

多重 PCR 靶向测序技术在肺炎支原体耐药疾病中的应用

宋丽影, 袁野, 路放, 李姗姗, 杨丽英*

(吉林金域医学检验所有限公司, 长春 130000)

摘要: **目的** 探讨多重 PCR 靶向测序技术在肺炎支原体耐药疾病中的应用。**方法** 选择 2023 年 9 月 25 日—2023 年 10 月 17 日年龄从 11 个月至 17 岁不等共 107 例长春市儿童医院科研室的患儿, 以送检项目名称为“上呼吸道多种病原体靶向测序”的肺炎支原体患者的咽拭子为研究对象。采用多重 PCR 联合 tNGS 技术, 以 96 种呼吸道病原的高度保守区域为靶标, 设计特异性引物, 在一个扩增管中进行 PCR 扩增富集目标病原, 同时通过第二轮 PCR 连接上区分样本来源的测序接头, 采用基因测序仪进行高通量测序得到测序数据, 使用生物信息学软件对测序数据进行过滤, 并与参考基因组进行比对, 判读病原体的检测结果。**结果** 107 例咽拭子样本中检测结果均属于肺炎支原体耐药 -23S, 大环内酯类抗生素 23S rRNA:A2063G, 各样本检测出的序列数不等, 突变频率均为 1.00 (突变频率: 该位点突变序列数占该位点总序列数的比例, 频率范围为 (0%, 100%))。**结论** 多重 PCR 靶向测序技术能够实现肺炎支原体及其耐药基因的高效、精准检测, 为早期诊断临床和指导合理用药等方面提供了依据, 多重 PCR 靶向测序技术在肺炎支原体耐药基因检测中具有重要的应用价值。

关键词: 多重 PCR 靶向富集; tNGS 技术; 肺炎支原体; 耐药基因

0 引言

急性呼吸道感染是临床常见感染性疾病之一。全球范围内每年因呼吸道病毒感染致死病例数超 400 万, 对儿童的生命健康安全造成严重威胁^[1-2]。我国急性呼吸道感染患儿约占我国门诊患儿总数的 60%, 占我国住院患儿的 25% 左右, 是引发患儿发病和死亡的主要疾病之一^[3]。

呼吸道感染的患病原因诊断困难, 病原复杂, 因此提供快速准确性高的诊断措施, 有利于为患者提供早日诊断和治疗, 避免错过最佳时机^[4]。肺炎支原体属于病原体之一, 在儿科呼吸道感染中常见, 占据儿童社区获得性肺炎的 25% 左右。临床研究显示, 每 5 年左右会爆发一次^[5-7]。肺炎支原体感染对儿童多个系统均会造成不良影响, 常见的为呼吸系统损伤, 症状较轻病情会自己消散痊愈, 但如果患者对大环内酯类抗生素耐药, 会影响治疗效果。多重 PCR 靶向测序技术又称扩增子靶向测序技术, 是一种将多重 PCR 技术与二代测序技术相结合的一种靶向捕获测序技术。该技术首先利用多重 PCR 反应, 对多个目标区域序列进行扩增, 最终得到扩增产物, 在聚合酶链式反应帮助下, 将二代测序所需的接头序列引入到扩增子产物的两

侧, 得到扩增子文库, 然后进行二代测序和生信流程分析, 获取目标区域的序列信息, 实现目标区域序列检测的目的。

本文旨在探究多重 PCR 靶向测序技术在肺炎支原体耐药基因检测中的实际应用效果及其潜在价值。

1 资料与方法

1.1 资料来源

选择 2023 年 09 月 25 日—2023 年 10 月 17 日的长春市儿童医院科研室共 107 例患儿为研究对象。男女数量之比为 62 : 45, 年龄区间为 1~17(岁), 平均年龄为 (6.0±1.3) 岁。所有患儿均符合《儿童社区获得性肺炎管理指南》的诊断标准。父母赞同后签署同意书。

纳入标准: 患儿均在院外或者潜伏期确诊为获得性感染性肺炎。

排除标准: (1) 患儿存在先天性免疫疾病; (2) 患儿采用免疫抑制剂治疗; (3) 患儿患有慢性呼吸系统疾病。

1.2 研究方法

1.2.1 标本采集与处理

采集鼻咽拭子 1~2 支以上。向 1.5 mL 离心管内加入 13 μ L

第一作者: 宋丽影, 主管检验师, 研究方向为 PCR 分子测序相关研究。

* 通信作者: 杨丽英, 主管检验师, 研究方向为微生物培养及分子感染。E-mail: jlyangliyong@kingmed.com.cn

外源性内参, 样本使用恒温振荡器 2500 r/min 震荡 3~5 min, 混匀后取 1.3 mL 进行 12000 r/min 5 min 离心, 离心后遗弃上清。

1.2.2 样本提取

提取试剂使用广州美基生物科技有限公司的产品。取出样品板, 每孔加入 250 μL 处理好的样本和 20 μL Proteinase K, 按照说明书操作提取样本中的 DNA/RNA。提取 45 min 后结束, 取出洗脱板, 等待备用。

1.2.3 核酸浓度测定

使用 Qubit 测定样品核酸浓度, 然后根据上述浓度计算每个样本的取样量和补水量。

1.2.4 文库制备

(1)合成 cDNA: 向上述取好核酸的孔中加入 2 μL cDNA 合成引物, 置于 PCR 仪器中 65°C 孵育 2 min, 保持在 4°C; 然后依次加入 2 μL 一链合成缓冲液和 2 μL 一链合成酶, 进行一链 cDNA 的合成。(2)目标区域富集将上述反应体系取出 11 μL 转入逆转录体系中置于 PCR 仪器中运行。从 PCR 仪器中取出扩增产物, 瞬时离心。进行第一次纯化。(3)文库扩增转 11.5 μL 上述纯化后富集产物到文库扩增预混液, 运行程序进行扩增。进行第二次纯化。(4)文库浓度测定: 使用 Qubit 测定每个样本的文库浓度。(5)文库 pooling 及质控。①文库 pooling。每个文库均取等质量(一般在 20~60 ng)进行 pooling, 按取样体积(μL) = 文库取样量(ng) / 文库浓度(ng/μL)。进行文库取样体积计算。②pooling 文库质控。使用 Qubit 测定 pooling 文库浓度。按 Equalbit DNA HS Assay Kit 说明书操作, 并记录文库浓度。③文库大小质控。采用全自动核酸蛋白分析仪(Qsep100)检测文库片段大小, 检测结果的文库片段大小处于 250~350 bp。

1.2.5 测序

利用生物信息分析把输出的序列信息与基因组参考序列进行比对, 从而获得靶向序列信息。测序步骤如下。(1)慢速清洗仪器。在清洗盒的孔中加入配制好的 1.3 mL 0.12% 次氯酸钠清洗液和 80 mL 的 0.05% 吐温清洗液。(2)试剂准备。将试剂夹盒放置在室温水槽中解冻约 90 min。从 2~8°C 取出新的测序芯片, 室温下静置 30 min, 避免反复冷藏。将测序缓冲液提前 30 min 置于室温, 解冻后置于 4°C 冰箱冷藏。(3)制备测序文库。创建测序程序并运行。

1.3 数据分析

本检测使用靶向高通量测序技术对多种微生物进行平行检测, 通过生物信息技术分析鉴定样本中可疑病原体, 辅助临床医生进行综合分析判断和制订个体化精准治疗方案。

1.3.1 生信分析基本流程

生信分析(bioinformatics analysis)是运用新的高通量分子生物技术收集并分析大量组学数据, 进而在数据研究基础上对生物医学问题进行研究、开发, 见图 1。

1.3.2 报告审核流程

报告审核流程见图 2。

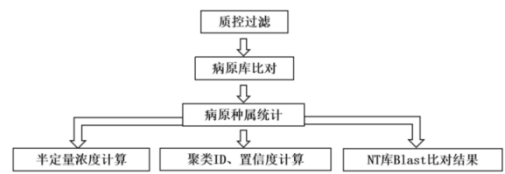


图 1 生信分析流程

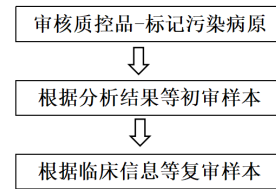


图 2 审核报告流程

质控点一: 质粒; 用于判断样本与接头是否匹配, 是否存在样本混淆。质粒匹配, 正常审核; 质粒不匹配, 暂停审核, 查找原因; 如实验无法确认, 需安排重新实验。

质控点二: Q30; 用于衡量测序质量。整个 RUN 的 Q30 < 75%, 测序失败, 建议整个 RUN 重上机; 整个 RUN 的 Q30 ≥ 75%, 整批次测序合格; 审核样本 Q30 ≥ 75%, 指标合格; 审核样本 Q30 < 75%, 测序失败, 建议重新建库或重新测序。

质控点三: 数据量; 数据量过低, 可能会存在病原体漏检情况。原始数据量 < 50 K, 质控不合格, 重新实验。50 K ≤ 原始数据量 < 100 K, 若有明确病原体检出, 则可根据样本信息, 正常审核; 若阴性检出, 则重新实验。原始数据量 ≥ 100 K, 正常审核。

2 结果与分析

本实验共检测 96 种病原体, 其中革兰阳性菌 10 种, 革兰阴性菌 12 种, DNA 病毒 31 种, RNA 病毒 39 种, 支原体 / 衣原体 4 种。本研究中 107 例患儿共检测出 30 种病原微生物, 详见表 1。

表 1 检测病原体

病原体	例数	病原体	例数
百日咳鲍特菌	7	金黄色葡萄球菌	9
肺炎支原体	107	巨细胞病毒(CMV)	1
卡他莫拉菌	6	人呼吸道病毒 3 型(人副流感病毒 3 型)	2
咽峡炎链球菌	32	单纯疱疹病毒 1 型(HSV-1)	3
中间链球菌	15	新型冠状病毒(Omicron_XBB.1)	4
流感嗜血杆菌	31	卡他莫拉菌	3
人呼吸道病毒 1 型(人副流感病毒 1 型)	3	星座链球菌	6
鲍曼不动杆菌	70	EB 病毒(EBV)	4
鼻病毒 A 型	12	人腺病毒 2 型	3
肺炎克雷伯菌	3	化脓链球菌	1
鼻病毒 B 型	6	人呼吸道合胞病毒 A 型	3

续表

病原体	例数	病原体	例数
柯萨奇病毒 A6 型	5	嗜麦芽窄食单胞菌	1
肺炎链球菌	9	人偏肺病毒	4
人腺病毒 3 型	2	人博卡病毒 1 型	1
鼻病毒 C 型	2	人腮腺炎病毒 4 型(人副流感病毒 4 型)	1

107 例患儿肺炎支原体全部检出, 均为大环内酯类抗生素 23S rRNA:A2063G, 各样本检测出的情况不同。见表 2。从表可看出, 不同年龄组的儿童肺炎支原体的检出率均为 100%。

表 2 不同年龄分组儿童肺炎支原体及耐药基因检出情况

年龄分组	组内人数	肺炎支原体检出人数	肺炎支原体检出率	耐药基因检出人数	耐药基因检出率
婴幼儿 (28 天~23 个月)	5	5	100%	5	100%
儿童 (24 个月~11 周岁)	96	96	100%	96	100%
青少年(12~17 周岁)	6	6	100%	5	83%

3 讨论与结论

目前认为肺炎支原体对抗生素的耐药机制主要与 23S rRNA 区基因位点突变(2063 位和 2064 位)相关, 可导致核糖体与大环内酯类药物亲和力下降而引起耐药^[8]。耐药基因是导致难治性肺炎支原体感染与重症患者增多的主要因素。本次研究成功运用多重 PCR 靶向测序技术对 107 例患儿进行检测, 在众多病原体中精准识别出 30 种病原微生物, 其中肺炎支原体在所有患儿样本中均被检出, 且耐药基因 23S rRNA:A2063G 呈现出 100% 检出率, 与施李芬等^[9] 研究结果相近, 不同年龄分组间虽有差异但总体形势严峻。本次研究凸显了该技术在肺炎支原体耐药疾病诊断中的关键作用, 为临床快速、准确判断感染病原体及耐药情况提供了有力支持, 有助于打破传统诊断方法的局限, 及时指导治疗方案的制订, 避免因经验性用药延误病情或加剧耐药问题。

既往研究表明, 传统检测方法如培养法耗时长、阳性率低, 难以满足临床快速诊断需求^[10]; 血清学检测虽能检测抗体, 但无法区分感染与既往感染, 且不能检测耐药基因。分子生物学技术的发展为解决这些问题带来希望, 多重 PCR 靶向测序技术整合了 PCR 扩增的高灵敏度和测序技术的精准性, 可一次性筛查多种病原体及耐药基因, 在感染性疾病诊断领域展现出巨大潜力。已有研究在其他细菌或病毒感染检测中应用类似技术取得良好效果, 为本研究在肺炎支原体耐药检测方面提供了技术思路和方法学参考。在耐药机制研究上, 虽然已知 23S rRNA:A2063G 突变与耐药相关, 但对于其他可能参与耐药的基因或因素知之甚少, 需要进一步深入探究肺炎支原体耐药的分子机制全貌。未来可进一步扩大样本量, 涵盖不同地区、年龄、病情严重程度的患者群体, 以增强研究结果的普遍性和代表性。

呼吸道病原多重 PCR 检测能在同一反应管中检测多种病原

体, 减少检测时间, 也可避免资源浪费, 节约成本, 为临床提供更为科学的诊断方案^[11]。tNGS 将超多重 PCR 与高通量测序技术相结合, 能对样本中的几十甚至上百种病原微生物等进行检测, 不仅可提高灵敏度, 同时也能促使分析结果得到简化, 节约成本, 提高性能, 实现双重优化。

综上所述, 耐药菌株的出现, 导致临床治疗难度增加。在日常生活中, 医护人员需合理使用大环内酯类抗生素, 促使耐药状况得到缓解, 也需早日识别患儿耐药情况, 提供最佳治疗措施, 从而有效提升儿童肺炎支原体感染的临床疗效。

参考文献

- [1] SETO WH, CONLY JM, PESSOA-SILVA CL, *et al.* Infection prevention and control measures for acute respiratory infection in healthcare settings: an update [J]. *East Mediterr Health J*, 2020, 22(01): 39-47.
- [2] BEZERRA PG, BRITTO MC, CORREIA JB, *et al.* Viral and atypical bacterial detection in acute respiratory infection children under five years [J]. *PLoS ONE*, 2021, 6(04): 918-928.
- [3] UNGER SA, BOGAERT D. The respiratory microbiome and respiratory infections [J]. *J Infect*, 2019, 74(02): 84-88.
- [4] 谢正德, 邓继岩, 任丽丽, 等. 儿童呼吸道感染病原体核酸检测专家共识 [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2022, 37(05): 321-332.
- [5] DIAZ M H, 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(01): 124-130.
- [6] CHENG Y, CHENG YJ, DAI SZ, *et al.* The prevalence of *Mycoplasma pneumoniae* among children in Beijing before and during the COVID-19 pandemic [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 854505.
- [7] GAO LW, YIN J, HU YH, *et al.* The epidemiology of paediatric *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in North China: 2006 to 2016 [J]. *Epidemiol Infect*, 2019, 147: e192.
- [8] 姚慧生, 张睿, 刘立云, 等. 肺炎支原体耐药基因检测与难治性肺炎支原体肺炎的相关性分析 [J]. *国际儿科学杂志*, 2016, 43(06): 492-496.
- [9] 施李芬, 陈俐丽, 余坚, 等. 24 例 23S rRNA A2063G 基因突变肺炎支原体肺炎临床分析 [J]. *中国小儿急救医学*, 2017, 24(03): 205-209.
- [10] 王敏, 郑业焕, 付光宇. 培养法与 PCR 法对肺炎支原体临床检测及耐药分析 [J]. *医学研究杂志*, 2013, 2: 164-166.
- [11] 陈钟英, 曾妍, 高正炎. 儿童社区获得性肺炎病原学特征分析及预防对策 [J]. *中国医药科学*, 2020, 10(05): 107-110.