

湖南省新发 X 群 Y 群流行性脑脊髓膜炎病例菌株的病原学特征分析

夏昕, 方明礼, 覃迪, 贺子翔, 高立冬, 湛志飞

湖南省疾病预防控制中心, 湖南 长沙 410005

摘要: **目的** 了解 2019—2020 年本省分离到的新发 X 群和 Y 群脑膜炎奈瑟菌病例菌株的药物敏感性及其分子分型特征。**方法** 从病人血液和脑脊液中分离到的脑膜炎奈瑟菌经生化鉴定后, 进行血清学分群、药敏试验以及多位点序列分型分析。**结果** 新发的 X 群、Y 群脑膜炎奈瑟菌药敏试验中对青霉素、氨苄青霉素、米诺环素、头孢曲松、头孢噻肟、氯霉素、阿奇霉素、美罗培南和利福平全部敏感; 对复方磺胺甲噁唑耐药; 与 B 群菌株的药物敏感性比较具有对青霉素、氨苄青霉素以及氟喹诺酮类抗菌药物更高的敏感性, 多位点序列分型结果显示 X 菌株为 ST-5 克隆群, 两株 Y 群菌株为 ST-23 克隆群。**结论** X 群有可能是从 A 群菌株荚膜转换而来, Y 群菌株与国际高致病流行 ST 克隆群一致, 二者均有可能成为新的流脑流行群并引起暴发疫情, 需引起重视。

关键词: 流行性脑脊髓膜炎; 脑膜炎奈瑟球菌; 药物敏感性; 多位点序列分型

中图分类号: R512.3 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2021)11-1295-04 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2021.11.004

Etiological characteristics of strains from cases of epidemic cerebrospinal meningitis due to newly isolated *Neisseria meningitidis* serogroups X and Y in Hunan Province

XIA Xin, FANG Ming-li, QIN Di, HE Zi-xiang, GAO Li-dong, ZHAN Zhi-fei

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

Author contributions: XIA Xin and FANG Ming-li contributed equally to this paper

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

Abstract: **Objective** To understand the drug susceptibility and molecular typing characteristics of strains from cases of epidemic cerebrospinal meningitis due to newly isolated *Neisseria meningitidis* serogroups X and Y in Hunan Province from 2019 to 2020. **Methods** Blood and cerebrospinal fluid specimens were collected from patients with epidemic cerebrospinal meningitis. Serogroups X and Y were identified and detected by culture and isolation, serological groups and susceptibility testing, multi-locus

基金项目: 国家科技重大专项 (2018ZX10713003-002-008) 湖南省细菌性传染病病原谱流行规律及变异研究

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

通信作者: 湛志飞, E-mail: 190776969@qq.com。

- [6] Campo M, Darragh AR. Work-related musculoskeletal disorders are associated with impaired presenteeism in allied health care professionals[J]. J Occup Environ Med, 2012, 54(1): 64-70.
- [7] 孙雪梅, 薛巧云, 葛华. 新疆某铜镍矿矿工职业紧张与肌肉骨骼疾患现状及其关系研究[J]. 职业与健康, 2020, 36(4): 449-452.
- [8] 韩凤, 王东升, 邹建芳, 等. 煤矿工人职业紧张与职业性肌肉骨骼疾患相关性研究[J]. 中国职业医学, 2018, 45(2): 188-193.
- [9] Siegrist J, Wege N, Puhhofer F, et al. A short generic measurer of work stress in the era of globalization: effort-reward imbalance[J]. Int Arch Occ Environ Health, 2009, 82(8): 1005-1013.
- [10] 汪向东, 王希林, 马弘. 心理卫生评定量表手册[M]. 北京: 中国心理卫生杂志社, 1999: 31-35.
- [11] 杨磊, VH. Hildebrandt, 余善法, 等. 肌肉骨骼疾患调查表介绍附调查表[J]. 工业卫生与职业病, 2009, 35(1): 25-31.
- [12] 何鼎盛. 新疆煤矿工人职业倦怠与肌肉骨骼疾患的流行病学调查及相关因素分析[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2017.
- [13] 曹贤文, 廖雍玲, 杨金星. 某小型煤矿开采项目职业危害评价分析[J]. 实用预防医学, 2014, 21(5): 575-576, 620.
- [14] 孙雪梅. 煤矿工人心理健康与肌肉骨骼疾患的关系及基因-环境交互作用研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2020.
- [15] 伊然. 发改委批准新疆大型煤炭基地建设规划[J]. 工程机械, 2015, 46(2): 63.
- [16] 姚健, 肖雨晴, 米力吾叶提·努尔兰, 等. 491 名煤矿工人职业紧张与心理健康的调查研究[J]. 新疆医科大学学报, 2020, 43(5): 659-663.
- [17] 雷蕾, 李玉娟, 刘兴琴, 等. 泸州市某医院护理人员职业性肌肉骨骼疾患现状及影响因素分析[J]. 工业卫生与职业病, 2019, 45(1): 27-30.
- [18] Thompson BJ, Stock MS, Banuelas VK, et al. The impact of a rigorous multiple work shift schedule and day versus night shift work on reaction time and balance performance in female nurses: a repeated measures study[J]. J Occup Environ Med, 2016, 58(7): 737-743.
- [19] 李富业, 何鼎盛, 王艳, 等. 新疆煤矿工人职业性肌肉骨骼疾患的危险因素分析[J]. 新疆医科大学学报, 2017, 40(10): 1349-1353.
- [20] 王雪涛, 别凤赛, 李晓光, 等. 煤矿作业工人肌肉骨骼疾患及其相关因素的调查与研究[J]. 中国工业医学杂志, 2020, 33(3): 211-216.

收稿日期: 2021-01-24

sequence typing (MLST). **Results** Serogroups X and Y strains were all sensitive to penicillin, ampicillin, minocycline, ceftriaxone, cefotaxime, chloramphenicol, azithromycin, meropenem and rifampicin in drug susceptibility test, but resistant to cotrimoxazole. Compared with serogroup B strains, the new strains were more sensitive to penicillin, ampicillin and fluoroquinolones. MLST results showed that strain X was the clone group of ST-5, and two strains of strain Y were the clone group of ST-23. **Conclusion** Serogroup X may be converted from serogroup A, while serogroup Y is consistent with the international highly pathogenic ST clone group. Both of them may become new epidemic serogroups and cause epidemic cerebrospinal meningitis outbreaks, which should be paid attention to.

Keywords: epidemic cerebrospinal meningitis; *Neisseria meningitidis*; drug sensitivity; multi-locus sequence typing

流行性脑脊髓膜炎(简称流脑)是一种细菌性疫苗可预防疾病。病原菌为脑膜炎奈瑟菌,人类是唯一宿主,健康人群携带率 1%~10%,流行区可高达 30%。病原菌可由鼻咽部侵入血循环,形成败血症,最后局限于脑膜及脊髓膜,形成化脓性脑脊髓膜病变,病死率高。由于流脑疫苗的普及,发病率下降明显,然而,即使在有疫苗可以预防、并且有抗生素可以治疗的条件下,流脑仍有超过 10%的病死率和 30%的高致残率,其疾病负担在传染病谱中位于前列,不容小觑。

新中国成立以来到 20 世纪 70 年代末,湖南省流脑共出现三次流行高峰,流行群别均为 A 群,1980 年后,全省开始使用并推广 A 群流脑疫苗,A 群流脑疫情得到了有效控制。但 C 群流脑病例时有发生,C 群菌株也逐渐取代了 A 群,成为本省的优势菌株。2008 年国家实行扩大免疫规划,将 A+C 群流脑疫苗纳入免疫规划,在疫苗的选择性压力下,C 群流脑病例呈现下降趋势,W135 群流脑菌株引起的病例开始抬头,此外 B 群流脑病例由于暂时没有疫苗可预防,也时有发生。随着四价(A+C+Y+W135)流脑疫苗的进一步推广,潜伏在人群中的流脑菌群又在悄然变迁,2019 年 3 月—2020 年 2 月,相继出现了本省的首例 X 群和 Y 群流脑病例,并从罹患病人的脑脊液和血液里分离到了三个病例菌株,为进一步了解本省出现的新型流脑病原学特征,现将 3 株菌株的实验室分析结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 菌株资料 病例菌株来自 2019 年 3 月—2020 年 2 月间新发流行性脑脊髓膜炎病人脑脊液和血液中分离的菌株 3 株。编号 2019B10 为 X 群脑膜炎奈瑟菌菌株,分离自某男,13 岁,湖南长沙市人,学生,2019 年 3 月发病,体温最高 40.1 ℃,于脑脊液中分离到脑膜炎奈瑟菌菌株;编号为 2019B22 的为 Y 群脑膜炎奈瑟菌菌株,分离自某男,9 岁,湖南永州市人,学生,2019 年 5 月发病,体温最高 38.8 ℃,于血液中分离出脑膜炎奈瑟菌;编号为 2020B02 为 Y 群脑膜炎奈

瑟菌菌株,病人某男,45 岁,湖南岳阳市人,农民,2020 年 2 月发病,体温最高 39.0 ℃,于脑脊液中分离到脑膜炎奈瑟菌。健康人群监测分离菌株来自 2019 年末从健康人群的流脑带菌率调查监测中分离到的 14 株 B 群流脑菌株。

1.2 生化及血清学鉴定 将疑似菌落接种到巧克力平皿,5%~10%CO₂,37 ℃培养过夜,VITEK 2 NH 生化鉴定卡鉴定。使用 Remel Europe Ltd 生产的脑膜炎奈瑟菌诊断血清进行凝集分群,达到“++”以上,则报凝集试验阳性。

1.3 药敏试验 采用 K-B 纸片法和 E-test 试条法进行 12 种抗菌药物敏感性试验,将脑膜炎奈瑟菌分纯新鲜菌株调到 0.5 麦氏单位浊度后,均匀涂布于 MH 血琼脂,将药敏纸片或者 E-test 试条贴其表面,置 5%~10% CO₂,放温箱 37 ℃培养 18~24 h,根据 2018 年 CLSI 标准判定药敏结果。药敏纸片共 10 种:美罗培南、米诺环素、头孢曲松、头孢噻肟、环丙沙星、氯霉素、阿奇霉素、利福平、复方磺胺甲噁唑、左氧氟沙星,购自 Oxoid 公司;E-test 试纸条共 2 种:青霉素和氨苄青霉素购自生物梅里埃公司。

1.4 多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)试验 按中国疾病预防控制中心传染病所呼吸道实验室的脑膜炎奈瑟菌 MLST 技术的操作标准方案,将脑膜炎奈瑟菌的 7 个管家基因,即 abcZ(ABC 转运子)、adk(腺苷酸激酶)、aroE(莽草酸脱氢酶)、fumC(延胡索酸酶)、gdh(葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)、pdhC(丙酮酸脱氢酶亚单位)和 pgm(磷酸葡萄糖变位酶)分别用一对引物进行扩增,再用相对应的测序引物对 PCR 产物进行分别测序,测序完成后,将不同等位基因序列在 MLST 数据库,提交并检索比对,确定该菌的序列型(sequence typing, ST)。

1.4.1 MLST 进行 PCR 扩增 扩增 PCR 体系为 50 μl,引物终浓度为 1 μmol/L,dNTP 200 μmol/L,Taq 酶 2.5 U,上样模板 1 μl,反应条件为 94 ℃ 2 min;94 ℃ 1 min,56 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min 共计 29 个循环;72 ℃ 2 min 结束,PCR 扩增引物序列见表 1。

表 1 脑膜炎奈瑟菌 MLST 分型 PCR 扩增引物序列

引物名称	引物序列 5'-3'
abcZ-P1C	TGTTCCGCTTCGACTGCCAAC
abcZ-P2C	TCCCCGTCGTAAAAACAATC
adk-P1B	CCAAGCCGTGTAGAATCGTAAACC
adk-P2B	TGCCCAATGCGCCCAATAC
aroE-P1B	TTTGAACAGCGGGTTGCGG
aroE-P2B	CAGCGGTAATCCAGTCCGAC
fumC-P1B	TCCCCGCCGTAAAAAGCCCTG
fumC-P2B	GCCCGTCAGCAAGCCCAAC
gdh-P1B	CTGCCCGCGGGTTTTCATCT
gdh-P2B	TGTTGCGCGTTATTTCAAAAGAAGG
pdhC-P1B	CCGGCCGTACGACGCTGAAC
pdhC-P2B	GATGTCGGAATGGGGCAAACA
pgm-P1	CTTCAAAGCCTACGACATCCG
pgm-P2	CGGATTGCTTTCGATCAGCGC

1.4.2 MLST 的 PCR 产物的测序和 ST 型别确定 扩增产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳验证,产物片段大小应在 700~1 400 bp 之间,产物经纯化后,交测序公司进行双通道序列测定,扩增片段测序完成后,使用 DNASTAR 软件进行序列碱基比对和序列拼接,将各等位基因序列在 MLST 数据库中提交,检索并比对,根据数据库提供的每种等位基因的序列号,确定 7 个管家基因的组合,即为其对应的 ST 型。测序引物序列见表 2。

表 2 脑膜炎奈瑟菌 MLST 分型测序引物序列

引物名称	引物序列 5'-3'
abcZ-S1A	AATCGTTTATGTACCCGAGR
abcZ-S2	GAGAACGAGCCGGGATAGGA
adk-S1A	AGGCWGGCAGCCCTTGG
adk-S2	CAATACTTCGGCTTTCACGG
aroE-S1A	GCGGTC AAYACGCTGR TK
aroE-S2	ATGATGTTGCCGTACACATA
fumC-S1	TCCGGCTTGCCGTTTGTAC
fumC-S2	TTGTAGGCGGTTTTCGGCAG
gdh-S3	CCTTGCCAAAGAAAAGCCTGC
gdh-S4C	RCGCACGGATTCATRYGG
pdhC-S1	TCTACTACATCACCCGTGATG
pdhC-S2	ATCGGCTTGTATGCCGTAITTT
pgm-S1	CGGCGATGCCGACCGCTTGG
pgm-S2A	GGTGATGATTTCCGGTYGCRCC

2 结果

2.1 生化及血清学结果 将巧克力双抗平板上生长的灰白不透明,圆形湿润光滑的单个疑似菌落进一步分纯过夜培养后,按照试剂说明接种到生物梅里埃 VITEK 2 配套的 NH 鉴定卡上后,上机培养孵育,约 4~6 h 后,生化结果显示为鉴定度很好的脑膜炎奈瑟菌菌株,生理盐水对照阴性,血清凝集反应后示 3 株菌均为脑膜炎奈瑟菌多价阳性,一株为 X 群单价因子血清阳性;2 株为 Y 群单价因子血清阳性。

2.2 药敏结果 X 群脑膜炎奈瑟菌对左氧氟沙星、环丙沙星及复方新诺明耐药外,其余均敏感,而两株 Y

群脑膜炎奈瑟菌,仅对复方新诺明耐药,对左氧氟沙星和环丙沙星为敏感或中介,其余均敏感,见表 3。14 株 B 群流脑菌株的药敏结果见表 4。

表 3 X 群脑膜炎奈瑟菌和 Y 群脑膜炎奈瑟菌对 12 种抗生素的药物敏感性结果

抗菌药物	X 群脑膜炎奈瑟菌	Y 群脑膜炎奈瑟菌
青霉素	敏感	敏感
氨苄青霉素	敏感	敏感
头孢曲松	敏感	敏感
头孢噻肟	敏感	敏感
美罗培南	敏感	敏感
氯霉素	敏感	敏感
左氧氟沙星	耐药	敏感/中介
环丙沙星	耐药	敏感/中介
米诺环素	敏感	敏感
利福平	敏感	敏感
阿奇霉素	敏感	敏感
复方磺胺甲噁唑	耐药	耐药

表 4 14 株 B 群脑膜炎奈瑟菌和抗生素的药物敏感率结果

抗菌药物	敏感 (%)	中介 (%)	耐药 (%)
青霉素	12(85.71)	1(7.14)	1(7.14)
氨苄青霉素	12(85.71)	2(14.29)	0(0.00)
头孢曲松	14(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
头孢噻肟	14(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
美罗培南	14(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
氯霉素	14(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
左氧氟沙星	4(28.57)	6(42.86)	4(28.57)
环丙沙星	4(28.57)	5(35.71)	5(35.71)
米诺环素	14(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
利福平	14(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
阿奇霉素	14(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
复方磺胺甲噁唑	0(0.00)	0(0.00)	14(100.00)

2.3 MLST 试验结果 对 3 株脑膜炎奈瑟菌菌株的 7 个管家基因扩增后测序,经 PubMLST 比对后发现 7 个基因位点的等位基因数值相对应的等位基因谱分别为 ST T 型和 ST1655 型,分属于 ST-5 和 ST-23 克隆群,见表 5。

表 5 3 株脑膜炎奈瑟菌的 MLST 分析结果

编号	血清群	基因测序比对结果							ST 型	ST 克隆群
		abcZ	adk	aroE	fumC	gdh	pdhC	pgm		
2019B10	X 群	1	1	2	1	3	2	19	7	ST-5 complex
2019B22	Y 群	12	5	18	9	11	9	17	1 655	ST-23 complex
2020B02	Y 群	12	5	18	9	11	9	17	1 655	ST-23 complex

3 讨论

流脑在全球范围内都时有发生,本省现行推广的免疫规划疫苗为 A 群流脑多糖疫苗、AC 群计划内免

疫为流脑 A+C 群多糖疫苗,收费推广的是 A+C+Y+W 群结合疫苗,流脑多糖疫苗,非免疫规划疫苗主要为 AC 群流脑多糖结合疫苗、ACYW135 群流脑多糖疫苗,B 群和 X 群暂时没有预防的疫苗,由于收费接种的原因,多价流脑疫苗普及性不高,故本省接连出现了 2 例 Y 群流脑病例,且第二例为成人感染病例,确实应引起重视。2000 年前,我国流脑流行以 A 群为主,2003 年,安徽出现了首例 C 群流脑暴发流行,2000 年的麦加朝圣引起了 W135 群流脑在全球的传播,本省也于 2012 年首次从病人和健康人群中分离到了 W135 群流脑菌株,Y 群菌株于 90 年代在美国出现,其他国家和地区较为少见,X 群菌株在非洲有小规模的暴发。

本次从病人身上分离到的 X 群和 Y 群流脑菌株,均为湖南省首发,近年来的流脑病例分离菌株以 B、C、W 群多见,健康人群带菌调查则以 B 群为主。研究组收集了 2019 年年底的健康人群带菌率调查中分离的 14 株 B 群脑膜炎奈瑟菌,与本次新发 X、Y 群流脑病例菌株同时做了药物敏感性试验,发现病例 X 菌株对左氧氟沙星、环丙沙星和复方新诺明耐药,其余敏感,而 Y 群菌株仅对复方新诺明耐药,对其余抗菌药物均为中介或敏感。而与 B 群流脑菌株比较,其对复方新诺明耐药率 100.00%,对左氧氟沙星、环丙沙星的耐药率分别为 28.57% 和 35.71%,而青霉素和氨苄青霉素的敏感率均仅为 85.71%,较之新发的 X、Y 群菌株,则依然保持了对该类药物的敏感性,提示在临床使用抗菌药物的选择性压力下,促使常见菌株对青霉素类药物的耐药。本省对脑膜炎奈瑟菌历年来的监测,其药敏结果主要为:对磺胺类药物耐药极高,对氟喹诺酮类抗菌药物部分耐药,对其余青霉素、头孢、碳青霉烯等抗生素较敏感^[1-2],本次结果基本与往年一致。

脑膜炎奈瑟菌的分群通常是基于荚膜多糖来进行的,荚膜多糖也是疫苗研制的基础。但是通过基因水平转移,不同血清群菌株可频繁发生荚膜转换,从而产生免疫逃逸,致使现有疫苗免疫失去效力。为了准确找到其分子流行病学特征,探讨荚膜是否会在疫苗的选择性压力下进行转换,利用 MLST 技术分析是行之有效的,它通过测定 7 个管家基因的碱基序列,并生成与其管家基因位点的等位基因数值对应的等位基因图谱,特定的等位基因谱则被视为一个 ST,以此对该菌株进行分型,具有相同或相似的等位基因谱的菌株,可以认为它们是来自于同一个克隆系具有一定的亲缘关系。目前在全球引起流脑的菌株基因型主要为:A 群(ST-5,ST-7)、B(ST-41/44,ST-32,ST-18,ST-269,

ST-8,ST-35)、C(ST-11)、Y(ST-23,ST-167)、W-135(ST-11)和 X(ST-181)^[3],本研究中,X 群脑膜炎奈瑟菌的 MLST 分型结果为 ST-5 群,而 Y 群脑膜炎奈瑟菌的 MLST 分型结果为 ST-23 群,可见 Y 群脑膜炎奈瑟菌的 ST 型与全球六个主要的高致病性流脑流行序列群之一的 Y 群(ST-23,ST-167)的高致病克隆系一致,而 X 群脑膜炎奈瑟菌的 ST 型与全球流行的 X 群(ST-181)不一致,反而与 A 群(ST-5)一致,20 世纪 60 年代,我国流脑流行的主要型别就是 A 群的 ST-5 型^[4],且该菌与国际上流行的 X 群 ST 型别不同,极有可能是我国独有的,并且可能是从 A 群菌株通过荚膜转换变成 X 群^[5-6]。2007 年,我国北京发现了国内首例 X 群流脑病例^[7],2013 年浙江发现我国第二例 X 群流脑病例^[8]。而 Y 群的病例在我国来讲相对更少见,天津 2015 年报道过发现一例^[9],Y 群菌株的 ST 型别与国际上流行的高致病克隆群一致,且以前我国 Y 群流脑病例一直较为罕见,故表明我国现在流行 Y 群菌株有可能是从国外传入本土并开始流行的。基于荚膜多糖疫苗给流行菌株带来的荚膜转换形势不容小觑,如何尽快研发出 X 群和 B 群疫苗,已成为防控流脑的最新挑战。

参考文献

- [1] 夏昕,湛志飞,张红,等. 脑膜炎奈瑟菌病原学及药物敏感性分析[J]. 中国感染控制杂志,2010,9(3): 173-175.
- [2] 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]. 中国公共卫生杂志,2011,27(12): 1568-1569.
- [3] Chang Q, Tzeng YL, Stephens DS. Meningococcal disease: changes in epidemiology and prevention[J]. Clin Epidemiol,2012,4: 237-245.
- [4] 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.
- [5] Zhu B, Yao P,Zhang L,et al. Genetic analysis of *Neisseria meningitidis* sequence type 7 serogroup X originating from serogroup A[J]. Infect Immun, 2017,85(6):e01019.
- [6] Ji X,Yao PP,Zhang LY,et al. Capsule switching of *Neisseria meningitidis* sequence type 7 serogroup A to serogroup X[J]. J Infect, 2017,75(6):521-531.
- [7] Chen C,Zhang TG,He JG,et al. A first meningococcal meningitis case caused by serogroup X *Neisseria meningitidis* strains in China[J]. Chin Med J (Engl), 2008,121(7):664-666.
- [8] 张恒,潘金仁,姚莘莘,等. 浙江省首例 X 群流行性脑脊髓膜炎病例调查分析[J]. 中华预防医学杂志,2015,49(6): 579-580.
- [9] 郭立春,刘晓川,徐庆杨,等. 天津市首例 Y 群流行性脑脊髓膜炎病例流行病学调查[J]. 中华预防医学杂志,2016,50(9): 825-827.