

• 论 著 •

肺炎支原体对红霉素体外耐药性与耐药基因相关性研究*

刘 艳,黄泽智,蒙松年,唐翠连
(邵阳医学高等专科学校医学检验系,湖南邵阳 422000)

摘 要:目的 探讨肺炎支原体(Mp)对红霉素耐药与耐药基因之间的关系。方法 通过对 46 株红霉素耐药 Mp 临床分离株的 23S rRNA V 区进行聚合酶链反应(PCR)扩增,并将扩增产物进行基因测序,确定其基因型。结果 46 株红霉素耐药 Mp 临床分离株中有 44 株(95.65%)发生 A2063G 突变,2 株(4.35%)A2064G 突变,未见 A2063C 和 C2617G/A 位点突变。结论 Mp 临床分离株对红霉素耐药与 23S rRNA V 区基因 2063、2064 位点 A→G 突变有密切关系,其中最主要的突变是 A2063G 突变。快速、准确识别 Mp 的 23S rRNA V 区基因突变可在诊断的同时给出耐药信息,有效指导临床合理用药。

关键词:肺炎支原体; 红霉素; 耐药基因; 23S rRNA; 点突变
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.02.002 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2017)02-0148-03

Study on the relationship between erythromycin sensitivity and drug-resistance gene in *Mycoplasma pneumoniae**
LIU Yan, HUANG Zezhi, MENG Songnian, TANG Cuilian
(Department of Medical Laboratory, Shaoyang Medical College, Shaoyang, Hunan 422000, China)

Abstract: Objective To study the relationship between erythromycin sensitivity and drug-resistance gene in *Mycoplasma pneumoniae*(Mp). **Methods** In 46 erythromycin-resistant MP clinical isolates, domain V of 23S rRNA was amplified by polymerase chain reaction(PCR), followed by direct automatic sequencing method. The DNA sequences were compared to find molecular mechanisms of drug resistance. **Results** Among the 46 erythromycin-resistant Mp clinical isolates, 44(95.65%) harbored an A-to-G transition mutation at position 2063 in the 23S rRNA gene and 2(4.35%) harbored an A-to-G transition mutation at position 2064, but no A-to-C transition mutation at position 2063 and C-to-G/A transition mutation at position 2617 were detected. **Conclusion** Erythromycin-resistant of Mp clinical isolates were closely related to A-to-G transition mutation at position 2063/2064 in domain V of 23S rRNA genes and the most important was the A2063G transition mutation. Rapid and accurate identification of the genetic mutations in domain V of 23S rRNA may be help to diagnose the infection of *Mycoplasma pneumoniae*, provide the drug-resistant information, and instruct the application of antibiotics reasonably and effectively.

Key words: *Mycoplasma pneumoniae*; erythromycin; drug-resistance gene; 23S ribosomal RNA; point mutations

肺炎支原体(Mp)是社区获得性肺炎(CAP)最主要的病原体之一,经呼吸道飞沫传播,四季均可发病,流行高峰季节不一^[1-2]。在儿童和青少年中,10%~30%的 CAP 是由 Mp 感染所致,流行期间可达 40%~50%^[3]。Mp 没有细胞壁,故对作用于细胞壁的抗菌药物如青霉素类、头孢菌素类不敏感,对大环内酯类、四环素类、氨基糖苷类及喹诺酮类抗菌药物敏感。但是由于四环素类、氨基糖苷类及喹诺酮类药物会影响儿童的生长发育,因此 5 岁以内的儿童一般不能使用这三类药物。大环内酯类药物如红霉素、罗红霉素、泰利霉素(14 元环)、阿奇霉素(15 元环)、交沙霉素(16 元环)等通过抑制蛋白质的合成而发挥抗菌作用,是目前儿科治疗 MP 感染的首选药物。

小儿感染 Mp 后若治疗不及时、不彻底可反复发作,从而导致疾病迁延不愈,甚至可引起严重的肺外并发症。近年 Mp 对大环内酯类抗菌药物的耐药越来越严重,多国均分离出耐大环内酯类抗菌药物的 Mp 株,其中德国约 2.0%^[4],法国约 3.6%^[5],美国约 7.0%^[6],日本约 10.9%^[7],而我国 70.0%以上 MP 分离株对大环内酯类抗菌药物耐药^[8]。目前,Mp 耐药机制的研究仅发现了作用靶位基因突变,即由于 23S rRNA 与抗菌药物直接结合的碱基点突变导致抗菌药物与核糖体亲和力下降而引起耐药,临床上分离出的 Mp 耐药株未检测到 23S

rRNA II 区和核糖体蛋白 L4、L22 的突变(在体外用抗菌药物诱导偶有突变),耐药 Mp 株的突变出现在 23S rRNA V 区,表现为 2063、2064 和 2617 位的碱基点突变^[9-12]。本研究通过对 46 株耐红霉素 Mp 的 23S rRNA V 区进行 PCR 扩增,并将扩增产物进行基因测序,以了解对红霉素耐药的 Mp 株与 23S rRNA V 区 2063、2064 和 2617 位的碱基点突变之间的关系。

1 材料与方法

1.1 标本来源 选取 2012 年 10 月至 2014 年 7 月邵阳地区三级以上医院急性呼吸道感染患儿共 4 276 例,年龄 1 个月至 14 岁,病程 7 d 内。其中,男 1 946 例,女 2 330 例,男、女比例 0.84 : 1。入院当天,收集患儿呼吸道咽拭子标本,分别用 Mp 快速鉴定培养法进行 Mp 培养检测。对 Mp 快速鉴定培养结果为阳性(培养 24 h 后,培养基由原来的红色变成清亮的淡黄色则为阳性)的标本进行纯培养,共获得 50 例生长良好的 Mp 株,培养物经 PCR 鉴定证实为 Mp。对这些 Mp 临床分离株进行 5 种抗菌药物(红霉素、阿奇霉素、交沙霉素、吉他霉素和克拉霉素)敏感试验,最终获得 46 株耐红霉素 Mp 临床分离株,冷冻保存,备用。Mp 快速鉴定培养基由陕西百盛园生物科技有限公司提供;药敏试剂盒由北京天坛药物生物技术开发公司提供;Mp 标准株 M129 由南华大学病原生物学研究所馈

* 基金项目:湖南省高等学校科学研究优秀青年基金资助项目(14B164)。
作者简介:刘艳,女,讲师,主要从事医学检验教学和实验室方面的研究。

赠。所有的操作均严格按照试剂盒的要求进行,并进行质量控制。按照美国临床实验室标准化协会(CLSI,原 NCCLS)2012 年规定的标准判定临床分离株的敏感性(或 MIC 值大于或等于标准敏感株 MIC 值 4 倍者则视为耐药株)。

1.2 方法 采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒从培养的 Mp 临床株中抽提基因组 DNA,经 PCR 扩增,将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,按照 OMEGA 公司生产的 PCR 产物纯化试剂盒对扩增的 PCR 产物进行纯化,将纯化的 PCR 产物送上海生工测序,用 BLAST 软件分析序列,检查突变。

1.2.1 抽提 Mp 临床分离株基因组 DNA 将冷冻保存的 Mp 临床分离株取出进行传代复苏。待生长时间比较稳定(约 7 d)

后,吸取 20 μ L 菌液加入到 1.5 mL 的离心管中,以 13 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,再加标本处理液 200 μ L,混匀,100 $^{\circ}$ C 的沸水中水浴 10 min,此液作为 DNA 模板备用。

1.2.2 PCR 扩增目的基因片段及 DNA 测序 参考文献[13]报道的扩增 23S rRNA V 区的引物序列,由上海生工合成,引物序列见表 1。反应体系为:双蒸水 8.5 μ L,2 $\times$ PCR Mix 12.5 μ L,上、下游引物各 1 μ L,DNA 模板 2 μ L。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min 后,开始 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min、65 $^{\circ}$ C 退火 45 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s 的 PCR 循环,共 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 终止反应。对扩增的产物进行琼脂糖凝胶电泳,检测其是否有目的片段,并对阳性产物进行纯化,送上海生工测序。

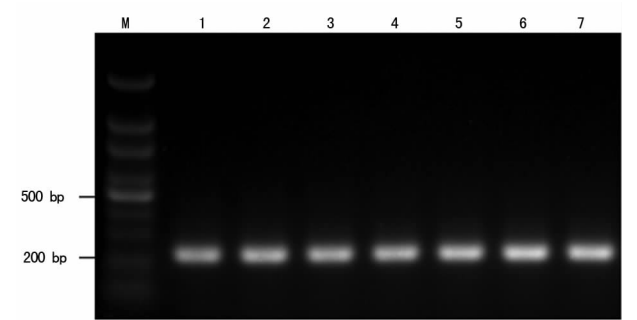
表 1 PCR 扩增 23S rRNA V 区的引物

引物名称	序列(5'~3')	扩增片段(bp)
23S rRNA V 区 2063/2064 基因	上游引物:ACTATAACGGTCCTAAGGTA	210
	下游引物:TTATCATGTAGAGAATAGGT	
23S rRNA V 区 2617 基因	上游引物:CGGAGGCGTACAAAGGT	496
	下游引物:CATCTAAGTGTGAAACTAT	

1.2.3 利用 BLAST 软件将测序结果与 GenBank 上所收录的编码序列进行比较分析。

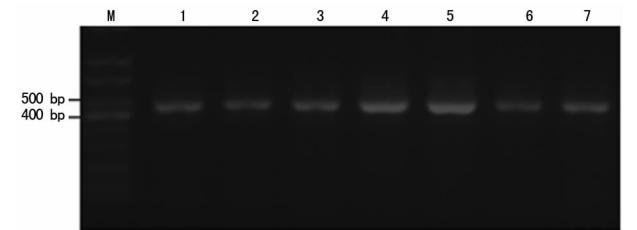
2 结 果

2.1 PCR 扩增结果 46 株耐红霉素 Mp 临床分离株及 Mp 标准株 M129 用 23S rRNA V 区 2063/2064 基因的引物和 2617 基因的引物分别行 PCR 扩增,全部出现目的条带(210 和 496 bp),见图 1、2。



注:M 表示相对分子质量标准;1 表示 M129 株(敏感对照株);2~7 表示临床分离 Mp 株。

图 1 部分 PCR 扩增 23S rRNA V 区 2063/2064 基因结果



注:M 表示相对分子质量标准;1 表示 M129 株(敏感对照株);2~7 表示临床分离 Mp 株。

图 2 部分 PCR 扩增 23S rRNA V 区 2617 基因结果

2.2 PCR 扩增产物的测序结果及 BLAST 比对 将 PCR 扩增产物送上海生工进行测序,用 BLAST 软件将测序结果与 GenBank 上所收录的编码序列进行比较分析,结果显示 46 株耐红霉素 Mp 株中有 44 株发生了 A2063G 突变(95.65%),2

株发生了 A2064G 突变(4.35%),未发现 A2063C 和 2617 位点的突变。发生 A2063G 突变的耐红霉素 Mp 株测序结果见图 3,BLAST 分析比对见图 4。

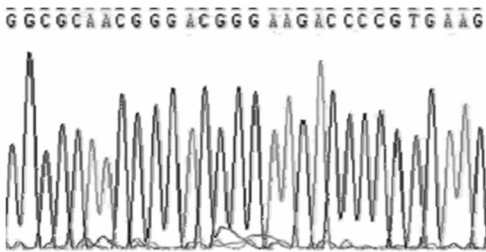


图 3 耐红霉素 Mp 株测序结果(A2063G 突变)



图 4 耐红霉素 Mp 株测序结果 BLAST 分析比对

3 讨 论

Mp 是儿童急性呼吸道感染的重要病原体之一,自然界中广泛存在。由 Mp 引发的肺炎及各种肺外并发症,对儿童健康危害非常大。临床上治疗儿童 Mp 感染的一线药物是大环内酯类抗菌药物,其中红霉素及其衍生物最为常用,但近年来的研究发现,大环内酯类抗菌药物耐药的 Mp 株日趋增多,使临床治疗 Mp 感染疗程长、疗效差[9]。临床使用大环内酯类抗菌药物治疗 Mp 感染前,应进行药物敏感试验。由于 Mp 营养要求高、生长缓慢,分离培养阳性率低,初次分离培养需 10~30 d,药敏试验还需 5~7 d,因此,Mp 的常规药敏试验不能及时、合理指导临床用药。因此,作者通过检测 Mp 的耐药基因是否发生突变来判断 Mp 是否耐药,以期提高实验室诊断效率,从而更好地指导临床。

研究表明,Mp 对大环内酯类抗菌药物耐药主要是与核糖体 23S rRNA 核苷酸点突变有关,其中 A2063G 突变可导致 14 元环和 15 元环大环内酯类抗菌药物高度耐药,而 16 元环大环内酯类抗菌药物的耐药水平较低[13];A2064G 突变则可引起 14 元环和 16 元环大环内酯类抗菌药物耐药,而 15 元环大环

内酯类药物耐药水平较低^[14]。临床上,由于纳入研究的患儿多数就诊前曾不同程度地服用过大环内酯类抗菌药物,可能产生了诱导耐药,或大环内酯类抗菌药物抑制了 Mp 敏感株的生长^[1]。本次研究发现,对红霉素耐药的 Mp 临床株中有 44 株发生了 A2063G 突变(95.65%),2 株发生了 A2064G 突变(4.35%),但未发现 A2063C 和 2617 位点的突变。这与 Lucier 等^[15]在体外诱导红霉素耐药试验中发现的一致。由此可见,耐红霉素 Mp 临床株的出现与 23S rRNA V 区 2063、2064 位点发生突变密切相关,尤其是 A2063G 突变。

目前,Mp 对大环内酯类抗菌药物的耐药机制中未发现灭活酶和药物主动外排系统,仅发现 23S rRNA 基因 A2063G/C、A2064G、C2617G/A 的突变导致抗菌药物与核糖体亲和力下降而引起耐药^[3,16]。因此,可通过检测 Mp 的 23S rRNA 基因反映其对红霉素等大环内酯类抗菌药物的药物敏感度。本研究发现,Mp 临床分离株对红霉素耐药与 23S rRNA V 区基因 2063、2064 位点 A→G 突变有密切关系,23S rRNA 突变的识别以及 Mp 临床株耐药基因的分型分析可进一步地加强对临床上大环内酯类抗菌药物或其他种类的抗菌药物耐药 Mp 的理解。快速、准确识别 Mp 的 23S rRNA 基因突变可在诊断的同时给出耐药信息,有效指导临床合理用药治疗 Mp 感染。

Mp 的耐药对人类身体健康造成了严重危害,应引起临床医生的关注,感染 Mp 的患儿治疗时进行连续耐药 Mp 的监测,对了解 Mp 的感染规律,制订出相应的防控措施非常有必要。本次研究检测基因突变所采用的方法为基因测序,该方法准确率高,操作复杂且需要特殊仪器(如测序仪等),检测成本较昂贵,不利于临床的应用和推广。因此,应寻找 1 种能快速检测 Mp 药物敏感度的方法,从而有效指导临床(尤其是儿科)合理用药治疗 Mp 感染。

参考文献

- [1] Principi N, Esposito S. Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*; its role in respiratory infection[J]. J Antimicrob Chemother, 2013, 68(3): 506-511.
- [2] 叶英. 左氧氟沙星在重症社区获得性肺炎患者中的药物动力学研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2013, 18(6): 661-668.
- [3] Morozumi M, Takahashi T, Ubukata K. Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*; characteristics of isolates and clinical aspects of community-acquired pneumonia[J]. J Infect Chemother, 2010, 16(2): 78-86.
- [4] Bébear C, Pereyre S, Peuchant O. *Mycoplasma pneumoniae*; susceptibility and resistance to antibiotics[J]. Future Microbiol, 2011, 6(4): 423-431.
- [5] Peuchant O, Ménard A, Renaudin H, et al. Increased macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in France directly detected in clinical specimens by real-time PCR and melting curve analysis [J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 64(1): 52-58.
- [6] Li X, Atkinson TP, Hagood J, et al. Emerging macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* in children; detection and characterization of resistant isolates[J]. Pediatr Infect Dis J, 2009, 28(8): 693-696.
- [7] Morozumi M, Iwata S, Hasegawa K, et al. Increased macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in pediatric patients with community-acquired pneumonia[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(1): 348-350.
- [8] Cao B, Zhao CJ, Yin YD, et al. High prevalence of macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* isolates from adult and adolescent patients with respiratory tract infection in China[J]. Clin Infect Dis, 2010, 51(2): 189-194.
- [9] Chan KH, To KK, Chan BW, et al. Comparison of pyrosequencing, Sanger sequencing, and melting curve analysis for detection of low-frequency macrolide-resistant *mycoplasma pneumoniae* quaspecies in respiratory specimens [J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(8): 2592-2598.
- [10] Tian XJ, Dong YQ, Dong XP, et al. P1 gene of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical isolates collected in Beijing in 2010 and relationship between genotyping and macrolide resistance[J]. Chin Med J (Engl), 2013, 126(20): 3944-3948.
- [11] Zhao F, Lv M, Tao X, et al. Antibiotic sensitivity of 40 *Mycoplasma pneumoniae* isolates and molecular analysis of macrolide-resistant isolates from Beijing, China[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(2): 1108-1109.
- [12] Ma Z, Zheng Y, Deng J, et al. Characterization of macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in children in Shenzhen, China[J]. Pediatr Pulmonol, 2014, 49(7): 695-700.
- [13] 沈俊娅, 陈岳明, 卢忠. 检测肺炎支原体 23S rRNA V 区 A2063G 基因突变的二种方法比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(4): 823-825.
- [14] Lung DC, Chan YH, Kwong L, et al. Severe community-acquired pneumonia caused by macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in a 6-year-old boy[J]. Hong Kong Med J, 2011, 17(5): 407-409.
- [15] Lucier TS, Heitzman K, Liu SK, et al. Transition mutations in the 23S rRNA of erythromycin-resistant isolates of *Mycoplasma pneumoniae*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1995, 39(12): 2770-2773.
- [16] Ye Y, Li SL, Li YJ, et al. *Mycoplasma pneumoniae* 23S rRNA Gene Mutations and Mechanisms of Macrolide Resistance[J]. Lab Medicine, 2013, 44(1): 63-68.

(收稿日期:2016-09-07 修回日期:2016-10-26)