

TaqMan 荧光定量 PCR 检测和鉴别 不同血清群脑膜炎奈瑟菌方法的 建立及应用

朱兵清 徐丽 李马超 任红宇 田国忠 高源 王艳华 祁国明 阙飙 邵祝军

【摘要】 目的 建立 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法,用于脑膜炎奈瑟菌不同血清群菌株的检测和鉴别。方法 设计合成 7 对引物和 TaqMan 探针,脑膜炎奈瑟菌种属特异性的基因为 *ctrA*;不同血清群的脑膜炎奈瑟菌特异性基因分别为 A 群(*sacB*)、B 群(*siaD*)、C 群(*siaD*)、X 群(*xcbB*)、Y 群(*synF*)、W₁₃₅ 群(*synG*)。检测和确定不同探针和引物用于脑膜炎奈瑟菌荧光定量 PCR 检测的特异性、敏感性,并同时 will 将荧光定量 PCR 和乳胶凝集方法应用于 121 份疑似脑膜炎奈瑟菌感染患者的脑脊液标本的检测。结果 *ctrA*、*sacB*、*siaD*(B 群)、*siaD*(C 群)、*xcbB*、*synF*、*synG* 等 7 对引物和探针能准确检测和鉴定 79 株不同血清群的脑膜炎奈瑟菌菌株,检测灵敏性比相应的普通 PCR 高 $10^1 \sim 10^3$ 倍,每对引物和探针反应体系中,能检测的最低全基因组 DNA 拷贝数分别为 8、8、80、8、8、80、8;检测 121 份疑似脑膜炎奈瑟菌感染患者的脑脊液标本, TaqMan 荧光定量 PCR 检测 11 份阳性,乳胶凝集方法检测 6 份阳性。结论 TaqMan 荧光定量 PCR 方法能特异地检测和鉴定不同血清群脑膜炎奈瑟菌,具有较高的灵敏性和快速检测的特点,能提高临床疑似脑膜炎奈瑟菌感染病例的阳性检出率。

【关键词】 脑膜炎奈瑟菌; TaqMan; 荧光定量 PCR

Establishment and application of TaqMan Real-Time PCR in detection and serogrouping of *Neisseria meningitidis* ZHU Bing-qing, XU Li, LI Ma-chao, REN Hong-yu, TIAN Guo-zhong, GAO Yuan, WANG Yan-hua, QI Guo-ming, KAN Biao, SHAO Zhu-jun. State Key Laboratory for Infectious Disease Control and Prevention, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: SHAO Zhu-jun, Email: shaozhujun@icdc.cn

【Abstract】 Objective To establish TaqMan Real-Time PCR method for detection and identification of *Neisseria meningitidis*. Methods Seven sets of primers and FAM-labeled probes targeting different genes of *Neisseria meningitidis* were designed and synthesized. *ctrA* gene was used for identification of *N. meningitidis* species. Six serogroups (A, B, C, X, Y, W₁₃₅) of *N. meningitidis* were detected with following genes: *sacB* (A), *siaD* (B), *siaD* (C), *xcbB* (X), *synF* (Y) and *synG* (W₁₃₅) respectively. Sensitivity and specificity of Real-Time PCR were assessed for different primers and probes. 121 cerebrospinal fluid (CSF) specimens from suspected *N. meningitidis* invasive meningitis cases were detected by latex agglutination test and Real-Time PCR assay simultaneously. Results 79 *N. meningitidis* isolates of different serogroups could be detected and identified by seven sets of primers and probes in this study. Real-Time PCR seemed more sensitive than standard PCR by $10^1 \sim 10^3$ times. The respective sensitivities for *ctrA*, *sacB*, *siaD*(B), *siaD*(C), *xcbB*, *synF* and *synG* were 8, 8, 80, 8, 8, 80, 8 genome DNA copies in each reaction. Of the 121 CSF specimens, 11 were positive for Real-Time PCR and 6 for latex agglutination test. Conclusion Real-Time PCR could rapidly detect and identify *N. meningitidis* of different serogroups and seemed more sensitive. It could be widely used for diagnose of invasive meningitis caused by *N. meningitidis*.

【Key words】 *Neisseria meningitidis*; TaqMan; Real-Time PCR

流行性脑脊髓膜炎(流脑)是由脑膜炎奈瑟菌

(*Neisseria meningitidis*, Nm)感染引起的以脑膜炎和败血症为主要症状的呼吸道传染病,病死率较高,因而及时诊断和治疗是降低病死率的关键^[1,2]。对脑脊液、血液等标本的细菌培养,不仅耗时,且因抗生素的大量应用、样品质量和培养条件等因素会大大影响培

基金项目:国家“十五”科技攻关计划资助项目(2005BA711A09)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所传染病预防控制国家重点实验室

通讯作者:邵祝军, Email: shaozhujun@icdc.cn

养的阳性率^[1-3]。目前 Nm 特异性基因 PCR 扩增检测的方法已逐渐用于流脑病例标本的检测^[4-7], 荧光定量 PCR 方法因具有较高的灵敏性、特异性、耗时短以及结果不受抗生素的影响等特点, 已应用于 Nm 的检测^[1-3]。根据荚膜多糖的结构 Nm 分为 13 个血清群, 其中 A、B、C、Y、W₁₃₅ 和 X 群菌株引起的病例占流脑病例的 95% 以上。我国流脑的流行一直以 A 群为主, 2003 年后开始出现 C 群流脑的暴发和局部地区流行, 近年来, 我国一些地区也出现 B、X、W₁₃₅ 群等感染病例的报道^[8-10]。建立和应用快速、特异性的荧光定量 PCR 检测方法, 不仅能提高我国流脑病例的阳性检出率, 而且对于发现和治疗不同血清群 Nm 感染的病例, 降低病死率, 同样具有重要的意义。为此我们建立了 TaqMan 荧光定量 PCR 方法, 用于检测和鉴别 A、B、C、X、Y 和 W₁₃₅ 等不同血清群 Nm, 并对其特异性、敏感性、稳定性等进行了研究, 以期应用于疑似流脑病例标本的检测。

材料与方法

1. 菌株和脑脊液标本: 本研究共采用 129 株菌株、1 份人类基因组 DNA 和 121 份脑脊液。129 株菌株中, Nm 79 株(71 株分离自国内 20 多个省市的流脑患者和健康带菌者; 8 株由美国疾病预防控制中心惠赠); 其他菌株包括流感嗜血杆菌 11 株、肺炎链球菌 28 株及副流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、轻型链球菌、大肠埃希菌、铜绿假单

胞菌、无乳链球菌、酿脓链球菌等 11 株。所有阳性对照质控菌株为中国药品生物制品检定所提供, 分别为 29019 (A 群)、29061 (B 群)、29012 (C 群)、29302 (X 群)、29303 (Y 群) 和 29057 (W₁₃₅ 群)。人类基因组 DNA 提取自健康人全血细胞。121 份脑脊液标本均来自全国流脑监测中疑似流脑病例。

2. 主要试剂与设备: 2× PCR 反应混合物为 Stratagene 公司产品, 超纯水为 Gibical 公司生产, 7 对引物和探针由美国疾病预防控制中心生物技术中心合成; Taq DNA 聚合酶、dNTPs、100 bp DNA Marker 购于 TaKaRa 生物工程公司, 普通 PCR 引物由赛百盛公司合成; 乳胶试剂盒为生物梅里埃和伯乐公司产品; Nm 分群血清为美国 Remel 公司产品。荧光定量 PCR 扩增仪为 Stratagene Mx 3000p, 普通 PCR 扩增仪为 Bio-Rad DNAEngine, 凝胶成像仪为 Bio-Rad Geldoc XR, 分光光度计为 Eppendorf Biophotometer。

3. 试验方法:

(1) Nm 接种于巧克力平板 (广州迪景公司产品), 5% CO₂, 37℃, 培养 18-20 h。采用革兰染色镜检、生化鉴定 Nm 菌株, 并进行血清分群。收集巧克力平板上的菌株, 用 QIAGEN 试剂盒提取菌体染色体 DNA。用 QIAGEN 试剂盒从 200 μl 脑脊液中提取 DNA, 最后将 DNA 洗脱于 100 μl AE 中。

(2) 荧光定量 PCR 引物和探针设计参照文献^[11], 探针标记 FAM 荧光基团, 引物及探针序列见表 1。

表1 Nm 种属和血清群特异性引物和探针

| 种属/血清群 | 目的基因 | 引物/探针 | 引物或探针序列(5'~3') | 片段大小(bp) |
|------------------|-------------|-------|--|----------|
| Nm | <i>ctrA</i> | P1 | TGTGTTCCGCTATACGCCATT | 114 |
| | | P2 | GCCATATTCACACGATATAACC | |
| | | Probe | FAM-AACCTTGAGCAA" T" CCATTTATCCTGACGTTCT-SpC6 | |
| A | <i>sacB</i> | P1 | AAAATTCAATGGGTATATCACGAAGA | 92 |
| | | P2 | ATATGGTGCAAGCTGGTTTCAATAG | |
| | | Probe | FAM-CTAAAAG" T" AGGAAGGGCACTTTGTGGCATAAT-SpC6 | |
| B | <i>siaD</i> | P1 | CCCATTTCAGATGATTTGT | 162 |
| | | P2 | AGCCGAGGGTTTATTCTAC | |
| | | Probe | FAM-ATGGGYAACAACACTATGTAATGTCTTTATT-BHQ | |
| C | <i>siaD</i> | P1 | CTTCCCTGAGTATGCGAAAAA | 77 |
| | | P2 | TGCTAATCCCCTGAATG | |
| | | Probe | FAM-TTTCAATGC" T" AATGAATACCACGTTTTTTTGC-SpC6 | |
| X | <i>xcbB</i> | P1 | TGTCCCAACCGTTTATTGG | 66 |
| | | P2 | TGCTGCTATCATAGCCGCC | |
| | | Probe | FAM-TGTTGCCACATGAATGGCGG-BHQ | |
| Y | <i>synF</i> | P1 | GAGCAGGAAATTTATGAGAATACAGA | 140 |
| | | P2 | CTAAAATCATTTCGCTCCATAT | |
| | | Probe | FAM-TATGGTG" T" ACGATATCCCTATCCTTGCTATAAT-SpC6 | |
| W ₁₃₅ | <i>synG</i> | P1 | GTGAGGGATTTCCATATATATTTA | 147 |
| | | P2 | TGCCATTCCAGAAATATCA | |
| | | Probe | FAM-TATGGAGCGAATGATTACAGTAACTATAA-BHQ | |

注: T 为标记 BHQ1 (一种荧光淬灭基团); Y 为 C/T 兼并碱基; SpC6 为磷酸化的探针 3' 末端

(3) 每个 PCR 反应体系总体积为 20 μl , 其中含 2 \times PCR 反应混合物 10 μl , 上下游引物、探针各 2 μl (终浓度在优化过程中进行调整), 参比荧光 Rox 0.3 μl , DNA 模板 2 μl , 超纯水 1.7 μl 。PCR 反应条件为: 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 50 个循环。每次扩增均以 Nm 全基因组 DNA 为阳性对照, 超纯水为阴性对照; 所有相同的样品和阴阳性对照都设有两孔以进行平行检测。先用 *ctrA* 的引物和探针检测 Nm 种属特异性基因片段。如果扩增结果阳性, 在 6 个不同的反应管中用相应的引物和探针分别检测 Nm 不同血清群特异性基因片段。扩增反应的循环域值 (C_t) 通过仪器自带软件进行计算。

(4) 每个基因的上、下游引物反应终浓度分别采用 100、300、600 和 900 nmol/L, 探针终浓度分别采用 100 和 200 nmol/L, 检测相应的阳性对照 DNA, DNA 浓度为 25 ng/ μl 。分析比较各种浓度组合下的扩增曲线和 C_t 值, 选取最优浓度。

(5) 用 *ctrA* 引物和探针检测 Nm A、B、C、29E、H、I、K、W₁₃₅、X、Y、Z 群和不可分群菌株, 流感嗜血杆菌血清型 a、b、c、d、e、f 和不可分型菌株, 肺炎链球菌血清型 3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、23F 和未分型菌株, 副流感嗜血杆菌, 金黄色葡萄球菌, 表皮葡萄球菌, 轻型链球菌, 大肠埃希菌, 铜绿假单胞菌, 无乳链球菌, 酿脓链球菌菌株以及人类基因组 DNA。分别用 *sacB*、*siaD* (B 群)、*siaD* (C 群)、*xcbB*、*synF* 及 *synG* 的引物和探针检测 Nm A、B、C、X、Y、W₁₃₅、29E、H、I、K、Z 群和不可分群菌株。

(6) 用分光光度计测定参考菌株 DNA 浓度并调整至 10 ng/ μl , 用超纯水 10 倍系列稀释, 使其终浓度为 1 fg/ μl ~10 ng/ μl , 分别用普通 PCR^[7] 和荧光定量 PCR 进行检测。普通 PCR 产物电泳上样量 5 μl ;

荧光定量 PCR 以双孔均有阳性扩增曲线且 C_t 值一致的最小 DNA 浓度为引物和探针的最低检测限度, 并将该 C_t 值作为下一步临床标本检测中 C_t 值的 cut-off 界值。对反应体系中细菌全基因组拷贝数的对数和相对应的扩增 C_t 值制作标准曲线, 根据曲线参数评价实验结果的可信度。

(7) 用 *ctrA* 引物和探针扩增 Nm 的阳性对照 DNA (A 群, 29019), 扩增两批, 每批扩增 8 管, 观察批内和批间的 C_t 值变化以检测其稳定性。

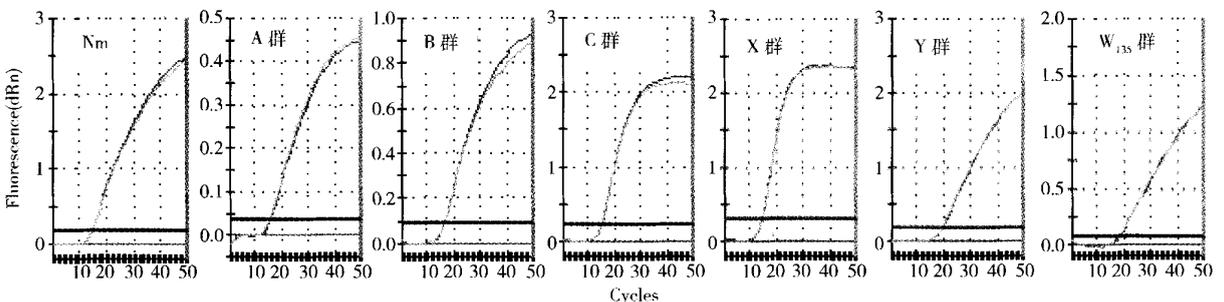
(8) 用乳胶凝集和荧光定量 PCR 方法同时检测临床脑脊液标本 121 份。荧光定量 PCR 检测 C_t 值小于相应的 cut-off 值者定为阳性反应。对于相同两孔 C_t 值相差 2 以上者重复检测; 对于 C_t 值略高者或仅一个孔检测结果阳性者, 增加一倍模板量再次检测, 以确定是否由污染造成的假阳性。

结 果

1. 引物和探针最佳反应浓度: 将出现较小 C_t 值时的引物和探针浓度定为最优反应浓度; 如果 C_t 值差别不大, 选择荧光信号较强的为最优反应浓度; 如果 C_t 值和荧光信号均差别不大, 选择相近的上、下游引物浓度。不同基因的引物和探针最佳反应浓度见表 2。在该浓度下, 各反应体系均能获得良好的扩增曲线 (图 1)。

表 2 不同基因的引物和探针的最佳反应浓度 (nmol/L)

| 基因 | 上游引物浓度 | 下游引物浓度 | 探针浓度 | C_t 值 |
|-------------------|--------|--------|------|---------|
| <i>ctrA</i> | 900 | 900 | 100 | 14 |
| <i>sacB</i> | 600 | 600 | 100 | 16 |
| <i>siaD</i> (B 群) | 900 | 900 | 100 | 17 |
| <i>siaD</i> (C 群) | 600 | 600 | 100 | 15 |
| <i>xcbB</i> | 600 | 600 | 100 | 15 |
| <i>synF</i> | 600 | 600 | 100 | 20 |
| <i>synG</i> | 600 | 600 | 100 | 19 |



注: 扩增基因从左至右依次为: *ctrA* (Nm), *sacB* (A 群), *siaD* (B 群), *siaD* (C 群), *xcbB* (X 群), *synF* (Y 群), *synG* (W₁₃₅ 群)

图 1 最优条件下各反应体系的扩增曲线

2. 特异性:

(1) *ctrA* 的引物和探针检测本研究中 79 株 Nm A、B、C、X、Y、W₁₃₅、29E、H、I、K、Z 群和不可分群菌株均获得阳性,其他非脑膜炎奈瑟菌菌株(50 株阴性对照)及人类基因组 DNA 未产生阳性扩增曲线。

(2) *sacB*、*siaD*(B 群)、*siaD*(C 群)、*xcbB*、*synF*、*synG* 的引物和探针分别能扩增 Nm A、B、C、X、Y 和 W₁₃₅ 群,互相之间未出现交叉扩增。除 *siaD*(C 群)扩增出 1 株不可分型菌株外,均不能扩增其他菌群(29E、H、I、K、Z)。

3. 灵敏性:本实验中,所有反应体系的标准曲线 R² 值均高于 0.99,说明实验操作准确,实验结果可信;扩增效率除 *sacB*、*synF* 略低于 90% 外,余均高于 90%,可以认为系统误差较小,结果可靠(表 3)。

4. 稳定性:用 *ctrA* 基因的探针和引物扩增 Nm 阳性对照 DNA(A 群,29019)时, C_t 值为 19.14~19.67,循环内和循环间的变化均在 1.0 以内(表 4)。

5. 临床标本检测:所有乳胶检测阳性的 6 份标本,荧光定量 PCR 检测结果也均为阳性,分群检测结果一致;另外有 5 份标本乳胶凝集法检测结果阴性而荧光定量 PCR 结果阳性。与乳胶凝集检测相比,荧光定量 PCR 检测具有更高的灵敏性。比较乳胶凝集检测结果阳性和阴性两类标本的荧光定量 PCR 的 C_t 值,未发现明显差异。用荧光定量 PCR 和乳胶凝集方法检测的成份分别为 Nm 的 DNA 和荚膜多糖,二者在脑脊液标本中的含量可能不一致。

讨 论

Nm 的荚膜转运基因 *ctrA* 和血清群特异的荚膜合成相关基因 *sacB*、*siaD*(B 群)、*siaD*(C 群)、*xcbB*、*synF*、*synG* 等是许多 PCR 方法检测 Nm 及其分型的目的基因^[2,3,7,11,12]。本实验中检测的 79 株 Nm 菌株 *ctrA* 扩增结果均为阳性,40 株其他菌

株均为阴性,该基因在 Nm 种属鉴定上具有良好的特异性和灵敏性。*sacB*、*siaD*(B 群)、*siaD*(C 群)、*xcbB*、*synF*、*synG* 的引物和探针分别能扩增出 A、B、C、X、Y 和 W₁₃₅ 群 Nm,互相之间未出现交叉扩增。对其他群(29E、H、I、K、Z 及不可分群)Nm 的检测中,除 *siaD*(C 群)扩增出 1 株不可分型菌株外,均无阳性扩增,说明 PCR 分群和血清学分群结果吻合性良好。至于 *siaD*(C 群)扩增出 1 株不可分型菌株,原因可能是该菌株具备群特异性的基因,但是基因中有缺失、插入或滑移错配,使其荚膜不能正常表达,表现为血清不可分群^[13,14]。

出现阳性扩增曲线,就可以证明扩增体系中存在相应细菌的 DNA,但是当 C_t 值很高时,就难以确定该模板是来自待检测标本还是因为操作过程中 DNA 的污染。为了避免出现太多的假阳性,选取双孔均有阳性扩增曲线,且 C_t 值接近的最小 DNA 浓度为最低检测限度。因为污染的 DNA 量较少,扩增的 C_t 值不具有稳定性^[15],当 C_t 值略高于 cut-off 界值时,可加大一倍模板量再次扩增,如果 C_t 值降至 cut-off 值以下,可以认为该标本荧光定量 PCR 结果阳性;如果第一次扩增是由 DNA 污染造成的,加大模板量也不会对 C_t 值产生明显的影响。

各基因的检测灵敏性不同,相对应的 C_t 值也不尽相同。因此,在确定样品 PCR 检测结果时,对各基因采用了不同的 C_t 值的 cut-off 界值。

Donald 等^[15]对 C_t 值的稳定性进行研究后发现,循环内和循环间 C_t 值变化的标准差随反应中起始模板数的影响很小,故本实验通过检测一种浓度的 DNA(阳性对照)来观察 C_t 值的变化情况,结果显示循环内和循环间 C_t 值差异均小于 1。所以在对样品采用双孔平行检测时,如果 C_t 值差异较大(>2),就认为实验结果不稳定,需要重新检测。

表3 荧光定量 PCR 与普通 PCR 检测灵敏度比较

| 菌株种/群 | 荧光定量 PCR | | | | | 普通 PCR | | | |
|------------------|-----------------|---------|--------|------------------|------------------|---------|---------------------------------|---------|--------|
| | 目的基因 | 灵敏度(fg) | 基因组拷贝数 | C _t 值 | R ² 值 | 扩增效率(%) | 目的基因 | 灵敏度(pg) | 基因组拷贝数 |
| Nm | <i>ctrA</i> | 20 | 8 | 38 | 0.998 | 91.2 | <i>crgA</i> | 2 | 800 |
| A | <i>sacB</i> | 20 | 8 | 39 | 0.999 | 89.7 | <i>Orf-2</i> | 200 | 80 |
| B | <i>siaD</i> (B) | 200 | 80 | 36 | 0.999 | 93.8 | <i>siaD</i> (B) | 2 | 800 |
| C | <i>siaD</i> (C) | 20 | 8 | 36 | 1.000 | 96.1 | <i>siaD</i> (C) | 20 | 8000 |
| X | <i>xcbB</i> | 20 | 8 | 37 | 1.000 | 93.2 | - | - | - |
| Y | <i>synF</i> | 200 | 80 | 37 | 0.999 | 89.0 | <i>siaD</i> (Y) | 20 | 8000 |
| W ₁₃₅ | <i>synG</i> | 20 | 8 | 38 | 0.999 | 91.8 | <i>siaD</i> (W ₁₃₅) | 2 | 800 |

注:基因组拷贝数以 Nm 全基因大小为 2.3 Mb 计算得来;尚未建立 X 群 Nm 普通 PCR 检测体系

表4 两次 *ctrA* 基因检测 Nm 的 C_t 值

| 循环 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 19.14 | 19.21 | 19.16 | 19.37 | 19.46 | 19.35 | 19.40 | 19.29 |
| 2 | 19.39 | 19.59 | 19.67 | 19.68 | 19.59 | 19.39 | 19.55 | 19.66 |

该实验检测到的各基因的灵敏性是建立在在对纯 DNA 扩增的基础之上, 由于在 DNA 提取过程中存在一定量的损失, 因此该灵敏性不能代表原始标本中细菌基因组的浓度。另外, 临床标本 (如脑脊液、血液) 中存在很多难以预知的因子, 这些因子可能影响到 PCR 扩增反应^[5,16], 因此确定 C_t 值的 cut-off 界值尚需要大量临床标本检测结果的支持。

对临床标本所有脑脊液均进行细菌培养, 仅有一份培养阳性, 且种属和分群结果与荧光定量 PCR 一致。细菌培养和乳胶凝集检测是目前临床上流脑诊断常用的两种实验室检测方法, 根据文中数据比较, 二者的灵敏性都明显低于荧光定量 PCR。与普通 PCR 灵敏性比较显示, 荧光定量 PCR 也明显优于普通 PCR, 且不需要对 PCR 产物进行电泳, 这不仅节省了时间, 也减少了污染的环节^[17]。另外, 本实验在原有普通 PCR 的基础上增加了对 X 群的分群检测, 提高了实验室对 X 群 Nm 的鉴定和检测能力, 有助于分析 X 群 Nm 的疾病负担及变化趋势。

普通 PCR 和乳胶凝集试验也存在标本检测结果不一致 (实验结果未发表) 的情况, 但与荧光定量 PCR 不同的是, 普通 PCR 不能检测出所有的乳胶凝集试验阳性的标本。分析原因, 可能为这两种方法都受到灵敏性的限制, 乳胶凝集试验不能够检测出 DNA 浓度高但荚膜多糖含量少的标本, 而普通 PCR 不能够检测出荚膜多糖浓度高但 DNA 含量少的标本; 对于后一种情况, 荧光定量 PCR 的应用能提高其阳性检出率。

本研究中建立的荧光定量 PCR 方法灵敏、特异且快速, 并能够准确分群, 可用于临床疑似流脑病例标本的检测。

参 考 文 献

[1] Poppert S, Essig A, Stoehr B, et al. Rapid diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR and fluorescence in situ hybridization. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(7): 3390-3397.

[2] Corless CE, Guiver M, Borrow R, et al. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(4):

1553-1558.

[3] Guiver M, Borrow R, Marsh J, et al. Evaluation of the applied biosystems automated Taqman polymerase chain reaction system for the detection of meningococcal DNA. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2000, 28(2): 173-179.

[4] Diggle MA, Clarke SC. Detection and genotyping of meningococci using a nested PCR approach. *J Med Microbiol*, 2003, 52(Pt 1): 51-57.

[5] Taha MK. Simultaneous approach for nonculture PCR-based identification and serogroup prediction of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(2): 855-857.

[6] Newcombe J, Cartwright K, Palmer WH, et al. PCR of peripheral blood for diagnosis of meningococcal disease. *J Clin Microbiol*, 1996, 34: 1637-1640.

[7] 张力, 邵祝军, 徐丽. 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. *中华流行病学杂志*, 2006, 27(5): 399-401.

[8] 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.

[9] 汤健闻, 梁华庆, 吕冬艳. 1962-2005 年百色市流脑流行趋势分析. *应用预防医学*, 2006, 12(2): 102-103.

[10] 徐丽. 我国流脑发病的形势与预防. *疾病监测*, 2002, 17(2): 74.

[11] Mothershed EA, Sacchi CT, Whitney AM, et al. Use of Real-Time PCR to resolve slide agglutination discrepancies in serogroup identification of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol*, 2004, 42: 320-328.

[12] Molling P, Jacobsson S, Backman A, et al. Direct and rapid identification and genogrouping of meningococci and *porA* amplification by LightCycler PCR. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(12): 4531-4535.

[13] Dolan-Livengood JM, Miller YK, Martin LE, et al. Genetic basis for nongroupable *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis*, 2003, 187: 1616-1628.

[14] Weber MV, Claus H, Maiden MC, et al. Genetic mechanisms for loss of encapsulation in polysialyltransferase-gene-positive meningococci isolated from healthy carriers. *Int J Med Microbiol*, 2006, 296(7): 475-484.

[15] Donald CE, Qureshi F, Burns MJ, et al. An inter-platform repeatability study investigating real-time amplification of plasmid DNA. *BMC Biotechnol*, 2005, 5: 15.

[16] Yamamoto Y. PCR in diagnosis of infection: detection of bacteria in cerebrospinal fluids. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002, 9(3): 508-514.

[17] Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM. Real-Time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev*, 2006, 19(1): 165-256.

(收稿日期: 2007-12-06)

(本文编辑: 张林东)