

# 多聚酶链反应用于布鲁氏菌病病人诊断的流行病学评价

唐浏英<sup>1</sup> 邱海燕<sup>1</sup> 李元凯<sup>1</sup> 张伟<sup>1</sup> 尚德秋<sup>1</sup>(指导)  
胡德育<sup>2</sup> 张福利<sup>2</sup> 刘冬立<sup>2</sup> 李巧林<sup>3</sup> 王进<sup>3</sup> 李秋芬<sup>3</sup>

**摘要** 我们首次用分子生物学方法(PCR)对布病暴发流行的疫区—陕西省绥德县义合乡和满堂川乡 54 例布病病人和 36 例对照进行了研究,发现以 SAT1:100<sup>++</sup>为诊断标准诊断的布病病人中,PCR 的阳性率为 75%,而生活环境相同的以相同的标准判定的对照人群 PCR 的阳性率是 56.7%,二者差异显著, $P < 0.05$ 。两组人群 RBPT 的阳性率分别是 96.3%和 30.6%。同时,我们还检查了免疫组 8 人,免疫时间从一个月到 32 年不等,PCR 和 RBPT 的阳性率分别是 100%和 87.5%。对急性、亚急性和慢性期布病病人 PCR 的阳性率进行统计学处理,结果  $P > 0.10$ ,差异不显著。这表明:以查抗体为主的血清学结果与感染或免疫的时间长短有关,而检查靶 DNA 的 PCR 方法则不受感染病期或免疫时间的影响。

**关键词** 布鲁氏菌病 分子流行病学 PCR

**The Epidemiologic Value of Polymerase Chain Reaction to the Diagnosis of Brucellosis Patients**  
*Tang Liu-ying\*, Qiu Hai-yan, Li Yuan-kai, et al. \* Institute of Epidemiology & Microbiology, Chinese Academy Preventive Medicine, Beijing 102206*

**Abstract** PCR was used to test fifty-four brucellosis patients and thirty-six healthy people as controls, who were all from Man Tang Chuan and Yi He communities, Sui De county, Shan Xi Province, where brucellosis out-break was occurred in 1996. The diagnostic titres of SAT for brucellosis patients was set 1:100<sup>++</sup>. The positive rates of PCR in patients and controls were 75% and 65.7% respectively, comparing with the positive rates of RBPT 96.3% and 30.6% in the same two groups. At the same time, we also detected eight people who had received immunization one month to thirty-two years ago, with positive rates for PCR and RBPT 100% and 87.5% respectively. The results showed that there was no significant diversity of PCR results among acute, subacute and chronic brucellosis patients. It was revealed that the serological results were related to the course of disease, but the results came out of PCR method which was used to detect target DNA was not influenced by the course of disease.

**Key words** Brucellosis Molecular Epidemiology PCR

近 10 年来,分子生物学方法被引入细菌感染的流行病学研究中来。分子生物学技术比表型法的优点要多,因为它们更敏感和特

异,而且同一种方法只要稍加改进便可应用于广泛范围的微生物病原体的研究。一些分子生物学手段已经被用于细菌的流行病学研究,这其中包括结合或不结合限制性内切酶消化的质粒谱、染色体 DNA 的限制性长度多态性分析(RFLP)、PCR 结合 RFLP、以及 PCR 结合随意引物(arbitrary primers AP—

1 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 北京 102206

2 陕西省卫生防疫站

3 陕西省绥德县卫生防疫站

PCR)<sup>[1,2]</sup>。

布病的流行病学调查相当困难,表型特征如培养特性、代谢特征、抗原特性和噬菌体的敏感性,常用于研究细菌性的暴发流行,但是由于布氏菌生长缓慢及严格的氧化代谢,研究起来非常困难。通常,布氏菌分成6个种,羊种、牛种、猪种、犬种、绵羊附睾种和沙林鼠种布氏菌。每个种都有一个参考的哺乳动物宿主。分子生物学技术的出现对表型提出了质疑,用DNA-DNA杂交法测定出所有布氏菌种核酸序列的同源性相当高,以致于Verger<sup>[3]</sup>等人建议布氏菌分成一个种。但是,目前仍然沿用传统的6个种的分类法。

### 对象与方法

一、检查方法: SAT RBPT 按一般操作进行; PCR 方法及引物的序列见参考文献<sup>[4]</sup>。

二、人群选择: 我们收集了98份血清,其中布病病人共54人,正常对照36人,免疫组8人。病人中21例为急性期,23例为亚急性期,10例慢性期布病病人。对调查的每一个人都由专业人员填写“人间布病流行病学个案调查表”。

### 结 果

我们对每份血样分别用 SAT、RBPT 和 PCR 方法进行检查,并对 PCR 检查的阳性率进行统计学处理,结果列于附表中(SAT 1 : 100<sup>++</sup>作为布病病人的诊断标准,结果未列于表中)。

附表 调查人群 PCR 和 RBPT 阳性率的比较

	检查人数	RBPT		PCR	
		阳性数	阳性率 (%)	阳性数	阳性率 (%)
对照组①	36	11	30.6	18	56.7*
免疫组	8	7	87.5	8	100
急性期病人②	21	21	100	12	63.9**
亚急性期病人③	23	22	95.7	16	70.0
慢性期病人④	10	9	90.0	8	80.0
病人合计⑤	54	52	96.3	36	75.0

\* 对照组有4例未做 PCR; \*\* 急性期有2例未做

PCR

PCR 检查的阳性率统计学处理结果: ⑤与①:  $\chi^2 = 2.947$   $P < 0.01$ , 差异显著; ②与③:  $\chi^2 = 0.29$   $P > 0.1$ , 差异不显著; ②与④:  $\chi^2 = 1.545$   $P > 0.1$ , 差异不显著; ③与④:  $\chi^2 = 0.38$   $P > 0.1$ , 差异不显著。

### 讨 论

我们实验室用细菌鉴定的一系列步骤对分离培养的两株菌最后定为羊种布氏菌生物3型(B. melitensisbv. 3), 因为我们的 PCR 引物是属特异性的, 不能区分种和型, 所以对分型不能进一步分析, 只是对血清学方法和 PCR 方法对病人的诊断做一个粗略的比较。我们所选的对照人群是生活条件及工作环境与布病病人是相似的, 只是用 SAT 1 : 100<sup>++</sup>的标准不能诊断为布病病人, 对照组的 PCR 阳性率为 56.7%, 我们认为与血清学检查一样(RBPT 阳性率为 30.6%), 因为是疫区, 有部分检查阳性。有防疫站的部分防疫人员, 并未感染布氏菌, 各项血清学反应结果均为阴性, 而 PCR 结果阳性, 可能是自然免疫所致。

本次调查病人 PCR 的阳性率为 75%, 并非象实验室感染动物实验结果那么高(动物 PCR 阳性率为 100%)。我们认为, 根据目前对布病发病机理的研究水平, 在不同的感染阶段, 布氏菌的定居位置不一样。布氏菌侵入机体, 突破粘膜屏障后, 在侵入局部生存; 然后进入吞噬细胞, 并进行增殖; 进入血液; 最后再全身泛化, 主要寄居于脾、肝、骨髓、淋巴结、肾和子宫(睾丸)<sup>[5,6]</sup>。我们所用的 PCR 方法是检查血液中布氏菌靶 DNA, 主要是破碎的中性白细胞及血单核细胞, 因而, 对不同病期的病人不可能 100% 检查阳性, 而且, 多数病人都进行过 1~2 个疗程的治疗, 病人的转归也各不相同。这也说明单纯的 PCR 方法用于疫区流行病学调查的局限性。同时, 我们还发现 PCR 方法不能区分感染和免疫, 而且不同病期差别不大。我们所选的免疫组人员, 免疫时间从 1 个月到 32 年不等, PCR 结果为 100% 阳性, 然而, 急性期、亚急性期和慢

性期病人的 PCR 阳性率没有显著性差异,  $P > 0.1$ 。

值得一提的是, Ghassan<sup>[7]</sup>等人对所收集的血样用 Ficoll-Hypaque 把外周单核细胞与其它血细胞分离后, 对其进行扩增, 他们第一次扩增的产物并非清晰可见, 需要对 PCR 产物再扩增, 才得到清晰的电泳谱带。在我们所扩增的 72 份阳性的样品中, 仅有 6 份第一次扩增后, 电泳带模糊, 第二次扩增才见清晰。其余的均十分清晰, 说明我们的血处理方法是可行。

我们认为, PCR 方法的优势在于病人的早期临床诊断。需要对这方面的资料进行补充研究。

参 考 文 献

1 Welsh J and McClelland M. Fingerprinting genomes using

PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Res*, 1990, 18: 7213-7218.

2 Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*. 1990, 18: 6531-6535.

3 Verger JM, Grimont F, Grimont PA, et al. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int J. Syst. Bacterio*, 1985, 35: 292-295.

4 唐浏英, 尚德秋, 李元凯, 等. 应用分子生物学技术检测布氏菌抗原的研究 I 聚合酶链反应检测布氏菌抗原的研究. *中国地方病防治杂志*, 1995, 10: 199.

5 布鲁氏菌病的免疫和发病机理的研究. 尚德秋主编. *中华流行病学杂志编辑部编辑*, 1987, P41.

6 动物布鲁氏菌病. 尚德秋主编. 北京: 科学技术文献出版社, 1992, P56.

7 Ghassan MM, Issam AK and Alex MA. Rapid Laboratory Confirmation of Human Brucellosis by PCR Analysis of Target Sequence on the 31-kilodalton *Brucella* Antigen DNA. *J. Clin Micro*, 1996, 34(2): 477-478.

(收稿: 1996-11-01 修回: 1996-11-07)

## 北京市崇文区 1991~1995 年被犬、猫等动物咬伤 人群的流行病学分析

鲍亚范 胡端萍

一、1991~1995 年全区被犬、猫等动物咬伤 5 367 人, 咬伤率为 0.25%。咬伤率 1991 年为 0.18%, 到 1994 年为 0.37%, 较 1991 年增加一倍。呈逐年上升趋势。1995 年北京市颁布和执行《养犬管理条例》后, 咬伤率为 0.19%, 较 1994 年下降 49%。

二、从性别看, 5 年内男性咬伤率为 0.29%, 女性为 0.20%, 两者差别显著 ( $P < 0.001$ ); 男女间咬伤率增长速度不同, 1994 年比 1991 年男性增加一倍, 而女性增加三倍。1995 年男、女咬伤率均与 1992 持平。

三、从年龄看: 被咬伤人群以 8~14 岁咬伤率最高, 为 0.78%, 60 岁以上人群咬伤率最低, 为 0.11%, 各年龄组咬伤率差别非常显著 ( $P < 0.001$ )。

四、被咬伤人群以中小學生为多, 咬伤率为 0.63% (占 33.04%), 工人最低为 0.20% (占

27.9%), 所占比例最小的为干部 (占 11.96%)。各职业之间咬伤率差别也非常显著 ( $P < 0.001$ )。

五、被咬伤的部位以手部为最多, 占全部咬伤的 52.70%, 其次是下肢, 占 29.44%。多部位同时咬伤较少, 占 1.19%。

六、被咬伤时间分布: 5~10 月被咬伤人数较多, 占咬伤总数的 60.11%, 其中 7 月最高, 占 11.18%, 12 月份最低, 占 5.34%。

七、被咬伤后注射狂犬病疫苗的时间以咬伤当天注射者人数最多, 占 45.05%, 三日内注射者占 91.34%, 有 39 人注射时间在 30 天以上, 占 0.73%, 其中最长者 2 年。

八、伤人的动物以犬为主, 占全部动物的 72.48%, 其中有 5 例为疑似狂犬咬伤。其他动物猫鼠等占 27.52%。被咬伤者中尚未发现狂犬病患者。

由此可见, 在咬伤人群中, 男性多于女性, 并以 8~14 岁学生为多, 与该人群接触犬等动物机会多有关, 提示我们此人群应为今后预防的重点对象。

(收稿: 1997-02-19)