

## 肺炎链球菌经典血清分型与分子分型两种方法比较\*

梁丽霞, 中学基, 高少东, 李南洋, 李成德, 李海珠  
(肇庆市第一人民医院检验科, 广东肇庆 526000)

**摘要:**目的 比较肺炎链球菌经典血清分型法与分子分型法, 为建立快速、准确的血清分型方法提供依据。方法 选取2013年10月~2015年2月肇庆市第一人民医院住院患者分离的150株肺炎链球菌为研究对象, 分别采用经典荚膜肿胀法和多重PCR法进行血清分型。比较两种方法的分型率及血清分型结果, 用两独立样本的非参数检验对分型率高的几种血清型进行统计分析对比, 并计算结果的总符合率、灵敏度及特异度。结果 肺炎链球菌经典荚膜肿胀法分型率为53.3%, 血清群以19群(32.7%), 6群(7.3%)和23群(4%)为主, 使用单因子血清分得血清型19F(23.3%), 19A(2.7%), 6C(2%)和23F(2.7%)。多重PCR法分型率为76.0%, 血清群以19群(41.3%), 6群(10.7%)和23群(10.7%)为主, 具体的血清型以19F(32.7%), 19A(8.0%), 6(10.7%)和23F(9.3%)为主, 采用两独立样本的非参数检验进行比较, 以血清型结果为19F, 19A和23F作对比, 统计结果 $P>0.05$ , 显示两种分型方法结果分布类别上相同, 无显著性差异; 两种方法结果总符合率为74.6%; 以多重PCR法验证经典荚膜肿胀法的敏感度, 敏感度为70.2%, 特异度为100%, 显示经典荚膜肿胀法敏感度不及分子分型法。结论 与传统的血清学分型技术相比, 分子分型技术具有快速、准确、灵敏及分辨力高等优点, 成为可依赖的分型手段。

**关键词:**肺炎链球菌; 经典荚膜肿胀法; 分子分型; 多重PCR

中图分类号: R378.12; R392.11 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2016)03-073-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.03.020

## Comparison of Classical and Molecular Typing Methods for *Streptococcus Pneumoniae*

LIANG Li-xia, SHEN Xue-ji, GAO Shao-dong, LI Nan-yang, LI Cheng-de, LI Hai-zhu

(Department of Clinical Laboratory,

the First People's Hospital of Zhaoqing, Guangdong Zhaoqing 526000, China)

**Abstract:** **Objective** To compare classical and molecular typing methods for *Streptococcus pneumoniae*, in order to provide fast and accurate method for classification. **Methods** Selected the 150 strains of *Streptococcus pneumoniae* which isolated from the First People's Hospital of Zhaoqing from October 2013 to February 2015 for the research objects, using the classical quellung classification method and molecular typing of multiple PCR method for classification. Compared the result and the rate of the classification, used the non parametric test of two independent samples for statistical analysis several higher rate of serotypes, and calculated the total coincidence rate, sensitivity and specificity. **Results** The typing rate of *Streptococcus pneumoniae* capsular was 53.3%, and the main serum group were 19(32.7%), 6(7.3%) and 23(4%) respectively. The serotype of 19F(23.3%), 19A(2.7%), 6C(2%) and 23F(2.7%) respectively by single factor serum. The typing rate of the multiple PCR method was 76.0%, and the main serum group were 19(41.3%), 6(10.7%) and 23(10.7%). The serotype were mainly 19F(32.7%), 19A(8.0%), 6(10.7%) and 23F(9.3%). Used the 2 Independent Sample Test for statistical analysis, compared with the serotypes 19F, 19A and 23F ( $P>0.05$ ). There was no statistically significant difference in the distribution of the types of the two methods. The total coincidence rate was 74.6%. To verify the classic quellung method by multiple PCR method, sensitivity was 70.2%, and specificity was 100%. That showed the capsular swelling method was less sensitivity than the molecular typing method. **Conclusion** Compared with the traditional serological typing techniques, molecular typing technique have the advantages of fast, accurate, sensitive and high resolution, and become the classification method which can be rely on.

**Keywords:** *Streptococcus pneumoniae*; classic capsular swelling method; molecular typing; multiple PCR

肺炎链球菌(*streptococcus pneumonias*, SP)为革兰阳性双球菌, 主要威胁儿童和老年人, 是引起儿童和成人社区获得性肺炎的重要致病菌。中国病例数占全球的12%, 是5岁以下儿童因感染而

死亡数最多的国家之一<sup>[1]</sup>。肺炎链球菌已成为重要的全球公共卫生问题, 除了疫苗, 目前没有公共卫生策略能降低其发病率<sup>[2]</sup>。肺炎链球菌外层荚膜多糖使机体产生保护性抗体而用于疫苗的制备。

\* 作者简介: 梁丽霞(1980-), 女, 硕士, 主管技师, 主要从事临床检验工作, 研究方向: 病原微生物分子检验, Tel: 0758-2102763, E-mail: miki128@126.com。

监测肺炎链球菌血清型,可为肺炎链球菌疫苗制备以及疾病预防提供重要的科学依据。

传统的肺炎链球菌血清分型方法是经典荚膜肿胀法<sup>[3]</sup>,虽然起到重要的作用,但存在局限性,如分辨力不高、操作步骤繁琐及判断结果存在主观性等。随着荚膜多糖基因序列(cps)的出现,分子分型技术因具备灵敏、快速、准确、分辨力高和特异度高等优点而逐渐广泛应用。本文对同一标本,分别采用经典荚膜肿胀法和多重 PCR 法进行血清分型,为建立快速、准确的血清分型方法提供依据。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 150 株肺炎链球菌分离株均来自肇庆市第一人民医院 2013 年 10 月~2015 年 2 月住院患者的各类送检标本中(排除相同患者同一部位重复分离菌株)。

1.2 试剂与仪器 哥伦比亚血平板, VITEK compact 型全自动分析系统, 棋盘式分型系统(pneumotest kit)试剂盒(丹麦国家血清研究所), 0.1 g/dl 的亚甲蓝溶液, Leica DM2000 显微镜, QIAamp<sup>®</sup>DNA Mini Kit 核酸提取试剂盒, 肺炎链球菌血清型分型引物, Taq DNA 聚合酶, PCR 扩增仪等。

## 1.3 实验方法

1.3.1 细菌分离鉴定:细菌分离培养按《全国临床检验操作规程》进行,挑取待测菌落在血平板上作奥普托欣(Optochin)试验。经 35℃ 10 ml/dl CO<sub>2</sub> 过夜孵育,若 Optochin 纸片周围抑菌环直径≥14 mm 判为 Optochin 试验敏感,可以确定该检测菌株为肺炎链球菌。若抑菌环直径为 9~13 mm 时应参照胆汁溶菌试验,其它草绿色链球菌的抑菌圈直径为≤8 mm。不敏感就可以确诊为非肺炎链球菌。所有菌株经 VITEK2 compact 型全自动微生物分析系统加以鉴定。选取标准菌株 ATCC 49619(已知血清型为 19F)作为质控菌株。

1.3.2 菌株保存:150 株肺炎链球菌菌株均以湿牛奶冷冻法置于-76℃冰箱保存。

1.3.3 细菌复苏:将肺炎链球菌冻存管从-76℃

冰箱取出至室温,挑取 3~5 μl 菌液接种于哥伦比亚血平板上,35℃,5 ml/dl CO<sub>2</sub> 培养 18~24 h。

1.3.4 传统血清学分型:经典荚膜肿胀法:①原理利用:棋盘式分型系统(pneumotest kit)分型<sup>[3]</sup>的经典荚膜肿胀方法。实验原理是肺炎链球菌特异性抗血清与荚膜抗原结合形成复合物,经染色后镜下可见细菌荚膜显著增大或出现凝集。②操作步骤:挑取肺炎链球菌菌落,放入小试管中,制成菌悬液约 0.5 麦氏单位溶液;挑取约 3 μl 菌悬液放入载玻片上,分别加入 3 μl 纵列和横行分型血清池,与菌悬液充分混匀。加入血清池的具体操作顺序从上到下、从左到右(严格按产品说明书操作);在上述混悬液中加入一接种环 0.1 g/dl 的亚甲蓝溶液放入载玻片上与抗血清混匀 1 min,盖上盖玻片,在显微镜下观察是否有荚膜或凝集出现。

1.3.5 肺炎链球菌分子分型:多重 PCR 分型方法:①DNA 提取:用 QIAamp<sup>®</sup>DNA Mini Kit 核酸提取试剂盒提取细菌 DNA。一切操作按照试剂说明书进行。②引物合成:肺炎链球菌血清型分型引物(<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/pcr.htm>)上提供的,由上海生工生物工程有限公司合成。③PCR 血清分型方案:基于美国目前主要流行血清型的肺炎链球菌 PCR 血清分型方案。④PCR 扩增:PCR 反应体系为 25 μl;Premix Taq(日本 Takara 公司)12.5 μl,引物 10 μl,ddH<sub>2</sub>O 1 μl、DNA 模板 1.5 μl。PCR 扩增条件:94℃ 4 min 预变性,94℃ 45 s 变性,54℃ 45 s 退火,72℃ 2 min 延伸 30 个循环,最后 72℃ 2 min 作末端延伸。PCR 产物电泳后观察结果。

1.4 统计学分析 使用 SPSS19.0 统计软件,以多重 PCR 法验证经典荚膜肿胀法的敏感度与特异度;采用两独立样本的非参数检验比较两种分型方法的差异是否有统计学意义。

## 2 结果

2.1 肺炎链球菌经典荚膜肿胀法分型率 见表 1。

表 1 150 株肺炎链球菌两种分型结果

方法	血清群/型[n(%)]								
	19 群				23 群			6 群	其它
	19F	19A	未分型	总数	23F	未分型	总数		
荚膜肿胀法	35(23.3)	4(2.7)	10(6.7)	49(32.7)	4(2.7)	2(1.3)	6(4.0)	11(7.3)	14(9.4)
多重 PCR	49(32.7)	12(8.0)	1(0.6)	62(41.3)	14(9.3)	2(1.3)	16(10.7)	16(10.7)	20(13.3)
									114(76.0)

肺炎链球菌经典荚膜肿胀法分型率为 53.3%(80/150),血清群以 19 群(32.7%,49/150),6 群

(7.3%,11/150),23 群(4%,6/150)为主,使用单因子血清分得血清型 19F(23.3%,35/150),19A

(2.7%, 4/150), 6C(2%, 3/150), 23F(2.7%, 4/150)为主。而多重PCR法分型率为76.0%(114/150), 血清群与经典荚膜肿胀法同以19群(41.3%, 62/150), 6群(10.7%, 16/150), 23群(10.7%, 16/150)为主, 具体的血清型以19F(32.7%, 49/150), 19A(8.0%, 12/150), 6(10.7%, 16/150), 23F(9.3%, 14/150)为主, 可见多重PCR法在肺炎链球菌血清型别的鉴定上优于荚膜肿胀法。

**2.2 统计学分析** 利用SPSS19.0软件, 采用两独立样本的非参数检验进行比较(双侧检验, 检验水准为 $\alpha=0.05$ ), 以血清型结果为19F, 19A, 23F作对比, 统计结果 $P=0.065>0.05$ , 显示两种分型方法结果分布类别上相同, 无显著性差异。两种方法结果总符合率为74.6%(112/150)。以多重PCR法验证经典荚膜肿胀法的敏感度, 敏感度为70.2%(80/114), 特异度为100%(36/36), 显示经典荚膜肿胀法敏感度不及分子分型法。

**3 讨论** 荚膜肿胀试验(Quellung反应)是1902年Neufeld用肺炎链球菌抗血清使其与同型菌荚膜发生了肿胀现象而命名。棋盘式分型系统是传统微生物学实验室肺炎链球菌血清分型的理想方法。但操作步骤比较繁琐, 所用血清费用比较昂贵, 常依赖操作者对结果解释的主观性, 要求有较高专业技能, 并且只能分到群, 细分型需要单因子抗血清<sup>[3]</sup>。本次研究显示经典血清学分型方法对群的分类较为显著, 而具体的型别结果却不明显。这些诸多因素不但对研究造成困难, 而且已经成为限制血清学分型技术普及的主要缺陷。

随着PCR技术的不断发展, 为了成功克服传统血清分型技术的缺点, 建立基于PCR技术上的分子分型方法显得尤为关键。2011年, 瑞士学者Cervaix等<sup>[4]</sup>在第一届感染预防和控制国际会议上, 报道了以多重PCR和微阵列技术相结合的新方法来自动检测肺炎链球菌的血清分型。这种方法首次利用多重PCR对肺炎链球菌溶血素、自溶素以及其它8个荚膜操纵子基因进行扩增, 相应引物被标记和点到微阵列芯片上, 在自动分子诊断系统中使用聚焦激光显微镜进行扫描结果并分析, 结果这种新技术可准确并识别出其中包括在结合疫苗中出现的13个血清型等51个肺炎链球菌血清型。此外, 以PCR技术为基础的分子分型方法可以用于一些临床上不能用血清直接识别的标本分型, 以及还能测定对一些传统血清学分型方法不敏感的样本。

本文多重PCR法比经典荚膜肿胀法分型率高, 与彭拓华等<sup>[5]</sup>研究的结果相似。主要原因是荚

膜肿胀法主要根据肺炎链球菌外层的不同多糖荚膜抗原与特异性血清发生复合物, 受荚膜影响较大。肺炎链球菌菌株经过反复传代, 由于自身产生的自溶酶, 使菌体渐渐溶解, 有报道指出普通人工培养基上荚膜容易丢失<sup>[6]</sup>, 而多重PCR是用分型引物对提取的DNA相关荚膜合成基因簇(cps)结合, 不受荚膜的影响。由于地区、年代、人群等不同因素影响, 能引起疾病的肺炎链球菌的血清型别也会不同。近几年监测显示, 2010年深圳赵瑞珍等<sup>[7]</sup>研究的肺炎链球菌血清型以19F, 23F, 6B, 4, 15B为主; 2011年李建平等<sup>[8]</sup>分析了杭州地区肺炎链球菌最常见的血清型为19F, 其次为19A, 6A, 23F和15B; 2012年南京徐飞等<sup>[9]</sup>研究的48株肺炎链球菌中以19F, 19A, 9V, 6B, 23F为主; 本文研究19A所占的比例升高, 与李建平及徐飞等<sup>[8,9]</sup>的研究结果相似。血清型替代现象削弱PCV7疫苗带来的好处, 存在生存选择性压力, 由于PCV13增加了19A型, 给肺炎链球菌带来更大的预防益处。但PCV存在荚膜血清型变化问题, 并且成本价格较高, 令许多发展中国家不能广泛推广使用<sup>[2]</sup>。

肺炎链球菌分子分型法也存在一定的缺点。虽然cpsA引物扩增的基因序列高度的保守, 但因cpsA基因的缺失或突变可能导致极少数的菌株不能扩增出阳性产物<sup>[10]</sup>。采用的分型引物设计存在一定的不足。首先, 以PCR技术为基础的分子分型方法所能鉴定的肺炎链球菌血清型/群有限, 肺炎链球菌血清型有90多种, 血清型序列只有40多种已公布, 但仍有50多种未能分型。一些分型引物为血清群特异性而非血清型特异性, 例如本次研究中6A/6B/6C/6D引物阳性扩增结果只能细分到6C/6D, 其结果可能是血清型6C, 6D; 15B/15C引物阳性扩增结果有可能是15B或15C; 不能细分型的还有15A/15F, 35A/35C/42, 7C/7B/40, 10F/10C/33C, 9V/9A, 33F/33A/37。另外, 多重PCR鉴定的结果之间存在交叉反应<sup>[11]</sup>, 如7A与7F, 6A与6B之间存在相似性, 这些不足应在后续试验中不断完善。

虽然以PCR为基础的分子分型技术具有一定的局限性, 但与经典的血清学分型技术相比, 该技术具有简单、分辨力高、敏感性强且准确可靠等优点, 可广泛应用于常规检测, 成为可依赖的分型手段。

#### 参考文献:

- [1] 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]. Lan-

- cet, 2009, 374(9693): 893-902.
- [2] 薛新娜, 陈 茶. 肺炎链球菌疫苗的研究进展[J]. 现代检验医学杂志, 2010, 25(3): 127-130.  
Xue XN, Chen C. Research progress of the vaccine of *Streptococcus pneumoniae*[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2010, 25(3): 127-130.
  - [3] 俞桑洁, 王 辉, 沈叙庄, 等. 肺炎链球菌临床检验规程的共识[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(12): 1066-1072.  
Yu SJ, Wang H, Shen XZ, et al. The consensus of clinical examination of *Streptococcus pneumoniae*[J]. Chin J Lab Med, 2012, 35(12): 1066-1072.
  - [4] Gervais A, Corbeil J, Raymond F. A new serotyping method of *S. pneumoniae* using an automated microarray-based assay[J]. Bmc Proc, 2011, 5 (Suppl 6): O28.
  - [5] 彭拓华, 李柏生, 曾洪辉, 等. 多重聚合酶链反应与荚膜肿胀试验对肺炎链球菌血清分型的比较研究[J]. 微生物与感染, 2015, 10(2): 98-102.  
Peng TH, Li BS, Zeng HH, et al. Serotyping of *Streptococcus pneumoniae* by multiplex polymerase chain reaction and capsular swelling test[J]. Journal of Microbes and Infections, 2015, 10(2): 98-102.
  - [6] 曹 杰, 屠 静, 邓 娟. 干酵母悬液对肺炎链球菌荚膜恢复的影响[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24(12): 1003.  
Cao J, Tu J, Deng J. Effect of dry yeast suspension on the recovery of *Streptococcus pneumoniae*[J]. Chin J Microbiol Immunol, 2004, 24(12): 1003.
  - [7] 赵瑞珍, 郑跃杰, 邓秋莲, 等. 广东省深圳社区获得性肺炎患儿肺炎链球菌的血清群/型的分布及其耐药性[J]. 中国感染与化疗杂志, 2010, 10(3): 205-208.  
Zhao RZ, Zheng YJ, Deng QL, et al. Serotype/serogroup distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* in children with community-acquired pneumonia in Shenzhen area[J]. Chin J Infect Chemother, 2010, 10(3): 205-208.
  - [8] 李建平, 叶 青, 沈月芳, 等. 以 CLSI(2009)标准评估杭州地区小儿肺炎链球菌的耐药性及其血清型分布研究[J]. 浙江检验医学, 2011, 9(1): 14-16.  
Li JP, Ye Q, Shen YF, et al. Study on distribution serotype and the drug resistance of *Streptococcus pneumoniae* of children in Hangzhou area by CLSI(2009) standard[J]. Zhejiang Journal of Laboratory Medicine, 2011, 9(1): 14-16.
  - [9] 徐 飞, 迟富丽, 谈 华, 等. 48 株儿童侵袭性肺炎链球菌血清型分布[J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(6): 909-910, 912.  
Xu F, Chi FL, Tan H, et al. Study on serotype distribution in 48 isolates of invasive *Streptococcus pneumoniae* with which children infected[J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2012, 33(6): 909-910, 912.
  - [10] 李马超, 张 砾, 李 倩, 等. 肺炎链球菌 PCR 分型技术的建立与应用[J]. 中华流行病学杂志, 2010, 31(3): 316-320.  
Li MC, Zhang L, Li Q, et al. Establishment and application of PCR method in serotyping of *Streptococcus pneumoniae*[J]. Chin J Epidemiol, 2010, 31(3): 316-320.
  - [11] 潘 芬, 张 泓. 多重聚合酶链反应在肺炎链球菌血清学分型中的应用[J]. 检验医学, 2014, 29(11): 1089-1093.  
Pan F, Zhang H. Application of multiplex polymerase chain reaction for detecting the serotypes of *Streptococcus pneumoniae*[J]. Laboratory Medicine, 2014, 29(11): 1089-1093.
- 收稿日期: 2015-09-15 修回日期: 2016-02-23
- 
- (上接 72 页)
- [9] Akagi H, Higuchi H, Sumimoto H, et al. Suppression of myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) enhances chemotherapy-associated apoptosis in gastric cancer cells[J]. Gastric Cancer, 2013, 16(1): 100-110.
  - [10] Wuillème-Toumi S, Robillard N, Gomez P, et al. Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. Leukemia[J]. Leukemia, 2005, 19(7): 1248-1252.
  - [11] Lee WS, Park YL, Kim N, et al. Myeloid cell leukemia-1 is associated with tumor progression by inhibiting apoptosis and enhancing angiogenesis in colorectal cancer[J]. Am J Cancer Res, 2014, 5(1): 101-113.
  - [12] Liu H, Peng HW, Cheng YS, et al. Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of Mcl-1 by TCTP[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(8): 3117-3126.
  - [13] 杨 威, 胡虞乾, 杨红杰, 等. Mcl-1 在肝硬化和肝癌组织中的表达及临床意义[J]. 华夏医学, 2013, 26(6): 1052-1056.  
Yang W, Hu YQ, Yang HJ, et al. Expression and clinical significance of myeloid cell leukemia sequence-1 in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma[J]. Acta Medicinæ Sinica, 2013, 26(6): 1052-1056.
  - [14] 孙凤娥, 方 浩. Mcl-1 蛋白的结构、功能及其抑制剂的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2013, 44(3): 296-302.  
Sun FE, Fang H. Progress in research of structure, function and inhibitors of Mcl-1 protein[J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2013, 44(3): 296-302.
- 收稿日期: 2015-08-25 修回日期: 2015-12-23