

DOI:10.13350/j.cjpb.220719

• 临床研究 •

# 支气管扩张患儿合并肺部感染的病原菌特征、耐药性及 SP-D 基因多态性分析

王雪壮\*, 林坚, 李燕, 王小花  
(海口市第三人民医院儿科, 海南海口 571100)

**【摘要】** 目的 分析支气管扩张患儿合并肺部感染的病原菌分布特征、耐药性,以及表面活性蛋白 D(SP-D)基因多态性。方法 本院 2018 年 1 月-2020 年 1 月收治的 96 例支气管扩张症合并肺部感染患儿为研究组,同期接受治疗的 100 例支气管扩张但未合并肺部感染患儿为对照组。采集患儿痰液标本进行病原菌的分离鉴定,采用纸片扩散法(K-B 法)检测主要病原菌的耐药性,采用 PCR 限制性片段长度多态性分析法检测 SP-D 基因 rs721917 的多态性,采用 Logistic 回归分析法分析支气管扩张患儿肺部感染发生的危险因素。结果 研究组 96 例患儿共分离出 116 株病原菌,其中革兰阴性菌 68 株,革兰阳性菌 42 株,真菌 6 株。主要感染病原菌肺炎链球菌 16 株,肺炎克雷伯菌 16 株,大肠埃希菌 22 株。大肠埃希菌对阿莫西林、头孢噻肟耐药率均超过 80%,对亚胺培南、阿米卡星的耐药率均低于 20%。肺炎克雷伯菌对红霉素的耐药率为 87.50%,亚胺培南耐药率 12.50%。肺炎链球菌阿莫西林、红霉素耐药率均超过 80%,头孢吡肟、亚胺培南耐药率均低于 15%。SP-D 基因 rs721917 位点存在 3 种基因型:TT、TC、CC,研究组的 C 等位基因频率(35.42% vs 14.00%)以及 CC 基因型频率(56.25% vs 41.00%)均高于对照组(均  $P < 0.05$ )。Logistic 回归分析显示,SP-D 基因 Met11Thr(rs721917T/C)位点基因型多态性是影响支气管扩张患儿发生肺部感染的独立危险因素( $P < 0.05$ )。结论 支气管扩张患儿肺部感染病原菌以革兰阴性菌为主,SP-D 基因多态性是影响支气管扩张患儿发生肺部感染的独立危险因素。不同病原菌耐药性差异较大,临床上应根据药敏试验结果合理选用抗菌药物。

**【关键词】** 支气管扩张症;肺部感染;病原菌;SP-D 基因多态性;耐药性

**【中图分类号】** R378

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2022)07-0831-04

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Jul. ;17(7):831-834.]

## Analysis of pathogenic bacteria characteristics, SP-D gene polymorphism and drug resistance in children with bronchiectasis and pulmonary infection

WANG Xue-zhuang, LIN Jian, LI Yan, WANG Xiao-hua (Pediatrics Haikou Third People's Hospital, Haikou 571100, China)

**【Abstract】** **Objective** To analyze the distribution characteristics of pathogenic bacteria, surface active protein D (SP-D) gene polymorphism and pathogenic bacteria resistance in children with bronchiectasis and pulmonary infection. **Methods** 96 children with bronchiectasis complicated with pulmonary infection treated in our hospital from January 2018 to January 2020 were selected as the study group, and 100 children with bronchiectasis without pulmonary infection treated in our hospital at the same time were selected as the control group. The sputum samples of children were collected and the pathogens were isolated and identified. The drug resistance of main pathogens was detected by disk diffusion method (K-B method), the polymorphism of SP-D gene rs721917 was detected by PCR restriction fragment length polymorphism analysis, and the logistic regression analysis was used to analyze the risk factors of pulmonary infection in children with bronchiectasis. **Results** 116 strains of pathogens were isolated from 96 children, including 68 strains of Gram-negative bacteria, 42 strains of Gram-positive bacteria and 6 strains of fungi. The main pathogens were *Streptococcus pneumoniae*, 16 strains of *Klebsiella pneumoniae* and 22 strains of *Escherichia coli*. The resistance rates of *E. coli* to cefotaxime and amoxicillin were more than 80%, the resistance rates to amikacin and imipenem were less than 20%, the resistance rate of *K. pneumoniae* to erythromycin was the highest (87.50%), the resistance rate to imipenem was the lowest (12.50%). The resistance rates of *S. pneumoniae* to amoxicillin and erythromycin were over 80%, and the resistance rates of cefepime and imipenem were lower than 15%. There were three genotypes in the rs721917 locus of SP-D gene: TT, TC, and CC. The C allele frequency (35.42% vs 14.00%) and CC genotype frequency (56.25% vs 41.00%) in the study group were higher than those in the control group (both  $P < 0.05$ ). Logistic regression analysis showed that

\* **【通讯作者(简介)】** 王雪壮(1984-),女,海南人,本科,主治医师,主要从事儿科支气管扩张症合并肺部感染等方面的研究。  
E-mail: wdyx16380@163.com

the SP-D gene Met11Thr (rs721917T/C) locus genotype polymorphisms were all independent risk factors for lung infection in children with tracheectasis ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The pathogens of lung infection in children with bronchiectasis are mainly Gram-negative bacteria, and SP-D gene polymorphism is an independent risk factor affecting lung infection in children with bronchiectasis. The drug resistance of different pathogenic bacteria is quite different, and antibacterial drugs should be rationally selected according to the results of drug susceptibility tests in clinical practice.

**【Key words】** bronchiectasis; lung infection; pathogenic bacteria; SP-D gene polymorphism; drug resistance

支气管扩张症是临床常见的呼吸系统疾病, 主要病理表现为支气管及周围肺组织发生慢性化脓性炎症反应, 进而损伤支气管壁的弹性组织, 导致支气管变形及持久扩张<sup>[1]</sup>。支气管扩张症的主要临床表现为反复咯血、慢性咳嗽以及咳大量脓痰, 其中感染是引起支气管扩张症的重要因素<sup>[2]</sup>。随着抗菌药物的广泛使用以及多药耐药菌感染风险的增加, 治疗难度呈增加趋势<sup>[3]</sup>。因此, 为提高治疗的针对性, 了解支气管扩张症患者肺部感染病原菌分布情况以及药敏特点具有重要临床意义。表面活性蛋白D (surfactant protein D, SP-D) 主要是由肺泡上皮细胞产生的一种高活性蛋白, 具有先天免疫调节作用, 参与肺表面蛋白的调节过程, 可抑制肺部炎症反应, 维持肺组织功能<sup>[4-5]</sup>。既往研究证实, SP-D 基因多态性是影响肺部炎症相关疾病的重要因素, 刘菲等<sup>[6]</sup>研究发现 SP-D 基因可能与糖尿病患者肺炎感染易感性有关。基于此, 本研究拟进一步探讨支气管扩张症患者感染病原菌的特征及其耐药性, 通过分析 SP-D 基因多态性与肺部感染的关系, 旨在指导临床筛选高危人群及预防性治疗。

## 对象与方法

### 1 受试对象

2018年1月-2020年1月本院收治的96例支气管扩张症合并肺部感染患儿为研究组, 其中男53, 女43例; 年龄为6~16岁, 平均(11.32±2.68)岁; 体质指数为16.2~23.5 kg/m<sup>2</sup>, 平均(19.05±1.85) kg/m<sup>2</sup>。选取同期收治的100例单纯支气管扩张(未合并肺部感染)患儿为对照组, 其中男57例, 女43例; 年龄为7~16岁, 平均(11.28±2.55)岁; 体质指数为15.8~23.0 kg/m<sup>2</sup>, 平均(18.91±1.92) kg/m<sup>2</sup>。

纳入标准: (1)符合支气管扩张诊断标准, 肺部CT显示支气管异常影像学改变, 表现为串珠样扩张、柱状扩张、囊性扩张等, 且出现环形阴影、双轨征等; (2)主要临床病症为反复咳嗽、咳脓痰或间断咯血等<sup>[7]</sup>; (3)感染患者均符合《医院感染诊断标准》<sup>[8]</sup>, 胸部X线片显示斑片状阴影或间质性改变, 且痰培养病原学检查结果为阳性, PCT、CRP、白细胞水平升高,

排除标准: (1)合并结核病、艾滋病、肿瘤等疾病; (2)伴随免疫、神经系统疾病; (3)有肺外伤、慢性阻塞

性肺疾病等肺部疾病; (4)入组前已接受抗菌药物治疗。

本研究获院伦理委员会批准, 所有患儿均由家属签署知情同意书。

### 2 方法

**2.1 标本采集及病原菌的培养与鉴定** 收集患儿痰液标本, 接种于血琼脂平板, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 35 °C 培养 24 h, 挑取单个纯菌落, 应用全自动微生物鉴定仪(型号: VITEK-32, 法国生物梅里埃公司生产)鉴定病原菌, 按照《全国临床检验操作规程》<sup>[9]</sup>操作。质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC25923、大肠埃希菌 ATCC25922 和肺炎克雷伯菌 ATCC13883, 购于北京中科质检生物技术有限公司。

**2.2 药敏试验** 采用纸片扩散法(K-B法)检测病原菌的耐药性, 药敏纸片购于英国 Oxoid 公司。用血琼脂平板培养细菌, 取平板上形成的单菌落接种于液体培养基, 扩大培养后接种于血琼脂平板, 待长出单菌落后进行药敏试验, 用游标卡尺测量抑菌圈直径。抗菌药物包括: 庆大霉素、阿米卡星、阿莫西林、红霉素、氨曲南、环丙沙星、替卡西林、亚胺培南、头孢噻肟、头孢吡肟。按照美国国家临床实验室标准化研究所标准<sup>[10]</sup>判断结果。

**2.3 基因多态性检测** 采集患儿肘静脉血, EDTA 抗凝, 采用 DNA 抽提试剂提取全血基因组 DNA, 用 DYY-10C 型电泳仪(北京六一仪器厂生产)和 OneC 型紫外可见分光光度计(美国赛默飞世尔公司生产)检测 DNA 质量和浓度, 将 DNA 标本稀释至同一浓度后 4 °C 保存。

登陆 GenBank、NCBI 等数据库搜索 SP-D 基因序列号, 借助 Primer 5 引物设计软件设计引物。SP-D 基因 rs721917 基因位点引物: 5'-CCCCATAG-CAGAGGACAGAA-3' (上游); 5'-CCAGGGTG-CAAGCACTGGAC-3' (下游)。PCR 反应体系 (20 μl): 2.5 μl PCR 缓冲液, 0.5 μl Taq 酶, dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μl, DNA 模板 1 μl, 上、下游引物各 0.5 μl, 无菌水 14.5 μl。应用荧光定量 PCR 仪进行 DNA 扩增。扩增条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 40 s, 58 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 25 个循环。PCR 产物经纯化后用 ABI3730 测序仪(美国应用生物系统

公司生产)测序,按仪器使用说明操作,然后使用BLAST软件对数据库中的序列与测序结果进行比对分析。

**2.4 统计学分析** 采用SPSS 20.0软件进行统计学分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 $t$ 检验;计数资料用例数或百分率表示,两组间比较采用 $\chi^2$ 检验;检测等位基因频率是否符合Hardy-Weinberg平衡定律;采用多因素Logistic回归分析法分析肺部感染发生的危险因素。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

### 1 病原菌种类及分布

96例患儿共分离出116株病原菌,其中革兰阴性菌68株,革兰阳性菌42株,真菌6株。主要感染病原菌为肺炎链球菌16株,肺炎克雷伯菌16株,大肠埃希菌22株。分离病原菌的构成见表1。

表1 支气管扩张症患者合并肺部感染病原菌种类及其构成  
Table 1 Distribution and constituent ratio of pathogenic bacteria

病原菌 Pathogenic bacteria	株数 No. of plants	占比(%) Proportion ratio
革兰阴性菌	68	58.62
大肠埃希菌	22	18.97
肺炎克雷伯菌	16	13.79
鲍曼不动杆菌	13	11.21
铜绿假单胞菌	11	9.48
阴沟肠杆菌	4	3.45
沙门氏菌	2	1.72
其他		0.00
革兰阳性菌	42	36.21
金黄色葡萄球菌	10	8.62
表皮葡萄球菌	9	7.76
肺炎链球菌	16	13.79
溶血葡萄球菌	4	3.45
其他	3	2.59
真菌	6	5.17
白色假丝酵母菌	3	2.59
光滑假丝酵母菌	3	2.59
合计 Total	116	100.00

### 2 主要病原菌的耐药性

大肠埃希菌对头孢噻肟、阿莫西林耐药率均超过80%,对阿米卡星、亚胺培南的耐药率均低于20%。肺炎克雷伯菌对红霉素的耐药率为87.50%,对亚胺培南耐药率为12.50%。肺炎链球菌对阿莫西林、红霉素的耐药率均超过80%,对头孢吡肟、亚胺培南的耐药率均低于15%(表2)。

### 3 两组患儿的SP-D基因多态性比较

SP-D基因rs721917位点存在3种基因型:TT、TC、CC。研究组的C等位基因频率(35.42% vs 14.00%)以及CC基因型频率(56.25% vs 41.00%)

均高于对照组(均 $P < 0.01$ )(表3)。该位点基因型的期望值、观测值符合Hardy-Weinberg平衡定律,表明样本具有群体代表性,不存在选择性偏移。

表2 主要病原菌对10种抗菌药物的耐药性  
Table 2 The drug sensitivity test results of main pathogenic bacteria

抗菌药物 Antibacterials	大肠埃希菌( $n=22$ ) <i>Escherichia coli</i>		肺炎克雷伯菌( $n=16$ ) <i>Klebsiella pneumoniae</i>		肺炎链球菌( $n=16$ ) <i>Streptococcus pneumoniae</i>	
	耐药株数 No. of resistant strains	耐药率 Resistance rate (%)	耐药株数 No. of resistant strains	耐药率 Resistance rate (%)	耐药株数 No. of resistant strains	耐药率 Resistance rate (%)
阿米卡星	3	13.64	6	37.50	5	31.25
氨基南	15	68.18	5	31.25	7	43.75
替卡西林	16	72.73	—	—	5	31.25
头孢噻肟	20	90.91	10	62.50	4	25.00
头孢吡肟	7	31.82	7	43.75	2	12.50
阿莫西林	19	86.36	4	25.00	13	81.25
环丙沙星	14	63.64	6	37.50	8	50.00
亚胺培南	4	18.18	2	12.50	0	0.00
红霉素	17	77.27	14	87.50	14	87.50
庆大霉素	11	50.00	10	62.50	7	43.75

注:“—”表示未做药敏试验。

Notes: “—” indicates that drug sensitivity test has not been conducted.

表3 两组患儿的SP-D基因多态性比较  
Table 3 Comparison of SP-D gene polymorphisms between the two groups of children

组别 Group	例数 Cases	基因型 Genotype			等位基因 Allele	
		TT	TC	CC	T	C
研究组	96	22	40	34	84	108
对照组	100	32	54	14	118	82
$\chi^2$		12.194			9.121	
$P$		0.002			0.003	

### 4 肺部感染影响因素Logistic回归分析

以SP-D基因rs721917位点基因型作为自变量,以是否发生肺部感染为因变量进行Logistic回归分析。结果显示,SP-D基因rs721917位点基因型多态性是影响支气管扩张症患者发生肺部感染的独立危险因素( $\beta = 0.824, SE = 0.326, Wald = 5.808, P = 0.012, OR = 2.262, 95\%CI$ 为1.153~4.458)。

## 讨 论

支气管扩张属于变态反应性疾病,主要是由环境、遗传等因素引起的支气管慢性炎症。研究证实,中性粒细胞、T淋巴细胞以及气道上皮细胞等多种细胞均参与其慢性变态反应发生过程<sup>[11]</sup>。支气管扩张患者肺组织的炎性损伤导致肺毛细血管基底膜增厚,引起组织缺氧,通气/血流比例失衡等,使得免疫调控紊乱,增加了肺部感染风险<sup>[12]</sup>。同时,病原菌入侵机体又可进一步刺激机体分泌大量炎症因子,并趋化炎症细胞聚集于肺组织,加重肺组织炎性损伤,导致呼吸功能减退,加重疾病进展。因此,研究支气管扩张症患者肺部感染的病原菌特点,并探讨合并感染发病机制可为临

床研究提供依据。

既往研究发现,支气管扩张患者肺部感染的病原菌主要为革兰阴性菌,其中以肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌比例较高<sup>[13]</sup>。本研究结果显示,96例患儿共分离116株病原菌,其中主要感染病原菌为肺炎链球菌、肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌,与欧阳细瑜等<sup>[14]</sup>的报道相近。药敏试验显示,肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌、肺炎链球菌对青霉素、对红霉素等抗生素的耐药率较高,对亚胺培南、头孢吡肟等抗生素的耐药率较低。因此,在临床抗菌治疗中应密切关注患者感染病原菌种类,并及时监测其耐药情况,根据药敏试验结果规范用药,全面评估用药剂量、治疗周期等,避免多种抗菌药物过量 and 长时间使用,降低多药耐药发生风险。

目前认为,遗传背景不仅影响支气管扩张的发生、发展,还能影响机体免疫应答、炎症调控等,从而影响机体对病原菌的抵抗能力<sup>[15]</sup>。SP-D是肺泡II型上皮细胞分泌的表面活性物质,参与调节肺表面蛋白及肺部炎症,同时还能调节免疫功能,诱导肺部巨噬细胞吞噬病原菌,利于清除入侵病原体,从而发挥抗菌、抗病毒作用<sup>[16]</sup>。目前,对于SP-D基因rs721917位点基因型多态性研究较多,且大部分研究发现该位点多态性与肺部感染密切相关<sup>[17]</sup>。本研究表明SP-D基因rs721917位点存在3种基因型:TT、TC、CC,其中研究组的C等位基因频率以及CC基因型频率均高于对照组( $P < 0.05$ ),表明rs721917位点的基因多态性与支气管扩张患儿肺部感染密切相关。*Logistic*回归分析显示,SP-D基因rs721917位点基因型多态性均是影响支气管扩张患儿发生肺部感染的独立危险因素( $P < 0.05$ ),表明C等位基因可增加支气管扩张患儿合并肺部感染风险。Miao-Hsi等<sup>[17]</sup>报道,SP-D基因rs721917位点CC基因型会影响SP-D蛋白的正常结构,且CC基因型患者的SP-D蛋白水平低于TT基因型患者,表明T→C的突变通过影响SP-D蛋白的功能而降低机体病原菌抵抗能力,从而增加肺部感染风险,即C等位基因可能为支气管扩张患儿肺部感染的易感基因。徐丽等<sup>[18]</sup>研究发现,SP-D蛋白还能通过结合于Toll样受体2/4而激活Toll样受体信号通路,激活机体免疫功能,rs721917位点突变导致SP-D蛋白功能异常,无法有效维持肺脏脂质稳态,引起肺纤维化和损伤肺组织功能,增加细菌入侵、定植风险,同时由于免疫功能的减退,病原菌在肺组织大量繁殖,释放多种有害物质(脂多糖、毒素),诱导炎症损伤,从而加重支气管扩张严重程度,增加治疗难度。

综上所述,支气管扩张症患儿肺部感染病原菌以革兰阴性菌为主,SP-D基因多态性是影响支气管扩张症患儿发生肺部感染的独立危险因素。不同病原菌耐

药性差异较大,临床上应根据药敏试验结果合理选用抗菌药物。

#### 【参考文献】

- [1] 王宁,徐金富. 欧洲成人支气管扩张症管理指南带给我们的思考[J]. 中华结核和呼吸杂志,2019,42(2):153-156.
- [2] 赵文驱,黄敏於,李博厚,等. 哮喘合并支气管扩张症流行病学及诊治现状分析[J]. 实用医学杂志,2019,35(22):3427-3430.
- [3] 王月平,尹飞飞,赵国厚,等. 血清CRP,IL-6,PCT在支气管扩张症合并肺部感染中的表达水平及意义[J]. 中华医院感染学杂志,2020,30(9):80-84.
- [4] Aramini B, Geraghty P, Lederer DJ, et al. Surfactant protein A and D polymorphisms and methylprednisolone pharmacogenetics in donor lungs[J]. J Thorac Cardiovasc Surg,2019,157(5):2109-2117.
- [5] Fakih D, Akiki Z, Junker K, et al. Surfactant protein D multimerization and gene polymorphism in COPD and asthma[J]. Respirology,2018,23(3):298-305.
- [6] 刘菲,王艳宏,李琳琳,等. 2型糖尿病肾病患者并发肺部感染表面活性蛋白D基因多态性与影响因素分析[J]. 中华医院感染学杂志,2020,30(4):47-50.
- [7] 葛爱,章雨薇,徐金富. 2021欧洲呼吸学会儿童和青少年支气管扩张症指南要点分析[J]. 中华结核和呼吸杂志,2021,44(9):787-792.
- [8] 中华人民共和国卫生部. 医院感染诊断标准(试行)[J]. 中华医学杂志,2001,81(5):314-320.
- [9] 尚红,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 北京:人民卫生出版社,2015.
- [10] 陈宏斌,王辉. 2017年CLSI M100-S27主要更新内容解读[J]. 中华检验医学杂志,2017,40(4):238-241.
- [11] Chang AB, Bush A, Grimwood K. Bronchiectasis in children: diagnosis and treatment[J]. Lancet,2018,392(10150):866-879.
- [12] 吴凤娟,元倩,胡青,等. 支气管扩张症患者肺部CT影像学特征与临床表现的相关性[J]. 中华医学杂志,2019,99(38):2982-2988.
- [13] 彭红星,曾玉兰,冯伏先,等. 支气管扩张合并感染患者纤维支气管镜下支气管分泌物病原菌培养及耐药性分析[J]. 中国感染与化疗杂志,2017,17(2):140-143.
- [14] 欧阳细瑜. 支气管扩张症合并肺部感染患者的病原菌菌群分布及耐药性分析[J]. 中国医院用药评价与分析,2019,19(8):1010-1012.
- [15] Flume PA, Chalmers JD, Olivier KN. Advances in bronchiectasis: endotyping, genetics, microbiome, and disease heterogeneity[J]. Lancet,2018,392(10150):880-890.
- [16] Sunil VR, Vayas KN, Cervelli JA, et al. Protective role of surfactant protein-D against lung injury and oxidative stress induced by nitrogen mustard[J]. Toxicol Sci,2018,166(1):108-122.
- [17] Miao-Hsi H, Ou CY, Wen-Yu H, et al. Functional analysis of genetic variations in surfactant protein D in mycobacterial infection and their association with tuberculosis[J]. Front Immunol,2018,9(1):1543.
- [18] 徐丽,谭榜宪,李华. 表面活性蛋白D基因多态性与肺部疾病易感性的研究进展[J]. 现代预防医学,2018,45(11):129-132.

【收稿日期】 2022-02-21 【修回日期】 2022-05-13