

江西省 2005—2015 年脑膜炎奈瑟菌血清分型和分子分型分析

杨 梦¹, 周海健², 徐晓倩¹, 熊长辉¹, 王 鹏¹, 刘晓青¹, 袁 辉¹

摘要: 目的 对江西省 2005—2015 年分离的脑膜炎奈瑟菌 (*Neisseriameningitidis*, Nm) 进行血清分型和分子分型研究, 揭示菌群特征和变迁情况。方法 对 2005—2015 年分离的 200 株脑膜炎奈瑟菌采用血清凝集的方法鉴定血清群, 对引起流脑流行的血清群进行脉冲场凝胶电泳 (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE) 和多位点序列分型 (Multilocus Sequence Typing, MLST), 使用 BioNumerics 软件构建最小生成树。分析不同来源、不同年份分离株的血清型和分子型别以及变迁情况。结果 200 株脑膜炎奈瑟菌中, 有 168 株可鉴定为已知血清群, 包括 C 群 (101 株)、B 群 (50 株)、A 群 (12 株)、W135 群 (2 株)、Y 群 (2 株) 和 X 群 (1 株), 另外 32 株为不可分群菌株。临床病人、密切接触者和健康人群分离株中分别有 100%、86.0% 和 28.9% 的菌株为 C 群。针对健康人群分离株, 2005 年、2007 年、2008 年、2012 年分离的菌株中, C 群分别占 1.9%、58.8%、81.5% 和 0%。95 株 C 群菌株分为 14 个 PFGE 型, 其中 NMNh.JX0001 和 NMNh.JX0002 为优势带型, 分别包含 46 和 30 株菌。NMNh.JX0001 型菌株在 2005—2006 年、2007—2008 年、2013—2014 年 3 个时间段在 C 群菌株中所占比例分别为 97.2%、28.6%、10.0%; 而 NMNh.JX0002 型菌株在 2005—2006 年、2007—2008 年、2013—2014 年 3 个时间段在 C 群菌株中所占比例分别为 2.8%、57.1%、90.0%。挑选优势带型以及相似带型的 33 株菌株进行 MLST 分型, 均为 ST-4821 型。结论 江西省 2005—2015 年的流脑病例均为 C 群菌株引起。在健康人群中存在 C 群脑膜炎奈瑟菌。虽然近 10 年流行的 C 群菌株 MLST 序列型未发生改变, 但是 PFGE 型别发生了变迁, 提示菌株基因组存在微进化。PFGE 型别的变迁有可能导致流行模式发生改变, 所以有必要开展持续监测, 密切关注新型菌株在人群中的传播扩散以及引起的流脑病例。

关键词: 细菌性脑膜炎; 脑膜炎奈瑟菌; 血清群; 分子分型技术; 多位点序列分型

中图分类号: R378.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-2694(2018)11-0996-05

Serogroup distribution and characteristics of molecular subtyping for *Neisseria meningitidis* isolated from Jiangxi, 2005—2015

YANG Meng¹, ZHOU Hai-jian², XU Xiao-qian¹, XIONG Chang-hui¹,
WANG Peng¹, LIU Xiao-qing¹, YUAN Hui¹

(1. Department of Communicable Disease Control and Prevention, Jiangxi Province Center for Disease Control and Prevention, Nanchang 330029, China;

2. State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Centre for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

Abstract: We analyzed the serogroup distribution and molecular subtyping characteristics of *Neisseria meningitidis* isolated from Jiangxi during 2005 and 2015, and revealed the characteristics and change of population structure. A total of 200 *N. meningitidis* isolated during 2005 and 2015 were investigated by serogroup, pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST). Clustering tree and minimum spanning tree was constructed by using BioNumerics software. The distribution of serogroup and molecular subtypes isolated in different sources and years were analyzed. Among the 200 *N. meningitidis*, the serogroup were C (101), B (50), A (12), W135 (2), Y (2), X (1), non-groupable (32). There were 100%, 86.0% and 28.9% of the clinical, close contact and healthy carried isolates were serogroup C. Among healthy carried isolates, there were 1.9%, 58.8%, 81.5% and 0% of the strains isolated from 2005, 2007, 2008 and 2012 were serogroup C. The 95 serogroup C strains were isolated into 14 PF-

国家科技重大专项基金项目 (No.2013zx10004203-002-007), 江西省卫计委科技计划(No.20062004)

通讯作者:袁 辉, Email:jxcdcyuanhui@126.com

作者单位:1.江西省疾病预防控制中心,南昌 330029;

2.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,北京 102206

GE types and among them NMNh.JX0001 and NMNh.JX0002 were dominant types, including 46 and 30 strains respectively. Among the serogroup C strains isolated during 2005—2006, 2007—2008 and 2013—2014, proportion of NMNh.JX0001 strains were 97.2%, 28.6% and 10.0% respectively, and proportion of NMNh.JX0002 strains were 2.8%, 57.1%, 90.0%. Thirty-three serogroup C strains with dominant PFGE types were analyzed by MLST and all were ST-4821. All the meningococcal diseases in Jiangxi between 2005 and 2015 were caused by serogroup C strains. Serogroup C strains have also existed in healthy population. Although the dominant ST of serogroup C has not changed in the past 10 years, the PFGE types have been changed, suggesting that the genome of bacteria exists microevolution. This microevolution might cause the change of epidemic model. Continuous monitoring is necessary.

Keywords: bacterial meningitis; *Neisseria meningitidis*; serogroup; molecular subtyping techniques; multilocus sequence typing

Supported by the Priority Project on Infectious Disease Control and Prevention (No. 2013zx10004203-002-007) from the Ministry of Health, China, and the Health and Family Planning Commission of Jiangxi Province (No. 20062004)

Corresponding author: Yuan Hui, Email: ymss921@126.com

脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*, *Nm*)是引起流行性脑脊髓膜炎(简称流脑)的病原体,分为12个血清群,其中A、B、C、W135和Y群引起了95%以上的流脑病例^[1-2]。上世纪50年代至80年代末,我国发生过3次流脑全国大流行,均是由A群引起,B群和C群只引起散发病例。80年代末由于A群流脑疫苗的使用,我国流脑发病率显著下降。2003年在安徽省发生由ST-4821序列型C群菌株引起的流脑流行^[3],之后在全国20多个省份均出现了ST-4821型C群菌株引起的流脑病例^[4],江西省也发生多起C群流脑暴发事件和多个散发病例^[5]。2005年,全国常规免疫的流脑疫苗由A群疫苗改为A+C群疫苗。

本研究拟采用血清分型、脉冲场凝胶电泳(Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE)和多位点序列分型(Multilocus Sequence Typing, MLST)技术,对江西省2005—2015年分离的脑膜炎奈瑟菌进行分析,旨在探讨人群普遍接种A+C群流脑疫苗之后,江西省脑膜炎奈瑟菌的血清型和分子型别变化特征,了解江西省脑膜炎奈瑟菌的菌群变迁情况,为流脑的预防控制提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 200株脑膜炎奈瑟菌为本实验室保存的于2005—2015年在江西省分离的菌株,其中临床病人分离株15株、密切接触者分离株57株、健康人群分离株128株。菌株详细信息见表1。

1.2 试剂及仪器 血平板或巧克力平板(广州迪景公司,中国),API NH生化鉴定试剂盒(梅里埃公司,法国),诊断血清(BD公司,美国),细菌基因组DNA提取试剂盒(QIAGEN公司,德国)。脑膜炎

表1 本研究分析的200株脑膜炎奈瑟菌分离时间和来源分布

Tab.1 Isolation time and source distribution of 200 *N. meningitidis* strains analyzed in the study

年份	来源			合计
	临床病人	密切接触者	健康人群	
2005	1	30	52	83
2006	2	10	5	17
2007	4	5	17	26
2008	4	0	27	31
2009	0	2	1	3
2010	0	0	2	2
2011	0	1	0	1
2012	1	0	17	18
2013	1	0	2	3
2014	2	9	1	12
2015	0	0	4	4
合计	15	57	128	200

奈瑟菌MLST分型引物由大连宝生物公司合成。PCR扩增仪为PTC200(MJ公司,美国),凝胶成像系统为GEL Doc2000(Bio-Rad公司,美国)。

1.3 方法

1.3.1 冻干菌株的复苏和复核 所有脑膜炎奈瑟菌经过常规培养、涂片、生化、血清鉴定后冻干保存于-20℃。用营养肉汤溶解复苏菌株后接种于血平板或巧克力平板,37℃,5% CO₂培养18~24 h,挑单个菌落纯培养后,再按常规方法进行复核鉴定。
1.3.2 细菌基因组DNA的提取 按照试剂盒说明书严格操作,提取的基因组DNA放-20℃冰箱保存待用。

1.3.3 PFGE 实验和数据分析 参考之前的方法 [3], 主要参数是:用 bioMérieux DENSIMAT 比浊仪调整细菌悬液浓度为 3.8~4.0;使用 *NheI* 作为限制性内切酶;在 CHEF-DRIII (Bio-Rad Laboratories, 美国)电泳仪中进行脉冲场凝胶电泳;电泳参数为 1~25 s, 16 h。PFGE 图像录入 BioNumerics (Version5.1, Applied maths, Inc.) 软件包进行处理和分析。图像之间的相似性系数用 Dice 系数 (Dice coefficients, SD) 表示^[6]。出现不同条带即判定为不同的型别, 对每一个型别都进行命名。根据每 2 个图像之间的相似性系数, 用非加权配对算术平均法 (unweighted pair group average method, UPGMA) 进行聚类, 构建聚类树。聚类分析时, 条带位置差异容许度设置为 1.5%。

1.3.4 MLST 参照 PubMLST (<http://pubmlst.org/neisseria>) 公布的标准方案, 确定进行脑膜炎奈瑟菌 MLST 的 7 个管家基因位点 (*abcZ*、*adk*、*aroE*、*fumC*、*gdh*、*pdhC*、*pgm*) 及引物。50 μL PCR 反应体系;电泳参数为: 94 °C, 3 min; 94 °C, 1 min; 64 °C, 1 min; 72 °C, 1 min; 33 个循环; 72 °C, 7 min。对 PCR 扩增产物进行测序, 测序结果与 PubMLST 数据库 (<http://pubmlst.org/neisseria>) 进行比对, 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)。

2 结 果

2.1 血清型分布特征 200 株脑膜炎奈瑟菌中, 有 168 株可用现有血清鉴定出血清群, 为 C 群 101 株, B 群 50 株, A 群 12 株, W135 群 2 株, Y 群 2 株, X 群 1 株。另外 32 株用现有血清无法鉴定出血清群,

判定为不可分群菌株。

15 株临床病人分离株均为 C 群。57 株密切接触者分离株中, 有 49 株 (86.0%) 为 C 群, 4 株为 A 群, 3 株为 B 群, 1 株不可分群。128 株健康人群菌株有 37 株 (28.9%) 为 C 群, 8 株为 A 群, 47 株为 B 群, 2 株为 W135 群, 2 株为 Y 群, 1 株为 X 群, 31 株为不可分群菌株。W135 群、X 群、Y 群菌株只在健康人群中分离到。临床病人和密切接触者中的 C 群菌株构成比高于健康人群 (图 1)。2005 年、2007 年、2008 年、2012 年分离的健康人群菌株相比其他年份较多, 结果显示这 4 年的健康人群分离株的血清群构成情况差异较大, 其中 2005 年和 2012 年以 B 群和不可分群菌株为主, C 群菌株分别只占 1.9% 和 0%; 而 2007 年和 2008 年的健康人群菌株中 C 群占的比例比较大, 分别为 58.8% 和 81.5% (图 2)。

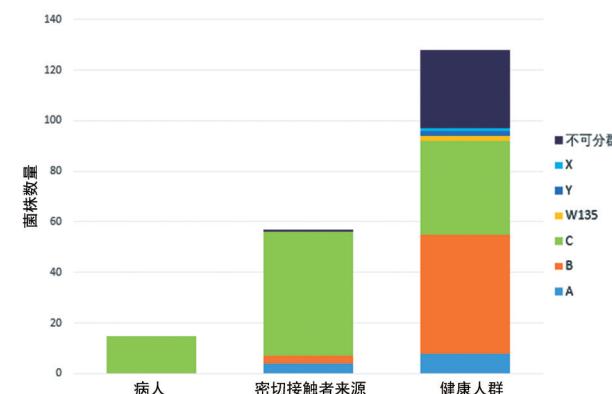


图 2 不同来源脑膜炎奈瑟菌的血清型分布

Fig.2 Serogroup distribution of *N. meningitidis* isolated in different sources

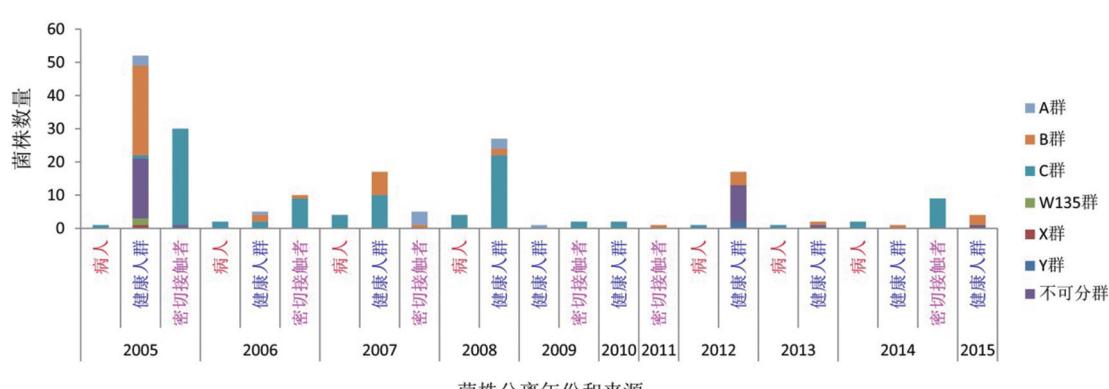


图 1 200 株脑膜炎奈瑟菌按照不同来源和不同年份的血清群分布

Fig.1 Serogroup distribution of *N. meningitidis* isolated in different sources and years

2.2 C群菌株分子分型结果 我们对101株C群菌株进行PFGE实验,其中6株发生染色体降解未能获得可用的电泳图谱。另外95株分为14个PFGE型,分别命名为NMNh.JX0001-NMNh.JX0014型。其中NMNh.JX0001和NMNh.JX0002为优势带型,分别包含46和30株菌。NMNh.JX0001和NMNh.JX0002只存在1条条带的差异。有4个带

型与优势带型只相差1~3条带,相似度大于85%,并且在聚类树上聚集成簇(图3中的簇1)。簇1由6个型别聚集而成,一共包含86株菌,占总菌株的90.5%(86/95)。其余8个带型分别只包含1~2株菌,与优势型别差异条带数多于9条,相似度低于65%。

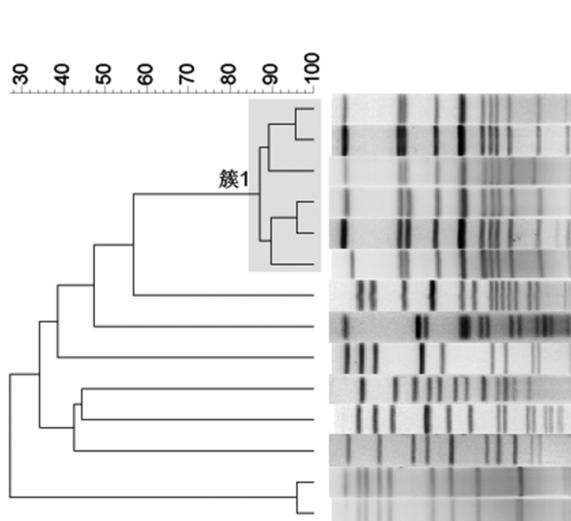


图3 对95株C群脑膜炎奈瑟菌进行PFGE分型获得的14种带型的聚类图
Fig.3 Cluster of 14 PFGE patterns obtained from 95 serogroup C *Neisseria meningitidis*

15株临床病人分离的C群菌株分为5种型别,其中5株属于NMNh.JX0001型,7株属于NMNh.JX0002型。49株密切接触者分离的C群菌株分为7种型别,其中34株属于NMNh.JX0001型,7株属于NMNh.JX0002型。31株健康人群C群菌株分为7种型别,其中7株属于NMNh.JX0001型、16株属于NMNh.JX0002型。

两个优势型别(NMNh.JX0001和NMNh.JX0002)主要分布在2005—2008年以及2013—2014年(图4)。NMNh.JX0001型菌株在2005—2006年、2007—2008年、2013—2014年3个时间段在C群菌株中所占比例分别为97.2%、28.6%、10.0%;而NMNh.JX0002型菌株在2005—2006年、2007—2008年、2013—2014年3个时间段在C群菌株中所占比例分别为2.8%、57.1%、90.0%。

挑选优势带型以及相似带型的33株菌株进行MLST分型,包括16株NMNh.JX0001型、9株NMNh.JX0002型、4株NMNh.JX0003型、1株NMNh.JX0004型、2株NMNh.JX0005型、1株NMNh.JX0006型菌株。结果显示所有33株菌均为ST-4821型。

PFGE型别	菌株数量	不同来源的菌株数量		
		临床患者	密切接触者	健康人群
NMNh.JX0001	46	5	34	7
NMNh.JX0002	30	7	7	16
NMNh.JX0005	2	0	0	2
NMNh.JX0003	6	1	2	3
NMNh.JX0004	1	0	0	1
NMNh.JX0006	1	1	0	0
NMNh.JX0007	1	0	1	0
NMNh.JX0009	2	1	1	0
NMNh.JX0011	1	0	0	1
NMNh.JX0008	1	0	1	0
NMNh.JX0012	1	0	0	1
NMNh.JX0010	1	0	1	0
NMNh.JX0013	1	0	1	0
NMNh.JX0014	1	0	1	0

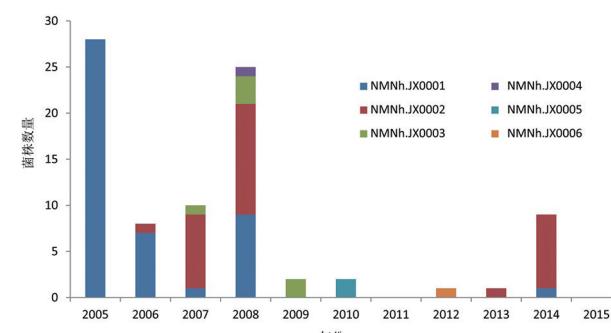


图4 C群脑膜炎奈瑟菌聚类簇中6种带型的年份分布
Fig.4 The year distribution of 6 PFGE patterns of serogroup C *Neisseria meningitidis*

3 讨论

我国历史上曾发生过3次流脑全国大流行,均是由A群引起。自80年代末开始使用A群流脑疫苗后,我国流脑发病率显著下降,目前已经少有A群流脑病例报道。在本研究中,江西省2005—2015年从临床病人分离的15株脑膜炎奈瑟菌均为C群,提示江西省流脑病例目前以C群为主。本研究健康人群分离的脑膜炎奈瑟菌中,不同年份的C群菌株占比例差异很大。2005年健康人群分离的菌

株中,C群只占1.9%,但是临床病人和密切接触者分离株几乎全部为C群。密切接触者均未出现临床症状,处于健康带菌状态,大部分密切接触者分离株的分子型别和病人菌株的分子型别一样,提示密切接触者带有致病克隆群,可能是传染源也可能是被病例传染的。与江西省相邻的安徽省在2004年发生ST-4821型C群流脑暴发流行。虽然无法考证临床病人和密切接触者是否有安徽旅行史,但是可以根据血清群和分子分型结果推测江西C群菌株可能由安徽传入。到2007年和2008年,健康人群分离株中C群占的比例上升至58.8%和81.5%,提示自2005年C群菌株传入江西以后,到2007—2008年C群菌株已经在健康人群中大量携带,但是由于已经开展C群流脑疫苗的常规免疫,人群尤其是婴幼儿童对C群流脑具有一定的免疫力,所以并未出现C群流脑病例增多的现象。在2012—2015年,病人和密切接触者分离株均为C群菌株,但是健康人群分离的24株菌株中,没有鉴定出C群菌株,可能是由于健康人群抽样调查时未能采集到携带C群菌株的人群标本。2012—2015年已经普遍接种C群流脑疫苗,但是仍然有C群流脑病例发生,提示应该加强C群流脑疫苗免疫和查漏补种,并且开展健康人群抗体水平检测,研究人群的免疫力水平。

自2003—2004年我国出现C群流脑病例暴发以来,已经在全国20多个省份发现C群流脑病例,并且C群菌株几乎都为ST-4821型^[4]。在之前的研究中我们揭示了2008年之前江西省流行的C群菌株为ST-4821型^[7],本研究中揭示江西省2008年至今的流行菌株也是ST-4821型C群菌株,跟全国情况一致。通过查询比对国家脑膜炎奈瑟菌分子分型数据库,本研究中的PFGE型别NMNh.JX0001型和NMNh.JX0002型是全国C群菌株的流行菌

型。本研究揭示了江西省2005—2015年,C群菌株发生了由NMNh.JX0001型向NMNh.JX0002型的转变,但是NMNh.JX0001型和NMNh.JX0002型菌株的分布时间跨度分别为2005—2014年和2006—2014年,提示可能长期存在着两种菌型的传播,其中NMNh.JX0001型菌株的比例在逐年降低,而NMNh.JX0002型菌株的比例在逐年升高。PFGE型别的变迁有可能导致新的流行模式,所以有必要开展持续监测,密切关注NMNh.JX0002型菌株在人群中的传播扩散以及引起的流脑病例。

参考文献:

- [1] Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, et al. Meningococcal disease[J]. N Engl J Med, 2001, 344: 1378-1388. DOI: 10.1056/NEJM200105033441807
- [2] Peltola H. Meningococcal disease: still with US[J]. Rev Infect Dis, 1983, 5: 71-91.
- [3] Shao Z, Li W, Ren J, et al. Identification of a new *Neisseria meningitidis* serogroup C clone from Anhui province, China[J]. Lancet, 2006, 367: 419-423. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)68141-5
- [4] Zhang J, Zhou HJ, Xu L, et al. Molecular characteristics of *Neisseria meningitidis* isolated during an outbreak in a jail: association with the spread and distribution of ST-4821 complex serogroup C clone in China[J]. Biomed Environ Sci, 2013, 5: 331-337. DOI: 10.3967/0895-3988.2013.05.002
- [5] 杨梦,袁辉,徐晓倩,等.江西省2005—2008年C群脑膜炎奈瑟菌分子分型分析[J].中华流行病学杂志,2009,30(10): 1095-1096. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.010.033
- [6] Dice LR. Measures of the amount of ecological association between species[J]. Ecology, 1945, 26: 297-302. DOI: 10.2307/1932409
- [7] 杨梦,周海健,袁辉,等.江西省脑膜炎奈瑟菌分离株分子分型和菌群结构分析[J].中华预防医学杂志,2013,47(4): 342-346. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2013.04.01