCR(RT-qPCR)法检测其 BCMA mRNA 相对表达量。

1.4 统计学处理 所有数据均采用 SPSS21.0 统计分析软件进行分析,使用 Shapiro-Wilk 检验对数据进行正态性检验,根据是否满足正态性,结果分别表示为 $\bar{x} \pm s$ 或中位数(四位分间距)[$M(IQR)$]。对于原数据或转换后满足正态性和方差同质性假设的数据,多组比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验;否则,使用 Kruskal-Wallis *H* 检验进行非参数检验。相关性分析采用 Spearman 等级相关。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HSP 组及 HSP 各亚组与对照组血浆 APRIL 水平比较 HSP 组、皮肤型亚组、关节型亚组、腹型亚组患儿血浆 APRIL 水平分别为 0.676(0.608)ng/mL、0.379(0.290)ng/mL、0.686(0.677)ng/mL、0.657(0.342)ng/mL、1.218(1.395)ng/mL,与对照组的 0.139(0.251)ng/mL 相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。两两比较显示,肾型亚组血浆 APRIL 水平高于皮肤型亚组、关节型亚组和腹型亚组($P < 0.05$),皮肤型亚组血浆 APRIL 水平低于其他 3 个亚组($P < 0.05$),而关节型亚组与腹型亚组 APRIL 水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 相关性分析 Spearman 相关分析显示,HSP 患儿血浆 APRIL 水平与 Gd-IgA1 呈正相关($r = 0.876$, $P < 0.001$),与 BCMA mRNA 表达呈正相关($r = 0.678$, $P < 0.001$),与 HSP 严重程度评分呈正相关($r = 0.796$, $P < 0.001$)。见图 1。



注:A为血浆 APRIL 水平与 Gd-IgA1 水平;B为血浆 APRIL 水平与 BCMA mRNA;C为血浆 APRIL 水平与疾病严重程度评分。

图 1 HSP 患儿血浆 APRIL 水平与各指标的相关性分析结果

2.3 外源性 APRIL 对体外试验中 Gd-IgA1 和 BCMA mRNA 表达的影响 经外源性 APRIL 处理后,

从 HSP 患儿分离的淋巴细胞上清液 Gd-IgA1 水平明显高于对照组[(0.127±0.018)U/mL vs. (0.045±

0.003)U/mL, $P=0.014$], BCMA mRNA 水平也明显上调(1.765 ± 0.223 vs. 1.206 ± 0.081 , $P=0.014$)。

3 讨 论

作为 HSP 血管壁中的主要沉积物^[1], IgA 分子在 HSP 的发病机制研究方面引起了极大关注。APRIL 是一种刺激 B 细胞增殖和 IgA 产生的细胞因子^[6]。研究显示,小鼠抗 APRIL 单克隆抗体可抑制 ddY 小鼠血清 IgA 水平,降低循环免疫复合物的肾脏沉积,并抑制蛋白尿发生^[12]。本研究结果显示,HSP 组患儿血浆 APRIL 水平增加,并且各亚组患儿,APRIL 水平升高最明显,且与 B 细胞中其受体 BCMA mRNA 表达增加呈正相关,从而诱导异常糖基化 IgA1 分子产生增加,最终导致 HSP 发病和进展。

HSP 是一种影响小血管的系统性血管炎^[1]。在这种情况下,患者易出现血管周围炎性细胞浸润^[2]。有报道称,HSP 患者发生肾小球损伤的原因可能是含有 Gd-IgA1 的系膜免疫复合物的沉积^[13],随后,补体介导的系膜细胞刺激发生,导致其增殖;同时也会刺激细胞因子的分泌^[14]。因此,通常在 IgA 肾病患者中检测到抗原和抗体免疫复合物的肾外来源。B 细胞是主要的阳性调节因子,能够产生抗原特异性免疫球蛋白和多种细胞因子^[14-15]。MCCARTHY 等^[15]报道了一种过度表达 BAFF 的转基因小鼠,该小鼠在存在共生菌群的情况下与人类 IgA 肾病高度相似。BAFF 过度表达后,小鼠出现高循环水平的异常糖基化 IgA、IgA 系膜沉积、血尿和蛋白尿。而 APRIL 与 BAFF 具有高度同源性,其编码基因 TNFSF13 被认为是 IgA 肾病的遗传易感位点^[4]。APRIL 与其特异性受体 BCMA 结合后,可激活下游核因子- κ B(NF- κ B),然后刺激外周血 B 细胞产生免疫球蛋白^[7]。本研究发现,HSP 组患儿血浆 APRIL 水平高于对照组,肾脏亚组血浆 APRIL 水平比其他 3 个亚组升高更显著,差异均有统计学意义($P<0.05$),且血浆 APRIL 水平与血浆 Gd-IgA1 水平呈正相关,与外周血 BCMA mRNA 表达呈负相关。这些结果表明 APRIL 可能在 HSP 的发展中发挥重要作用,并且 APRIL 和 Gd-IgA1 有一定协同作用。

APRIL 由多个细胞表达和分泌,包括单核细胞、巨噬细胞和淋巴细胞;而 B 细胞在其中发挥的作用更显著,并且经常参与自身免疫性疾病。ZHAI 等^[16]研究发现,IgA 肾病患者 B 细胞中 APRIL mRNA 和 BAFF mRNA 表达显著上调,但在 T 淋巴细胞中却没有。这可能意味着 B 细胞在决定血浆 APRIL 水平方面发挥更重要的作用。因此,本研究假设在 HSP 患儿的 B 细胞中,APRIL 及其下游信号被激活。为了评估 APRIL 是否是 HSP 中 Gd-IgA1 增加的原因,本研究进一步分析了 APRIL 对体外试验中 Gd-IgA1 产生的影响,结果发现 HSP 组患儿和对照组的淋巴细胞对 APRIL 的反应不同,经 APRIL 预处理后,从

HSP 患儿体内分离的淋巴细胞上清液中,Gd-IgA1 水平显著高于对照组($P<0.05$)。本研究体外试验结果表明,APRIL 在 HSP 组患儿 Gd-IgA1 产生中起一定作用。更重要的是,不仅 APRIL,而且 B 细胞异常也可能导致 HSP Gd-IgA1 的升高,因为 APRIL 增加了 HSP 组患儿淋巴细胞中 Gd-IgA1 的生成。CD19⁺ B 细胞是产生 IgA1 的主要细胞^[6-7],为了探讨 HSP 患儿淋巴细胞异常的原因,在 APRIL 诱导的 Gd-IgA1 产生方面,检测了 CD19⁺ B 细胞中编码 APRIL 受体的 BCMA mRNA 表达。在 HSP 患儿中,BCMA mRNA 表达呈上调趋势。本研究发现,HSP 患儿 BCMA mRNA 表达异常,Gd-IgA1 水平升高,推测 APRIL 可能通过诱导 BCMA mRNA 的表达、增加 Gd-IgA1 的水平,并与它们协同作用来诱导和加剧组织损伤。

本研究结果发现,血浆 APRIL 水平与 Gd-IgA1 水平呈正相关,体外实验也证实 APRIL 可以在体外细胞培养模型中诱导异常糖基化 IgA1 分子的产生。此外,APRIL 水平较高的患儿有更严重的临床表现,尤其是肾脏受累。本研究结果显示,APRIL 与 HSP 严重程度具有相关性,提示 APRIL 可能是促进 Gd-IgA1 产生的因素。

综上所述,HSP 患儿血浆 APRIL 水平升高,其水平与 HSP 疾病严重程度有相关性,其机制可能是 APRIL 与其 B 细胞中的受体有协同作用,可诱导 Gd-IgA1 的产生。

参考文献

- [1] 石健,张聘. 过敏性紫癜病因及发病机制的研究[J]. 医学信息,2022,35(4):49-52.
- [2] 傅桐,杜悦. 儿童 IgA 血管炎诊断与治疗[J]. 中国实用儿科杂志,2022,37(1):17-21.
- [3] 王彬,邵宽芙蓉,董晨. 滤泡辅助性 T 细胞及半乳糖缺乏的 IgA1 在儿童过敏性紫癜中的表达及意义[J]. 中国当代儿科杂志,2020,22(5):473-477.
- [4] YANG C, JIE W, YANLONG Y, et al. Genome-wide association study identifies TNFSF13 as a susceptibility gene for IgA in a South Chinese population in smokers[J]. Immunogenetics, 2012, 64(10):747-753.
- [5] MAGLIOZZI R, MARASTONI D, CALABRESE M. The BAFF/APRIL system as therapeutic target in multiple sclerosis[J]. Expert Opin Ther Targets, 2020, 24(11):1135-1145.
- [6] VINCENT F B, SAULEP-EASTON D, FIGGETT W A, et al. The BAFF/APRIL system: emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2013, 24(3):203-215.
- [7] SHI F, XUE R, ZHOU X, et al. Telitacicept as a BlyS/APRIL dual inhibitor for autoimmune disease[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2021, 43(6):666-673.
- [8] MATSUDA Y, HANEDA M, KADOMATSU K, et al. A

- proliferation-inducing ligand sustains the proliferation of human naïve (CD27⁺) B cells and mediates their differentiation into long-lived plasma cells in vitro via transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor and B-cell mature antigen[J]. *Cell Immunol*, 2015, 295(2):127-136.
- [9] 中华中医药学会. 过敏性紫癜[J]. *风湿病与关节炎*, 2012, 1(5):75-78.
- [10] YANG Y H, YU H H, CHIANG B L. The diagnosis and classification of Henoch-Schönlein purpura: an updated review[J]. *Autoimmun Rev*, 2014, 13(4/5):355-358.
- [11] 杨莉莉, 刘翠华, 刘栋. 成人及儿童过敏性紫癜在临床表现和预后中的差异[J]. *重庆医学*, 2018, 47(9):1188-1190.
- [12] MYETTE J R, KANO T, SUZUKI H, et al. A proliferation inducing ligand (APRIL) targeted antibody is a safe and effective treatment of murine IgA nephropathy[J]. *Kidney Int*, 2019, 96(1):104-116.

- [13] ISHIKO S, TANAKA A, TAKEDA A, et al. Utility of glomerular Gd-IgA1 staining for indistinguishable cases of IgA nephropathy or Alport syndrome[J]. *Clin Exp Nephrol*, 2021, 25(7):779-787.
- [14] ZHENG N, XIE K, YE H, et al. TLR7 in B cells promotes renal inflammation and Gd-IgA1 synthesis in IgA nephropathy[J]. *JCI Insight*, 2020, 5(14):e136965.
- [15] MCCARTHY D D, KUJAWA J, WILSON C, et al. Mice overexpressing BAFF develop a commensal flora-dependent, IgA-associated nephropathy[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(10):3991-4002.
- [16] ZHAI Y L, ZHU L, SHI S F, et al. Increased APRIL expression induces IgA1 aberrant glycosylation in IgA nephropathy[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(11):e3099.

(收稿日期:2022-10-13 修回日期:2023-02-16)

• 短篇论著 •

肺炎克雷伯菌荚膜血清型和耐药基因型检测及其耐药机制研究

兰 俊¹, 侯 轩², 王 辉², 张清雯²

三二〇一医院:1. 医学检验科;2. 医学微生物免疫科, 陕西汉中 723000

摘要:目的 研究肺炎克雷伯菌的荚膜血清型、耐药基因型及其耐药机制。方法 选择 2018 年 5 月至 2021 年 5 月该院收治的 240 例高黏液表型肺炎克雷伯菌(HMKP)感染者作为研究对象,其中耐碳青霉烯类-HMKP(CR-HMKP)49 例,非 CR-HMKP 191 例,分别对两组患者分离菌株 HMKP 的药敏试验结果、毒力基因分布、荚膜血清学及质粒接合实验进行检测。结果 CR-HMKP 及非 CR-HMKP 组 HMKP 的头孢噻肟、头孢曲松、头孢唑林、哌拉西林、亚胺培南、美罗培南、厄他培南、头孢吡肟及阿米卡星的耐药情况比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);CR-HMKP 及非 CR-HMKP 组 HMKP 的毒力基因 aerobactin、alls、mrkD、iroN、rmpA、magA、rmpB 的表达情况差异均有统计学意义($P < 0.05$);CR-HMKP 及非 CR-HMKP 组 HMKP 的 blaKPC、blaNDM、blaCTX-M、blaSHV、qnrC、rmtB 基因表达比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。CR-HMKP 及非 CR-HMKP 组 HMKP 的荚膜血清型 K1、K2、K57 分布比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);质粒接合实验分析显示,两组 HMKP 对头孢噻肟、头孢曲松、头孢唑林、哌拉西林、亚胺培南、美罗培南、厄他培南、头孢吡肟及阿米卡星的耐药情况差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 肺炎克雷伯菌的血清型主要表现为 K2 和耐药基因型主要表现为 rmtB,可作为肺炎克雷伯菌感染患者治疗的重要靶点。

关键词:肺炎克雷伯菌; 耐药基因; 质粒; 接合; 医院感染

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.10.025

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2023)10-1273-04

文献标志码:A

有研究报道显示,肺炎克雷伯菌感染已经成为医院内感染的常见菌之一^[1]。目前,临床对于肺炎克雷伯菌感染患者的治疗中,多选用头孢类及碳青霉烯类抗菌药物。但是,临床研究发现,由于抗菌药物的广泛使用,病原菌对抗菌药物的耐药率呈逐年上升的趋势^[2]。高黏液表型肺炎克雷伯菌(HMKP)是高毒力型病原菌的重要代表,随着耐碳青霉烯类-HMKP(CR-HMKP)的分离,其在临床的迁徙性扩散已经成

为全球性的公共卫生问题^[3]。正常生理状态下,肺炎克雷伯菌存在于人体的上呼吸道、肠道中,当机体的免疫力显著下降时,肺炎克雷伯菌可经呼吸道进入肺内,最终造成肺大叶或者肺小叶的融合性病变^[4]。研究证实,HMKP 在医院内已经形成若干暴发流行^[5]。但是,对于 HMKP 荚膜的血清学分析的研究较少^[6]。本研究主要对肺炎克雷伯菌的血清型鉴定、耐药基因型检测及其耐药机制进行分析,以期临床诊断及治

疗提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2018 年 5 月至 2021 年 5 月本院收治的 240 例 HMKP 感染者作为研究对象,其中 CR-HMKP 感染者 49 例(CR-HMKP 组),非 CR-HMKP 类感染者 191 例(非 CR-HMKP 组)。

1.2 仪器与试剂 ExTaq 酶及 DNA Marker 均购自 TaKaRa 公司,基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)仪由美国布鲁克(Bruker)公司提供,全自动细菌药敏分析仪由美国 BD 公司提供,PCR 仪由上海宏石医疗科技有限公司提供。

1.3 方法

1.3.1 标本采集及 HMKP 分离 采集所有患者的痰液标本,采用 MALDI-TOF MS 仪进行细菌鉴定,采用 BD Phoenix M50 全自动微生物鉴定及药敏分析系统进行药敏试验及超广谱 β -内酰胺酶(ESBL)检测。检测过程中,将标本在生物安全柜中接种于血平板,使用接种环轻触菌落表面,能拉起黏液丝长度 ≥ 5 mm 则为拉丝实验阳性,可判定为 HMKP。通过药敏试验分析,对碳青霉烯类耐药的 HMKP 则为 CR-HMKP^[7]。

1.3.2 耐药及毒力基因检测 分别对患者痰液的 DNA 进行扩增后,采用 PCR 及电泳方法对毒力基因(aerobactin、alls、mrkD、iroN、rmpA、magA、rmpB)、碳青霉烯酶基因(blaKPC、blaNDM、blaIMP、blaVIM、blaOXA-48)、质粒介导的喹诺酮耐药基因[qnrA、qnrB、qnrC、qnrS、acc(6-IB-CR)]、ESBL 基因(blaTEM、blaCTX-M、blaSHV),以及 16S 核糖体 RNA(rRNA)甲基化酶基因(rmtC、rmtB、armB、armA)进行检测。基因测序均由深圳华大基因科技股份有限公司完成。

1.3.3 质粒接合实验 以临床分离的 CR-HMKP 作为供体菌,使用大肠埃希菌 J53 作为受体菌,对于以上菌株进行接种中国蓝平皿后,在 35 °C 下进行孵育过夜,将活化后的菌株分别用生理盐水调至 0.5 MCF

(麦氏浊度单位),取 5 μ L 菌液在 1 mL 的营养肉汤中进行接种,在 35 °C 下进行孵育 4 h,使用供体菌 20 μ L 及受体菌 40 μ L 按照 1:2 进行混合,接种于 2 mL 的营养肉汤,在 35 °C 下进行孵育 18 h,使用上述的混合液在筛选平皿中涂抹,在 35 °C 下孵育过夜,再次挑选菌落转移到另外一个筛选平皿中,在 35 °C 下孵育过夜。使用质谱仪进行鉴定,采用全自动微生物鉴定及药敏分析仪进行药敏试验。

1.3.4 荚膜血清学分析 采用 PCR 仪检测 HMKP 的 K1、K2、K5、K20、K54、K57 血清学分布。同时,对肺炎克雷伯菌的 7 个管家基因(rpoB、pgi、infB、gapA、phoE、mdh、tonB)进行测序。

1.4 观察指标 (1)分析药敏试验结果,并比较 CR-HMKP 组及非 CR-HMKP 组 HMKP 对头孢噻肟、头孢曲松、头孢唑林、哌拉西林、亚胺培南、美罗培南、厄他培南、头孢吡肟及阿米卡星的耐药情况。(2)分析毒力基因分布结果,分别对 CR-HMKP 组及非 CR-HMKP 组 HMKP 毒力基因 aerobactin、alls、mrkD、iroN、rmpA、magA、rmpB 的表达情况进行比较。(3)分析耐药基因分布情况,分别对 CR-HMKP 组及非 CR-HMKP 组 HMKP 的 blaKPC、blaNDM、blaCTX-M、blaSHV、qnrC、rmtB 基因表达情况进行比较。(4)分析荚膜血清学分布情况,分别对 CR-HMKP 组及非 CR-HMKP 组 HMKP 的荚膜血清型 K1、K2、K57 分布情况进行比较。(5)分析质粒接合实验结果。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件包进行统计学分析,计量材料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验,计数资料以例数或率表示,采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 HMKP 的药敏试验结果分析 CR-HMKP 组及非 CR-HMKP 组 HMKP 对头孢噻肟、头孢曲松、头孢唑林、哌拉西林、亚胺培南、美罗培南、厄他培南、头孢吡肟及阿米卡星的耐药情况比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 两组 HMKP 的药敏试验结果[n(%)]

组别	n	头孢噻肟	头孢曲松	头孢唑林	哌拉西林	亚胺培南	美罗培南	厄他培南	头孢吡肟	阿米卡星
CR-HMKP 组	49	49(100.00)	49(100.00)	49(100.00)	49(100.00)	49(100.00)	49(100.00)	49(100.00)	49(100.00)	45(91.84)
非 CR-HMKP 组	191	160(83.77)	155(81.15)	162(84.82)	151(79.06)	140(73.30)	135(70.68)	136(71.20)	126(65.97)	131(68.59)
χ^2		9.132	10.875	8.462	12.312	16.612	18.742	18.302	22.871	10.781
P		<0.001	<0.001	0.004	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 两组毒力基因分布情况分析 CR-HMKP 及非 CR-HMKP 组 HMKP 的 aerobactin、alls、mrkD、iroN、rmpA、magA、rmpB 7 个管家基因表达情况比

较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

2.3 两组耐药基因分布情况分析 CR-HMKP 及非 CR-HMKP 组 HMKP 的 blaKPC、blaNDM、blaCTX-

M、blaSHV、qnrC、rmtB 基因表达之间的差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

表 2 两组毒力基因分布情况分析[$n(\%)$]

组别	<i>n</i>	aerobactin	alls	mrkD	iroN	rmpA	rmpB
CR-HMKP 组	49	1(2.04)	1(2.04)	2(4.08)	1(2.04)	42(85.71)	2(4.08)
非 CR-HMKP 组	191	21(10.99)	50(26.18)	52(27.23)	41(21.47)	22(11.52)	5(2.62)

表 3 两组耐药基因分布情况分析[$n(\%)$]

组别	<i>n</i>	blaKPC	blaNDM	blaCTX-M	blaSHV	qnrC	rmtB
CR-HMKP 组	49	45(91.84)	42(85.71)	41(83.67)	39(79.59)	43(87.76)	48(97.96)
非 CR-HMKP 组	191	6(3.14)	7(3.66)	3(1.57)	6(3.14)	8(4.19)	2(1.05)
χ^2		183.322	161.572	175.571	149.612	162.732	222.062
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.4 两组荚膜血清学分布情况 CR-HMKP 组及非 CR-HMKP 组 HMKP 的 K1、K2、K57 血清学分布情况比较,差异有在统计学意义($P<0.05$),见表 4。

2.5 质粒接合实验分析 质粒接合实验分析显示,两组 HMKP 对头孢噻肟、头孢曲松、头孢唑林、哌拉西林、亚胺培南、美罗培南、厄他培南、头孢吡肟及阿米卡星的最小抑菌浓度(MIC)比较,差异均有统计学

意义($P<0.001$),见表 5。

表 4 两组荚膜血清学分布情况[$n(\%)$]

组别	<i>n</i>	K1	K2	K57
CR-HMKP 组	49	2(4.08)	4(8.16)	2(4.08)
非 CR-HMKP 组	191	0(0.00)	1(0.52)	0(0.00)
χ^2		7.861	11.162	7.861
<i>P</i>		0.005	0.001	0.005

表 5 质粒接合实验抗菌药物的 MIC($\bar{x}\pm s$,mg/L)

组别	<i>n</i>	头孢噻肟	头孢曲松	头孢唑林	哌拉西林	亚胺培南	美罗培南	厄他培南	头孢吡肟	阿米卡星
CR-HMKP 组	49	16.21±1.95	16.33±1.33	14.65±1.45	16.21±1.77	64.10±1.77	9.76±1.17	256.55±1.77	14.21±1.95	4.33±1.33
非 CR-HMKP 组	191	1.60±1.96	2.37±1.57	3.21±1.33	2.26±1.55	2.46±0.98	1.98±1.01	2.26±1.74	2.60±1.96	2.37±1.57
<i>t</i>		46.738	63.061	50.086	50.431	234.719	42.649	900.244	37.141	8.854
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

3 讨 论

流行病学调查显示,肺炎克雷伯菌造成的呼吸道感染发病率呈现显著的上升趋势^[8]。从本院的研究资料来看,由 CR-HMKP 造成的呼吸机相关性肺炎的比例较高,所以及时通过对本医疗机构的肺炎克雷伯菌感染及耐药情况的分析,对于医院内感染控制工作的提升具有重要的意义。目前研究认为,在肺炎克雷伯菌的感染过程中,频繁使用抗菌药物,大量生成的灭活酶可进一步造成药物抗菌活性的下降^[9]。同时,不当使用抗菌药物还会造成相关耐药基因的激活,抗菌药物的作用位点发生改变,进而影响抗菌药物发挥抗菌作用^[10]。在患者治疗过程中,耐药菌株抗菌药物外排泵的过度表达,造成呼吸道感染患者靶点的药物剂量降低,从而导致耐药,影响患者的治疗效果^[11]。通过药敏试验指导临床及时调整抗菌药物治疗方案,不仅对优化医疗治疗方案具有积极的意义,同时有利于患者治疗效果的提升^[12]。

在肺炎克雷伯菌感染过程中,荚膜是肺炎克雷伯菌感染的重要毒力因子,根据荚膜多糖建立的分型方法^[13],可以将其分为不同的血清型,目前已知的血清型主要包括 78 个,而纳入本研究的 K1、K2、K5、K20、K54、K57 被认为是高毒力肺炎克雷伯菌的主要血清型。既往研究中,K20 被广泛报道^[14],同时 K2 血清型也在以往 CR-HMKP 感染中被发现,而本研究中发现的荚膜血清型主要为 K1、K2、K57,与以往的研究存在一定差异。分析认为,造成此种差异的原因是不同地区人群的基因多态性^[15]。对毒力基因分布结果分析显示,发生 CR-HMKP 感染的患者主要表现为 rmpA 基因表达异常,提示在日后的临床研究中,rmpA 基因可作为本地区肺炎克雷伯菌感染药物治疗的重要靶向。本研究对耐药情况的分析发现,CR-HMKP 对头孢噻肟、头孢曲松、头孢唑林、哌拉西林、亚胺培南、美罗培南、厄他培南、头孢吡肟的耐药情况均为 100%,对阿米卡星的耐药情况则较低。建议在

临床对此类患者的治疗中降低头孢噻肟、头孢曲松、头孢唑林、哌拉西林、亚胺培南、美罗培南、厄他培南、头孢吡肟等药物的使用量,同时联合使用多种抗菌药物,降低耐药性。

流行病学调查显示, HMKP 造成的感染可达到 2%~18%^[16],而目前国内对于 CR-HMKP 造成呼吸道感染的区分的研究还较少,也缺乏对诊疗过程中呼吸道感染患者 CR-HMKP 的认识^[17]。但近年来的研究指出, CR-HMKP 的耐药率呈现显著升高趋势^[18]。随着 CR-HMKP 感染风险的显著升高,其较高的侵袭性及病死率使其已成为呼吸道感染的“超级细菌”^[19]。因此,对患者耐药情况进行分析,及时调整治疗方案,对于患者的治疗具有积极意义^[20]。

但是本研究还存在一定的局限性,纳入研究的样本量较小,同时 CR-HMKP 感染存在显著的地域性差异,所以在对患者的治疗中,对于不同地区的指导意见还有待在日后的研究中进行验证。

综上所述,肺炎克雷伯菌的荚膜血清型主要表现为 K2,耐药基因主要为 rmtB,二者均可作为肺炎克雷伯菌感染者治疗的重要靶点。

参考文献

- [1] 刘妍,张萍淑,吴宗武,等. NICU 肺炎克雷伯菌携带耐药基因特征与临床耐药性分析[J]. 中国实验诊断学, 2021, 25(4):475-479.
- [2] 任艳丽,王云英,蒋敏,等. 不同碳青霉烯酶型肠杆菌科细菌感染的治疗策略研究[J]. 中国抗生素杂志, 2021, 46(4):339-345.
- [3] 林晓宇,朱月永,商红艳,等. 527 例细菌性肝脓肿病原菌分布、耐药性及相关危险因素分析[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(7):873-877.
- [4] 胡久丽,肖旭,朱孝芹,等. 痰样分离的高黏液型肺炎克雷伯菌耐药性及毒力基因检测[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(5):982-985.
- [5] 曹小利,程莉,周万青,等. 碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌 ST11 菌株的基因组学特点分析[J]. 临床检验杂志, 2021, 39(2):99-104.
- [6] 李东明,王宇凡,武玉晶,等. 耐碳青霉烯革兰阴性杆菌耐药性及基因分型[J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 31(6):816-820.
- [7] 雷静,刘泽世,高兴辉,等. 碳青霉烯类耐药肠杆菌目细菌检测及鉴定现状[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2022, 14(3):533-538.
- [8] AKTHER T, RANJANI S, HEMALATHA S, et al. Nanoparticles engineered from endophytic fungi (*Botryosphaeria rhodina*) against ESBL-producing pathogenic multi-drug-resistant *E. coli*[J]. Gut Pathog, 2021, 33(83):1-8.
- [9] KARKI D, DHUNGEL B, BHANDARI S, et al. Antibiotic resistance and detection of plasmid mediated colistin resistance mcr-1 gene among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples[J]. Gut Pathog, 2021, 13(1):45.
- [10] JONAS D, REUTER S, KLASSEN S, et al. Evaluation of the BD Phoenix CPO detect panel for prediction of *Ambler* class carbapenemases [J]. Sci Rep, 2021, 11(1):13150.
- [11] WANG T C, LIN J C, CHANG J C, et al. Virulence among different types of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* with multi-locus sequence type (MLST)-11, serotype K1 or K2 strains[J]. Gut Pathog, 2021, 13(1):40.
- [12] D'SOUZA R, NGUYEN L P, PINTO N A, et al. Role of AmpG in the resistance to β -lactam agents, including cephalosporins and carbapenems; candidate for a novel antimicrobial target [J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2021, 20(1):45.
- [13] PAVEENKITTIPORN W, LYMAN M, BIEDRON C, et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Enterobacterales* in Thailand, 2016–2018[J]. Antimicrob Resist Infect Control, 2021, 10(1):88.
- [14] STEFANIUK E M, KOZINSKA A, WASKO I, et al. Occurrence of beta-lactamases in colistin-resistant *enterobacterales* strains in poland: a pilot study[J]. Pol J Microbiol, 2021, 70(2):283-288.
- [15] ELEKHNAWY E A, SONBOL F I, ELBANNA T E, et al. Evaluation of the impact of adaptation of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to benzalkonium chloride on biofilm formation [J]. Egyptian J Med Human Gene, 2021, 22(51):1-6.
- [16] SHAWA M, FURUTA Y, MULENGA G, et al. Novel chromosomal insertions of ISEcp1-blaCTX-M-15 and diverse antimicrobial resistance genes in Zambian clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Escherichia coli*[J]. Antimicrob Resist Infect Control, 2021, 10(1):79.
- [17] ALGHORIBI M F, ALQURASHI M, OKDAH L, et al. Successful treatment of infective endocarditis due to pan-drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* with ceftazidime-avibactam and aztreonam[J]. Sci Rep, 2021, 11(1):9684.
- [18] SHARAH J Y, HASHEMI A, ARDEBILI A, et al. Molecular characteristics of antibiotic-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from hospitalized patients in Tehran, Iran[J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2021, 20(1):32.
- [19] ROBERT K K, CLARISSE N N, CHADRACK K, et al. Bacterial pathogens in Cattle Egret (*Bubulcus ibis*) and Pied Crow (*Corvus albus*) in Kinshasa, Democratic Republic of the Congo[J]. Open Access Library J, 2021, 8(4):1-10.
- [20] WANG H C, MIN C H, LI J, et al. Characterization of fosfomycin resistance and molecular epidemiology among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from two tertiary hospitals in China[J]. BMC Microbiol, 2021, 21(1):109.