

• 论 著 •

儿童肺炎支原体 23S rRNA 基因位点突变检测分析^{*}

潘 芬, 孟磊俊, 秦惠宏, 张天栋, 石迎迎, 张 涛[△]

(上海市儿童医院/上海交通大学附属儿童医院检验科 200040)

摘要:目的 了解儿童肺炎支原体(MP)大环内酯类耐药基因(23S rRNA)位点突变,以及与临床资料的相关性。方法 收集该院 354 份肺炎患儿的呼吸道标本,采用实时荧光定量 PCR 法检测 MP 及 23S rRNA 位点突变(A2063G 或/和 A2064G)情况,并将 MP 阳性患儿分成位点突变组和未突变组,比较两组之间的临床资料。结果 354 份呼吸道标本中,166 份检测为 MP 阳性(46.9%),且 135 份 MP 阳性标本中存在 23S rRNA 基因位点突变(阳性检出率 81.3%),31 份未检测到 23S rRNA 基因位点突变。分析突变组和非突变组的临床资料发现两组在年龄和性别方面比较差异无统计学意义($P>0.05$),但突变组的重症肺炎和肺外并发症发生率高于未突变组($P<0.05$),且平均住院时间和平均发热时间均较未突变组长($P<0.05$)。结论 MP 23S rRNA 基因位点突变的较高检出率提示 MP 对大环内酯类耐药率较高,这为临床 MP 的感染、治疗提供一定的参考依据。

关键词:肺炎支原体; 23S rRNA; 耐药基因; 临床资料

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.06.014

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)06-0760-03

Analysis of mutations detection in 23S rRNA gene locus of *Mycoplasma pneumoniae* among children^{*}

PAN Fen, MENG Leijun, QIN Huihong, ZHANG Tiandong, SHI Yingying, ZHANG Hong[△]

(Department of Clinical Laboratory, Shanghai Municipal Children's Hospital / Affiliated Children's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200040, China)

Abstract:Objective To understand the mutations of macrolide resistance gene locus (23S rRNA) of *Mycoplasma pneumoniae* (MP) and its correlation with clinical features. Methods A total of 354 respiratory tract samples were collected from children patients with pneumonia. MP and its mutations in 23S rRNA gene locus were detected by real-time PCR. The children cases of MP positive were divided into the mutation group and non-mutation group. Then the clinical data were compared between the two groups. Results Among 354 respiratory tract samples, 166 cases(46.9%) were MP positive, moreover the mutation of 23S rRNA gene locus existed in 135 MP positive samples with the positive detection rate of 81.3%, while no 23S rRNA gene locus mutations were detected in 31 samples. Analyzing the clinical data of the mutation group and non-mutation group found that there was no statistical difference in the aspects of age and gender between the two groups. The occurrence rates of severe pneumonia and extrapulmonary complications in the mutation group were higher than those in the non-mutation group ($P<0.05$), moreover the average hospitalization time and fever duration in the mutation group were longer than those in the non-mutation group ($P<0.05$). Conclusion 23S rRNA gene locus mutation has higher detection rate, prompting that MP shows high resistant rate to macrolides, which could provide a certain basis for treatment of MP infections.

Key words: *Mycoplasma pneumoniae*; 23S rRNA; drug-resistance gene; clinical data

肺炎支原体(MP)是社区获得性肺炎的常见病原菌之一,多见于儿童与青少年。由于无细胞壁且对作用于细胞壁的抗菌药物无效,使得大环内酯类(红霉素、阿奇霉素等)成为治疗 MP 感染的首选药物。然而随着抗菌药物的广泛应用,国内外已不断出现了耐大环内酯类 MP 菌株^[1-2]。目前 MP 对大环内酯类抗菌药物耐药机制的研究热点主要是抗菌药物作用靶位改变,尤其是 23S rRNA 基因位点的改变(2063、2064 位点多见)^[3]。因此,本研究采用荧光 PCR 技术检测儿童 MP 菌株的大环内酯类耐药基因 23S rRNA 的 2063 或/和 2064 位点突变改变,并分析该耐药基因位点突变与患儿临床资料的相关性,为临床 MP 感染治疗提供一定的理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院 2016 年 4 月 1 日至 2016 年 6 月 30 日疑似 MP 感染 354 例患儿的 354 份呼吸道样本(233 份咽拭子和 121 份肺泡灌洗液),其中男 194 例,女 160 例,年龄为 0~

14 岁,肺炎诊断均符合《诸福棠实用儿科学》第 8 版诊断标准^[4]。

1.2 仪器与试剂 通用型 DNA 提取试剂盒、肺炎支原体核酸及耐药突变位点检测试剂盒(江苏默乐生物科技有限公司), ABI7500 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司),严格按照仪器和试剂说明书进行操作。

1.3 方法

1.3.1 DNA 模板的制备 采用热裂解法对呼吸道样本进行操作。(1)咽拭子:加入 2 mL 左右的无菌生理盐水,反复挤压振荡混匀后,13 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,向沉淀中加入 50 μLDNA 裂解液和 5 μL 的内标基因,振荡混匀,100 ℃恒温处理 10 min,13 000 r/min 离心 2 min,上清液用于 DNA 扩增;(2)肺泡灌洗液:13 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,向沉淀中加入 50 μLDNA 裂解液和 5 μL 的内标基因,振荡混匀,100 ℃恒温处理 10 min,13 000 r/min 离心 2 min,上清液用于

* 基金项目:上海市卫计委重要薄弱学科建设项目(2015ZB0203);上海市卫计委青年基金项目(20154Y0150)。

作者简介:潘芬,女,技师,主要从事细菌分子流行病学研究。 △ 通信作者,E-mail:zhanghong3010@126.com。

DNA 扩增。

1.3.2 DNA 扩增 反应体系为 25 μL, 其中检测混合液 19.5 μL, 酶 0.5 μL, DNA 模板 5 μL。同时设置 1 个质控品 W、1 个反应阴性对照、1 个弱阳性质控品和 1 个强阳性质控品。荧光 PCR 扩增参数: 50 °C 2 min; 95 °C 2 min; 91 °C 15 min, 64 °C 1 min, 40 个循环。荧光信号收集定为 FAM(2063 或 2064 位点

A-G 突变)、VIC(肺炎支原体)、CY5(内标)。

1.3.3 结果判定 荧光定量 PCR 的结果以 Ct 值显示, 根据阴性质控品所得数据进行分析并调节基线, 同时内标的 Ct 值应≤35。2063 或 2064 位点突变采用 FAM 荧光指示, 肺炎支原体采用 VIC 荧光指示, 结果判定标准见表 1。

表 1 荧光 PCR 仪检测 MP 核酸及耐药突变位点结果判读标准

待检样本的荧光 PCR 结果		鉴定结果
2063 或 2064 位点突变	肺炎支原体	
Ct≥35.33	Ct<35.01	肺炎支原体阳性, 未发生 A2063G 或 A2064G 耐药突变
Ct<35.33	Ct<35.01	肺炎支原体阳性, 发生 A2063G 或/和 A2064G 耐药突变
Ct≥35.33	Ct≥35.01	阴性
无 S 曲线	无 S 曲线	阴性

1.4 临床资料统计 收集 MP 阳性的患者临床资料, 包括性别、年龄、平均住院时间、疾病诊断、实验室检查和转归等。

1.5 统计学处理 使用 SPSS19.0 软件进行统计学分析; 计数资料以百分数表示, 组间比较采用 χ^2 检验; 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 经方差齐性检验后, 采用 t 检验比较两组间差异; $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 MP 的检测 354 份呼吸道样本中, 166 份 PCR 检测为阳性, 总体阳性率为 46.9%, 其中男孩阳性率 44.3% (86/194), 女孩阳性率 50.0% (80/160)。不同年龄层均可检测 MP, 其中, <1 岁婴儿期患儿占阳性例数的 7.8% (13 例), 1~2 岁幼儿期患儿占 14.5% (24 例), 3~5 岁学龄前期占 34.9% (58 例), 6~14 岁儿童占 42.8% (71 例), 表明大于等于 3 岁患儿阳性率明显高于其他年龄组 ($P < 0.05$)。比较不同样本类型 MP 阳性率发现: 肺泡灌洗液标本 MP 阳性明显高于咽拭子标本 (76.9% vs. 31.3%), 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.2 MP 耐药位点检测结果 166 份 MP 阳性标本中, 检出 135 份样本中存在 23S rRNA 点突变 (A2063G 或/和 A2064G) (阳性率为 81.3%), 31 份未检测到 23S rRNA 基因位点突变。比较不同样本类型 MP 耐药位点突变阳性率发现两者并无明显差异 ($P > 0.05$) (见表 2)。MP 阴性样本中未检测到 23S rRNA 点突变 (A2063G 或/和 A2064G)。

2.3 临床资料的比较 收集 166 例 MP 阳性的患儿临床资料, 根据是否发生耐药位点突变分成 23S rRNA 基因突变组和未突变组, 分析一般资料发现两组在年龄和性别方面均无统计学差异 ($P > 0.05$)。突变组 42 例患儿中诊断为重症肺炎 55 例, 肺外并发症 42 例, 其中消化系统记忆并正指征 (肝功能损伤 ALT、AST 增高和腹泻) 17 例, 心血管系统 (心脏损伤心肌酶谱和心电图改变) 11 例, 皮疹 10 例, 血液系统 2 例, 泌尿系统 1 例, 肝脏损伤伴皮疹 1 例。未突变组 31 例患儿中诊断为重症肺炎有 6 例, 肺外并发症 4 例, 均为消化系统 (肝功能损伤 ALT、AST 增高)。突变组重症 MP 肺炎和肺外并发症发生率高于未突变组 ($P < 0.05$)。此外, 突变组的平均住院时间和平均发热时间均较未突变组长, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 2 354 份呼吸道样本荧光 PCR 检测结果分析

样本类型	n	MP 阳性	MP 阴性	23S rRNA	23S rRNA
		(n)	率(%)	点突变(n)	点突变率(%)
咽拭子	233	73	31.3*	55	75.3△
肺泡灌洗液	121	93	76.9	80	86.0
总数	354	166	46.9	135	81.3

注: 与肺泡灌洗液比较, * $\chi^2 = 66.291, P < 0.05$; △ $\chi^2 = 3.071, P > 0.05$ 。

表 3 突变组和未突变组 MP 感染患儿的临床资料比较

项目	突变组 (n=135)	未突变组 (n=31)	t/χ ²	P
年龄(岁)	4.72±2.86	5.15±2.15	0.796	0.427
性别(n)	男 72 女 63	14 17	0.674	0.412
重症 MP 肺炎	例数(n) 55 百分比(%) 40.7	6 19.5	4.961	0.026
肺外并发症	例数(n) 42 百分比(%) 31.1	4 12.9	4.172	0.041
平均住院时间(d)	8.94±3.45	7.39±2.38	2.378	0.019
平均发热时间(d)	7.34±3.73	5.45±3.59	2.560	0.011

3 讨 论

MP 感染在全球范围内均有发生,感染率为 9.6%~66.7%^[5-6]。由于 MP 难培养、培养阳性率低等原因,使得荧光 PCR 技术成为了早期检测 MP 的主要技术,并在临幊上广泛开展。本研究结果显示:本院荧光 PCR 技术检测 MP 总阳性率为 46.9%,与国内文献报道阳性检出率基本一致^[7]。另外,分析不同标本类型的 MP 阳性率,显示肺泡灌洗液标本 MP 阳性明显高于咽拭子标本,考虑可能与肺泡灌洗液直接取自病灶处支气管有关^[8],而咽拭子标本采样更容易受技术人员操作熟练程度等方面影响。因此,可推荐肺泡灌洗液作为荧光 PCR 检测的标本,对 MP 感染的诊断更具有一定意义。

一般上,大环内酯类抗菌药物作为儿童 MP 感染首选药物,作用机制是其通过抑制细菌蛋白质的合成而发挥抑菌作用。近年来,耐大环内酯类 MP 菌株逐渐增加,对耐药机制的探讨成为当前的研究热点,其耐药机制主要包括:(1)药物作用靶位改变(主要为 23S rRNA 基因突变);(2)药物主动外排机制;(3)药物灭活,其中药物靶位改变是最主要的耐药机制^[9]。

核糖体 50S 亚单位 23S rRNA 结构域 V 区是大环内酯类抗菌药物的结合位点,若该区域核苷酸突变可引起抗菌药物与核糖体亲和力下降,从而使 MP 产生耐药性,目前已发现突变位点主要有 2063、2064、2067、2617 等。而国内文献报道主要以 2063 和 2064 突变位点多见,Xin 等^[10]报道了北京地区 50 株菌株中,40 株为 A2063G 位点突变,5 株为 A2064G 位点,1 株为 A2063C,突变率达到 92.0%;张泓等^[11]报道了上海地区 112 株 MP 菌株中,98 株耐药株均存在 23S rRNA 的 A2063G 或 A2064G 位点突变,突变率达 87.5%。本研究只针对上述两个位点进行分析,发现 A2063G 或/和 A2064G 位点的突变率达到 80% 以上,与上述文献报道基本一致。同时耐药位点突变检测阳性可提示该 MP 菌株对大环内酯类抗菌药物耐药,提示临床医生在选择和使用大环内酯类抗菌药物时应多加考虑。

随着耐药菌株的不断出现,临幊上 MP 感染治疗面临着严峻的挑战。MP 感染除了引起严重的肺部症状外,还累及多个脏器,引起其严重的肺外症状。Vervloet 等^[12]研究发现,MP 感染时肺外损害发生率高达 20%~50%,其中以血液系统受累最常见,其次是胃肠道、皮肤、骨关节肌肉、中枢神经系统等。国内张立等^[13]报道了 MP 感染时肺外并发症主要以消化系统受累为主。本研究对 166 例 MP 阳性患儿的临床资料进行分析,结果显示肺外症状发生率为 27.7%,主要以消化系统为多见,同时突变组的临床症状较未突变组严重,且更易出现肺外症状,发展为重症 MP 肺炎。此外,由于 MP 菌株突变组较非突变组在治疗上更具有难治性,且临床治疗与抗菌药物的使用剂量、疗程长短和患者的临床治疗反应等密切相关,导致突变组的患儿较非突变组病程延长,住院时间更长。

综上所述,MP 感染率可引起严重肺部及肺外疾病,而且 MP 标本中 23S rRNA 基因位点突变有较高的检出率,提示 MP 对大环内酯类抗菌药物耐药率较高,需要引起重视。因此,采用实时荧光定量 PCR 技术检测 MP 23S rRNA 基因位点改变,对 MP 抗菌药物的选择和使用具有一定的指导意义。

参考文献

[1] Liu Y, Ye XY, Zhang H, et al. Antimicrobial susceptibility

of *Mycoplasma pneumoniae* isolates and molecular analysis of macrolide-resistant strains from Shanghai, China [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(5): 2160-2162.

- [2] Diaz MH, Benitez AJ, Winchell JM. Investigations of *mycoplasma pneumoniae* infections in the United States: trends in molecular typing and macrolide resistance from 2006 to 2013[J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(1): 124-130.
- [3] Yoo SJ, Kim HB, Choi SH, et al. Differences in the frequency of 23S rRNA gene mutations in *Mycoplasma pneumoniae* between children and adults with community-acquired pneumonia: clinical impact of mutations conferring macrolide resistance [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(12): 6393-6396.
- [4] 江载芳,申昆玲,沈颖. 诸福棠实用儿科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2015:1280-1282.
- [5] Chalker V, Stocki T, Mentasti M, et al. Increased incidence of *Mycoplasma pneumoniae* infection in England and Wales in 2010: multiocus variable number tandem repeat analysis typing and macrolide susceptibility[J]. *Eur Surveill*, 2011, 16(19): 19865.
- [6] Sur G, Kudor-Szabadi L, Vidrean V, et al. Etiology of pneumonia in children in the absence of pneumococcal and antihaemophilus vaccines[J]. *Roum Arch Microbiol Immunol*, 2012, 71(1): 48-52.
- [7] 胡文娟,郭东星,王红,等. 实时定量 PCR 检测肺炎支原体方法的建立及临床应用[J]. 国际儿科学杂志,2015,42(5):570-574.
- [8] 杨文青,吕晓丽,李锐成,等. 实时荧光定量 PCR 检测肺炎支原体 DNA 在小儿肺炎诊断中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(4):416-418.
- [9] 潘芬,张泓. 肺炎支原体耐药性及分子流行病学研究进展[J]. 上海交通大学学报(医学版),2014,34(8):1248-1253.
- [10] Xin DL, Mi ZH, Han X, et al. Molecular mechanisms of macrolide resistance in clinical isolates of mycoplasma pneumoniae from China[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(5): 2158-2159.
- [11] 张泓,叶信予,徐晓刚,等. 儿童呼吸道分离肺炎支原体药物敏感性分析[J]. 中国感染与化疗杂志,2015(1):63-66.
- [12] Vervloet LA, Marguet C, Camargos PA. Infection by *Mycoplasma pneumoniae* and its importance as an etiological agent in childhood community-acquired pneumonias[J]. *Braz J Infect Dis*, 2007, 11(5): 507-514.
- [13] 张立,陈志敏,沈征,等. 浙江省儿童鼻咽吸出物标本肺炎支原体基因分型研究[J]. 中华儿科杂志,2011,49(10):750-754.

(收稿日期:2016-10-19 修回日期:2017-01-21)