论著

文章编号:1000-5404(2011)21-2230-05

肺炎链球菌表面蛋白A多价DNA疫苗交叉免疫保护作用评价

张 巧,林科雄,姚 伟,李 琦,钱桂生,王长征,马千里 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室)

[摘要] **目的** 评价肺炎链球菌表面蛋白A(PspA)优势家族亚类抗原的肺炎链球菌多价DNA疫苗抵御不同肺炎链球菌来源的异种PspA分子毒力作用的能力。**方法** 以包含PspA抗原Fam1的Clade1亚类和Fam2的Clade3亚类DNA序列的T载体为模板,聚合酶链反应(PCR)扩增具有高保护性抗体效价和强交叉反应的PspA优势家族亚类PspA-Fam1-Clade1和PspA-Fam2-Clade3片段,克隆至真核载体pcDNA3.1(+),构建重组质粒pcDNA3.1-Clade1和pcDNA3.1-Clade3,免疫印迹(Western blot)及逆转录聚合酶连反应(RT-PCR)检测重组质粒在哺乳动物细胞BHK-21中的表达。重组肺炎链球菌PspA多价DNA疫苗(pcDNA3.1-Clade1+pcDNA3.1-Clade3)肌肉注射免疫小鼠,观察免疫小鼠鼻咽部PspA异家族来源的不同肺炎链球菌携带情况改变和腹腔攻击小鼠21d的生存情况。**结果** 成功构建肺炎链球菌PspA优势家族亚类抗原的肺炎链球菌多价DNA疫苗。疫苗(pcDNA3.1-Clade1+pcDNA3.1-Clade3)免疫组小鼠鼻咽部携带的PspA异家族来源的不同肺炎链球菌菌落计数无显著性差异($P>0.05$),而明显少于空白质粒及PBS对照组小鼠($P<0.01$);疫苗(pcDNA3.1-Clade1+pcDNA3.1-Clade3)免疫组小鼠针对PspA异家族来源的不同肺炎链球菌腹腔攻击后中位生存时间无显著差异($P>0.05$),而明显长于空白质粒及PBS对照组小鼠($P<0.01$)。**结论** PspA优势家族亚类PspA-Fam1-Clade1和PspA-Fam2-Clade3的靶抗原组合形式能够有效解决PspA的抗原多样性问题,所构建的肺炎链球菌DNA疫苗有望针对PspA异家族来源的临床肺炎链球菌株感染。

[关键词] 肺炎链球菌;肺炎链球菌表面蛋白A;核酸疫苗
[中图法分类号] R378.12; R392-33; R392.7 [文献标志码] A

Evaluation of cross-immune protection of PspA multivalent DNA vaccine against *Streptococcus pneumoniae*

Zhang Qiao, Lin Kexiong, Yao Wei, Li Qi, Qian Guisheng, Wang Changzheng, Ma Qianli (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University. Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To evaluate the ability of *Streptococcus pneumoniae* multivalent DNA vaccine with dominant pneumococcal surface protein A (PspA) clades against heterogeneous PspA from different *Streptococcus pneumoniae*. **Methods** PspA-Fam1-Clade1 and PspA-Fam2-Clade3 fragments, which were the clades of PspA-dominant family with high protective antibody titers and strong cross-reaction, were amplified using polymerase chain reaction (PCR) from their recombinant T vectors. Then the PCR products were cloned into a eukaryotic vector pcDNA3.1(+) for construction of the recombinant plasmids pcDNA3.1-Clade1 and pcDNA3.1-Clade3. Western blotting and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were performed for detecting expression of the recombinant plasmids in mammalian cells BHK-21. Recombinant PspA multivalent DNA vaccines (pcDNA3.1-Clade1 + pcDNA3.1-Clade3) were injected to immunize mice, and then the mice nasopharyngeal carriage of Streptococcus pneumoniae isolates from different PspA family clades were evaluated, and median survival time of the immunized mice by abdominal attack of Streptococcus pneumoniae isolates of different PspA family clades were calculated after 21 d. **Results** The PspA-dominant family clades recombinant multivalent DNA vaccines (pcDNA3.1-Clade1 + pcDNA3.1-Clade3) were successfully constructed. Colony counts of 5 *Streptococcus pneumoniae* isolates in the groups of mice immunized with the DNA vaccines (pcDNA3.1-Clade1 + pcDNA3.1-Clade3) had no significant difference ($P<0.01$), but were lower than those of the control groups of which mice were immunized with vectors and PBS, respectively. The median

[基金项目] 重庆市自然科学基金(2010BB5181)
[通信作者] 马千里,E-mail:cqmql@163.com

survival time of the groups of mice immunized with the DNA vaccines (pcDNA3.1-Clade1 + pcDNA3.1-Clade3) had no significant difference ($P<0.01$), but were all significantly longer than those of the groups of mice immunized with vectors and PBS ($P<0.01$). **Conclusion** PspA-dominant family clades (PspA-Fam1-Clade1 and PspA-Fam2-Clade3) can effectively solve the problem of heterogeneity of PspA, and the constructed Streptococcus pneumoniae DNA vaccine could be applied to target clinical infections by Streptococcus pneumoniae strains with PspA from different family.

[**Key words**] Streptococcus pneumoniae; Pneumococcal surface protein A; DNA vaccine

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC2010BB5181). Corresponding author: Ma Qianli, Tel: 86-23-68774093, E-mail: cqmql@163.com

肺炎链球菌是社区获得性感染最常见的致病菌[1],耐药肺炎链球菌感染的防治问题已经成为全球公共卫生领域的重要课题[2-4]。目前,肺炎链球菌23价荚膜多糖疫苗和7价蛋白-多糖结合疫苗已经在临床应用中暴露出了血清型依赖、免疫保护缺陷等明显不足[5-7],为克服传统疫苗缺陷,研究以肺炎链球菌毒力蛋白为靶点的DNA疫苗成为新一代肺炎链球菌疫苗的热点[8-9]。肺炎链球菌表面蛋白A(pneumococcal surface protein A,PspA)作为目前最为理想的疫苗候选抗原具有肺炎链球菌种属特异性及强免疫原性优势[9-10]。但是,PspA分子中独特性表位所在的CDR域具有抗原多样性,包括3个家族6亚类,其中Fam1家族包括2个亚类(Clade 1和Clade 2),Fam2家族包括3个亚类(Clade 3, Clade 4和Clade 5),Fam3家族仅包括1个亚类(Clade 6)[10]。虽然过去的研究认为异种PspA蛋白间存在广泛的抗原抗体交叉反应[11],但最近的报道及本课题组前期研究结果均证实这种交叉反应仅存在于同家族内部[12-13]。

本课题组在前期研究中筛选出了重庆地区肺炎链球菌临床感染株的PspA抗原的优势家族亚类抗原组合(Clade1 + Clade2)[14],本研究在此基础上构建了肺炎链球菌多价DNA疫苗,并进一步评价了其对肺炎链球菌鼻咽部定植的防御及抗侵袭性感染的作用,以期为进一步肺炎链球菌DNA疫苗的优化研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒、细胞株

包含PspA抗原2个主要家族(Fam1和Fam2)的不同亚类(Clade1,Clade2,Clade3,Clade4,Clade5)的不同肺炎链球菌侵袭株来源于前期研究收集的保存株S. P007株(PspA-Fam1-Clade1)、S. P023株(PspA-Fam1-Clade2)、S. P028株(PspA-Fam2-Clade3)、S. P009株(PspA-Fam2-Clade4)、S. P045株(PspA-Fam2-Clade5)。包含PspA抗原Fam1-Clade1亚类和Fam2-Clade3亚类DNA序列的T载体为前期研究构建保存[11],分别来源于前期研究中采集的激发高保护性抗体的侵袭性感染的肺炎链球菌S. P007株和S. P028株。大肠杆菌DH5α及真核载体pcDNA3.1(+)为我室保存。幼仓鼠肾细胞BHK-21[11],购自中国科学院细胞库。

1.2 抗体、工具酶和试剂

本课题组常用抗体及试剂同前期研究[14]:高保真*Taq*酶、DNA限制性内切酶*Kpn* Ⅰ、*Xba* Ⅰ、T_4 DNA连接酶均购自TaKaRa公司,质粒快速提取试剂盒购自Promega公司,脂质体转染试剂Lipofectamine™ 2000购自Invetrogen公司,RT-PCR试剂盒购自Fermentas公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG购自Southern生物工程公司,抗His单克隆抗体购自Santa Cruz生物技术工程公司。

1.3 实验动物

二级雌性BABL/c小鼠,6~8周龄,体质量(19±2)g,购自第三军医大学实验动物中心。

1.4 重组真核表达质粒的构建

以前期构建并测序确认的、源自S. p007株(PspA-Fam1-Clade1)和S. p028株(PspA-Fam2-Clade3)的PspA'(pspA基因的N端序列)序列设计引物,引物设计中引入His-tag序列,并插入*Kpn* Ⅰ、*Xba* Ⅰ酶切位点:PspA-Fam1-Clade1:正义:5′-GGGGTACCATGGCGTCGCTATCTTAGGGGCTGGT-3′;反义:5′-GCTCTAGATTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGAGTTTCTTCTTCATC-TCCGTCAG-3′; PspA-Fam2-Clade3:正义:5′-GG GGTACCATG-GTTACGTC-TCAGCCAGTAAC-3′; 反义:5′-GCTCTAGATTAGT-GGTGGTGGTGGTGGTGAGTGCTTCAGTTTTTTCTAATTC-3′。以包含PspA抗原Fam1的Clade1亚类和Fam2的Clade3亚类DNA序列的T载体为模板,PCR反应条件同前期研究[11]:复性温度为55 ℃。扩增的目的片段(Fam1的Clade1亚类和Fam2的Clade3亚类的DNA序列)连接真核载体pcDNA3.1(+),化学法转化DH5α感受态细胞,挑选阳性克隆,抽提重组阳性克隆质粒送TaKaRa公司测序。

1.5 核酸疫苗重组质粒转染BHK-21细胞及RT-PCR和Western blot鉴定

RT-PCR检测PspA-Fam1-Clade1片段和PspA-Fam2-Clade3片段基因的表达情况:按RNA提取试剂盒说明提取转染细胞总RNA,合成引物上游:PspA-Fam1-Clade1:F:5′- AGCTGCTA-AGAAAGATTACGA-3′, R:5′-TTCATCCGCTTTTCGAAC-3;PspA-Fam2-Clade3:F:5′-CAACCAATACTTACAAAACGCTT-3′, R:5′-ACTTTCGCTTTTGCTTGCT-3′。常规两步法RT-PCR及扩增产物电泳鉴定PspA-Fam1-Clade1和PspA-Fam2-Clade3基因的表达。Western blot检测PspA-Fam1-Clade1和PspA-Fam2-Clade3蛋白片段的表达:方法同前期研究[11]。

1.6 动物免疫

大量抽提质粒 pcDNA3.1(+)及2种重组质粒(pcDNA3.1-Clade1,pcDNA3.1-Clade3),稀释至1g/L浓度-20℃保存备用。6~8周龄雌性BAlB/c小鼠300只,分为3个组,A组:PBS组,B组:pcDNA3.1(+)空质粒组,C组:pcDNA3.1-Clade1+pcDNA3.1-Clade3,每组共100只,分为5个亚组,每组各20只。每组小鼠于免疫前1周双侧股四头肌注射心肌毒素100 μl(10 μmol/L)预处理后,第0天免疫小鼠,每只小鼠两侧股四头肌共注射100 μl(50 μl/侧),第28天同法加强免疫1次。

1.7 免疫小鼠鼻咽部肺炎链球菌菌落计数

上述各组免疫小鼠末次免疫28 d后,按照前期研究中建立的成熟的小鼠鼻咽部肺炎链球菌携带模型制备方法[11,14]:5种肺炎链球菌肺炎链球菌S. P007株(PspA-Fam1-Clade1)、S. P023株(PspA-Fam1-Clade2)、S. P028株(PspA-Fam2-Clade3)、S. P009株(PspA-Fam2-Clade4)、S. P045株(PspA-Fam2-Clade5),调节菌液浓度为10^6 CFU。以10 μl菌液滴鼻建立小鼠鼻腔携带状态,7d后处死小鼠(每组10只),按文献[11,14]报道方法进行鼻腔灌洗液行菌落计数比较。

1.8 免疫小鼠肺炎链球菌侵袭株腹腔攻击后21 d生存时间分析

上述各组免疫小鼠末次免疫28 d后,按照文献[15]报道建立的肺炎链球菌侵袭性腹腔攻击模型:如上述培养至对数生长期的肺炎链球菌S. P007株(PspA-Fam1-Clade1)、S. P023株(PspA-Fam1-Clade2)、S. P028株(PspA-Fam2-Clade3)、S. P009株(PspA-Fam2-Clade4)、S. P045株(PspA-Fam2-Clade5)调节菌液浓度为10^4 CFU。每组小鼠按以下方案进行攻击试验(每组10只,每只小鼠腹腔注射10^4 CFU的菌液6μl)后观察生存情况。

1.9 统计学分析

运用SPSS 13.0软件统计分析,鼻咽部灌洗液菌落计数CFU均值采用Log10($\bar{x} \pm s$),组间比较采用t检验。生存情况按*Keplan-Meier*法统计中位生存时间,组间分析用*Log-rank*检验。

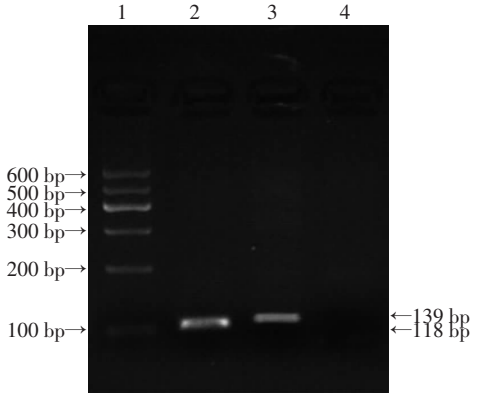
2 结果

2.1 重组PspA真核表达载体鉴定

包含PspA-Fam1-Clade1和PspA-Fam2-Clade3片段的2种真核质粒测序序列与本课题组前期收集S. p007株和S. p028株对应测序序列完全一致,证明重组真核表达载体构建成功。

2.2 重组质粒在BHK-21细胞的表达

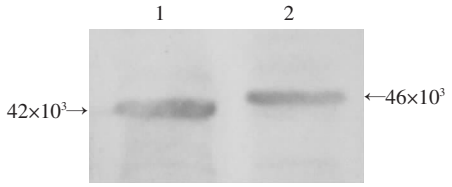
RT-PCR结果显示,在转染了pcDNA3.1-Clade1和pcDNA3.1-Clade3重组质粒的BHK-21细胞中检测到118 bp的PspA-Fam1-Clade1的mRNA和139bp的PspA-Fam2-Clade3的mRNA的表达,而在BHK-21总细胞提取物和pcDNA3.1(+)空质粒转染组未见表达条带,从转录水平证明了PspA-Fam1-Clade1和PspA-Fam2-Clade3片段基因在哺乳动物细胞的成功表达(图1)。



1:DNA分子量标准;2:pcDNA3.1-Clade1转染组;3:pcDNA3.1-Clade3转染组;4:pcDNA3.1(+)空质粒转染组

图1 pcDNA3.1-Clade1和pcDNA3.1-Clade3质粒瞬时转染BHK-21细胞RT-PCR琼脂糖凝胶电泳结果

重组载体转染BHK-21细胞总蛋白提取物Western blot分析可见大小分别为42×10^3和46×10^3蛋白带,分别与PspA-Fam1-Clade1和PspA-Fam2-Clade3片段分子量符合,对照空质粒转染组未见对应蛋白表达带,从翻译水平证明了PspA-Fam1-Clade1和PspA-Fam2-Clade3蛋白片段在哺乳动物细胞的成功表达(图2)。



1(PspA1):pcDNA3.1-Clade1转染组;2(PspA3):pcDNA3.1-Clade3转染组

图2 pcDNA3.1-Clade1和pcDNA3.1-Clade3质粒瞬时转染BHK-21细胞免疫蛋白电泳结果

2.3 免疫小鼠鼻咽部肺炎链球菌定植的防御评价

免疫小鼠鼻咽部定殖7d后鼻腔灌洗液菌落计数如表1所示:空白质粒及PBS对照组小鼠鼻咽部5种肺炎链球菌株均定殖成功,菌落计数无显著差异($P>0.05$)。pcDNA3.1-Clade1+pcDNA3.1-Clade3疫苗免疫组小鼠鼻咽部5种肺炎链球菌间菌落计数值无显著差异($P>0.05$),而与相应(空质粒和PBS)对照组比较均有所减少,存在统计学差异($P<0.01$)。

表1 免疫小鼠鼻咽部5种肺炎链球菌菌落计数[$n=20$,CFU($\lg \pm se$)]

组别	S. P007株(PspA-Fam1-Clade1)	S. P023株(PspA-Fam1-Clade2)	S. P028株(PspA-Fam2-Clade3)	S. P009株(PspA-Fam2-Clade4)	S. P045株(PspA-Fam2-Clade5)
PBS组	5.42±0.32[a]	5.44±0.45[a]	5.38±0.38[a]	5.44±0.34[a]	5.47±0.33[a]
pcDNA3.1(+)空质粒组	5.36±0.21[a]	5.41±0.26[a]	5.40±0.33[a]	5.39±0.32[a]	5.43±0.29[a]
pcDNA3.1-Clade1+pcDNA3.1-Clade3组	3.14±0.18	3.61±0.21	3.07±0.16	3.59±0.20	3.66±0.15

a:$P<0.01$,与pcDNA3.1-Clade1+pcDNA3.1-Clade3组比较

表2 免疫小鼠5种肺炎链球菌腹腔攻击后中位生存时间[n=20,d(范围)]

组别	S. P007株 (PspA-Fam1-Clade1)	S. P023株 (PspA-Fam1-Clade2)	S. P028株 (PspA-Fam2-Clade3)	S. P009株 (PspA-Fam2-Clade4)	S. P045株 (PspA-Fam2-Clade5)
PBS组	0(0-2)[a]	0(0-1)[a]	0(0-2)[a]	0(0-3)[a]	0(0-1)[a]
pcDNA3.1(+)空质粒组	1(0-2)[a]	1(0-2)[a]	1(0-2)[a]	1(0-2)[a]	1(0-2)[a]
pcDNA3.1-Clade1+pcDNA3.1-Clade3组	8(5-21)	5(3-17)	9(5-21)	6(2-19)	8(4-21)

a: $P<0.01$,与pcDNA3.1-Clade1+pcDNA3.1-Clade3组比较

2.4 免疫小鼠肺炎链球菌腹腔攻击生存情况分析

各组免疫小鼠28 d后应用致死剂量的包含PspA抗原主要2个家族的不同亚类的不同肺炎链球菌侵袭株S. P007株(PspA-Fam1-Clade1)、S. P023株(PspA-Fam1-Clade2)、S. P028株(PspA-Fam2-Clade3)、S. P009株(PspA-Fam2-Clade4)、S. P045株(PspA-Fam2-Clade5)腹腔攻击小鼠,统计中位生存时间如表2所示:pcDNA3.1-Clade1+pcDNA3.1-Clade3疫苗免疫组小鼠各组间中位生存时间无显著性差异($P>0.05$),而均较相应(空质粒和PBS)对照组显著延长,存在统计学差异($P<0.01$)。

3 讨论

PspA是肺炎链球菌DNA疫苗重要的候选抗原,存在于所有肺炎链球菌表面,均有强免疫原性[9],但是,应用单一亚类的PspA制备的肺炎链球菌疫苗不能覆盖所有的致病肺炎链球菌感染。国外文献报到的PspA分子的抗原多样性地域性差异较大[16-18],本课题组前期研究中发现重庆地区PspA家族只包含Fam1及Fam2的菌株,以Fam1-Clade2(31.0%)和Fam2-Clade3(47.6%)为优势分布亚类[14]。最近北京儿研所的jing等[18]亦报道了在中国儿童侵袭性感染的171株肺炎链球菌菌株中PspA优势家族亚类以Fam1-Clade1(24.6%)和Fam2-Clade3(49.7%)为优势分布。那么,如何解决PspA的抗原多样性问题是肺炎链球菌PspA的DNA疫苗研究中的关键问题。本课题组进一步观察了肺炎链球菌自然感染情况下PspA家族分布及异家族亚类间抗原抗体交叉反应情况,发现临床自然感染肺炎链球菌株PspA的Fam1内部亚类间的交叉反应中仅Clade1的特异性抗体与Clade2之间存在显著的交叉反应,而Clade2的特异性抗体与Clade1之间无明显交叉反应;在Fam2内部亚类的交叉反应中,Clade3的特异性抗体与Clade4,Clade5之间存在显著的交叉反应,Clade4的特异性抗体仅与Clade3之间存在显著交叉反应,Clade5的特异性抗体与Clade3,Clade4之间无明显交叉反应[14]。因此,考虑肺炎链球菌PspA的DNA疫苗靶抗原组成时应同时包括产生高保护性抗体效价和强交叉反应兼具区域优势的Clade亚类成分才能有效针对广泛的临床致病肺炎链球菌菌株感染。国外目前尚无应用优势PspA优势亚类构建多价DNA疫苗的报道,故本研究我们结合PspA的地域性优势分布特点及交叉保护家族优势亚类Fam1-Clade1片段基因+Fam2-Clade3片段基因组成了靶抗原,构建了肺炎链球菌PspA的多价DNA疫苗,利用小鼠肺炎链球菌的鼻咽部定植及侵袭性感染模型成功证实了该疫苗针对不同PspA家族亚类来源肺炎链球菌具有相似的防御能力,有效解决了PspA的地域性抗原多样性问题,所构建的肺炎链球菌DNA疫苗有望针对PspA异家族来源的临床肺炎链球菌株感染。

值得一提的是,本研究中我们观察到肺炎链球菌DNA疫苗免疫后的小鼠鼻咽部灌洗液中肺炎链球菌菌落计数较对照空白质粒组有所减少,但是并不能完全清除;而针对肺炎链球菌侵袭性感染的保护亦有限,实验组小鼠的中位生存时间虽然较对照组延长,具有统计学意义,但是均未超过10 d。考虑可能与传统的DNA疫苗免疫方式相关,传统的DNA疫苗经肌肉注射,肌肉细胞对外源DNA的摄取能力是其他组织的100~1 000倍,但是许多研究表明尽管肌肉组织的DNA摄取能力和表达水平较高,但是由于肌肉组织缺乏相关的巨噬细胞、树突状细胞和淋巴细胞,故其抗原呈递能力较弱,要激发较强的免疫原性需要注入大剂量的质粒,可操作性及安全性都存在问题。其次,目前的研究发现肺炎链球菌的致病过程中存在众多毒力蛋白参与,而没有一种蛋白可以覆盖肺炎链球菌的黏附、定植、迁移、侵袭性感染的全过程。另外,一个重要的原因是目前的DNA疫苗接种方式激发的免疫应答缺乏鼻咽部局部黏膜免疫反应。因此,既然进一步研究如何增强目前肺炎链球菌DNA疫苗的免疫原性,增加抗原组成及克服鼻咽部局部黏膜免疫缺陷是我们下一步优化肺炎链球菌多价DNA疫苗的研究重点。

参考文献:

[1] 中华医学会呼吸病学分会. 社区获得性肺炎诊断和治疗指南[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2006, 29(10): 651-655.

[2] Le CF, Palanisamy N K, Mohd-Yusof M Y, *et al*. Capsular serotype and antibiotic resistance of Streptococcus pneumoniae isolates in Malaysia[J]. PLoS One, 2011, 6(5): e19547.

[3] Daoud Z, Kourani M, Saab R, *et al*. Resistance of Streptococcus pneumoniae isolated from Lebanese patients between 2005 and 2009 [J]. Rev Esp Quimioter, 2011, 24(2): 84-90.

[4] Xue L, Yao K, Xie G, *et al*. Serotype distribution and antimicrobial

resistance of Streptococcus pneumoniae isolates that cause invasive disease among Chinese children[J]. Clin Infect Dis, 2010, 50(5): 741 – 744.

[5] Bekker A, Chou C, Bernstein H H. Update on universal annual influenza immunization recommendations for children[J]. Curr Opin Pediatr, 2009, 21(1): 122 – 126.

[6] Palmu A A, Saukkoriipi A, Jokinen J, *et al*. Efficacy of pneumococcal conjugate vaccine against PCR-positive acute otitis media[J]. Vaccine, 2009, 27(10): 1490 – 1491.

[7] Zangeneh T T, Baracco G, Al-Tawfiq J A. Impact of conjugate pneumococcal vaccines on the changing epidemiology of pneumococcal infections[J]. Expert Rev Vaccines, 2011, 10(3): 345 – 353.

[8] Serruto D, Serino L, Masignani V, *et al*. Genome-based approaches to develop vaccines against bacterial pathogens[J]. Vaccine, 2009, 27(25/26): 3245 – 3250.

[9] Ferreira D M, Oliveira M L, Moreno A T, *et al*. Protection against nasal colonization with Streptococcus pneumoniae by parenteral immunization with a DNA vaccine encoding PspA (Pneumococcal surface protein A)[J]. Microb Pathog, 2010, 48(6): 205 – 213.

[10] Melin M M, Hollingshead S K, Briles D E, *et al*. Distribution of pneumococcal surface protein A families 1 and 2 among Streptococcus pneumoniae isolates from children in finland who had acute otitis media or were nasopharyngeal carriers[J]. Clin Vaccine Immunol, 2008, 15(10): 1555 – 1563.

[11] 张巧,马千里,李琦,等. 肺炎链球菌黏附素A基因疫苗的构建及对小鼠鼻咽部肺炎链球菌携带的防御作用[J]. 第三军医大学学报,2008, 30(8): 739 – 742.

[12] Nabors G S, Braun P A, Herrmann D J, *et al*. Immunization of healthy adults with a single recombinant pneumococcal surface protein A (PspA) variant stimulates broadly cross-reactive antibodies to heterologous PspA molecules[J]. Vaccine, 2000, 18(17): 1743 – 1754.

[13] Silva M, Cabrera-Crespo J, Sbrogio-Almeida M E, *et al*. Optimizing expression of Streptococcus pneumoniae surface protein a, PspA: serocross-reactivity within families of antisera induced against clades 1 and 3[J]. Mol Biotechnol, 2007, 37(2): 146 – 154.

[14] 马千里,张巧,李琦,等. 肺炎链球菌疫苗候选抗原PspA异家族亚类间交叉反应评价[J]. 湖南中医药大学学报,2009, 29(7): 30 – 33.

[15] Chiavolini D, Pozzi G, Ricci S. Animal models of Streptococcus pneumoniae disease[J]. Clin Microbiol Rev, 2008, 21(4): 666 – 685.

[16] Rolo D, Ardanuy C, Fleites A, *et al*. Diversity of pneumococcal surface protein A (PspA) among prevalent clones in Spain[J]. BMC Microbiol, 2009, 9: 80.

[17] Heeg C, Franken C, van-der-Linden M, *et al*. Genetic diversity of pneumococcal surface protein A of Streptococcus pneumoniae meningitis in German children[J]. Vaccine, 2007, 25(6): 1030 – 1035.

[18] Qian J, Yao K, Xue L, *et al*. Diversity of pneumococcal surface protein A (PspA) and relation to sequence typing in Streptococcus pneumoniae causing invasive disease in Chinese children[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2011, [Epub ahead of print].

(**收稿**:2011-07-11;**修回**:2011-09-13)

(编辑 王 红)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2011)21-2234-01

弥漫性泛细支气管炎1例诊治体会

陈恒屹,曹国强 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所呼吸内科)

[**关键词**] 弥漫性泛细支气管炎

[**中图法分类号**] R562.2+1 [**文献标志码**] B

1 临床资料

患者,男性,55岁,教师。以“咳嗽、咳痰、气促半年余,加重20余天”为主诉入院。既往有鼻窦炎病史多年。自2010年6月以来患者无明显诱因出现反复咳嗽,咯黄绿色脓性痰液,每天约数十毫升至300 ml不等。并伴有逐渐加重的劳力性气促和喘息,偶有低热。曾于2010年6月16日到某“三甲医院”就诊,先后行胸部HRCT及痰培养检查,诊断为“慢性支气管炎、支气管扩张伴感染、慢性阻塞性肺气肿”,予以多种强效广谱抗生素抗感染以及祛痰、平喘等治疗,病情无明显好转。2010年8月11日发现双肺散在小结节影,于某“三甲医院”进行诊断性抗结核治疗1月余,抗结核方案为HREZ,但症状仍无改善。20余天前患者受凉后咳嗽、气促症状加重,痰量明显增多,约300 ml/日。于2010年11月15日来我院就诊。查体:慢性重病容,呼吸急促,口唇及甲床明显发绀。肺气肿征,双肺散在断续性湿性罗音,偶可闻及高调呼气相喘鸣音。胸部HRCT示(图1A):双肺弥漫性播散性的小叶中心结节影和树芽征,以双下肺为著,双肺散在双轨状细支气管扩张。鼻窦瓦氏位片(图2B)提示双侧上颌窦黏膜肥厚,上颌窦密度增加,窦腔变小。血常规、肝肾功、生化未见明显异常,结核菌素试验阴性。3次痰抗酸染色未见抗酸杆菌。3次痰培养均为铜绿假单孢菌生长。血气分析提示:pH=7.43, PaO_2:55 mmHg, $PaCO_2$:35 mmHg。2010年11月16日肺功能示:FEV1 0.74 L,占预计值的28%,FEV1/FVC 42%。临床诊断:弥漫性泛细支气管炎。入院后停抗结核药物,予以罗红霉素0.15 g,口服,2次/d,甲泼尼龙片8 mg,口服,2次/d以及解痉、祛痰治疗,3 d后患者咳痰量由300 ml/d减少至120 ml左右/d,每天咳嗽时间明显缩短。半月后患者精神状态明显改善,气促减轻,2010年12月01日复查肺功能结果为:FEV1 0.91 L,占预计值的39%,FEV1/FVC 51%。患者于2010年12月02日出院,随访4个月患者情况良好,目前仍用罗红霉素维持治疗。

(下转2239页)

[**通信作者**] 曹国强,E-mail:cgq1963@163.com