

DOI:10.13350/j.cjpb.231118

• 临床研究 •

儿童肺炎支原体感染流行病学特征分析

林莉¹,狄天伟¹,杨爱娟²,周莲娟¹,徐月静^{1*}

(1. 浙江大学医学院附属儿童医院,浙江杭州 310003;2. 永康市妇女儿童保健院)

【摘要】 目的 探讨浙江地区儿童肺炎支原体(MP)感染流行病学特征和临床特点。方法 收集2021-2022年本院临床表现为发热、鼻塞、咳嗽、呼吸困难、扁桃体炎和肺炎的患儿作为研究对象。采集并培养MP阳性标本。采用倍比稀释法测定MP对红霉素、乙酰螺旋霉素、罗红霉素、阿奇霉素、克拉霉素、环丙沙星和司帕沙星耐受程度。对MP-23S rRNA V区进行PCR扩增,并测序。结果 MP阳性样本215份,阳性率20.73%;其中2021年检出98份MP阳性标本,阳性率19.48%;2022年117份MP阳性阳性本,阳性率21.91%。支气管炎中MP阳性率17.33%(13/75),支气管肺炎中MP阳性率20.97%(134/639),大叶性肺炎中MP阳性率22.93%(36/157),重症肺炎中MP阳性率26.56%(17/64)。MP春季、夏季、秋季和冬季检出率分别为:22.09%(36/163)、19.23%(15/78)、16.27%(55/338)和21.62%(99/458)。<6个月、6个月~1~岁、1~岁、3~岁、5~14岁各年龄组阳性率分别为:19.89%(36/181)、24.47%(58/237)、20.81%(67/322)、19.70%(40/203)和13.83%(13/94)。MP对红霉素、乙酰螺旋霉素、罗红霉素、阿奇霉素、克拉霉素、环丙沙星和司帕沙星耐药率分别为:58.60%、62.79%、45.58%、52.09%、37.67%、4.19%和0.47%。选取的60株MP菌株中共有46株发生位点突变,22株发生A2063G,17株发生A2064G,3株发生G2062A,2株发生A2063T,1株发生A2063C和1株C2617G。结论 MP感染男童多于女童,全年皆有病例,秋冬季高发。MP对红霉素、乙酰螺旋霉素和阿奇霉素耐药率较高,这与MP-23S rRNA V区突变有关。

【关键词】 肺炎支原体,儿童,耐药

【中图分类号】 R375.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)11-1333-04

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Nov.;18(11):1333-1336.]

Epidemiological characteristics of *Mycoplasma pneumoniae* infection in children

LIN Li¹, DI Tianwei¹, YANG Aijuan², ZHOU Lianjuan¹, XU Yuejing¹ (1. Children's Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China; 2. Yongkang Women and Children Health Hospital) *

【Abstract】 **Objective** The epidemiological and clinical characteristics of *Mycoplasma pneumoniae* infection were explored in children in Zhejiang region. **Methods** Children who were hospitalized in our hospital from 2021 To 2022 and whose clinical manifestations were fever, stuffy nose, cough, dyspnea, tonsillitis and pneumonia were collected as research objects. The MP positive specimens were collected and cultivated. The tolerance of MP to Erythromycin, acetyl Spiramycin, Roxithromycin, Azithromycin, Clarithromycin, Ciprofloxacin and sparfloxacin was determined by double dilution method. The MP-23S rRNA V region were amplified by PCR and then were sequenced. **Results** 215 MP positive samples, with a positive rate of 20.73%. Among them, 98 MP positive specimens were detected in 2021, with a positive rate of 19.48%; In 2022, there were 117 MP positive cases, with a positive rate of 21.91%. MP positive rate was 17.33% (13/75) in bronchitis, 20.97% (134/639) in bronchopneumonia, 22.93% (36/157) in lobar pneumonia, and 26.56% (17/64) in severe pneumonia. The detection rates of MP in spring, summer, autumn, and winter were 22.09% (36/163), 19.23% (15/78), 16.27% (55/338), and 21.62% (99/458), respectively. The positive rates for the age groups of <6 months, 6 months- old, 1- year old, 3- year old, and 5-14 year old were 19.89% (36/181), 24.47% (58/237), 20.81% (67/322), 19.70% (40/203), and 13.83% (13/94), respectively. The resistance rates of MP to erythromycin, acetyl spiramycin, roxithromycin, azithromycin, clarithromycin, ciprofloxacin and sparfloxacin were 58.60%, 62.79%, 45.58%, 52.09%, 37.67%, 4.19% and 0.47%, respectively. There 46 strains of 60 strains MP selected were mutated, including 22 mutations were A2063G, 17 mutations were A2064G, 3 mutations were G2062A, 2 mutations were A2063T, 1 mutations were A2063C and 1 mutations were C2617G. **Conclusion** More boys than girls have cases throughout the year, with a high incidence in autumn and winter. MP had a high resistance rate to erythromycin, acetylspiramycin and azithromycin, which was related to the mutation of MP-23S rRNA V region.

【Key words】 *Mycoplasma pneumoniae*; children; drug resistance

* **【通讯作者】** 徐月静, E-mail: xuyuejing127@163.com

【作者简介】 林莉(1994-),女,浙江温州人,本科,护师,研究方向:儿童肺炎方面。E-mail:965814768@qq.com

肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*, MP)是属于支原体的一个类别,可以独立存活的最小微生物之一,其由蛋白质、多糖、脂质三层膜组成,具有较强的生命力^[1]。人类是它唯一的机体,MP可寄生在宿主呼吸道黏膜上皮细胞,主要经飞沫、气溶胶传播,也可经直接接触传播^[2-3]。由于儿童存在呼吸道血管丰富、气管及支气管管腔狭窄、黏液腺发育不完全、呼吸功能代偿能力、机体免疫功能不成熟等问题,因而儿童更易发生感染,它是儿童呼吸道感染的常见病原体^[4]。肺炎支原体肺炎是常见的社区获得性肺炎,传染性强,潜伏期1~3周,MP感染四季均可发病各地气候不同其季节分布具有差异性^[5]。由于MP没有细胞壁,因而对作用于细胞壁和阻碍细胞壁合成的抗生素如青霉素、头孢类抗生素等天然耐药。而大环内酯类、喹诺酮类和四环素类抗生素对MP具有良好的治疗作用。由于儿童生长发育等原因,喹诺酮类和四环素类抗生素不适宜用于儿童治疗,大环内酯类抗生素则是治疗儿童MP感染的首选药物。随着抗生素的广泛使用,MP对不同抗生素产生了不同的耐受性。有研究显示自20世纪50年代世界各地陆续检出MP对红霉素耐药,而20世纪90年代则美国科学家、法国科学家陆续分离出MP的红霉素耐药株^[6-8]。近年来,MP的耐药株检出率越来越高,刘鑫^[9]关于宁波地区2019-2021年住院儿童肺炎支原体感染研究显示MP耐药率超过70%。MP对大环内酯类抗生素耐药主要是其作用靶点改变,其中23S rRNA V区A2063G和A2064G是常见基因突变。

本次研究对浙江地区儿童MP感染流行病学特征进行分析和研究,为肺炎支原体感染防治提供依据。

材料与方 法

1 材 料

1.1 研究对象 回顾性研究2021年1月-2022年12月在本院就诊和住院,临床表现为发热、鼻塞、咳嗽、呼吸困难、扁桃体炎和肺炎的患儿作为研究对象,共计1037例,其中男561例(54.10%),女476例(45.90%),年龄0~14(4.16±2.53)岁。纳入标准:(1)所有患儿均符合《诸福棠实用儿科学》中的诊断标准;(2)患者年龄不超过14周岁。排除标准:(1)有其他基础疾病,免疫类疾病;(2)2周内使用抗生素或糖皮质激素治疗患者;(3)档案资料不齐全。

1.2 仪器与试剂 C100型PCR仪和chemiDoc XRS+凝胶成像分析系统购自美国伯乐(Bio-Rad)公司;高速离心机,上海分析仪器厂;肺炎支原体快速液体培养基,自北京联立信生物技术有限公司;赛乐迪亚-麦可II(Serodia-myc II)肺炎支原体抗体检测试剂盒,日本

富士瑞必欧株式会社;Taq mix DNA聚合酶、10×PCR buffer和dNTPs,生工生物工程(上海)股份有限公司;抗生素,英国Oxoid公司。

2 方 法

2.1 MP检测 患儿入院24h内采集外周静脉血2mL,并离心于3000 r/min(离心半径10.3 cm)离心8 min,分离血清,并按照试剂盒操作规程并进行结果判定。将阳性标本接种于培养基,并置于5%CO₂培养箱中37℃培养。

2.2 药敏试验 采用倍比稀释法测定MP对红霉素、乙酰螺旋霉素、罗红霉素、阿奇霉素、克拉霉素、环丙沙星和司帕沙星耐受程度。

2.3 MP-23S rRNA V区PCR扩增 选取其中60份样本进行基因检测。DNA提取:选取培养好的油煎蛋样光滑菌株并放入盛有500 μL的1.5 mL EP管中,4℃10000 r/min离心15 min,弃上清。加入150 μL DNA提取试剂,振荡混匀。52℃水浴1.5 h,然后加入100 μL蛋白酶K 95℃水浴20 min,10000 r/min(离心半径10.3 cm)离心3 min,取上清液。提取DNA样本浓度均在80~200 ng/μL之间,纯度A值1.6~1.9之间,符合PCR扩增的条件。引物设计参照GenBank和文献^[10],合成由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR反应体系:Taq mix DNA聚合酶1.25 μL、正反引物各2 μL、DNA模板液4 μL、dNTPs 4 μL、10×PCR buffer 4 μL、ddH₂O补足25 μL。PCR反应条件:95℃预变性4 min;95℃变性1 min,65℃退火1 min,72℃延伸2 min;72℃终延伸8 min,4℃保存。取10 μL PCR扩增产物于1.5%琼脂糖凝胶电泳并进行EB染色。采用凝胶成像分析仪拍照电泳结果。取扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,并与标准株M129菌株进行比较。

3 统 计 分 析

统计学分析采用SPSS25软件完成,计数资料以百分比(%)表示,组间比较采用χ²检验(皮尔逊),以P<0.05为数据差异具有统计学意义。

结 果

1 一 般 情 况

1037例患儿送检标本中检出MP阳性样本215份,阳性率20.73%。其中2021年503份标本检出98份MP阳性标本,阳性率19.48%;2022年534份标本中检出117份MP阳性阳性本,阳性率21.91%。2022年检出MP数量和检出率高于2021年,两年间MP检出率差异不具有统计学意义(χ²=0.928, P>0.05)。102例呼吸道感染患儿中MP阳性患者15

例,阳性率 14.71%;75 例支气管炎中 MP 阳性患者 13 例,阳性率 17.33%;639 例支气管肺炎中 MP 阳性患者 134 例,阳性率 20.97%;157 例大叶性肺炎中 MP 阳性患者 36 例,阳性率 22.93%;64 例重症肺炎中 MP 阳性患者 17 例,阳性率 26.56%。支气管肺炎中 MP 阳性患者例数较多,而重症肺炎患者中 MP 阳性率略高。重症肺炎与其他疾病间比较,MP 检出率不具有统计学意义($\chi^2 = 3.5527, 1.7379, 1.0787, 0.3291$, 均 $P > 0.05$)。

2 不同季节检出情况

2021-2022 年春季、夏季、秋季、冬季 MP 阳性数分别为 36、15、55 和 99 例,阳性率分别为:22.09% (36/163)、19.23% (15/78)、16.27% (55/338) 和 21.62% (99/458)。2021 年春季、夏季、秋季、冬季 MP 阳性数分别为 15、9、31 和 43 例,阳性率分别为:24.59% (15/61)、27.27% (9/33)、17.51% (31/177) 和 18.53% (43/232);2022 年春季、夏季、秋季、冬季 MP 阳性数分别为 21、6、24 和 56 例,阳性率分别为 20.59% (21/102)、13.33% (6/45)、14.91% (24/161) 和 24.78% (56/226)。秋冬季节是 MP 的发病高峰,而夏季发病人数最少。MP 阳性率则秋季较低,与其他季节比较数据不具有统计学意义($\chi^2 = 0.3843, 2.5005, 0.3964, 3.5587$, 均 $P > 0.05$)。

3 年龄和性别

将患儿按照年龄和性别进行分组。按年龄划分分别为:<6 个月组、6 个月~组、1~岁组、3~岁组和 5~14 岁组。各组患儿人数分别为:181、237、322、203 和 94 例,MP 阳性患儿分别为:36、59、67、40 和 13 例。年龄上 3 岁以下患儿数量较多,5 岁以上患儿较少。性别上男性患儿多于女性患儿分别为 561 例和 476 例,MP 阳性患儿分别为 118 例和 97 例。1~岁组检出阳性患儿最多,其 MP 阳性率与其他年龄组比较,MP 检出率不具有统计学意义($\chi^2 = 0.0600, 1.3061, 0.0934, 2.2807$, 均 $P > 0.05$)。见表 1。

表 1 不同年龄和性别 MP 发病趋势

Table 1 Incidence of *M. pneumoniae* pneumonia by age and gender

年龄 Age	男 Male			女 Female			总数 Total		
	患者数 No.	MP 阳性 MP positive	阳性率 (%) Positive rate	患者数 No.	MP 阳性 MP positive	阳性率 (%) Positive rate	患者数 No.	MP 阳性 MP positive	阳性率 (%) Positive rate
<6 个月	93	19	20.43	88	17	19.32	181	36	19.89
6 个月~	134	33	24.63	103	25	24.27	237	58	24.47
1~岁	172	36	20.93	150	31	20.67	322	67	20.81
3~岁	106	22	20.75	97	18	18.56	203	40	19.70
5~14 岁	56	8	14.29	38	5	13.16	94	13	13.83

4 MP 药敏结果

MP 对大环内酯类抗生素中红霉素、乙酰螺旋霉素和阿奇霉素耐药率高于 50%,分别为 58.60%、62.79% 和 52.09%。MP 对喹诺酮类抗生素环丙沙星和司帕沙星耐药率低于 10%,分别为 4.19% 和 0.47%。见表 2。

表 2 MP 药敏结果
Table 2 *M. pneumoniae* drug sensitivity results

抗生素 Drug	耐药 Drug resistance		中介 Intermediary		敏感 Sensitive	
	株数 No.	率 (%) Ratio	株数 No.	率 (%) Ratio	株数 No.	率 (%) Ratio
红霉素	126	58.60	14	6.51	75	34.88
乙酰螺旋霉素	135	62.79	12	5.58	68	31.63
罗红霉素	98	45.58	19	8.84	98	45.58
阿奇霉素	112	52.09	15	6.98	88	40.93
克拉霉素	81	37.67	21	9.77	113	52.56
环丙沙星	9	4.19	3	1.40	203	94.42
司帕沙星	1	0.47	0	0.00	214	99.53

5 MP-23S rRNA V 区测序结果

选取的 60 株 MP 菌株中共有 46 株发生位点突变,14 株未发生位点突变。具体突变位点分别为:22 株发生 A2063G,17 株发生 A2064G,3 株发生 G2062A,2 株发生 A2063T,1 株发生 A2063C 和 1 株 C2617G。其中 A2063G 和 A2064G 检出率最高。

讨论

MP 无细胞壁,外层细胞膜主要由蛋白质和脂类构成,形态多样,如球形、丝状等,能够引起上、下呼吸道和肺部感染性疾病的常见病原体,它也是儿童社区获得性呼吸道感染的主要病原体之一,约占儿童获得性肺炎的 10%~30%,在流行高峰可达 50%^[11-12]。MP 可单独引起感染,也可能合并其他病原体,如流感病毒等^[13]。浙江地区 2021 年阳性率 19.48%,2022 年 MP 阳性率 21.91%,2022 年 MP 阳性率略高于 2021 年。MP 膜表面富含的脂质相关膜蛋白,它可以引起组织细胞坏死,是致病的关键因素。与此同时,它还可以影响宿主自身机体免疫系统。它引起的常见呼吸道有呼吸道感染、支气管炎、大叶性肺炎和重症肺炎,也可以造成对脑、心、肝、肾、血液、关节和皮肤造成损伤。支气管肺炎中 MP 阳性患者例数较多,而重症肺炎患者中 MP 阳性率略高。

MP 全年均有病例报告,但是不同季节感染病例数存在一定差异。马少杰等^[14] 研究显示 5 年间民航总医院门急诊就诊儿童肺炎支原体检出例数在秋冬季较多,其中秋季阳性率最高。娜仁等^[15] 对 2015-2019 年天津地区儿童肺炎支原体流行情况显示,秋季检出率最高,而冬季检出例数最高。由于幼儿免疫系

统不成熟,因而幼儿是 MP 的易感人群。浙江地区儿童肺炎支原体检出以 5 岁以下儿童为主。由于 MP 没有细胞壁,因而对作用于细胞壁和阻碍细胞壁合成的抗生素天然耐药。而四环素类抗生素可以导致儿童“四环素牙”,喹诺酮类抗生素中特别是氟喹诺酮类抗生素可引起儿童软骨异常,氨基糖苷类抗生素具有耳毒性和肾毒性,因而这些抗生素儿童限制使用,大环内酯类抗菌药物是治疗儿童 MP 感染的首选药物。

近年来随着抗生素的广泛使用,MP 对其产生了一定耐受性。为了进一步了解浙江地区 MP 的耐药情况,本次研究中选取了红霉素、乙酰螺旋霉素、罗红霉素、阿奇霉素、克拉霉素、环丙沙星和司帕沙星进行实验,结果显示 MP 对红霉素、乙酰螺旋霉素和阿奇霉素耐药率超过 50%,而对环丙沙星和司帕沙星小于 10%。由此可见,杭州地区 MP 分离株对大环内酯类抗生素产生了一定耐受性。MP 中核糖体 23S rRNA 含有酰基转移酶中心,这个中心存在 I-VI 共 6 个不相同的结构域,其作用催化肽键的形成^[15]。大环内酯类抗生素能够作用于 MP 核糖体 23S rRNA V 区形成共价结合,从而抑制肽键形成。以往研究显示 MP 分离株对大环内酯类抗生素耐药机制主要有:(1) 23S rRNA V 区基因突变,使大环内酯类抗生素无法形成共价结合;(2) 外排机制;(3) 甲基化钝化酶^[16]。本次研究中检出了 A2063G、A2064G、G2062A、A2063T、A2063C 和 C2617G。其中 A2063G 和 A2064G 检出率最高。

2021-2022 年浙江地区儿童呼吸道肺炎支原体感染中男童多于女童,全年皆有病例,秋冬季高发。对 MP 临床发布和耐药性监测,有利于合理应用抗生素。

【参考文献】

[1] Krafft C, Christy C. *Mycoplasma pneumoniae* in children and adolescents[J]. *Pediatr Rev*, 2020, 41(1): 12-19.
[2] Izadnegahdar R, Cohen AL, Klugman KP, et al. Childhood pneumonia in developing countries[J]. *Lancet Respir Med*, 2013, 1(7): 574-584.
[3] Carrim M, Wolter N, Benitez AJ. Epidemiology and molecular identification and characterization of *Mycoplasma pneumoniae*,

South Africa, 2012-2015 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2018, 24(3): 506-513.

- [4] Meyer Sauteur PM, Unger WW, Nadal D, et al. Infection with and carriage of *Mycoplasma pneumoniae* in children[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 329.
[5] 周菁菁. 78 例住院儿童肺炎支原体肺炎耐药情况及临床特点分析[D]. 遵义医学院, 2018.
[6] 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.
[7] Waites KB, Balish MF, Atkinson TP. New insights into the pathogenesis and detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections[J]. *Future Microbiol*, 2008, 3(6): 635-648.
[8] Okazaki N, Narita M, Yamada S, et al. Characteristics of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin *in vitro* [J]. *Microbiol Immunol*, 2001, 45(8): 617-620.
[9] 刘鑫. 浙江省宁波地区 2019-2021 年住院儿童肺炎支原体感染及耐药分析[J]. *上海预防医学*, 2023, 35(02): 154-158.
[10] Tsutomu Y, Tsuyoshi K. Epidemiology of *Mycoplasma pneumoniae* infections in Japan and therapeutic strategies for macrolide-resistant *M. pneumoniae* [J]. *Frontiers Microbiol*, 2016, 7(20): 693.
[11] 常青, 高燕敏, 闫超, 等. 2015-2016 年无锡地区儿童肺炎支原体流行基因特征分析[J]. *中国人兽共患病学报*, 2018, 34(7): 668-672.
[12] 张涛. 儿童肺炎支原体耐药性与临床用药相关性的研究[D]. 广州医科大学, 2014.
[13] 涂鹏, 窦海伟, 史大伟, 等. 流感样病例中肺炎支原体感染与耐药情况研究[J]. *中国全科医学*, 2022, 25(02): 145-148, 158.
[14] 马少杰, 胡文娟, 时琰丽, 等. 2017-2021 年民航总医院门急诊儿童肺炎支原体感染情况分析[J]. *中国医药生物技术*, 2022, 17(3): 231-236.
[15] 娜仁, 司萍, 张嘉懿, 等. 2015-2019 年天津地区儿童肺炎支原体呼吸道感染的流行情况及与环境因素的关系[J]. *中国妇幼保健*, 2021, 36(19): 4496-4498.
[16] Medjo B, Atanaskovic-Markovic M, Radic S, et al. *Mycoplasma pneumoniae* as a causative agent of community acquired pneumonia in children: clinical features and laboratory diagnosis [J]. *Ital J Pediatr*, 2014, 40(1): 104.

【收稿日期】 2023-06-07 【修回日期】 2023-08-25