

· 论著摘要 ·

随机扩增多态性 DNA 在院内感染性肺炎
逆行感染途径研究中的应用

代芊 邓宏 黄汉朝

关于院内感染性肺炎(NP)是否存在胃→咽→下呼吸道的逆行感染途径尚缺乏基因组 DNA 水平上的确凿证据。1998年6月至1999年3月选择三所教学医院脑外科、神经内科行气管切开或插管的患者,按全国医院感染监控中心制订的诊断标准确诊 NP, 年龄 ≤ 15 岁, 确诊为肺部感染时间 ≤ 48 小时者除外。发生 NP 的归为病例组, 未发生 NP 的归为对照组。二组均衡性检验具有良好的可比性。用 PSB 采集下呼吸道分泌物, 同时采集空腹胃液作细菌定量培养并测定 pH 值, 每 1~2 天一次。对上述来自胃和下呼吸道细菌表型鉴定结果相同者, 作质粒 DNA、酶切图谱分型及随机扩增多态性 DNA(RAPD) 技术分析。

纳入研究的 108 例患者中, 男 84 例, 女 24 例, 年龄 16~83 岁, 平均年龄(47.7 \pm 14.6)岁, 将确诊为肺部感染的 50 例归为病例组, NP 的发生率为 46.3% (50/108)。PSB 采样有 76 例次出现有诊断意义($> 10^3$ cfu/ml)的结果, 分离到 76 株细菌, 包括革兰氏阳性菌 23 株, 阴性菌 45 株, 真菌 8 株。胃液细菌培养分离到 68 株菌, 包括革兰氏阳性菌 11 株, 阴性菌 50 株, 真菌 7 株。有 22 株菌(11 对, 分别来自 11 例患者的胃部和肺部)在胃液分离鉴定出 1~2

天后, 在肺 PSB 也分离到相同的细菌, 且连续 2~3 次采样均得到一致的结果。对其中 6 名患者将美蓝经胃管注入胃内, 第 2 天在患者咽部用咽拭子可检出蓝色分泌物, PSB 在下呼吸道也有蓝色分泌物检出, 初步证明有逆行途径存在。逆行感染发生率为 10.2% (11/108), 占感染病例的 22% (11/50)。来源于同一病人的胃、肺部表型鉴定结果相同的菌株, 其质粒 DNA 图谱、Hind III 酶切电泳图谱完全相同, 提示它们在质粒 DNA 水平具有很高的同源性。更有意义的是, RAPD 在各对应菌株之间得到完全相同的扩增带, MINTS 聚类分析相似系数为 100%, 进一步在基因组 DNA 水平说明它们很可能为同源菌株。至此, 由细菌表型特征到基因组 DNA 水平均证明存在胃→咽→下呼吸道逆行感染途径。

在测定胃液 pH 值的同时, 计数该 pH 环境下胃内细菌总数。结果表明随着胃液 pH 值的升高, 胃内定植细菌总数明显增加, 两者呈显著相关 ($P < 0.01$)。病例组 pH 均值 4.89 \pm 1.48, 对照组 pH 均值 3.27 \pm 1.19, $P < 0.01$ 。按 pH ≥ 4 及 pH < 4 将病例组分为二组, 当 pH < 4 时, NP 的发生占 26%, pH ≥ 4 时, NP 的发生占 74%, $\chi^2 = 32.94$, $P < 0.01$, 即随着胃液 pH 值的升高, NP 的发生率显著增大。

(收稿: 1999-06-15)

作者单位: 132013 吉林, 第四军医大学吉林军医学院

聚合酶链反应斑点杂交技术在临床乙型肝炎病毒检测中的应用

孙嵘嵘 郑志红 刘桂荣 胥婧 鲁润铭 刘兵 王桂珍

利用半抗原地高辛配基(digoxigenin)制备非同位素标记探针技术, 分别标记乙型肝炎病毒全基因

作者单位: 110006 沈阳市传染病院中心研究室(孙嵘嵘、郑志红、刘桂荣、胥婧、鲁润铭); 中国医科大学微生物教研室(刘兵、王桂珍)

探针(DIG-HBV DNA)及乙型肝炎病毒 PCR 产物 C 区探针[DIG-HBV(C/prc)], 经斑点杂交检测血清 HBV DNA 及血清聚合酶链反应(PCR)产物, 与 PCR 平行检测 122 份血清标本。实验中以 DIG-HBV(C/prc)为探针, 即 PCR-斑点杂交方法直接标记纯化的 HBV PCR 产物经斑点杂交实验检测 HBV DNA。结

果显示, PCR-斑点杂交法与 PCR 以及地高辛标记乙型肝炎病毒全基因探针斑点杂交实验平行检测 122 份血清标本, 阳性标本分别为 60 份、50 份、30 份, 阳性率分别为 49.1% (60/122)、40.98% (50/122)、24.6% (30/122)。实验表明, HBV 全基因探针斑点杂交实验的阳性率只有 24.6%, 明显低于 PCR 法及 PCR-斑点杂交法, 且 PCR-斑点杂交法用的探针是以纯化的 HBVDNA 为模板经 PCR 扩增法制备而成的, 而 HBV 全基因探针制备则需大量提取和纯化质粒, 还需经酶切、回收等步骤, 方法繁琐, 整个过程时间长, 工作量大, 且敏感性低, 暴露了普通斑点杂交的缺点。PCR 方法敏感性高, 比普通斑点杂交法灵敏度高约 10^4 , 能检出 1fg 的 DNA, 在临床检验和实验中已被广泛应用, 尤其是在病毒感染的诊断中有很大的发展。实验还证明, PCR-斑点杂交实验使 PCR 阳性率由常规的 40.98% 上升到 49.1%, 且与 ELISA 方法检测肝炎患者血清的符合率达 89.1%。而且, 50 例 PCR 法阳性结果中, 用 PCR-斑点杂交法检出 2 例非特异结果, 在 72 例 PCR 阴性结果中, 用 PCR-斑点杂交法检出 12 例阳性结果, 经交互法 χ^2 检验,

$\chi^2=5.79, P<0.05$, 两种方法结果的差异有统计学意义。证明 PCR-斑点杂交法比 PCR 法更敏感更特异。在对病人血清免疫标志物的分析中发现, HBsAg+ 的标本有 2 例, 其 HBV-DNA 检出率为 100%, 且三种 DNA 检测方法结果一致。在 HBsAg+ 和抗-HBe+ 的 26 例标本中, HBV-DNA 检出率较高, PCR 电泳法为 80.76%, PCR-斑点杂交法为 92.30%。在 HBsAg+ 或抗-HBe+ 时, HBV-DNA 检出率也较高。以上结果均说明病毒在体内复制。在 7 例 HBsAg+ 和抗-HBe+ 的组中, PCR 法检出率为 85.71%, PCR-斑点杂交法 100%, 表明血清发生 HBeAg+ 到抗-HBe+ 转换后 HBV 复制仍维持一段时间。而 3 例抗-HBs+、抗-HBe+ 的组中, 用 PCR 法未能检出 HBVDNA 存在, 而用 PCR-斑点杂交法可检测出 2 例阳性。表明 HBVDNA 水平已降低, 但仍有少量复制。可见 PCR-斑点杂交检测法省时, 省力, 可提高检测敏感性且特异性强, 操作方便, 适用于临床及科研推广应用。

(收稿: 1999-03-20 修回: 1999-05-25)

428 例淋病患者淋球菌多部位感染流行病学调查

孙冰 刘向阳 杜欣 胡静华

1994~1997 年对确诊的 428 例淋病患者多部位(尿道、宫颈、直肠、咽部及眼结膜)进行采样, 经实验室检查确定淋球菌感染部位, 把 ≥ 2 个部位感染者视为多部位感染。流行病学调查包括: ①发病前 10 天内性交情况, 包括夫妻间、非婚性伴间; 性行为 and 性交方式。②发病前 10 天内洗浴, 共用物品和内衣裤洗涤方式等日常行为。③发病前 10 天内性伴人数。结果淋病患者淋球菌感染主要以一个部位生殖器感染为主, 两个以上多部位感染, 主要为咽部、直肠、眼结膜的感染。女性多部位感染率为 36.51%, 男性为 10.88%。多部位感染与发病前 10 天内(非婚性伴间和夫妻间)性交次数的关系, 统计学处理, $\chi^2=24.82, P<0.001$, 说明多部位感染与非婚性伴间性交次数差异有显著性, 非婚性交次数多者, 多部位感染亦多。在多部位感染与夫妻间和非婚性伴间性交情况比较中, $\chi^2=17.23, P<0.001$, 表明有非婚性

交者多部位感染明显多于只有夫妻间性交者。多部位感染与爱抚动作的关系统计中, 接吻部位主要为眼、口、外生殖器; 手爱抚动作的部位主要为头面部、外生殖器, χ^2 检验结果, $P<0.001$, 说明有口、眼、外生殖器接吻爱抚动作者, 有头面部、外生殖器手爱抚动作者的多部位感染明显多于没有此动作者。多部位感染与性交方式关系中, 性交方式复杂, 如有口交、肛交史者多部位感染明显高于只有异性生殖器接触者。多部位感染与性伴人数的关系, $\chi^2=53.69, P<0.001$, 表明性伴人数与多部位感染差异有显著性, 性伴人数多者, 多部位感染也多。多部位感染与婚姻状况、文化程度、职业、民族各自自然状况以及洗浴, 共用物品和内衣裤洗涤方式等日常行为经统计学处理, $P>0.05$, 差异无显著性。调查结果证明在高危人群中除生殖器外的淋球菌感染的存在, 同时行为流行病学调查资料也证明了这一结果的可靠性。