

一外来民工子女患流脑死亡病例及其密切接触者菌株分离检测分析

韦俊超¹, 朱水荣², 包云娟¹

(1. 浙江省东阳市疾病预防控制中心, 浙江东阳 322100 2. 浙江省疾病预防控制中心, 杭州 310009)

[关键词] 流脑死亡病例; 脑膜炎奈瑟菌; 密切接触者; 脉冲场凝胶电泳

[中图分类号] R373.3

[文献标识码] C

[文章编号] 1004-8685(2008)04-0751-02

2007年3月19日上午, 东阳市疾病预防控制中心(简称市疾控中心)接到本市人民医院1例疑似流行性脑脊髓膜炎(简称流脑)的报告: 患者为一外来民工的儿子, 刚满周岁, 无流脑多糖菌苗接种史, 于2007年3月18日晚9时出现发热、啼哭、呕吐等症状, 入院时患儿面色发绀, 有大小不一的出血点和瘀斑, 体温38℃, 血压72/58 mmHg, 心率100次/分, 巴氏征和脑膜刺激征均为阳性; 血常规 WBC $9.1 \times 10^9/L$, 中性粒细胞39%、淋巴细胞54%; 超敏C反应蛋白63000 $\mu g/L$, 血糖、钠、氯、钙均有不同程度下降; 尿酸、尿素氮、ALT、AST、AKP等均明显升高, 致使患儿于20日凌晨死亡。市疾控中心在接到报告后迅速对病人及其密切接触者进行了流行病学调查, 并采集了病人的脑脊液、血液和9份密切接触者的咽拭子标本, 在现场接种后送实验室分离培养。

1 材料与方法

1.1 标本来源

采集病人脑脊液及血液各1份; 以无菌棉拭子采集密切接触者咽拭子标本9份, 于采样现场立即接种。

1.2 培养基、试剂和仪器

双抗巧克力平板(含多粘菌素B和万古霉素)由上海市CDC生产; 双向血液增菌瓶、API NH试条、VITEK 2 NH细菌鉴定卡、ATB全自动微生物鉴定仪、VITEK 2-compact均由法国一生物梅里埃公司生产; 药敏纸片、血平板由杭州微生物试剂厂生产。

1.3 诊断血清

脑膜炎奈瑟菌诊断血清(由中国生物制品检定所生产); 胶原凝集试剂盒(由法国一生物梅里埃公司生产); 进口脑膜炎奈瑟菌诊断血清(由丹麦生产); 以上试剂均在有效期内按说明书使用。

1.4 病原菌分离鉴定方法

依照《流行性脑脊髓膜炎诊断标准》GB16884-1997附录A B C方法进行^[1]。

1.5 药敏质控菌株

大肠埃希菌 ATCC25922, 金黄色葡萄球菌 ATCC25923, 绿脓杆菌 27853由浙江省疾病预防控制中心菌种室提供。

1.6 脉冲场凝胶电泳(PFGE)

参照 Bygrave, Maiden^[2]的方法进行。所用试剂和主要仪

器包括: PFGE用限制性内切酶 Sfi¹、Xba¹ 购自 TAKARA大连宝生物工程有限公司; 琼脂糖 SeaKem Gold Agarose 脉冲场凝胶电泳仪 ChefMapper III、读胶仪 GelDoc2000购自 Biorad USA; 蛋白酶 K购自 Merck Germany; 水浴摇床购自江苏金坛江南仪器厂; SHA-C浊度仪 Densitab 10 Merieux 血平板等购自法国梅里埃公司; SDS AMRESCO USA; 电泳条件: 初始脉冲时间1 s, 最终脉冲时间25 s, 电压6 V/cm, 电场夹角120°; 电泳时间16 h, 温度14℃; 电泳缓冲液0.5×TBE; 标准对照株 H9812由中国疾病预防控制中心提供。

2 结果

2.1 分离培养

病人脑脊液于3000 r/min离心, 10 min用接种环取沉淀物直接划种双抗巧克力平板; 病人血液直接注入双向血液增菌瓶中; 将粘有灭菌生理盐水的无菌棉拭子采集密切接触者悬雍垂后壁分泌物立刻划种到双抗巧克力平板上, 将上述划种平板及增菌瓶置于37℃、5% CO₂培养箱培养24 h后观察结果。在病人脑脊液、血液和4份咽拭子标本中均分离到脑膜炎奈瑟菌样菌落: 在双抗巧克力平板上菌落直径约0.8~1.2 mm, 表面突起、光滑、湿润、圆整、似水滴样半透明; 在血平板上形成直径约1.0~1.5 mm, 表面突起、光滑、湿润、圆整、呈灰白色的菌落。涂片染色, 显微镜下观察均呈革兰阴性双球菌, 大多成对排列, 相对的两边菌体凹陷呈双肾形。菌株在普通营养琼脂平板上不生长。

2.2 生化反应

将上述5株菌株分别接种于API NH试条上, 按说明书操作, 人工读板后输入仪器, 结果均被判定为脑膜炎奈瑟菌(生化谱: 5002 id=99.9%, T=1.00为极好的鉴定结果)。其详细的生化反应如下: 葡萄糖产酸+, 果糖产酸-, 麦芽糖产酸+, 蔗糖产酸-, 鸟氨酸脱羧酶-, 脲酶-, 脂酶-, 碱性磷酸酶-, β -半乳糖苷酶-, 脯氨酸氨酶-, γ -谷氨酰转氨酶+, 吡啶-。

将上述5株菌株分别接种于VITEK 2 NH细菌鉴定卡上, 在VITEK 2-compact上培养36℃ 5 h并自动读卡, 结果均被判定为脑膜炎奈瑟菌(生化谱: 2615400000 96% Probability)。其详细的生化反应如下: 精氨酸芳基酰胺酶-, γ -谷氨酰转移酶+, L-赖氨酸芳基酰胺酶-, D-半乳糖苷酶-, 亮氨酸芳基酰胺酶+, ELIMAN+, 苯丙氨酸芳基酰胺酶+, L-脯氨酸芳

—; D-麦芽糖 +; 蔗糖 —; N-乙酰-D-葡萄糖氨 —; 尿素酶 —; β -半乳糖吡喃糖苷酶阴酚 —; 鸟氨酸脱羧酶 —; 阿拉伯糖苷酶 —; 丙酮酸盐 —; 磷酸基维生素 B —; 苹果酸盐 —; 麦芽三糖 —; 谷氨酸盐 —; 磷酸盐 —; D-核糖 2 —; 苯基磷酸酯 —; 木糖 —。

2.3 血清学分型及胶乳凝集试验

将检到的 5 株菌分别与中国生物制品检定所生产的诊断血清进行凝集试验, 结果均为盐水凝集—、多价 I++、多价 II—、多价 III—、A 群++++、B 群—、C 群+。菌株经三代转种血平板后再与上述诊断血清进行凝集, 结果为盐水凝集—、多价 I++、多价 II—、多价 III—、A 群++++、B 群—、C 群—。采用法国—生物梅里埃公司生产的胶乳凝集试剂对菌株进行凝集试验, 5 株菌凝集结果均为 A 群++++、B 群—、C 群—。在送浙江省 CDC 后采用丹麦产诊断血清进行凝集, 其结果为多价 I++、多价 II—、多价 III—、A 群++++、B 群—、C 群—。故可确定这 5 株菌均为 A 群脑膜炎奈瑟菌。

2.4 药敏试验

采用 WHO 推荐的改良 K—B 纸片法, 5 株菌的药敏结果均为: 对青霉素、利福平、氨苄西林、头孢曲松、阿奇霉素、氯霉素、米诺环素、头孢噻肟、美洛培南均敏感; 对复方新诺明、环丙沙星、左氧氟沙星均耐药。

2.5 脉冲场凝胶电泳 (PFGE)

5 株 A 群脑膜炎奈瑟菌菌株经 Sfi¹ 内切酶酶切, H9812 经 Xba¹ 内切酶酶切后同时制胶进行脉冲场凝胶电泳, 所有菌株均显示有相同的 14 条电泳条带, 且各条带的位置完全一致, 可见 4 株密切接触者分离株酶切图谱与病人分离株图谱完全一致 (见图 1)。

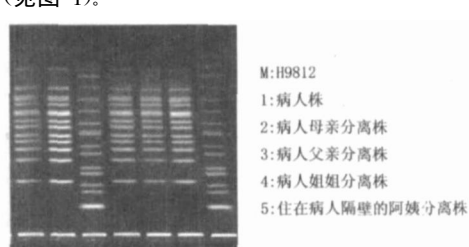


图 1 5 株 A 群脑膜炎奈瑟菌脉冲场凝胶电泳分析图

3 讨论

本次检出的病人株和 4 株密切接触者中的分离株其培养特性、生化反应、药敏试验、血清学分型及胶乳凝集试验结果完全一致。同时, 我们将这 5 株 A 群脑膜炎奈瑟菌菌株送浙江省疾控中心, 采用 PCR 作进一步检测, 检测结果表明: 这 5 株菌株均为 A 群脑膜炎奈瑟菌, 因此可以认定这是一起由 A 群脑膜炎奈瑟菌引起外来民工儿子死亡的流脑疫情。

流行性脑脊髓膜炎是由脑膜炎奈瑟菌 (Nm) 通过呼吸道传播引起的化脓性脑膜炎, 在我国一直是严重危害人民群众健康的传染病^[3], 尤其是儿童的身体健康^[4], 因此备受人们关注。而流脑的发生与流行是由流脑传染源和易感人群的存在所决定的, 而脑膜炎奈瑟菌 (Nm) 携带者是流脑的主要传染源^[5]。本次从 9 份密切接触者咽拭子标本中, 检出 4 株脑膜炎奈瑟菌, 他们分别是病人父亲、母亲、姐姐和住在隔壁的

阿姨。其携带率为 44.44%, 高于曾照丽^[5]、游旅^[6]等报告的 33.3% 和 10.7%。经流行病学调查发现, 在本起疫情的密切接触者中脑膜炎奈瑟菌携带率偏高的主要原因是: 外来民工居住环境差, 门窗紧闭, 造成室内空气不流通所致。调查还发现, 外来民工与其子女均未接种流脑疫苗, 因此, 在加强对密切接触者监控的同时, 要求服用敏感药物如青霉素类药物进行预防, 严防第二代病例的发生^[7]。另外, 咽拭子标本的采集方法也很重要, 根据多年的采样经验, 建议使用被无菌生理盐水湿润且已将生理盐水拧干的棉拭子去采集密切接触者悬雍垂后壁分泌物。如果棉拭子上的水分过多, 采样时棉拭子上不易粘得悬雍垂后壁分泌物, 且由于棉拭子上的过多水分会刺激咽喉部出现吞咽动作, 使采样后的棉拭子接触到非采样部位, 降低阳性检出率; 如果棉拭子不先用生理盐水湿润, 那么采样时棉拭子上的细小棉丝极易粘附在咽喉部, 产生异物感并出现吞咽动作, 同样使阳性检出率下降。

PFGE 以其重复性好、分辨力强而被誉为细菌分子生物学分型技术的“金标准”^[8]。Tenover 等^[9]提出了有关菌株同源性的判别标准, 按其电泳条带可分为: 无差异, 说明为相同菌株; 有 1~3 条带的差异说明菌株间有相近关系, 且只有单基因的改变; 4~6 条带的差异说明菌株间可能有相近关系, 表示出有两个独立基因的差异; 如菌株间有 6 条带或更多条带差异, 说明有三个或更多基因的变化, 被视为无相关性。本次病人分离株酶切图谱与 4 株密切接触者图谱完全一致, 根据上述 PFGE 条带判别标准可以认为从密切接触者中分离到的 4 株 A 群菌株和病人的 A 群菌株来源于同一克隆菌株^[10]。

[参考文献]

- [1] GB16884—1997. 流行性脑脊髓膜炎诊断标准 [S].
- [2] Bygraves JA, Maiden MC. Analysis of the clonal relationships between strains of *N meningitidis* by pulsed-field gel electrophoresis [J]. J Gen Microbiol 1992; 138: 523—531.
- [3] 中华人民共和国卫生部. 全国流行性脑脊髓膜炎监测方案 [M]. 北京: 卫生部, 2006.
- [4] 胡绪敬. 流行性脑脊髓膜炎的流行病监测与预防 [J]. 中国计划免疫, 2001; 7(5): 300—303.
- [5] 曾照丽, 张晓曦, 王亚梅, 等. 一例流脑病人的密切接触者实验室检验结果报告 [J]. 中国卫生检验杂志, 2006; 16(5): 606—607.
- [6] 游旅, 田克诚, 姚光海, 等. 2005 年贵州省健康人群和病例密切接触者流脑病原菌带菌状况调查 [J]. 疾病监测, 2006; 21(3): 120—122.
- [7] 胡绪敬. 流脑流行的监测与预防 [J]. 中国公共卫生, 2004; 20(5): 638—640.
- [8] 王丽丽, 徐建国. 脉冲场凝胶电泳技术 (PFGE) 在分子分型中的应用现状 [J]. 疾病监测, 2006; 21(5): 27—279.
- [9] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing [J]. J Clin Microbiol 1995; 33: 2233—2239.
- [10] 张铁钢, 贺雄, 陈丽娟, 等. 北京地区 2005 年流行性脑脊髓膜炎病原学监测 [J]. 中华流行病学杂志, 2006; 27(5): 396—398.

(收稿日期: 2008—01—02)