

• 调查研究 •

河北省首例 B 群流脑死亡病例病原学分析*

贾肇一¹, 何宝花¹, 王颖童¹, 郭映辉², 张文超², 苏彦龙³, 郭建花⁴, 王茜¹, 马洪生¹, 孙印旗^{1**}

(1. 河北省疾病预防控制中心, 河北石家庄 050021; 2. 河北省儿童医院;

3. 石家庄市裕华区疾病预防控制中心; 4. 石家庄市疾病预防控制中心)

【摘要】 目的 对河北省首例 B 群流行性脑脊髓膜炎(流脑)死亡病例进行病原学分析。 **方法** 采集患儿血和脑脊液标本, 进行生化鉴定和 PCR 目的基因的检测, 对分离菌株进行 Etest 法药敏试验和多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)分析。 **结果** 该病例证实为 B 群脑膜炎奈瑟菌引起的脑膜炎病例, 该菌株对磺胺甲氧唑、环丙沙星、萘啶酸耐药, 对米诺霉素、阿奇霉素等敏感。MLST 结果分析该菌为 ST-9754 型, 属于 ST-4821 高致病克隆群。 **结论** 该病例为河北省首例 B 群流脑死亡病例, 病原菌为具有高致病性的 ST-9754 型脑膜炎奈瑟菌, 提示应要加强流脑病原学监测。

【关键词】 脑膜炎奈瑟菌; B 群; 病原学**【中图分类号】** R373.31 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-5234(2013)11-1025-04

[Journal of Pathogen Biology. 2013 Nov; 8(11): 1025-1028.]

Etiological analysis of the first death from epidemic cerebrospinal meningitis due to *Neisseria meningitidis* serogroup B in Hebei ProvinceJIA Zhao-yi¹, HE Bao-hua¹, Wang Ying-tong¹, Guo Ying-hui², Zhang Wen-Chao², Su Yan-long³, Guo Jian-hua⁴, Wang Qian¹, Ma Hong-Sheng¹, Sun Yin-Qi¹ (1. Hebei Province Center for Disease Prevention and Control, Shijiazhuang 050021, China; 2. Children's Hospital of Hebei Province; 3. Yuhua Center for Disease Prevention and Control; 4. Shijiazhuang Center for Disease Prevention and Control)

【Abstract】 Objective To analyze the etiological characteristics of the first death from epidemic cerebrospinal meningitis due to *Neisseria meningitidis* serogroup B in Hebei Province. **Methods** Samples of blood and cerebrospinal fluid were collected from a sick infant. The samples were biochemically analyzed and subjected to PCR to test for target genes. The Etest was used to determine the drug susceptibility of isolates, and isolates were analyzed using multilocus sequence typing (MLST). **Results** The infant was confirmed to have a *Neisseria meningitidis* serogroup B infection. The strain was resistant to sulfamethoxazole, ciprofloxacin, and nalidixic acid. MLST indicated that the strain was ST-9754 and belonged to the ST4821 complex. **Conclusion** This was the first death due to infection with *Neisseria meningitidis* serogroup B in Hebei Province. The strain responsible is highly pathogenic, indicating that surveillance of epidemic cerebrospinal meningitis should be enhanced.

【Key words】 *Neisseria meningitidis*; serogroup B; etiology

***流行性脑脊髓膜炎(epidemic cerebrospinal meningitis)简称流脑,是由脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*, Nm)通过呼吸道传播引起的化脓性脑膜炎,为急性呼吸道传染病,常在冬春季引起发病与流行,患者以儿童为多见,流行时成人发病亦增多,具有起病急、病情发展快、病死率高和后遗症严重的特点^[1,2]。根据荚膜多糖的特异性,多数流脑病例是由 A、B、C、W135、X、Y 等血清群菌株引起。2004 年以来我国致病流脑血清群以 A 群和 C 群为主, W135 群、B 群引起散发病例。2011 年 11 月底,河北省发现一例 B 群流脑死亡病例,相关临床资料及实验室检查结果报告如下。

材料与方法

1 病例资料

患儿男性,3 月龄,石家庄市栾城县人,2011 年 11 月 19 日发病,体温 38.5℃,伴有恶心、呕吐,皮肤现较多瘀点、瘀斑。遂到村卫生室就诊,服用退烧药安瑞克后于 21 日凌晨 02:30 转入栾城县医院。查体:心率 150 次/min,呼吸 40 次/min,有意识,但精神差。患儿于 04:35 转院至河北省儿童医院。查体:体温 36.5℃,心率 212 次/min,呼吸 50 次/min,血压 85/46 mmHg,神志清醒,精神反应差,全身可见大量瘀斑,咽

* 【基金项目】 河北省科技厅项目(No. 11276137)。

** 【通讯作者】 孙印旗, E-mail: hbsunyq@hotmail.com

【作者简介】 贾肇一(1983—),男,河北沧州人,硕士,主管技师。主要研究方向:病原微生物检验。

E-mail: jiazhaoyi@163.com

部充血明显,双肺呼吸音粗,无颈项强直,巴氏征、克氏征阴性,四肢皮肤发花,末梢凉,循环差。入院诊断为上呼吸道感染、流行性脑脊髓膜炎(暴发型)。给予青霉素抗感染、补液、扩容、纠正等对症治疗。6时患儿病情危重,瘀斑面积迅速增大,反应极差,呼吸浅促、困难,气管插管,呼吸机辅助呼吸。患儿频繁心率下降,经治疗无效于21日09:50心跳停止,临床死亡。

2 细菌培养

抽取患者血液、脑脊液采用哥伦比亚血平板(购于迪景公司)进行细菌培养。

3 菌株的生物学特征和生化、血清学鉴定

将菌株转种于哥伦比亚血平板,置于5%CO₂培养箱中,37℃培养20h,观察菌落形态,进行革兰染色和氧化酶试验;制备菌悬液,接种API-NH生化鉴定条(购于法国生物梅里埃公司),37℃恒温培养箱中放置2h后读取结果;使用脑膜炎奈瑟菌分群诊断血清(购于美国Remel公司)进行分群试验。

4 PCR检测

PCR试剂购于大连宝生物工程有限公司,基因组DNA提取试剂盒购于德国QIAGEN公司;普通PCR引物由北京华大基因公司合成,荧光PCR引物、探针由中国疾病预防控制中心传染病所呼吸道室提供。

4.1 DNA模板制备

4.1.1 菌株模板的制备 挑取一定量的新鲜培养物,悬浊于200 μl超纯水中,沸水浴20 min,12 000 r/min(离心半径9.5 cm)离心5 min,吸取上清液即为DNA模板,-20℃保存。

4.1.2 脑脊液模板的制备 吸取200 μl脑脊液,按照基因组DNA提取试剂盒说明书进行菌体核酸的提取。

表1 普通PCR引物序列及扩增片段长度

目的基因 Target genes	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	扩增片段长度 (bp) Amplified fragment length (bp)
crp A	F: 5-GCTGGCGCCGCTGGCAACAAATTC-3' R: 5-CTTCTGCAGATTGCGGCTGCCGT-3'	230
Orf-2(A)	F: 5-CGCAATAGGTGTATATATTTCTCC-3' R: 5-CGTAATAGTTTCGTATGCCTTCTT-3'	400
siaD(B)	F: 5-GGATCATTTCAGTGTTTCCACCA-3' R: 5-GCATGTGAGGAATAAGCATTAA-3'	450
siaD(C)	F: 5-TCAAATGAGTTTGCAATAGAAGGT-3' R: 5-CAATCACGATTTGCCCAATTGAC-3'	250
siaD(Y)	F: 5-CTCAAAGCGAAGGCTTTGGTTA-3' R: 5-CTGAAGCGTTTTCATTATAATTGTAA -3'	120
siaD(W135)	F: 5-CAGAAAGTGAGGGATTTCATA-3' R: 5-CACAACCATTTTCATTATAGTTACTGT -3'	120

4.2 菌株的普通PCR流脑分群鉴定 扩增引物序列见表1。扩增条件:94℃预变性5 min;92℃30 s,55

℃40 s,72℃30 s,共37个循环;72℃延伸10 min。反应产物用1.5%琼脂糖凝胶检测,电压6 V/cm^[3]。

4.3 脑脊液的荧光PCR流脑分群鉴定 扩增引物、探针序列见表2,扩增条件:50℃2 min;95℃10 min;95℃15 s,60℃1 min,共50个循环^[4]。

表2 荧光PCR引物序列和探针序列

种属/ 血清群 Species or Serogroup	目的 基因 Target genes	引物/ 探针名称 Primer or Probe name	引物或探针序列 (5'-3') Primer or probe sequence (5'-3')	扩增片段 长度 (bp) Amplified fragment length (bp)
Nm	ctrA	P1	TGTGTTCCGCTATACGCCATT	114
		P2	GCCATATTCACAGTATATACC	
		Probe	FAM-AACCTTGAGCAA* T' CCATTTATCCTGACGTTCT-SpC6* T'-BHQ1	
A	sacB	P1	AAAATTCAATGGGTATATACGAAGA	92
		P2	ATATGGTGCAAGCTGGTTTCAATAG	
		Probe	FAM-CTAAAAAG* T' AGGAAGGGCACTTTGTGGCATA-AT-SpC6	
B	siaD	P1	CCCATTTCAGATGATTTGT	162
		P2	AGCCGAGGGTTTATTCTAC	
		Probe	FAM-ATGGGYAACAACTATGTAATGTCTTTATT-BHQ	
C	siaD	P1	CTTTCCTGAGTATGCGAAAAAA	77
		P2	TGCTAATCCCGCTGAATG	
		Probe	FAM-TTTCAATGC*T' AATGAATACCCGTTTTTTTT-GC-SpC6	
X	xcbB	P1	TGTCCCCAACCGTTTATTGG	66
		P2	TGCTGTATCATAGCCGCC	
		Probe	FAM-TGTTTGCCACATGAATGGCGG-BHQ	
Y	synF	P1	GAGCAGAAATTTATGAGAATACAGA	140
		P2	CTAAAATCATTCGCTCCATAT	
		Probe	FAM-TATGGTG*T' ACGATATCCCTATCCTTGCTATA-AT-SpC6	
W135	synG	P1	GTGAGGGATTTCATATATATTTA	147
		P2	TTGCCATTCCAGAAATATCA	
		Probe	FAM-TATGGAGCGAATGATTACAGTAACATATAA-BHQ	

注:“T”标记BHQ1(一种荧光淬灭基团);“Y”为C/T兼并碱基;SpC6为磷酸化。
Note: “T”, labeled with BHQ1 (one kind of quencher); “Y”, C/T; SpC6, phosphorylated

4.4 多位点序列分型技术(Multi-locus sequence typing, MLST)分析管家基因 检测脑膜炎奈瑟菌的7个管家基因,分别为:abcZ、adk、aroE、fumC、gdh、pdhC、pgm。使用水煮法获得菌体DNA模板,基因的扩增引物序列及扩增条件来自脑膜炎奈瑟菌MLST数据库(<http://pubmlst.org/neisseria>),引物序列见表3,基因扩增产物送北京华大基因公司进行双向基因测序,测序结果用Contig Express软件将上下游序列进行拼接,测序结果提交脑膜炎奈瑟菌MLST数据库,获得各管家基因位点的等位基因数值,并形成相应的等位基因谱,判断其序列型(ST)及其所属的ST克隆系。

5 药物敏感性试验

挑取分纯后的待测菌于无菌生理盐水中,制成

0.5 麦氏单位菌悬液,然后均匀涂布于含 5% 羊血的 M-H 琼脂平板上,粘贴 E-test 药敏试纸条(购于瑞典 AB bioMerieux 公司),置于 CO₂ 培养箱中,37 ℃ 培养 20 h。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922 和肺炎链球菌 ATCC49619,根据最新版 CLSI 标准解释结果。

表 3 MLST 分型 PCR 扩增引物序列
Table 3 Primer sequence of multi-locus sequence typing

目的基因 Target genes	引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
abcZ-	abcZ-P1C	TGTTCCGCTTCGACTGCCAAC
	abcZ-P2C	TCCCGTCGTAAAAACAATC CCAAGCCGTGTAGAATCGTA-
adk	adk-P1B	AACC
	adk-P2B	TGCCCAATGCGCCCAATAC
aroE	aroE-P1B	TTTGAACAGGCGGTTGCGG
	aroE-P2B	CAGCGGTAATCCAGTGCGAC
fumC	fumC-P1B	TCCCGCCGTAAAAGCCCTG
	fumC-P2B	GCCCGTCAGCAAGCCCAAC
gdh	gdh-P1B	CTGCCCGGGGTTTTCATCT
	gdh-P2B	TGTTGCGCGT-
pdhC	pdhC-P1B	TATTTCAAAGAAGG CCGGCCGTACGACGCTGAAC
	pdhC-P2B	GATGTCGGAATGGGGCAAA- CA
pgm	pgm-P1	CTTCAAAGCCTACGACATCCG
	pgm-P2	CGGATTGCTTTCGATGACGGC

结 果

- 1 菌株的生物学特征和生化、血清学鉴定
- 该菌株为革兰阴性双球菌,氧化酶试验阳性。血平板上菌落形态:光滑、湿润、圆形凸起,不溶血。API-NH 生化条鉴定为脑膜炎奈瑟菌。血清学分群鉴定菌株不自凝,与 B 群单价血清凝集,其他单价血清不凝集。鉴定为 B 群脑膜炎奈瑟菌。
- 2 菌株的普通 PCR 流脑分群鉴定
- PCR 扩增分离菌株的脑膜炎奈瑟菌种属特异基因 *crgA* 及分群特异基因 *siaD*(B) 均阳性,即该菌株为 B 群脑膜炎奈瑟菌。
- 3 脑脊液的荧光 PCR 流脑分群鉴定
- 荧光 PCR 检测脑脊液标本中菌种属特异性的基因 *ctrA* 和分群特异基因 B 群(*siaD*) 均阳性,即该菌株为 B 群脑膜炎奈瑟菌。
- 4 MLST 分析
- 将该株菌的 7 个管家基因片段的 DNA 测序,通过与脑膜炎奈瑟菌 MLST 数据库中的数据进行比对,得到 7 个基因位点的等位基因数值,分别为 *abcZ*: 606, *adk*: 3, *aroE*: 58, *fumC*: 261, *gdh*: 30, *pdhC*: 5, *pgm*: 255。序列图谱经过申请得到一个新的型别: ST-9754 型,属于 ST-4821 高致病克隆群。
- 5 细菌对抗菌药物的敏感性
- 该菌株对米诺环素、阿奇霉素、头孢噻肟、头孢曲松、氯霉素、美罗培南、利福平敏感;对青霉素、氨苄西林中敏;对磺胺甲异噁唑、环丙沙星、萘啶酸耐药。

讨 论

河北省自 1950 年有流脑疫情报告至今,流行的脑膜炎奈瑟菌血清群一直以 A 群和 C 群为主,与我国其他多省疫情相似,未发现 B 群流脑病人。该病例是河北省确诊的首例 B 群流脑病例,同时河北省近两年来对健康人群带菌监测结果也显示 B 群脑膜炎奈瑟菌带菌率升高,成为优势菌群。目前尚无有效的 B 群流脑疫苗,一旦易感人群积累到一定程度后,可能发生流脑疫情,因此需要加强对 B 群疫苗的研发,加强流脑病原的及时监测,关注流脑菌群的变迁趋势,及早采取防控措施^[5,6]。

脑脊液、血液等标本的细菌培养耗时费力,抗生素的大量应用、样品质量和培养条件等因素影响培养的阳性率^[7]。因此脑膜炎奈瑟菌特异性基因 PCR 扩增方法已逐渐用于流脑病例标本的检测^[3,8]。本例菌株普通 PCR 检测及脑脊液标本的荧光 PCR 检测均与传统的菌株生化鉴定、血清学鉴定结果相一致,表明 PCR 方法特别是荧光 PCR 方法因其具有较高的灵敏性、特异性、耗时短以及结果不受抗生素的影响等特点,可用于流脑的病原学检测,以便及早确诊,及时治疗。

脑膜炎奈瑟菌易出现自发突变及不同群之间基因重组,克隆群呈多样性,所以造成基于对荚膜多糖分群的传统血清学分型方法不能准确反映菌株之间的谱系关系,也无法满足流脑的分子流行病学研究,而 MLST 分型技术则可以分析菌株进化关系以及在判断分离株是否属高致病性克隆系等方面,可弥补传统方法分型的不足^[9]。MLST 结果显示,该 B 群脑膜炎奈瑟菌为 ST-9754 型,脑膜炎奈瑟菌 MLST 数据库中未有相同型别的菌株报道,但仍属于 ST-4821 高致病克隆群。病例资料显示该患儿起病急、病情发展快、病情严重且不易控制,所以该菌株属于高致病性菌株,应对其生物学特性、免疫原性、致病机理等进行深入研究,并且要加强对其监测,防止扩散传播。

随着抗生素的大量使用,造成脑膜炎奈瑟菌对某些抗菌药已具有耐药性^[10]。本次分离到的 B 群脑膜炎奈瑟菌菌株对磺胺类(磺胺甲异噁唑)和喹诺酮类(环丙沙星、萘啶酸)都产生了耐药,对青霉素类(青霉素、氨苄西林)敏感性降低,而对米诺环素、阿奇霉素、头孢噻肟、头孢曲松、氯霉素、美罗培南、利福平敏感。因此在流脑临床治疗和采取应急预防性服药时,应根据药敏试验结果合理选择使用敏感的抗菌药,以取得较好疗效。

【参考文献】

[1] 李军宏, 王晓军, 梁晓峰. 我国流行性脑脊髓膜炎的流行概况及

- 预防控制[J]. 疾病监测, 2005, 20(4): 169—70.
- [2] 吕静, 杨红梅, 江永忠, 等. 2006~2010年湖北省流行性脑脊髓膜炎病原学和血清学监测分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2012, 7(4): 287—90.
- [3] 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[J]. 中华流行病学杂志, 2006, 27(5): 399—401.
- [4] 朱兵清, 徐丽, 李马超, 等. 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[J]. 中华流行病学杂志, 2008, 29(4): 360—3.
- [5] 孙印旗, 马洪生, 贾肇一, 等. 河北省流行性脑脊髓膜炎发病特征与菌群变迁分析[J]. 动物医学防制, 2012, 11(28): 1184—7.
- [6] 邵祝军. B 群脑膜炎奈瑟菌、大肠杆菌 K1 菌株、溶血巴斯德菌 A2

- 菌株的荚膜多糖疫苗[J]. 中华预防医学杂志, 2012, 46(1): 21.
- [7] Poppert S, Essig A, Stoeck B, et al. Rapid diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR and fluorescence in situ hybridization[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(7): 3390—7.
- [8] Diggle MA, Clarke SC. Detection and genotyping of meningococci using a nested PCR approach[J]. J Med Microbiol, 2003, 52(Pt 1): 51—7.
- [9] Enright MC, Spratt BG. Multilocus sequence typing[J]. Trends Microbiol, 1999, 12(7): 482—7.
- [10] 徐丽, 邵祝军, 李马超, 等. 脑膜炎奈瑟菌对 12 种抗菌药物体外敏感性检测[J]. 中国计划免疫, 2006, 12(1): 53—5.

【收稿日期】 2013-03-04 【修回日期】 2013-07-26

(上接 1019 页)

一,也是每年确定流感流行株、推荐使用疫苗种类和及早发现变异株的基础^[6]。分析丽水市 2009 年 6 月~2012 年 9 月流感病原学监测数据,各年份的流行株流感病毒型及出现时间基本一致,并未发生毒株变异现象。而加强流感病原学检测系统的管理,提高实验室的检测能力,及时发现流感变异毒株仍是今后流感防控工作的重点。

【参考文献】

- [1] 杨绍基, 任红. 传染病学[M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 62—5.

- [2] 黄维娟, 董婕, 舒跃龙. 中国流感监测网络发展概况[J]. 疾病监测, 2008, 23(8): 463—9.
- [3] 卫生部. 全国流感监测方案(2010 年版)[M]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2010.
- [4] 康来仪, 董柏青, 陈直平, 等. 实用传染病防治[M]. 3 版. 北京: 学苑出版社, 2010: 393.
- [5] 寇铮, 胡松年, 李天宪. 甲型 H1N1 流感病毒流行株基因组进化分析[J]. 科学通报, 2009, 54(12): 1652—6.
- [6] 谭毅, 唐宁, 闭福银, 等. 广西流感与人禽流感监测网络的建立与运行效果[J]. 疾病监测, 2007, 22(8): 537—9.

【收稿日期】 2013-07-04 【修回日期】 2013-09-12

(上接 1024 页)

的同时,也带来新的公共卫生问题。本次调查结果显示,随机抽样的 500 部移动通信工具微生物污染较为严重,其中致病菌检出率为 11.4%,HBV-DNA 检出率为 11.0%,肠道病毒检出率为 9.8%,应引起高度重视。问卷调查显示大部分受调查者对移动通信工具的卫生状况不重视且未能掌握正确的消毒方法。94.9%的受调查者使用移动通信工具前后不洗手,这部分人存在通过手—口传播疾病的风险。移动通讯工具表面用 75%酒精消毒后,各种病原微生物污染程度较消毒前均降低,这与文献^[2~4]报道的结果相符。因此建议可用此消毒法消毒移动通信工具。

移动通信工具属于精密电子设备,其电池受热易引起爆炸,屏幕及线路易受化学消毒剂腐蚀而损坏。

建议相关部门能根据以上特点研制相应的专用消毒设备或一次性自定型可回收膜套,以提高移动通信工具使用的安全性。

【参考文献】

- [1] 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国国家标准《公共场所卫生标准监测检验方法》(GB/T 18204. 25-2000) [S]. 北京: 中国标准出版社, 2000.
- [2] 毛中圆, 郭小龙, 蒋小平, 等. 公用电脑微生物污染及清洁消毒方法探讨[J]. 宁夏医学杂志, 2008, 30(6): 566—7.
- [3] 孙同瑞. 网吧电脑微生物污染与消毒方法研究现状[J]. 安徽预防医学杂志, 2005, 11(1): 471.
- [4] 王新, 韩丽华. 手及电脑鼠标的微生物监测分析[J]. 实用医技杂志, 2007, 14(11): 14921.

【收稿日期】 2013-05-21 【修回日期】 2013-09-06