

不可分群脑膜炎奈瑟菌 PCR 基因分型研究

张艳亭¹, 徐丽², 高源², 杨慧芳¹, 刘宝莲¹, 芦晶¹, 李海清¹

摘要: **目的** 对自健康人群鼻咽拭子中分离的 74 株表型特征为不可分群的脑膜炎奈瑟菌, 利用 PCR 基因分型技术进行基因特征分析。**方法** 用 PCR 方法扩增脑膜炎奈瑟菌种属特异性基因 *crgA* 和 A、B、C、W₁₃₅、Y、Z、X 以及 29E 不同群的特异性基因片段, 确定不同菌株的基因型。**结果** 以脑膜炎奈瑟菌 *crgA* 基因为靶基因进行 PCR 扩增, 74 株不可分群脑膜炎奈瑟菌中, 66 株脑膜炎奈瑟菌 *crgA* 基因扩增阳性, 检出率 89.19%。66 株菌株进行不同血清群的 PCR 分群鉴定, 40 株菌株 (60.61%) 可检测为不同的血清群基因型, B 群 27 株, 29E 群 7 株, X、Y 群各 2 株, C、W₁₃₅ 各 1 株。**结论** 不可分群脑膜炎奈瑟菌进行 PCR 基因分型研究对脑膜炎奈瑟菌的研究具有重要的流行病学意义。

关键词: 不可分群; 脑膜炎奈瑟菌; PCR

中图分类号: R515.2

文献标识码: A

文章编号: 1003-9961(2009)10-0779-03

PCR genotyping of ungroupable *Neisseria meningitidis* ZHANG Yan-ting*, XU Li, GAO Yuan, YANG Hui-fang, LIU Bao-lian, LU Jing, LI Hai-qing. *Yangquan Municipal Center for Disease Control and Prevention, Yangquan 045000, Shanxi, China

Corresponding author: HUANG Jian-shi, Email: YQJKWJK@163.COM

Abstract: **Objective** PCR genotyping analysis of the genetic characteristics of 74 phenotypically ungroupable *Neisseria meningitidis* derived from the nose and throat swabs among healthy population was conducted. **Methods** PCR amplification of *Neisseria meningitidis* genus-specific genes, *crgA* and A, B, C, W₁₃₅, Y, Z, X, as well as 29E of specific gene fragments of different groups, was performed to identify the genotypes of different strains. **Results** PCR amplification based on *Neisseria meningitidis* *crgA* as the target gene revealed 66 *crgA*-positive *Neisseria meningitidis* out of 74 ungroupable strains, the detection rate being 89.19%. PCR serogroup identification suggested 40 strains (60.61%) of different serogroups of genotypes among the 66 strains, including 27 strains of B group, seven of 29E group, two of X and Y each, and one of C and W₁₃₅ each. **Conclusion** PCR genotyping analysis of ungroupable *Neisseria meningitidis* exerted a significant epidemiologic impact on the study of *Neisseria meningitidis*.

Key words: ungroupable; *Neisseria meningitidis*; polymerase chain reaction

脑膜炎奈瑟菌 (*Neisseria meningitidis*, Nm) 是流行性脑脊髓膜炎的病原菌。根据群特异性荚膜多糖的不同, Nm 分成 13 个血清群。中国已发现 Nm 有 11 个血清群, 即 A、B、C、D、Y、W₁₃₅、29E、X、I、K、H 群, 另外由于分离条件及传统鉴定方法的局限性, 仍有大量表型特征为 Nm 的菌株无法进行分型, 大多归类为不可分群 Nm。为了解阳泉市健康人群 Nm 带菌状况, 于 2008 年 4-6 月采集 980 份健康人群鼻咽拭子进行 Nm 分离培养, 根据传统表型特征鉴定出 74 株不可分群 Nm, 为进一步确认此 74 株不可分群 Nm 变异前的血清群, 为流行病学研究和实验室诊断提供科学依据。因此, 对本实验室保存的 74 株不可分群 Nm 菌株进行了种属和部分常见

血清群分群 (A、B、C、Y、W₁₃₅、29E、X、Z 群) PCR 分析研究, 现将结果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 菌株 自健康人群鼻咽拭子中分离到的表型特征为细菌形态和生化反应符合的 Nm, 但血清学鉴定时出现异常现象: (1) 生理盐水自凝; (2) 与生理盐水和血清均不凝集; (3) 生理盐水不凝集, 但是与所有多价血清均凝集; (4) 生理盐水不凝集, 可与某一个多价血清凝集, 并且包括的因子血清都凝集或其中部分因子血清凝集, 因而不能用血清学分群的 Nm 74 株。使用 QIAamp DNA Mini Kit 基因组提取试剂盒, 提取 DNA 模板。

1.2 试剂和仪器 Taq DNA 聚合酶、脱氧核糖核苷酸 (dNTPs) 和 100 bp Ladder Marker 购于 TaKaRa 生物工程公司; 琼脂糖为 Gene Tech 公司产品; GHV-1 染料为赛百盛公司产品; BioTeke2X PCR 预混液为百泰克公司产品; PCR 引物由赛百

作者单位: 1. 山西省阳泉市疾病预防控制中心, 山西 阳泉 045000;

2. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所

作者简介: 张艳亭, 女, 山西省阳泉市人, 主要从事微生物检验工作

通信作者: 张艳亭, Tel: 0353-3306821, Email: YQJKWJK@163.COM

收稿日期: 2009-07-15

盛公司合成;DNA 提取试剂盒为德国 QIAGEN 公司产品。PCR 扩增仪为 Bio-RAD DNA Engine,凝胶成像仪为 Bio-RAD Gel Doc™ XR,稳压稳流电泳仪为 Dyy-8B 型。

1.3 寡聚核苷酸引物和 PCR 扩增体系和条件
crgA、*orf-2*、*siaD* 和 *ctrA* 基因的寡聚核苷酸引物见表 1。每个 PCR 反应体系总体积均为 25 μ l。A、B、C、W₁₃₅ 群扩增体系组成为:10 \times PCR 缓冲液(含 Mg²⁺ 15 mmol/L)2.5 μ l,上下游引物(终浓度 1 μ mol/L)各 1 μ l,4 种 dNTP 混合物 2 μ l(终浓度 200 μ mol/L),DNA 模板 1 μ l,Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ l)0.25 μ l,加灭菌超纯水补足 25 μ l。PCR 扩增条件:95 $^{\circ}$ C 4 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 45 s;30 个循环,72 $^{\circ}$ C 5 min。Y、29E、X、Z 群扩增体系组成为:Bioteke 2 \times PCR 预混液 10 μ l,上下游引物(终浓度 0.2 μ mol/L)各 2.5 μ l, DNA 模板 1 μ l,Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ l)0.25 μ l,加灭菌超纯水补足 25 μ l。PCR 扩增条件:Y 群为 95 $^{\circ}$ C 4 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 45 s;35 个循环,72 $^{\circ}$ C 5 min;29 E、X、Y 群为:95 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,62.5 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 30 s;35 个循环,72 $^{\circ}$ C 5 min。

表 1 实验中所用引物名称及序列
Table 1 Primers and sequence

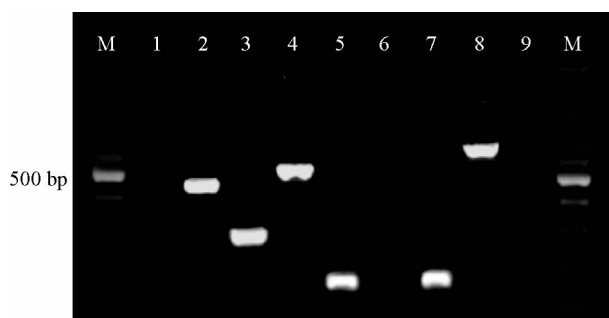
引物名称	引物序列(5'~3')	鉴定特性	产物片段(bp)
<i>crgA</i>	GCT GGC GCC GCT GGC AAC AAA ATT C	<i>Nm</i> 种属	230
	CTT CTG EAG ATT GCG GCG TGC CGT		
<i>orf-2</i>	CGC AAT AGG TGT ATA TAT TCT TCC	<i>NmA</i> 群	400
	CGT AAT AGT TTC GTA TGC CTT CTT		
<i>siaD</i> (B)	GGA TCA TTT CAG TGT TTT CCA CCA	<i>NmB</i> 群	450
	GCA TGC TGG AGG AAT AAG CAT TAA		
<i>siaD</i> (C)	TCA AAT GAG TTT GCG AAT AGA AGG T	<i>NmC</i> 群	250
	CAA TCA CGA TTT GCC CAA TTG AC		
<i>siaD</i> (Y)	CTC AAA GCG AAG GCT TTG GTT	<i>NmY</i> 群	120
	CTG AAG CGT TTT CAT TAT AAT TGC TAA		
<i>siaD</i> (W ₁₃₅)	CAG AAA GTG AGG GAT TTC CAT A	<i>NmW₁₃₅</i> 群	120
	CAC AAC CAT TTT CAT TAT AGT TAC TGT		
<i>ctrA</i> (29E)	ATT ACG CTG ACG GCA TGT GGA	<i>Nm29E</i> 群	667
	TTG TCG CGG ATT TGC AAC TA		
<i>ctrA</i> (X)	GTC TTT GTA TAA GGC CCA AG	<i>NmX</i> 群	525
	TTG TCG CGG ATT TGC AAC TA		
<i>ctrA</i> (Z)	TAT GCG GTG CGT TTC GCT ATG	<i>NmZ</i> 群	667
	TTG TCG CGG ATT TGC AAC TA		

1.4 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物 取 3 μ l PCR 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶(含 5 μ l/100 ml GHV-1 染料)电泳(0.5 \times TBE,6 V/cm,60 min),100 bp DNA Ladder Marker 为分子质量标准,凝胶成像分析仪下观察并照像。

2 结果

2.1 *Nm* 种属鉴定 74 株不可分群 *Nm* 中有 66 株均扩增出 *crgA* 基因特异性片段,用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物得到 230 bp 的阳性条带,其余 8 株和阴性对照扩增皆阴性。

2.2 *Nm* 分群鉴定 66 株 *Nm* 中有 27 株扩增出 *siaD*(B) 基因特异性片段,得到 450 bp 阳性条带(B 群);1 株扩增出 *siaD*(C) 基因特异性片段,得到 250 bp 阳性条带(C 群);2 株扩增出 *ctrA*(X) 基因特异性片段,得到 525 bp 阳性条带(X 群);2 株扩增出 *siaD*(y) 基因特异性片段,得到 120 bp 阳性条带(Y 群);1 株扩增出 *siaD*(W₁₃₅) 基因特异性片段,得到 120 bp 阳性条带(W₁₃₅群);7 株扩增出 *ctrA*(29E) 基因特异性片段,得到 667 bp 阳性条带(29E 群);A、Z 群均未扩增出相应特异性基因片段;剩余 26 株 *Nm* 和阴性对照皆阴性。见图 1。



M;100 bp DNA Ladder Marker; 1~8:为血清群 A、B、C、X、Y、Z、W₁₃₅ 和 29E; 9:阴性对照

图 1 *Nm* 分群 PCR 扩增产物电泳图
Figure 1 Electrophoresis of PCR amplification products in *Nm* grouping

3 讨论

近年来随着抗生素压力和疫苗使用,用传统表型特征鉴定到的 *Nm*,变异菌株占到的比例大,数量多。本次 74 株自 980 例健康人群鼻咽拭子中分离培养,用传统表型特征鉴定为不可分群 *Nm* 菌株中,确定 *Nm* 66 株,阳性检出率 89.19%。结果提示,在检测工作中,不可忽视不可分群 *Nm* 的检出。由于细菌变异增加了检测难度,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*,但是出现生理盐水自凝;与生理盐水和血清均不凝集;生理盐水不凝集,但是与所有多价血清均凝集;生理盐水不凝集,可与某一个多价血清凝集,并且包括的因子血清都凝集或其中部分因子血清凝集时,往往不判定为 *Nm*,这样就直接影响到检测质量。用 PCR

方法进行种属和分群分析研究,进一步验证了对不可分群 *Nm* 认识的必要性。种属鉴定结果表明,阳泉市健康人群中仅不可分群 *Nm* 带菌率就达 6.74%,明显高于国内^[1]报道健康人群 *Nm* 带菌率较高的 5.17%,山西省^[2]健康人群 *Nm* 带菌率为 1.17%,本次不可分群 *Nm* 带菌率高达山西省^[5] *Nm* 带菌率 5.76 倍,可见山西省乃至全国健康人群 *Nm* 带菌率偏低其原因与血清群变异有关,因此应加强对不可分群 *Nm* 的检测工作。

分群结果显示:对 66 株 *Nm*,进行了 8 个血清群的鉴定,确认血清群 40 株,分群率 60.61%。其中 B 群 27 株,29E 群 7 株,X、Y 群分别 2 株,C、W₁₃₅ 各 1 株,未检出 A、Z 群,还有 26 株 *Nm* 未分到具体群。表明阳泉市来源于健康人群的不可分群 *Nm*,细菌变异前血清群分布特点,以 B 群变异为最多,占 67.50% (27/40),29E 群占居第二位 17.50% (7/40),X、Y 群为第 3 位,分别占 5.00% (2/40),C、W₁₃₅ 群第 4 位,分别占 2.50% (1/40),A、Z 群均未检出。本次确认血清群 40 株 *Nm* 中血清群分布于 B 群、29E 群、X 群、Y 群、C 群、W₁₃₅ 群,增加了山西省^[4]健康人群中携带 *Nm* 的血清群资料,但是未检出 A 群 *Nm* 是否说明健康人群中 A 群 *Nm* 变异极微,26 株未分到具体群的 *Nm* 其血清群是否在已肯定中国 *Nm* 的 D、I、K、H 血清群范围内,或者可能为其他新的血清群(除 Z 群外),待进一步鉴定确认。

在全世界的流行性脑脊髓膜炎(流脑)流行中尚有 1% ~ 5% 的菌株还无法分群,中国 21 世纪 PCR 技术在流脑监测中应用^[5],现中国疾病预防控制中心传染病预防控制所做 8 个血清群的分群鉴定,PCR 方法灵敏度高,特异性强,对不可分群 *Nm* PCR 分析研究,不仅能进一步确定 *Nm*,而且能确认

血清群,从而了解变异前血清群分布特点,提供健康人群中不可分群 *Nm* 带菌状况资料,完善流脑病原菌监测内容,保证其监测质量,对流行病学研究和实验室诊断有着极其重要意义,目前对健康人群不可分群 *Nm* 进行种属和分群(A、B、C、Y、W₁₃₅、29E、X、Z 群)PCR 分析研究在国内尚未见报道。

参考文献

- [1] Zhang L, Shao ZJ, Xu L, Polymerase Chain Reaction assay to identify *Neisseria meningitidis* serogroup A, B, C, Y and W135 [J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2006, 27(5): 399-401. (in Chinese)
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.
- [2] Xu L, Zhu BQ, Gao Y, et al. Establishment and application of PCR assay to identify *Neisseria meningitidis* serogroup 29E, X and Z [J]. Disease Surveillance, 2009, 24(4): 280-282. (in Chinese)
徐丽,朱兵清,高原,等. 鉴别 29E 群、X 群和 Z 群脑膜炎奈瑟菌聚合酶链反应方法的建立及应用[J]. 疾病监测, 2009, 24(4): 280-282.
- [3] Qiao FJ, Ren LZ, Wang H, et al. Study on application of PCR technique in surveillance of Meningococcal meningitis [J]. Chinese Journal of Public Health Engineering, 2008, 7(4): 198-199. (in Chinese)
乔凤娟,任林柱,王会,等. PCR 技术在流脑监测中的应用研究[J]. 中国卫生工程学杂志, 2008, 7(4): 198-199.
- [4] Guo F, Liu XH, Jiang B, et al. Surveillance of Meningococcal meningitis in healthy population in Suizhou, 2001-2006 [J]. Chinese Journal of Disease Control & Prevention, 2007, 11(5): 482-484. (in Chinese)
郭芳,刘晓辉,蒋冰,等. 随州市 2001-2006 年健康人群流行性脑脊髓膜炎监测结果分析[J]. 中华疾病控制杂志, 2007, 11(5): 482-484.
- [5] Li GH, Gao XF, Zhang QX, et al. Survey on carriage of *Neisseria meningitidis* in healthy population in Shanxi, 2005 [J]. Chinese Remedies and Clinics, 2006, 6(9): 696-696. (in Chinese)
李国华,高雪芬,张秋香,等. 山西省 2005 年健康人群流行性脑脊髓膜炎带菌状况调查分析[J]. 中国药物与临床杂志, 2006, 6(9): 696-696.