

## 急性呼吸系统疾病暴发疫情多重巢式 PCR 检测分析\*

张洁<sup>1</sup>, 姚文清<sup>1</sup>, 刘敏<sup>1</sup>, 陈静乙<sup>2</sup>, 田疆<sup>1</sup>, 孙英伟<sup>1</sup>, 赵卓<sup>1</sup>

**摘要:**目的 对 3 起不明原因的聚集性急性呼吸系统疾病暴发疫情的标本进行多重巢式 PCR 检测, 及时筛查 SARS 病毒、高致病性禽流感 H5N1 亚型病毒并检测其他亚型流感病毒、副流感病毒、支原体、肺炎衣原体等病原体, 探讨该方法在聚集性急性呼吸系统疾病调查中的应用意义。方法 采用多重巢式 PCR 方法对 3 起疫情的咽拭标本进行可引起急性呼吸系统疾病的 23 种病原体进行筛查。结果 医院甲不明原因肺炎聚集性病例 9 例, 对 9 例咽拭标本进行筛查, 肺炎衣原体感染 6 例; 学校乙不明原因肺炎聚集性病例 69 例, 对 13 份咽拭标本进行检测, B 型流感嗜血杆菌(HIB)感染 7 例; 学校丙不明原因肺炎聚集性病例 12 例, 对 12 份咽拭标本进行检测, HIB 感染 5 例。结论 多重巢式 PCR 方法可快速有效地筛查引起聚集性急性呼吸系统疾病暴发疫情的病原体, 为有效遏制疫情及进一步处理提供线索。

**关键词:** 多重巢式 PCR 技术; 肺炎衣原体; B 型流感嗜血杆菌(HIB)

中图分类号: R 56

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)11-1455-03

## Application of multiplex RT-nested PCR in pathogen screening for outbreak of acute respiratory system diseases

ZHANG Jie\*, YAO Wen-qing, LIU Min et al. (\* Department of Infection and Communicable Disease Control, Liaoning Provincial Center for Disease Control and Prevention, Shen-yang, Liaoning Province 110005, China)

**Abstract: Objective** To explore the application of multiplex reverse transcription(RT) nested PCR in the screening of pathogens related to epidemic outbreak of acute respiratory system diseases. **Methods** Totally 34 oropharyngeal swab specimens were collected from the cases of 3 epidemics of acute respiratory diseases and detected with multiplex RT-nested PCR for 23 pathogens related to the diseases. **Results** There were 9 cases of unknown pneumonitis happened in hospital A. *Chlamydia pneumoniae* was detected among 66.7% of the cases. There were 13 cases of unknown pneumonitis in school B and hemophilic influenzae B was detected in 7 cases(53.8%). There were 12 cases of unknown pneumonitis in school C and hemophilic influenzae B was detected in 5 cases(41.7%). **Conclusion** Multiplex RT-nested PCR is a rapid and highly efficient method to screen the pathogens related to epidemic outbreak of acute respiratory system disease.

**Key words:** multiplex RT-Nested PCR; *Chlamydia pneumoniae*; hemophilic influenza B

急性呼吸系统疾病症状特异性不强, 致病病原体种类繁多, 应用传统检测方法费时费力。多重巢式 PCR 技术特异性强、敏感性高, 检测快速, 一次 PCR 反应可同时检测、鉴别出多种病原体。当急性呼吸系统疾病疫情暴发时, 应用多重巢式 PCR 技术核酸检出率高的病原体很大程度上提示暴发疫情可能是该病原体引起。本研究采用的多重巢式 PCR 技术, 可快速筛查严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)、人禽流感及其他传染性呼吸道疾病病原体, 为聚集性急性呼吸系统疾病早期预警和疫情的调查处理提供科学依据和针对性措施<sup>[1]</sup>。

## 1 对象与方法

1.1 对象 采集 3 起(医院甲、学校乙、学校丙)聚集性急性呼吸系统疾病患者(腋下体温  $\geq 37.3$  °C, 同时伴有咳嗽、流涕、咽痛等呼吸系统感染症状之一者, 或 X 线检查显示有肺部感染表现者)咽拭子标本合计 34 份进行实验室检测。

1.2 仪器与试剂 基因扩增仪(EDC-810, 北京东胜创新生物科技有限公司), 电泳系统(BIO-RAD, 美国), 凝胶成像系统(UVP, 美国), 低温离心机(SIGMA 3-48K, 德国), Qiagen Rnasy Mini Kit、Qiagen one step RT-PCR Kit(Qiagen, 德国), Promega Access RT-PCR System、Promega Rnasin Plus Rnase Inhibitor、低熔点琼脂糖(Promega, 美国), Transgen Biotech 2 × Trans Taq HiFi PCR Super Mix(Transgen, 中国), X174-Hinc digest DNA Marker(TaKaRa, 日本), Sero CPTMIgG、IgM 抗体 ELISA 试剂盒(SAVYON, 以色列)。

## 1.3 检测方法

1.3.1 核酸的提取 参见 Qiagen Rnasy Mini Kit 说明书, 提取核酸 -70 °C 保存待用。

\* 基金项目: 国家重大传染病科技重大专项项目(2009ZX1004-209); 辽宁省卫生安全评价重大实验室项目(2007403016)

作者单位: 1. 辽宁省疾病预防控制中心感染与传染性疾病预防控制所, 辽宁 沈阳 110005; 2. 中国医科大学

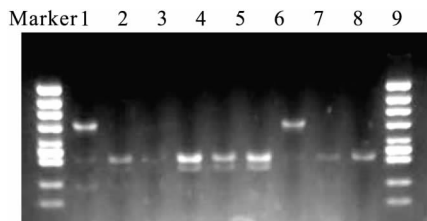
作者简介: 张洁(1981-), 女, 辽宁大连人, 主管医师, 硕士, 主要从事传染病病原微生物研究工作。

通讯作者: 赵卓, E-mail: zhaozhuo@lncdc.com

1.3.2 多重巢式 PCR 甲型流感病毒、乙型流感病毒、丙型流感病毒和呼吸道合胞病毒 A、B 亚型为第 1 组,鼻病毒、副流感病毒 1~4 型、肠道病毒和冠状病毒(OC43、HcoV-229E)为第 2 组,支原体、衣原体、链球菌、B 型流感嗜血杆菌(hemophilus influenzae B, HIB)为第 3 组,水痘-带状疱疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒、肠道病毒为第 4 组,呼肠病毒为第 5 组,偏肺病毒为第 6 组。每个样本提取核酸后分别进行上述 6 组多重巢式 PCR 反应,PCR 产物进行低熔点琼脂糖电泳,根据 X174-Hinc digest DNA Marker,判断产物片段大小<sup>[2-8]</sup>。

## 2 结果

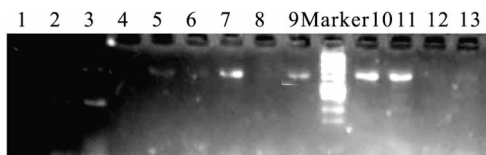
2.1 医院甲检测结果(图 1) 医院甲 9 份咽拭标本经巢式 RT-PCR 检测,仅第 3 组电泳有目的条带检出,分别为肺炎衣原体核酸检出率为 66.67% (6/9),HIB 核酸检出率为 22.22% (2/9),其他病原体未检出。对 9 例患者及 14 位密切接触者共 23 份急性期血清进行衣原体 IgM 和 IgG 抗体检测,结果 IgM 抗体阳性检出 8 份,其中患者 IgM 抗体阳性检出 6 份,密切接触者 IgM 抗体阳性检出 2 份;IgG 抗体阳性 22 份,患者 IgG 抗体阳性检出 8 份,密切接触者 IgG 抗体全部为阳性。



注: Marker 条带从上往下依次为: 1 057、770、612、495、392、341、291、210、162 bp。2、4、5、6、8、9 号条带为肺炎衣原体,约 368 bp; 1、7 号条带为 HIB,约 538 bp。

图 1 医院甲标本电泳结果

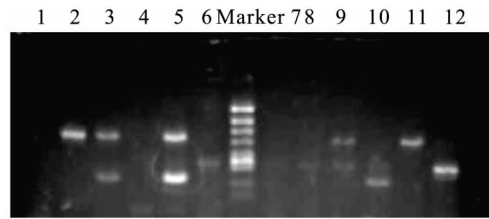
2.2 学校乙检测结果(图 2) 学校乙 13 份患者咽拭标本检测结果为 HIB 核酸检出 7 份,肺炎链球菌核酸检出 2 份,其他病原体未检出。



注: Marker 条带同图 1; 2、3、5、7、9、10、11 号条带为 HIB,约 538 bp; 2、3 号条带为肺炎链球菌,约 229 bp。

图 2 学校乙标本电泳结果

2.3 学校丙检测结果(图 3) 学校丙 12 份患者咽拭标本检测结果为 HIB 核酸检出 5 份,肺炎链球菌核酸检出 3 份,其他病原体未检出。



注: Marker 条带同图 1; 2、3、5、9、11 号条带为 HIB,约 538 bp; 3、5、10 号条带为肺炎链球菌,约 229 bp。

图 3 学校丙标本电泳结果

## 3 讨论

人类初次感染肺炎衣原体时,约在发病 3 周后出现 IgM 抗体,6~8 周出现 IgG 抗体,再次感染或重复感染后,常在 1~2 周内出现较高水平的 IgG 抗体<sup>[9]</sup>。医院甲暴发疫情中,患者 IgM 抗体阳性结果与核酸检出结果基本一致,提示可能是肺炎衣原体的现症感染;患者和密切接触者的 IgG 抗体阳性率高达 95.65%,说明可能有肺炎衣原体的既往感染史。多重巢式 PCR 技术与血清学检测方法相结合,进一步提示肺炎衣原体可能是导致这起疫情暴发的主要原因。通常认为 HIB 只感染儿童,青少年感染 HIB 少有报道,本研究从学校乙、丙 2 次疫情中检测出由 HIB 导致的学生感染暴发疫情,但由于 HIB 培养条件较为特殊,患者咽拭未能进行细菌学培养,实验室结果也提示应在今后工作中增加细菌学培养,进一步明确病原微生物。肺炎链球菌是条件致病菌,40% 的健康人鼻咽部有寄生,当环境发生变化时才感染致病<sup>[10]</sup>。学校乙、丙 2 起疫情均检出肺炎链球菌,可能是由于机体免疫力低下或合并其他感染时,引起肺炎症状。

本研究应用多重巢式 PCR 技术,在急性呼吸系统疾病疫情暴发后,及时对采集的标本检测,相关地区主管部门和卫生行政机构得到及时反馈的实验结果后,积极采取针对性诊疗和预防措施,均使疫情得到有效的控制。

## 参考文献

- [1] 刘敏,姚文清,孙佰红,等.沈阳市类流感样病例病原检测分析[J].中国公共卫生,2009,25(1):104-105.
- [2] 刘敏,姚文清,孙英伟,等.辽宁省急性呼吸系统疾病监测结果分析[J].中国公共卫生,2009,25(4):387-388.
- [3] Wagner MM, Tsui FC, Espino JU, et al. The emerging science of very early detection of disease outbreaks[J]. J Public Health Man Pra, 2001, 7: 51-59.
- [4] Coiras MT, Pérez-Brefña P, Garcia ML, et al. Simultaneous detection of influenza A, B and C viruses, respiratory syncytial virus and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested-PCR assay[J]. J Med Virol, 2003, 69(1): 132-144.
- [5] Coiras MT, Aquilar JC, Garcia ML, et al. Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays[J]. J Med Virol, 2004, 72(3): 484-495.

- [6] Gröndahl B, Puppe W, Hoppe A, et al. Rapid identification of nine microorganisms causing acute respiratory tract infections by single-tube multiplex reverse transcription-PCR: feasibility study [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(1): 1-7.
- [7] Gruteke P, Glas AS, Dierdorp M, et al. Practical implementation of a multiplex PCR for acute respiratory tract infections in children [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(12): 5596-5603.
- [8] Leary TP, Erker JC, Chalmers ML, et al. Detection of mammalian reovirus RNA by using reverse transcription-PCR: sequence diversity within the  $\lambda 3$ -encoding L1 gene [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(4): 1368-1375.
- [9] Marrie TJ. Chlamydia pneumoniae [J]. Thorax, 1993, 48: 1-4.
- [10] 张雪梅. 肺炎链球菌转化对细菌毒力和耐药性影响的研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学博士学位论文, 2003.

收稿日期: 2011-07-26

(韩仰欢编辑 周欣琳校对)

## • 实验研究 •

## 番茄红素对铁负荷大鼠抗氧化功能影响\*

王瑞<sup>1</sup>, 张红<sup>2</sup>, 吴博<sup>1</sup>, 冯彦红<sup>1</sup>, 刘重斌<sup>1</sup>

**摘要:**目的 探讨番茄红素对铁负荷大鼠抗氧化功能保护作用。方法 36 只 SD 大鼠按体重随机分为空白对照、铁负荷、番茄红素、番茄红素高、中、低剂量干预 6 组, 每组 6 只, 持续饲喂 6 周后, 取血和肝、肾、脾、心和结肠组织测定铁含量、总铁结合力; 测定血清和组织中丙二醛(MDA)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、过氧化氢酶(CAT)及谷胱甘肽-S 转移酶(GST)活性。结果 高剂量番茄红素干预组大鼠血清、肝、脾、心脏和结肠组织中铁含量分别为(19.06 ± 2.1)  $\mu\text{mol/L}$ 、(25.67 ± 2.7)  $\mu\text{g/g}$ 、(38.30 ± 4.8)  $\mu\text{g/g}$ 、(17.30 ± 2.6)  $\mu\text{g/g}$  和(12.08 ± 2.9)  $\mu\text{g/g}$ , 与铁负荷组比较, 高剂量番茄红素干预组大鼠组织中铁含量明显下降, 血清总铁结合力明显增加, MDA 含量明显下降, T-SOD 活性明显上升, 血清、心脏、肝和结肠 CAT、GST 活性明显上升( $P < 0.05$ )。结论 番茄红素能有效清除体内自由基, 增强机体抗氧化能力。

关键词: 番茄红素; 铁负荷; 氧化应激; 大鼠

中图分类号: R 151.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)11-1457-03

## Protective effects of lycopene on oxidative stress in iron overload rats

WANG Rui\*, ZHANG Hong, WU Bo, et al. (\* Department of Physiology, School of Basic Medicine, Wenzhou Medical College, Wenzhou Zhejiang Province 325035, China)

**Abstract: Objective** To examine protective effects of lycopene on oxidative stress. **Methods** Thirty-six SD rats were randomly divided into control, iron, lycopene, iron + high lycopene, iron + medium lycopene, and iron + low lycopene group (6 rats in each group) and fed for 6 weeks. The iron concentration and total iron-binding capacity (TIBC) in serum and liver, kidney, spleen, heart, and colon tissue of the rats were determined. At the same time, the levels of malondialdehyde (MDA), total superoxide dismutase (T-SOD), catalase (CAT), and glutathione S-transferase (GST) were measured. **Results** In iron + high lycopene group, iron concentrations of serum and liver, spleen, heart, and colon tissue were 19.06 ± 2.1  $\mu\text{mol/L}$ , 25.67 ± 2.7, 38.30 ± 4.8, and 12.08 ± 2.9  $\mu\text{g/g}$ . In the high lycopene group, the serum iron decreased significantly; the serum TIBC increased significantly; the content of MDA decreased significantly; the activity of T-SOD increased significantly; and the activities of CAT and GST in serum, heart, liver, and colon increased significantly compared to those of the iron load group ( $P < 0.05$  for all). **Conclusion** The results suggest that lycopene prevents iron-induced oxidative stress with its potent free radical scavenging and antioxidant properties.

**Key words:** lycopene; iron load; oxidative stress; rat

番茄红素是植物中所含天然色素, 为机体最强的抗氧化剂之一<sup>[1-2]</sup>。元素铁由于其独特化学反应活性, 在能量代谢、细胞增殖和 DNA 修复中起着重要作用<sup>[3]</sup>。而机体过多自由铁却通过催化 fenton

反应生成具有高度反应活性的羟自由基, 导致氧化应激, 从而损害机体一些基本成分, 如脂质、蛋白、DNA 等, 最终导致细胞损伤和凋亡<sup>[4-5]</sup>。目前, 有关番茄红素对机体铁代谢作用以及对铁负荷大鼠氧化应激是否有保护作用文献较少。本研究通过构建慢性铁负荷大鼠模型, 同时饲喂不同剂量番茄红素, 探讨番茄红素对慢性铁负荷大鼠抗氧化功能影响, 为人体铁负荷相关疾病干预提供实验依据。

## 1 材料与方法

## 1.1 主要试剂与仪器 丙二醛(malondialdehyde,

\* 基金项目: 浙江省自然科学基金(Y2110388); 浙江省科技厅公益性应用研究项目(Y2011C37091); 温州市科技项目(Y20100330)

作者单位: 1. 温州医学院基础医学院生理教研室, 浙江温州 325035; 2. 湖州师范学院医学院

作者简介: 王瑞(1987-), 女, 湖南岳阳人, 硕士在读, 研究方向: 营养生理。

通讯作者: 刘重斌, E-mail: liuchongbin1972@126.com