

· 论 著 ·

一起小规模群体肺炎链球菌感染流行的报告

方 健¹, 宋海燕¹, 陈从新¹, 刘 波¹, 张骏飞¹, 吴伟立²

[摘要] 目的 明确一次小规模不明原因发热疫情的病因。方法 常规提取 6 例发热患者和 11 例密切接触者咽拭子 DNA 和 RNA, 采用荧光定量 PCR 法检测 15 种病原体, 取扩增产物进行测序鉴定, 并与常规培养结果比对; 采用荚膜肿胀试验检测肺炎链球菌血清型。结果 在 17 例咽拭子中培养出肺炎链球菌阳性 11 例 (64.7%), 血清型鉴定为 6 群 6A 型, 未分离到其他病原菌; 在 17 例咽拭子标本中, 检出 13 例 (76.5%) 肺炎链球菌 DNA 阳性, 2 例 (11.8%) 嗜肺军团菌 DNA 阳性, 3 例 (17.6%) 肺炎支原体阳性, 1 例 (5.9%) 乙型流感病毒 RNA 阳性; 在其中 5 例中, 3 例肺炎链球菌与肺炎支原体同时阳性, 1 例肺炎链球菌与乙型流感病毒同时阳性, 另 1 例密切接触者同时检出肺炎链球菌与嗜肺军团菌; 对所有 CT 值小于 35 的咽拭子 DNA 经普通 PCR 扩增后测序, 并经 NCBI 基因库比对, 结果与相应病原体的基因组序列相符。结论 肺炎链球菌为引起此次疫情流行的主要病因。

[关键词] 发热; 聚合酶链反应; 肺炎链球菌

[中图分类号] R37 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-271X(2011)06-0485-03

The prevalence of streptococcus pneumoniae among a military camp

FANG Jian¹, SONG Hai-yan¹, CHEN Cong-xin¹, LIU Bo¹, ZHANG Jun-fei¹, WU Wei-li². 1. 105 Hospital of PLA, Hefei, Anhui 230031, China; 2. Beijing Gene Institute, Beijing 101300, China

[Abstract] **Objective** To investigate the etiological causes of fever with unknown origin in soldiers in a military camp. **Methods** The DNA and RNA from throat swabs in six soldiers with fever of unknown origin and eleven close contacts without fever were detected by real-time fluorescent quantitative PCR assay for fifteen species of common respiratory pathogens and the serotypes of streptococcus pneumoniae were determined by Quellung test. **Results** The positive of streptococcus pneumoniae detected by swab culture was 64.7% (11/17) and the predominant strain was serotype 6A. Out of the 17 swabs, the streptococcus pneumoniae was positive in 13 (76.5%) by PCR. Legionella pneumophila was in 2 (11.8%), mycoplasma pneumoniae in 3 (17.6%) and influenza B virus in 1 (5.9%). All specimens were positive for streptococcus pneumoniae detected by real-time fluorescent quantitative PCR and were confirmed by sequencing. **Conclusion** Streptococcus pneumoniae is the pathogen for this upper-respiratory infection in a military camp. The real-time PCR assay used in this study is sensitive and specific for detecting common pathogens in nasopharyngeal swabs.

[Key words] fever; polymerase chain reaction; streptococcus pneumoniae

肺炎链球菌感染的暴发主要发生在人群密集居住地如无家可归者临时居住地、白天关怀中心、监狱和军营等处所, 在高危人群如嗜酒者、老年人和危重症患者多发, 以血清 1 型、4 型、5 型和 7F 型感染较常见^[1-4]。在北京地区, 社区获得性肺炎则以 19 群和 6 群 6A 型、6B 型和 6C 型菌株较多见^[5]。军事人员在野外训练时因支原体、腺病毒和肺炎链球菌感染引起的暴发流行也时有报道^[6-7]。我们及时处

理了一起小规模群体肺炎链球菌感染流行疫情, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 流行病学资料 2010 年 6 月 11 日至 12 日某单位 17 名战士中有 6 人出现集体发热、咽痛和扁桃体肿大。该组战士曾于发病前在河北省某地执行任务。我们立即取患者咽拭子, 送江苏省疾病预防控制中心检测甲型 H1N1 流感病毒 RNA, 结果为阴性。由于病因不明, 对密切接触者进行隔离医学观察, 未进行任何疫苗注射和抗感染化疗预防。将发热患者隔离诊治, 经青霉素治疗 5 d, 全部痊愈出院。本次疫情也得到控制。治疗前取急性期咽拭子和双份血清备检。

基金项目: 全军“十一五”科技攻关项目 (2008G021)

作者简介: 方 健 (1959-), 男, 安徽合肥人, 硕士, 主任医师, 博士生导师, 从事卫勤保障和医院管理研究

作者单位: 1. 230031 安徽合肥, 解放军 105 医院; 2. 101300 北京, 中国科学院北京基因研究所

通讯作者: 吴伟立, E-mail: wuwl@big.ac.cn

1.2 咽拭子培养 无菌采集咽拭子,将洗液划线接种血平板(羊血+哥伦比亚琼脂),在 5% CO₂, 37℃ 培养 24 h,观察菌落特征。选取特征性单菌落分别接种于 THY 液体培养基中,37℃ 培养 24 h,获取分离菌的纯培养物。

1.3 荧光定量 PCR 检测 用棉头咽拭子擦拭患者咽部侧后壁,浸泡于 3 ml 生理盐水中,冲洗,置冲洗液于 -40℃ 中保存。取保存液 200 μl,提取 DNA 和 RNA(QIAamp DNA RNA 试剂盒,德国)。将 RNA 逆转录为 cDNA,并与提取的 DNA 一起放入 -20℃ 冰柜中备检。采用我们已建立的检测 15 种病原体的实时荧光定量 PCR 法分别检测每份咽拭子 DNA 和 cDNA,引物和探针见表 1。结果判断:扩增信号的 CT 值小于 35 者被认为阳性;有信号但 CT 值介于 35~40 之间者,在重复检测一次后 CT 值不变者被认为阳性;无扩增信号者被认为阴性。随后对 CT 值小于 35 的标本进行普通 PCR 扩增,所用引物同前。

1.4 扩增产物的测序 对于荧光 PCR 检测肺炎链球菌阳性标本采用 PCR-测序联检进行确认,分别针对肺炎链球菌的多个毒力基因设计相关引物,对本标本核酸进行扩增,扩增产物采用 ABI 3730XL 测序仪进行测序。

1.5 细菌血清型鉴定 采用荚膜肿胀试验(Quellung test)检测肺炎链球菌血清型,分型血清购自丹麦国家血清研究所(States Serum Institut, Denmark)。

1.6 血清学检测 取患者发热期和恢复期双份血清,根据实时荧光定量 PCR 检测咽拭子的阳性结

果,选择检测相应病原体的试剂盒。采用间接免疫荧光法(德国欧蒙公司,4 型血清型)检测抗嗜肺军团菌抗体;采用 ELISA 法(德国维润有限公司生产的赛润试剂盒)检测血清抗 MP-IgM 和-IgG。采用 ELISA 法(Abcam 相关试剂盒,北京西美杰科技有限公司)检测抗流感病毒抗体。发热时血清 IgM 抗体阳性或恢复期血清 IgG 抗体滴度与发病时相比升高 4 倍者被认为是阳性结果,而 IgM 阴性仅 IgG 阳性者,被认为系过去感染。

2 结果

2.1 咽拭子病原菌分离培养结果 在 17 例咽拭子中培养出肺炎链球菌阳性 11 例(64.7%),未分离到其他病原菌。1 例高热患者的咽拭子细菌培养阴性,可能与在入院应用抗生素后 12 h 才取标本有关。经血清型鉴定,分离到的肺炎链球菌为 6 群 6A 型。

2.2 咽拭子病原体核酸的检出情况 在 17 例咽拭子标本中,经实时荧光定量 PCR 检测,结果 13 例(76.5%)肺炎链球菌 DNA 阳性,2 例(11.8%)嗜肺军团菌 DNA 阳性,3 例(17.6%)肺炎支原体阳性,1 例(5.9%)乙型流感病毒 RNA 阳性;在其中 5 例中,3 例肺炎链球菌与肺炎支原体同时阳性,1 例肺炎链球菌与乙型流感病毒同时阳性,另 1 例密切接触者检出肺炎链球菌与嗜肺军团菌。

2.3 测序结果 对经实时荧光定量 PCR 检测阳性的咽拭子 DNA 和 cDNA 样本,应用相同的引物再进行普通 PCR 扩增,扩增产物经测序后发现其序列

表 1 检测中所用引物、探针序列和目的基因

病原体	引物和探针	序列(5'→3')	靶基因	扩增片段长度(bp)
肺炎链球菌	1	GATCGTGCTCCGATGACTTA	Ply/ltyA 基因	85
	2	AATTGCTGGGGTCTTCCACT		
	probe	CTGTTTGGCAAGTAGCGATAGCTTTCTCC		
乙型流感病毒	1	GGCTGCCACTGATGACAAGA	NP	106
	2	AAAGGTGCCTCCTGTTTGTGTTG		
	probe	AGAAGAAAAAGAATGCCAGAGATGTCAAAGAA		
肺炎支原体	1	GCA GTTGCTGCGCGCTAAGTT	P1	86
	2	AAGCGAGGTACGGTAGCGGTAT		
	probe	TGGTAGGGAAC TCGTTTTAGCGGGTACC		
嗜肺军团菌	LP-1	GCTTGCAATGTCAACAGC	mip	147
	LP-2	CCTTTAGCCATTGCTTCC		
	Probe	CTGCAACCGATGCCACATCATTA		
SARS 冠状病毒	1	AAGCCTCGCCAAAAACGTAC	NP	229
	2	AAGTCAGCCATGTTCCCGAA		
	probe	CGTCACTCAAGCATTTGGGAGACG		

分别与肺炎链球菌(图 1)、嗜肺军团菌、肺炎支原体和乙型流感病毒(图未列出)的基因序列相符。

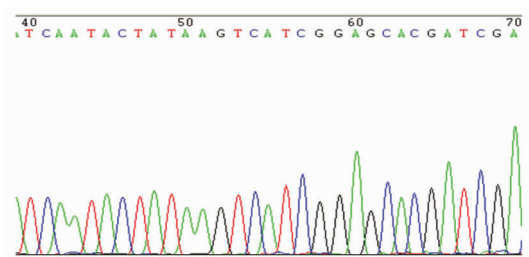


图 1 肺炎链球菌阳性产物测序的结果峰图

2.4 血清学检测情况 对发热或发热同期血清和发病 2 月后血清检测抗嗜肺军团菌抗体、抗 MP-IgM 和-IgG 和抗流感病毒抗体均阴性。

3 讨论

肺炎链球菌感染系严重的世界性问题,在新兵训练营,由于居住拥挤和易感人群的聚集,更是成为肺炎暴发的主要发病场所之一,其中由肺炎链球菌感染引起的并不鲜见^[8-10]。本组战士在执行训练任务过程中,出现集体上呼吸道感染暴发疫情,经实时荧光定量 PCR 法和咽拭子培养,确定引起本次疫情的病原体为肺炎链球菌,检测还发现携带嗜肺军团菌、肺炎支原体和流感病毒。

肺炎链球菌是具有荚膜的革兰氏阳性菌,也是引起社区获得性肺炎、败血症、脑膜炎和中耳炎的主要病原体,主要通过呼吸道传播。肺炎链球菌感染还具有较高的发病率和病死率,除了由于其对抗生素越来越不敏感外,还与对其缺乏特异性的早期快速诊断方法有关。近年来,随着各种分子生物学检测方法的应用与发展,如 DNA 探针法、换装结构介导的等温线扩增法和 TaqMan 实时荧光 PCR 法,使得对肺炎链球菌感染的快速诊断成为可能。这些方法将目的基因对准编码肺炎链球菌致病因子的基因,如自溶素 (autolysin, *lytA*)、肺炎球菌素、青霉素结合蛋白、肺炎球菌表面抗原 A 和锰依赖的超过氧化物歧化酶等,均有利于对其的快速诊断与鉴别。其中 *lytA* 和自溶酶 (pneumolysin, *ply*) 基因是实时荧光定量 PCR 法检测最常用的目的基因^[11-12]。本研究是依据 *ply* 和 *lytA* 基因片段设计的引物,实际应用证实灵敏度和特异性均较高,有益于临床病例的快速诊断。

本次分离的肺炎链球菌为 6 群 6A 型,与北京常见菌群一致,临床表现也较温和,但造成感染流行的原因不清。北京有 6C 型感染暴发的报告^[5],在欧洲和北美也有血清 5 型感染的流行,这些少见血清型是否容易暴发还有待观察。耐大环内酯类的侵入性肺炎链球菌分离株在欧洲为检出率 11% ~ 34%,在美国和中国则分别为 29% 和 94%,并可能与 *erm*(B) 和 *mef*(A) 基因的传播有关,值得进一步加以研究。

【参考文献】

- [1] Crum NF, Wallace MR, Lamb CR, et al. Halting a pneumococcal pneumonia outbreak among United States marine corps trainees [J]. Am J Prev Med, 2003, 25(2): 107-111.
- [2] Crum NF, Russell K, Kaplan EL, et al. Pneumonia outbreak associated with group A streptococcus species at a military training facility [J]. Clin Infect Dis, 2005, 40: 511-518.
- [3] Vainio A, Lyytikäinen O, Sihvonen R, et al. An outbreak of pneumonia associated with *S. pneumoniae* at a military training facility in Finland in 2006 [J]. APMIS, 2009, 117: 488-491.
- [4] Romney MG, Hull MW, Gustafson R, et al. Large community outbreak of streptococcus pneumoniae serotype 5 invasive infection in an impoverished, urban population [J]. Clin Infect Dis, 2008, 47: 768-774.
- [5] 刘尊杰, 姚开虎, 衷 林, 等. 1997-2007 年上呼吸道感染患儿鼻咽部 6 群肺炎链球菌分离株的耐药性变化 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2010, 10(3): 182-187.
- [6] 夏文明, 金丽芬, 吴 扬, 等. 部队野外作训卫勤保障探讨 [J]. 东南国防医药, 2010, 12(6): 573-574.
- [7] 张阳根, 邓小军, 陈 彬, 等. 常规军事训练对新兵血清生化指标的影响 [J]. 东南国防医药, 2010, 12(5): 388-390.
- [8] 方 健, 宋海燕, 陈从新, 等. 一起肺炎支原体感染暴发的报告 [J]. 中华疾病控制杂志, 2008, 12(4): 347-349.
- [9] Metzgar D, Osuna M, Kajon AE, et al. Abrupt emergence of diverse species B adenoviruses at US military recruit training centers [J]. J Infect Dis, 2007, 196(10): 1465-1473.
- [10] 方 健, 王静宇, 宋海燕, 等. 15 种呼吸道病原体的实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用 [J]. 解放军医学杂志, 2010, 35(10): 1254-1257.
- [11] Parra E, Castaneda E, Moreno J. Identification of haemophilus influenzae, streptococcus pneumoniae and neisseria meningitidis by polymerase chain reaction [J]. Biomedica, 2007, 27: 454-460.
- [12] Ergin A, Eser OK, Sener B, et al. Value of demonstration of pneumococcal surface antigen A and autolysin genes for the identification of streptococcus pneumoniae clinical isolates [J]. Mikrobiyol Bul, 2009, 43: 11-17.

(收稿日期: 2011-06-07; 修回日期: 2011-08-15)

(本文编辑: 张仲书; 英文编辑: 王建东)