

· 实验研究 ·

鉴别脑膜炎奈瑟菌 A、B、C、Y、W₁₃₅ 群的多重聚合酶链反应诊断方法

张力 邵祝军 徐丽

【摘要】 目的 建立一种能鉴别脑膜炎奈瑟菌(Nm) A、B、C、Y、W₁₃₅ 5 个血清群的多重聚合酶链反应(PCR)方法。**方法** 首先 PCR 扩增 Nm *crgA* 基因,确定 Nm 感染;再通过多重 PCR 扩增荚膜表达基因 *orf-2* 和 *siaD* 基因,根据特异条带区分不同群 Nm。**结果** 多重 PCR 检测 61 株 Nm 与 4 株非 Nm,能准确地鉴定并可将其 Nm 分成 5 个血清群;检测 4 例流行性脑脊髓膜炎患者的脑脊液,2 例出现 A 群 400 bp 的特异条带,而细菌培养和胶乳凝集方法检测均为阴性;检测 18 份流行性乙型脑炎患者标本,与胶乳凝集试验结果一致。**结论** 多重 PCR 诊断方法能正确鉴别不同群 Nm,对流行性脑脊髓膜炎的临床诊断与流行病学调查有重要意义。

【关键词】 脑膜炎奈瑟菌;多重聚合酶链反应

A novel method for detection and sero-grouping of *Nisseria meningitidis* ZHANG Li, SHAO Zhu-jun, XU Li. Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

【Abstract】 Objective We developed a multiplex polymerase chain reaction (PCR) method for detection, identification and sero-grouping strains of *N. meningitidis*. **Methods** The gene of *crgA* was selected for detection and identification of *N. meningitidis* and the 230 bp of *crgA* fragments were amplified. The genes of *siaD* and *orf-2* were used for sero-grouping. With this technology, *N. meningitidis* of serogroup A, B, C, Y and W₁₃₅ can be differentiated from the specific fragment 400 bp, 450 bp, 250 bp, 120 bp, 120 bp. **Results** This multiple PCR method seemed to be more sensitive than latex agglutination. We used this method to detect 61 isolates of *N. meningitidis* and the 230 bp of *crgA* fragments were amplified. No positive results were obtained from on 4 strains of non-*N. meningitidis*. It seemed that the PCR method which was based on *crag*, was specific in detecting *N. meningitidis*. The 55 strains of *N. meningitidis* could be grouped into A, B, C, Y and W₁₃₅ by this multiplex PCR. No gene fragment was synthesized for the other serogroups of *N. meningitidis*. No cross-reaction was observed for other bacterial species. 4 samples of meningococcal meningitis patients were detected by the multiplex PCR and two of them were positive with 400 bp band, representing serogroup A of *N. meningitidis* but all were negative to culture and latex agglutination. 18 samples of Japanese (B) encephalitis patients were also detected by multiplex PCR and no positive result was obtained which was consistent to the finding from culture and latex agglutination. **Conclusion** This multiplex PCR method showed its potential in clinical diagnosis and epidemiological investigation.

【Key words】 *Nisseria meningitidis*; Multiplex polymerase chain reaction

95% 以上的流行性脑脊髓膜炎(流脑)病例是由脑膜炎奈瑟菌(Nm)A、B、C、Y、W₁₃₅ 群引起^[1],因此区分 Nm 血清群对流脑的诊断和防治至关重要。*crgA*(一种与 Nm 粘附有关的调控因子)基因可作为鉴定 Nm 的特异基因,荚膜表达基因 *orf-2* 和唾液酸转移酶基因 *siaD* 可鉴别 Nm 的 5 个群^[2]。Nm 的 A、B、C 群扩增产物长度分别为 400 bp, 450 bp,

250 bp。虽然 Y 和 W₁₃₅ 群的产物长度都是 120 bp,但它们扩增所用的引物不同,因此多重聚合酶链反应(PCR)能够同时鉴别 A、B、C、Y、W₁₃₅ 5 个群 Nm 感染,而且比细菌培养和血清学方法敏感。本文利用扩增 *crgA* 基因诊断流脑,再扩增荚膜表达基因 *orf-2* 和唾液酸转移酶基因 *siaD* 鉴别 Nm 的 5 个群,获得了较满意的实验结果。该方法在流脑的临床诊断、流行病学监测和疫苗效果评价中可发挥重要作用。

材料与方 法

1. 菌株: 研究所用 Nm 菌株为 20 世纪 60 至 90 年代在山东、安徽等 15 个省市从流脑患者和带菌者分离收集, 本室保存, 共 61 株; 其中 A 群 17 株、B 群 16 株、C 群 10 株、Y 群 2 株、W₁₃₅ 群 10 株、29E 群 2 株、H 群 1 株、I 群 1 株、X 群 2 株。阳性对照为 Nm 29019(A)、29021(B)、29025(C)、29028(Y) 和 79245(W₁₃₅); 阴性对照菌株为肺炎链球菌(31201); 肺炎链球菌与金黄色葡萄球菌为本研究室保存; 大肠埃希菌由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所微生物室惠赠。所有菌株在使用前进行常规鉴定。

2. 主要试剂: 蛋白酶 K、RNaseA 为 Sigma 公司产品; TaqDNA 聚合酶、dNTP、Marker 购于华美生物工程公司; 引物由赛百盛公司合成。

3. Nm 培养及 DNA 模板制备: Nm 培养及 DNA 模板制备参照文献[3,4]。灵敏度检测所用模拟标本的制备如下: 纯培养的细菌分别用三蒸水、健康人或非流脑患者的血清和脑脊液系列稀释, 分别制备模板进行多重 PCR 扩增, 扩增阳性的最低浓度的稀释液即灵敏度。

4. 寡聚核苷酸引物和多重 PCR 扩增: *crgA*、*orf-2* 和 *siaD* 基因的寡聚核苷酸引物见表 1。对 *orf-2* 和 *siaD* 进行多重 PCR 扩增的体系组成为: 蒸馏水 5 μl、buffer 5 μl、dNTP 4 μl (终浓度 200 μmol/L)、MgCl₂ 3 μl、引物 3 μl (终浓度 1 μmol/L)、模板 2 μl、Taq 酶 1 μl (2.5 U)。扩增条件为: 94℃ 3 min; 92℃ 30 s, 55℃ 40 s, 72℃ 30 s; 37 个循环, 72℃ 10 min。

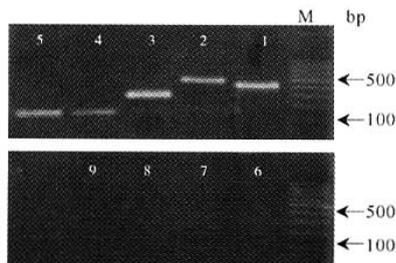
表1 实验中所用引物名称及序列

引物名称	靶基因	引物序列
引物对 a	<i>crgA</i>	5'-gctggcgcgcctggcaacaaaattc-3' 5'-cttctgcagattgcggcgtgcct-3'
引物对 1	<i>orf-2</i> (A)	5'-cgcaataggtgtatatattctcc-3' 5'-cgtaatagtttctgtatgcctttct-3'
引物对 2	<i>siaD</i> (B)	5'-ggatcatttcagttgtttccacca-3' 5'-gcatcctggaggaataagcattaa-3'
引物对 3	<i>siaD</i> (C)	5'-tcaaatgagtttgcgaatagaaggt-3' 5'-caatcacgattgcccaattgac-3'
引物对 4	<i>siaD</i> (Y)	5'-ctcaagcgaagcctttggta-3' 5'-ctgaagcgttttcattataattgctaa-3'
引物对 5	<i>siaD</i> (W ₁₃₅)	5'-cagaaagtgaggattccata-3' 5'-cacaaccatttcattatagttactgt-3'

结 果

1. Nm 与 Nm A、B、C、Y、W₁₃₅ 血清群的鉴别:

所有的 Nm 菌株均可扩增出 230 bp 的阳性条带, 非 Nm 菌株扩增皆阴性。上述 5 个血清群的 Nm 菌株扩增 *orf-2* 和 *siaD* 基因时可得到 400 bp (A 群)、450 bp (B 群)、250 bp (C 群)、120 bp (Y 群)、120 bp (W₁₃₅ 群) 特异条带。虽然 Y 与 W₁₃₅ 群的产物长度都是 120 bp, 但扩增时所用的引物不同, 因此很容易分别 Y 和 W₁₃₅ 群。非上述 5 个血清群的 Nm 以及非 Nm 多重 PCR 皆呈阴性 (图 1)。



M: 100 bp Marker; 1: 29019(A 群 Nm); 2: 29021(B 群 Nm); 3: 29025(C 群 Nm); 4: 29028(Y 群 Nm); 5: 79245(W₁₃₅ 群 Nm); 6: 29043(I 群 Nm); 7: 44825(大肠埃希菌); 8: 1800(金黄色葡萄球菌); 9: 31201(肺炎链球菌)

图1 多重 PCR 扩增 Nm *orf-2* 和 *siaD* 基因

2. 灵敏度检测: 国内流脑主要是 A、B、C 3 群引起, 检测灵敏度针对此 3 群。从结果可见, 多重 PCR 方法(50 μl PCR 体系中加 2 μl 模板, 以下同)对细菌悬液、CSF 和模拟血清 29019(A 群)、29021(B 群)、29025(C 群)检测灵敏度比胶乳凝集方法(60 μl 胶乳体系中加 40 μl 菌液)分别敏感 160 倍、16 000 倍、1600 倍(表 2)。

表2 多重 PCR 检测 Nm 菌悬液、模拟 CSF、模拟血清的灵敏度(最低检测限)与胶乳凝集的比较

项 目	检测方法	
	PCR 方法	胶乳凝集方法
Nm 菌悬液(CFU/ml)		
A 群(29019)	1 × 10 ⁴	1 × 10 ⁵
B 群(29021)	1 × 10 ⁴	1 × 10 ⁷
C 群(29025)	1 × 10 ³	1 × 10 ⁵
模拟 CSF(CFU/ml)		
A 群(29019)	1 × 10 ⁴	1 × 10 ⁵
B 群(29021)	1 × 10 ³	1 × 10 ⁶ *
C 群(29025)	1 × 10 ³	1 × 10 ⁵
模拟血清(CFU/ml)		
A 群(29019)	1 × 10 ⁴	1 × 10 ⁵
B 群(29021)	1 × 10 ⁴	1 × 10 ⁶ *
C 群(29025)	1 × 10 ²	1 × 10 ⁶

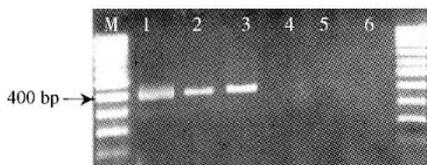
* 未检出

3. 特异性检测: 61 株 Nm 菌皆扩增出 *crgA* 基因 230 bp 片段, 在相同条件下对引起细菌性脑膜炎

肺炎链球菌与金黄色葡萄球菌进行扩增,均为阴性。多重 PCR 扩增 *orf-2* 和 *siaD* 基因,对 Nm A、B、C、Y 和 W₁₃₅ 群的 55 株菌均准确地确定了它们的血清群,作为对照的其他群 Nm 和非 Nm 菌株均扩增阴性。将上述 5 对引物进行单引物扩增时,对相应群 Nm 的鉴定也是特异的, Nm 不同血清群之间以及 Nm 与非 Nm 之间皆无交叉扩增反应。多重 PCR 检测 18 份乙脑患者的血清和尿亦为阴性。

4. 重复性检测:多重 PCR 检测 61 株 Nm 菌, 4 株非 Nm 菌, 每株均重复试验 3 次, 所有实验结果重复稳定。

5. 标本检测:多重 PCR 检测 2004 年 3 月从辽宁省收集的 4 例临床诊断为流脑患者的 CSF, 其中 2 例出现 A 群 Nm 特异条带(400 bp), 另 2 例扩增结果为阴性(图 2)。此 4 例 CSF Nm 培养和胶乳凝集试验结果皆为阴性;多重 PCR 还检测了 2003 年 4 月份从广西地区收集的不明原因的脑炎病例血清 14 份和尿 4 份, 重复多重 PCR 试验 3 次, 结果皆为阴性反应。这些标本取自 11 个病例, 后来经血清学检查其中 9 例为乙脑 IgM 阳性, 确诊为乙脑, 另外 2 例亦临床诊断为乙脑。



M: Marker; 1: 阳性对照 29019(A 群 Nm); 2~5: 患者; 6: 阴性对照 31201(肺炎链球菌); M: 100 bp Marker

图2 4 例流脑患者脑脊液标本的扩增结果

讨 论

在 Nm 致病过程中粘附作用是必不可少的, 而 *crgA* 基因参与 Nm 与靶细胞的紧密接触^[5]。*crgA* 基因序列保守, 可以用于区分 Nm 和其他细菌。本研究检测的 61 株 Nm 菌株全部获得了 230 bp 的特异性片段, 而 4 株非 Nm 菌株均为阴性, 而且试验结果重复性好。

A 群 Nm 荚膜表达所需的基因簇长 4.7 kb, 包括 4 个开放阅读框架, 在其他群 Nm 菌中未发现类似的基因结构^[6]。因此, 使用 PCR 扩增 *orf-2* 基因, 可特异性检测 A 群 Nm。B、C、Y 和 W₁₃₅ 群荚膜多糖虽然都是唾液酸, 但它们结构的重复单位不同^[1]。实验表明, 参与 B、C、Y、W₁₃₅ 群唾液酸合成的荚膜

基因之间可发生杂交, 而参与唾液酸聚合成多唾液酸链的群特异的唾液酸转移酶(*siaD*)之间不发生杂交^[7], 可利用 *siaD* 基因区分 B、C、Y 和 W₁₃₅ 群。本研究先用 PCR 扩增 *crgA* 基因确定 Nm 感染, 进一步使用多重 PCR 扩增 *orf-2* 与 *siaD* 基因对 Nm 进行分群诊断, 有利于增强多重 PCR 的特异性, 提高诊断结果的可靠性。

本文应用多重 PCR 对 Nm A、B、C、Y 和 W₁₃₅ 群 55 株 Nm 进行扩增, 均可正确鉴别它们的血清群, 且敏感特异。对此 Nm 菌 5 群以外的 6 株其他群的扩增结果均为阴性; 对 4 株能引起化脓性脑膜炎的非 Nm 菌亦扩增阴性, 这说明我们选择的 *orf-2* 与 *siaD* 基因可以确定 Nm 并区分它们的血清群。因为 95% 以上的流脑病例是由 A、B、C、Y、W₁₃₅ 5 群引起的, 因此应用多重 PCR 检测临床标本是可行的。本方法敏感度较高, 特异性较强, 重复性好, 比细菌培养方法诊断流脑节省时间, 而且检验结果不受抗生素使用的影响, 比血清学方法诊断 B 群 Nm 感染灵敏度高得多, 并且不易发生交叉反应。本研究建立的 PCR 诊断方法为流脑的临床诊断和流行病学调查提供实验基础。但是, 本研究的临床标本较少, 还需要收集更多的流脑患者和其他化脓性脑炎患者的标本进行验证和完善。

参 考 文 献

- 1 杨正时, 房海, 主编. 人及动物病原细菌学. 石家庄: 河北科技出版社, 2002. 359-377.
- 2 Muhamed KT. Simultaneous approach for nonculture PCR-based identification and serogroup prediction of *Neisseria meningitidis*. J Clin Microbiol, 2000, 38: 855-857.
- 3 Fox AJ, Jones DM, Gray SJ, et al. An epidemiologically valuable typing method for *Neisseria meningitidis* by analysis of restriction fragment length polymorphisms. J Med Microbiol, 1991, 34: 265-270.
- 4 Maiden M, Suker J, McKenna AJ, et al. Comparison of the class I outer membrane protein of eight serological reference strains of *Neisseria meningitidis*. Mol Microbiol, 1991, 5: 727-736.
- 5 Deghmane AE, Petit S, Topilko A, et al. Intimate adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial cells is under the control of the *crgA* gene, a novel LysR-type transcriptional regulator. EMBO J, 2000, 19: 1068-1078.
- 6 Paula O, Anders B, Per O. PCR identification of the group A *Neisseria meningitidis* gene in cerebrospinal fluid Scand. J Infect Dis, 1999, 31: 481-483.
- 7 Ray B, Heike C, Guiver M, et al. Non-culture diagnosis and serogroup determination of meningococcal B and C infection by a sialyltransferase(*siaD*) PCR ELISA. Epidemiol Infect, 1997, 118: 111-117.

(收稿日期: 2005-01-10)

(本文编辑: 孙强正)