

# 儿童肺泡灌洗液肺炎支原体检出率及基因型分析

汪小五<sup>1</sup>, 丁圣刚<sup>2</sup>, 王林定<sup>3</sup>, 唐振华<sup>1</sup>, 朱义朗<sup>1</sup>, 高 勇<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:检测 136 例儿童肺泡灌洗液标本感染肺炎支原体(MP)的情况并初步了解安徽合肥地区 MP 基因型情况。方法:采用普通 PCR 技术从 136 例儿童的肺泡灌洗液标本筛查出已感染 MP 的标本,并通过巢式多重 PCR 技术对 MP 阳性标本进行基因型分析,对照试验采用 FH-MP 标准株为 DNA 模版。巢式多重 PCR 扩增后的 DNA 片段构建 T 载体重组质粒做基因测序验证。结果:普通 PCR 检测显示有 52 例 MP 阳性标本(136 例肺泡灌洗液标本)。巢式多重 PCR 技术检测显示 MP 阳性标本基因型均为 P1-I 型,而标准株 FH-MP 的基因型为 P1-II 型。重组质粒经过测序后进行片段对比验证其扩增条带均正确。结论:合肥地区儿童 MP 流行株基因型为 P1-I 型,感染 MP 的阳性率为 38.2%。

**[关键词]** 肺炎支原体;基因型;儿童;巢式多重 PCR

**[中图分类号]** R 375 **[文献标志码]** A **DOI:**10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2019.01.029

## The detection rate and genotype analysis of *Mycoplasma pneumoniae* in bronchoalveolar lavage fluid

WANG Xiao-wu<sup>1</sup>, DING Sheng-gang<sup>2</sup>, WANG Lin-ding<sup>3</sup>, TANG Zhen-hua<sup>1</sup>, ZHU Yi-lang<sup>1</sup>, GAO Yong<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, The Second People's of Hospital of Fuyang, Fuyang Anhui 236015;

2. Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei Anhui 230022;

3. Department of Microbiology, Medical University of Anhui, Hefei Anhui 230032, China)

**[Abstract]** **Objective:** To detect the distribution of *Mycoplasma pneumoniae* (MP) in bronchoalveolar lavage fluid of 136 children, and preliminarily understand the genotype of MP in Hefei Anhui province. **Methods:** The MP infection cases in 136 bronchoalveolar lavage fluid samples were screened using PCR. The genotype of MP was analyzed using nest multiplex PCR, and the DNA temple of FH-MP standard strain was set as control. The recombinant plasmid was constructed using the amplified DNA fragment cloned by nest multiplex PCR, and sequenced. **Results:** Fifty-two positive MP samples were screened in 136 cases of bronchoalveolar lavage fluid using PCR. The nest multiplex PCR results showed that the genotype of MP positive samples was type P1-I, and the genotype of standard strain FH-MP was type PCP1-II. The sequencing results of the recombinant plasmid showed that the cloned fragment was right. **Conclusions:** The genotype of epidemic strains of MP is type P1-I, and the positive rate of MP infection is 38.2% in Hefei.

**[Key words]** *Mycoplasma pneumoniae*; genotype; child; nest multiplex PCR

社区获得性肺炎中比较常见的病原体就是肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*, MP)<sup>[1]</sup>。肺炎支原体肺炎(MPP)是一种自限性疾病,但是有时会引起各种肺部疾病如支气管炎、脑炎、坏死性肺炎,严重者甚至会导致死亡<sup>[2]</sup>。MP 感染的流行周期为 3~4 年<sup>[1,3]</sup>。MPP 还没有明确的发病机制,从临床症状分析可能是病原体入侵机体呼吸上皮细胞的纤毛状上皮细胞或者是机体免疫反应的结果<sup>[4]</sup>。P1 基因具有其自然特性即高度保守性,且随着分子生物学技术的发展可根据分离株中 P1 氨基酸序列之间的

差异把其分成两大类型 P1-I 型和 P1-II 型<sup>[5]</sup>。对 MP 流行株的基因型进行分析可对其发病机制和临床诊断治疗进行探讨<sup>[5]</sup>。本实验收集儿童的肺泡灌洗液标本,了解合肥地区儿童 MP 流行株基因型的现状。

### 1 资料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 研究对象 选取 2013 年 8 月至 2016 年 1 月安徽医科大学第一附属医院儿科儿童肺泡灌洗液标本 136 例。本研究通过医学伦理委员会审核同意,研究对象同意并签署知情同意书。-80℃ 保存样本。

1.1.2 材料来源 MP(FH; ATCC15531)标准菌株(美国 ATCC 产品)为实验室保存。

1.1.3 主要试剂 MP 快速培养试剂盒购自珠海

[收稿日期] 2018-03-13 [修回日期] 2018-08-06

[作者单位] 1. 安徽省阜阳市第二人民医院 检验科, 236015; 2. 安徽医科大学第一附属医院 儿科, 安徽 合肥 230022; 3. 安徽医科大学 微生物学教研室, 安徽 合肥 230032

[作者简介] 汪小五(1988-), 女, 硕士研究生。

[通信作者] 高 勇, 硕士研究生导师, 高级检验师。E-mail: wudongxw@163.com

迪尔生物工程有限公司;细胞基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根生化有限公司;DNA 胶回收试剂盒购自上海生物工程有限公司。

1.1.4 引物 普通 PCR 引物<sup>[6]</sup>为含内切酶 *Bam*H I 酶切位点的上游引物为 5'-TTG GAT CCA AGG GGG TGT GGG CGG A-3';内切酶 *Sal* I 酶切位点的下游引物为 5'-TCG TCG ACG GTG GAG GAG GTG TTT C-3'。*Bam*H I 酶和 *Sal* I 酶切位点分别为 GGA TCC 和 GTC GAC。巢式和多重 PCR 引物参照文献[7]由上海生物工程有限公司合成。巢式 PCR-P1 基因的重复序列 RepMP4 序列的外内侧引物分别为 ADH2F/ADH2R;5'-GGC AGT GGC AGT CAA CAA ACC ACG TAT-3'/5'-GAA CTT AGC GCC AGC AAC TGC CAT-3'和内侧引物 ADH3F/ADH3R;5'-GAA CCG AAG CGG CTT TGA CCG CAT-3'/5'-GTT GAC CAT GCC TGA GAA CAG TAA-3'。P1 基因的重复序列 RepMP2/3 序列的外内侧引物分别为 ADH3/MP2/3-R1;5'-CGA GTT TGC TGC TAA CGA GT-3'/5'-AGA TTG ACC TGA GCC TGA AG-3'和内侧引物 MP2/3-F2/MP2/3-R2;5'-CAC AAG TGG TTC GCG TTC CT-3'/5'-GGC TGG GTG GAA TGG TCT GT-3'。多重 PCR-P1 基因重复序列引物为 ADH4F;5'-GAC CGC ATC AAC CAC CTT TGC GTT ACG-3'/N1;5'-CCC GGT GGT GGA AGT ATT TT-3'/2N2C;5'-CGA GTT TGC TGC TAA CGA GT-3'/MP2/3-F3;5'-TCG ACC AAG CCA ACC TCC AG-3'/R3-1;5'-TTG GAA TCG GAC CCA CTT CG-3'/R3-2;5'-CGA CGT TGT GTT TGT GCC AC-3'/R3-2V;5'-CGG TAT AGC TAA TTT GGT AC-3'。

## 1.2 MP 阳性标本的筛查和基因分型

1.2.1 肺泡灌洗液的收集 行纤维支气管镜术,取液体标本在 1 h 内处理标本,保存于 -80 °C 待实验。

1.2.2 MP (FH; ATCC15531) 标准菌株培养 严格按照实验室购买的 MP 快速培养试剂盒说明书中的步骤操作。

1.2.3 普通 PCR 法筛查 MP 阳性标本 cDNA 提取; -80 °C 取出 136 份肺泡灌洗液标本和 MP (FH; ATCC15531) 标准菌株转阳培养液按细胞基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。普通 PCR 技术筛查 MP 阳性标本。

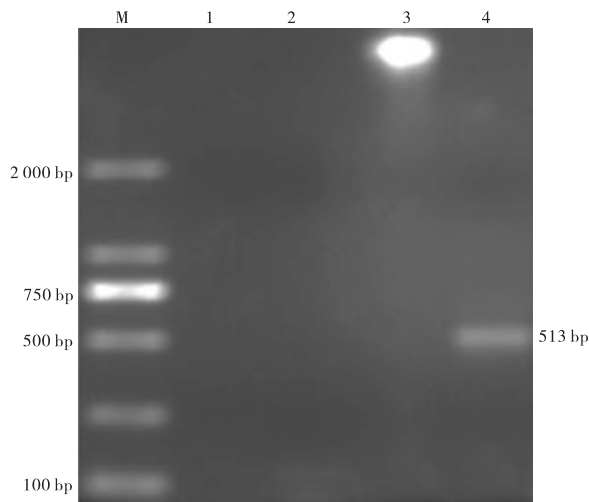
1.2.4 MP 阳性标本的基因分型 P1 基因的重复序列 RepMP4 序列和 RepMP2/3 序列的外侧引物和内侧引物以及试剂盒提取的基因组 DNA 模板按照巢式 PCR 扩增体系进行扩增。外侧扩增体系为 50

μL 总体积;RepMP4 序列退火温度为 75 °C 30 s;RepMP2/3 序列退火温度为 61 °C 30 s。内侧扩增体系为 50 μL 总体积;RepMP4 序列退火温度为 73 °C 30 s;RepMP2/3 序列退火温度为 65 °C 30 s。多重 PCR 进行分型扩增体系为 50 μL 总体积;RepMP4 序列退火温度为 70 °C 30 s,DNA 模板为巢式 PCR RepMP4 序列扩增产物稀释 1 000 倍;RepMP2/3 序列退火温度为 70 °C 30 s,DNA 模板为巢式 PCR RepMP4 序列扩增产物稀释 1 000 倍。

1.2.5 MP 阳性标本扩增条带确定 1% 琼脂糖凝胶电泳验证及基因测序。

## 2 结果

2.1 MP 阳性标本的筛查 普通 PCR 法对从肺泡灌洗液中提取的基因组 DNA 中进行扩增,1% 琼脂糖凝胶电泳后显示有 513 bp 目的条带(见图 1)。136 例标本中检测出 52 例 MP 阳性标本,阳性率为 38.2%。



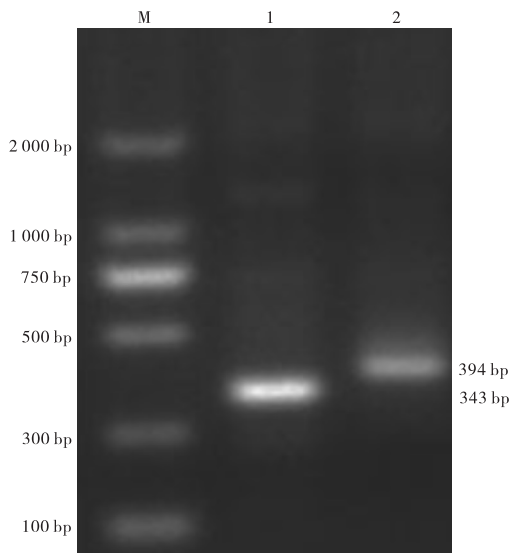
M:Marker;1:空白组;2:空白组普通PCR扩增;  
3:实验组cDNA;4:实验组普通PCR扩增

图1 普通 PCR 技术法扩增

2.2 MP 阳性标本的基因分型 1% 琼脂糖凝胶电泳分析 MP 阳性标本巢式多重 PCR 扩增产物发现:RepMP4 重复序列扩增出了大约 343 bp 条带;RepMP2/3 重复序列扩增出了大约 394 bp 条带(见图 2)。FH 标准菌株则在 RepMP4 重复序列扩增出了大约 560 bp 条带;RepMP2/3 重复序列扩增出了大约 617 bp 条带(见图 3)。基因序列测序比对后正确。

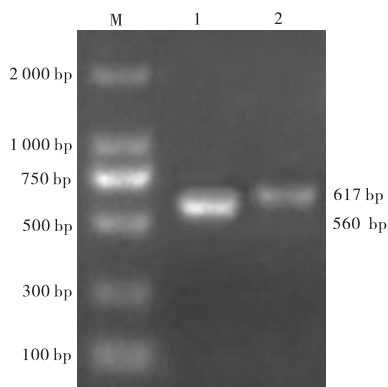
## 3 讨论

肺炎是儿童和青少年常见的呼吸道感染引起的



M:Marker;1:RepMP4片段扩增;2:RepMP2/3片段扩增

图2 MP标本多重PCR技术法分析



M:Marker;1:RepMP4片段扩增;2:RepMP2/3片段扩增

图3 MP-FH标准菌株多重PCR技术法分析

一种疾病,往往发病都考虑为细菌或者病毒感染引起,会常常忽略支原体的感染而延误治疗<sup>[8]</sup>。快速准确的检测方法非常重要。MP检测的金标准是培养法,但是其培养时间长,市场快速培养试剂盒检出率又低<sup>[9]</sup>。核酸检测方法是近年来比较流行的检测方法,可直接从呼吸道标本中检测出病原体特殊的DNA片段<sup>[8]</sup>。本实验收集了行纤维支气管镜术儿童肺泡灌洗液标本进行普通PCR扩增检测其感染MP的情况,发现136例疑似感染MP标本中有52例是扩增阳性结果,其感染率为52.8%。该数据可以反映合肥地区儿童在近期感染MP情况。

MP基因型依赖于P1基因的快速循环PCR(Rapid-Cycle PCR)和PCR-限制性长度多态性分析(RFLP)方法<sup>[10]</sup>。本实验室采用巢式多重PCR技术对52例阳性标本进行了分析:均扩增出了P1-I

型的目的条带。对照组扩增出P1-II型的目的条带。该数据可以反映合肥地区儿童感染MP流行基因型均为P1-I型。

王楠等<sup>[5]</sup>检测西安地区儿童感染MP流行基因型均为P1-I型。KENRI等<sup>[7]</sup>采用的巢式多重PCR的方法将1995-2005年十年间的MP菌株进行了分型发现P1-I型和P1-II型交替存在并发现了变异株。本实验未能发现亚型,可能是由于样本量的局限。

收集来的136份肺泡灌洗液标本中有52份是MP阳性标本,即合肥地区儿童MP的感染率为38.2%,而且全部为P1-I型。该调查结果初步说明合肥地区儿童感染MP主要为P1-I型。虽然样本量有限,后期还会继续扩大样本量,来补充实验数据的不足,但是该结果对临床治疗还是有一定的指导意义。

#### [参考文献]

- [1] 沈夏梦,华春珍,王晓芳,等. 儿童肺炎支原体肺炎临床特点及血浆分泌型白细胞蛋白酶抑制剂的水平变化[J]. 临床儿科杂志,2014,32(8):720.
- [2] ZHANG Y,ZHOU Y,LI S, *et al.* The clinical characteristics and predictors of refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children[J]. PLoS One,2016,11(5):e0156465.
- [3] SHIN JE,CHEON BR,SHIM JW, *et al.* Increased risk of refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children with atopic sensitization and asthma[J]. Korean J Pediatr,2014,57(6):271.
- [4] DING S,WANG X,CHEN W, *et al.* Decreased interleukin-10 responses in children with severe *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia[J]. PLoS One,2016,11(1):e0146397.
- [5] 王楠,张凯,张国成. 儿童肺炎支原体西安流行株的基因分型[J]. 临床儿科杂志,2013,31(5):455.
- [6] 汪小五,曾宪聪,陈伟,等. 肺炎支原体P1蛋白的制备及其应用的初步研究[J]. 安徽医科大学学报,2014,49(12):1709.
- [7] KENRI T,OKAZAKI N,YAMAZAKI T, *et al.* Genotyping analysis of *Mycoplasma pneumoniae* clinical strains in Japan between 1995 and 2005: type shift phenomenon of *M. pneumoniae* clinical strains[J]. J Med Microbiol,2008,57(4):469.
- [8] 严春霞,闻人庆,陆伟宏,等. 可视化环介导等温扩增技术在肺炎支原体检测中的应用[J]. 临床检验杂志,2016,34(2):85.
- [9] 黄梅霞. 两种儿童肺炎支原体检测方法的对比分析及临床应用[J]. 实用医技杂志,2017,24(4):399.
- [10] 闫晓苏,赵飞,张建中. 新型p1基因型肺炎支原体分型方法的建立与应用[J]. 微生物学报,2012,52(2):262.

(本文编辑 刘璐)