

病, 2011, 37(4): 193-198.

[10] Wilhelm A, Aldridge V, Haldar D, et al. CD248/endosialin critically regulates hepatic stellate cell proliferation during chronic liver injury via a PDGF-regulated mechanism[J]. Gut, 2016, 65(7): 1175-1185.

[11] Wang L, Ma LK, Fan H, et al. MicroRNA-9 regulates cardiac fibrosis by targeting PDGFR-beta in rats[J]. J Physiol Biochem, 2016, 72(2): 213-223.

[12] Chen Q, Chen LY, Kong DS, et al. Dihydroartemisinin alleviates bile duct ligation-induced liver fibrosis and hepatic stellate cell activation by interfering with the PDGF-beta R/ERK signaling pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2016, 34: 250-258.

[13] Shi H, Shi A, Dong L, et al. Chlorogenic acid protects against liver fibrosis in vivo and in vitro through inhibition of oxidative stress[J]. Clin Nutr, 2016, 35(6): 1366-1373.

[14] 刘理静, 钱红, 尹辉明, 等. 中华猕猴桃果仁非饱和脂肪酸通过激活 Keap1/Nrf2 信号通路增强肺纤维化大鼠抗氧化能力[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(4): 479-483.

[15] Kandhi R, Bobbala D, Yeganeh M, et al. Negative regulation of the hepatic fibrogenic response by suppressor of cytokine signaling 1[J]. Cytokine, 2016, 82(S1): 58-69.

[16] Cigna N, Moshai EF, Brayer S, et al. The hedgehog system machinery controls transforming growth factor-beta-dependent myofibroblastic differentiation in humans: involvement in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Am J Pathol, 2012, 181(6): 2126-2137.

[17] Teglund S, Toftgard R. Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1805(2): 181-208.

[18] Kumar V, Mondal G, Dutta R, et al. Co-delivery of small molecule hedgehog inhibitor and miRNA for treating liver fibrosis[J]. Biomaterials, 2016, 76: 144-156.

[19] Hyun J, Choi SS, Diehl AM, et al. Potential role of Hedgehog signaling and microRNA-29 in liver fibrosis of

IKK beta-deficient mouse[J]. J Mol Histol, 2014, 45(1): 103-112.

[20] Lin X, Kong LN, Huang C, et al. Hesperetin derivative-7 inhibits PDGF-BB-induced hepatic stellate cell activation and proliferation by targeting Wnt/beta-catenin pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2015, 25(2): 311-320.

[21] Xiao WQ, Jiang WL, Shen J, et al. Retinoic acid ameliorates pancreatic fibrosis and inhibits the activation of pancreatic stellate cells in mice with experimental chronic pancreatitis via suppressing the Wnt/beta-Catenin signaling pathway[J]. PLoS One, 2015, 10(11): e0141462.

[22] Inoue A, Obayashi K, Sonoda Y, et al. Regulation of matrix metalloproteinase-1 and alpha-smooth muscle actin expression by interleukin-1 alpha and tumour necrosis factor alpha in hepatic stellate cells[J]. Cytotechnology, 2017, 69(3): 461-468.

[23] Bedekovics J, Kiss A, Beke L, et al. Platelet derived growth factor receptor-beta (PDGFR beta) expression is limited to activated stromal cells in the bone marrow and shows a strong correlation with the grade of myelofibrosis[J]. Virchows Archiv, 2013, 463(1): 57-65.

[24] Lee JI, Wright JH, Johnson MM, et al. Role of Smad3 in platelet-derived growth factor-C-induced liver fibrosis [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2016, 310(6): 436-445.

[25] Zhang L, Ji YX, Kang ZC, et al. Protocatechuic aldehyde ameliorates experimental pulmonary fibrosis by modulating HMGB1/RAGE pathway[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2015, 283(1): 50-56.

[26] 孔德松, 张自力, 雷娜, 等. 姜黄素对血小板衍生生长因子诱导活化的肝星状细胞细胞外基质的影响[J]. 中草药, 2013, 44(1): 70-75.

[27] Ma FY, Blease K, Nikolic-Paterson DJ. A role for spleen tyrosine kinase in renal fibrosis in the mouse obstructed kidney[J]. Life Sci, 2016, 146: 192-200.

(收稿日期: 2017-04-24 修回日期: 2017-06-27)

• 综 述 •

肺炎链球菌的实验诊断及防治研究进展*

刘小花, 陈 涛 综述, 陈宇宁 审校

(四川省成都市新都区人民医院检验科, 四川成都 610500)

关键词:肺炎链球菌; 实验诊断; 防治
DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2017. 20. 028 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2017)20-2875-03

肺炎链球菌简称肺炎球菌, 在自然界中分布广泛, 可以在 20%~40% 孩童的鼻咽和 5%~10% 健康成人体内发现, 在某些特殊环境, 如人口集中的医院或军营等, 可发现更多数量的肺炎链球菌。肺炎链球菌在全世界范围内是一种非常重要的病原体, 可引起多种严重疾病, 如肺炎、中耳炎、脑膜炎、鼻窦炎及菌血症等^[1-2]。在发展中国家, 肺炎链球菌感染甚至可导致死亡^[3]。目前, 细菌培养还是临床上诊断肺炎链球菌的主要方

法, 但是此方法检出率较低, 且受许多因素的影响。此外, 由于大量抗菌药物的广泛使用, 使肺炎链球菌的检出率更低^[4]。本文就近年来对肺炎链球菌的实验诊断与防治进展进行综述。

1 肺炎链球菌的实验诊断

1.1 细菌培养

1.1.1 血液培养 自动血培养仪报警后, 取出报警培养瓶及该患者的另侧培养瓶, 用一次性注射器抽取部分血培养液, 一

* 基金项目: 四川省卫生厅科研课题(130534); 成都市新都区社会事业科技计划项目(2014. 07)。

部分用于革兰氏染色,镜检出有革兰阳性链球菌,同时取部分血培养液接种于血平板(儿童则接种 1 个血平板和 1 个巧克力平板),置于 5%~10% CO₂ 环境下 37℃ 温育 24 h。挑取疑似菌落做奥普托欣(Optochin)试验和胆汁溶菌试验来确定肺炎链球菌结果。血培养的优点:阳性血培养瓶内肺炎链球菌大量繁殖,可导致可溶性抗原浓度提高,提高肺炎链球菌检出率,且检测之前需要经过革兰氏染色初筛后确定其为链球菌属,而血培养液中的链球菌属最常见的是肺炎链球菌。此法可对检测结果进行方便快捷的报告^[5]。可以确定诊断的是,在血液中培养出肺炎链球菌,但是在血液中培养出病原菌检出率很低,儿童血液中检出肺炎链球菌低于 10%,成人病例也只有 20%~30% 的检出率。导致血培养肺炎链球菌检出率低的原因很多,包括采集血液前使用抗菌药物,或者在培养过程中肺炎链球菌自身释放出自溶素等。自溶素不仅使肺炎链球菌自身的细胞死亡,而且可以导致细菌的染色形态发生明显变化,在血液培养瓶中还可以有效抑制次代菌的生长^[6-7]。

1.1.2 脑脊液检查 脑脊液的细菌培养在脑膜炎的诊断中起到十分重要的作用。使用抗菌药物之前采集 1~2 mL 脑脊液进行微生物学检测(包括涂片和培养)。脑脊液标本在常温下应在 15 min 内送达实验室,不能保存于冰箱。依据脑脊液的革兰氏染色与培养能对大多数肺炎链球菌脑膜炎作出诊断,但是如果采样之前患者使用了抗菌药物,则肺炎链球菌的检出率会出现明显偏低,而且脑脊液标本应该得到及时处理,久置会导致其中的病原菌死亡^[8],如有全自动血培养仪,则可以将脑脊液、关节液等无菌体液直接注入全自动血培养瓶中进行检测。因此,一般建议做脑脊液培养的同时做血培养。

1.2 涂片镜检 用一次性无菌吸痰器采集痰标本,标本在接种前应先涂片,镜检筛选鳞状上皮细胞<10 个/低倍视野、白细胞>25 个/低倍视野的合格痰标本^[9]、脑脊液等无菌体液,将标本离心后取沉淀进行涂片和革兰氏染色,从阳性报警的血培养瓶中取出少量内容物直接涂片和染色。显微镜下肺炎链球菌是直径小于 2 μm 的革兰阳性球菌,成对排列,宽端相对,矛尖状,尖端向外,无鞭毛,无芽孢,部分菌株直接涂片可看到荚膜。

1.3 免疫层析试验(ICT) 采用 ICT 能迅速检测出肺炎链球菌的 C 多糖细胞壁抗原,简称 NOW 试验。NOW 试验可以检测体液标本,特别是对肺炎链球菌脑膜炎的脑脊液标本,敏感性高达 95%~100%,特异性达 100%^[10],对支气管肺泡灌洗液与胸腔积液有较高的敏感性和特异性,分别为 95%、87%。特别是对于病情危重不能获得痰液的肺炎患者,NOW 试验的快速检测就更有临床意义。Kristoffer 等^[10]报道血培养肺炎链球菌阳性,而 NOW 试验的阳性率高达 100%,当阳性血液培养瓶放置达 30 d 后,取血液作传代培养后出现无菌生长,NOW 试验仍然为阳性时具有重要的临床诊断意义^[11]。

1.4 酶联免疫吸附试验(ELISA) 肺炎结合疫苗临床评价认为,人血清中肺炎链球菌荚膜多糖型特异 IgG 抗体含量的测定方法非常重要。最新一代测量肺炎链球菌荚膜多糖抗体含量的测定方法为 ELISA,肺炎链球菌表面黏附蛋白 A(PsaA)在 90% 的肺炎链球菌血清型中均有存在,其是肺炎链球菌细胞表面表达的一种共同蛋白,不同的血清型肺炎链球菌的 PsaA 相对分子质量不同。抗-PsaA IgG ELISA 法是用天然或重组的 PsaA 制备成的免疫球蛋白(IgG)来进行 ELISA 试验,该方法可以用来检测血浆或脑脊液标本。可以根据标准血清中的 IgG 含量,通过计算得到待检血清标本中 IgG 抗体的浓度^[12]。可根据患者脑脊液或者血浆的抗-PsaA 浓度升高对侵袭性肺炎链球菌病进行特异性诊断,而且不受服用抗菌药物的

影响^[13]。

1.5 核酸扩增技术 提取肺炎链球菌的 DNA 模板后,即可进行实时荧光 PCR。PCR 技术检测肺炎链球菌的共用靶标记物是肺炎链球菌溶血素基因。痰标本中肺炎链球菌的检出率为 68%~100%,感染性病原菌的肺炎链球菌 DNA 检出量明显高于正常定植菌的量^[14]。文献报道,脑脊液和血液中肺炎链球菌 DNA 检出量可以用来作为儿童侵袭性肺炎链球菌病的预后观察指标^[15]。随着分子生物学技术的发展,采用实时荧光 PCR 方法检测肺炎链球菌,具有良好的临床应用前景^[16]。

2 肺炎链球菌的防治进展

2.1 一般预防措施 肺炎链球菌主要通过咳嗽、打喷嚏释放出来的呼吸道飞沫进行传播,所以在拥挤的环境当中更容易传播。儿童是主要的高危人群,因为儿童正处于生长发育的重要阶段,应该根据其各阶段特点,及时添加生长发育所需要的辅食,满足各项营养素的供给,并积极参加体育锻炼、预防和治疗某些营养性疾病。在我国,可以使用的预防肺炎链球菌的疫苗主要有两类,一类是肺炎链球菌结合疫苗(PCV7),另一类是 23 价肺炎链球菌多糖疫苗(PPV23)。2000 年,PCV7 在美国获准上市,主要用于 5 岁以下儿童的预防接种。PCV7 对疫苗血清型 IPD 的有效性达 97.4%^[17]。WHO 建议对于 5 岁以下儿童病死率超过 50‰(每 1 000 名活产儿中有 50 名死亡),或者每年儿童死亡人数超过 50 000 的国家,需要将 PCV7 纳入国家计划免疫^[18]。另外,因为 HIV 病毒携带者感染疾病的风险高于正常人的 300 倍,在 HIV 感染高发的国家也建议接种 PCV7^[19]。已接种过 PCV7 的 2 岁以上健康儿童不推荐接种 PPV23;在接种 PCV7 的基础上高危儿童(大于 2 岁),或者在不能获得 PCV7 时可考虑接种 PPV23^[20]。据统计,2006—2008 年中国地区儿童感染肺炎链球菌的血清型主要有 5 种,其中 PCV7 覆盖了 4 个血清型,PCV13 覆盖了另一个血清型 19A^[21]。

2.2 合理用药 肺炎链球菌的耐药问题已经成为全球关注的难题。随着抗菌药物的大量使用,出现了更多的多重耐药菌株,临床应该根据药物的药效学和药代动力学资料为患者选择合理的抗菌药物,才能有效控制耐药菌株的扩散。对于社区获得性呼吸道感染患者,应选择经验治疗。轻度肺炎可以口服抗菌药物,阿莫西林可作为首选,因为其具有良好的药代动力学,半衰期长、吸收好,也可以选择阿莫西林/克拉维酸(7:1 剂型)^[22]。随着大量使用抗菌药物和长时期经验用药,使得多重耐药菌株和耐青霉素肺炎链球菌菌株(PNSP)陆续增多^[23],临床上必须严格加强监测肺炎链球菌的耐药性。国外研究证实,使用阿莫西林或者青霉素常规剂量,能够充分治疗 MIC₅₀ 为 2~4 mg/L 肺炎链球菌引起的肺炎^[24]。对于中耳炎患者,可以考虑用大剂量的阿莫西林或者阿莫西林/克拉维酸。免疫力较好的患儿在早期可暂不考虑抗菌药物。有指征的患者可以选择口服阿莫西林或者青霉素,如果 3 d 后治疗无效者可考虑阿莫西林/克拉维酸、头孢呋辛等药物^[22]。需注意的是,对于高度耐药菌株所致感染患者适合注射头孢曲松。疑似肺炎链球菌脑膜炎感染时,经验治疗可考虑万古霉素联合第三代头孢菌素如头孢曲松等,而对于头孢菌素过敏的患者,可考虑使用万古霉素联合利福平^[25]。还可以考虑选择的抗菌药物有氯霉素或者美罗培南等。

3 总结

本文对肺炎链球菌的实验诊断和治疗进展进行了综述,列举了近年来诊断肺炎链球菌的一些新方法,如肺炎链球菌抗原的检测、核酸扩增技术等方法。目前,用于快速诊断肺炎链球

菌的方法还有很多,如斑点杂交法^[26]、PCR 电泳法^[27]、盒式 PCR 等^[28],这些诊断方法与传统方法相比,特异度、灵敏度高,且能快速诊断肺炎链球菌,大大节省了诊断时间,为患者留下了宝贵的治疗时间。而对于肺炎链球菌感染的治疗,近几年也得到了不断地发展,医生们应根据其丰富的临床经验和一些辅助技术进行诊断,对患者进行有效治疗,对于耐药性不同的菌株应给予不同的抗菌药物。但目前抗菌药物的滥用仍是一大问题,在减少抗菌药物使用的情况下,不断开发新的检测方法和治疗方法是目前防治肺炎链球菌感染最有效的措施。

参考文献

- [1] Pellegrino P, Carnovale C, Perrone V, et al. Epidemiological analysis on two decades of hospitalisations for meningitis in the United States[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2014, 33(9): 1519-1524.
- [2] Barzilay J, O'Brien L, Kwok S, et al. Could a single dose of pneumococcal conjugate vaccine in children be effective? Modeling the optimal age of vaccination [J]. *Vaccine*, 2006, 24(7): 904-913.
- [3] 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.
- [4] Campbell SG, Marrie TJ, Anstey R, et al. The contribution of blood cultures to the clinical management of adult patients admitted to the hospital with community-acquired pneumonia: a prospective observational study[J]. *Chest*, 2003, 123(4): 1142-1150.
- [5] 王沛, 吕志华. 肺炎链球菌抗原试验快速检测阳性血培养瓶肺炎链球菌[J]. *热带医学杂志*, 2008, 8(1): 47-48.
- [6] Luna M, Famiglietti A, Absi R, et al. Community-acquired pneumonia: etiology, epidemiology, and outcome at a teaching hospital in Argentina[J]. *Chest*, 2000, 118(5): 1344-1354.
- [7] Petti A, Woods W, Reller B. *Streptococcus pneumoniae* antigen test using positive blood culture bottles as an alternative method to diagnose pneumococcal bacteremia [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(5): 2510-2512.
- [8] Kellogg JD, Elder CJ. Identification of *streptococcus pneumoniae* revisited[J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(9): 3373-3375.
- [9] 姚蓓, 张丽丽. 重庆某二甲医院痰涂片结果与培养结果的分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2017, 38(1): 116-118.
- [10] Kristoffer S, Holmberg H. Usefulness of the *streptococcus pneumoniae* urinary antigen test in the treatment of community-acquired pneumonia[J]. *Clin Infect Dis*, 2005, 41(8): 1209-1210.
- [11] 沈定树, 许春燕. 侵袭性肺炎链球菌病的实验诊断进展[J]. *中国卫生检验杂志*, 2012, 22(11): 2793.
- [12] 王欣茹, 赵志强, 谢贵林. 肺炎链球菌荚膜多糖特异性 IgG 抗体定量 ELISA 检测及质量控制要求[J]. *微生物学免疫学进展*, 2014, 42(4): 61-67.
- [13] Anthony S, Zena M, Joyce N, et al. Diagnosis of invasive pneumococcal disease among children in Kenya with enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin G

- antibodies to pneumococcal surface adhesin A[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2005, 12(10): 1195-1201.
- [14] Murdoch R. Molecular genetic methods in the diagnosis of lower respiratory tract infections[J]. *APMIS*, 2005, 112(11/12): 713-727.
- [15] Carrol ED, Guiver M, Nkhoma SA, et al. High pneumococcal DNA loads are associated with mortality in Malawian children with invasive pneumococcal disease[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2007, 26(5): 416-422.
- [16] Kong FR, Brown M, Sabananthan A, et al. Multiplex PCR-based reverse line blot hybridization assay to identify 23 *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide vaccine serotypes[J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(5): 1887-1891.
- [17] Black S, Shinefield H, Fireman B, et al. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2000, 19(3): 187-195.
- [18] WHO. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization--WHO position paper [J]. *Wkly Epidemiol Rec*, 2007, 82(12): 93-104.
- [19] Bliss SJ, O'Brien KL, Janoff EN, et al. The evidence for using conjugate vaccines to protect HIV-infected children against pneumococcal disease[J]. *Lancet Infect Dis*, 2008, 8(1): 67-80.
- [20] Advisory Committee on Immunization Practices. Preventing pneumococcal disease among infants and young children. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) [J]. *MMWR Recomm Rep*, 2000, 49: 1-35.
- [21] 张波, 陈瑶, 刘智勇, 等. 91 株肺炎链球菌的血清型分布及耐药性分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2012, 22(20): 4619-4621.
- [22] 黎全华, 杨永弘. 儿童肺炎链球菌感染的防治进展[J]. *临床药物治疗杂志*, 2013, 11(1): 27-31.
- [23] 章玉丹, 盛蓉辉, 黄妮娜, 等. 患儿非侵入性肺炎链球菌血清型及抗生素耐药性研究[J]. *西北药学杂志*, 2017, 32(2): 206-208.
- [24] Deeks L, Palacio R, Ruvinsky R, et al. Risk factors and course of illness among children with invasive penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. The *Streptococcus pneumoniae* Working Group [J]. *Pediatrics*, 1999, 103(2): 409-413.
- [25] Macgowan AP. Clinical implications of antimicrobial resistance for therapy[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 62 Suppl 2(5): 105-114.
- [26] 樊慧珍, 黄文杰, 梁昆, 等. 反向斑点杂交快速检测肺炎链球菌[J]. *新医学*, 2004, 35(3): 145-146.
- [27] 黄文杰, 刘志红, 王全立, 等. 肺炎链球菌定性及定量诊断方法的建立[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2000, 16(4): 280-283.
- [28] 胡晓彦, 桂炳东, 王伶, 等. BOX-PCR 技术在肺炎链球菌检测中应用[J]. *实验与检验医学*, 2010, 28(3): 209-211.