

B群脑膜炎奈瑟氏菌多位点酶电泳型及其流行病学意义*

中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所** 李新武 胡绪敬 高立慧 王 君

提要 为了阐明自70年代以来在我国11个省和2个直辖市内从流脑病人和带菌者中所分离的B群脑膜炎奈瑟氏菌(Nm)之间的流行病学关系,采用多位点酶电泳技术研究了57株病人菌株和45株带菌者菌株的多位点酶电泳型和克隆群。初步发现,上述菌株可分为69个电泳型(ET)和13个克隆群。其中I克隆群最为重要,因为从70年代以来,它代表了63.7%的所试的全部菌株,并且代表了77.2%的病人菌株,它在地理地区分布上也相当广泛。另外,还有一个明显的趋向,即是从1984年以后,越来越多的病人菌株集中于I克隆群,而且优势ET也出现在I克隆群的复合ET₁和ET₂₄中。当同病人菌株相比较时,上述带菌者菌株显示了更复杂的不同的基因型,只有40%的菌株属于上述I克隆群和优势ET。

关键词 B群脑膜炎奈瑟氏菌 多位点酶电泳型 克隆群体结构

很多国家的流行病学监测发现,90%以上的流脑病例是由脑膜炎奈瑟氏菌A、B、C三个血清群引起,在一些国家中还发现这些菌群的菌株尚可变迁^[1~3]。过去我国流脑的流行以A群Nm为主,占所分离到流脑病人菌株的95%以上。由B群Nm致病者较少,但在健康人群中B群Nm占带菌菌株的60~70%。近年来,我国由B群Nm致病的病例有增加的苗头^[4],B群Nm的带菌率仍占有Nm带菌率的70%左右。因此我们认为必须考虑今后我国会不会发生Nm优势菌群由A群向B群变迁?病人与带菌者的B群Nm的致病性有无差别?对它们怎样才能有效地鉴别?从而可以有的放矢地进行预防。这些问题已引起国内外学者的重视,他们曾试图采用Nm表型分型的方法对B群菌株进行分型。因多数带菌者的B群Nm菌株不能分型或分型率不高,故这种分型的流行病学意义有一定的局限性^[5,6]。Caugant等应用多位点酶电泳技术对挪威的B群Nm进行分型时发现,病人菌株和带菌者菌株在一些ET复合型中所占的比例明显不同,这为鉴别B群Nm可能提供了一种有效的技术手段^[7]。为此,我们采用此技术

对我国70年代以来至今所收集到的102株B群Nm进行了分型研究,并探讨了B群Nm多位点基因型的流行病学意义。

材料和方法

一、材料: B群Nm102株,其中病人菌株57株,带菌者菌株45株,分别从河北、上海等13个省市收集。电泳参考菌株1株,编号29019,由本所保存。还有国际B群参考菌株1株,编号80-1-B11,由美国食品和药品管理局提供。所试菌株在开启菌种时均再行鉴定。

二、方法:

1.同工酶提取及电泳法: 见参考文献^[8~10]。

2.同工酶染色法: 按Sclander氏方法选择9种酶分别进行特异性染色^[9]。9种酶分别为: 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6P); 苹果酸酶(ME); 依赖辅酶I的谷氨酰胺脱氢酶(GDI); 乙醇脱氢酶(ADH); 异柠檬酸脱氢酶(IDH); 延胡索酸酶(FUM); 碱性磷酸酶(ALP),

* 卫生部医学科学研究基金资助课题

** 北京, 邮政编码 102206

依赖辅酶Ⅱ的谷氨酰胺脱氢酶(GDⅡ);腺苷酸激酶(ADK)。

3.上述菌株电泳分型以后,再应用算术平均连接法对其进行聚类分析,所试菌株的平均遗传多态值及平均等位基因数均按Selander方法计算^[9]。

结 果

一、B群Nm的总体遗传多态值及病人菌株和带菌者菌株之间遗传多态值的比较:应用多位点酶电泳技术检测时发现,102株B群Nm 9个位点均为多型性位点,等位基因数为2~6个,每个位点的平均等位基因数为4.44,平均遗传多态值为0.3868,对ET的平均遗传多态值为0.4428。当比较病人和带菌者菌株9种酶位点的遗传多态值时发现,前者为0.3096,后者为0.4415,这表明病人菌株的遗传分化程度比带菌者菌株小。

二、病人和带菌者菌株的ET及克隆群分布:所试菌株和电泳参考菌株同时进行电泳后(图1),根据所试菌株分别和参考菌株在9种同工酶电泳中迁移率的比值可得到所试菌株的

相对迁移率,由此可将所试菌株划分为69个ET,另外加上国际B群参考菌株构成的ET₉,共计70个ET。经聚类分析后画出树状图,再按Olyhoek的克隆群体划分原则,可将70个ET划分为13个克隆群(表1、图2)。在所试的102株B群Nm中79.4%的菌株属于I和Ⅳ克隆群,尤其是I克隆群更重要,它占全部所试菌株63.7%,占病人菌株(44/57)77.2%。就ET而言,以I克隆群中ET₁和ET₂₄复合型为主,它们占上述全部所试菌株的53.9%,占病人菌株的64.9%。其次是ET₂₇复合型和ET₃₉₋₅₃,它们占病人菌株14株,带菌者菌株11株。此外,ET₃₅₋₃₈,ET₅₄和ET₆₆₋₆₉仅有带菌者菌株。

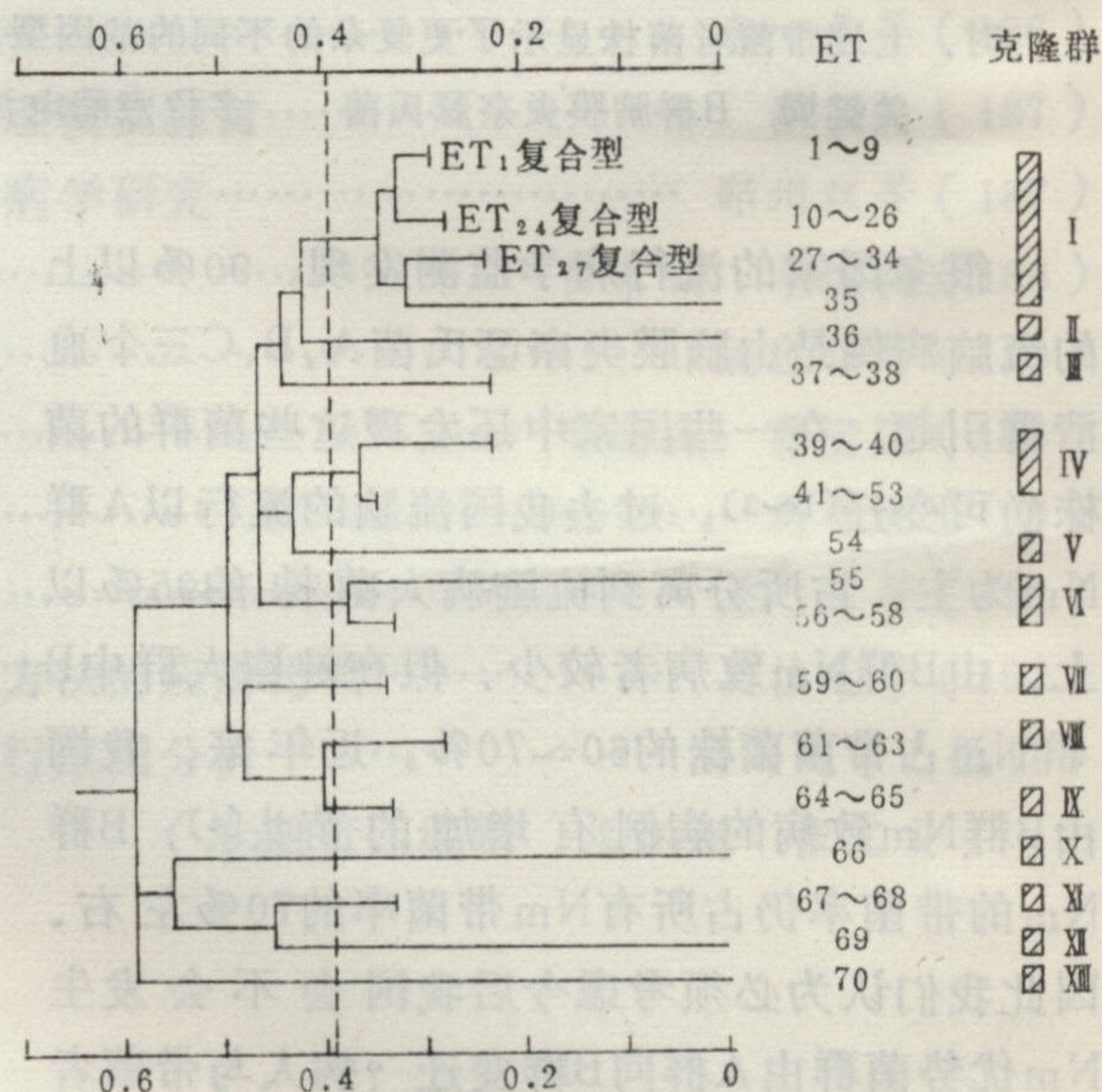


图2 103株B群Nm70个ET型之间遗传关系的树状图

三、不同年分离的病人菌株克隆群的比较:1984年全国流脑发病率比1983年明显上升,按照以往流脑流行规律,这预示着我国在80年代可能将要开始新的流行周期^[12]。我们比较了在这次发病上升前后期间内所搜集的B群Nm的克隆群体结构。由表2可见,在1974~1979年所搜集的16株B群Nm可分为5个克隆群,其中I、Ⅳ克隆群分别占9株和4株。1984~1990年所搜集的41株B群Nm也可分为4个克

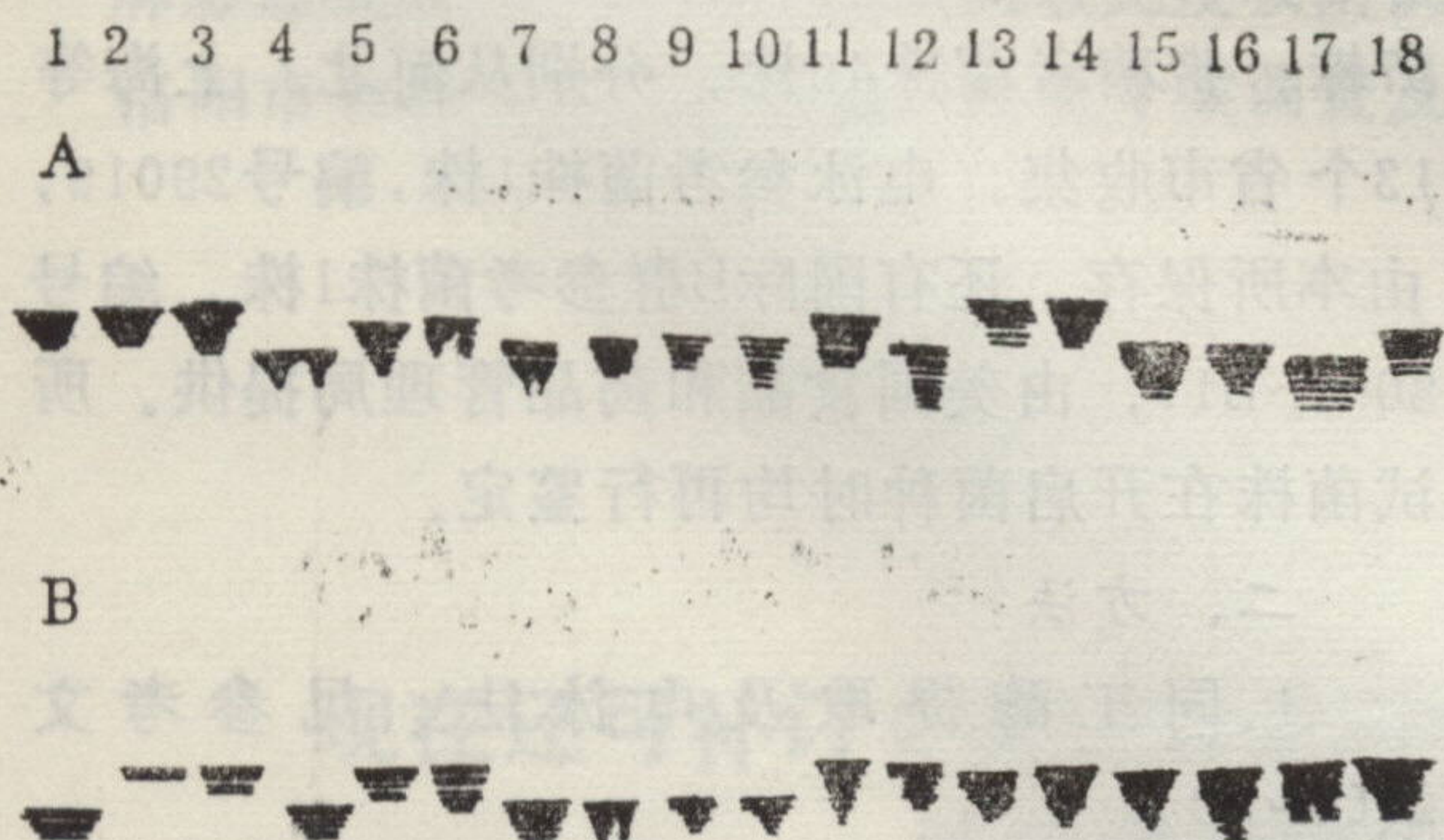


图1 B群Nm两种同工酶的电泳图谱

A: G6P: 1~18依次为198512、G135、G137、G265、B1985、595、612、G261、G256、G260、G255、G232、29019、G233、G211、G240、G270、542852 B群Nm

B: ME: 1~18依次为8622、9、B4428、G3、A14、C94、A50、A3、B167、B54、29019、85040、85003、85001、9003、9005、9008、9009、B群Nm

表1 B群Nm70个ET在克隆群中的分布

克隆群	ET	各种酶位点的等位基因									病人带菌者		参考菌株
		G6P	ME	GD1	IDH	ADH	FuM	ALP	GD ₂	ADK	菌株数	菌株数	
I	ET ₁ 复合型(1~9)	4	3	2	4	3	3	1	3	2	25	2	9003
	ET ₂₄ 复合型(10~26)	4	3	2	4	3	3	3	3	2	12	16	N198681
	ET ₂₇ 复合型(27~34)	4	3	3	1	3	3	3	3	2	7	2	4383
II	35	3	3	3	2	3	3	3	1	2		1	203
	36	2	3	3	3	3	2	3	3	2		1	78044
	37~38	4	1	2	1	3	3	4	3	1		2	79030
IV	39~53	3	5	3	2	3	3	4	3	2	7	9	B1985
V	54	4	5	3	5	3	2	4	3	2		1	95
VI	55~58	6	4	2	2	3	3	4	3	2	2	2	88005
VII	59~60	2	3	5	3	3	3	1	1	2	1	1	G233
VIII	61~63	4	2	2	3	3	3	4	1	2	2	2	29021
IX	64~65	4	5	2	3	3	3	2	2	2	1	1	G211
X	66	3	3	4	3	1	1	3	3	2		1	409
XI	67~68	4	5	2	4	4	2	3	3	2		2	A50
XII	69	2	3	2	4	4	0	3	3	2		1	80112
XIII	70	4	5	3	4	0	0	4	1	2		1	88011
总计											57	45	

表2 不同年从病人分离的B群Nm克隆群分布的 比较

克隆群	1974~1979		1984~1990	
	株	%	株	%
I	9	56.25	35	85.37
IV	4	25.0	3	7.31
VI			2	4.88
VII	1	6.25		
VIII	1	6.25	1	2.44
IX	1	6.25		
总计	16	100.00	41	100.00

隆群，但是其中明显的改变是1984年以后的菌株更集中于I克隆群，其所占的比例上升显著，达到85.37%。与此同时，IV克隆群所占的比例大幅度下降，只占7.31%。

四、B群Nm克隆群的地区分布特点：57株病人菌株可分为6个克隆群，其中以I克隆群菌株的地区分布最广泛，在收集到病人菌株的11个省市中，有10个省市皆发现该克隆群菌株，它还是大部分省市病人菌株的优势克隆群。尤其是河北、四川和上海的菌株，这种优势克隆群分布的特点更明显。Ⅶ~Ⅸ克隆群只分布个别省市（自治区）中（表3）。

表3 从病人分离的不同克隆群B群Nm的地区分布

克隆群	河北	上海	北京	四川	浙江	江苏	山东	辽宁	河南	湖北	宁夏	不详	总计
I	14	9	3	5	3	2	2	2	1	2		1	44
IV	1	4	1			1							7
VI	2												2
VII		1											1
VIII											2		2
IX		1											1
总计	17	15	4	5	3	3	2	2	1	2	2	1	57

讨 论

引起我国流脑发生与流行的主要病原菌是A群Nm,但近年来从病人中分离的B群Nm有增多的苗头^[4],而且从带菌者中所收集的菌株一直是以B群Nm为主,它在带菌菌株中所占的比例可高达60~80%^[11]。不过,至今B群Nm仍不象A群Nm那样引起的流脑病例多。为什么B群Nm带菌率很高,它引起的病例却比较少?我们将怎样分析B群Nm带菌者的流行病学作用以及对他们应怎样预防?为了阐明这些问题,我们采用多位点酶电泳技术检查自70年代以来从病人和带菌者中所收集的B群Nm多位点酶的基因型时发现,带菌者菌株的遗传多态值比病人菌株大,这说明前者的遗传分化程度较高,所以它的基因型分布不集中,不如病人菌株那样具有明显的优势克隆群。只有少部分带菌菌株与病人菌株属于相同的基因型,这表明多数带菌菌株与致病菌株之间缺乏同源关系。Caugant在研究挪威B群Nm引起流脑流行时也发现,近年来约80%的病例是由ET₅和ET₃₇复合型引起的,只有7%和9%的带菌菌株分别分布于上述复合型中^[7]。常规的表型分型不能全面反映B群Nm的特性。多位点酶电泳分型则提供了有效的检定技术,它不仅可将所有B群Nm分型,而且还可以揭示病人与带菌者菌株之间的遗传关系,从而更显示了多位点酶电泳分型在B群Nm分类学上的重要价值。

过去我们及Achtman在研究A群Nm多位点酶基因型时发现,每次流脑流行时皆明显可见一种优势克隆群的存在^[12,13]。我们还发现A群Nm不同优势克隆群周期性地变换引起我国流脑周期性流行^[12]。在本次研究中,我们又发现,从70年代以来,在B群Nm中I克隆群较多见,尤其是自1984年以来,从病人中分离的菌株越来越集中于此克隆群中。随着从病人中分离B群Nm的增多,此克隆群会不会成为一种引起大范围流脑流行的优势克隆群,导致Nm流行菌群变迁?这倒是应引起我们高度注

视的问题,必须加强流行病学监测,对其进行深入研究。

Multilocus Enzyme Electrophoretic Types of *Neisseria meningitidis* Serogroup B and Their Epidemiologic Significances Li Xinwu, et al., Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of preventive Medicine, Beijing

In order to expound the epidemiologic relationships between the strains of *Neisseria meningitidis* serogroup B isolated from patients and carriers, 57 case and 45 carrier isolates were collected in 11 provinces and 2 municipalities of China since the 1970s and their multilocus enzyme electrophoretic types and clonal population structures were studied by multilocus enzyme electrophoresis. It was primarily found that the above strains could be divided into 69 electrophoretic types (ET) and 13 clones. Among others, the clone I was the most important one, because the clone I represented 63.7% of all strains tested and 77.2% of the case isolates and its district distributions were quite wide since the 1970s. In addition, it was an obvious tendency that more and more of the case isolates gathered up the clone I since 1984 and the predominant ETs also occurred in the complex ET 1 and ET 24 of the clone I. As compared with the case isolates, the above carrier isolates displayed more heterogeneous types. Only 40% of all carrier isolates belonged to the above clone I and predominant ETs.

Key words *Neisseria meningitidis* serogroup B Multilocus enzyme electrophoretic types Clonal population structure

参 考 文 献

1. Peltola H. Meningococcal diseases; still with us. Rev Inf Dis. 1983; 5(1): 71.
2. Varughese PV, et al. Meningococcal disease in Canada. in: Vedros NA (Ed) Evolution of Meningococcal Disease. Vol. I CRC Press, 1987; P. 4-7.
3. Kuzemenska P. et al. Epidemiology of Meningococcal Disease in Central and Eastern Europe. in: Vedros NA (Ed) ibid. Vol. 1, 1987; P 103.

4. Hu Xujing, et al. Epidemiological features of epidemic cerebrospinal meningitis in China. in: Mark Achtman et al (Eds) *Neisseriae* 1990. Walter de Gruyter. Berlin. New York 1991; P 165.

5. Kayhty, et al. Types and subtypes of group B meningococci isolated in Finland from 1976 through April 1986. in Poolman JT, et al (Eds) *Gonococci and Meningococci*. 1988; P 119.

6. 白雪源,等.单抗-全菌体ELISA法对106株B群脑膜炎球菌的分型.中华微生物学和免疫学杂志 1991; 11(2): 89.

7. Caugant DA, et al. Clonal diversity of *Neisseria meningitidis* from a population of asymptomatic carriers. *Inf and Immun* 1988; 56(8): 2060.

8. 李新武,等.我国A群脑膜炎奈瑟氏菌的克隆群体结构与流行病学意义.中国公共卫生学报 1991; 10(4): 217.

9. Selander PK, et al. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Applied and Environmental Microbiology* 1986; 51(5): 873.

10. Chun PK, et al. Genetic relationships among *Neisseria* species assessed by comparative enzyme electrophoresis. *J Gen Microbiol* 1985; 131: 3105.

1. 胡绪敬,等.1990~1991年十省流脑监测与控制初步报告.中国疾病监测1991; 6(9): 139.

12. 胡绪敬,等.我国流脑周期流行特征的研究.中华流行病学杂志 1991, 12(3): 136.

13. Achtman M, et al. Recent results on epidemic meningococcal meningitis. *J Med Microbiol*. 1988; 26: 172.

(1990年11月1日收稿 1990年12月30日修回)

乙型肝炎核心抗体阳性者与血型关系的探讨

浙江省宁波市卫生防疫站* 许国章 杜晓光

由遗传因素决定的ABO血型系统,是否影响人体对某些疾病的易感性? 我们采集了宁波市中心血站1988年9月~1990年5月间血清标本673例,用ELISA法检测乙型肝炎核心抗体,结果共检查出55例乙型肝炎核心抗体阳性,其与ABO血型系统的关系列述于附表。

可见,乙型肝炎核心抗体阳性者与机体的ABO血型关系无显著差异($\chi^2=2.98$, $P>0.05$)。

附表 乙型肝炎核心抗体阳性者与ABO血型系统关系

血型	检测数	乙型肝炎核心抗体阳性数	百分率
A	221	13	5.88
B	169	16	9.47
O	235	23	9.79
AB	48	3	6.25
合计	673	55	8.17

* 邮政编码 315000

HANTA-HDPA、DEIA与IFA检测EHF抗体的比较

黑龙江省卫生防疫站* 陶滨礼 王炜红 刘学礼

HANTA-HDPA (Hantavirus High Density Composite Particles Agglutination) 方法是南朝鲜李镐汪教授最近研究的用汉坦病毒致敏的高密度合成硅胶微粒检测EHF抗体的新方法,去年李教授访问黑龙江省卫生防疫站赠送了两套试剂盒,我们选用了17份临床诊断为流行性出血热的病人血清与我们实验室研究的斑点免疫方法(DEIA)和传统的间接免疫荧光法(IFA)进行了比较,报告如下。

材料: 血清抗体:临床诊断为流行性出血热的病人血清从1:20倍比稀释至1:5120

结果与讨论: HANTA-HDPA方法原理与间接

血凝方法相同,只是用红色的高密度硅胶微粒代替红血球,因此具有沉降速度合适,对致敏抗原(或抗体)结合能力强,可大量生产和易保存等优点。间接免疫荧光法检测EHF抗体是传统公认的方法,因此我们以它作为标准方法与其它两种方法进行比较,从我们所作的结果看,所用的17份血清有4份IFA方法检测阴性而其它两方法也是阴性,再看几何平均滴度,我们认为HANTA-HDPA方法有很好的特异性和较高的敏感性,同时此三种方法的比较也进一步证实了我们室研究的DEIA方法的可靠性。

* 哈尔滨, 邮政编码 150036