

湖南省 B 群脑膜炎奈瑟菌的药物敏感性及其 PFGE 分型特征分析

夏昕¹, 方明礼¹, 周海健², 覃迪¹, 贺子翔¹, 高立冬¹, 湛志飞¹

1. 湖南省疾病预防控制中心, 湖南 长沙 410005; 2. 中国疾病预防控制中心, 北京 102206

摘要: **目的** 了解湖南省 B 群脑膜炎奈瑟菌的病原生物学特征、药物敏感性以及 PFGE 分型特征。 **方法** 29 株 B 群流脑菌株经生化和血清学鉴定后, 对菌株进行药敏试验和脉冲场凝胶电泳分型。 **结果** 29 株 B 群脑膜炎奈瑟菌菌株对米诺环素、头孢曲松、头孢噻肟、美罗培南、利福平、氯霉素和阿奇霉素全部敏感, 对青霉素和氨苄青霉素的敏感率为 75.86% 和 86.21%, 对环丙沙星、左氧氟沙星、复方新诺明耐药率较高, 耐药率为 34.48%、41.38% 和 96.55%; 29 株 B 群脑膜炎奈瑟菌的 PFGE 分型共分为 22 个带型, 不同地区间分离株可见带型一致的情况。 **结论** B 群脑膜炎奈瑟菌对抗菌药物的敏感性与其它血清群基本一致, PFGE 分子分型呈现高度多态性, 健康人群携带者的带型与病人的带型呈现一定的遗传相关性, 应持续开展监测, 密切关注菌株的传播趋势。

关键词: 流行性脑脊髓膜炎; B 群脑膜炎奈瑟菌; 药物敏感性; 脉冲场凝胶电泳; 分子分型

中图分类号: Q939.11+6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2019)11-1305-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2019.11.007

Drug sensitivity and pulsed-field gel electrophoresis typing characteristics of *Neisseria meningitidis* serogroup B in Hunan province

XIA Xin¹, FANG Ming-li¹, ZHOU Hai-jian², QIN Di¹, HE Zi-xiang¹, GAO Li-dong¹, ZHAN Zhi-fei¹

1. Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changsha 410005, Hunan, China

2. Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: ZHAN Zhi-fei, E-mail: 190776969@qq.com

Abstract: **Objective** To understand the pathogenic biological characteristics, drug sensitivity and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing characteristics of *Neisseria meningitidis* serogroup B isolated in Hunan province. **Methods** The drug sensitivity test and PFGE typing were carried out on 29 *Neisseria meningitidis* serogroup B strains which were identified biochemically and serologically. **Results** Twenty-nine *Neisseria meningitidis* serogroup B strains were all sensitive to minocycline, ceftriaxone, cefotaxime, meropenem, rifampicin, chloramphenicol and azithromycin, and their sensitivities to penicillin and ampicillin were 75.86% and 86.21%, respectively. They were highly resistant to ciprofloxacin (34.48%), levofloxacin (41.38%) and compound sulfamethoxazole (96.55%). 29 *Neisseria meningitidis* serogroup B strains were divided into 22 bands by PFGE typing, and the isolates in different regions showed the same band pattern. **Conclusions** The sensitivities of *Neisseria meningitidis* serogroup B strains to antibacterial drugs were basically consistent with those of other serogroups, and PFGE typing presented highly different types. There was a certain genetic correlation between PFGE bands in healthy people and patients. We should continue to carry out molecular typing monitoring and pay close attention to the spread of strains.

Key words: epidemic cerebrospinal meningitis; *Neisseria meningitidis* serogroup B; drug sensitivity; pulsed-field gel electrophoresis; molecular typing

流行性脑脊髓膜炎(简称流脑)是由脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*, Nm)通过呼吸道传播引起的疾病,多在冬春季节发病,属于中国法定的乙类传染病。

基金项目: 国家科技重大专项(2018ZX10713003-002-008)

作者简介: 夏昕(1978-),女,江苏盱眙人,硕士研究生,副主任技师,主要从事病原微生物的研究工作。夏昕、方明礼同为第一作者。

通信作者: 湛志飞, E-mail: 190776969@qq.com。

病,脑膜炎奈瑟菌分为 13 个血清群,建国以来,曾发生 3 次全国流脑大流行,以 A 群流脑大流行为主。随着 A 群流脑疫苗在全国的推广与普及, A 群流脑日益减少,本省自 2006 年以后未再发生过 A 群流脑病例的流行,2007 年湖南省将 A+C 群流脑疫苗纳入免疫规划, C 群流脑病例也开始逐步减少,并于 2012 年首次发现了 W135 群病例^[1-2], 其后在健康人群监测调

查中,也屡屡发现 C 群和 W135 群菌株的携带,本省计划免疫部门也开始积极推广 ACYW135 四价流脑疫苗的接种,接种后成效显著,但是也造成了新的问题,由于 B 群流脑疫苗荚膜的多变性,该群疫苗在国内仍处于研制和验证阶段,没有上市,故在四价和两价流脑疫苗的选择性压力下,近年来,本省无论是在健康人群监测或是流脑病例中均以 B 群流脑多见,且占比不断提高。本研究组主要收集了近年来从健康人群监测、病人以及密切接触者标本中分离到的 B 群脑膜炎奈瑟菌菌株,对其进行了药物敏感性以及 PFGE 分型试验,以期进一步了解其病原学特征,为流脑的防控提供实

验室依据,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 来自流脑病人及健康人群监测收集到的 29 株 B 群流脑菌株,经生化和血清学确认,其中流脑患者分离 5 株,健康人群监测分离 24 株。时间跨度为 2009–2018 年间,菌株的详细资料见表 1,药敏质控菌株肺炎链球菌 ATCC 49619 以及 PFGE Marker 沙门菌 H9812 为湖南省疾病预防控制中心实验室留存备用。

表 1 29 株 B 群脑膜炎奈瑟菌菌株基本资料

序号	菌株编号	分离时间(年、月)	血清型	菌株来源	样本种类	性别	年龄(岁)	地址
1	2009B004	2009. 2	B 群	病人	脑脊液	男	12	永州
2	2010B84	2010. 11	B 群	健康带菌	咽拭子	女	15	岳阳
3	2010B85	2010. 11	B 群	健康带菌	咽拭子	男	15	岳阳
4	2010B88	2010. 11	B 群	健康带菌	咽拭子	男	15	衡阳
5	2010B89	2010. 11	B 群	健康带菌	咽拭子	女	18	衡阳
6	2011B63	2011. 11	B 群	健康带菌	咽拭子	男	14	衡阳
7	2011B65	2011. 11	B 群	健康带菌	咽拭子	男	18	衡阳
8	2011B67	2011. 11	B 群	健康带菌	咽拭子	男	15	衡阳
9	2011B68	2011. 11	B 群	健康带菌	咽拭子	女	18	衡阳
10	2012B141-E47	2012. 11	B 群	健康带菌	咽拭子	女	15	张家界
11	2012B141-E55	2012. 11	B 群	健康带菌	咽拭子	男	15	张家界
12	2015B004	2015. 1	B 群	病人	血	女	24	株洲
13	2015B057	2015. 12	B 群	病人	血	女	4 月	长沙
14	2017B37-E2	2017. 10	B 群	健康带菌	咽拭子	男	11	衡阳
15	2017B37-E32	2017. 10	B 群	健康带菌	咽拭子	女	4	衡阳
16	2017B37-F14	2017. 10	B 群	健康带菌	咽拭子	男	21	衡阳
17	2017B37-H6	2017. 10	B 群	健康带菌	咽拭子	男	16	衡阳
18	2017B37-H25	2017. 10	B 群	健康带菌	咽拭子	男	17	衡阳
19	2017B37-H26	2017. 10	B 群	健康带菌	咽拭子	男	16	衡阳
20	2017B37-H29	2017. 10	B 群	健康带菌	咽拭子	男	17	衡阳
21	2017B47- C16	2017. 12	B 群	健康带菌	咽拭子	男	4	张家界
22	2017B47- E1	2017. 12	B 群	健康带菌	咽拭子	女	14	张家界
23	2017B47- E8	2017. 12	B 群	健康带菌	咽拭子	男	17	张家界
24	2017B47- E14	2017. 12	B 群	健康带菌	咽拭子	男	16	张家界
25	2017B47- E15	2017. 12	B 群	健康带菌	咽拭子	男	15	张家界
26	2017B47- E17	2017. 12	B 群	健康带菌	咽拭子	女	12	张家界
27	2017B47- F26	2017. 12	B 群	健康带菌	咽拭子	男	17	张家界
28	2018B003	2018. 2	B 群	病人	血	男	53	湘潭
29	2018B005	2018. 2	B 群	病人	血	男	58	郴州

1.2 主要试剂 抗菌药物 12 种: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)、复方新诺明(SXT)、左氧氟沙星(LVX) 购自英国 Oxoid 公司;青霉素(PEN)和 氨苄西林(AMP) E-test 药敏试条及 API NH 鉴定卡、VITEK 2 NH 鉴定卡购自法国生物梅里埃公司;流脑鉴定用血清购自 Remel 公司, SeaKem Gold Agarose 金胶购自 Cambraex Bio Science Rockland 公司;限制性内切酶 Nhe I 购自宝生生物工程(大连)有限公司;蛋白酶 K 购自 MER-CK 公司,所有试剂均在有效期内使用。

1.3 培养和生化鉴定 将疑似菌落接种于巧克力双抗琼脂平板,置 5%~10%CO₂ 孵育箱 37 ℃ 18~24 h 分纯培养后,取新鲜培养物接种至 API NH 鉴定卡或者 VITEK 2 NH 鉴定卡上,按试剂和仪器说明书操作。

1.4 血清学实验 采用 Remel 公司的脑膜炎奈瑟菌诊断血清,用接种环刮取新鲜培养物与诊断血清在玻片上研磨均匀,轻轻摇动玻片 1~2 min 后观察结果。先用 A-D 多价血清进行凝集,如为阳性,再用 B 群单价血清进行凝集,同时用生理盐水作阴性对照,如对照成立,且待测菌株与多价诊断血清和 B 群血清凝集试验均阳性判断待测菌株为 B 群脑膜炎奈瑟菌菌株。

1.5 药物敏感性试验 参考美国临床实验室标准化研究所(CLSI)推荐的药敏指南,十二种抗菌药物中,青霉素和氨苄青霉素采用 Etest 试纸条法,其余 10 种抗菌药物采用 K-B 纸片扩散法,将菌株调至浓度为 0.5 麦氏单位,均匀涂布于 MH 血琼脂上,再贴上药敏纸片或药敏 e-test 试条,置 5%~10% CO₂ 37 ℃ 培养 18~24 h,直接读取定量结果或者用游标卡尺量取抑菌圈直径,并根据 CLSI 的标准判定药敏结果分别为敏感、中介或者耐药。

1.6 PFGE 试验 根据中国疾病预防控制中心 PulseNet China 实验室的脑膜炎奈瑟菌 PFGE 电泳标准操作规程进行试验(官网为 <http://www.pulsenet-china.net/>)。将 5%~10% CO₂ 环境,37 ℃ 温箱纯培养 18~24 h 的脑膜炎奈瑟菌培养物,均匀悬浊于缓冲液中,按网站推荐的脑膜炎奈瑟菌指南进行操作,制备金胶小胶块样品后,经蛋白酶 K 裂解,再用 Nhe I 限制性内切酶酶切电泳,Marker 沙门菌 H9812 用 Xba I 酶酶切,按操作规程设置电泳参数,电泳 16 h,电泳完毕后用 Gel-red 核酸染料染色约 20 分钟,最后用凝胶成像仪读取电泳图谱。获得图谱后,再使用 BioNumerics 软件进行分型比对,聚类树形图类型选择 UPGMA(un-weighted pair group method with averages)的方法,条带位置差异容许度(tolerance)为 1.5%。不同菌株的电泳条带的相似性系数采用 Dice 系数表示。

2 结果

2.1 生化及血清学结果 疑似菌株置 5%~10% CO₂ 温箱 37 ℃ 孵育 18~24 h 分纯培养后,按说明书接种到 API NH 鉴定试剂卡或者是 VITEK 2 的 NH 鉴定卡上,手工读取或者上机读取生化鉴定结果,均为脑膜炎奈瑟菌。生化确认后,用群因子多价血清 A-D 与菌株进行凝集,阳性后,再与因子血清 B 与菌株进行凝集,也为凝集试验阳性后,(同时用生理盐水做对照凝集),确认为 B 群脑膜炎奈瑟菌。

2.2 抗菌药物敏感性结果 所有 29 株 B 群脑膜炎奈瑟菌对 MIN、CRO、CTX、MEM、RIF、CHL 和 AZM 全部敏感;对 PEN 和 AMP 较为敏感,分别为 22 株和 25 株,对 CIP 和 LVX 则各有 13 株敏感,对 SXT 耐药情况最严重,仅有 1 株敏感,详细药敏结果见表 2。

2.3 PFGE 试验结果 湖南省分离到的 29 株 B 群 Nm 菌株中,共分为 22 个 PFGE 型,分子生物学分型呈高度多态性,其中 23 株为一个优势簇,相似度约大于 55%,不同地区的健康带菌者分离到的菌株有来自同一基因型别,病人与健康带菌者身上分离的菌株有一

定的遗传相关性。PFGE 分型分析结果树形图见图 1。

表 2 29 株 B 群脑膜炎奈瑟菌和
抗生素的药物敏感率结果(K-B 法)

抗菌药物	敏感		中介		耐药	
	株数	率(%)	株数	率(%)	株数	率(%)
青霉素(PEN)	22	75.86	6	20.69	1	3.45
氨苄青霉素(AMP)	25	86.21	4	13.79	0	0.00
头孢曲松(CRO)	29	100.00	0	0.00	0	0.00
头孢噻肟(CTX)	29	100.00	0	0.00	0	0.00
美罗培南(MEM)	29	100.00	0	0.00	0	0.00
氯霉素(CHL)	29	100.00	0	0.00	0	0.00
左氧氟沙星(LVS)	13	44.83	6	20.69	10	34.48
环丙沙星(CIP)	13	44.83	4	13.79	12	41.38
米诺环素(MH)	29	100.00	0	0.00	0	0.00
利福平(RIF)	29	100.00	0	0.00	0	0.00
阿奇霉素(AZM)	29	100.00	0	0.00	0	0.00
复方新诺明(SXT)	1	3.45	0	0.00	28	96.55

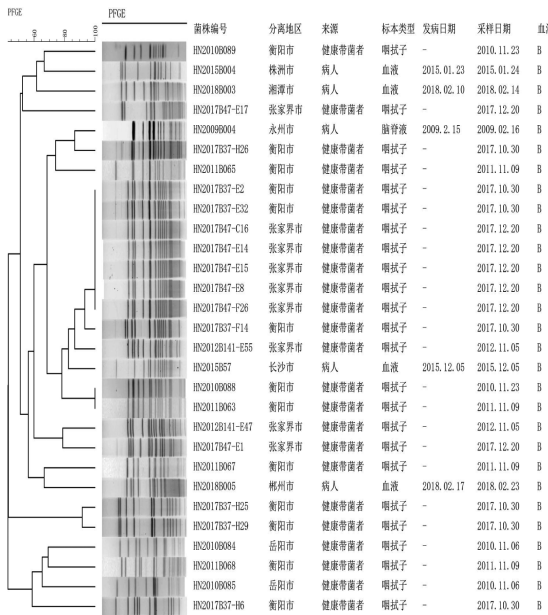


图 1 29 株 B 群脑膜炎奈瑟菌 PFGE 分型分析结果

3 讨论

上世纪九十年代,A 群流脑在本省曾引起过大范围的流行,病死率高,预后也差,但随着 A 群流脑疫苗的普及与接种,本世纪已经不见踪迹了,取而代之的是流脑的其它血清型,本省近年来流行过 C 群、B 群、W135 群脑膜炎奈瑟菌菌株引起的流脑病例,这其中又以 B 群流脑最为特殊和棘手,因为在中国目前市场上已经有 A, C, W135, Y 的四价荚膜多糖或多糖结合疫苗可用于人群的广泛接种并对该四群流脑进

行有效的预防,但基于 B 群流脑疫苗这一块,却迟迟没有正式上市,因为 B 群脑膜炎奈瑟菌的荚膜多糖是一种神经氨酸多聚物,这种多聚物唾液酸与人体细胞有共同抗原,故而制作疫苗相对疫苗比较棘手^[3],故对于 B 群流脑疫苗的研究更倾向于外膜蛋白而不是荚膜多糖^[4],并且中国 B 群流脑流行以 cc4821 克隆群为主,其型别有别于国际上已有的 B 群蛋白疫苗^[5],故 B 群流脑疫苗的市场空白,也造成本省 B 群流行性脑膜炎的流行负担,本省自 2009 年首次从流脑病人分离出 B 群脑膜炎奈瑟菌,由于没有有效的上市疫苗,此后该群病例时有发生,占比也有所增加,不过目前针对 B 群脑膜炎奈瑟菌的外膜蛋白作为疫苗候选抗原的疫苗正在积极的研发中,并且也取得了一定的进展^[6]。

流脑流行的一个显著特征是具有明显的地域性,随着时间推移和疫苗应用,会发生血清群转换,邵祝军等^[7]认为,中国 B 群流脑主要以散发为主,脑膜炎奈瑟菌血清型均为 B3 型,而非国际上主要流行的 B15 和 B4 菌型。本次研究中所选的 29 株 B 群脑膜炎奈瑟菌,5 株来自于病人的血或者脑脊液,其余 24 株为健康带菌者的咽拭子分离,经生化和血清学确认为 B 群脑膜炎奈瑟菌菌株。以往青霉素一直是作为对流行性脑脊髓膜炎的首选药物,无论青霉素或者是氨苄青霉素都是很敏感的,往年的数据中,B 群菌株通常都对抗菌药物更为敏感^[8],但本次研究的数据中发现,已经有 1 株菌对青霉素完全耐药,还有 6 株和 4 株分别对青霉素和氨苄青霉素的药敏试验结果为中介度,国外也曾有报道过 B 群脑膜炎奈瑟菌引起的流脑病例对青霉素耐药,尽管该患者后来通过头孢曲松的进一步治疗康复了,但应引起对该耐药的进一步重视^[9]。另所有 29 株 B 群脑膜炎奈瑟菌对 MIN、CRO、CTX、MEM、RIF、CHL 和 AZM 全部敏感;29 株 B 群脑膜炎奈瑟菌菌株均对 SXT 呈高度耐药,对 CIP 和 LVX 部分耐药,对 CIP 和 LVX 则各有 13 株敏感,对 SXT 最不敏感,仅有 1 株敏感。这一结果与邵祝军等^[10]报道的基本一致,与本省其它血清群的脑膜炎奈瑟菌的耐药情况也基本类似^[11]。如何减少更多耐药菌株的出现,也是研究组后续需要关注的重点。

脉冲场凝胶电泳 PFGE 结果显示,29 株 B 群 Nm 基因呈高度多态化,共分为 22 个 PFGE 带型,其中 23 株 Nm 菌株在聚类树形图上聚集成为优势簇,相似度约大于 55%,且所有流脑病例的分离菌株均在优势聚类簇中,在优势簇中,还可发现,病例分离株与健康带菌者的分离株存在高度相关,不同地区之间,如衡阳市

和张家界市的健康携带者分离株还存在条带一致的情况。国外的研究表明^[12],在健康人群携带者中分离的流脑菌株 PFGE 带型呈现出基因的高度多态性,但病例中分离的 B 群流脑菌株却集中属于少数的几个群,本省 29 株 B 群 Nm 的 PFGE 结果可见,不仅健康带菌者中分离到的 B 群 Nm 菌株呈现基因高度多态性,病人中分离到的 Nm 菌株也呈现遗传学多态性,不同地区的健康带菌者分离到的菌株有来自同一基因型别,病人与健康带菌者身上分离的菌株有一定的遗传相关性。

综上所述,尽管目前病例 B 群 Nm 的 PFGE 型别多样,但也发现部分健康人群与病人的 Nm 菌株有一定的关联,利用 PFGE 技术对 Nm 菌株进行分型比对,绘制不同菌株的聚类树形图,对于今后有可能发生的 B 群流脑病人的分子生物学分型有一定的预警和关联作用,并为进一步做好流脑的防控具有积极意义。

参考文献

- [1] 夏昕,戴德芳,湛志飞,等. 湖南省首例 W135 群流行性脑脊髓膜炎病例流行病学及病原学分析[J]. 疾病监测, 2013, 28(9):714-716.
- [2] 戴德芳,李放军,夏昕,等. 1951-2016 年湖南省流行性脑脊髓膜炎流行病学特征及菌群变迁趋势分析[J]. 实用预防医学, 2017, 24(12):1440-1442.
- [3] 张水华,陈献雄,王妍,等. 流行性脑膜炎球菌疫苗研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2010, 38(1):66-69.
- [4] MacNeil JR, Rubin L, Folaranmi T, et al. Use of serogroup B meningococcal vaccines in adolescents and young adults: recommendations of the advisory committee on immunization practices, 2015[J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2015, 64(41):1171-1176.
- [5] 朱兵清,高婉迎,徐丽,等. 中国 B 群脑膜炎奈瑟菌分子流行病学特征分析[J]. 中华预防医学杂志, 2019, 53(2):153-158.
- [6] 谢梅花,李开铭,胡四海. B 群脑膜炎奈瑟菌外膜蛋白作为疫苗候选抗原的研究进展[J]. 现代免疫学, 2014, 34(6):510-513.
- [7] 邵祝军. 中国流行性脑脊髓膜炎流行变异趋势[J]. 中华预防医学杂志, 2013, 47(10):891-893.
- [8] 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其分型[J]. 中国公共卫生, 2011, 27(12):1568-1569.
- [9] Abeyseriya SD, Speers DJ, Gardiner J, et al. Penicillin-resistant *Neisseria meningitidis* bacteraemia, Kimberley region, March 2010[J]. Commun Dis Intell Q Rep, 2010, 34(3):342-344.
- [10] 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.
- [11] 夏昕,周海健,湛志飞,等. 湖南省 C 群及 W135 群脑膜炎奈瑟菌的流行病学及病原学特征分型[J]. 中国感染控制杂志, 2018, 17(5):373-379.
- [12] Yazdankhah SP, Caugant DA. *Neisseria meningitidis*: an overview of the carriage state[J]. J Med Microbiol, 2004, 53(Pt9):821-832.