

## 临床研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002522

## 肺炎链球菌胆碱结合蛋白 A 在社区获得性肺炎诊断中的应用

邹 琴<sup>1</sup>, 罗 红<sup>2</sup>, 黄 进<sup>1</sup>, 方 容<sup>1</sup>, 王 威<sup>1</sup>

(1. 武汉市第四医院/华中科技大学同济医学院附属普爱医院检验科, 武汉 430033;

2. 大连医科大学临床免疫与微生物教研室, 大连 116100)

**【摘要】目的:**探索以肺炎链球菌胆碱结合蛋白 A(pneumococcal choline binding protein A, rCbpA)为抗原的酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)反应模型在肺炎球菌性社区获得性肺炎患者(community acquired pneumonia, CAP)检测中的应用价值。**方法:**设计合成 *cbpA* 基因序列引物,通过 PCR 扩增,构建克隆质粒 PGM-T/*cbpA* 和表达质粒。经异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl phosphorothioate, IPTG)诱导表达重组蛋白 rCbpA;构建 ELISA 反应模型(rCbpA 作为抗原),检测健康组及肺炎球菌性 CAP 患者组血清中相应的 IgM 和 IgG 抗体。并与痰培养、血培养结果相比较。运用卡方检验分析结果差异。**结果:**成功获得肺炎链球菌重组蛋白 rCbpA,建立 rCbpA-ELISA 模型。以 rCbpA-IgM 模式检测肺炎球菌性 CAP 患者组的敏感性为 22.5%,与血培养及痰培养法检测的敏感性无统计学差异( $\chi^2=3.529, P=0.060; \chi^2=0.075, P=0.785$ );但其特异性为 100%,明显高于痰培养( $\chi^2=12.754, P=0.000$ )。rCbpA-IgG 模式检测肺炎球菌性 CAP 患者组的敏感性为 50%,与血培养、痰培养检测的敏感性差异具有统计学意义( $\chi^2=17.635, P=0.000; \chi^2=7.912, P=0.005$ )。**结论:**血清重组蛋白 rCbpA 对 IgM 类抗体有高特异性、对 IgG 类抗体有高敏感性,且该检测方法快,判定结果更准确客观,可以有效提高肺炎球菌感染性肺炎的诊断价值。

**【关键词】**肺炎链球菌胆碱结合蛋白 A;蛋白表达;社区获得性肺炎;酶联免疫吸附测定**【中图分类号】**R446.5**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-12-28

## Application of pneumococcal choline binding protein A in the diagnosis of community-acquired pneumonia

Zou Qin<sup>1</sup>, Luo Hong<sup>2</sup>, Huang Jin<sup>1</sup>, Fang Rong<sup>1</sup>, Wang Wei<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Wuhan Fourth Hospital; Wuhan Puai Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology; 2. Teaching and Research Section of Clinical Immunology and Microbiology, Dalian Medical University)

**【Abstract】Objective:** To investigate the applicative value of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reaction model which took pneumococcal choline binding protein A (rCbpA) as antigen in detecting patients with community acquired pneumonia (CAP). **Methods:** The specific primers of *cbpA* gene sequence were designed and synthesized, and proliferated according to PCR, finally, the cloning plasmids PGM-T/*cbpA* and expressing plasmids were constructed. Recombinant rCbpA was expressed after the inducing of isopropyl phosphorothioate (IPTG); ELISA model (rCbpA as antigen) was constructed and was used to detect IgM and IgG in the control group and CPA group. And results were compared with sputum culture and blood culture and were analyzed by Chi-square test. **Results:** The recombinant protein CbpA was obtained and rCbpA-ELISA was established. The sensitivity detected by the rCbpA-IgM in pneumococcal CAP patients was 22.5%, which had no statistically significant difference by blood and sputum culture method ( $\chi^2=3.529, P=0.060; \chi^2=0.075, P=0.785$ ). But its specificity was 100%, which was significantly higher than that by sputum culture ( $\chi^2=12.754, P=0.000$ ). The sensitivity detected by rCbpA-IgG mode to detect pneumococcal CAP patients was 50%, which was statistically different from the sensitivity by blood culture and sputum culture ( $\chi^2=17.635, P=0.000; \chi^2=7.912, P=0.005$ ). **Conclusion:** The serum recombinant protein rCbpA has high specificity to IgM and high sensitivity to IgG. Moreover, advantages including fast detection and objective judgment result, can improve the diagnostic value of pneumococcal infections.

作者介绍: 邹 琴, Email: zq07180061@126.com,

研究方向: 细菌感染快速诊断。

通信作者: 黄 进, Email: 757758282@qq.com。

基金项目: 湖北省武汉市科技局应用基础前沿专项资助项目(编号: 2019020701011472)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200624.0848.002.html>  
(2020-06-24)

recombinant protein rCbpA has high specificity to IgM and high sensitivity to IgG. Moreover, advantages including fast detection and objective judgment result, can improve the diagnostic value of pneumococcal infections.

**【Key words】**pneumococcal choline binding protein A; protein expression; community-acquired pneumonia; enzyme-linked immunosorbent assay

社区获得性肺炎(community acquired pneumonia, CAP)在全世界范围内影响着各年龄段人体的健康,其发病率及病死率均较高。引起 CAP 的主要病原菌之一是肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, *S.pn*)。*S.pn* 是一种机会致病菌<sup>[1-2]</sup>,儿童、年老者、合并慢性疾病及免疫功能不全的人群更易感染<sup>[3-5]</sup>。临床对 CAP 的治疗主要依赖病原体的鉴定并给予相应的抗菌药物。抗生素的普遍使用降低了常规培养法的阳性检出率,且培养肺炎链球菌营养条件高、耗时长,易贻误病情。同时痰标本易受鼻咽部定植菌影响,阳性结果难以确定是定植菌还是病原菌<sup>[6]</sup>。客观快速地诊断 CAP 病原菌可以早期对症治疗,降低死亡率。

肺炎链球菌胆碱结合蛋白 A (pneumococcal choline binding protein A, CbpA) 是肺炎链球菌胆碱结合蛋白中数量最多、含量最丰富的成分,可刺激机体产生相应抗体,且在 *S.pn* 各血清型间保守性高,因此可作为 ELISA 模型检测指标。本研究团队前期通过动物试验研究表明,以 CbpA 蛋白作为抗原检测 *S.pn* 感染的肺炎小鼠具有其应用价值<sup>[7-9]</sup>。在此基础上,本研究通过原核表达的方法获取 CbpA 重组蛋白,建立 rCbpA-ELISA 反应模型检测血清中相应抗体,为肺炎球菌性 CAP 患者的快速诊断奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株和载体 大肠埃希菌 DH5、BL21(DE3);克隆载体 PGM-T(北京全式金生物公司);表达载体 pET-32a(+)(本实验室保存)。

1.1.2 主要试剂 DNA 和蛋白标志物、内切酶及连接酶(日本 Takara 公司);蛋白定量试剂盒、胶回收试剂盒、总蛋白提取试剂盒、质粒小提试剂盒、蛋白纯化试剂盒(北京天根公司);酶标二抗、显色剂(Novagen 公司)。

1.1.3 血清标本 肺炎球菌性 CAP 组(细菌学确诊)40 例,男 22 例,女 18 例,平均年龄 54.5 岁,为 2016 至 2018 年呼吸科住院患者。诊断标准严格参照我国《社区获得性肺炎的诊断和治疗指南》<sup>[10]</sup>进行,其中经痰培养鉴定为 *S.pn* 感染 8 例,血培养阳性 3 例。健康对照组 40 例,男 20 例,女 20 例,平均年龄 52 岁,为健康体检者,其中经痰培养鉴定 *S.pn* 感染 11 例,血培养均为阴性。

### 1.2 方法

1.2.1 目的基因 *cbpA* 扩增 *cbpA* 引物 F:5'-GGGGGATC-

CCTGAAACCAGAAAAAAGGT-3'(黑体是 *Bam*H I 位点);R:5'-GGGAAGCTTTGCTTTTCGTTTAG-3'(黑体是 *Hind* III 位点)。通过 PCR 技术扩增 *cbpA* (321 bp)。扩增条件:95 °C 4 min;94 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 1 min,共 35 个循环;72 °C 终延伸 7 min,电泳分析 PCR 产物。

1.2.2 重组质粒 pET32a(+)/*cbpA* 的构建 用 T4 DNA 连接酶连接目的片段与 PGM-T 载体,转化至 *E.coli* DH5 感受态细胞,将转化菌涂布于含氨苄青霉素的 LB 培养基上(含 X-Gal 和 IPTG)。挑取阳性单克隆进行液体增菌培养,抽提质粒,并送检测序;用 *Bam*H I 和 *Hind* III 分别对克隆质粒和 pET-32a(+)-表达载体进行双酶切,并以相同条件过夜连接并进行转化,按上述实验条件培养后再次鉴定。

1.2.3 CbpA 蛋白的诱导表达与纯化 将 pET32a(+)/*cbpA* 转化至大肠埃希菌 BL21(DE3),涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板,挑取单克隆接种至含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,当 OD<sub>600 nm</sub> 为 0.7 左右时加入 IPTG(终浓度为 1 mmol/L),28 °C 培养 3~4 h。低温离心 10 min 收菌体,冰浴超声破碎,离心收集上清,SDS-PAGE 凝胶电泳分析 CbpA 表达情况。提取总蛋白,纯化 rCbpA 并测定其浓度,-20 °C 保存备用。

1.2.4 血清抗体检测的 ELISA 模型 参照 ELISA 反应模式<sup>[11]</sup>进行血清学测定;加入待检血清 50 μL/孔;然后分别酶标二抗(含辣根过氧化物酶的 IgM 和 IgG 抗体);TMB 显色,测定 OD<sub>450 nm</sub> 值。阳性判定标准:实验组 OD<sub>450 nm</sub>/阴性对照组 OD<sub>450 nm</sub> ≥ 2.1。

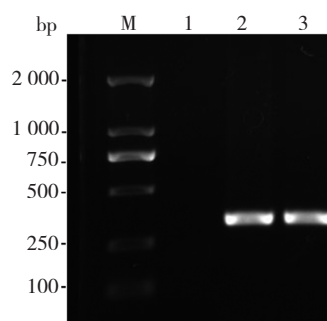
### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件比较 2 组间的统计学差异,采用卡方检验评价其应用价值。检验水准 α=0.05。

## 2 结果

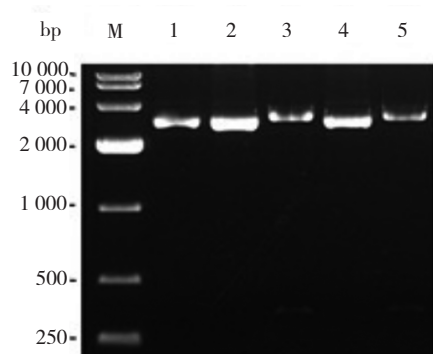
### 2.1 扩增 *cbpA*、构建 PGM-T/*cbpA*

*cbpA* 的 PCR 扩增产物约 321 bp,符合预期(图 1)。构建的克隆质粒经测序与 GeneBank 一致率为 100%。测序质粒经限制性内切酶双酶切后,在 321 bp 附近也出现预期条带(图 2)。



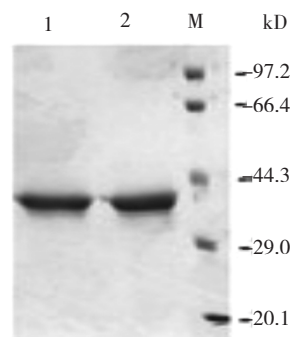
注:M,2000 标志物;1:阴性对照;2~3:目的基因 *cbpA*

图 1 PCR 扩增目的基因 *cbpA*



注:M,10000 标志物;1:空载体 PGM-T;2,4:重组质粒 PGM-T/cbpA;3,5:重组质粒 PGM-T/cbpA 经 *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切

图2 重组克隆质粒双酶切鉴定

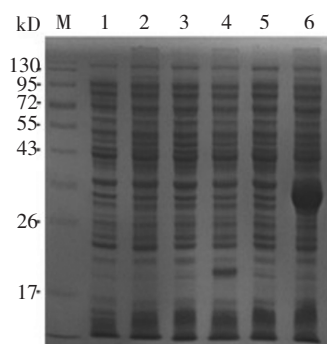


注:M,蛋白质标准;1,2:重组蛋白 CbpA

图4 纯化蛋白 CbpA 的 SDS-PAGE 电泳图

## 2.2 CbpA 蛋白的诱导表达、纯化

诱导后的含 pET32a(+)/*cbpA* 的破菌上清经 SDS-PAGE 电泳分析,约 30 kD 附近出现明显目的蛋白条带(图3)。与预期一致,该蛋白具有可溶性。经试剂盒纯化后电泳,纯化产物为单一 CbpA 蛋白条带(图4)。



注:M,蛋白质标准;1:大肠杆菌 BL21(DE3)的蛋白质表达产物;2:大肠杆菌 BL21(DE3)经 IPTG 诱导后的蛋白质表达产物;3:pET-32a 空载体转化菌的蛋白质表达产物;4:pET-32a 空载体转化菌经 IPTG 诱导后的蛋白质表达产物;5:pET32a(+)/*cbpA* 重组质粒转化菌的蛋白质表达产物;6:pET32a(+)/*cbpA* 重组质粒转化菌经 IPTG 诱导后的蛋白质表达产物

图3 重组表达质粒 pET32a(+)/*cbpA* 的 IPTG 诱导结果

## 2.3 血清抗体检测及其应用价值

采用 ELISA 模型检测 CAP 患者组血清样本中抗 CbpA-IgM 抗体的阳性率为 22.5%,检测健康对照组相应抗体的阳性率为 0,两者差异有统计学意义( $P=0.000$ );检测 CAP 患者组血清样本中抗 CbpA-IgG 抗体的阳性率为 50%,健康对照组相应抗体的阳性率为 12.5%,差异有统计学意义( $\chi^2=13.091, P=0.000$ ),见表 1。采用痰培养和血培养方法检测 CAP 患者组时检出肺炎链球菌的阳性率分别为 20%和 7.5%;IgM 类抗 CbpA 抗体检出的阳性率为 22.5%,与痰培养、血培养法比较差异无统计学意义( $\chi^2=0.075, P=0.785; \chi^2=3.529, P=0.060$ ),但其特异性为 100%,明显高于痰培养( $\chi^2=12.754, P=0.000$ );IgG 类抗 CbpA 抗体检出的阳性率为 50%,与痰培养和血培养相比差异有统计学意义( $\chi^2=7.912, P=0.005; \chi^2=17.635, P=0.000$ )。rCbpA 对肺炎链球菌性 CAP 患者的血清学诊断价值见表 2。

## 3 讨论

肺炎链球菌是导致脑膜炎、中耳炎和鼻窦炎的的主要病原菌之一,侵入人体血液可能会导致败血症,同时也是 CAP 的主要病原体<sup>[12-14]</sup>。CAP 的治疗主要是对感染病原菌应用相应的抗菌药物。近年来对大

表 1 临床标本血清学检测及培养鉴定阳性率

| 组别                   | CbpA |       |     |       | 培养 |       |    |       |
|----------------------|------|-------|-----|-------|----|-------|----|-------|
|                      | IgM  |       | IgG |       | 血液 |       | 痰液 |       |
|                      | 例数   | 阳性率/% | 例数  | 阳性率/% | 例数 | 阳性率/% | 例数 | 阳性率/% |
| 肺炎链球菌性 CAP( $n=40$ ) | 9    | 22.5  | 20  | 50.0  | 3  | 7.5   | 8  | 20.0  |
| 健康对照组( $n=40$ )      | 0    | 0.0   | 5   | 12.5  | 0  | 0.0   | 11 | 27.5  |

表 2 CAP 组血清抗体检测及培养鉴定的诊断价值(%)

| 检测方法        | 标本  | 敏感性  | 特异性   | 约登指数  | 阴性预测值 | 阳性预测值 |
|-------------|-----|------|-------|-------|-------|-------|
| rCbpA-ELISA | IgM | 22.5 | 100.0 | 122.5 | 56.3  | 100.0 |
|             | IgG | 50.0 | 87.5  | 137.5 | 63.6  | 80.0  |
| 培养          | 痰液  | 20.0 | 72.5  | 92.5  | 47.5  | 42.1  |
|             | 血液  | 7.5  | 100.0 | 107.5 | 51.9  | 100.0 |

环内酯类抗生素的耐药逐渐增高,尤其是肺炎链球菌的耐药最为明显,影响临床治疗效果。*S.pn* 是鼻咽部的一种正常菌群<sup>[15]</sup>,是常见的条件致病菌,健康对照组痰培养出现 11 例阳性印证了这一点。因此,对于经痰培养鉴定为阳性的标本仍需判定是否为病原菌。肺炎链球菌培养时间长,采集深部痰及灌洗液需要侵入性操作,加之早期经验性使用抗菌药物,导致肺炎链球菌肺炎诊断困难。因此,准确分离、鉴别 *S.pn* 对临床肺炎球菌性 CAP 的诊治意义重大。前期动物试验表明,CbpA 蛋白对肺炎小鼠 IgG 类抗体诊断的敏感性和特异性均为 83.8%<sup>[9]</sup>。基于此,测定临床血清标本外周血中抗体水平,通过定量比较分析对肺炎球菌性 CAP 患者的诊断价值。

CbpA 是 *S.pn* 的主要毒力因子之一,含量丰富,且有一段相对保守的序列。*S.pn* 感染人体后先侵入外周血,刺激机体产生某些抗体,并且作为机会致病菌,寄居时的抗体滴度低于感染状态的滴度,因此可采用血清学检测方法。本研究采用基因工程技术获得重组蛋白 rCbpA,以此为抗原包被于 ELISA 反应板中,测定临床血清标本中的抗体。结果表明,健康对照组 IgM 和 IgG 类抗 rCbpA 抗体滴度均低于肺炎球菌性 CAP 患者组。且 CAP 组中经痰培养和血培养鉴定为 *S.pn* 感染的患者,其 CbpA-IgM 和 CbpA-IgG 抗体也为阳性。在儿科,传统培养法的假阳性率(约 2.8%)远高于侵袭性 *S.pn* 感染时临床允许的假阳性率(< 0.7%)<sup>[16]</sup>。rCbpA 检测肺炎球菌性 CAP 患者 IgM 类抗体的敏感性为 22.5%,与痰培养相比敏感性无明显差异,但特异性和阳性预测值均为 100%,能明显降低假阳性率。且 rCbpA 检测速度快,判定结果客观,可用于早期快速诊断。rCbpA 检测肺炎球菌性 CAP 患者相应 IgG 抗体的敏感性为 50%,明显高于常规的痰培养、血培养,能明显降低假阴性率。IgG 类抗体出现在感染后中晚期,也可用于流行病学调查。

肺炎链球菌危害人类健康且耐药菌株日益增加。蔡晓燕等<sup>[17]</sup>对住院的败血症患儿进行了病原菌分布、耐药情况分析,其中血培养中病原菌以肺炎链球菌为主,且耐药率高达 100%(红霉素)、91.7%(克林霉素)。*S.pn* 快速精准检测技术可有效提高感染性肺炎的诊断价值。本研究以 *S.pn* 重组蛋白 rCbpA 为抗原,协同利用其对 IgM 类抗体的高特异性和对 IgG 类抗体的高敏感性,对 *S.pn* 感染的血清标本进行定量检测,该检测方法快,判定结果更准确,并且具有不受抗菌药物应用影响的优势,具有实际的可行性和应用价值。

## 参 考 文 献

- [1] Ramirez JA, Anzueto AR. Changing need of community-acquired pneumonia[J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(S3): S3-S9.
- [2] Bandettini R, Melioli G. Laboratory diagnosis of streptococcus pneumonia infections: past and future[J]. J Prev Med Hyg, 2012, 53(2): 85-88.
- [3] Moens L, Verbinnen B, Covens K, et al. Anti-pneumococcal capsular polysaccharide antibody response and CD5 B lymphocyte subsets[J]. Infect Immun, 2015, 83(7): 2889-2896.
- [4] Shea KM, Edelsberg J, Weycker D, et al. Rates of pneumococcal disease in adults with chronic medical conditions[J]. Open Forum Infect Dis, 2014, 1(1): ofu024.
- [5] Torres A, Peetermans WE, Viegi G, et al. Risk factors for community-acquired pneumonia in adults in Europe: a literature review[J]. Thorax, 2013, 68(11): 1057-1065.
- [6] 刘琳, 张湘燕, 高占成. 气道分泌物病原菌培养在呼吸系统感染诊断中的应用价值[J]. 山东医药, 2016, 56(3): 103-105.
- [7] Wang L, Jiang YL, Zhang JR, et al. Structural and enzymatic characterization of the choline kinase LicA from Streptococcus pneumoniae[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0120467.
- [8] Beth M, Justin T, Richard H, et al. Broadly protective protein-based pneumococcal vaccine composed of pneumolysin toxoid-CbpA peptide recombinant fusion protein[J]. J Infect Dis, 2014, 209(7): 1116-1125.
- [9] 霍琳红, 孙文平, 杨光, 等. 肺炎链球菌菌体蛋白 LytA 和 CbpA 对感染小鼠的诊断价值[J]. 中华微生物学与免疫学杂志, 2011, 31(4): 366-370.
- [10] 瞿介明, 曹彬. 中国成人社区获得性肺炎诊断和治疗指南(2016 年版)修订要点[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2016, 39(4): 241-242.
- [11] 邹琴, 孙文平, 杨光, 等. 肺炎链球菌自溶素对感染性肺炎的诊断价值[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(21): 4801-4804.
- [12] 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.
- [13] Kim L, Mcgee L, Tomczyk S, et al. Biological and epidemiological features of antibiotic-resistant Streptococcus pneumoniae in pre- and post-conjugate vaccine eras: a United States perspective[J]. Clin Microbiol Rev, 2016, 29(3): 525-552.
- [14] Backhaus E, Berg S, Andersson R. Epidemiology of invasive pneumococcal infections: manifestations, incidence and case fatality rate correlated to age, gender and risk factors[J]. BMC Infect Dis, 2016, 16(1): 367-367.
- [15] Varghese R, Jayaraman R, Veeraraghavan B. Current challenges in the accurate identification of Streptococcus pneumoniae and its serogroups/serotypes in the vaccine era[J]. J Microbiol Methods, 2017, 141: 48-54.
- [16] Sard B, Bailey MC, Vinci R. An analysis of pediatric blood cultures in the postpneumococcal conjugate vaccine era in a community hospital emergency department[J]. Pediatr Emerg Care, 2006, 22(5): 295-300.
- [17] 蔡晓燕, 王朝媛, 谭薇. 2010—2015 年败血症患儿病原菌与耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(16): 3791-3794.

(责任编辑:唐秋姗)