

# 多位点酶电泳法(ET)用于我国A群脑膜炎奈氏菌的分型及流行病学意义

中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所

王 骏\* 王健夫 胡 真

**提要** 应用多位点酶电泳(ET)分型法从我国183株A群脑膜炎奈氏菌中分出24个ET型,其中ET<sub>3</sub>、ET<sub>18</sub>为70年代以来在我国引起流脑流行的优势型别。在不同的流行期中优势型别不相同。每一次流行只和一个ET优势型别有关。在流行间歇期,存在许多地方性的ET型别的菌株引起的发病和健康带菌者。

**关键词** A群脑膜炎奈氏菌 多位点酶电泳 数值分类法 遗传距离

由于传统的血清学分类法应用于脑膜炎奈氏菌研究时,存在一些不足<sup>[1,2]</sup>,我们首次引进一种新的分类系统——多位点酶电泳技术,试用于我国A群脑膜炎奈氏菌的分型研究。我们采集了183株菌,选定了8种由染色体控制的酶进行电泳测定,将它们的同功酶类型综合分析以构成菌株的多位点酶电泳谱型(简称ET)<sup>[3,4]</sup>。ET分型从遗传本质上反映出不同类型菌的差别,并有助于揭示自然界和人对细菌进化过程的影响及与流脑流行的关系<sup>[5]</sup>。

## 材料和方法

一、参考菌株: A群脑膜炎奈氏菌29019,购自中国药品生物制品检定所。

二、样品菌株: 1956~1987年从河南、山东、江西、安徽、河北、四川、贵州、青海、广东和辽宁等省的病人和带菌者中分离的182株菌,经鉴定为A群脑膜炎奈氏菌后备用。

三、酶的提取: 取单个菌落接种100ml TSB肉汤,37℃水浴振摇16小时,5000转/分离心20分钟,弃上清。用1ml TE(pH6.8, 10mmol/L Tris, 1mmol/L EDTA)溶解菌沉淀,置-35℃冰箱48小时,取出融化,使菌细胞破裂、胞内酶游离。置4℃16500转/分离心15分钟,取上清液加蔗糖到10%作为样品备用(置-20℃储存)。

四、电泳、染色: 采用聚丙烯酰胺垂直板胶,浓缩胶浓度2.5%,分离胶浓度7.5%。加参考株29019的3份酶液作参考标准,连同样品菌株的酶液分别加于板胶的阴极端。4℃下恒流4小时,然后染色。按Selander方法选择8种酶分别进行电泳和特异性底物的染色<sup>[3]</sup>。它们是: 谷氨酸脱氢酶(GD<sub>1</sub>),醇脱氢酶(ADH),异柠檬酸脱氢酶(IDH),葡萄糖6磷酸脱氢酶(G6P),苹果酸酶(ME),反丁烯二酸酶(FUM),腺苷激酶(ADK),碱性磷酸酶(ALP)。

五、读胶,排序: 记录每一样品各种酶的主带到加样端的距离,即阳极迁移距离。设: M<sub>x</sub>=样品菌株酶主带的阳极迁移距离; M=参考菌株酶主带的阳极迁移距离; Y=相对迁移率; 则, Y=M<sub>x</sub>/M。按Y的数值由小到大用正整数命名,代表某一酶的不同同功酶类型,然后将同一菌株的所有被测酶的类型数字符号组合起来就构成其多位点酶电泳谱型(ET)。如11-003号菌株的8种酶类型分别是: G6P 3, ME 2, IDH 3, FUM 2, ADH 1, GD<sub>1</sub> 1, ADK 2, ALP 1, 则其ET型为3 2 3 2 1 1 2 1, 余类推。相同ET型的菌株归类在一起,然后进行聚类分析<sup>[5]</sup>。同时,用4种LOS(脂寡糖)单克隆抗

\* 现已调华西医科大学医学院工作



体对所试菌株用免疫斑点法作LOS分型<sup>[5]</sup>。

### 结 果

一、分型：从183株A群脑膜炎奈氏菌(含参考株29019)中可分出24个ET型(附表)。用SPSS/PC系统对24个ET型进行聚类分析(附图)，可形象地反映出各个ET型间的相

互关系。从附表和附图可见：存在有2个菌株数占优势的ET型，即ET<sub>3</sub>(占总菌株数的36%)和ET<sub>18</sub>(占24.5%)。ET<sub>3</sub>和ET<sub>18</sub>在聚类树状图中分别位于相距0.464个遗传距离的两个聚类区组内，它们在酶的遗传背景上相差较大，至少在G6P, ME, IDH三个位点上存在差异。

附表

183株A群脑膜炎奈氏菌ET类型

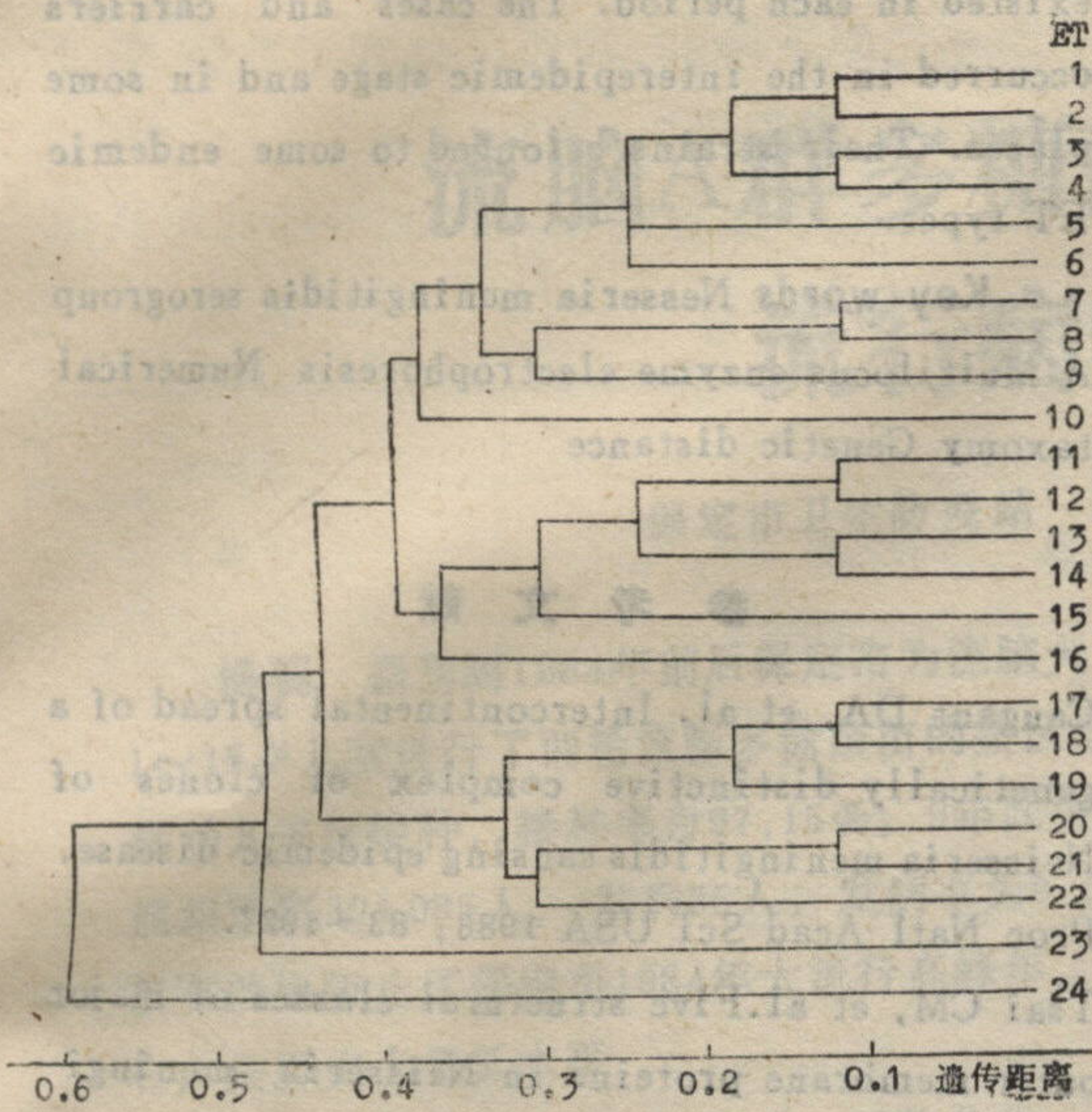
ET	菌株数	酶的相对迁移类型								供参考株
		G6P	ME	IDH	FUM	ADH	GD <sub>1</sub>	ADK	ALP	
1	2	3	1	2	2	1	2	2	1	79094
2	6	2	1	2	2	1	2	2	1	79113
3	65	2	1	2	2	1	1	2	1	29019
4	5	3	1	2	2	1	1	2	1	79107
5	2	3	1	3	2	1	2	2	1	79103
6	3	3	2	2	2	1	2	2	1	00188
7	1	2	1	2	2	1	1	1	1	J84-143
8	3	2	1	1	2	1	1	1	1	80042
9	1	1	1	2	2	1	2	2	1	80038
10	1	2	1	2	2	0	3	2	1	79132
11	6	2	1	3	2	1	1	2	1	80006
12	2	2	1	3	2	2	1	2	1	80055
13	3	2	1	3	2	1	1	3	2	78052
14	4	2	1	3	2	1	1	3	1	Hb84022
15	2	2	1	3	2	1	2	2	2	广86-30
16	2	2	1	4	2	0	1	2	1	HN87001
17	4	3	2	3	2	1	1	3	1	广87-42
18	44	3	2	3	2	1	1	2	1	11-003
19	5	3	2	3	2	2	1	3	1	山-214
20	14	2	2	2	2	1	1	2	1	川-87004
21	3	2	2	3	2	1	1	2	1	80003
22	3	3	2	2	2	1	1	2	2	79136
23	1	2	0	3	0	1	1	2	1	川79110
24	1	2	1	0	1	2	2	2	1	川77001

二、流行病学：在70年代流行期，以ET<sub>3</sub>型的菌株占优势(占同期菌株总数的74.2%)；在间歇期和流行前期，ET<sub>3</sub>型降为40%，其余的菌株可分出9个ET型；未分离到ET<sub>18</sub>型的菌株。在60年代河南省的流脑流行期，其菌株以ET<sub>18</sub>型为主(10株菌中ET<sub>18</sub>有6株)。从1956~1966年分离的菌中未分出ET<sub>3</sub>型。在80

年代流行期，以ET<sub>18</sub>型菌株占优势(占同期总菌株数的80%)；在流行后期和散发地区，ET<sub>18</sub>只占15%，其余的菌株也可分出9个ET型；仍能分离到少量的ET<sub>3</sub>型菌株。

ET<sub>3</sub>型和ET<sub>18</sub>型分布很广。华北、华中的河南、河北、安徽、山东、湖北、江西等省，都分离到ET<sub>3</sub>和ET<sub>18</sub>型菌株；西南、西北





附图 24个ET型的聚类分析树状图  
(SPSS/PC IBM computer.算术平均法)

的四川、贵州、青海等省，也分离到ET<sub>3</sub>和ET<sub>18</sub>型菌株。对其菌株数较少的其他22个非优势ET型，则有几种情况：(1)在相距较远的省份中同时被分离到；(2)在相邻近的两个省份中被分离到；(3)只在某一局部地区被检出。

ET<sub>3</sub>和ET<sub>18</sub>型能从病人也能从带菌者分离的菌株中检出。在从病人分离的121株菌中，ET<sub>3</sub>和ET<sub>18</sub>占70%；而从带菌者分离的61株菌中，ET<sub>3</sub>和ET<sub>18</sub>只占39%，优势明显减少。某些非优势ET型菌株仅见于从带菌者中分离到，如ET<sub>5</sub>、ET<sub>6</sub>、ET<sub>17</sub>等。1984年从山东、河北分离的菌株中发现：从病人分离菌株的ET型与同家健康亲属所带菌株及同村病人中分离菌株的ET型完全相同，都是ET<sub>18</sub>型。在相距较远的其他村中，从健康带菌者分离菌株的ET型则是ET<sub>19</sub>。ET<sub>19</sub>与ET<sub>18</sub>在两个酶位点上有差别，它们在附图中处于相距0.25遗传距离的区组内，在酶的遗传关系上，较其他ET型密切。

三、与LOS分型的关系：在183株菌中，13株属L<sub>10</sub>型，13株属L<sub>11</sub>，20株属L<sub>10</sub>/L<sub>11</sub>复合型，11株属L<sub>9</sub>，3株属L<sub>8</sub>，5株未能分型。未

见到明显的ET型和LOS型间特定的从属关系。131株L<sub>10</sub>型菌可分出22个ET型，L<sub>9</sub>可分出7个ET型，L<sub>11</sub>可分出6个ET型，都以ET<sub>3</sub>和ET<sub>18</sub>型占多数。

### 讨 论

A群脑膜炎奈氏菌在长期演化中形成许多遗传基因不同的菌株，其差别可通过其同功酶类型即ET型表现出来<sup>[6]</sup>。这些差别的形成主要受到自然环境、人群等称为自然选择效应的影响。ET型别就直接反映了自然界、人与细菌的相互作用。考察ET型的时间、地区 and 人群中的分布情况，能对细菌的遗传背景、进化及与疾病流行的关系有更深入的了解<sup>[7]</sup>。

从结果可见，我国的A群脑膜炎奈氏菌的ET型呈多样性。各ET型的演化是不平行的，存在具有不同遗传背景的两个菌株数占优势的ET型及众多的非优势型。70年代以来，大多数的流脑流行是由两个优势型引起的：70年代以ET<sub>3</sub>为主，80年代以ET<sub>18</sub>为主，而ET<sub>3</sub>处于散发。看来，每一次大流行都主要和一个优势ET型有关，在新的流行时期，旧的流行型有可能被与其基因型相差较大的新型所取代。西德学者Mark Actman认为：新型替代旧型成为新流行型的现象不是ET型间的演变所致，而是在某些较封闭的地区中早已存在遗传背景有较大不同的ET型。新型的侵袭力、毒力和生存力都较强，在自然环境和人群抵抗力适宜时，新型的菌株就从局部的一点迅速传播，替代旧型引起新的流行；旧型则由于人群抵抗力增强而转为散发和带菌<sup>[5,7]</sup>。我们的研究结果看来支持他的这一论点。

从我国的情况看：ET<sub>3</sub>和ET<sub>18</sub>型菌株存在时间较长、分布地区广、在病人中分离的比例高，也能造成病人周围健康人群带菌。可认为它们的生存能力、侵袭能力和毒力都较强，应成为今后防治工作中需重点研究的菌型。非优势型的情况较复杂：某些ET型在不同的省份都能引起发病，可能是由于带菌旅游者的传



入，引起缺乏免疫力的人群发病；某些只在较短的时间和局部地区引起发病的ET型可能是地方株，其生存能力有限，侵袭扩散的条件受限制，但也难排除在自然环境和人群抵抗力适宜时这些地方株会变成流行株的可能性。某些只在带菌者中发现的ET型可能对人无害属正常菌群，但也不排除发生致病的可能性。

ET分型系统同LOS分型系统没有特定的联系。ET分型具有特异性好、方法简便、分辨能力高的优点。它一方面在菌株的遗传本质上反映了不同年代、不同地区同一血清型存在的差异，反映出自然选择效应的影响，又能反映不同型别间的遗传关系，并且扩大了分辨能力，弥补了传统分型法的不足。随着研究的深入，ET分型法的重要意义会越来越广的显示出来。

**Method of Multilocus Enzyme Electrophoresis for Typing Neisseria Meningitidis Serogroup A in China and It's Significance in Epidemiology** Wang Jun, et al., Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing

A new, more perfect taxonomic method the multilocus enzyme electrophoresis has recently been developed to type Neisseria meningitidis serogroup A strains in China isolated from 1956~1987 and to study the epidemiological relationship of the types.

183 strains could be divided into 24 ET types, among which ET<sub>3</sub>, ET<sub>18</sub> were found predominant in epidemics occurred in last two decades respectively. Different predominant ET types were found in different epidemic period and only one predominant ET type

existed in each period. The cases and carriers occurred in the interepidemic stage and in some places. Their strains belonged to some endemic ET types.

**Key words** Neisseria meningitidis serogroup A Multilocus enzyme electrophoresis Numerical taxonomy Genetic distance

**参 考 文 献**

1. Caugant DA, et al. Intercontinental spread of a genetically distinctive complex of clones of Neisseria meningitidis causing epidemic disease. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 4927.
2. Tsai CM, et al. Five structural classes of major outer membrane proteins in Neisseria meningitidis. J Bacteriol 1981; 146: 69.
3. Selander RK, et al. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. Appl Environ Microbiol 1986; 51: 873.
4. Selander RK, Levin BR. Genetic diversity and structure in Escherichia coli populations. Science 1980; 210: 545.
5. Achtman M, et al. Clonal population structure of Neisseria meningitidis serogroup A isolated from epidemics and pandemics between 1915 and 1983. Rev Infect Diseases 1987; 9: 665.
6. Olyhoek T, et al. Evidence For clonal structure in Neisseria meningitidis; relevance to epidemiology. Antonie von Leeuwenhoek 1986; 52: 202.
7. Achtman M, Pluschke G. Clonal analysis of descent and virulence among selected Escherichia coli. Annu Rev Microbiol 1986; 40: 185.

(本工作得到胡绪敬, 李新武, 柔玉莲, 赵松庆, 王世明同志的帮助, 在此一并致谢)

(1989年12月27日收稿, 1990年3月31日修回)

14912