

ravertebral block for mastectomy; A randomized controlled trial of different concentrations of bupivacaine and fentanyl[J]. Indian J Anaesth, 2012, 56(1):34-39.

[14] HEO B H, LEE H J, LEE H G, et al. Femoral nerve block for patient undergoing total knee arthroplasty: Prospective, randomized, double-blinded study evaluating analgesic effect of perineural fentanyl additive to local anesthetics[J]. Medicine, 2016, 95(36):1-5.

[15] KIRKSEY M A, HASKINS S C, CHENG J, et al. Local anesthetic peripheral nerve block adjuvants for prolongation of analgesia; a systematic qualitative review[J]. PLoS One, 2015, 10(9):1-23.

[16] WERDEHAUSEN R, BRAUN S, HERMANN S H, et al. The influence of adjuvants used in regional anesthesia on lidocaine-induced neurotoxicity in vitro[J]. Reg Anesth Pain Med, 2011, 36(5):436-443.

[17] WHITING D J, WILLIAMS B A, OREBAUGH S L, et al. Case report: postoperative analgesia and preserved motor function with clonidine and buprenorphine via a sciatic perineural catheter[J]. J Clin Anesth, 2009, 21(4):297-299.

[18] LEPPERT W. The impact of opioid analgesics on the gastrointestinal tract function and the current management possibilities[J]. Contemp Oncol (Pozn), 2012, 16(2):125-131.

[19] SABBE M B, GRAFE M R, MJANGER E, et al. Spinal delivery of sufentanil, alfentanil, and morphine in dogs. Physiologic and toxicologic investigations[J]. Anesthesiology, 1994, 81(4):899-920.

[20] WILLIAMS B A, HOUGH K A, TSUI B Y, et al. Neurotoxicity of adjuvants used in perineural anesthesia and analgesia in comparison with ropivacaine[J]. Reg Anesth Pain Med, 2011, 36(3):225-230.

[21] JOSHUA B, NICHOLAS J, MICHAEL L, et al. Neurotoxicity questions regarding common peripheral nerve block adjuvants in combination with local anesthetics[J]. Curr Opin Anaesthesiol, 2015, 28(5):598-604.

(收稿日期:2018-02-16 修回日期:2018-05-04)

• 综 述 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.13.046

脑膜炎奈瑟菌的检测技术及检测进展

廖春艳 综述,李志峰,段刚[△]审校
(重庆市疾病预防控制中心 400042)

关键词:流行性脑脊髓膜炎; 脑膜炎奈瑟菌; 实验室技术
中图分类号:R446.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2018)13-2011-04

流行性脑脊髓膜炎(简称流脑)是由脑膜炎奈瑟菌(Nm)通过呼吸道传播引起的化脓性脑膜炎,为急性呼吸道传染病,常在冬春季引起发病与流行。脑膜炎发病迅速,病死率超过 20%,且后遗症严重^[1]。我国 90%以上的患者是由 A 群 Nm 引起。Nm 是只存在于人体的需氧双球菌,其外膜含脂多糖成分,致病性 Nm 的外膜外有荚膜多糖。Nm 有多基因差异。根据 Nm 荚膜多糖的不同,分为 12 个血清群:A、B、C、H、I、K、L、X、Y、Z、29E、W135 和不能分群菌株。Nm 的病原学检测包括细菌培养、革兰染色、生化鉴定、血清学分群、乳胶凝集反应直接检测抗原等。脑脊液革兰染色仍是快速检测 Nm 的重要方法之一,患者淤点(斑)、脑脊液涂片检测时在中性粒细胞内见到革兰阴性肾形双球菌或脑脊液、血液培养 Nm 阳性或脑脊液、血液 Nm 特异性核酸片段检测阳性都可作为流脑的确诊依据。病原学检测是检验 Nm 的传统方法,但因 Nm 对冷、热、干燥和化学消毒剂的高度敏感

性和对外环境的弱抵抗力,以及临床标本的采集、运送、培养、接种方式、培养基质量、检测人员的经验等都可能影响检验结果的准确性。PCR 分子学诊断的优点是可测出菌群特异性 Nm DNA,不要求阳性结果中存在活的病原体,且结果可在 2 h 内获得^[2]。目前,高敏感性、高特异性、操作简便的分子生物学检验技术已广泛应用于 Nm 感染的检验诊断。本文就 Nm 的检测技术及检测进展作初步综述。

1 Nm 的病原学检测技术

病原学检测是最早应用于细菌检测的方法。分离出 Nm 是诊断流脑的“金标准”,其鉴定方法包括革兰染色、氧化酶试验、生化鉴定、血清学分群等。基于获得的阳性菌株,可进行进一步的研究,比如体外药物敏感试验就必须首先分离到阳性菌株。李马超等^[3]就曾对其实验室 2005—2006 年分离的 49 株 Nm 菌株(16 株 A 群、33 株 C 群)进行体外抗菌药物敏感性检测,结果表明,16 株 A 群 Nm 菌株对复方磺胺甲

[△] 通信作者, E-mail: miker197610@126.com。

噁唑、四环素、左氧氟沙星、萘啶酸 4 种抗菌药物耐药,对环丙沙星耐药或中度敏感,33 株 C 群 Nm 菌株对复方磺胺甲噁唑耐药,31 株(93.9%)C 群菌株对萘啶酸耐药,20 株(60.6%)C 群菌株对左氧氟沙星耐药,17 株(51.5%)C 群菌株对环丙沙星耐药,4 株 A 群和 1 株 C 群 Nm 菌对青霉素不敏感。冯君平等^[4]进一步探索了 A 群、C 群 Nm 的最适培养基,结果表明添加酵母浸出粉的培养基可作为 A 群、C 群 Nm 培养的最适培养基。郑春早等^[5]配制了一种小牛血清“双抗”培养基作为 Nm 的增菌培养基,与常规检测培养基比较表明,应用小牛血清“双抗”培养基建立的新方法适用于 A、B、C 群 Nm 的检测,且检测效果明显优于常规的咽拭子直接接种法。病原学检测的缺点是较繁琐、耗时、影响因素多,特异性可能不够好。

2 Nm 的普通聚合酶链反应(PCR)

PCR 是一种用于放大扩增特定的 DNA 片段的分子生物学技术,对于不能用血清学分群的 Nm 疑似菌株或无法进行 Nm 分离培养的脑脊液、血液、血清标本可采用 PCR 进行 DNA 扩增辅助检测鉴定。近年来 PCR 技术广泛应用于 Nm 的检测中^[2,6]。黄亮等^[7]采用普通 PCR 技术对流脑疑似病例的脑脊液和血液标本中 Nm 种属及各群的特异性 DNA 片段进行了检测,发现 6 例流脑疑似患者的脑脊液标本中有 5 份 Nm 属特异性基因 Crg A 阳性,5 份检出 Nm C 群 SiaD(C)基因片段;血液标本中 1 份检出 Nm CrgA 基因,1 份检出 Nm C 群 SiaD(C)基因片段。张文艳等^[8]对 Nm 血红素加氧酶的基因 Hemo 进行扩增,结果表明,Nm 标准菌株为阳性结果,即扩增出长为 424 bp 的 DNA 片段,而肺炎链球菌、乙型流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌均未扩增出该 DNA 片段,为阴性结果;PCR 技术能检测出 4 pg 的脑膜炎双球菌 DNA,具有高敏感性;11 份脑脊液样品 Nm PCR 检测常规培养检测结果显示,PCR 检出率为 36.3%,而培养法的检出率为 18.2%,PCR 明显高于培养法($P < 0.05$)。徐丽等^[9]则利用普通 PCR 技术建立了检测 29E 群、X 群和 Z 群等 3 个血清群 Nm 的方法,然后将该方法应用于 41 份疑似 Nm 菌株标本的检测,结果表明,41 份疑似 Nm 标本中,29E 群和 X 群 PCR 阳性的标本分别有 7 份和 2 份,未检测出 Z 群菌株,建立了能准确、特异地鉴定 29E 群、X 群和 Z 群 Nm 菌株的 PCR 方法。

3 Nm 的多重(复合)聚合酶链反应(PCR)

普通 PCR 主要用于单一致病因子的鉴定;多重 PCR 反应原理与一般 PCR 相同,主要用于多种病原微生物的同时检测或鉴定,也可用于某些遗传病及癌基因的分型鉴定。近年来,多重 PCR 技术越来越广

泛应用于 Nm 的检测。任红宇等^[10]针对包括 Nm 在内的 8 种细菌的特异性基因,通过优化单一 PCR 扩增体系及扩增程序,初步建立了能同时检测 8 种导致细菌性脑膜炎的病原体的复合 PCR 扩增方法。熊长辉等^[11]应用多重 PCR 技术对其实验室保存的 70 株已经血清学鉴定的 Nm 进行核酸鉴定及基因分群,同时检测 23 例流脑疑似病例脑脊液标本中 Nm 特异性 DNA 片段,发现 68 株 Nm 的多重 PCR 检测结果与血清学分群结果一致,2 株血清学未能分群的 Nm 经多重 PCR 检测为 C 群;23 例流脑疑似病例脑脊液标本经多重 PCR 检测有 5 例为 C 群,1 例为 A 群,1 例为 B 群,阳性检出率为 30.43%,传统的病原分离培养、生化鉴定和血清学鉴定 4 例为 C 群,阳性检出率为 17.39%。可见多重 PCR 技术对 Nm 检测的特异性优于病原学检测。DIAWARA 等^[12]应用复合荧光实时 PCR(RT-PCR)技术对脑脊液中的 Nm 和肺炎链球菌进行了检测,结果表明,Nm 和肺炎链球菌的不同熔融温度的两峰分别为 87.5 °C、85.5 °C。Nm 和肺炎链球菌的 RT-PCR 的灵敏度分别为 100%(95%CI:82.4~100.0,85.1~100.0),二者特异度相同,均为 100%(95%CI:88.6~100.0)。Nm 和肺炎链球菌引起的脑膜炎的诊断准确率分别提高到 50.7%和 28.6%。DE FILIPPIS 等^[13]利用多重 PCR 技术对 Nm、流感嗜血杆菌、肺炎链球菌进行了检测,总共收集了 110 个分离株和 134 例临床标本(99 例脑脊液和 35 例血液标本)并进行了分析,结果表明,所使用的方法快速、特异性好、灵敏度高。ZHU 等^[14]利用多重 PCR 技术对 Nm 进行了基因分型。结果表明,其检测灵敏度为 1 ng 基因组 DNA(相当于 4×10^5 基因组),脑脊液标本中为 3×10^5 cfu/mL,这种多重 PCR 检测可能有助于临床诊断和流脑流行病学监测。

4 荧光定量 PCR 检测 Nm 法

荧光定量 PCR 通过荧光染料或荧光标记的特异性探针对 PCR 产物进行标记跟踪,实时在线监控反应过程,通过相应的软件可以对产物进行分析,计算待测样品模板的初始水平。雷永良等^[15]应用该技术对 167 例流脑监测标本进行了检测,并与传统的病原学检测进行比较,结果表明新方法与传统方法阳性符合率为 55.56%,另有 4 例传统方法检测为阴性的标本用荧光定量 PCR 检测为阳性,其特异度、灵敏度都高于传统培养法,且检测周期更短。杨艳等^[16]针对 Nm 特异性基因 por A 设计引物、探针,用实时荧光 PCR 技术进行检测,并与常规 PCR 比较,结果表明应用实时荧光 PCR 检测时,64 株 Nm 检测结果均为阳性,6 株非 Nm 结果均为阴性。检测灵敏度达 5.0×10^3 cfu/mL,即 5 cfu/test,比常规 PCR 灵敏度高 10

倍,并且结果重复性好。张晓春等^[17]采用荧光定量 PCR 检测健康者咽拭子中 Nm 的带菌情况,结果表明,荧光定量 PCR 的灵敏度、特异度均为 100%,阳性预测值(PPV)为 13.09%,阴性预测值(NPV)为 100.00%,检出限为 0.5 cfu/50 μL 体系,荧光定量 PCR 检出结果的时间为 3 h,而培养法至少要 2 d。该方法可用于疾病的快速诊断,特别适合健康者的带菌率调查。MIRONOV 等^[18]采用荧光定量 PCR 技术对 Nm 参考菌株和 187 例脑膜炎患者的脑脊液进行研究,结果表明该方法比传统培养法有更好的特异性和敏感性。文献[12]也将荧光定量 PCR 技术与多重 PCR 技术结合,取得了良好的实验结果。

5 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 Nm 抗体水平

应用 ELISA 间接法检测患者急性期和恢复期血清中的抗体水平,如恢复期效价较急性期呈 4 倍或 4 倍以上升高,可作为流脑的辅助鉴别。ELISA 间接法也可以应用于健康者血清抗体的测定,结果可为当地的流脑防控提供参考。张洪飞等^[19]应用 ELISA 分析了通辽市科左中旗 221 例健康者 Nm 带菌情况及其抗体水平,检出脑膜炎双球菌 13 株,总带菌率为 3.81%;A 群抗体阳性率为 71.91%,C 群抗体阳性率为 47.51%,为该地区今后的流脑预防、控制提供了科学依据。

6 Nm 的分子分型及其他新技术

多位点序列分型(MLST)技术是从基因水平通过管家基因的点突变对 Nm 进行分型,利用 MLST 可以对数十年前不同地区分离的菌株之间的亲缘关系进行评估,尤其是对不同菌群之间基因发生的频繁的重组事件,分析菌株进化关系及判断分离株是否属高致病性克隆系等方面,可弥补传统血清型分型方法的不足^[20]。MLST 适合用于长期的、大范围的流行病学调查和监测菌群结构变化,研究地域性传播和流行性变迁。两株细菌 MLST 分型结果相同,表示这两株细菌属于相同的克隆或者克隆群,不能认为他们之间有流行病学联系。朱水荣等^[20]采用 MLST 技术,对浙江省 2004—2013 年部分 Nm 菌株开展基因分型研究,得出了浙江省 Nm 分离株间的遗传进化关系,为今后有针对性地制订流脑预防控制措施提供参考。邓小玲等^[21]则采用 MLST 技术,对广东省 Nm 分离株间的遗传进化关系进行了研究,为有针对性地采取预防控制措施提供依据。

脉冲场凝胶电泳(PFGE)是一种分离大分子 DNA 的方法,实践表明,大于 40 kb 的 DNA 不能在恒强水平琼脂糖凝胶电泳中分离,PFGE 解决了这一难题。PFGE 可以用来分离相对分子质量 10 kb 到 10 Mb 的 DNA 分子。其分型的基础是大片段的插

入、缺失、重组或质粒的获得、丢失或酶切位点的点突变。MOODLEY 等^[22]应用 PFGE 技术对南非 2002—2006 年 B 群 Nm 克隆分析,发现了一个新的基因克隆 ST-4240/6688。邵祝军等^[23]则应用 PFGE 技术对中国 C 群 Nm 分离株进行分析,结果发现 AH1 是中国 C 群 Nm 主要的带型。

在流脑调查中,上述两种分子分型的运用原则:暴发调查时所有菌株进行 PFGE,挑选代表菌株进行 MLST,对于流脑特异性引物 PCR 扩增阳性的患者血清或者脑脊液未能分离到菌株的进行 MLST;个案调查时所有菌株进行 PFGE 和 MLST 分型,对于流脑特异性引物 PCR 扩增阳性的患者血清或者脑脊液未能分离到菌株的进行 MLST;健康携带情况调查及在全国范围的、长期的流行情况调查时所有菌株进行 PFGE,挑选代表菌株进行 MLST 分型。

多位点可变量数串联重复序列分析(MLVA)也是一种分子分型技术,其分型依据为 VNTR 位点的滑链突变。该方法具有较好的分辨力、重复性、分型力及可比性,操作简单,试验周期为 1 d。SHAN 等^[24]应用 MLVA 技术分析了序列型为 ST-4821 的 C 群 Nm 引起的 2010 年中国山东省的流脑疫情暴发。

2000 年日本学者发明了恒温核酸扩增技术,即环介导等温扩增技术(LAMP)。近年来该技术已成功地应用于流脑、SARS、禽流感、HIV 等疾病的检测中。LEE 等^[25]应用 LAMP 技术对脑脊液中的 Nm 进行了快速鉴定,结果表明,该方法灵敏度高(比传统的 PCR 方法高 2~5 个数量级),反应时间短(30~60 min 就能完成反应)。

蛋白质组学技术是从蛋白质水平进行生命科学研究的新方法。有疾控工作者用该方法初步探索了 Nm 部分蛋白表型特征分析。胡源等^[26]利用双向电泳技术与质谱结合的蛋白质组学技术对 66 株 C 群 Nm 菌株及 2 株参考菌株的部分外膜蛋白和 sucD 蛋白表型进行分析,根据外膜蛋白和 sucD 蛋白将实验菌株共分为 9 型,其中安徽菌株分型结果显示出了高度的一致性,而其他地区菌株分型分布则显示出高度的多态性,结果对认识安徽省流脑的流行规律和有效进行流脑疫情的防控具有重要意义。

综上所述,Nm 的实验室检测技术涉及传统的病原学检测技术、免疫学 ELISA 及不断更新的分子生物学方法,如 PCR、荧光定量 PCR、多重 PCR、LAMP 技术、MLVA 分型、MLST 技术、PFGE 分型、蛋白质组学技术等。Nm 的分子生物学方法比传统病原学检测法具有更高的特异性和灵敏度。当然各种技术并非单一的,实际工作中可能相互融合,以更好地优化 Nm 的检测分析。新的方法也有其不足之处,如

LAMP 因灵敏度高, 容易形成气溶胶污染, 由于国内大多数实验室不能严格分区, 假阳性问题可能比较严重, 因此, 引物设计要求比较高, 有些疾病的基因可能不适合使用 LAMP; 蛋白质组学技术中 2-DE 技术还不成熟, 现在有更新的色谱质谱联用法取代 2-DE 和质谱鉴定法, 对蛋白质的鉴定更准确, 将更好地服务于疾病预防控制工作中。

参考文献

- [1] 郭莹. 普通 PCR 法与细菌培养法相结合检测流行性脑膜炎奈瑟氏菌[J]. 临床合理用药杂志, 2014, 7(20): 123-124.
- [2] 徐葵花. 脑膜炎奈瑟菌菌群的研究进展[J]. 中华传染病杂志, 2008, 26(5): 313-315.
- [3] 李马超, 徐丽, 黄鑫, 等. 49 株脑膜炎奈瑟菌体外抗菌药物敏感性检测[J]. 疾病监测, 2008, 23(2): 76-79.
- [4] 冯君平, 李国晏, 谢澎, 等. 酵母浸出粉在奈瑟脑膜炎双球菌培养中的比较观察[J]. 微生物学免疫学进展, 2012, 40(5): 20-23.
- [5] 郑春早, 邵荣标, 毕诚, 等. 小牛血清培养基用于人群脑膜炎奈瑟菌带菌调查研究[J]. 疾病控制杂志, 2008, 12(5): 462-464.
- [6] 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, 2008, 7(4): 198-199.
- [7] 黄亮, 赵丽萍, 张治芳, 等. 脑膜炎奈瑟菌的 PCR 快速诊断[J]. 医学动物防制, 2013, 29(1): 13-14.
- [8] 张文艳, 王海, 胡中旺, 等. 脑膜炎双球菌的 PCR 法快速检测[J]. 中国公共卫生, 2006, 22(3): 297-298.
- [9] 徐丽, 朱兵清, 高源, 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.
- [10] 任红宇, 安淑一, 李马超, 等. 细菌性脑膜炎多重聚合酶链反应检测方法的研究[J]. 中国疫苗和免疫, 2010, 16(1): 47-51.
- [11] 熊长辉, 杨梦, 刘晓青, 等. 脑膜炎奈瑟菌检测及基因分群[J]. 中国公共卫生, 2015, 31(5): 578-580.
- [12] DIAWARA I, KATFY K, ZEROUALI K, et al. A duplex real-time PCR for the detection of *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* in cerebrospinal fluid[J]. J Infect Dev Ctries, 2016, 10(1): 53-61.
- [13] DE FILIPPIS I, DE ANDRADE C F, CALDEIRA N, et al. Comparison of PCR-based methods for the simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in clinical samples[J]. Braz J Infect Dis, 2016, 20(4): 335-341.
- [14] ZHU H, WANG Q, WEN L, et al. Development of a multiplex PCR assay for detection and genogrouping of *Neisseria meningitidis*[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(1): 46-51.
- [15] 雷永良, 陈秀英, 叶碧锋, 等. 荧光定量 PCR 用于脑膜炎奈瑟菌的快速检测[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(11): 2585-2587.
- [16] 杨艳, 汪川, 汪春梅, 等. TaqMan-MGB 探针实时荧光 PCR 检测脑膜炎奈瑟菌 *porA* 基因[J]. 现代预防医学, 2009, 36(11): 2096-2098.
- [17] 张晓春, 朱昆蓉, 黄蓉娜, 等. 实时荧光 PCR 法检测脑膜炎奈瑟菌核酸的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(5): 1007-1009.
- [18] MIRONOV K O, PLATONOV A E, DRIBNOKHODOVA O P, et al. A method for determination of *Neisseria meningitidis* serogroup A, B, C and W by real-time PCR[J]. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol, 2014(6): 35-42.
- [19] 张洪飞, 刘永跃, 李树峰, 等. 通辽市科左中旗健康人群脑膜炎奈瑟菌带菌及抗体水平监测报告[J]. 疾病监测与控制, 2010, 4(12): 658-658.
- [20] 朱水荣, 潘军航, 姚莘莘, 等. 多位点分型技术应用于浙江省脑膜炎奈瑟菌基因分型研究[J]. 中国疫苗和免疫, 2015, 21(3): 307-313.
- [21] 邓小玲, 管大伟, 黎薇, 等. MLST 分型技术应用于脑膜炎奈瑟菌的分子流行病学研究[J]. 华南预防医学, 2008, 34(3): 10-14.
- [22] MOODLEY C, DU PLESSIS M, NDLANGISA K, et al. Clonal analysis of *Neisseria meningitidis* serogroup B strains in South Africa, 2002 to 2006: emergence of new clone ST-4240/6688[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(11): 3678-3686.
- [23] 邵祝军, 任红宇, 徐丽, 等. 中国 C 群脑膜炎奈瑟菌脉冲场凝胶电泳分析[J]. 中华流行病学杂志, 2007, 28(8): 756-760.
- [24] SHAN X Y, ZHOU H J, ZHANG J, et al. Application of Multiple-Locus variable number tandem repeat analysis to identify Outbreak-Associated *neisseria meningitidis* serogroup C sequence type 4821 in China[J]. PLoS One, 2015, 10(1): e0116422.
- [25] LEE D, KIM E J, KILGORE P E, et al. Clinical evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of *Neisseria meningitidis* in cerebrospinal fluid[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0122922.
- [26] 胡源, 邵祝军, 闫笑梅, 等. C 群脑膜炎奈瑟菌部分蛋白表型特征分析[J]. 疾病监测, 2006, 21(8): 428-430.

(收稿日期: 2017-06-27 修回日期: 2017-09-18)