

## 脑膜炎奈瑟菌病原学及药物敏感性分析

夏 昕, 湛志飞, 张 红, 刘运芝, 覃 迪, 黄一伟

(湖南省疾病预防控制中心, 湖南 长沙 410005)

**[摘要]** **目的** 了解某省各市、县疾病预防控制中心 2007—2008 年分离的 8 株脑膜炎奈瑟菌的病原学特征及药物敏感性。**方法** 经培养及生化鉴定后, 对菌株进行血清学及聚合酶链反应(PCR)鉴定分群, 最后采用最低抑菌浓度(MIC)琼脂稀释法进行药敏试验。**结果** 8 株脑膜炎奈瑟菌中有 5 株 C 群、1 株 B 群、1 株 Y 群及 1 株不可分群菌株。所有菌株对青霉素、氨苄西林、米诺环素、头孢曲松、头孢噻肟、美罗培南、利福平敏感, 对复方磺胺甲噁唑全部耐药, 对环丙沙星和左氧氟沙星各有 4 株耐药, 对氯霉素和阿奇霉素各有 1 株耐药。**结论** 8 株脑膜炎奈瑟菌的流行株中以 C 群为主; 青霉素、头孢曲松、头孢噻肟、美罗培南等可作为治疗流行性脑脊髓膜炎的一线药物, 脑膜炎奈瑟菌对喹诺酮类及大环内酯类抗生素的耐药现象需引起重视。

**[关键词]** 脑膜炎奈瑟菌; 流行性脑脊髓膜炎; 血清学; 聚合酶链反应; 抗菌药物; 微生物敏感性试验

**[中图分类号]** R378.1<sup>+</sup>5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2010)03-0173-03

## Etiology and drug sensitivity of *Neisseria meningitidis*

XIA Xin, ZHAN Zhi-fei, ZHANG Hong, LIU Yun-zhi, QIN Di, HUANG Yi-wei (Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changsha 410005, China)

**[Abstract]** **Objective** To understand the pathogenic characteristics and drug sensitivity of 8 strains of *Neisseria meningitidis* isolated in Hunan province between 2007—2008. **Methods** *Neisseria meningitidis* strains were identified and clustered by serology and PCR test, drug sensitivity test was carried by minimum inhibitory concentration (MIC) agar dilution method. **Results** Among 8 strains of *Neisseria meningitidis*, 5 strains were in serogroup C, 1 in serogroup B, 1 in serogroup Y and 1 was unidentified. All 8 strains were sensitive to penicillin, ampicillin, minocycline, ceftriaxone, cefotaxime, meropenem, rifampicin, but resistant to sulfamethoxazole/trimethoprim, 4 strains were resistant to ciprofloxacin and levofloxacin respectively, and 1 strain was resistant to chloramphenicol and azithromycin respectively. **Conclusion** Eight epidemic strains of *Neisseria meningitidis* are mainly in serogroup C; penicillin, ceftriaxone, cefotaxime and meropenem should be used as the first-line drugs for the treatment of epidemic cerebrospinal meningitis, the resistance to quinolones and macrolides should be paid attention.

**[Key words]** *Neisseria meningitidis*; epidemic cerebrospinal meningitis; serology; polymerase chain reaction; antimicrobial agents; antimicrobial susceptibility test

[Chin Infect Control, 2010, 9(3): 173-175]

流行性脑脊髓膜炎(简称流脑)是我国冬春季节常见的呼吸道传播疾病, 脑膜炎奈瑟菌 A 群曾是我国主要流行菌群, 近几年来, B 群和 C 群的病例也逐渐增多。2007—2008 年, 湖南省各市、县疾病预防控制中心(简称疾控中心)向省疾控中心共上送其分离的脑膜炎奈瑟菌 8 株, 其中从流脑患者分离 5 株, 健康人群监测分离 3 株。流脑患者阳性菌株主要分离自血液和脑脊液标本, 健康人群阳性菌株则从咽

拭子中分离。从流脑患者分离的 5 株菌中, 除 1 株为 B 群脑膜炎奈瑟菌外, 其余均为 C 群脑膜炎奈瑟菌; 健康人群监测中分离的 3 株菌分别为 C 群、Y 群和 1 株不可分群株。

根据全国流脑监测方案的要求, 我们对以上 8 株菌进行了培养和生化鉴定、血清学和聚合酶链反应(PCR)试验分群以及抗菌药物的敏感性试验, 现将结果报告如下。

[收稿日期] 2009-08-25

[作者简介] 夏昕(1978-), 女(汉族), 江苏省盱眙县人, 主管技师, 主要从事病原微生物学研究。

[通讯作者] 夏昕 E-mail: xiaxincs@126.com

## 1 材料与方法

1.1 菌株来源 2007—2008 年湖南省各市、县疾控中心送检并鉴定的脑膜炎奈瑟菌。

1.2 培养和生化鉴定 将送检菌株接种于巧克力琼脂平板,置 5%CO<sub>2</sub> 温箱 37℃ 孵育 24 h,将可疑菌株进一步分纯培养后,取新鲜培养物按说明书接种至 API NH 鉴定试剂卡上,再置 37℃ 温箱培养 2 h,观察结果。

1.3 血清学实验 采用中国药品生物鉴定所的脑膜炎奈瑟菌诊断血清,用接种环刮取纯菌与玻片上的血清研磨均匀,轻轻摇动玻片 1~2 min 观察结果。先用多价血清进行凝集,阳性后再分别用群因子血清进行凝集实验分群,同时用生理盐水作对照凝集。

1.4 PCR 鉴定实验 参照文献[1]中方法对靶基因进行扩增,种属特异性基因 *CrgA* 可以用于区分 Nm 和其他细菌;荚膜多糖(CPS)基因 *SiaD* 和 *Orf* 用来进行 Nm 的分群。引物合成序列及预期 PCR 产物大小见表 1。反应体系 25 μL,其中 buffer 5 μL、dNTP 4 μL(终浓度 200 μmol/L)、MgCl<sub>2</sub> 3 μL、引物 3 μL(终浓度 1 μmol/L)、模板 2 μL、Taq 酶 1 μL(2.5 U),余为蒸馏水。扩增条件为:94℃ 3 min;92℃ 30 s,55℃ 40 s,72℃ 30 s;37 个循环,72℃ 10 min。其中阳性对照株为已知的各型脑膜炎奈瑟菌菌株,Marker 为 TaKaRa 公司购买的 100 bp Marker。

表 1 6 对脑膜炎奈瑟菌种群基因的引物名称、序列及产物大小  
Table 1 The sequence of primer and size of PCR product of *Neisseria meningitidis* population genes

引物名称	序列	产物 (bp)
<i>CrgA</i> (总)	5'-GCTGGCGCCGCTGGCAACAAAATTC-3' 5'-CTTCTGCAGATTGCGGCGTGCCGT-3'	230
<i>Orf</i> -2(A)	5'-CGCAATAGGTGTATATATTCTTCC-3' 5'-CGTAATAGTTTCGTATGCTTCTTT-3'	400
<i>SiaD</i> (B)	5'-GGATCATTTTCAGTGTTCACCA-3' 5'-GCATGCTGGAGGAATAAGCATTA-3'	450
<i>SiaD</i> (C)	5'-TCAAATGAGTTTGCGAATAGAAGGT-3' 5'-CAATCACGATTTGCCCAATTGAC-3'	250
<i>SiaD</i> (Y)	5'-CTCAAAGCGAAGGCTTTGGTTA-3' 5'-CTGAAGCGTTTTCATTATAATTGCTAA-3'	120
<i>SiaD</i> (W135)	5'-CAGAAAGTGAGGATTTCCATA-3' 5'-CACAACCATTTTCATTATAGTTACTGT-3'	120

1.5 药敏试验 采用最低抑菌浓度(MIC)琼脂稀释法进行药敏试验,严格按照 2007 年美国临床实验室标准化研究所(CLSI)推荐的指南进行。培养基

为 5% 羊血 M-H 血琼脂;抗菌药物共 12 种:青霉素(PEN)、氨苄西林(AMP)、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)、复方磺胺甲噁唑(SXT)、左氧氟沙星(LVX),均购自英国 Oxoid 公司。

药敏质控菌株:根据 2007 年 CLSI 要求,大肠埃希菌 ATCC 25922 用于 MIN、CIP 的药敏试验质量控制;肺炎链球菌 ATCC 49619 用于其他 10 种抗生素的质量控制。

## 2 结果

2.1 培养及生化结果 送检菌株在 CO<sub>2</sub> 温箱 37℃ 孵育 24 h 后,取圆形、凸起、光滑、湿润、半透明、不溶血、稍黏的菌落进行进一步的纯培养,再取新鲜分纯后的培养物按说明书接种到 API NH 鉴定试剂卡,结果显示 8 株菌的关键实验 γ-谷氨酰转移酶(GGT)阳性,葡萄糖发酵阳性,麦芽糖发酵阳性或阴性,其余果糖发酵、蔗糖发酵、尿酶、酯酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶等均为阴性;生化培养鉴定结果为脑膜炎奈瑟菌。

2.2 血清学及 PCR 结果 从流脑患者分离的 5 株菌中,4 株为血清多价 I 阳性,C 群阳性,PCR 结果为总 *CrgA* 阳性,*SiaD*(C)阳性;1 株为血清多价 I 阳性,B 群阳性,PCR 结果为总 *CrgA* 阳性,*SiaD*(B)阳性。3 株健康人群监测分离的菌株中,1 株血清多价 I 阳性,C 群阳性,PCR 结果为总 *CrgA* 阳性,*SiaD*(C)阳性;1 株为血清多价 II、III 阳性,Y 群阳性,PCR 结果为总 *CrgA* 阳性,*SiaD*(Y)阳性;还有 1 株菌为血清多价 I、II、III 均阳性,不能分群,PCR 结果仅有总 *CrgA* 阳性,余阴性。PCR 分型基因阳性结果见图 1。

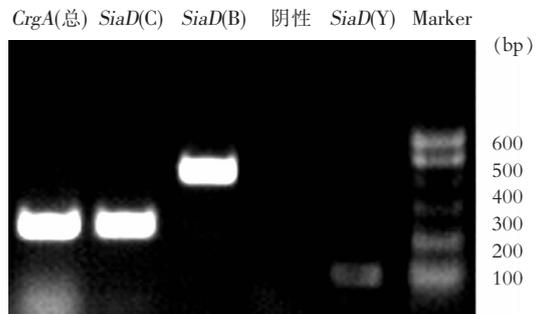


图 1 脑膜炎奈瑟菌分型基因 PCR 结果  
Figure 1 PCR product of typed gene of *Neisseria meningitidis*

2.3 药敏结果 8 株脑膜炎奈瑟菌对 PEN、AMP、MIN、CRO、CTX、MEM、RIF 全部敏感;对 SXT 全部耐药;对 CIP 和 LVX 各有 4 株耐药,对 CHL 和 AZM 各有 1 株耐药。

### 3 讨论

本组分离自患者血液和脑脊液标本的 5 株脑膜炎奈瑟菌中,除 1 株为 B 群脑膜炎奈瑟菌外,其余均为 C 群脑膜炎奈瑟菌;健康人群监测中除分离到 1 株 C 群菌株外,其余 2 株中,1 株为 Y 群,另 1 株经 PCR 鉴定不可分群,血清学鉴定也有交叉凝集现象,可能为未知群别的菌株,属于非流行株。从流行株的情况看,A 群脑膜炎奈瑟菌可能因为 A 群流脑疫苗的普及接种,已经不再是我省主要流行株了,B 群和 C 群脑膜炎奈瑟菌则有增多趋势,提示我们必须加强对这 2 群脑膜炎奈瑟菌的监测,此外还应将多价流脑疫苗进行推广普及。

对 8 株脑膜炎奈瑟菌进行血清学和 PCR 分群实验,两实验结果基本一致。实验结果提示健康人群分离的脑膜炎奈瑟菌抗原具有复杂性和多样性,其是否有致病性尚需进一步研究。

在药敏试验中,所有 8 株脑膜炎奈瑟菌对 PEN、AMP、MIN、CRO、CTX、MEM、RIF 全部敏感,说明这些药物可以作为临床治疗流脑的首选药物。但国外已有脑膜炎奈瑟菌对 PEN、AMP、RIF 等抗菌药物耐药的报道<sup>[2-3]</sup>,需引起我们的高度重视。所有菌株均对 SXT 耐药,这一结果与邵祝军<sup>[4]</sup>、孙健<sup>[5]</sup>等的报道一致,说明 SXT 已经完全不适合用于该类感染的治疗。氟喹诺酮类抗菌药物

CIP 与 LVX 在我国文献报道中耐药性较高<sup>[4-5]</sup>;本组脑膜炎奈瑟菌约半数对其耐药,耐药形势比较严峻。CHL 在我国以往的耐药监测报告中,从未出现过耐药菌株<sup>[4-5]</sup>;而在本组实验中,1 株从密切接触者咽拭子中分离出的经血清学和 PCR 实验均无法分群的脑膜炎奈瑟菌对其耐药,对于该菌的耐药机制和生物学特征值得我们进一步研究。另外,还有 1 株从流脑患者血液中分离的 C 群脑膜炎奈瑟菌对 AZM 耐药。AZM 作为新一代大环内酯类抗生素,其抗菌谱较广,竟然也出现了耐药菌株,这对临床上如何更合理地使用和监管抗菌药物,减少耐药菌株的出现提出了新的任务与挑战。

### [参考文献]

- [1] 张力,邵祝军,徐丽. 鉴别脑膜炎奈瑟菌 A、B、C、Y、W 135 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] Hedberg S T, Fredlund H, Nicolas P, et al. Antibiotic susceptibility and characteristics of *Neisseria meningitidis* isolates from the African meningitis belt, 2000 to 2006: phenotypic and genotypic perspectives [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009,53(4):1561-1566.
- [3] Jorgensen J H, Crawford S A, Fiebelkorn K R. Susceptibility of *Neisseria meningitidis* to 16 antimicrobial agents and characterization of resistance mechanisms affecting some agents [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(7):3162-3171.
- [4] 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.
- [5] 孙健,黄锐敏,鞠长燕. 55 株脑膜炎奈瑟菌对 12 种抗生素体外敏感性试验[J]. 中国热带医学,2008,8(2): 286-287.

(上接第 172 页)

有关,且不同年龄段儿童的隐性感染及抗体水平也不同。为了消除混杂因素的影响,更准确地反映预防药物的作用,本研究采用了随机、分层、配伍、标准化及逐步多重回归等措施,研究结果较单因素分析更准确。但由于样本量太小,隐性感染比较研究参数不稳定,可信限过宽,需要更大样本量的进一步研究证实。

### [参考文献]

- [1] Chang L Y, King C C, Hsu K H, et al. Risk factors of entero-

- virus 71 infection and associated hand, foot, and mouth disease/herpangina in children during an epidemic in Taiwan [J]. Pediatrics, 2002, 109(6): e88.
- [2] 万俊峰,朱理业,刘红,等. 阜阳市手足口病 (EV71 感染) 疫情流行病学分析 [J]. 安徽医学, 2008, 29(4): 344-345.
- [3] 殷子斐,苏永华,胡玉芝,等. 手足口病的中医治疗 [J]. 中医儿科杂志, 2008, 4(1): 51-55.
- [4] 霍莉莉. 小儿手足口病的中医药治疗概况 [J]. 新疆中医药, 2003, 21(2): 50-52.
- [5] Chen S C, Chang H L, Yan T R, et al. An eight-year study of epidemiologic features of enterovirus 71 infection in Taiwan [J]. Am J Trop Med Hyg, 2007, 77(1): 188-191.