

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2018.05.002

· 论 著 ·

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

夏 昕¹, 周海健², 湛志飞¹, 覃 迪¹, 贺子翔¹, 蔡 亮¹, 高立冬¹, 戴德芳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)

[摘要] **目的** 了解湖南省 C 群和 W135 群脑膜炎奈瑟菌的流行病学及病原学特征。**方法** 收集 2006—2016 年湖南省流行性脑脊髓膜炎患者的血液或脑脊液、患者密切接触者以及健康人群的咽拭子标本中分离到的脑膜炎奈瑟菌菌株, 进行生化检测、血清学分群。选取其中的 C 群和 W135 群部分菌株进行药敏试验, 并采用脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型以及多位点序列分型(MLST)方法对菌株进行分子分型, 分析其流行病学特征。**结果** 经生化和血清学确认后, 选取 22 株 C 群脑膜炎奈瑟菌和 9 株 W135 群脑膜炎奈瑟菌进行药敏试验, 结果显示对大部分检测抗菌药物全部敏感, 但对复方磺胺甲噁唑 C 群菌株全部耐药, 而 W135 群菌株的耐药率为 55.56%, 两者比较差异有统计学意义($\chi^2 = 7.61, P = 0.006$)。经 PFGE 分型后, 22 株 C 群脑膜炎奈瑟菌共分为 5 种 PFGE 带型, 其中 5 株 HNC-01 带型和 13 株 HNC-02 带型属同一亚型; 2006 年湖南省第 1 例 C 群患者分离菌株的 PFGE 带型为 HNC-02, 与 2012、2013 年患者以及患者密切接触者分离菌株的图谱完全一致, 与带型为 HNC-01 的 2008、2010、2013 年的患者分离菌株仅有一个带型的差异, 均属于优势带型。9 株 W135 群脑膜炎奈瑟菌 PFGE 分型后共分为 2 个带型, 其中首例患者与 2013、2016 年患者分离菌株的带型一致, 均为 HNW-01 型。选取其中优势带型菌株经 MLST 后, 结果 C 群脑膜炎奈瑟菌为 ST4821 型, W135 群脑膜炎奈瑟菌为 ST11 型, 均属于脑膜炎奈瑟菌的高致病性克隆群。**结论** 湖南省 C 群流脑和 W135 群流脑自首例病例出现后, 各自都成为了该群病例的优势流行克隆群, C 群流脑近年有减少态势, 但出现了新的流行型别; W135 群自 2012 年起成为我省新的流脑流行株, 其优势菌株与国际上侵袭性的 W 群分型一致, 可能引起新的大流行, 应及时制定相应的防控政策。

[关键词] 流行性脑脊髓膜炎; 脑膜炎奈瑟球菌; 血清型; 脉冲场凝胶电泳分型; 多位点序列分型; 分子流行病学

[中图分类号] R512.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2018)05-0373-07

Epidemiological and etiological characteristics of serogroup C and serogroup W135 *Neisseria meningitidis* in Hunan Province

XIA Xin¹, ZHOU Hai-jian², ZHAN Zhi-fei¹, QIN Di¹, HE Zhi-xiang¹, CAI Liang¹, GAO Li-dong¹, DAI De-fang¹ (1 Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changsha 410005, China; 2 State Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

[Abstract] **Objective** To understand epidemiological and etiological characteristics of serogroup C and W135 *Neisseria meningitidis* (Nm) in Hunan Province. **Methods** Nm strains isolated from blood or cerebrospinal fluid of patients with epidemic cerebrospinal meningitis, as well as throat swab specimens of close contacts of patients and healthy people in Hunan Province from 2006 to 2016 were collected, strains were performed biochemical testing and serological grouping. Partial strains of serogroup C and serogroup W135 were selected to perform antimicrobial susceptibility testing, and perform genotyping by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence ty-

[收稿日期] 2017-06-23

[基金项目] 湖南省卫生厅科研基金课题(C2013-035)

[作者简介] 夏昕(1978-), 女(汉族), 江苏省盱眙县人, 副主任技师, 主要从事致病菌的分子分型研究。

[通信作者] 戴德芳 E-mail: defangdai1997@126.com

ping (MLST), epidemiological characteristics were analyzed. **Results** After being confirmed by biochemical and serological detection, 22 strains of serogroup C *Nm* and 9 strains of serogroup W135 *Nm* were selected to perform antimicrobial susceptibility testing, results showed that all strains were sensitive to most detected antimicrobial agents, but serogroup C *Nm* were all resistant to compound sulfamethoxazole, resistance rate of serogroup W135 *Nm* was 55.56%, difference was statistically significant ($\chi^2 = 7.61, P = 0.006$). After PFGE typing, 22 strains of serogroup C *Nm* were divided into 5 PFGE bands, HNC-01 band of 5 strains and HNC-02 band of 13 strains were of the same subtype; PFGE band of first isolated strain of serogroup C in Hunan Province in 2006 was HNC-02, which was identical with strains isolated from patients and close contacts of patients in 2012 and 2013, there was only one band that was different from band HNC-01 in strains isolated from patients in 2008, 2010, and 2013, all were dominant bands. 9 strains of serogroup W135 *Nm* were divided into 2 band patterns after PFGE typing, the strain from the first patient was the same type as the strains isolated from patients in 2013 and 2016, all were HNW-01 type. Dominant strains were selected for MLST, results showed that serogroup C *Nm* was ST4821 type, serogroup W135 was ST11 type, all were highly pathogenic clones of *Nm*. **Conclusion** After the first case of serogroup C and serogroup W135 epidemic meningitis appeared in Hunan Province, both became the dominant epidemic clone group of the disease, serogroup C *Nm* decreased in recent years, but new epidemic types have emerged. Serogroup W135 became new epidemic strain of epidemic cerebrospinal meningitis in this province since 2012, the dominant strain is consistent with the globally invasive serogroup W, which may cause a new pandemic, corresponding prevention and control policy should be formulated timely.

[Key words] epidemic cerebrospinal meningitis; *Neisseria meningitidis*; serotype; pulsed-field gel electrophoresis; multilocus sequence typing; molecular epidemiology

[Chin J Infect Control, 2018, 17(5): 373-379]

流行性脑脊髓膜炎(简称流脑)是由脑膜炎奈瑟菌引起的国家法定乙类传染病之一,尽管随着A+C群流脑疫苗的普及,流脑的发病率呈逐年下降趋势,但由于脑膜炎奈瑟菌菌株在疫苗的选择性压力下可导致人群中存在菌群和毒力的变迁,一旦发生血清群的转换,则又可能引起新的大流行,切不可放松警惕。在解放后全国A群流脑大流行的背景下,我省也发生过数次A群流脑的大流行,但自2006年后,便再未报道过A群流脑病例,甚至健康人群的带菌调查中,也未再发现A群流脑菌株的踪迹。健康人群带菌,近年来以一般不致病的不可分群流脑和偶可致病的B群流脑菌株多见,B群流脑多为散发,经试验后发现分子分型型别多样化,未见优势菌群^[1];但是,B群流脑因其荚膜不稳定而无有效的多糖疫苗,基于外膜蛋白核酸的疫苗,尚在积极的研发中^[2],随着现有流脑疫苗的普及应用,我省脑膜炎奈瑟菌的菌群也在悄然发生变迁,我省自2006年末首次报道发现C群流脑病例^[3],2012年首次报道发现W135群流脑病例后^[4],C群和W135群病例所占的比例有所上升,且近年来,从密切接触者与健康人群监测中,均分离到不少C群和W135群菌株。因此,现将我省近几年来从患者、患者密切接触者以及健康人群带菌调查中收集到的部分C群和W135群流脑菌株,对其进行药敏及脉冲场凝胶电泳

(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)分型以及多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST),以探讨其病原学遗传特性以及流行病学的相关性,其结果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 资料及菌株来源 资料来源于《湖南省疫情资料汇编》和中国疾病预防控制中心信息系统报告。菌株分离于2006—2016年湖南省内流脑患者、患者密切接触者以及健康人群带菌调查的标本。

1.1.2 主要试剂 12种抗菌药物:青霉素、氨苄西林、头孢噻肟、头孢曲松、美罗培南、米诺环素、氯霉素、阿奇霉素、利福平、环丙沙星、左氧氟沙星、复方磺胺甲噁唑均购自英国Oxoid公司;2种E-test药敏试条青霉素和氨苄西林及API NH鉴定卡则购自生物梅里埃公司;PFGE电泳琼脂糖SeaKem Gold Agarose购自Cambraex Bio Science Rockland公司;PCR试剂及限制性核酸内切酶Nhe I购自TaKaRa大连宝生物工程有限公司;消化用蛋白酶K购自MERCK公司,以上试剂均在有效期内使用。

1.2 方 法

1.2.1 生化和血清学鉴定 将上送的疑似脑膜炎

奈瑟菌菌株接种到巧克力平板上,置 5% CO₂,37℃ 温箱培养 24 h 后,再挑取单个菌落做进一步的分纯培养,然后取新鲜纯培养物按说明书接种到生物梅里埃公司的 API NH 生化鉴定试纸条上,37℃ 继续孵育 2.0~2.5 h,根据培养后的颜色变化记录生化结果,并根据编码读取鉴定结果。生化确认后,再将菌落用 Remel Europe Ltd 的脑膜炎奈瑟菌诊断血清做进一步的血清学分型,先用流脑多价血清进行凝集,再用因子血清分群,并记录结果,做血清凝集的同时用生理盐水做对照。

1.2.2 药敏试验 参考美国临床实验室标准化协会(CLSI,2013 版)推荐的指南,按照我国脑膜炎奈瑟菌监测方案推荐的 12 种抗菌药物,对青霉素和氨苄西林采用 E-test 试纸条法,其余 10 种抗菌药物采用 K-B 纸片法进行药敏试验,将脑膜炎奈瑟菌用生理盐水调节浊度为 0.5 麦氏单位后,均匀涂布于 5% 的脱纤维羊血 MH 琼脂,再将 K-B 药敏纸片或 E-test 药敏试纸条贴于血 MH 琼脂表面,静置片刻后,置 5%CO₂,37℃ 温箱培养 18~24 h 读取结果,最后根据 CLSI 的标准判定结果为敏感、中介或者耐药。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微生物实验室留存备用。

1.2.3 PFGE 分型 根据中国疾病预防控制中心 PulseNet China 网中心实验室发布的脑膜炎奈瑟菌脉冲场凝胶电泳(PFGE)标准操作方案(SOP)进行试验(<http://www.pulsenet-china.net/>)。将菌株用巧克力平板置 5% CO₂,37℃ 温箱培养 18~24 h,挑取菌落纯培养物均匀悬浮于 CSB 缓冲液中,用 1%SeaKem Gold 制备上样小胶块,用蛋白酶 K 裂解再洗涤后,脑膜炎奈瑟菌用 Nhe I 限制性内切酶进行酶切,Marker H9812 标准菌株用 Xba I 限制性内切酶酶切,37℃ 温浴约 3 h,再根据操作方案设置参数和条件,电泳 16 h。起始脉冲时间:1 s;终止脉冲时间:25 s;电压:6 V/cm;电泳温度:14℃,电泳完毕后用 Gelred 核酸染料染色约 25 min,最后用凝胶成像仪读取 tif 图像。获得图谱后,再使用 BioNumerics 软件处理,聚类树形图类型选择 UPGMA (unweighted pair group method with averages)方法,不同带型的电泳条带的相似性采用 Dice 相关系数百分比表示。

1.2.4 MLST 参考 PubMLST(<http://pubmlst.org/neisseria>)网站的标准方案,分析脑膜炎奈瑟菌的 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)、pgm(磷酸葡萄糖变位酶),对管家基因及引物进行 PCR 扩增:50 μL 反应体系,引物 1 μmol/L 终浓度, dNTP 200 μmol/L, Taq 酶 2.5 U,模板 1 μL,反应条件为 94℃ 2 min;94℃ 1 min、56℃ 1 min、72℃ 2 min 共 29 个循环;72℃ 2 min 结束,再对扩增后的产物分别进行测序,测序结果与 PubMLST 数据库(<http://pubmlst.org/neisseria>)进行检索比对,获得各管家基因位点的等位基因数值,并确定其序列型(ST),MLST 试验的 PCR 扩增引物序列见表 1,MLST 试验的测序引物序列见表 2。

表 1 脑膜炎奈瑟菌 MLST 分型 PCR 扩增引物序列
Table 1 MLST and PCR amplification primer sequences of *Neisseria meningitidis*

引物名称	引物序列 5'-3'	产物大小(bp)
abcZ-P1C	TGTTCCGCTTCGACTGCCAAC	900
abcZ-P2C	TCCCCGTCGTAAAAACAATC	
adk-P1B	CCAAGCCGTGTAGAATCGTAAACC	730
adk-P2B	TGCCAATGCGCCAATAC	
aroE-P1B	TTTGAACAGGCGTTGCGG	780
aroE-P2B	CAGCGGTAATCCAGTGCAC	
fumC-P1B	TCCCCGCCGTAAAAGCCCTG	800
fumC-P2B	GCCCGTCAGCAAGCCAAC	
gdh-P1B	CTGCCCCGGGGTTTTCATCT	680
gdh-P2B	TGTTGCGGTTATTTCAAAGAAGG	
pdhC-P1B	CCGGCCGTACGACGCTGAAC	720
pdhC-P2B	GATGTCGGAATGGGGCAAACA	
pgm-P1	CTCAAAGCCTACGACATCCG	1 200
pgm-P2	CGGATTGCTTTCGATGACGGC	

表 2 脑膜炎奈瑟菌 MLST 分型测序引物序列
Table 2 Primer sequences for MLST sequencing of *Neisseria meningitidis*

引物名称	引物序列 5'-3'	产物大小(bp)
abcZ-S1A	AATCGTTTATGTACCGCAGR	433
abcZ-S2	GAGAACGAGCCGGATAGGA	
adk-S1A	AGGCWGGCACGCCCTTGG	465
adk-S2	CAATACTTCGGCTTTCACGG	
aroE-S1A	GCGGTCAAYACGCTGRTK	490
aroE-S2	ATGATGTTGCCGTACACATA	
fumC-S1	TCCGGCTTGCCGTTTGTACAG	465
fumC-S2	TTGTAGGCGGTTTTGGCGAC	
gdh-S3	CCTTGCAAAGAAAGCCTGC	501
gdh-S4C	RCGCACGGATTTCATRYGG	
pdhC-S1	TCTACTACATCACCTGATG	480
pdhC-S2	ATCGGCTTTGATGCCGTATTT	
pgm-S1	CGGCGATGCCGACCGCTTGG	450
pgm-S2A	GGTGATGATTCGGTYGCRCC	

2 结果

2.1 一般资料 2006—2016 年,湖南省共报告实验室诊断病例 21 例,通过对分离脑膜炎奈瑟菌的血清学分群后确认为 C 群 11 株、B 群 6 株、W135 群 4 株。从已报告的流脑实验室确诊病例密切接触者以及三个省级流脑监测点中共培养分离出脑膜炎奈瑟菌 114 株,其中 B 群 55 株、C 群 19 株、W135 群 5 株、不可分群 35 株。

2.2 菌株鉴定与选取结果 从 2006—2016 年间湖南省内流脑患者、患者密切接触者以及健康人群带菌调查标本中分离的脑膜炎奈瑟菌,再次经 API NH 生化鉴定卡以及多价血清及群因子血清凝集试验确认后,选取其中 22 株 C 群、9 株 W135 群脑膜炎奈瑟菌为本次研究菌株。22 株 C 群脑膜炎奈瑟菌中,来自于患者的血 6 株、脑脊液 1 株,患者密切接触者的咽拭子 10 株,健康带菌者咽拭子 5 株;9 株来自于张家界市,7 株来自衡阳市,3 株来自于湘潭市,长沙市、株洲市、郴州市各 1 株。9 株 W135 群脑膜炎奈瑟菌中,来自于患者的血 3 株、脑脊液 1 株,患者密切接触者的咽拭子 3 株,健康带菌者咽拭子 2 株;3 株来自于长沙市,张家界市、衡阳市各 2 株,株洲市、益阳市各 1 株。

2.3 药敏结果 31 株脑膜炎奈瑟菌除 2 株 C 群菌株对青霉素的药敏结果为中介外,其余菌株对青霉素、氨苄西林、头孢噻肟、头孢曲松、美罗培南、氯霉素、米诺环素、阿奇霉素、利福平全部敏感,22 株 C 群菌株和 9 株 W135 群菌株对环丙沙星、左氧氟沙星均为部分耐药,两者的耐药率比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),但 C 群菌株对复方磺胺甲噁唑全部耐药,而 W135 群菌株的耐药率为 55.56%,两者比较,差异具有统计学意义($\chi^2 = 7.62, P = 0.006$)。见表 3。

2.4 PFGE 分型结果 22 株 C 群脑膜炎奈瑟菌经 PFGE 分型后,以 70% 相似度为标准,共分为 2 个簇、5 种 PFGE 带型;按相似度 $\geq 90\%$ 为同一亚型,其中 18 株 HNC-01 和 HNC-02 菌株属于同一亚型。2006 年湖南的第 1 例 C 群患者分离的菌株

PFGE 带型为 HNC-02,与 2012、2013 年患者以及患者密切接触者分离菌株的图谱完全一致,与带型为 HNC-01 的 2008、2010、2013 年患者分离的菌株仅有一个带型的差异,均属于优势带型,另 2008 年分离菌株中有 1 例患者与 1 名健康带菌者带型一致,为带型 HNC-05。见图 1。9 株 W135 群脑膜炎奈瑟菌经 PFGE 分型后共分为 2 个带型,其中首例患者与 2013、2016 年患者分离的菌株带型一致,均为 HNW-01 型,带型 HNW-02 的 2 株 W135 群流脑菌株分离自 2012 年 1 例 C 群死亡患者的密切接触者^[5],与患者血清型不一致,为正常人群携带的非流行株。见图 2。

表 3 31 株脑膜炎奈瑟菌对 12 种抗菌药物的药敏结果(%)
Table 3 Antimicrobial susceptibility testing results of 31 *Neisseria meningitidis* strains to 12 kinds of antimicrobial agents(%)

抗菌药物	C 群脑膜炎奈瑟菌 (n=22)			W135 群脑膜炎奈瑟菌 (n=9)		
	敏感	中介	耐药	敏感	中介	耐药
青霉素	90.91	9.09	0.00	100.00	0.00	0.00
氨苄西林	100.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00
头孢噻肟	100.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00
头孢曲松	100.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00
美罗培南	100.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00
米诺环素	100.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00
氯霉素	100.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00
阿奇霉素	100.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00
左氧氟沙星	27.27	22.73	50.00	55.56	22.22	22.22
环丙沙星	40.91	36.36	22.73	77.78	0.00	22.22
利福平	100.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00
复方磺胺甲噁唑	0.00	0.00	100.00	33.33	11.11	55.56

2.5 MLST 结果 选取 C 群的优势带型 HNC-01、HNC-02 和 W135 群的优势带型 HNW-01 的部分菌株,进行 MLST,扩增产物均在 700 - 1 400 bp 之间。产物纯化后,经 DNA 双通道序列测定,将不同的等位基因序列提交至 MLST 数据库,经 PubMLST 检索比对,结果显示,测序后的 7 个基因位点的等位基因数值相对应的等位基因谱 C 群 HNC-01、HNC-02 带型菌株均为 ST4821 型,W135 群 HNW-01 带型为 ST11 型。

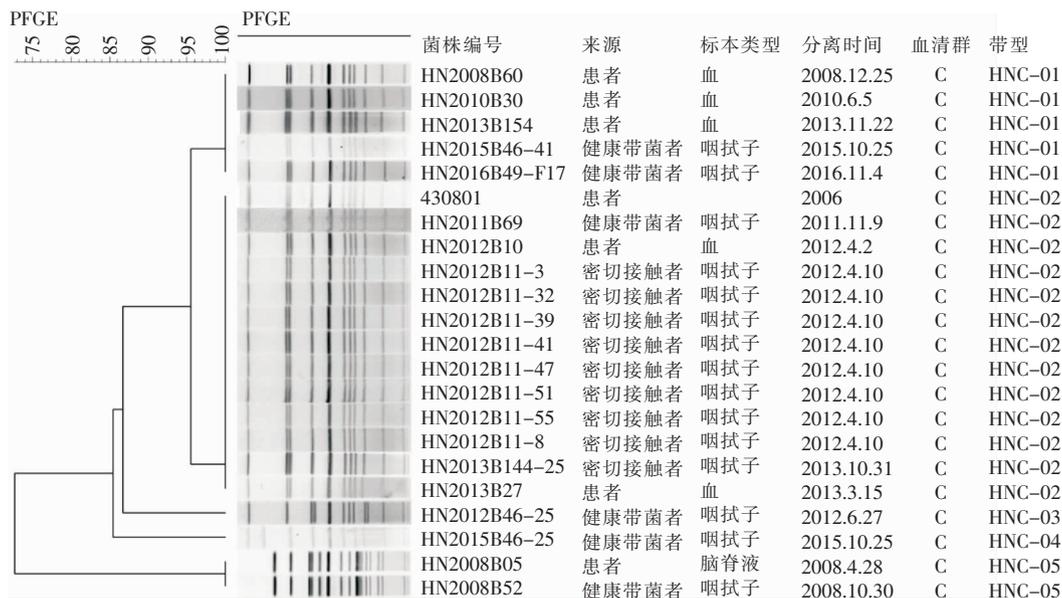


图 1 22 株 C 群脑膜炎奈瑟菌 PFGE 分型软件分析结果

Figure 1 Analysis of 22 serogroup C *Neisseria meningitidis* strains by PFGE typing software



图 2 9 株 W135 群脑膜炎奈瑟菌 PFGE 分型软件分析结果

Figure 2 Analysis of 9 serogroup W135 *Neisseria meningitidis* strains by PFGE typing software

3 讨论

流行性脑脊髓膜炎是一种在我国流传的既古老又新鲜的传染病,发病历史悠久,但菌群仍在持续发生变迁,一旦感染,儿童极易引发暴发型流脑,如不及时治疗,6~24 h 内即可危及生命,病情凶险,病死率高,切不可掉以轻心。据《湖南省疫情资料汇编》和中国疾病预防控制中心信息系统报告,湖南省在 1951—2016 年间,共报告流脑病例 504 498 例,死亡 48 305 例,发病率波动于 0.003/10 万~34.08/10 万之间,并于 1959、1967 年以及 1974—1977 年期间出现 3 次流行高峰。自二十世纪八十年代流脑 A 群多糖疫苗广泛使用后,发病率逐年大幅下降,全省范围内未再出现暴发流行,流行周期已不明显。2007 年 6

月,我省将 A+C 群流脑疫苗纳入免疫规划,并实施扩大国家免疫规划,流脑疫情得到有效控制。近 10 年(2007—2016 年)流脑发病率波动于 0.003/10 万~0.035/10 万之间,徘徊在历史低位,2014、2016 年全省仅各报告病例 2 例。病例以 15 岁以下年龄段人群为主,主要分布在湖南的西部和中南部,2004—2016 年数据显示,发病率居前五位的城市为:湘西自治州、张家界市、湘潭市、长沙市、益阳市,占全省病例的 57.14%^[6]。

由于 A 群多糖疫苗多年来的普及,我省 A 群脑膜炎奈瑟菌已逐渐消退。自 2006 年我省衡阳地区首次发现 C 群流脑病例以来,其后几年病例以 C 群流脑行为为主。随着 A+C 流脑疫苗免费接种步伐的推进,2012 年我省又首次发现了 W135 群流脑病例,随后 W135 群病例开始逐渐增多。B 群流脑疫

苗由于荚膜的多变性,疫苗尚在研制和验证阶段,需要多剂次及佐剂的配合,方能产生保护性抗体^[7]。我省在健康人群监测中 B 群流脑多见,型别多样,个别型别可致病,但症状较 C 群和 W135 群流脑轻。本次研究主要分析了我省近年来的 C 群和 W135 群脑膜炎奈瑟菌的病原学特征,以探讨其流行病学特征。

22 株 C 群脑膜炎奈瑟菌和 9 株 W135 群脑膜炎奈瑟菌,均来自于患者、密切接触者以及健康人群带菌调查中分离到的菌株,C 群菌株的时间跨度为 2006—2016 年;W135 群菌株的时间跨度为 2012—2016 年,患者以长株潭、衡阳及张家界为主,病例既有儿童、学生,也有成人,发病时间集中在历年的 10 月到次年 6 月间,夏季没有病例。我省自 2014 年开始,鲜有检出 C 群病例,新发的 W135 群病例开始逐步增多。有研究^[8]认为,W135 群脑膜炎奈瑟菌与我国早年曾引起多次大流行的 A 群菌株表达相同的菌毛结构蛋白 PilE 和主要黏附蛋白 NadA,提示 W135 群脑膜炎奈瑟菌可能具有与 A 群脑膜炎奈瑟菌相似的传播流行模式,以往 A 群的流行常引起聚集性和暴发,故对 W135 群菌株可能造成的流行应持谨慎态度。

31 株脑膜炎奈瑟菌对 12 种抗菌药物的敏感性试验中,均对青霉素、氨苄西林、头孢曲松、头孢噻肟、美罗培南、氯霉素、米诺环素、利福平、阿奇霉素高度敏感,无耐药菌株,对左氧氟沙星和环丙沙星部分耐药。从数据上看,C 群脑膜炎奈瑟菌似乎耐药率更高,但并无统计学差异。另外,22 株 C 群脑膜炎奈瑟菌对复方磺胺甲噁唑全部耐药,9 株 W135 群脑膜炎奈瑟菌对其耐药率为 55.56%,两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。从药敏结果来看,W135 群脑膜炎奈瑟菌的整体情况还比较乐观,但国外流行 W 群病例多年,Mowlaboccus^[9]报道,在澳大利亚西部,2016 年流行的 ST11 型 W 血清群脑膜炎奈瑟菌经基因组分析显示存在对青霉素耐药的 *penA*₂₅₃ 等位基因,此发现极有可能影响流脑的治疗方案,应引起警惕。

对 C 群和 W135 群脑膜炎奈瑟菌分别进行 PFGE 分型分析比较,发现 22 株 C 群脑膜炎奈瑟菌共分为 5 个带型,其中优势带型 HNC-01 和带型 HNC-02 的 18 株菌的带型两者间仅有一个条带的差异,相似度在 95% 以上,根据 Tenover^[10] 研究原则,认为这些差异可能是菌株偶发的一次基因事件引起的带型变化,这种情况常可发生在菌株重复培

养或同一患者多次分离时发生,故可以认为其在遗传角度是有高度同源性的,在流行病学上也是紧密相关的。带型 HNC-03 和带型 HNC-04 分别来自于健康人群的携带菌,与优势菌群按 70% 相似度为标准,仍然归为同一簇。带型 HNC-05 的 2 株菌与其余 20 株菌,从遗传角度来说,相差较远,分别来自于 2008 同一年的患者及健康带菌调查,时间上有差异,地点也不一样,但既然能够引起病例的发生,就可能为另一种 C 群的潜在流行群,应引起重视。9 株 W135 群脑膜炎奈瑟菌经过 PFGE 电泳后共分为 2 种带型,优势带型 HNW-01 的 7 株菌株分离自 2012—2016 年间的患者、密切接触者及带菌者,其 PFGE 图谱完全一致,带型 HNW-02 为 2012 年 4 月一起 C 群流脑死亡患者的密切接触者调查中分离到的 2 株 W135 群脑膜炎奈瑟菌,当年那起流行事件中的“主角”是 C 群脑膜炎奈瑟菌,这 2 株 W135 群菌株只是偶然分离到,并未引起密切接触者发病,PFGE 分型显示,其与致病优势流行克隆群带型并不相同,相似度低于 90%,是否可能致病,还有待进一步研究。值得引起注意的是,我省报道的 C 群和 W135 群首例病例分离菌株,带型与优势带型一致,可以认为自首例病例后,即开始了该型别菌株的流行。

目前,全球流脑病例主要由 7 个高致病性 Nm 序列群的菌株引起,分别是 ST1 序列群、ST5 序列群、ST8 序列群、ST11 序列群、ST32 序列群、ST41/44 序列群以及 ST4821 序列群。湖南省的 C 群流脑优势流行菌株进行了 MLST 后,结果均为 ST4821 群,属于我国特有的主要流行克隆群^[11]。湖南省 W135 群流脑优势流行菌株的型别,通过 MLST 后,为高致病性的 ST11 群,与目前全球主要流行的侵袭性 W135 群脑膜炎奈瑟菌的 ST 型别一致^[9, 12-13],也与目前我国其他省市的新发 W135 群的型别一致^[14]。

从病例菌群的统计结果中发现,自 2006 年我省第一次发现 C 群流脑病例以来,就再未检出过 A 群病例。从 2006—2013 年,几乎每年都可以检出 C 群病例,说明 C 群已经取代了 A 群,成为我省的优势菌株,但自从 2012 年我省首次发现 W135 群流脑病例以来,C 群流脑病例便呈现下降趋势。2014—2016 年末报道 C 群流脑病例,而 W135 群菌株已经通过健康人群监测进入了我们的视野,同时也引起了相关的流脑疾病。B 群流脑病例由于暂时无疫苗可预防,一直时有发生,说明我省的流脑流行菌群正

在向多元化发展,这与我国将 A + C 群多糖疫苗纳入免疫规划的政策息息相关。在疫苗的选择性压力下,流脑菌群的悄然变迁也给我们的防控工作带来更大挑战,在我国流脑的局部暴发仍不断出现。在非洲仍有周期性的流脑大流行,如果不控制这种流行趋势,可能会殃及其他洲^[15]。

鉴于我省 W135 群流脑病例自 2012 年后时有发生,且存在优势流行克隆群的情况下,应大力宣传和推广有效的疫苗免疫策略,国际市场上的脑膜炎球菌多糖疫苗(MPV)有 2 价(A + C 群)和 4 价(A、C、Y、W135 群)两种,是由相应血清群 Nm 制成纯化的、对热稳定的冻干的荚膜多糖,疫苗具有良好的安全性和免疫原性^[16],可将 C 群和 W135 群流脑造成的隐患进一步控制。新的防控策略制定和实施后,也不能放松对流脑病原学的监测,由于该菌群存在着一个血清群的变迁,积极的主动监测能为我省流脑的防控起到有效的预测预警作用。应当进一步加强实验室的检测能力,密切关注我省流脑流行菌群的变迁趋势,并制定相应对策,将这一古老又新鲜的传染病始终控制在低发病水平。

[参 考 文 献]

[1] 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.

[2] 李开铭,谢梅花,余敏君,等. B 群脑膜炎奈瑟菌外膜蛋白 NMB0315 核酸疫苗的免疫活性和免疫保护作用初步研究[J]. 中国免疫学杂志, 2015, 31(12): 1648 - 1653, 1658.

[3] 刘英豪,罗小成,伍运生,等. 湖南省首起由 C 群脑膜炎奈瑟菌引起流脑局部流行的调查[J]. 实用预防医学, 2008, 15(2): 446 - 447.

[4] 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.

[5] 田晓辉,夏昕,王敏,等. 张家界市首例 C 群流脑死亡病例及

其密接人群中分离的脑膜炎奈瑟菌实验室分析和 PFGE 分型[J]. 实用预防医学, 2012, 19(9):1311 - 1313.

- [6] 戴德芳,李放军,夏昕. 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.
- [7] 王立新,熊恩东. 单价 B 群脑膜炎奈瑟菌 OMV 疫苗免疫后的抗体亲和力及其 IgG 亚型[J]. 国外医学(微生物学分册), 2003, 26(2):44 - 45.
- [8] Sun X, Zhou H, Xu L, et al. Prevalence and genetic diversity of two adhesion-related genes, *pilE* and *nadA*, in *Neisseria meningitidis* in China[J]. Epidemiol Infect, 2013, 141(10): 2163 - 2172.
- [9] Mowlaboccus S, Jolley KA, Bray JE, et al. Clonal expansion of new penicillin-resistant lade of *Neisseria meningitidis* serogroup W clonal complex 11, Australia[J]. Emerg Infect Dis, 2017, 23(8): 1364 - 1367.
- [10] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(9): 2233 - 2239.
- [11] Shao Z, Li W, Ren J, Liang X, et al. Identification of a new *Neisseria meningitidis* serogroup C clone from Anhui Province, China[J]. Lancet, 2006, 367(9508): 419 - 423.
- [12] Kilic A, Urwin R, Li H, et al. Clonal spread of serogroup W135 meningococcal disease in Turkey[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(1): 222 - 224.
- [13] Lemos AP, Harrison LH, Lenser M, et al. Phenotypic and molecular characterization of invasive serogroup W135 *Neisseria meningitidis* strains from 1990 to 2005 in Brazil[J]. J Infect, 2010, 60(3): 209 - 217.
- [14] 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 .
- [15] 胡绪敬. 流脑流行的监测与预防[J]. 中国公共卫生, 2004, 20(5):638 - 640.
- [16] 殷大鹏. 脑膜炎球菌疫苗:多糖疫苗与多糖结合疫苗[J]. 中国疫苗和免疫, 2008, 14(6):573 - 575.

(本文编辑:文细毛)