Rep, 2007, 8(5): 451 – 455.
[17] Long F, Zhang XM, Karp S, et al. Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation[J]. Development, 2001, 128(24): 5099 – 5108.
[18] Enomoto-Iwamoto M, Nakamura T, Aikawa T. et al. Hedgehog protein stimulate chondrogenic cell differentiation and cartilage formation[J]. J Bone Miner Res, 2000, 15(9): 1659 – 1668.
[19] Gofflot F, Hars C, Illien F, et al. Molecular mechanisms underlying limb anomalies associated with cholesterol deficiency during gestation: implications of Hedgehog signaling[J]. Hum Molec Genet, 2003, (10): 1187 – 1198.
[20] 刘振峰,方锐,孟庆才. Ⅱ型胶原酶消化法可短时间获得大量纯化大鼠关节软骨细胞[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(50): 9323 – 9326.
[21] 陈林松,史宏灿. 胰酶联合Ⅱ型胶原酶法体外分离培养软骨细胞的分析[J]. 中国医药, 2014, 9(10): 1522 – 1525.
[22] Kasper M, Schnidar H, Neill GW, et al. Selective modulation of Hedgehog/GLI target gene expression in human keratinocytes [J]. Mol Cell Biol, 2006, 26: 6283 – 6299.
[23] Regl G, Kasper M, Schnidar H, et al. Activation of the Bcl-2 promoter in response to Hedgehog/Gli signal transduction is predominantly mediated by Gli2[J]. Cancer Res, 2004, 64(21): 7724 – 7731.
[24] 王琪琳,苏玲,刘相国. Hedgehog 信号通路与肿瘤[J]. 生命的化学, 2011, 31(1): 21 – 25.
[25] Meng H, Zhang T, Liu W, et al. Sodium fluoride induces apoptosis through the downregulation of hypoxia-inducible factor-1α in primary cultured rat chondrocytes[J]. Int J Mol Med, 2014, 33(2): 351 – 358.

收稿日期: 2015-01-27 (解学魁编辑 吴少慧校对)

· 实验研究 ·

脑膜炎奈瑟菌检测及基因分群*

熊长辉,杨梦,刘晓青,徐晓倩,王鹏,袁辉

摘 要: 目的 建立多重聚合酶链反应(PCR)技术对脑膜炎奈瑟菌(Neisseria meningitidis, *Nm*)的快速诊断及分群方法。**方法** 应用多重 PCR 技术对本实验室保存的 70 株已鉴定 *Nm* 进行核酸鉴定及基因分群,同时检测 23 例流行性脑脊髓膜炎(简称流脑)疑似病例脑脊液标本中脑膜炎奈瑟菌特异性 DNA 片段。用传统的细菌培养法和血清凝集法作对照,比较其特异性。**结果** 68 株 *Nm* 的多重 PCR 检测结果与血清分群结果一致,2 株血清未能分群的 *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出 4 例为 C 群,阳性检出率为 17.39%。**结论** 多重 PCR 技术对脑膜炎奈瑟菌检测的特异性优于传统的细菌培养法以及血清凝集法。

关键词: 多重 PCR; 脑膜炎奈瑟菌; 基因分群
中图分类号: R 378.1+5 **文献标志码**: A **文章编号**: 1001-0580(2015)05-0578-03 DOI: 10.11847/zgggws2015-31-05-10

Application of multiplex PCR technology in rapid detection and genotype of Neisseria meningitidis

XIONG Chang-hui, YANG Meng, LIU Xiao-qing, et al (*Department of Infectious Disease, Jiangxi Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanchang, Jiangxi Provonce* 330029, China)

Abstract: Objective To study rapid detection and genotype of Neisseria meningitidis (Nm) using multiplex PCR detection technology. **Methods** Seventy strains of Nm were detected with multiplex PCR and the amplified Nm specific DNA fragments in cerebrospinal fluid samples from 23 suspected meningitis cases were also detected with electrophoresis; the results of the detections were compared with conventional staining on smears and bacterium separation technology. **Results** The genotyping results of 68 Nm strains were consistent with those of serotyping and 2 Nm strains undetected with serotyping were identified by multiplex PCR as group C. The positive detection rate was 30.43% by using multiplex PCR and higher than that by conventional staining on smears and bacterium separation technology (17.39%) for the detections of the 23 suspected meningitidis cases. **Conclusion** The sensitivity and specificity of multiplex PCR were higher than those of serum agglutination reaction for the identification and group-typing of Nm.

Key words: multiplex PCR; Neisseria meningitidis; genotype

流脑是由脑膜炎奈瑟菌引起的起病急,病情发展迅速,如果治疗不及时很快引起死亡的急性呼吸道传染病。建立特异、快速的脑膜炎奈瑟菌(Neisseria meningitidis, *Nm*)检测与分群方法,提高病原

* **基金项目**: 江西省卫生厅科研课题(20122004)
作者单位: 江西省疾病预防控制中心传染病所,江西 南昌 330029
作者简介: 熊长辉(1982 –),男,江西南昌人,本科,主管技师,研究方向:病原微生物和分子生物学。
通讯作者: 袁辉,E-mail: jxcdcyuanhui@126.com
数字出版日期: 2015 – 4 – 9 15:34
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20150409.1534.010.html

菌的检出率,有效控制传染源,是控制流脑流行的最有效的途径。传统细菌分离培养、染色镜检、生化鉴定和血清学分群等检测方法不但费时费力,且检测结果受抗生素使用及其他非特异性因素的影响,检出率低。而 *Nm* 至少包括 13 个血清群,全球 90% 以上的流脑病人均有 A、B、C、Y 和 W135 群引起[1]。本研究采用多重 PCR 方法同时检测及鉴别 *Nm* 的 A、B、C、Y 和 W135 5 个血清群,结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　*标准菌株及样本*　*Nm* 各群的阳性对照质控菌株(中国药品生物制品检定所)分别为 29019(A 群)、29061(B 群)、29012(C 群)、29303(Y 群)和 29057(W135 群)。阴性对照菌株为肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、流感嗜血杆菌和乳糖奈瑟氏菌(江西省疾病预防控制中心传染病所实验室分离并保存)。70 份 *Nm* 分离株(江西省近年流脑临床患者、暴发疫情及带菌者调查中带菌者分离鉴定)23 份疑似流脑病人脑脊液标本(江西省市县级疾病预防控制中心)。

1.2　*试剂与培养基*　营养琼脂、多粘菌素 B、万古霉素(北京陆桥有限公司)。卵黄双抗平板、巧克力双抗平板本实验室自配。API NH 鉴定试剂(法国梅里埃公司),脑膜炎奈瑟菌单克隆抗体诊断血清(美国 BD 公司)。Taq 酶、10 × PCR buffer、dNTP Mixture、Marker(100 bp DNA Ladder)、Marker(500 bp)、6 × Loading Buffer(宝生物工程(大连)有限公司)。PCR 引物(上海生工公司合成)。PCR 引物根据参考文献[2-4]设计(表 1)。

表 1　扩增 *Nm* 各群所用引物

引物名称	引物序列(5′→3′)	鉴定特性	扩增片段长度(bp)
Orf - 2	CGCAATAGGTGTATATATTCTTCC′CGTAATAGTTTCGTATGCCTTCTT	NmA 群	400
siaD(B)	GGATCATTTCAGTGTTTTCCACCA′GCATGCTGGAGGAATAAGCATTAA	NmB 群	450
siaD(C)	TCAAATGAGTTTGCGAATAGAAGGT′CAATCACGATTTGCCCAATTGAC	NmC 群	250
synF(Y)	ACGATATCCCTATCCTTGCCTACTGAAGCGTTTTCATTATAATTGCTAA	NmY 群	75
synG(W135)	CAGAAAGTGAGGGATTTCCATACACAACCATTTTCATTATAGTTACTGT	NmW135 群	120

1.3　*主要仪器*　微量高速离心机(德国 eppendorf 公司)、PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad 公司)、自动凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)、电泳仪(中国上海天能科技有限公司 TANONEPS-100)、超净工作台(中国苏净安泰 SW-CJ-2FD)、培养箱(日本 EYELA SLI-1200)、高速冷冻离心机(德国 SIGMA 3-18K)、生物安全柜(美国 Thermo 公司)。

1.4　*方法*

1.4.1　PCR 检测方法　挑取菌落于 100 μL 去离子水于 eppendorf 管中,放于金属裂解仪中 100 ℃ 15 min 后,12 000 r/min 离心 5 min,取上清即为 PCR 扩增模板。将脑脊液吸取 100 μL 于 eppendorf 管中,放于金属裂解仪中 100 ℃ 15 min 后,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液用于 PCR 扩增。反应总体积 25 μL,在 200 μL 管中依次加入:10 × buffer 2.5 μL;dNTPS(每种 dNTP 溶液浓度为 2.5 mmoL/L) 2 μL;引物每条 1 μL(终浓度 1 μmoL/L);Taq 酶 0.5 μL(5 U/μL);超纯水 8 μL;模板 2 μL。以阳性对照质控菌株作阳性对照,肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、流感嗜血杆菌和乳糖奈瑟氏菌作阴性对照。反应程序:94 ℃ 5 min,变性模板 DNA;然后 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 3% 琼脂糖凝胶电泳,500 bp 和 100 bp DNA Ladder Marker 作参照。

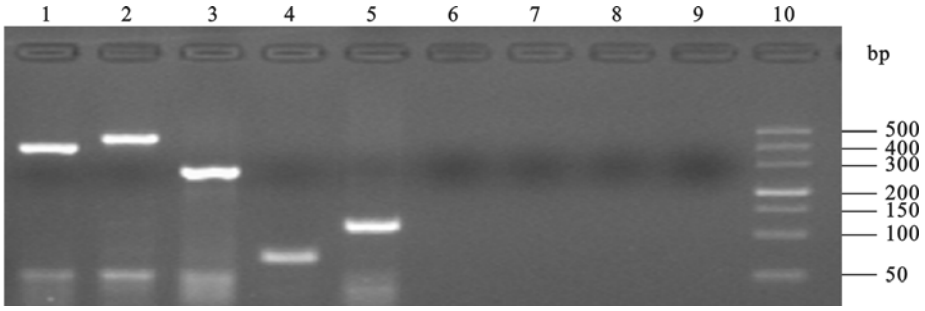
1.4.2　传统的细菌培养法和血清凝集法　取 50 μL 脑脊液直接接种于巧克力培养基,37 ℃ 5% ~10% CO_2 环境中培养 18 ~ 24 h,观察细菌生长情况,挑取可疑菌落作氧化酶试验、革兰染色筛选,再采用 API NH 生化鉴定至种,采用 A、B、C、Y、W135 各群单克隆抗体血清分型。血清凝集分群按常规玻片凝集方法进行。

2　结果

2.1　PCR 检测结果　70 株 *Nm* 经多重 PCR 检测结果为 8 株 A 群,12 株 B 群,48 株 C 群和 2 株 W135 群,68 株与血清分群结果一致。2 株血清未能分群的菌株多重 PCR 检测结果为 C 群。检出率分别为 100% 和 97.14%。23 例流脑疑似病人的脑脊液标本 5 份检出 NmC 群 siaD(C) 基因,1 份检出 NmA 群 Orf - 2 基因,1 份检出 NmB 群 siaD(B)基因。

2.2　*传统的细菌培养法和血清凝集法结果(图 1)*　23 例流脑疑似病人的脑脊液标本作细菌培养,4 份脑脊液标本培养出可疑脑膜炎奈瑟氏菌。经染色均为革兰阴性双球菌,氧化酶试验阳性,葡萄糖、麦芽糖均(+),蔗糖、乳糖、果糖均(-),血清学分群鉴定确认 4 株可疑菌株均为 C 群脑膜炎奈瑟氏菌,与多重 PCR 检测结果一致。多重 PCR 和病原分离培养检出率分别为 30.43% 和 17.39%。*Nm* 菌各群的特异基因均能准确的确定实验所检测的 *Nm* 菌株的血清群,作为对照的其他群 *Nm* 和阴性对照的金黄

色葡萄球菌、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌及乳糖奈瑟氏菌菌株均为阴性。



注：10：Marker；1 ~ 9 依次为：NmA、NmB、NmC、NmY、NmW135、肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、流感嗜血杆菌和乳糖奈瑟氏菌

图 1　多重 PCR *Nm* 各群的阳性对照质控菌株和阴性对照菌株扩增情况

3　讨　论

中国流脑的流行一直以 A 群为主，2003 年以后开始出现 C 群流脑的暴发和局部地区的流行，近年来一些地区也出现了 B 群、X 群、W135 群等感染病例的报道[5-7]。A 群和 C 群 *Nm* 感染可以通过疫苗接种进行预防，但是其它血清群的 *Nm* 尚无相应的疫苗，目前只能通过提前用药进行预防，因此，为了采取正确的防治措施，在流脑的诊断中有必要对 *Nm* 进行分群检测，这也有助于掌握 *Nm* 的血清群流行情况，以便针对性地接种或研发疫苗。快速检测和鉴定病原菌及分群，是及时有效地诊断、控制与预防流脑传播的重要手段。经典的检测方法包括增菌、分离培养、生化或血清学鉴定。这些方法操作繁琐、费时，也受到许多因素的影响，容易造成漏检。而且，对于那些在采样之前接受过抗生素治疗的病例，病原分离率会有一定程度的降低，另外，样品质量、培养条件、诊断血清的质量等一些因素也能影响培养阳性率。普通 PCR[8] 对 *Nm* 的鉴定及分群是传统方法的一个飞越，但是对 *Nm* 的鉴定及分群时需要对每个血清群配置一个反应体系，即一个实验仅能对一个靶基因进行分析，操作时比较麻烦。虽然有人研发了荧光 PCR[9-11]，但是此方法对设备的要求较高，购买昂贵，实验室难以普及。

多重 PCR 以其突出的优越性得到了广泛的应用，自 1988 年 Chamberlian 等[12] 首次提出这一概念起，多重 PCR 技术已被广泛应用于核酸诊断的许多领域，包括基因敲除分析[13]、突变和多态性分析[14]、定量分析以及 RNA 检测等。在感染性疾病领域，多重 PCR 技术也已经显示出它的价值。普通 PCR 及多重 PCR 对 *Nm* 基因分群的目的是了解其血清群，大多数情况下，与血清分群结果一致，但也有少数菌株，因为群特异性基因中有缺失、插入或滑移错配，使其荚膜不能正常表达，表现为血清不可分群，而这种基因序列的改变未能通过基因分群体现出来，因此出现了基因群与血清群不一致的情况[15-16]。

参考文献

[1] Stephens DS. Conquering the meningococcus[J]. FEMS Microbiol Reviews, 2007, 31: 3 - 14.
[2] Borrow R, Claus H, Guiver M, et al. Non-culture diagnosis and serogroup determination of meningococcal B an d C infection by a sialyltransferase (siaD) PCR ELISA[J]. Epidemiol Infect, 1997, 118: 111 - 117.
[3] Fraisier C, Stor R, Tenebray B, et al. Use of a new single multiplex PCR-based assay for direct simultaneous characterization of six Neisseria meningitidis serogroups[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2009: 2662 - 2666.
[4] Mlling P, Jacobsson S, Backman A, et al. Direct and rapid identification and genogrouping of meningococci and porA amplification by Light Cycler PCR[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40: 4531 - 4535.
[5] Shao Z, Li W, Ren J, et al. Identification of a new Neisseria meningitidis serogroup C clone from Anhui province, China[J]. Lancet, 2006, 367(9508): 419 - 423.
[6] 汤健闻，梁华庆，吕冬艳. 1962 - 2005 年百色市流脑流行趋势分析[J]. 应用预防医学，2006，12(2)：102 - 103.
[7] 徐丽. 我国流脑发病的形势与预防[J]. 疾病监测，2002，(2)：74.
[8] 熊长辉，杨梦，袁辉，等. PCR 技术在流行性脑脊髓膜炎诊断中的应用研究[J]. 中国热带医学，2009，9(9)：1660 - 1661.
[9] Thomas JD, Hatcher CP, Satterfield DA, et al. sodC-based real-time PCR for detection of Neisseria meningitidis[J]. PLoS One 2011, 6: 319 - 321.
[10] Mothershed EA, Sacchi CT, Whitney AM, et al. Use of real-time PCR to resolve slide agglutination discrepancies in serogroup identification of Neisseria meningitidis[J]. Clin Microbiol, 2004, 42: 320 - 328.
[11] 杨艳，汪川，苏红卫，等. 脑膜炎奈瑟菌荧光定量 PCR 法检测[J]. 中国公共卫生，2009，25(9)：1086 - 1087.
[12] Chamberlain JS, Gibbs RA, Rainer JE, et al. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification[J]. Nucleic Acids Res, 1988, 16(23): 41 - 56.
[13] Gannon VP, King RK, Kim JY, et al. Rapid and sensitive method for detection of shiga-like toxin producing *Escherichia coli* in ground beef using the polymerase chain reaction locus via multiplex DNA amplification[J]. Appl Environ Microbiol, 1992, 58(12): 3809 - 3815.
[14] Rithidech KN, Dunn JJ, Gordon CR. Combining multiplex and touchdown PCR to screen murine microsatellite polymorphisms[J]. Biotechniques, 1997, 23(1): 36, 40, 42, 44.
[15] Dolan-Livengood JM, Miller YK, Martin LE, et al. Genetic basis for nongroupable Neisseria meningitids[J]. Infect. Dis, 2003, 187: 1616 - 1628.
[16] Wber MV, Claus H, Maiden MC, et al. Genetic mechanisms for loss of encapsulation in polysialyltransferase-gene-positive meningococci isolated from healthy carriers[J]. Med Microbiol, 2006, 296(7): 475 - 84.

收稿日期： 2014-06-04　　（吴少慧编校）

中国公共卫生 CPH