

DOI:10.3969/j.issn.1671-9638.2017.04.009

· 论 著 ·

## 182 株儿童患者肺炎链球菌的分子生物学鉴定及分型

郭映辉<sup>1</sup>, 何宝花<sup>2</sup>, 王颖童<sup>2</sup>, 贾肇一<sup>2</sup>, 王 茜<sup>2</sup>, 李贵霞<sup>1</sup>, 张文超<sup>1</sup>, 孙印旗<sup>2</sup>, 陈素良<sup>2</sup>

(1 河北省儿童医院, 河北 石家庄 050031; 2 河北省疾病预防控制中心, 河北 石家庄 050021)

**[摘要]** **目的** 对来自患儿的肺炎链球菌进行分型, 为肺炎链球菌疫苗的正确选择提供科学依据。**方法** 收集 2014 年来自河北省儿童医院的 182 株肺炎链球菌, 普通 PCR 对肺炎链球菌进行种属鉴定, 应用多重 PCR 方法对菌株进行菌型分析。**结果** 经 PCR 检测 182 株菌的 *cpsA* 基因扩增均为阳性; 经多重 PCR 检测, 除 8 株未分型菌株外, 其余 174 株肺炎链球菌中, 以 19F、19A 和 6A/6B 型数量最多, 分别为 68 株(37.36%)、33 株(18.13%) 和 26 株(14.28%), 其余型别有 35B 型、14 型、6C/6D 型、23F 型、15B/15C 型等。**结论** 182 株肺炎链球菌的菌型主要为 19F、19A 和 6A/6B, 为该省肺炎链球菌疫苗的正确选择和制订使用策略提供了科学依据。

**[关键词]** 肺炎链球菌; 多重 PCR; 菌型鉴定; 种属鉴定; *cps* 基因

**[中图分类号]** R181.3<sup>+</sup>2 R378.1<sup>+</sup>2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2017)04-0326-04

## Molecular identification and typing of 182 strains of *Streptococcus pneumoniae* isolated from children

GUO Ying-hui<sup>1</sup>, HE Bao-hua<sup>2</sup>, WANG Ying-tong<sup>2</sup>, JIA Zhao-yi<sup>2</sup>, WANG Qian<sup>2</sup>, LI Gui-xia<sup>1</sup>, ZHANG Wen-chao<sup>1</sup>, SUN Yin-qi<sup>2</sup>, CHEN Su-liang<sup>2</sup> (1 Children's Hospital of Hebei Province, Shijiazhuang 050031, China; 2 Center for Disease Control and Prevention of Hebei Province, Shijiazhuang 050021, China)

**[Abstract]** **Objective** To type *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) isolated from children, and provide scientific basis for the correct selection of *S. pneumoniae* vaccine. **Methods** 182 strains of *S. pneumoniae* were collected from Children's Hospital of Hebei Province in 2014, species of strains were identified by polymerase chain reaction (PCR), types of strains were analyzed with multiplex PCR. **Results** PCR detection showed that *cpsA* gene amplification of 182 strains were all positive; multiplex PCR detection revealed that except 8 strains were not typed, the main types of the remaining 174 strains were 19 F ( $n = 68$ , 37.36%), 19A ( $n = 33$ , 18.13%), and 6A/6B ( $n = 26$ , 14.28%), the other types were 35B, 14, 6C/6D, 23F, 15B/15C, and so on. **Conclusion** The main types of 182 strains of *S. pneumoniae* are 19 F, 19A, and 6A/6B, which provide scientific basis for the correct selection of *S. pneumoniae* vaccine for this province.

**[Key words]** *Streptococcus pneumoniae*; multiplex polymerase chain reaction; bacterial typing; species identification; *cps* gene

[Chin J Infect Control, 2017, 16(4): 326-329]

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, Sp)感染是重要的全球性疾病, 可引起肺炎、婴幼儿急性化脓性中耳炎和细菌性脑膜炎, 每年全球至少有

100 万左右 5 岁以下的儿童死于肺炎链球菌相关疾病, 2 岁以下儿童受到的危害更严重<sup>[1]</sup>。由于肺炎链球菌的高发病率和致死率, 其疫苗推广十分重要,

[收稿日期] 2016-06-26

[基金项目] 河北省科技支撑计划项目(14277733D)

[作者简介] 郭映辉(1974-), 女(汉族), 河北省邢台市人, 主任技师, 主要从事临床微生物检验研究。

[通信作者] 孙印旗 E-mail: hbsunyq@hotmail.com

但目前疫苗的保护范围有限,无法覆盖所有菌型。因此,为正确和有效地免疫儿童,迫切需要了解肺炎链球菌菌型种类及其分布情况。

荚膜是肺炎链球菌最主要的致病因子,其生成主要由荚膜合成基因簇(*cps*)调控,该基因几乎存在于所有肺炎链球菌中,且高度保守,本研究中用于鉴定肺炎链球菌的 *cpsA* 引物以及用于分型的引物大多来自 *cps* 基因簇,且大多经 Southern 印迹实验的检验<sup>[2]</sup>。基于 PCR 技术的分子鉴定及分型方法敏感性高,操作简便,成本较低,已经成为肺炎链球菌血清分型的首选方法。世界卫生组织(WHO)手册在关于流行性脑膜炎、肺炎链球菌和流感嗜血杆菌引起的脑膜炎诊断方法一节介绍了肺炎链球菌的 PCR 分型方法<sup>[3]</sup>。本研究利用分子生物学方法对 2014 年河北省儿童医院分离的 182 株来自儿童患者的肺炎链球菌进行分型,初步了解该省儿童患者致病性肺炎链球菌菌型特点,科学评价该省现行的肺炎链球菌疫苗使用策略,为肺炎链球菌疫苗的正确选择提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株来源 2014 年河北省儿童医院对临床诊断为大叶性肺炎、气管炎、中耳炎、胸膜炎、心内膜炎及败血症等病例进行相关标本采集,标本经初步生化鉴定共分离 182 株肺炎链球菌,全部纳入研究。菌株分离自痰、血、脑脊液、肺泡灌洗液、臀部脓肿穿刺液、胸腔积液、气管内分泌物、眼分泌物和关节腔脓液等标本,所有菌株均分离自 8 岁以下儿童,其中 150 株来自 2 岁以下儿童。

1.1.2 仪器与试剂 哥伦比亚血琼脂培养基购自广州市迪景微生物科技有限公司,PCR Premix 体系、DNA Marker 购自大连宝生物工程公司,引物由北京华大基因公司合成。9700 型普通 PCR 仪为美国 ABI 公司生产,5417 型离心机为德国 Eppendorf 公司生产,1285 型生物安全柜为美国 Thermo 公司生产,MCO-18AIC 型 CO<sub>2</sub> 培养箱为日本三洋公司生产,164-5050 型电泳仪为美国伯乐公司生产,G Box F3 型紫外凝胶成像仪为英国 Syngene 公司生产。

### 1.2 方法

1.2.1 DNA 模板的制备 将收集的菌株接种于哥伦比亚血琼脂培养基上,置 CO<sub>2</sub> 培养箱中,在 5%

CO<sub>2</sub>、35℃条件下培养 18~20 h。挑取一定量的新鲜培养物,悬浮于 200 μL 超纯水中,涡旋振荡,沸水浴 20 min 后,12 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液制备菌株 DNA 模板,-20℃保存备用。

1.2.2 菌株种属鉴定 对菌株进行种属特异性基因 *cpsA* 的普通 PCR 鉴定,引物序列 *cpsA*-F:GCA GTA CAG CAG TTT GTT GGA CTG ACC, *cpsA*-R:GAA TAT TTT CAT TAT CAG TCC CAG TC,反应条件为:94℃预变性 4 min,94℃变性 45 s,54℃退火 45 s,72℃延伸 90 s,35 个循环后 72℃再延伸 5 min。PCR 扩增结束后,在浓度为 1.0%琼脂糖中进行电泳,电压为 5 V/cm,电泳 1 h,紫外凝胶成像仪观察并采集图像。

1.2.3 多重 PCR 分型 分 9 个反应依次对待测样品进行 PCR 分型,每个反应均包括多对不同的血清型引物及作为内对照的 *cpsA* 引物,引物序列参照文献<sup>[3]</sup>报道,扩增条件:95℃预变性 15 min,94℃变性 30 s,54℃退火 90 s,72℃延伸 60 s,35 个循环后 72℃再延伸 10 min,PCR 扩增结束后,在浓度为 1.0%琼脂糖中进行电泳,电压为 5 V/cm,电泳 1 h,紫外凝胶成像仪观察并采集图像。根据扩增片段长度,确定样品所属型别。引物分组见表 1。

表 1 多重 PCR 引物分组情况

Table 1 Grouping of multiplex PCR primers

分组	血清型
1	6(6A/6B/6C/6D),3,19A,22F/22A,16F
2	8,33F/33A/37,15A/15F,7F/7A,23A
3	19F,12F/12A/44/46,11A/11D,38/25F,35B
4	24(24A/24B/24F),7C/7B/40,4,18(18A/18B/18C/18F),9V/9A
5	14,1,23F,15B/15C,10A
6	39,10F/10C/33C,5,35F/47F,17F
7	23B,35A/35C/42,34,9N/9L,31
8	21,2,20,13
9*	6C/6D

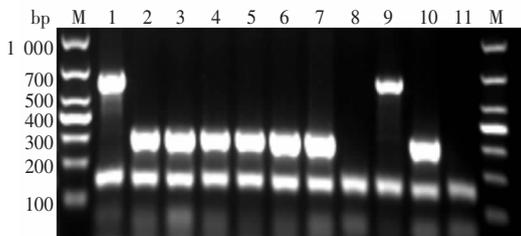
\*:当 6(6A/6B/6C/6D)为阳性时,进行第 9 组多重 PCR,若 6C/6D 型检测阳性即为此型,否则为 6A/6B 型

## 2 结果

2.1 菌株种属鉴定结果 182 株菌经 PCR 鉴定, *cpsA* 基因均为阳性。

2.2 多重 PCR 分型检测结果 经多重 PCR 分型检测,19F、19A 和 6A/6B 三种菌型所占比率最多,分别为 37.36%、18.13%和 14.28%。图 1 为部分菌株第 3 组多重 PCR 电泳图,菌株均在 160 bp 处有一条带,此条带为内参基因 *cpsA* 条带。菌株 1

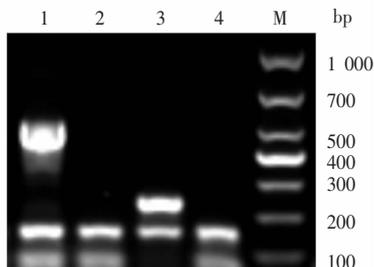
和 9 在 677 bp 处有一电泳条带,菌型为 35B;菌株 2~7 和 10 在 304 bp 处有一条带,菌型为 19F;菌株 8 和 11 为阴性。图 2 为部分菌株第 1 组多重 PCR 电泳图,菌株均在 160 bp 处有一条带,菌株 1 在 566 bp 处有一电泳条带,菌型为 19A,菌株 3 在 250 bp 处有一条带,菌型为 6。其余菌株的型别为:35B 型(9 株)、14 型(7 株)、6C/6D 型(6 株)、23F 型(6 株)、15B/15C 型(5 株)、1 型(4 株)、24 型(24A/24B/24F)(2 株)、3 型(2 株)、7C/7B/40 型(2 株)、5 型(1 株)、12F/12A/44/46 型(1 株)、35A/35C/42 型(1 株)、15A/15F 型(1 株);有 8 株菌不能分型。见表 2。



M:DNA Marker;1~11:1~11 号肺炎链球菌

图 1 肺炎链球菌第 3 组多重 PCR 产物电泳图

Figure 1 Electrophoresis map of multiplex PCR products of group 3 *S. pneumoniae*



M:DNA Marker;1~4:1~4 号肺炎链球菌

图 2 肺炎链球菌第 1 组多重 PCR 产物电泳图

Figure 2 Electrophoresis map of multiplex PCR products of group 1 *S. pneumoniae*

### 3 讨论

肺炎链球菌是严重危害儿童和老年人身体健康的病原菌之一。目前已知的肺炎链球菌有 90 多个血清型/群,只有少部分血清型/群能够导致人群发病<sup>[4]</sup>,但能引起所有年龄组的高发病率和病死率,在世界范围内是一个严重的公共卫生问题<sup>[5]</sup>。

随着分子生物学的发展,各种分子生物学手段应用到病原微生物学的研究中,其中 PCR 方法是一种灵敏度高、操作简便、成本较低的方法,可广泛应用于肺炎链球菌的日常监测工作。荚膜是肺炎链球

表 2 肺炎链球菌分型结果及构成比

Table 2 Typing and constituent ratios of *S. pneumoniae*

菌型	菌株数	构成比(%)
19F	68	37.36
19A	33	18.13
6A/6B	26	14.28
35B	9	4.94
14	7	3.85
6C/6D	6	3.30
23F	6	3.30
15B/15C	5	2.75
1	4	2.20
24(24A/24B/24F)	2	1.10
3	2	1.10
7C/7B/40	2	1.10
5	1	0.55
12F/12A/44/46	1	0.55
35A/35C/42	1	0.55
15A/15F	1	0.55
未分型	8	4.39

菌最主要的致病因子,而荚膜的产生主要是由荚膜合成基因簇(*cps*)调控的,它几乎存在于所有肺炎链球菌基因组中,用 *cpsA* 引物鉴定肺炎链球菌方便准确。目前,肺炎链球菌的血清学分布监测工作主要是对收集菌株进行培养及血清学鉴定,所用血清比较昂贵,结果解释对操作人员的经验要求较高,是血清学分群/型的主要缺点。世界卫生组织推荐的建立在 PCR 技术基础上的血清分型技术可以克服传统血清分群/型技术的不足,用于临床上一些不能直接用血清鉴定菌株的分型,以及对传统血清学分型方法不敏感菌株的检测<sup>[3,6]</sup>,且无主观偏差,实验结果更可靠,操作便捷、省时,成本较低,该分型方法是以 *cpsA* 基因为靶基因,设计一系列引物,建立起来的检测血清型的多重 PCR 方法<sup>[7]</sup>。通过比较分析美国、巴西和南非等国家分离的菌株,证实多重 PCR 分型方法与传统的血清型方法具有良好的相关性<sup>[8-9]</sup>。但本研究中所采用的分子生物学方法鉴定肺炎链球菌种属及型别也存在一定的局限性,虽 *cpsA* 基因序列高度保守,但也有文献报道由于基因的缺失或突变导致极少数菌株不能扩增出 *cpsA* 基因<sup>[10]</sup>,但本研究中未发现类似情况。

肺炎链球菌的发病率及病死率较高,而疫苗的使用是一种有效的预防手段,目前全球较常见的肺炎链球菌疫苗有 7 价肺炎链球菌结合疫苗(PCV 7)、13 价肺炎链球菌结合疫苗(PCV 13)和 23 价肺炎链球菌多糖疫苗(PPV 23),疫苗的使用可以使肺炎链球菌相关疾病的发病率明显降低、呈现较高的

保护力<sup>[11]</sup>。本研究中所用引物可鉴别肺炎链球菌 1、3、4、5、6A/B、7A/F、9A/V、14、15A、18A/B/C/F、19A、19F、23F 等血清型/群,研究结果可为正确选择肺炎链球菌疫苗提供科学依据,但疫苗的长期使用会导致血清流行病学方面的变化<sup>[12-13]</sup>。近年来,非疫苗覆盖血清型/群肺炎链球菌感染病例逐渐增多,针对肺炎链球菌所开展的监测工作已经成为肺炎链球菌相关疾病预防控制工作的重要组成部分。目前全球范围内 6C、6D 型肺炎链球菌导致的病例不断增多<sup>[14]</sup>,有研究发现现有疫苗对 6C 血清型菌株的侵袭没有保护性,本研究中有 6 株肺炎链球菌是 6C/6D 型,占 3.30%,需要对此类菌型进行重点监测。以 PCR 技术为基础的分型方法能鉴定的肺炎链球菌血清型/群有一定局限性,如本试验中有 8 株肺炎链球菌未能分型,另外,一些分型引物为血清群特异性而非血清型特异性,如 6A/6B 引物阳性结果的菌株可能是血清型 6A 或血清型 6B,这些需在以后研究中完善。

本研究利用分子生物学方法进行肺炎链球菌种属及菌型鉴定,为临床病原微生物的鉴定提供了一种快速、灵敏、客观和低成本的方法。目前,河北省关于肺炎链球菌菌型情况的相关报道较少,本研究中 182 株肺炎链球菌主要血清型为 19F、19A 和 6A/6B,该结果丰富了该省儿童致病性肺炎链球菌的菌型资料,与我国其他地区的菌型结果基本一致<sup>[15-16]</sup>,目前现有的三种疫苗中,PCV13 和 PPV23 均覆盖这三种血清型,为肺炎链球菌疫苗的正确选择和制订肺炎链球菌疫苗的使用策略提供了科学依据。

#### [参 考 文 献]

[1] World Health Organization. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization WHO position paper[J]. Wkly Epidemiol Rec, 2007, 82 (12): 93 - 104.

[2] O'Halloran DM, Cafferkey MT. Multiplex PCR for identification of seven *Streptococcus pneumoniae* serotypes targeted by a 7-valent conjugate vaccine[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43 (7): 3487 - 3490.

[3] World Health Organization. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* [M]. 2nd, WHO Manual, 2011.

[4] Kyaw MH, Rose CE Jr, Fry AM, et al. The influence of

chronic illnesses on the incidence of invasive pneumococcal disease in adults[J]. J Infect Dis, 2005, 192(3): 377 - 386.

- [5] O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates[J]. Lancet, 2009, 374(9693): 893 - 902.
- [6] Pai R, Gertz R, Beall B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(1): 124 - 131.
- [7] Iraurgi P, Torres MJ, Gandia A, et al. Modified sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of invasive pneumococci recovered from Seville[J]. Clin Microbiol Infect, 2010, 16(9): 1504 - 1507.
- [8] Njanpop Lafourcade BM, Sanou O, van der Linden M, et al. Serotyping pneumococcal meningitis cases in the African meningitis belt by use of multiplex PCR with cerebrospinal fluid [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(2): 612 - 614.
- [9] Dias CA, Teixeira LM, Carvalho Mda G, et al. Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children[J]. J Med Microbiol, 2007, 56(Pt 9): 1185 - 1188.
- [10] Brito DA, Ramirez M, de Lencastre H, et al. Serotyping *Streptococcus pneumoniae* by multiplex PCR[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(6): 2378 - 2384.
- [11] Camargo DR, Pais FS, Volpini AC, et al. Revisiting molecular serotyping of *Streptococcus pneumoniae* [J]. BMC Genomics, 2015, 16(Suppl 5): S1.
- [12] Pichon B, Ladhani SN, Slack MP, et al. Changes in molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* causing meningitis following introduction of pneumococcal conjugate vaccination in England and Wales[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(3): 820 - 827.
- [13] Rudolph K, Bruce MG, Bulkow L, et al. Molecular epidemiology of serotype 19A *Streptococcus pneumoniae* among invasive isolates from Alaska, 1986 - 2010[J]. Int J Circumpolar Health, 2013, 72: 20854.
- [14] Nahm MH, Lin J, Finkelstein JA, et al. Increase in the prevalence of the newly discovered pneumococcal serotype 6C in the nasopharynx after introduction of pneumococcal conjugate vaccine[J]. J Infect Dis, 2009, 199(3): 320 - 325.
- [15] 陈驰, 肖磊, 石继春, 等. 277 株肺炎链球菌生物学鉴定及血清学分型结果分析[J]. 中国医药导刊, 2011, 13(10): 1774 - 1775.
- [16] 钱婧, 薛莲, 谢贵林, 等. 171 株儿童侵袭性肺炎链球菌血清分型和多位点序列分型研究[J]. 临床儿科杂志, 2012, 30 (2): 187 - 191.

(本文编辑:豆清娅)