

广东省 2003—2011 年 35 株 C 群脑膜炎奈瑟菌多位点序列分析

刘美真 柯昌文 管大伟 陈经雕 张万里 李柏生
柯碧霞 谭海玲 梁剑

【关键词】 脑膜炎奈瑟菌; 多位点序列分析

Multilocus sequence typing technique research on 35 strains of *Neisseria meningitidis* C serogroup isolated from Guangdong province, 2003–2011 LIU Mei-zhen, KE Chang-wen, GUAN Da-wei, CHEN Jing-diao, ZHANG Wan-li, LI Bo-sheng, KE Bi-xia, TAN Hai-ling, LIANG Jian. Guangdong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 511430, China

Corresponding author: LIU Mei-zhen, Email: gz-lmz@163.com

This work was supported by a grant from the Medical Scientific Research Foundation of Guangdong Province (No. A2011069).

【Key words】 *Neisseria meningitidis*; Multilocus sequence typing

流行性脑脊髓膜炎(流脑)近年来在广东省发病维持在低水平,但流行菌群有不断变迁趋势,B、C群菌株已成为主要致病菌群之一。本研究采用多位点序列分析(MLST),对2003—2011年广东省保存的35株C群脑膜炎奈瑟菌(*Nm*)分离株开展分子流行病学研究,探讨菌株间遗传进化关系。

1. 材料与方法:

(1)菌株来源:35株菌分离自临床病例14株,病例密切接触(密接)者14株,健康带菌者(带菌者)7株。来源地区为东莞(20株)、深圳(5株)、广州(4株)、湛江(2株)、韶关(2株)、茂名(1株)、肇庆(1株)。

(2)试剂及仪器:包括诊断血清(美国Remel公司)、Premix Taq DNA聚合酶(购自大连宝生物公司)、细菌基因组DNA提取试剂盒(德国QIAGEN)、流脑7对看家基因引物(由上海生工公司合成)、温度梯度PCR扩增仪(为德国Eppendorf产品)、ABI3730xl型全自动测序仪(ABI, USA)。

(3)方法:所有C群*Nm*菌株按常规方法复苏,再采用PCR确认。按照试剂盒说明书提取基因组DNA后置-30℃冰箱保存。参照PubMLST(<http://pubmlst.org/neisseria>)标准方案并略加调整进行MLST。其中未经纯化的PCR扩增产物委托北京六合华大基因生物工程有限公司测序,序列与PubMLST数据库比对,获得各看家基因位点的等位基因数

值,并形成相应的等位基因谱,判断其序列型(ST)。采用Tree drawing在线软件UPGMA制作进化树分析菌株进化关系特征。

2. 结果:

(1)MLST分型:35株C群*Nm*中,29株属ST-4821克隆系,1株属ST-32克隆系,另5株在数据库中未能找到相应克隆系,其中ST-4821克隆系所占比例最多(82.9%,29/35),其次为ST-5542(8.6%,3/35)、ST-5615和ST-5680(各1株,分别为2.9%)。临床病例分离株(14株)和密接者分离株(14株)均属高致病克隆群。2004年东莞地区流脑暴发,从密接者和病例中分离的6株菌均属ST-4821(序号2~7)。此次疫情采集暴发点密接者和同环境人员咽拭子75份,分离出13株*Nm*,带菌率为17.3%,其中C群5株(38.5%),B群7株,1892群1株;同时对暴发点邻近健康人群采咽拭子32份,仅分离到1株B群*Nm*,未分离出C群菌株。此次密接者、同厂和相邻厂的外来工*Nm*带菌率分别为25.7%(9/35)、10.0%(4/40)和3.1%(1/32)。2005年该地区分离自病例及其密接者的菌株均为ST-4821(序号16~18);2008年该地区从6名密接者中分离到2株C群菌株,均为ST-4821(序号26、27)。带菌者分离的7株菌分别为1株ST-4821(来自广州)、1株ST-32/ET-5克隆系(来自韶关)、3株未知克隆系ST-5542(均来自广州)、1株ST-5615(来自韶关)、1株ST-5680(来自湛江)。见表1。

(2)菌株ST型进化分析:2003—2011年广东省C群*Nm*共有8个ST型,其中ST-4821克隆群有4个序列型(ST-4821、ST-4820、ST-4831、ST-4833),而其中ST-4821占多数(89.7%)。ST-4821克隆群中,ST-4831、ST-4833各有2个基因座的改变,ST-4820、ST-4821各有1个基因座改变。另外4个ST型主要来自带菌者,并与ST-4821克隆群进化关系较远(图1)。

2003—2011年广东省C群*Nm*主要的克隆系是ST-4821,并于2004、2005和2008年曾在东莞地区引发多起聚集性疫情。2004—2010年东莞地区除优势克隆系ST-4821外,2005年还出现ST-4831、ST-4833序列型;深圳地区则出现ST-4820序列型;而肇庆、茂名、湛江地区的序列型均为ST-4821。

3. 讨论:2006年我国新发现的高传染性*Nm*群(ST-4821)曾造成2003年安徽省流脑暴发和流行,至今仍是我国C群*Nm*的主要流行菌群^[1,2]。广东省自2004年在东莞市发生一起流脑局部暴发后,连续3年主要在该地出现C群

表 1 2003—2011 年广东省 C 群 Nm 的 MLST 分型

序号	菌株号	菌株来源	分离年份	检材类型	标本来源	ST 型	ST 克隆系
1	L-MG758	湛江	2003	咽拭子	带菌者	5680	-
2	L-MG764	东莞	2004	脑脊液	病例	4821	ST-4821 COMPLEX
3	L-MG768	东莞	2004	咽拭子	密接者	4821	ST-4821 COMPLEX
4	L-MG769	东莞	2004	咽拭子	密接者	4821	ST-4821 COMPLEX
5	L-MG771	东莞	2004	咽拭子	密接者	4821	ST-4821 COMPLEX
6	L-MG773	东莞	2004	咽拭子	密接者	4821	ST-4821 COMPLEX
7	L-MG775	东莞	2004	咽拭子	密接者	4821	ST-4821 COMPLEX
8	L-MG792	广州	2005	咽拭子	带菌者	5542	-
9	L-MG835	东莞	2005	脑脊液	病例	4831	ST-4821 COMPLEX
10	L-MG836	东莞	2005	咽拭子	密接者	4833	ST-4821 COMPLEX
11	L-MG839	东莞	2005	咽拭子	密接者	4821	ST-4821 COMPLEX
12	L-MG840	东莞	2005	咽拭子	密接者	4821	ST-4821 COMPLEX
13	L-MG843	东莞	2005	脑脊液	病例	4821	ST-4821 COMPLEX
14	L-MG862	广州	2005	咽拭子	带菌者	5542	-
15	L-MG887	东莞	2005	脑脊液	病例	4821	ST-4821 COMPLEX
16	L-MG888	东莞	2005	咽拭子	密接者	4821	ST-4821 COMPLEX
17	L-MG889	东莞	2005	咽拭子	密接者	4821	ST-4821 COMPLEX
18	L-MG898	韶关	2005	咽拭子	带菌者	32	ST-32/ET-5 COMPLEX
19	L-MG906	深圳	2006	脑脊液	病例	4821	ST-4821 COMPLEX
20	L-MG907	广州	2006	脑脊液	病例	4821	ST-4821 COMPLEX
21	L-MG916	茂名	2006	脑脊液	病例	4821	ST-4821 COMPLEX
22	L-MG918	东莞	2007	咽拭子	密接者	4821	ST-4821 COMPLEX
23	L-MG925	韶关	2007	咽拭子	带菌者	5615	-
24	L-MG926	深圳	2008	脑脊液	病例	4821	ST-4821 COMPLEX
25	L-MG928	东莞	2008	脑脊液	病例	4821	ST-4821 COMPLEX
26	L-MG929	东莞	2008	咽拭子	密接者	4821	ST-4821 COMPLEX
27	L-MG930	东莞	2008	咽拭子	密接者	4821	ST-4821 COMPLEX
28	L-MG941	东莞	2009	咽拭子	带菌者	4821	ST-4821 COMPLEX
29	L-MG942	东莞	2010	脑脊液	病例	4821	ST-4821 COMPLEX
30	L-MG943	湛江	2010	血液	病例	4821	ST-4821 COMPLEX
31	L-MG945	深圳	2010	咽拭子	密接者	4821	ST-4821 COMPLEX
32	L-MG952	肇庆	2010	脑脊液	病例	4821	ST-4821 COMPLEX
33	L-MG954	深圳	2011	脑脊液	病例	4820	ST-4821 COMPLEX
34	L-MG956	深圳	2011	血液	病例	4821	ST-4821 COMPLEX
35	L-MG958	广州	2011	咽拭子	带菌者	5542	-

流脑局部暴发, C 群 Nm 已成为广东省主要致病菌群。本研究采用 MLST 分型技术, 研究发现 2003—2011 年广东省分离的 C 群 Nm 主要属高致病的 ST-4821 克隆群, 含 4 个 ST 序列型, ST-4821 是最重要的优势型(占总菌株数的 82.9%)。从

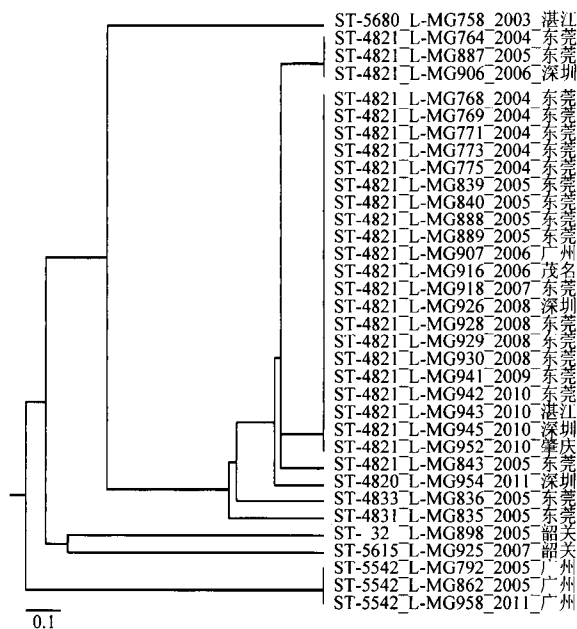


图 1 2003—2011 年广东省 35 株 C 群 Nm 克隆进化关系

病例和密接者分离的 C 群 Nm 菌株均属 ST-4821 高致病性克隆系, 从带菌者分离的菌株则以未知克隆系为主(如广州地区分离株以 ST-5542 为主), 与云南省报道一致^[3]; 另外 ST-32、ST-5615 和 ST-5680 序列型在国内地区未见报道, 是否为广东省特有型别还有待进一步调查。

参 考 文 献

[1] Shao Z, Li W, Ren J, et al. Identification of a new *Neisseria meningitidis* serogroup C clone from Anhui province, China. Lancet, 2006, 367(9508):419-423.

[2] Peng JP, Zhang XB, Yang E, et al. Analysis on comparative genomics of *Neisseria meningitidis* serogroup C strain from 14 countries of China between 1966—2005. Chin J Sci (C), 2007, 37(1):82-87. (in Chinese) 彭俊平, 张笑冰, 杨娥, 等. 1966—2005 年中国 14 个省、市 C 群脑膜炎球菌比较基因组学分析. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2007, 37(1):82-87.

[3] Yin JW, Zhou YM, Gao Y. Biological characteristics of 6 strains of *Neisseria meningitidis* group C in Yunnan. Chin J Prev Med Inf, 2011, 27(5):347-349. (in Chinese) 尹建雯, 周永明, 高媛. 云南省 6 株 C 群脑膜炎奈瑟菌分子生物学特征分析. 预防医学情报杂志, 2011, 27(5):347-349.

(收稿日期: 2012-09-14)

(本文编辑: 张林东)