

• 论 著 •

儿童社区获得性肺炎分离的肺炎支原体耐药性分析

黄金文, 李如凯, 焦继光

(广东省深圳市石岩人民医院检验科 518108)

摘要:目的 探讨石岩地区儿童社区获得性肺炎标本中分离的肺炎支原体对抗菌药物的耐药性。方法 采集 2013 年 2 月至 2015 年 4 月, 石岩疑似社区获得性肺炎儿童病例的咽拭子和血清标本共 426 例; 咽拭子进行肺炎支原体培养, 血清标本使用 ELISA 检测肺炎支原体抗体(Mp-IgM); 阳性者采用支原体专用培养基进行培养鉴定与药敏检测。结果 426 例儿童患者中确认为肺炎支原体感染的 69 例; 药敏试验结果显示: 肺炎支原体对红霉素耐药率为 76.8%(53/69), 对阿奇霉素耐药率为 65.2%(45/69), 对左氧氟沙星耐药率为 18.8%(13/69), 对四环素耐药率为 4.3%(3/69), 对米诺环素耐药率为 4.3%(3/69), 对庆大霉素耐药率 24.6%(17/69)。结论 肺炎支原体是石岩地区儿童社区获得性肺炎的主要病原体之一, 其在大环内酯类药物耐药性较为严重, 治疗时可选择敏感药物作为治疗药物, 但是务必考虑这几种药物对儿童的毒性和造成的不良反应, 切忌盲目用药。

关键词:社区获得性肺炎; 肺炎支原体; 抗菌药物; 耐药性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.05.006

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)05-0591-03

Analysis on drug resistance of *Mycoplasma pneumoniae* isolated from children with community acquired pneumonia

HUANG Jinwen, LI Ruhai, JIAO Jiguang

(Department of Clinical Laboratory, Shiyan People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518108, China)

Abstract: Objective To explore the resistance to antibacterial drugs in *Mycoplasma pneumoniae*(Mp) isolated from the children with community acquired pneumonia (CAP) in Shiyan area. **Methods** A total of 426 throat swabs and serum samples were collected from children patients with suspected CAP in Shiyan area from Feb. 2013 to Apr. 2015. The throat swabs were used to culture Mp. The serum Mp-IgM was detected by ELISA, the positive samples were confirmed by plate culture method, meanwhile, the drug sensitivity test was taken. **Results** Among 426 children cases, 69 cases were confirmed as Mp infection; the drug susceptibility test results showed that the resistance rate of Mp was 76.8(53/69) to erythromycin, 65.2%(45/69) to azithromycin, 18.8%(13/69) to levofloxacin, 4.3%(3/69) to tetracycline, 4.3%(3/69) to minocycline and 24.6%(17/69) to gentamicin. **Conclusion** Mp is one of the key pathogens of CAP in Shiyan area, which is severely resistant to macrolide. The treatment should choose sensitive drugs as the treatment drug, but it is important to consider the toxicity and adverse reactions of these several kinds of drugs to children. The blind medication should be avoided.

Key words: community acquired pneumonia; *Mycoplasma pneumoniae*; antibacterial drugs; drug resistance

社区获得性肺炎是指原本身体健康、免疫力正常的人群在医院以外罹患的肺部感染, 社区获得性肺炎在儿童、老年人肺炎中最为常见, 包括典型性肺炎和非典型性肺炎两种类型。典型性肺炎的病原体主要是常见的肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、卡他莫拉菌和流感嗜血杆菌等细菌性病原体; 而引起非典型性肺炎的病原体主要是肺炎支原体、肺炎衣原体、嗜肺军团菌和病毒等等。目前, 随着高端检验技术的大力开发与不断更新, 人们对非典型病原体的认识也日渐深入。由于国家卫生和计划生育委员会对疾病诊断和抗菌药物使用的相关规定, 过去被人们忽略的非典型病原体标本送检率和检出率大幅提高, 二级以上医院已普及咽拭子支原体培养及 PCR 技术, 使得支原体肺炎的诊断更为明确可靠, 临床医师可通过药敏试验结果选择药物进行有针对性的抗菌治疗。然而随着广谱高效抗菌药物的过度应用, 支原体对常用抗菌药物已产生了不同程度的耐药性, 已成为治疗支原体感染的一大阻碍, 而且目前仍然有些临床医生对支原体的治疗还停留在经验用药的水平, 因此常常有经验治疗失败的病例。笔者对石岩地区肺炎支原体耐药现状进行了统计探讨, 旨在为临床治疗支原体肺炎选药提供较为准确的参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 2013 年 2 月至 2015 年 4 月, 来石岩人民医院门诊及住院部、社康中心就治的社区获得性肺炎患儿共 426 例纳入本研究, 男 206 例、女 220 例; 最小 8 个月, 最大 8 岁。上述纳入研究者均行胸部 X 线影像检查, 患儿的诊断标准参照《社区获得性肺炎诊断和治疗指南》^[1]。

1.2 仪器与试剂 肺炎支原体抗体(Mp-IgM)ELISA 试剂盒由深圳博卡生物技术有限公司提供, 肺炎支原体检测平板(Mp 平板)的营养琼脂购自 Oxoid 公司, 所有抗菌药物纸片购自中国药品生物制品检定所。

1.3 方法

1.3.1 标本处理 患者入院后、抗菌药物使用之前严格按无菌操作采集咽拭子及血液标本; 要求患儿在早晨空腹, 禁水、禁食条件下抽取静脉血标本; 咽拭子标本放入装有 TE 缓冲液的小试管搅动, 然后充分挤压咽拭子至挤干后弃去, 最后与血清标本一起保存于一 20 ℃。

1.3.2 标本检测 咽拭子培养: 操作方法参考文献^[2], 将咽拭子标本置于肺炎支原体培养基中, 在 37 ℃、5% CO₂ 环境中培养 24 h, 如果有支原体生长, 则培养基的 pH 值下降可

使酸碱指示剂由红色变黄色,如基质不变色或出现混浊则说明无支原体生长。血清 Mp-IgM 的 ELISA 检测按说明书进行。取培养阳性的咽拭子标本涂布于 Mp 平板,置 37 °C、5%CO₂ 环境,孵育 6~9 d 后观察平板生长情况,如呈现“油煎蛋”样菌落生长者,可确诊为肺炎支原体阳性;同时用支原体培养基将药物稀释成一定的浓度梯度,然后将等体积的支原液体(浓度为 10⁵ CFU/mL)与不同浓度梯度的药物混合,培养后观察不变色的最小药物浓度定为最小抑菌浓度(MIC)。

1.4 统计学处理 数据采用 SPSS20.0 统计软件进行分析处理,检测性能和耐药率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 社区获得性肺炎患儿的支原体检测 血清 Mp-IgM 的 ELISA 检测: Mp-IgM 阳性 82 例、阴性 344 例;咽拭子肺炎支原体培养: 阳性 69 例、阴性 357 例,两种方法检测的性能比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 1.766, P > 0.05$)。见表 1。

表 1 ELISA 与咽拭子培养法检测结果的比较(n)

Mp-IgM	咽拭子培养		合计
	+	-	
+	63	19	82
-	6	338	344
合计	69	357	426

2.2 咽拭子肺炎支原体培养阳性标本的药敏试验 肺炎支原体对 6 种临床常用药物的敏感性试验显示,其对红霉素、阿奇霉素耐药率较高,分别为 76.8% 和 65.2%,高于其他 4 种药物。阿奇霉素与庆大霉素耐药率比较差异有统计学意义($\chi^2 = 22.96, P < 0.05$)。支原体对四环素和米诺环素耐药率最低,均为 4.3%。见表 2。

表 2 69 株肺炎支原体对 6 种抗菌药物的药敏试验结果

药物	敏感(n)	中介(n)	耐药(n)	耐药率(%)
红霉素	12	4	53	76.8
阿奇霉素	16	8	45	65.2
左氧氟沙星	53	3	13	18.8
四环素	62	4	3	4.3
米诺环素	60	6	3	4.3
庆大霉素	40	12	17	24.6

3 讨论

肺炎支原体是社区获得性肺炎常见的病原体之一,主要通过呼吸道飞沫和空气传播,尤其在儿童和老年人中的发病率最高。儿童肺炎支原体感染后以间质性肺炎为主,亦可诱发多种并发症,引发多系统、多脏器感染病变。治疗肺炎支原的首选抗菌药物为大环内酯类抗菌药物,临床医师经验治疗主要选择红霉素和阿奇霉素等大环内酯类药品。然而,自 2001 年日本报道出现了第一例大环内酯类耐药的肺炎支原体病例以来,许多国家都有耐大环内酯类抗菌药物的肺炎支原体报道且呈现逐年上升的趋势,但不同国家、不同地区分离的肺炎支原体耐药程度各不相同。据报道,2007—2010 年,美国分离的大环内酯类耐药的肺炎支原体大约占 8.2%,意大利约为 25.0%,德

国大约在 3.0%^[3]。然而有研究发现,中国肺炎支原体对大环内酯类耐药率在 84.0%~100.0%,尹玉东等^[4]统计了北京 3 所医疗中心的成人社区获得性肺炎中,支原体对大环内酯类药物的耐药现状,发现其对红霉素的耐药率为 71.7%,对阿奇霉素的耐药率为 60.4%,由此可见我国肺炎支原体对大环内酯耐药的情况不容乐观。

通过对石岩地区 426 例社区获得性肺炎患儿的咽拭子和血清标本检测,发现 69 例有肺炎支原体感染,占社区获得性肺炎病原体的 16.2%,可见支原体的确是社区获得性肺炎的重要病原之一。但要注意的是,无呼吸道感染症状的健康儿童和呼吸道感染症状明显的儿童其肺炎支原体流行率基本相同^[5],可见真正由支原体感染引起肺炎的病例数可能被高估。Zhao 等^[6]调查了 2007—2012 年北京儿童肺炎中支原体感染率为 19.1%,其中 12.4% 伴呼吸道感染,对大环内酯类抗菌药物的耐药率为 90.7%。不同地区因抗菌药物使用习惯与控制方法的差异,导致各地肺炎支原体的耐药性各有特点。本文统计发现,红霉素和阿奇霉素等治疗肺炎支原体的一线药物对多数患者可能无效,因其耐药率分别为 76.8%、65.2%,与文献^[6]的报道相比较要低很多,这可能与鉴定方法,检测前患儿是否使用过该类药物有关,如果在标本检测前使用了有效抗菌药物,则可能因敏感菌被抑制使得检出阳性率下降,导致耐药率相应升高,但若采用 PCR 或 Mp-IgM 方法则对阳性率影响不大。在药敏试验中,肺炎支原体对左氧氟沙星、四环素、米诺环素耐药率都较低,因此,石岩地区肺炎支原体治疗可考虑选择这 3 种药物,但通常情况下,左氧氟沙星等喹诺酮类药物是禁用于儿童的,四环素类也因其特有毒性和不良反应很少用于儿童。出于以上的考虑,要控制儿童肺炎支原体感染十分困难,因此往往采取以预防疾病为主的策略,同时相关机构及时检测、及时发现和防控大环内酯类耐药株的传播与感染至关重要。

有研究表明,大环内酯类耐药的肺炎支原体与 23RNA 点突变有关,主要是 A2063G 和 A2064G^[7-8],约占 90%,有人通过单核苷酸多态性分析(SNP)和 Cycleave PCR 方法快速检出大环内酯类耐药肺炎支原体。这些研究对诊断与治疗支原体肺炎提供了很大帮助^[9-10],但针对 8 岁以下的儿童罹患大环内酯类耐药支原体肺炎儿童的治疗,可供选择的抗菌药物甚少,亟待深入研究。

参考文献

[1] 中华医学会呼吸病学分会. 社区获得性肺炎诊断和治疗指南[J]. 中国临床医生, 2001, 29(1): 20-22.
 [2] 曹玉璞, 叶元康. 支原体与支原体病[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 119-120.
 [3] Dumke R, Von Baum H, Lück PC, et al. Occurrence of macrolide-resistant Mycoplasma pneumoniae strains in Germany[J]. Clin Microbiol Infect, 2010, 16(6): 613-616.
 [4] 尹玉东, 曹彬, 王辉, 等. 北京地区成人社区获得性肺炎患者中肺炎支原体耐药情况的多中心调查[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2013, 36(12): 954-958.
 [5] Meyer Sauter PM, van Rossum AM, Vink C. Mycoplasma pneumoniae in children: carriage, pathogenesis, and antibiotic resistance[J]. Curr Opin Infect Dis, 2014, 27(3): 220-227.
 (下转第 595 页)

总 Treg 和天然 Treg 百分率低于其他组别的成年人。

记忆 Th 遇抗原刺激后以产生效应分子为主,如细胞因子等,对抗原反应强烈,能辅助 B 淋巴细胞产生抗体;纯真 Th 细胞遇抗原刺激后以活化增殖为主,主要发挥免疫调理作用,直接或者通过 CD8⁺T 淋巴细胞抑制免疫应答的发生,同时其表面表达的 CD45RA 也逐渐转变为 CD45RO^[4]。本次实验结果显示,记忆 Th 细胞百分率在各个组别间不存在差异,而纯真 Th 细胞在 18~50 岁的男性和女性间存在差异,且男性高于女性。

CD28 与其配体结合为 T 淋巴细胞提供活化所必需的共刺激信号,即第二信号。CD28 在风湿性关节炎(RA), Graves 病,冠心病患者 T 淋巴细胞中表达减少,可能与自身免疫反应细胞组织损伤活性增强有关^[5]。CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞属于细胞毒 T 淋巴细胞,与靶细胞直接接触通过排粒作用释放穿孔素和颗粒酶等细胞毒物质,溶解靶细胞,同时还可能通过释放一些细胞因子诱导靶细胞的凋亡^[6]。有研究表明在喘息性肺炎患儿可以出现 CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞的升高和 CD4⁺CD28⁺T 淋巴细胞的降低^[7],CD4⁺CD28⁺T 淋巴细胞在带状疱疹病毒感染时增高。本研究显示,男女童的 CD8⁺CD28⁺细胞百分率差异有统计学意义,而成年人各组间差异无统计学意义。

HLA-DR 是 MHC-II 类抗原,是 T 淋巴细胞晚期活化的标志,根据 HLA-DR 的表达情况,可以得知活化 Ts 细胞和活化的总 T 淋巴细胞的比值。本次实验结果显示,18~50 岁成年男性的活化 Ts 和活化 T 总均低于其他组别成年人。

B1 是具有自我更新能力的长寿细胞,参与对多种细菌的抗感染免疫,属固有免疫效应细胞,另外,B1 也可能通过产生 IgM 类自身抗体而参与某些自身免疫病发生^[8]。本研究显示,成年人各个组别间的 B1 百分率差异有统计学意义,即 B1 百分率体现了性别和年龄的差异。

CD10 分子是一种中性内肽酶,可以水解刺激 B 淋巴细胞分化的肽类物质,从而使 B 淋巴细胞的分化发生下调。在 B 前体细胞分化发育过程中,CD10 从阴性转为强阳性再转为阴性。因此,CD10 可以反映 B 前体细胞分化发育过程^[9]。本研究显示,18~50 岁成年女性转化 B 的百分率高于其他组成成年人。

我国大部分淋巴细胞亚群百分率参考范围都是参考国外相关文献制订的。但是淋巴细胞免疫分型参考值受到种族类别、生活环境、经济水平等因素影响,所以使用国外参考范围会造成对临床诊断判断的不准确。本研究建立的参考范围较国外参考范围能更准确地反映武汉地区人群的淋巴细胞亚群分布,对于医生准确判断本地区患者病情有重要意义。

男童和女童淋巴细胞亚群百分率中,仅 CD8⁺CD28⁺/CD8 差异有统计学意义。由此可制订本实验室淋巴细胞亚群的男女童的 95% 正常参考区间。由于儿童的年龄分布跨越不大,故未对儿童进行不同年龄区间两两比较。

本实验用方差分析比较同性别不同年龄阶段和同年龄段不同性别的成年人淋巴细胞亚群百分率,结果显示,仅 CD4⁺CD28⁺,CD8⁺CD28⁺和记忆 Th 在各组间比较差异无统计学意义,其他项目差异均有统计学差异。由此可制订本实验室淋巴细胞亚群的男女成年人的正常 95% 参考范围。目前淋巴细胞的测定用于多方面的研究,而通常都是将监测结果与健康人群相比较,以判断被检测者疾病状况。由于健康人外周血淋巴细胞亚群表型稳定,故所得结果基本上能够反映武汉地区健康成年人和儿童外周血淋巴细胞亚群的水平,能够作为正常参考范围,为临床疾病的诊断和治疗提供参考依据。

参考文献

- [1] 刘尧娟,欧超伟,钟琼.健康人外周血 T 细胞亚群参考区间的建立[J]. 检验医学与临床,2010,7(7):596-597.
- [2] 张炬,陈万军.CD4⁺CD25⁺调节 T 细胞在免疫耐受及自身免疫病中的作用基础[J]. 医学与临床,2005,25(9):785-788.
- [3] 刘莉,丁乾.恶性肿瘤患者外周血 CD4⁺CD25⁺调节 T 细胞的检测及临床意义[J]. 临床肿瘤学杂志,2005,10(4):342-345.
- [4] 陈军浩,欧阳健.系统性红斑狼疮患者 CD4⁺T 淋巴细胞 CD45RO/CD45RA 的表达[J]. 现代检验医学杂志,2002,17(4):3-4.
- [5] 赵进良,王勤,张学光,等.类风湿关节炎患者 CD4⁺T 细胞亚群 4-1BB 和 CD28 分子的表达及临床意义[J]. 江苏医药,2009,35(10):1179-1180.
- [6] 韩琳,裴毅.肿瘤患者 CD8⁺T 细胞中 CD28 表达的研究进展[J]. 现代生物医学进展,2007,7(9):1402-1404.
- [7] 柴少卿,季伟.喘息性肺炎患儿外周血中共刺激分子 CD28 及淋巴细胞亚群的变化[J]. 内蒙古医学杂志,2010,42(12):1425-1428.
- [8] 龚非力.医学免疫学[M].北京:科学出版社,2000:77-78.
- [9] 陈愉,赵彤,蔡庆发,等.弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 bcl-2、bcl-6、CD10 蛋白表达及其在亚分类中的意义[J]. 肿瘤防治研究,2008,35(8):563-565.

(收稿日期:2016-08-26 修回日期:2016-10-18)

(上接第 592 页)

- [6] Zhao H, Li S, Cao L, et al. Surveillance of mycoplasma pneumoniae infection among children in Beijing from 2007 to 2012[J]. Chin Med J, 2014, 127(7):1244-1248.
- [7] 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.
- [8] Matsuoka M, Narita M, Okazaki N, et al. Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant Mycoplasma pneumoniae clinical isolates obtained in Japan[J]. Antimi-

crobiol Agents Chemother, 2004, 48(12):4624-4630.

- [9] Uh Y, Hong JH, Oh KJ, et al. Macrolide resistance of mycoplasma pneumoniae and its detection rate by Real-Time PCR in primary and tertiary care hospitals[J]. Ann Lab Med, 2013, 33(6):410-414.
- [10] Liu Y, Ye X, Zhang H, et al. Rapid detection of Mycoplasma pneumoniae and its macrolide-resistance mutation by Cycleave PCR[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2014, 78(4):333-337.

(收稿日期:2016-09-21 修回日期:2016-11-14)