

# 2009–2015 年邯郸市健康人群流行性脑脊髓膜炎带菌率调查及分子分型研究

闫永飞, 赵丽萍, 郭娜娜, 马艳霞, 李燕霞, 李瑞芳, 邓健, 黄亮

邯郸市疾病预防控制中心, 河北 邯郸 056008

**摘要:** **目的** 了解邯郸市健康人群流行性脑脊髓膜炎带菌状况以及菌群分布变化情况, 为预测流脑发病趋势、合理制定流脑防控措施提供依据。 **方法** 2009–2015 年间, 采集 7 个年龄组健康人群的咽拭子, 接种于巧克力双抗琼脂平板进行脑膜炎奈瑟菌分离培养鉴定。 **结果** 共采集 3 528 份健康人群咽拭子, 其中阳性 100 株, 带菌率为 2.83%; 通过血清分群鉴定出 71 株, 其中 A 群 8 株, B 群 36 株, C 群 18 株, W135 群 9 株; 未分群 29 株, 包括多凝菌 (12 株)、自凝菌 (8 株)、不凝菌 (9 株), 并且以 15~ 岁年龄组的带菌率最高。通过 PCR 的方法对未分群的菌株进行分子分型, 鉴定出 18 株, 分型率为 62.1%; 其中 A 群 3 株, B 群 8 株, C 群 6 株, 29E 群 1 株, 仍有 11 株未分型。 **结论** 2009–2015 年邯郸市健康人群流行性脑脊髓膜炎带菌率较低, 但 10~25 岁年龄组带菌率显著。流行株在 2009–2011 年主要以 B 群为主, 并且集中在 10~25 岁之间, 但是到 2014 年、2015 年的流行株就有所改变, 主要是 C 群和 W135 群。这更应该引起关注, 进一步加大卫生宣传力度和流脑疫苗接种率。

**关键词:** 流脑; 带菌率; 分子分型

中图分类号: R512.3 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2018)02-0209-03 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2018.02.023

## Germ-carrying rate of epidemic cerebrospinal meningitis and molecular typing of bacteria among healthy population in Handan City, 2009–2015

YAN Yong-fei, ZHAO Li-ping, GUO Na-na, MA Yan-xia, LI Yan-xia, LI Rui-fang, DENG Jian, HUANG Liang

Handan Municipal Center for Disease Control and Prevention, Handan, Hebei 056008, China

Corresponding author: HUANG Liang, E-mail: huangliang0312@163.com

**Abstract:** **Objective** To investigate the germ-carrying rate of epidemic cerebrospinal meningitis and the changes of bacteria type distribution among healthy population in Handan City, and to provide a basis for forecasting the tendency of incidence of epidemic cerebrospinal meningitis and rationally formulating its prevention and control measures. **Methods** The throat swab specimens were collected from 7 age groups of healthy population during 2009–2015, and then inoculated in chocolate double anti-AGAR plate to isolate, cultivate and identify *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*). **Results** A total of 3,528 throat swab specimens were collected from healthy population, and 100 positive strains were detected, with the germ-carrying rate being 2.83%. 71 strains were identified by serum grouping, of which 8 strains were characterized in serogroup A, 36 strains in serogroup B, 18 strains in serogroup C and 9 strains in serogroup W135. 29 strains were unidentified, including 12 strains of multiple-coagulate bacteria, 8 strains of self-coagulate bacteria and 9 strains of non-coagulate bacteria, and the germ-carrying rate of the age group of 15- years was the highest. The unidentified strains were typed molecularly by PCR, and 18 strains were identified (with the typing rate being 62.1%), including 3 strains in serogroup A, 8 strains in serogroup B, 6 strains in serogroup C, 1 strain in serogroup 29E. But 11 strains still remained unidentified. **Conclusions** The germ-carrying rate of epidemic cerebrospinal meningitis among the healthy population in Handan City from 2009 to 2015 was low, but the carrying rates in the age groups of 10-, 15- and 25- years were slightly higher. Serogroup B *N. meningitidis* strains prevailed and mainly prevailed in the age groups of 10-15 years during the period of 2009–2011, and were supplanted by serogroup C and serogroup W135 *N. meningitidis* strains in 2014–2015. Therefore, more attention should be paid to intensifying health propaganda and expanding the coverage rate of meningococcal meningitis vaccine.

**Key words:** epidemic cerebrospinal meningitis; germ-carrying rate; molecular typing

流行性脑脊髓膜炎 (meningococcal meningitis) 简称流脑, 它是由脑膜炎奈瑟菌 (*Neisseria meningitidis*,

**作者简介:** 闫永飞 (1986-), 女, 河北邯郸人, 硕士, 主管检验师, 研究方向: 微生物检验与分子生物学。

**通信作者:** 黄亮, E-mail: huangliang0312@163.com。

Nm) 引起的急性化脓性脑膜炎, 传染性较强。其特点是起病急、病情重、变化多、传播快、流行广, 来势凶猛, 病死率高, 危害性大<sup>[1-2]</sup>。人群对脑膜炎奈瑟菌普遍易感。流脑一般好发于小年龄段儿童, 患者主要是 15 岁以下的少年儿童, 特别是 6 个月~2 岁的婴幼儿容易感染, 因为幼儿自身抵抗力差, 容易患病。近年来, 临

床上也发现有成年人患此病,而成人的病死率高<sup>[3-4]</sup>。为了解邯郸地区健康人群流脑带菌状况,为制定防控措施提供依据,2009-2015 年对邯郸地区健康人群开展了流脑带菌状况调查,现将结果报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象 于 2009-2015 年间在邯郸地区内采用分层随机抽样方法抽取 0~、5~、10~、15~、25~、35~、45~ 岁 7 组年龄组健康人群为调查对象,共计 3 528 人,其中男 1 731 人,女 1 797 人。

1.2 材料 双抗巧克力琼脂平板购于北京陆桥技术有限责任公司;脑膜炎奈瑟菌多价及分群诊断血清购自美国 Remel 公司;生化试剂购于 API NH;核酸提取试剂盒购自 Qiagen 公司。Taq 酶、dNTP Mixture、10×PCR Buffer、6×Loading Buffer(上样缓冲液)、Marker D(标记)均选自上海生工有限公司。所有试剂均在有效期内使用。

1.3 检测方法

1.3.1 脑膜炎奈瑟菌分离培养 采集的咽拭子立即接种于双抗巧克力平板,置 5%CO<sub>2</sub> 培养箱 37℃ 培养 18~24 h;选择圆形、凸起、湿润、似露滴状的可疑菌落接种于巧克力琼脂平皿纯化,进一步鉴定<sup>[4-5]</sup>。

1.3.2 菌群鉴定 可疑菌落进行革兰染色,选择革兰阴性、卵圆形或肾型双球菌进行生化试验,将生化符合葡萄糖(+)麦芽糖(+)乳糖(-)蔗糖(-)的菌株保存,用脑膜炎奈瑟菌诊断血清进行血清型分群<sup>[6-7]</sup>。

1.3.3 PCR 检测

1.3.3.1 模板制备 参照试剂盒说明书进行制备。  
1.3.3.2 PCR 反应程序 PCR 反应体系(50 μl)包括以下成分:dNTP 4 μl、10×Buffer 5 μl、10 μmol/L 引物各 2 μl、MgCl<sub>2</sub>(25 mol/L)6 μl、DNA 聚合酶 3 U,将上述成分充分混匀后,加入制备好的 DNA 模板 4 μl。循环参数为:94℃ 5 min,92℃ 30 s,56℃ 35 s,72℃ 35 s,36 次循环;最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 2%琼脂糖凝胶电泳,Marker D 作参照<sup>[8-9]</sup>。引物设计见表 1。

表 1 扩增 Nm 种属及常见群所用引物

引物名称	引物序列	鉴定特性	扩增片段大小(bp)
CrgA	5'-GCTGGCGCCGCTGGCAACAAAATTC-3'	Nm 种属	230
	5'-CTTCTGCAGATTGCGGCGTGCCGT-3'		
ORF-2	5'-CGCAATAGGTGTATATATTCTTCC-3'	NmA 群	400
	5'-CGTAATAGTTTCGTATGCCTTCTT-3'		
SIAD(B)	5'-GGATCATTTCAGTGTTCACCA-3'	NmB 群	450

续表 1

引物名称	引物序列	鉴定特性	扩增片段大小(bp)
SIAD(C)	5'-GCATGCTGGAGGAATAAGCATTAA-3'	NmC 群	250
	5'-CAATCAGGATTGCCCAATTGAC-3'		
SIAD(Y)	5'-CTCAAAGCGAAGCGTTTGTT-3'	NmY 群	120
	5'-CTGAAGCGTTTTTCATTATAATTGCTAA-3'		
SIAD(W135)	5'-CAGAAAGTGAAGGATTCCATA-3'	NmW135 群	120
	5'-CACAACCATTTTCATTATAGTTACTGT-3'		
ctrA(29E)	5'-ATT ACG CTG ACG GCA TGT GGA-3'	Nm29E 群	667
	5'-TTG TCG CGG ATT TGC AAC TA-3'		
ctrA(X)	5'-GTC TTT GTA TAA GGC CCA AG-3'	NmX 群	525
	5'-TTG TCG CGG ATT TGC AAC TA-3'		
ctrA(Z)	5'-TAT GCG GTG CGT TTC GCT ATG-3'	NmZ 群	667
	5'-TTG TCG CGG ATT TGC AAC TA-3'		

1.4 结果分析 用 Excel 2003 整理数据,用 SPSS 20.0 对数据进行统计学分析,计数资料采用卡方检验,检验水准 α=0.05。

2 结果

2.1 健康人群不同年龄组脑膜炎奈瑟菌检测情况 2009-2015 年邯郸市共采集健康人群咽拭子标本 3 528 份,阳性数为 100 份,带菌率为 2.83%,并且以 15~ 岁年龄组带菌率最高,其次 10~ 岁年龄组,5 岁以下的带菌率最低。经统计学分析,不同年龄组的带菌率差异有统计学意义( $\chi^2=26.33, P<0.05$ ),见表 2。

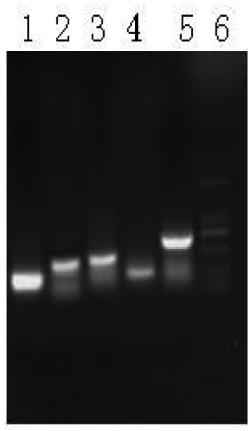
2.2 不同年龄组脑膜炎奈瑟菌菌群分布情况 2009-2015 年间,分离的 100 份阳性咽拭子中,通过血清学鉴定的有 71 株,分型率为 71%;其中主要是以 B 群为主,为 36 株,A 群 8 株,C 群 18 株,W135 群 9 株。除此之外还有 29 株未分群,包括多凝菌(12 株)、自凝菌(8 株)、不凝菌(9 株);将其通过分子分型鉴定出 18 株,分型率为 62.1%;其中 A 群 3 株,B 群 8 株,C 群 6 株,29E 群 1 株。结果见表 2。

表 2 不同年龄组脑膜炎奈瑟菌分型情况

年龄组(岁)	总数	A 群	B 群	C 群	W135 群	29E 群	未分型	阳性数	带菌率(%)
0~	320	1	1	1	0	0	1	4	1.25
5~	778	0	8	4	0	0	2	14	1.80
10~	950	3	12	13	3	0	2	33	3.47
15~	521	3	17	3	3	1	3	30	5.76
25~	376	2	2	1	1	0	2	8	2.13
35~	315	0	2	1	1	0	1	5	1.59
45~	268	2	2	1	1	0	0	6	2.24
合计	3 528	11	44	24	9	1	11	100	2.83

2.3 健康人群脑膜炎奈瑟菌分子生物学分群鉴定

对未分群的 29 株进行分子分型鉴定,21 株 Nm CrgA 基因阳性,其中可以分群的有 18 株,有 3 株菌扩增出 ORF-2 基因片段,电泳条带大小为 400 bp(A 群),8 株菌扩增出 SIAD(B)基因片段,电泳条带大小为 450 bp(B 群),6 株菌扩增出 SIAD(C)基因片段,电泳条带大小为 250 bp(C 群),1 株菌扩增出 ctrA(29E)基因片段,电泳条带大小为 667 bp(29E 群),其余菌株未扩增出条带。见图 1。



注:1:230 bp; 2:400 bp; 3:450 bp; 4:250 bp; 5:667 bp。1~5:分别为血清群种属、A、B、C、29E; 6:Marker D。

图 1 Nm 分群 PCR 扩增产物电泳图

2.4 2009-2015 年间流行菌株的变化情况

邯郸市健康人群流行菌株在 2009-2011 年主要是 B 群,但是到 2011 年以后检出减少,C 群和 W135 群检出增加。结果见表 3。

表 3 2009-2015 年健康人群 Nm 菌株血清群分布

血清群	2009 年	2010 年	2011 年	2012 年	2013 年	2014 年	2015 年	合计
A	2	3	1	3	1	1	0	11
B	13	16	5	3	5	2	0	44
C	2	3	4	4	3	4	4	24
W135	0	0	0	2	2	3	2	9
29E	0	0	0	1	0	0	0	1
未分型	2	1	2	1	2	3	0	11

3 讨论

本次调查结果显示,2009-2015 年间检测的 3 528 份邯郸市健康人群的脑膜炎奈瑟菌带菌情况,其中阳性菌株为 100 株,带菌率为 2.83%。流行株在 2009-2011 年主要是 B 群,但是到 2012 年以后以 C 群和 W135 群为流行菌株,这更应该引起关注。另外,从年龄组看,以 10~25 岁年龄组带菌率显著,说明这些健康带菌者是重要的传染源。这部分人群跨度较大,有学生和上班族,首先提示要加强对学校、企业和流动人

口集聚区等重点单位、重点区域的流脑防控工作,加大宣传教育力度,努力提高群众对流脑预防知识知晓率,多管齐下,形成群防群控的局面,防止流脑的流行。

近年来随着抗生素大量的使用,用传统的分离方法鉴定到的 Nm,其中变异菌株占到的比例逐年增大。本次调查 100 份阳性脑膜炎奈瑟菌株中通过血清学分群鉴定出 71 株;剩余的 29 株用传统表型特征鉴定为不可分群 Nm 菌株,与此同时结合 PCR 方法又确定了 21 株 Nm CrgA 基因阳性,其中可以分群的有 18 株。由于细菌的基因突变,增加了实际检测难度<sup>[8-10]</sup>。如果按病原菌的表型特征,虽然细菌形态和生化反应符合 Nm,但是出现自凝菌(与生理盐水凝集)、不凝菌(与生理盐水和血清都不凝集)、多凝菌(与多价血清凝集),往往就无法判定为 Nm,进而就直接影响到检测质量,进而会影响到病人的治疗以及出现疫情后的防控措施的落实等问题;因此在以后的检测中生化鉴定与分子分型鉴定相结合的方法是十分必要的。

参考文献

[1] 周义红. 常州武进区 2011 年健康人群流行性脑脊髓膜炎带菌率及免疫水平调查[J]. 江苏预防医学,2012,5(1):55-56.

[2] 陈玮. 2012 年奉节县健康人群流脑抗体监测结果分析[J]. 职业卫生与病伤,2013,28(5):310-311.

[3] 崔敏,许建雄,蔡衍珊,等. 广州市 2009-2011 年健康人群流脑免疫水平及带菌状况分析[J]. 热带医学杂志,2013,35(8):1015-1017.

[4] 刘振武,王晓萍,钱玉春,等. 合肥市 2011 年流脑流行前期健康人群流脑带菌率及免疫水平调查[J]. 安徽预防医学杂志,2013,19(6):411-413.

[5] 褚红娜,魏峰,赵国良,等. 承德市 2013-2014 年流行性脑脊髓膜炎健康人群带菌监测分析[J]. 医学动物防制,2016,33(5):494-496.

[6] 贾滨,张楠,石倩,等. 北京市朝阳区 2009-2013 年健康人群流脑带菌状况分析[J]. 实用预防医学,2016,23(5):614-616.

[7] 薛伟华,庞志钊,张云,等. 2015 年平山县健康人群流行性脑脊髓膜炎监测结果分析[J]. 中国卫生检验杂志,2016,26(7):1020-1022.

[8] 赵丽萍,黄亮. 邯郸市不可分群脑膜炎奈瑟菌 PCR 基因分型[J]. 山西医药杂志,2014,58(6):1325-1326.

[9] 何宝花,贾肇一,王颖童,等. 河北省 2012-2013 年流脑病例病原学监测及分子分型研究[J]. 中国卫生检验杂志,2015,25(5):506-510.

[10] 祁业敏,高永海,卢俊荣,等. 2000-2013 年沧州市健康人群流行性脑脊髓膜炎带菌监测结果[J]. 职业与健康,2014,30(16):2245-2247.

[11] 徐征,朱兵清,高源,等. 中国不可分群脑膜炎奈瑟菌的分子分型分析[J]. 疾病监测,2014,29(9):688-692.

[12] 邱德山,徐东,张宜东,等. 高密市 2013-2014 年健康人群流行性脑脊髓膜炎带菌率调查与分析[J]. 微生物学免疫学进展,2015,6(1):44-47.

收稿日期:2016-12-12