

北京地区 2005 年流行性脑脊髓膜炎病原学监测

张铁钢 贺雄 陈丽娟 和京果 杨洁 孙美平 邵祝军 陈志海 赵辉

【摘要】 目的 对 2005 年北京地区流行性脑脊髓膜炎(流脑)进行病原学监测。方法 对临床流脑病例的血液、脑脊液标本进行特异性核酸片段检测,对鉴定阳性的菌株进行脉冲场凝胶电泳(PFGE)和多位点序列(MLST)分析。结果 在 7 份血液和 5 份脑脊液标本中检测到脑膜炎奈瑟菌的核酸片段。共分离到 105 株脑膜炎奈瑟菌。A 群和 C 群菌株的群内菌株 PFGE 图谱无差异条带。MLST 分析结果表明北京地区 A 群脑膜炎奈瑟菌的序列类型主要是 ST7,而 C 群主要是 ST4821。结论 北京地区目前流脑病例主要由序列类型为 ST7 的 A 群和 ST4821 的 C 群脑膜炎奈瑟菌引起。

【关键词】 流行性脑脊髓膜炎;血清群;多位点序列分析;脉冲场凝胶电泳分析

Surveillance on pathogens of meningococcal meningitis in Beijing, 2005 ZHANG Tie-gang*, HE Xiong, CHEN Li-juan, HE Jing-guo, YANG Jie, SUN Mei-ping, SHAO Zhu-jun, CHEN Zhi-hai, ZHAO Hui. *Institute of Immunization and Prevention of Beijing Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100013, China

【Abstract】 Objective To study the pathogens of meningococcal meningitis (MM) in Beijing, 2005. Methods Blood and cerebrospinal fluid specimens from MM patients were detected by polymerase chain reaction. Bacterial strains were analyzed by pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing. Results 7 of the blood and 5 of cerebrospinal fluid specimens showed positive results. 105 of the *Neisseria meningitidis* strains were isolated from the specimens of patients, close contacts and healthy carriers. Serogroup A and C *Neisseria meningitidis* strains shared the same patterns of pulsed-field gel electrophoresis, respectively. The sequence type of serogroup A *Neisseria meningitidis* belonged to ST7 while the sequence type of serogroup C *Neisseria meningitidis* belonged to ST4821. Conclusion Patients suffered from meningococcal meningitis were caused by serogroup A (ST7) and C (ST4821) *Neisseria meningitidis* in Beijing, 2005.

【Key words】 Meningococcal meningitis; Serogroup; Multilocus sequence typing; Pulsed-field gel electrophoresis

流行性脑脊髓膜炎(流脑)其发病率和死亡率均较高,严重威胁人群的健康。非洲一些国家在 1988-1997 年共发生流脑 70.4 万例,死亡 10 万例^[1]。我国在 1959、1967 和 1977 年曾出现 3 次流脑的全国大流行,其发病率分别为 55.6/10 万、403/10 万和 60.1/10 万^[2]。根据脑膜炎奈瑟菌荚膜多糖抗原免疫学的特性,可将其划分为 13 个血清群(A、B、C、D、29E、H、I、K、L、W₁₃₅、X、Y 和 Z),其中 A、B、C、Y 和 W₁₃₅ 群是主要致病的血清型^[3]。我国过去所发生的 3 次全国性大流行都是由 A 群脑膜炎奈瑟菌引起^[4]。由于 20 世纪 80 年代 A 群流脑疫苗的

使用,我国从 1985 年开始流脑发病逐年减少。在过去的 20 年间,流脑的年发病率稳定在 0.2/10 万~1.0/10 万。虽然我国流脑的防治取得一定的成效,但是仍时有爆发性流行。尤其是 2005 年,安徽省出现了 C 群脑膜炎奈瑟菌引起的 5 起流脑暴发疫情^[5]。脑膜炎奈瑟菌的易变性、B 群菌疫苗的缺少以及人群对 C 群脑膜炎奈瑟菌的免疫屏障空白,均为流脑的爆发性流行提供了可能。为了有效地控制和预防流脑流行,必须加强实验室诊断检测水平,及时对流脑病例和暴发疫情的病原菌进行相关检测,以实现北京地区脑膜炎奈瑟菌流行菌群的分布和变迁进行动态监测。2005 年北京市疾病预防控制中心进行了北京地区流脑病例的相关病原学的监测工作,结果报告如下。

作者单位:100013 北京市疾病预防控制中心免疫预防所(张铁钢、贺雄、陈丽娟、和京果、杨洁、孙美平);中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(邵祝军);北京地坛医院感染中心一科(陈志海),检验科(赵辉)

材料与方 法

1. 流脑病例标本以及菌株收集:北京市区县疾病预防控制中心和北京地坛医院收集流脑病例的脑脊液和抗凝血标本,送至北京市疾病预防控制中心免疫预防所流脑室进行检测。脑膜炎奈瑟菌菌株由北京地坛医院流脑病例脑脊液中分离得到。各区县疾病预防控制中心负责密切接触者和健康带菌者的咽拭子采集工作,同时进行脑膜炎奈瑟菌的分离工作,并将菌株送至北京市疾病预防控制中心免疫预防所流脑室进行鉴定实验。

2. PCR 检测:使用 QIAGEN 公司的试剂盒提取脑脊液和抗凝血总 DNA,用于 PCR 模板。引物设计参考 David 等^[6]的方法。PCR 扩增条件:94℃ 预变性 2 min,进入循环程序,94℃ 变性 30 s,50℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 45 s,30 个循环后,72℃ 延伸 7 min。以去离子水为 PCR 反应的阴性对照。取 5 μl PCR 产物,用于 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

3. 菌株鉴定:采用氧化酶实验、血清学分群鉴定和糖源利用实验均参考 WHO 实验操作手册^[7]。

4. 脉冲场凝胶电泳分析 (PFGE):参考 Bygraves, Maiden^[8]的方法进行。内切酶为 Nhe I。电泳条件:初始脉冲时间 1 s;最终脉冲时间 25 s;电压 6 V/cm;电泳时间 16 h;温度 14 ℃。

5. 多位点序列分析 (MLST):将脑膜炎奈瑟菌划线培养于血平板,35℃ 温箱培养过夜。用 QIAGEN 公司的 DNA 提取试剂盒进行菌株 DNA 提取。片段扩增引物和测序引物参考 Maiden 等^[9]和 Ian 等^[10]的方法。用 BigDYE Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit 进行测序的标记反应。标记产物用 PRINCETON 公司的 Centrisep Spin Columns 纯化,去除多余的未反应的荧光标记物。标记后产物用 ABI 3100 自动测序仪完成测序和校对程序。

结 果

1. 流脑病例以及标本 PCR 检测:根据疾病监测网络报告情况,北京地区 2005 年共接到报告病例 95 例,确诊 81 例,死亡 6 例,死亡率 0.03/10 万。实验室共收集到 48 份抗凝血标本和 35 份脑脊液标本。其中 20 例病例收集到双份标本。在 40 份抗凝血标本中,7 份 PCR 检测阳性,阳性率为 17.5%。另外 8 份标本发生凝固,未做检测。在 17 份脑脊液标本中,5 份 PCR 检测阳性,阳性率为 29.4%,其中

2 份阳性标本病原菌分离也为阳性。其余的 18 份脑脊液标本由于量过少,只进行了病原菌分离,未进行 PCR 检测。

2. 病例和密切接触者分离菌株情况:2005 年从临床诊断为流脑病例脑脊液标本中分离到 5 株 A 群和 4 株 C 群脑膜炎奈瑟菌,未分离到其他血清群,说明 A 群和 C 群是北京地区的主要致病血清群。在 494 份密切接触者的咽拭子标本中分离到 18 株 A 群和 5 株 C 群脑膜炎奈瑟菌,分离率为 4.7%。其中有 2 例的分离菌株与其密切接触者分离到菌株的血清群一致(表 1)。在北京市 12 个区县的 3221 名健康带菌者的咽拭子标本中分离到 3 株 A 群、13 株 B 群和 9 株 C 群脑膜炎奈瑟菌,携带率为 0.8%。北京铁路局疾病预防控制中心从安徽省来京的 1010 名健康人群中分离到 3 株 A 群、40 株 B 群和 5 株 C 群菌株,携带率为 4.8%。从带菌调查结果可以看出,北京市人群和安徽省来京人群主要携带 B 群脑膜炎奈瑟菌。

表 1 2005 年北京地区流脑病例、密切接触者和带菌者分离的脑膜炎奈瑟菌鉴定结果

菌株来源	氧化酶试验	血清学检测	乳胶凝集试验	糖原利用试验				MLST 分析
				葡萄糖	麦芽糖	乳糖	蔗糖	
病例 1	+	A	A	+	+	-	-	ST7
病例 2	+	A	A	+	+	-	-	ST7
病例 3	+	A	A	+	+	-	-	ST7
病例 4	+	A	A	+	+	-	-	ST7
病例 5	+	A	A	+	+	-	-	ST7
病例 6	+	C	C	+	+	-	-	ST4821
病例 7	+	C	C	+	+	-	-	ST4821
病例 8	+	C	C	+	+	-	-	ST4821
病例 9	+	C	C	+	+	-	-	ST4821
M1	+	A	A	+	+	-	-	ST7
M2	+	A	A	+	+	-	-	ST7
M3	+	A	A	+	+	-	-	ST7
M4	+	A	A	+	+	-	-	ST7
M5*	+	A	A	+	+	-	-	ST7
M6	+	A	A	+	+	-	-	ST7
M7	+	C	C	+	+	-	-	ST4821
M8	+	C	C	+	+	-	-	ST4821
M9	+	C	C	+	+	-	-	ST4821
M10	+	C	C	+	+	-	-	ST4821
M11#	+	C	C	+	+	-	-	ST4821
带菌者 1 [△]	+	C	C	+	+	-	-	ST4821
带菌者 2 [△]	+	C	C	+	+	-	-	ST4821

* M(密切接触者)5 是病例 3 的密切接触者; # 是病例 9 的密切接触者; △ 来自安徽省

3. 菌株分子生物学特征:

(1)北京地区 A 群和 C 群脑膜炎奈瑟菌 PFGE 分析:对 2005 年部分分离到的脑膜炎奈瑟菌进行

PFGE 分析。如图 1A 所示,病例分离的 5 株 A 群菌株电泳图谱没用差异条带,说明北京地区引起流脑的 A 群致病菌来源于同一克隆菌株。图 1B 的结果表明,北京地区病例密切接触者分离的 A 群菌和病例的 A 群菌株图谱一致。比较图 1C 和图 1D 的电泳图谱,可以看出病例的 C 群分离菌、密接分离菌和来自安徽省健康带菌者分离菌株的图谱无差异条带,说明目前北京地区引起流脑的 C 群菌株也来源于同一克隆菌株。

(2)北京地区 A 群和 C 群脑膜炎奈瑟菌 MLST 分析:对部分 A 群和 C 群菌株进行 MLST 分析。结果表明,目前北京地区流行的 A 群脑膜炎奈瑟菌的序列类型主要是 ST7,而 C 群主要是 ST4821(表 1)。其中,北京地区 C 群脑膜炎奈瑟菌与安徽省引起暴发疫情的菌株的序列类型一致。本文研究结果进一步证实了该克隆的 C 群菌株在我国的传播流行。

讨论

脑膜炎奈瑟菌引起的脑膜炎往往具有较高的死亡率,备受关注。我国原来 A 群菌引起的病例占 95%,而 B 群菌和 C 群菌只是占很小比例^[11]。但是在 2004 年和 2005 年,安徽省共出现 5 起 C 群菌引起的流脑爆发性疫情,共发生 29 名流脑病例^[5]。由于现有的流脑多糖疫苗具有群特异性预防作用,无交叉保护作用。北京市在 2005 年及时将单价 A 群流脑疫苗改为 A+C 联合疫苗,以免 C 群菌在北京地区引起暴发。病原学的监测结果表明,2005 年北京地区分离的 C 群脑膜炎奈瑟菌,与引起安徽省流脑爆发性疫情的菌株序列类型一致,均为 ST4821,说明高致病性的 C 群脑膜炎奈瑟菌已经在北京地区传播流行,并成为北京地区 C 群脑膜炎奈瑟菌引起流脑病例的主要病原菌类型,因此应该加强对 C 群脑膜炎奈瑟菌的病原学监测。

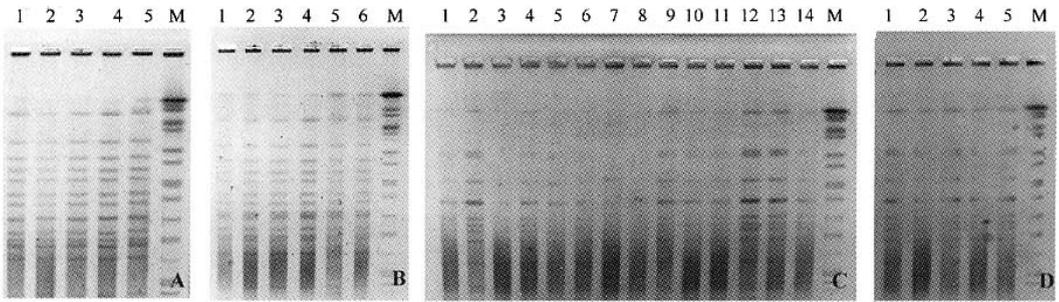


图1 2005年北京地区A群和C群脑膜炎奈瑟菌PFGE分析结果
A:5株A群病例分离的脑膜炎奈瑟氏菌电泳结果(1~5:菌株DNA经过Nhe I内切酶酶切电泳) B:6株A群密切接触者分离的脑膜炎奈瑟菌电泳结果(1~6:菌株DNA经过Nhe I内切酶酶切电泳) C:15株C群密切接触者脑膜炎奈瑟菌电泳结果(1~4:4株C群病例菌株DNA经过Nhe I内切酶酶切电泳;5~9:5株C群密切接触者菌株DNA经过Nhe I内切酶酶切电泳;10~14:5株北京地区健康带菌者调查菌株DNA经过Nhe I内切酶酶切电泳) D:5株C群安徽省来京健康带菌者调查菌株的电泳结果[1~5:5株菌株DNA经过Nhe I内切酶酶切电泳;M:DNA分子量标准,Salmonella(H9812)DNA经过Xba I酶切之后电泳]

图1 2005年北京地区A群和C群脑膜炎奈瑟菌PFGE分析结果

参考文献

- Robbins SR. Meningococcal meningitis in sub-Saharan Africa: the case for mass and routine vaccination with available polysaccharide vaccines. Bull WHO, 2003, 81:745-750.
- 胡绪敬. 流脑流行的监测与预防. 中国公共卫生, 2004, 20: 638-640.
- Jonathan NG, John VH, John S, et al. Fluorescent amplified-fragment length polymorphism genotyping of *N. meningitidis* identifies clones associated with invasive disease. J Clin Microbiol, 2000, 38:4580-4585.
- 胡绪敬. 流脑流行病学监测与预防. 中国计划免疫, 2001, 7: 300.
- Shao ZJ, Li W, Ren J, et al. Identification of a new *Neisseria meningitidis* serogroup C clone from Anhui province, China. Lancet, 2006, 367:419-423.
- David CR, Lisa L, Marie LS, et al. Evaluation of a rapid PCR assay for diagnosis of meningococcal meningitis. J Clin Microbiol, 2003, 41:3851-3853.
- Popovic T, Ajello GW, Facklam R. Manual for the laboratory diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1999.
- Bygraves JA, Maiden MC. Analysis of the clonal relationships between strains of *N. meningitidis* by pulsed-field gel electrophoresis. J Gen Microbiol, 1992, 138:523-531.
- Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 3140-3145.
- Ian MF, Stephen JG, Rachel U, et al. Multilocus sequence typing and antigen gene sequencing in the investigation of a meningococcal disease outbreak. J Clin Microbiol, 1999, 37: 3883-3887.
- Zhu P, Hu X, Xu L. Typing *Neisseria meningitidis* by analysis of restriction fragment length polymorphisms in the gene encoding the class 1 outer membrane protein: application to assessment of epidemics throughout the last 4 decades in China. J Clin Microbiol, 1995, 33:458-462.

(收稿日期:2006-03-06)
(本文编辑:张林东)