

张家界市首例 C 群流脑死亡病例及其密接人群中分离的脑膜炎奈瑟菌实验室分析和 PFGE 分型

田晓辉¹, 夏 昕², 王 敏¹, 戴德芳²

摘要: 目的 了解张家界市首例 C 群流脑死亡病例及其密切接触人群中分离到的 11 株脑膜炎奈瑟菌的病原学特征及其流行关系。方法 经培养及生化鉴定后, 对菌株进行血清学及聚合酶链反应(PCR)鉴定分群, 最后采用最低抑菌浓度(MIC)琼脂稀释法进行药敏试验; 脉冲场凝胶电泳对菌株进行 PFGE 分型分析。结果 通过生化、血清学和 PCR 实验共鉴定到 9 株 C 群脑膜炎奈瑟菌和 2 株 W135 群脑膜炎奈瑟菌, 药敏试验中所有菌株对青霉素、氨苄西林、米诺环素、头孢曲松、头孢噻肟、氯霉素、阿奇霉素、美罗培南和利福平全部敏感; 对复方磺胺甲噁唑全部耐药; 对环丙沙星和左氧氟沙星部分耐药, PFGE 结果显示 11 株菌株共分为两个带型, 其中 9 株 C 群脑膜炎奈瑟菌菌株带型完全相同。结论

C 群和 W135 群可能成为新的流脑流行群引起疾病, 分离的菌株对大部分抗生素仍较敏感, 但要注意耐药趋势, 造成该病例死亡的病原菌为 C 群脑膜炎奈瑟菌, 与其密接同学中分离到的 C 群脑膜炎奈瑟菌的 PFGE 分型呈现高度一致性, 提示为同一克隆群。

关键词: 流行性脑脊髓膜炎; 脑膜炎奈瑟球菌 C 群; 聚合酶链反应; 脉冲场凝胶电泳

中图分类号: R515.2

文献标识码: A

Laboratory Analysis and PFGE Typing of the *Neisseria Meningitidis* Strains Isolated from the First Serogroup C *Neisseria Meningitidis* Death Case and her Close Contacts in Zhangjiajie City TIAN Xiao-hui, XIA Xin, Wang Min, et al.
(Zhangjiajie city Center for Disease Control and Prevention, Zhangjiajie 427000, Hunan, China)

Abstract: **Objective** To explore the pathogenic characteristics and the epidemic associations of the 11 *Neisseria meningitidis* strains isolated from the first serogroup C *Neisseria meningitidis* death case and her close contacts in Zhangjiajie City.

Methods After culture and biochemical identification, the *Neisseria meningitidis* strains isolated were identified and clustered by serological and PCR tests. Drug sensitivity was tested for minimum inhibitory concentration (MIC) by agar dilution method.

Molecular typing was performed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). **Results** Nine serogroup C strains and two serogroup W135 strains were identified by biochemical, serological and PCR tests. All of the 11 strains were sensitive to penicillin, ampicillin, minocycline, ceftriaxone, cefotaxime, chloramphenicol, azithromycin, meropenem and rifampicin. All were resistant to sulfamethoxazole, and some were resistant to ciprofloxacin and levofloxacin. PFGE indicated that 11 strains showed two banding patterns, and 9 serogroup C *Neisseria meningitidis* strains displayed the same banding pattern. **Conclusions**

Serogroup C and W135 *Neisseria meningitidis* may become the new primary epidemic strains of epidemic cerebrospinal meningitis. The isolates are sensitive to most of the antibiotics, but antibiotic resistance trend should be noticed. PFGE typing of the serogroup C strains isolated from the death case and her close contact classmates indicates high consistency, which suggests that the isolates are the same clone serogroup.

Key words: Epidemic cerebrospinal meningitis; Serogroup C *Neisseria meningitidis*; Polymerase chain reaction; Pulsed field gel electrophoresis

作者单位: 1 湖南省张家界市疾病预防控制中心(湖南 张家界 427000); 2 湖南省疾病预防控制中心

作者简介: 田晓辉(1971—), 男, 湖南张家界人, 主管技师 主要从事病原微生物检测和实验室管理工作。通讯作者: 夏昕(1978—), 女, 江苏盱眙

流行性脑脊髓膜炎(简称流脑)是我国冬春季常见的呼吸道传染病, 脑膜炎奈瑟菌 A 群曾是我国主要流行群, 随着 A 群疫苗的普及接种, B 群和 C 群开始登上历史舞台, 尤其是 C 群病例, 具有起病急、病程发

年都维持在较低水平,但张家界市作为世界级的旅游窗口城市,人员流动频繁,随着国内外脑膜炎奈瑟菌流行形势的变迁,势必将对其造成影响,2012 年 4 月初,张家界市发现了首例实验室诊断的 C 群脑膜炎奈瑟菌引起的重症流脑病例,并在随后的密切接触者调查中,又分离到 10 株脑膜炎奈瑟菌,其中 8 株 C 群、2 株 W135 群,W135 群流脑菌株也为湖南省首次分离。现将本次疫情的实验室分析以及 PFGE 分子分型结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 患者资料 某女,15 岁,张家界市永定区某中学住校学生,因发热、流涕、鼻塞和咳痰于 4 月 2 日入院治疗,体温 41.0℃、脉搏 89 次/min,呼吸 20 次/min,血压 126/82 mmHg,实验室检查血常规:白细胞总数 WBC $21.3 \times 10^9/L$ 、中性粒细胞比例为 92.9%、淋巴细胞比例为 3.92%。4 月 2 日突发四肢抽搐,抽搐时拳头紧握、不省人事、面色苍白、口吐白沫、持续数分钟,给予吸氧、安定镇静对症处理无明显好转。当天医院采集该患者血液上送到湖南省疾病预防控制中心进行进一步鉴定,5 d 后从血液的细菌培养中分离到革兰阴性的双球菌,经鉴定为脑膜炎奈瑟菌 C 群。4 月 4 日患者出现瞳孔放大、角膜反射、腹壁反射、膝反射消失等症状后死亡。

1.2 密切接触者资料 对与流脑病例患者同班的 55 名某中学师生和 2 名校医及其 3 名家属共 60 名密切接触者进行了咽拭子采样分离培养,共分离到 10 株脑膜炎奈瑟菌菌株,均为患者的同班同学,该校为住读学校,其中 7 个男生,3 个女生,年龄都在 14~15 岁之间,均已预防性服药,未发生二代病例。

1.3 菌株来源 该起疫情中分离到的 11 株脑膜炎奈瑟菌菌株,其中包括流脑死亡病例血液中分离到 1 株 C 群脑膜炎奈瑟菌;密切接触者咽拭子中分离到 8 株 C 群脑膜炎奈瑟菌以及 2 株 W135 群脑膜炎奈瑟菌。药敏质控标准菌株大肠埃希菌 ATCC 25922、肺炎链球菌 ATCC 49619 为湖南省 CDC 微检科实验室留存。

1.4 培养和生化鉴定 将可疑菌落接种于巧克力琼脂平板,5%CO₂,37℃孵育 24 h,进行分纯培养后,取新鲜培养物按说明书接种至 APINH 鉴定试剂卡上,再置 37℃温箱培养 2.5 h,观察结果。

1.5 血清学实验 采用中国药品生物鉴定所的脑膜炎奈瑟菌血清分型试剂盒,将接种于 APINH 鉴定试剂卡上的

多价血清进行凝集,阳性后再分别用群因子血清进行凝集实验分群,同时用生理盐水作对照凝集。

1.6 PCR 鉴定实验 参照文献^[1]中方法对靶基因进行扩增,种属特异性基因 *CrgA* 用于区分脑膜炎奈瑟菌(简称 Nm)和其他细菌;荚膜多糖(CPS)基因 *SiaD* 和 *Orf* 用来进行 Nm 的分群。引物合成序列及预期 PCR 产物大小见表 1。扩增条件为:94℃3 min;92℃30 s,55℃40 s,72℃30 s;37 个循环,72℃10 min。

1.7 药敏试验 采用最低抑菌浓度(MIC)琼脂稀释法进行药敏试验,按照美国临床实验室标准化研究所(CLSI)推荐的指南进行。抗菌药物共 12 种,购自英国 Oxoid 公司。青霉素(PEN)、氨苄西林(AMP)、美罗培南(MEM)、米诺环素(MIN)、头孢曲松(CRO)、头孢噻肟(CTX)、环丙沙星(CIP)、氯霉素(CHL)、阿奇霉素(AZM)、利福平(RIF)、复方磺胺甲噁唑(SXT)、左氧氟沙星(LVX)。

表 1 6 对脑膜炎奈瑟菌种群的引物名称、序列及产物大小

引物名称	序列	产物大小(bp)
<i>CrgA</i> (总)	5'-gtggcgccgclggcaacaattc-3'	230
	5'-ctctagagattggcggcgcggt-3'	
<i>Orf-2</i> (A)	5'-cgcaataggctataattcttcc-3'	400
	5'-cgtaaatgtttcgtagctctt-3'	
<i>SiaD</i> (B)	5'-ggatcatttcagtgtttcacaa-3'	450
	5'-gcagctgggaataaagattaa-3'	
<i>SiaD</i> (C)	5'-tcataagcatttggcaatagaggt-3'	250
	5'-caatcagcatttggcaatagac-3'	
<i>SiaD</i> (Y)	5'-ctcaagcgaagcgtttggtta-3'	120
	5'-ctgaagcgttttcattatattgctaa-3'	
<i>SiaD</i> (W135)	5'-cagaagttggagatttcata-3'	120
	5'-caacaacttttcattatagttact-3'	

1.8 PFGE 试验 参考中国 CDC PulseNet China 网络实验室的脑膜炎奈瑟菌脉冲场凝胶电泳(PFGE)标准操作方案的方法进行 PFGE 分型。流脑菌株选用 *Nhe* I 酶切,Marker 沙门菌 H9812 标准菌株选用 *Xba* I 酶切,200 μl 体系,酶切 4 h 后再跑电泳 16 h。设定起始脉冲时间:1 s;终止脉冲时间:25 s;电压:6 V/cm;电泳温度:14℃。

2 结果

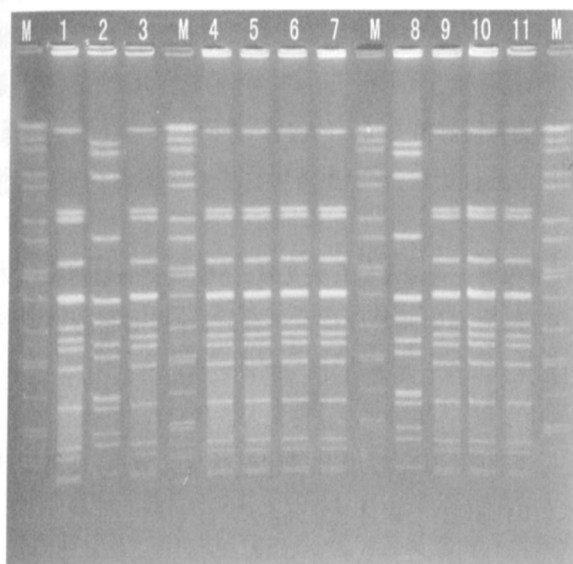
2.1 培养及生化特性 将标本培养物中的可疑菌落接种到巧克力平板,5%CO₂温箱 37℃孵育 24 h 后,可见圆形、凸起、光滑、湿润、半透明的菌落。取新鲜分

糖发酵阳性, 麦芽糖发酵阳性或阴性, 其余果糖发酵、蔗糖发酵、尿酶、脂酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶等均均为阴性; 生化培养鉴定结果均为脑膜炎奈瑟菌。

2.2 血清学及 PCR 结果 从流脑死亡患者分离的 1 株菌为血清多价 I 阳性, C 群阳性, PCR 结果为总 CrgA 阳性, SiaD(C) 阳性; 8 株密切接触者为血清多价 I 阳性, C 群阳性, PCR 结果为总 CrgA 阳性, SiaD(C) 阳性; 2 株密切接触者为血清多价 I 阳性, W135 群阳性, PCR 结果为总 CrgA 阳性, SiaD(W135) 阳性。

2.3 药敏结果 所有 11 株脑膜炎奈瑟菌对 AMP、MIN、PEN、CRO、CTX、RIF、AZM、CHL 和 MEM 全部敏感; 对 SXT 全部耐药; 2 株 W135 群脑膜炎奈瑟菌对 CIP 和 LVX 均敏感, 9 株 C 群脑膜炎奈瑟菌菌株则各有 4 株对 CIP 和 LVX 耐药。

2.4 PFGE 试验结果 11 株脑膜炎奈瑟菌脉冲场凝胶电泳后, 共分为 2 个 PFGE 型, 其中 2 株 W135 群的脑膜炎奈瑟菌为同一带型, 另外 9 株 C 群脑膜炎奈瑟菌菌株为另一带型, 本次结果显示, 流脑患者血液中分离到的 C 群脑膜炎奈瑟菌与其同学密接的咽拭子中分离到的 8 株 C 群脑膜炎奈瑟菌菌株的电泳图谱完全一样, 提示为同一克隆群。PFGE 分型分析结果见图 1, 其中 M 为 Marker 沙门菌标准株 H9812; 序号 1~11 则为检测样本, 1 为流脑死亡病例分离到的 C 群流脑菌株; 2, 8 为密接者分离到的 W135 群流脑菌株; 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11 则为密接者分离到的 8 株 C 群流脑菌株, 可以看到除 2, 8 外, 其余菌株均为同一带型。



3 讨论

自 1984 年以来, 随着流脑疫苗(A 群和 A+C 群)相继纳入免疫规划, 人民群众的居住和卫生条件也不断改善, 流脑疫情得到了有效的控制, 近几年湖南省流脑病例以散发为主, 病例群别也呈多样化^[2, 3], 本次张家界市首次检出 C 群流脑病例, 且病情凶险, 进程快, 很快造成病人死亡, 在随后的疫情病例调查中, 又从死者学校的同学的咽拭子标本中分离到 10 株脑膜炎奈瑟菌, 其中 8 株为 C 群脑膜炎奈瑟菌, 2 株为 W135 群脑膜炎奈瑟菌。

从分离到的菌株情况看, A 群脑膜炎奈瑟菌可能因为 A 群流脑疫苗的普及接种, 已经不再是张家界地区的主要流行菌株。由于 A+C 群流脑结合疫苗 2008 年才开始在全国推广免费接种, 而 C 群菌株在本地区显然处于流行的优势菌群, 故在大年龄组的学生中极有可能因为漏种疫苗而引起疾病, 对 C 群流脑的防控形势仍然严峻。我国 W135 群脑膜炎病例于 2007 年首次在广东省出现, 随后广西、福建等省份也相继出现该群病例^[4~6]。张家界市作为湖南省的旅游窗口城市, 人员流动频繁, 本次在学生中检出到 W135 群菌株, 为湖南省首次检出, 虽然没有进一步引起病例发生, 但仍存在着隐患, 尤其目前国内推行的免费疫苗仍是以 A 群和 A+C 群为主, 对 W135 群的感染并无保护性, 这就提示必须引起高度关注, 在经济条件许可的情况下, 要尽可能接种 A+C+Y+W135 四价流脑疫苗, 以保障人民群众的身体健康。

11 株脑膜炎奈瑟菌对 AMP、MIN、PEN、CRO、CTX、RIF、AZM、CHL 和 MEM 全部敏感; 说明青霉素、头孢类等抗生素仍然可以作为治疗流脑的首选药物, 但国外已有脑膜炎奈瑟菌对 PEN、AMP、RIF 等抗菌药物耐药的报道^[7, 8], 需引起注意。11 株菌对 SXT 全部耐药、对 CIP 和 LVX 部分耐药, 这一结果与国内报道基本一致^[2, 9, 10], 说明磺胺类与喹诺酮类抗生素已经不适合作为抗该类感染的治疗, 鉴于当前脑膜炎奈瑟菌的耐药形势并不严重, 如何早期诊断并及时治疗, 避免重症及死亡病例的发生, 也是临床应该高度重视的问题。

对本次疫情的 11 株脑膜炎奈瑟菌进行进一步 PFGE 分子分型, 结果显示共分为 2 个 PFGE 带型, 除 2 株 W135 群的脑膜炎奈瑟菌为另一带型外, 其余 9 株 C 群脑膜炎奈瑟菌菌株为同一带型, 也就是说, 本次

细胞自噬的研究中提出,在姜黄素给药前期,自噬可作为一种防御机制抵御环境变化对细胞造成的损伤,隔离某些凋亡因子,延迟凋亡的发生,对细胞有保护作用;在姜黄素给药后期,自噬则作为一种细胞的死亡程序,促进凋亡的发生,凋亡是诱导 K562 细胞死亡的主要原因。Cirstea 等^[20]也证实, RAPA 可诱导多发性骨髓瘤细胞发生自噬和凋亡,且凋亡的发生晚于自噬。

由于自噬和肿瘤血管生成均受 PI3K/Akt/mTOR 信号通路调控,两者关系密切。Nguyen 等实验证实,重组 K5(rK5)可诱导内皮细胞发生自噬和凋亡, Bcl-1 上调,但是 Bcl-2 基因水平不变,同时 VEGF 被抑制^[21]。

本研究证实了 RAPA 作为 mTOR 的靶向抑制剂,对 Ph 染色体阳性的 SUP-B15 细胞株有显著的抑制作用,并可诱导其发生自噬和凋亡,并呈现一定时序性。研究有待从分子水平进一步研究阐明该作用的机制,为进一步寻找新的白血病治疗策略提供实验依据和参考。

[参考文献]

[1] Xu Q, Simpson SE, Scialla TJ, et al. Survival of acute myeloid leukemia cells require PI3 kinase activation[J]. Blood, 2003, 102(3): 972-980.

[2] Ly C, Arechiga AF, Melo JV, et al. Bcr-Abl kinase modulates the translation regulators ribosomal protein S6 and 4E-BP1 in chronic myelogenous leukemia cells via the mammalian target of rapamycin [J]. Cancer Res, 2003, 63(18): 5716-5722.

[3] Gutierrez A, Look AT. NOTCH and PI3K-AKT pathways intertwined[J]. Cancer Cell, 2007, 12(5): 411-431.

[4] Abraham RT, Eng CH. Mammalian target of rapamycin as a therapeutic target in oncology[J]. Expert Opin Ther Targets, 2008, 12(2): 209-222.

[5] Vu C, Fruman DA. Target of Rapamycin signaling in leukemia and

lymphoma[J]. Clinical Cancer Research, 2010, 16: 5374-5381.

[6] Gilliland DG, Tallman MS. Focus on acute leukemias[J]. Cancer Cell, 2002, 1(5): 417-420.

[7] Avellino R, Romano S, Rasole R, et al. Rapamycin stimulates apoptosis of childhood acute lymphoblastic leukemia cells[J]. Blood, 2005, 106: 1400-1406.

[8] Saunders R, Cisterne A, Weiss J. The mammalian target of rapamycin inhibitor RAD001 (everolimus) synergizes with chemotherapeutic agents ionizing radiation and proteasome inhibitors in pre-B acute lymphocytic leukemia[J]. Haematologica, 2011, 96: 69-77.

[9] Crazzolaro R, Cisterne A, Thien M, et al. Potentiating effects of RAD001 (Everolimus) on vincristine therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. Blood, 2009, 113(14): 3297-3306.

[10] Klionsky DJ. Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve[J]. Autophagy, 2008, 4(6): 740-743.

[11] Huang J, Klionsky DJ. Autophagy and human disease[J]. Cell Cycle, 2007, 6(15): 1837-1849.

[12] 虞燕霞,顾振纶,秦正红,等.自噬激活与抗肿瘤药物的作用[J].中国药理学通报, 2006, 22(2): 137-141.

[13] Lum JJ, Bauer DE, Kong M, et al. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis[J]. Cell, 2005, 120: 237-248.

[14] 赵妍敏. mTOR 靶向抑制剂雷帕霉素对人急性 T 淋巴细胞白血病细胞的作用及机理研究[D]. 浙江大学博士学位论文, 2009.

[15] Oberstein A, Jeffrey PD, Shi Y, et al. Crystal structure of the bcl-XL-Bcl-1 peptide complex; Bcl-1 is a novel BH3-only protein [J]. J Biol Chem, 2007, 282: 13123-13132.

[16] Debnath J, Baehrecke EH. Does autophagy contribute to cell death [J]. Autophagy, 2005, 1: 10-18.

[17] Baehrecke EH. Autophagy: dual roles in life and death[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005, 6(6): 505-510.

[18] Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism[J]. Oncogene, 2004, 23(16): 2891-2906.

[19] 潘红宁.姜黄素诱导 K562 细胞死亡中自噬的作用及其与凋亡的关系[D].苏州大学硕士学位论文, 2007.

[20] Cirstea D, Hideshima T, Pozzi S. Combination of nab-rapamycin and perifosine induces synergistic cytotoxicity and antitumor activity via autophagy and apoptosis in multiple myeloma (MM)[J]. Blood, 2008, 112: 3663-3671.

[21] Nguyen TMB, Subramanian IV, Kelekara A, et al. Kringle 5 of human plasminogen, an angiogenesis inhibitor, induces both autophagy and apoptotic death in endothelial cells[J]. Blood, 2007, 109: 4793-4802.

(收稿日期: 2012-05-22)

(接 1313 页)

株 C 群脑膜炎奈瑟菌菌株的电泳图谱完全一样,为同一流行克隆群,说明造成该病例死亡的 C 群脑膜炎奈瑟菌菌株已经在张家界市某中学造成了小范围的流行,由于疫情上报及时,相关单位反映迅速,及时抑止了二代病例的发生,60 个密接检出了 10 株脑膜炎奈瑟菌,带菌率如此之高,也提醒张家界市相关卫生医疗行政主管部门和疾控机构应引起对流脑的高度重视,在今后的工作中,应及时监测脑膜炎奈瑟菌在人群中的带菌情况,以便及时发现新的型别并掌握其流行趋势,同时利用脉冲场凝胶电泳技术 PFGE 对流行菌株进行分型比对、结合流行病学找到其流行关联,及时提出预警信息,追溯传染源,切断传播途径都具有重要意义。

[参考文献]

[1] 张力,邵祝军,徐丽.鉴别脑膜炎奈瑟菌 A、B、C、Y、W135 群的多重

[2] 夏昕,湛志飞,张红,等.脑膜炎奈瑟菌病原学及药物敏感性分析[J].中国感染控制杂志, 2010, 9(3): 337-338.

[3] 夏昕,湛志飞,刘运芝,等.湖南省 B 群脑膜炎奈瑟菌药物敏感性及分型[J].中国公共卫生杂志, 2011, 27(12): 1568-1569.

[4] 刘美真,管大伟,邓小玲,等.广东省首例 W135 群流脑的病原学分析[J].华南预防医学, 2008, 34(3): 26-28.

[5] 林玫,杨进业,权怡,等.广西首例 W135 群流脑病例流行病学调查[J].应用预防医学, 2008, 14(3): 143-144.

[6] 原灵,詹锦峰,林震宇,等.福建省首例 W135 群流行性脑脊髓膜炎病例的回顾性研究[J].疾病监测, 2010, 25(3): 195-195.

[7] Hedberg ST, Fredlund H, Nicolas P, et al. Antibiotic susceptibility and characteristics of *Neisseria meningitidis* isolates from the African meningitis belt, 2000 to 2006: phenotypic and genotypic perspectives [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(4): 1561-1566.

[8] Jorgensen JH, Crawford SA, Fiebelkorn KR. Susceptibility of *Neisseria meningitidis* to 16 antimicrobial agents and characterization of resistance mechanisms affecting some agents[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(7): 3162-3171.

[9] 邵祝军,徐英春,徐丽,等.22 株脑膜炎奈瑟菌对治疗和预防用抗菌药的体外敏感性[J].中国感染与化疗杂志, 2007, 7(6): 435-437.

[10] 孙健,黄锦敏,鞠长蕊.55 株脑膜炎奈瑟菌对 12 种抗生素体外敏