

1.2 仪器与试剂 T100 聚合酶链反应(PCR)扩增仪(美国 Bio-Rad 公司)、GelDoc 2000 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)、DYY-6C 电泳仪(北京六一生物科技股份有限公司)、25 μ L 微量注射器(上海哈美顿实验器材有限公司)、大蜡螟(盐城新安华生物科技有限公司)、DL2000 DNA marker(BBI 生命科学有限公司)、PCR 预混合溶液(宝生物工程大连有限公司)、磷酸盐缓冲液(PBS)。主要引物序列见表 1,均由上海生物工程股份有限公司合成。

表 1 引物序列表

引物名称	序列 (5′-3′)	产物大小 (bp)
Wzi	F:GTGCCGCGAGCGCTTTCTATCTTGGTATTC	447
	R:GAGAGCCACTGGTTCCAG AATTACCGC	
rmpA	F:CATAAGAGTATTGGTTGACAG	429
	R:CTTGCA TGAGCCATCTTTCA	
rmpA2	F:TGTGCAATAAGGATGTTACATTAGT	609
	R:TTTGA TG TGACCATTTTCA	
iroN	F:GTCCGCGGTA ACTTCAGCC	829
	R:TCAGAA TGAACTACCGCCC	
iucA	F:AATCAATGGCTATTC CGCTG	239
	R:CGCTTCACTTCTTCACTGACAGG	

注:F 表示正向引物;R 表示反向引物。

1.3 方法

1.3.1 MLST、荚膜血清型及毒力基因检测 采用煮沸法提取肺炎克雷伯菌基因组 DNA,PCR 扩增毒力基因 rmpA、rmpA2、iucA 和 iroN^[9-10],筛选出 hvKP。采用 PCR 扩增肺炎克雷伯菌的 7 个管家基因 gapA、infB、mdh、pgi、phoE、rpoB 和 tonB 并测序(<https://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/primers-used>),PCR 扩增 wzi 基因并测序^[11],将所有测序结果上传至 <https://bigsd.b.pasteur.fr> 网站进行比对,确定所有 hvKP 的 MLST 分型及荚膜血清分型。

1.3.2 拉丝实验 将肺炎克雷伯菌接种于哥伦比亚血琼脂培养基,37 $^{\circ}$ C 过夜培养,用接种环挑取菌落,菌落被拉伸 ≥ 5 mm 即为拉丝实验阳性,本实验重复

3 次。

1.3.3 大蜡螟感染模型 选取虫体质量 250~350 mg 长 2~2.5 cm 活动良好的奶白色大蜡螟用于实验。用 PBS 缓冲液将菌液倍比稀释至 1×10^5 CFU/mL、 1×10^6 CFU/mL、 1×10^7 CFU/mL、 1×10^8 CFU/mL,依次记为 1~4 组,用 25 μ L 微量注射器吸取 10 μ L 菌液由大蜡螟的最后一只右后足注入虫体,每组注射 10 只。另选取 10 只大蜡螟注射 PBS,10 只不做任何处理作为空白对照。将大蜡螟放入一次性培养皿 37 $^{\circ}$ C 避光培养 72 h,在注射后每 12 h 记录一次大蜡螟的生存情况,虫体变黑、无活动、刺激无反应判定为死亡。菌株 ATCC43816 为本研究的高毒力对照,ATCC700603 为低毒力对照,10 株临床收集的 非高毒力 cKP 记为经典组。实验重复 3 次取平均值绘制生存曲线,记算 72 h 时肺炎克雷伯菌 50%致死量(LD₅₀)^[12]。本研究先用高毒力标准菌株 ATCC43816 和低毒力标准菌株 ATCC700603 建立起肺炎克雷伯菌大蜡螟感染模型的操作规程并评价其可行性,再用临床收集到的 K1 型、K64 型和 K112 型高毒力菌株及非高毒力的经典株进行实验评估该模型区分 hvKP 的能力。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件对 LD₅₀ 程序进行分析,结果用 Log10LD₅₀ 表示。采用 GraphPad Prism 8.0 软件对大蜡螟数据进行处理分析并绘制 Kaplan-Meier 生存曲线图,用 Log-rank 分析数据,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 高毒力肺炎克雷伯菌分型及毒力基因检测 通过拉丝实验和毒力基因检测,共收集 15 株 hvKP,检出 3 种血清型,分别为 K1 ST23 型(13.3%,2/15)、K64 ST11 型(60.0%,9/15)、K112 ST15 型(26.7%,4/15)。K1 和 K64 型的菌株均含有 rmpA、rmpA2、iucA 和 iroN 4 个毒力基因,而 K112 型的 4 株均只含有 rmpA2 和 iucA 2 个毒力基因。K64 ST11 型和 K112 ST15 型菌株均对碳青霉烯类抗菌药物耐药,即为 CR-hvKP,对亚胺培南和美罗培南的最小抑菌浓度(MIC)见表 2。

表 2 高毒力肺炎克雷伯菌分型、毒力基因及亚胺培南和美罗培南 MIC 值检测结果

荚膜血清型	MLST	n	rmpA	rmpA2	iucA	iroN	亚胺培南(μ g/mL)	美罗培南(μ g/mL)
K1	ST23	2	+	+	+	+	≤ 0.25	≤ 0.25
K64	ST11	9	+	+	+	+	>8	>8
K112	ST15	4	-	+	+	-	2	>8

注: + 表示含有目的基因; - 表示不含目的基因。

2.2 大蜡螟感染模型 ATCC700603、ATCC43816 的生存曲线如图 1 所示,大蜡螟能够区分出高毒力和低毒力肺炎克雷伯菌,当菌液浓度分别为 1×10^5

CFU/mL、 1×10^6 CFU/mL、 1×10^7 CFU/mL、 1×10^8 CFU/mL 时,ATCC700603 和 ATCC43816 对应浓度比较,差异均有统计学意义($P=0.000\ 1$ 、 $0.002\ 3$ 、

0.024 5、0.042 8)。

2.2 cKp、不同荚膜血清分型的 hvKP 及对照组 ATCC700603、ATCC43816 的生存曲线 未做任何处理的空白对照和注射了 PBS 的大蜡螟均存活,随着菌液浓度的升高,大蜡螟的病死率也随之升高。见图 2。

与高毒力标准菌株 ATCC43816 相同,K1、K64、K112 型临床菌株均表现出高致死率,当菌液浓度在 $1\times 10^7\sim 1\times 10^8$ CFU/mL 时,所有大蜡螟在 48 h 内死亡。 1×10^6 CFU/mL 的菌液可区分出 hvKP 和 cKP,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 3。

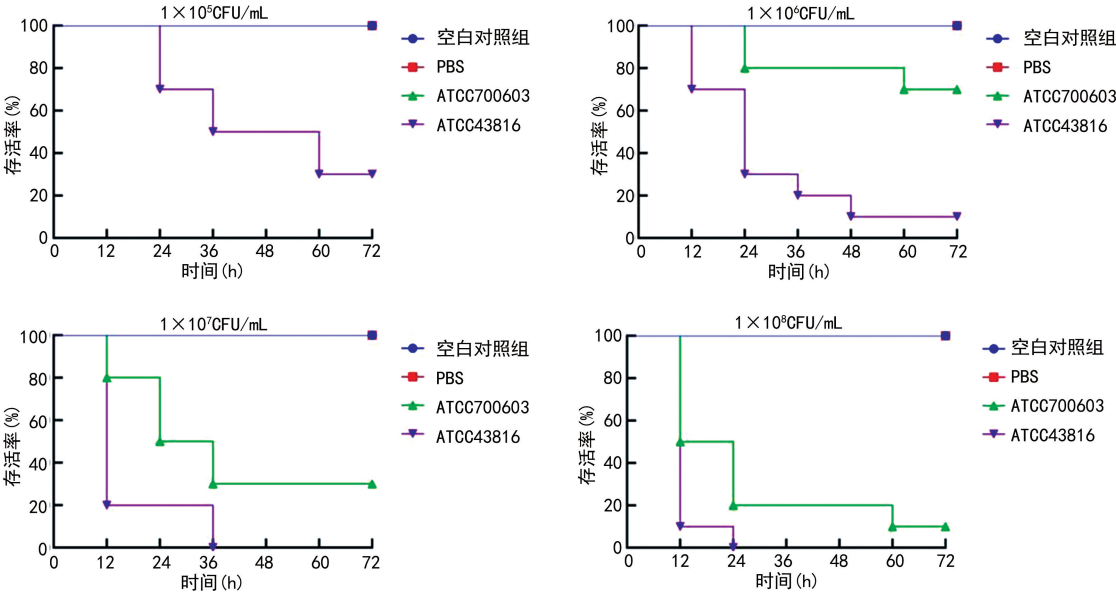


图 1 大蜡螟接种不同浓度 ATCC700603、ATCC43816 菌液后的生存曲线

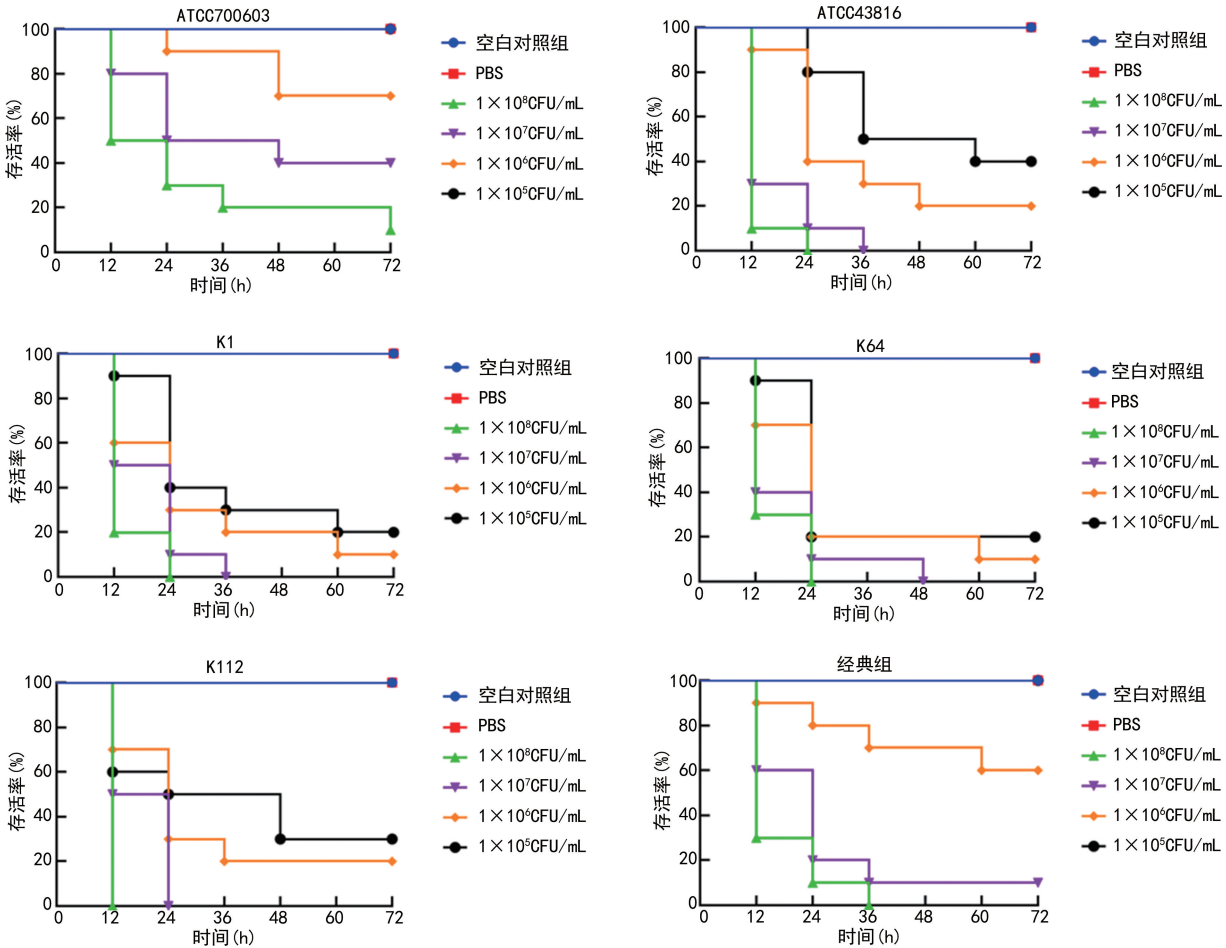
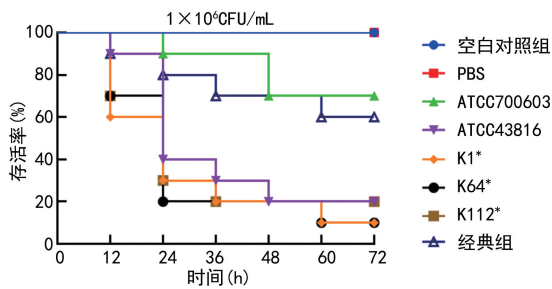


图 2 大蜡螟在接种 PBS 缓冲液及不同浓度的 ATCC700603、ATCC43816、K1 型、K64 型、K112 型和经典肺炎克雷伯菌菌液后的生存曲线



注:与经典肺炎克雷伯菌比较, * $P < 0.05$ 。

图 3 大蜡螟在接种 1×10^6 CFU/mL 菌液时的生存曲线

2.3 LD_{50} 分析 参照文献[13]大蜡螟感染模型,将 $\text{Log}_{10}LD_{50} < 5.06$ 的分离株定义为高毒株。在本实验中,利用 SPSS 的概率分析程序计算出 ATCC700603、ATCC43816、K1 型、K64 型、K112 型和 cKP 在 72 h 的 LD_{50} 分别为 5.2×10^6 CFU/mL、 6.8×10^4 CFU/mL、 1.0×10^4 CFU/mL、 1.0×10^4 CFU/mL、 3.1×10^4 CFU/mL、 1.6×10^6 CFU/mL,对应的 $\text{Log}_{10}LD_{50}$ 分别为 6.718、4.834、3.987、3.987、4.504、6.212,临床分离的 K1 型、K64 型、K112 型肺炎克雷伯菌均可被定为高毒力菌株。

3 讨论

高毒力肺炎克雷伯菌主要在亚洲传播流行,尤其是中国、韩国和日本,可引起患者全身多处感染甚至发生侵袭转移,其他地区也有零星报道且发病率不断上升。K1 ST23 型 hvKP 是中国的优势克隆株,大约 64.3% 的 hvKP 分离株是 K1 型且 K1 型分离株大多聚集在克隆群 23(CG23)中[13]。hvKp 在血平板上呈高黏表型,故临床常用拉丝实验来鉴别高毒力菌株,但这种方法并不完全准确[14],有些 hvKp 并不表现出高黏性,会造成漏检,而有些 cKp 却有高黏特性,被错误的定义为 hvKp,毒力基因的检测可帮助提高准确率, *rmpA* 和 *rmpA2* 可促进荚膜合成有抗细胞吞噬的作用, *iucA* 和 *iroN* 与铁载体的合成有关,也是 hvKp 的重要毒力基因,近年来,许多新的毒力基因被发现,有研究表明, *peg344*、*rmpA*、*rmpA2*、*iucA* 和 *iroB* 在鉴定 hvKP 方面诊断准确度大于 95%[8]。尽管多种毒力基因组合鉴定 hvKP 的方法已成为研究趋势,动物感染模型因其可以直观地表现出细菌毒力的大小,仍被广泛用于评估病原菌的毒力[15]。

小鼠等感染类动物模型建模对实验室要求较高,往往限制动物实验的开展,而大蜡螟感染模型对实验硬件要求较低,操作简便,价格低廉,可进行大规模繁殖,且可以快速进行实验等优点,大蜡螟幼虫能够在 37 °C 培养,免疫系统与人类有许多相似之处,均由体液免疫和细胞免疫组成,比无脊椎动物更先进。大蜡螟模型已被用于抗菌药物的疗效评估[16]、真菌的毒力评估[17],细菌感染后的参数变化,包括临床观察、组织病理学分析、细菌负荷的测定、免疫反应激活的监测

等[18],1998 年,大蜡螟就被用于肺炎克雷伯菌的相关研究[19]。本研究用大蜡螟来评估临床分离的肺炎克雷伯菌毒力水平,在被注射菌液后的 12 h 内,无论是高毒力组还是低毒力组,大蜡螟的病死率均较低,可能是体内的免疫系统发挥抵抗外来病原体、保护虫体的作用,在 12~24 h,高致病性菌株突破防线导致大蜡螟病死率急剧升高,24 h 后,大蜡螟病死率趋于平稳,故而本实验记录了大蜡螟 72 h 生存情况,并计算 72 h LD_{50} ,为评估肺炎克雷伯菌的毒力水平提供依据。本研究分离的 K1 型、K64 型和 K112 型肺炎克雷伯菌均为高毒力菌株,与毒力基因检测结果相一致,其对大蜡螟致死率明显高于 cKp,同时它们 72 h 的 LD_{50} 与 cKp 相比,相差两个数量级,具有更强的致病力。ST11 型和 ST15 型是临床常见的碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌(CRKP)分型,本研究检出的 K64 ST11 型和 K112 ST15 型菌株是 CRKP 获得毒力质粒形成了 hv-CRKP[20],表现出与 K1 型 hvKP 相似的毒力影响。

然而,有研究称大蜡螟并不能准确区分出 cKp 和 hvKP, RUSSO 等[21]研究表明,向大蜡螟幼虫注射 $1 \times 10^2 \sim 5 \times 10^2$ CFU/mL 的菌液,观察 5 d,发现 cKp 和 hvKP 的毒力在大蜡螟中存在显著重叠,差异无统计学意义或只有很小的差异。相反的, INSUA 等[22]的研究显示大蜡螟感染模型可用于评估肺炎克雷伯菌的毒力,此模型不仅区分了高毒力的菌株和低毒力的菌株,甚至精确区分了高毒力菌株之间的差异,类似的结果在其他研究中也有报道[23]。此外,相关研究还通过对感染各种肺炎克雷伯菌后大蜡螟酚氧化酶活性的检测、虫体载菌实时荧光定量 PCR 分析等多方面评估大蜡螟感染模型在肺炎克雷伯菌中的应用。大蜡螟易受年龄、体质量、繁殖条件、供应商等多种因素的影响,从而导致病死率会有所差异,这可能解释了在不同实验室进行的研究中,一些参考菌株出现了相互矛盾的不同幼虫病死率的结果。因此在建立大蜡螟感染模型时,研究方案参数的标准化有助于提高结果的准确性[18]。本实验选用体质量 250~350 mg,长 2.0~2.5 cm 奶白色活动良好的大蜡螟,在购入 1 周内完成菌液注射,用 75% 乙醇溶液对穿刺部位消毒,于同一部位用相同量程的微量注射器注入相同量的菌液,而后放入相同条件培养,并设置对照组,实验重复 3 次,可以较好地实现 hvKP 和 cKP 的鉴别,表明大蜡螟感染模型是评估 hvKP 毒力的有效模型。

本研究通过建立大蜡螟感染模型对 hvKP 进行体内毒力评估,实现了 hvKP 和 cKP 的鉴别,此方法简便易行,可实现大批量检测,相较小鼠模型更易在临床推广。但是由于本次实验样本量较少,只评估了临床常见的 3 种血清型,故实验结果不能完全反应

hvkP 所有血清型的毒力特征。本实验通过绘制大蜡螟的生存曲线及计算 LD₅₀ 来反映 hvkP 的毒力水平,除此之外,还可以取大蜡螟的血液进行生化免疫指标检测或病理切片观察等,大蜡螟感染模型具有很大的研究潜力。

综上所述,本实验结果表明大蜡螟感染模型是评估 hvkP 毒力的有效模型,若再联合毒力生物标志物检测,可以实现 hvkP 临床菌株的准确鉴定,为 hvkP 导致的医院感染防控提供有力的实验室支持。

参考文献

[1] LIU Y C, CHENG D L, LIN C L. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess associated with septic endophthalmitis[J]. Arch Intern Med, 1986, 146(10): 1913-1916.

[2] RUSSO T A, MARR C M. Hypervirulent *klebsiella pneumoniae*[J]. Clin Microbiol Rev. 2019, 32(3): e00001-19.

[3] WU C, ZHOU Y, AI W, et al. Co-occurrence of OXA-232, RmtF-encoding plasmids, and pLVPK-like virulence plasmid contributed to the generation of ST15-KL112 hypervirulent multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. Front Microbiol, 2023, 14: 1133590.

[4] GU D, DONG N, ZHENG Z, et al. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study[J]. Lancet Infect Dis, 2018, 18(1): 37-46.

[5] LEE C R, LEE J H, PARK K S, et al. Antimicrobial resistance of hypervirulent *klebsiella pneumoniae*: epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and resistance mechanisms[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7: 483.

[6] CHEN Y T, CHANG H Y, LAI Y C, et al. Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK of *Klebsiella pneumoniae* CG43 [J]. Gene, 2004, 337: 189-198.

[7] WU K M, LI L, YAN J J, et al. Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis[J]. J Bacteriol, 2009, 191(14): 4492-4501.

[8] RUSSO T A, OLSON R, FANG C, et al. Identification of biomarkers for differentiation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from classical *K. pneumoniae*[J]. J Clin Microbiol, 2018, 56(9): e00776.

[9] ZHOU C, WU Q, HE L, et al. Clinical and molecular characteristics of carbapenem-resistant hypervirulent *klebsiella pneumoniae* isolates in a tertiary hospital in Shanghai, China[J]. Infect Drug Resist, 2021, 14: 2697-2706.

[10] XU M, FU Y, FANG Y, et al. High prevalence of KPC-2-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* causing

meningitis in Eastern China[J]. Infect Drug Resist, 2019, 12: 641-653.

[11] 王伟, 康海全, 赵树龙, 等. KL47 型和 KL64 型 ST11 碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌分子流行病学特征[J]. 中华医院感染学杂志, 2022, 32(6): 819-823.

[12] ZHAO Y, ZHANG X, TORRES V V L, et al. An outbreak of carbapenem-resistant and hypervirulent *klebsiella pneumoniae* in an intensive care unit of a major teaching hospital in Wenzhou, China[J]. Front Public Health, 2019, 7: 229.

[13] SHI Q C, LAN P, HUANG D Y, et al. Diversity of virulence level phenotype of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from different sequence type lineage[J]. BMC Microbiol, 2018, 18(1): 94.

[14] CATALÁN-NÁJERA JC, GARZA-RAMOS U, BARRIOS-CAMACHO H. Hypervirulence and hypermucoviscosity: two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes[J]. Virulence, 2017, 8(7): 1111-1123.

[15] 郑茂, 袁成良, 鄂建飞, 等. 高毒力肺炎克雷伯菌实验室鉴定方法的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2022, 47(8): 772-778.

[16] 胡仁静, 戴越, 沈兰凤, 等. 磷霉素和亚胺培南对肺炎克雷伯菌体内协同作用的评价[J]. 中国新药杂志, 2021, 30(23): 2203-2209.

[17] 赵望, 孙毅, 曾同祥. 大蜡螟作为病原真菌动物实验模型的相关研究[J]. 中国真菌学杂志, 2020, 15(4): 248-252.

[18] SERRANO I, VERDIAL C, TAVARES L, et al. The virulent *galleria mellonella* model for scientific experimentation[J]. ANTIBIOTICS(Basel), 2023, 12(3): 505.

[19] IIMURA Y, ISHIKAWA H, YAMAMOTO K, et al. Hemagglutinating properties of apolipoprotein III from the hemolymph of *galleria mellonella* larvae[J]. Arch Insect Biochem Physiol, 1998, 38(3): 119-125.

[20] CHOBY J E, HOWARD-ANDERSON J, WEISS D S. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*-clinical and molecular perspectives[J]. J Intern Med, 2020, 287(3): 283-300.

[21] RUSSO TA, MACDONALD U. The *galleria mellonella* infection model does not accurately differentiate between hypervirulent and classical *Klebsiella pneumoniae* [J]. mSphere, 2020, 5(1): e00850-19.

[22] INSUA J L, LLOBET E, MORANTA D, et al. Modeling *Klebsiella pneumoniae* pathogenesis by infection of the wax moth *galleria mellonella*[J]. Infect Immun, 2013, 81(10): 3552-3565.

[23] 汤怡颖, 胡仁静. 大蜡螟感染模型在肺炎克雷伯菌毒力研究中的应用[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2018, 38(8): 611-615.

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.20.023

锥体束 CT 联合 MMP-2 对义齿修复患者颞下颌 关节骨关节病的诊断价值*

宿 静¹, 杜艳锋², 董文博²

河北省邯郸市口腔医院:1. 牙体牙髓科;2. 修复科, 河北邯郸 056000

摘 要:目的 分析锥体束 CT 联合颞下颌关节滑液中基质金属蛋白酶 2(MMP-2)水平检测对义齿修复患者颞下颌关节骨关节病的诊断价值。**方法** 选取 2019 年 2 月至 2021 年 2 月在该院经固定义齿修复后出现颞下颌关节骨关节病的患者 51 例作为研究组。另选取同期 55 例固定义齿修复后无颞下颌关节骨关节病者作为对照组。对两组研究对象颞下颌关节进行锥体束 CT 检测,判定锥体束 CT 检测与临床诊断的一致性,并测定研究对象髁突高;收集研究对象颞下颌关节滑液检测 MMP-2 水平,采用受试者工作特征(ROC)曲线分析颞下颌关节滑液 MMP-2 水平对义齿修复后颞下颌关节骨关节病的诊断价值;分析锥体束 CT、MMP-2 联合检测诊断义齿修复后颞下颌关节骨关节病与临床诊断的一致性。**结果** 锥形束 CT 检测出颞下颌关节骨关节病者 53 例,未患颞下颌关节骨关节病者 53 例,其中假阳性 11 例,假阴性 9 例。锥形束 CT 检测与诊断一致性较好($Kappa=0.623, P<0.05$)。与对照组比较,研究组颞下颌关节髁突高降低 $[(13.26\pm2.35)\mu\text{g/L vs. } (16.33\pm2.87)\mu\text{g/L}]$,差异有统计学意义($P<0.05$)。与对照组比较,研究组颞下颌关节滑液中 MMP-2 水平升高 $[(38.57\pm6.22)\mu\text{g/L vs. } (21.53\pm4.03)\mu\text{g/L}]$,差异有统计学意义($P<0.05$)。ROC 曲线分析结果显示,颞下颌关节滑液 MMP-2 水平诊断颞下颌关节骨关节病的曲线下面积为 0.791,灵敏度为 74.5%,特异度为 78.2%,最佳截断值为 29.073 $\mu\text{g/L}$ 。颞下颌关节滑液 MMP-2 水平诊断颞下颌关节骨关节病 50 例,未发生颞下颌关节骨关节病 56 例,与临床诊断一致性较好($Kappa=0.527, P<0.05$),诊断灵敏度、特异度分别为 74.5%、78.2%。二者联合检测义齿修复患者发生颞下颌关节骨关节病 63 例,未发生颞下颌关节骨关节病 43 例,与临床诊断一致性较好($Kappa=0.738, P<0.05$),诊断灵敏度、特异度分别为 98.0%、76.4%。与锥体束 CT、MMP-2 相比,联合检测诊断灵敏度更高,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 义齿修复后发生颞下颌关节骨关节病患者颞下颌关节滑液 MMP-2 水平升高,锥体束 CT 联合颞下颌关节滑液中 MMP-2 水平检测对义齿修复患者颞下颌关节骨关节病的诊断与临床诊断具有较高一致性。

关键词:锥体束 CT; 颞下颌关节滑液; 基质金属蛋白酶 2; 义齿修复; 颞下颌关节骨关节病

中图分类号:R782.6;R445.2

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2024)20-3059-05

Diagnostic value of cone beam CT combined with MMP-2 in temporomandibular joint osteoarthritis in patients with denture restoration*

SU Jing¹, DU Yanfeng², DONG Wenbo²

1. Department of Endodontics; 2. Department of Prosthetics, Handan Stomatological
Hospital, Handan, Hebei 056000, China

Abstract: **Objective** To analyze the diagnostic value of cone beam CT combined with detection of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in temporomandibular joint synovial fluid for temporomandibular joint osteoarthritis in patients with denture restoration. **Methods** A total of 51 patients with temporomandibular joint osteoarthritis after fixed denture restoration in this hospital from February 2019 to February 2021 were selected as the study group. A total of 55 patients without temporomandibular joint osteoarthritis after fixed denture restoration were selected as the control group. The cone beam CT examination of temporomandibular joint was performed in the two groups to determine the consistency between cone beam CT examination and clinical diagnosis, and the condylar height was measured. The level of MMP-2 in synovial fluid was detected. The receiver operating characteristic (ROC) curve was used to analyze the diagnostic value of MMP-2 level in synovial fluid for temporomandibular joint osteoarthritis after denture restoration. To analyze the consistency between the combined detection of cone beam CT and MMP-2 and clinical diagnosis of temporomandibular

* 基金项目:河北省医学科学研究重点课题计划项目(20191818)。

作者简介:宿静,女,主治医师,主要从事 CBCT 在牙体牙髓、颞下颌关节等疾病的应用方面的研究。