

· 论著 ·

人禽流感死亡病例不同组织器官中 H5N1 病毒的检测分析*

陈秋霞, 李晖, 邹丽容, 倪汉忠, 黄平, 方苓, 柯昌文, 罗会明

(广东省疾病预防控制中心, 广东广州 510300)

【摘要】目的 了解 H5N1 病毒在人禽流感死亡病例组织器官中的分布和含量。 **方法** 在 BSL-3 实验室, 测定 H5N1 禽流感病毒分离株的 TCID₅₀, 并采用荧光定量 PCR 制作标准曲线; 将人禽流感死亡病例的尸解标本, 包括心、肝、脾、肺、肾、脑等组织标本研磨处理后, 进行荧光定量 PCR 检测, 并根据标准曲线推算 H5N1 禽流感病毒的病毒载量。 **结果** 心、肝、肾、脑组织标本中 H5N1 禽流感病毒检测为阴性, 在肺、脾组织标本中检测到 H5N1 病毒, 病毒载量分别为 10^{6.3} TCID₅₀/ml 和 10^{4.55} TCID₅₀/ml。 **结论** 除呼吸系统外, 在脾组织中也存在 H5N1 禽流感病毒。

【关键词】 禽流感病毒; 荧光定量 RT-PCR; 病毒载量

【中图分类号】 R373.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2007)01-0017-02

[Journal of Pathogen Biology. 2007 Feb; 2(1):17-18, 21.]

The detection on H5N1 avian influenza virus in different organs of a dead case

CHEN Qiu-xia, LI Hui, ZOU Li-rong, NI Han-zhong, HUANG Ping, FANG Ling, KE Chang-wen, LUO Hui-ming (Center for Disease Control and Prevention of Guangdong Province, Guangzhou 510300, China)

【Abstract】 Objective To understand the distribution and virus load of H5N1 avian influenza virus(AIV) in different organs from a H5N1 AIV dead case. **Methods** Isolate the H5N1 AIV in BSL-3 lab and assay the TCID₅₀, then use the 10-fold series dilutions of isolate as standards to get the standard curve by fluorescent quantitative PCR. The autopsy samples, including heart, liver, spleen, lung, kidney and brain, were ground and detected by Real-time PCR. According to the standard curve, virus load of H5N1 AIV was calculated. **Results** H5N1 AIV can be detected in lung and spleen with the virus load 10^{6.3} TCID₅₀/ml and 10^{4.55} TCID₅₀/ml respectively, while H5N1 AIV can't be detected in heart, liver, kidney and brain. **Conclusion** Besides the lung, H5N1 AIV can exist in spleen.

【Key words】 Avian influenza virus(AIV); fluorescent quantitative PCR; virus load

人感染高致病性禽流感(简称人禽流感)的病原体为禽流感病毒 H5N1 型。自 1997 年我国香港地区出现首例人禽流感病例以来,越来越多的感染病例陆续被报道,尤其是东南亚地区,在禽流感疫情呈蔓延趋势的同时,禽流感病例也日益增多,到目前为止,全球共有十几个国家和地区已相继发生了 258 例人禽流感病例,其中 154 例死亡^[1],病死率达 50% 以上。

2006 年 2 月 22 日广东省确诊首例人禽流感病例,3 月 2 日该病例死亡。为了解 H5N1 病毒在组织器官的分布及病毒载量,研究人禽流感病毒的发病机制,作者等对该死亡病例的尸解组织标本进行了 H5N1 禽流感病毒的检测,结果报告如下。

材料和方法

1 病毒分离与鉴定

用鸡胚来分离病毒。取患者气管抽吸物标本,经处理后接种 9~11 d 鸡胚,分别于 24、48、72 h 收取鸡胚尿囊液,并测定血凝活性。对具有血凝活性的尿囊液再用血凝抑制试验和 RT-PCR 和荧光定量 PCR 进行鉴定。

2 病毒滴度测定

采用 MDCK 细胞进行病毒滴度的测定。用 96 孔细胞微量板培养 MDCK 细胞,细胞成片后,将上述分离到的待测病毒株用细胞维持液稀释至 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸ 等的稀释度;吸去 MDCK 单层细胞上清,分别加入每个稀释度的病毒液,接种量为 50 μl/孔,每个稀释度接种 8 孔,同时设细胞对照。置 37℃ 5%CO₂ 孵箱培养 6~7 d,观察细胞感染病毒的情况,计算病毒滴度。

3 定量 PCR 检测

3.1 病毒核酸提取 采用德国 QIAGEN 公司生产的 QIAamp Viral RNA Kit,提取每个稀释度的病毒核酸。操作步骤按试剂盒说明进行。

3.2 标准曲线制作 采用深圳匹基生物有限公司生产的 H5N1 Real-time PCR 试剂进行检测。反应完成后,调

*【基金项目】广东省科技攻关重大专项课题(No. 2004A2090104)。

【作者简介】陈秋霞(1968-),女(汉族),河南人,2002 年毕业于中山大学病原生物学系,医学硕士。现为广东省疾病预防控制中心副主任医师,主要从事病毒学实验研究。

E-mail:susanchenqx@gmail.com

节基线(base line)至适宜处,各荧光曲线与基线的交叉点对应的横坐标即为 Ct 值(cycle of threshold),根据各稀释度与 Ct 值的对应关系,绘制标准曲线。

4 组织器官中 H5N1 病毒检测

4.1 尸解组织处理 首先对肺组织进行研磨处理,在间隔两周后分别取心、肝、脾、肾和脑组织进行研磨处理。具体方法:取各种尸解标本约 10 g,加入 2.0 ml 组织培养液(MEM),研磨,4℃条件下,1 500 r/min,离心 10 min,取上清备用。以上操作均在生物安全三级实验室进行。

4.2 病毒核酸提取 取 140 μ l 上清,采用 QIAamp Viral RNA Kit 提取病毒核酸。

4.3 定量 PCR 检测 采用 H5N1 Real-time PCR 试剂对心、肝、脾、肺、肾和脑等尸解组织标本的研磨上清液进行 H5N1 病毒核酸检测,具体操作步骤按试剂盒说明进行。

结果

1 病毒分离与鉴定

收集的鸡胚初代尿囊液对 1%红细胞的凝集效价 $\leq 1/20$,经两次传代后,尿囊液的血凝效价 $\geq 1/128$ 。对具有血凝活性的尿囊液进行血凝抑制试验,分离物不被 H3、H1 标准血清抑制。吸取尿囊液进行 H5N1 的核酸检测,结果阳性。

2 病毒滴度

微量细胞法滴定 H5 病毒分离株滴度,按照 Reed-Muench 法计算,病毒 TCID₅₀/100 μ l 为 $10^{6.8}$ 。

3 定量 PCR 检测

将病毒分离株作 10 倍连续稀释,即 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} ,分别提取病毒核酸,进行 H5N1 的 Real-time PCR 检测,结果见图 1。

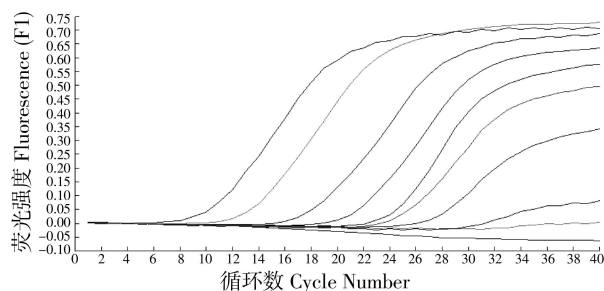


图1 H5N1 病毒分离株系列稀释液的 Real-time PCR 扩增结果
Fig. 1 The Real-time PCR amplification curve of series dilutions of the H5N1 isolate

4 不同组织器官中 H5N1 病毒的分布及含量

分别从尸解肺组织和脾脏标本中检测到 H5N1 病毒核酸,而心、肝、肾和脑组织中 H5N1 病毒核酸检测阴性。根据 Real-time PCR 检测值查标准曲线,推算肺、脾组织中病毒含量分别为 $10^{6.3}$ TCID₅₀/ml 和 $10^{4.55}$ TCID₅₀/ml (图 2,3)。

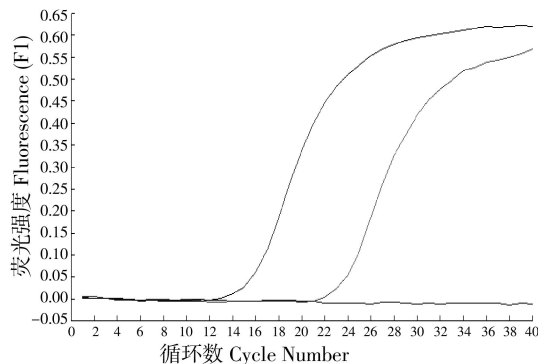


图2 肺组织中 H5N1 病毒 Real-time PCR 扩增结果
Fig. 2 The Real-time PCR amplification curve of the H5N1 in lung

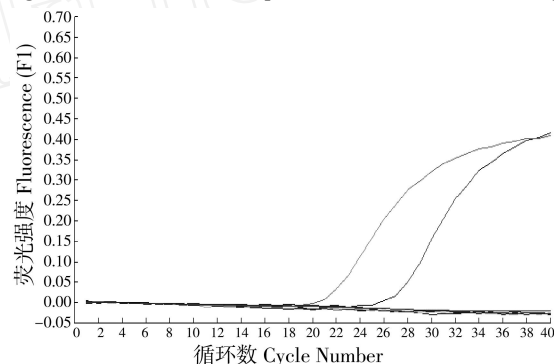


图3 心肝肾脾脑组织中 H5N1 病毒 Real-time PCR 扩增结果
Fig. 3 The Real-time PCR amplification curve of the H5N1 in heart, liver, kidney, spleen and brain

讨论

通过采用荧光定量 PCR 和 RT-PCR 方法,从该例患者的咽漱液和气管抽吸液标本中检测到人禽流感病毒 H5N1 核酸,经 M、HA、NA 基因序列的测定和分析,确诊为 H5N1 禽流感病毒感染,并从患者的气管抽吸液标本和肺尸解组织标本中分离到病毒(该结果已另文发表)。这是广东省首例人禽流感病例,患者发病之初表现为发热、乏力、咳嗽、咽痛、头痛和全身不适等类似普通流感的症状,4 d 后病情进展迅速,出现了呼吸困难和呼吸衰竭,表现出急性呼吸窘迫综合征和多器官功能衰竭等临床症状,发病 9 d 后死亡。尸体解剖显示患者多器官脏器受损,肺严重淤血水肿和胸腔积液。本次对尸解组织标本的检测显示 H5N1 病毒主要分布在肺组织和脾组织,含量分别达 $10^{6.3}$ TCID₅₀/ml 和 $10^{4.55}$ TCID₅₀/ml,而在心、肝、肾、脑组织中未检测到 H5N1 病毒核酸。

有文献报道人禽流感病例的脑脊液、粪便和血清标本中分离到 H5N1 禽流感病毒;通过 RT-PCR 和 Real-time PCR 方法也可以从血浆中检测到 H5N1 病毒^[2,3]。本病例除肺组织外,在脾脏中也检测到 H5N1 禽流感病毒。表明 H5N1 禽流感病毒与一般的流感病毒很少表现出病毒血症不同,可能在体内多个器官扩散。本病例脾脏组织中 H5N1 病毒的含量达到了 $10^{4.55}$ TCID₅₀/ml,但

(下转 21 页)

表3 淮南地区矿工胃镜检查及Hp检测结果
Table 3 The gastroscopy and the detective results
of Hp in Huainan miners

检查方法 Examination methods	分型 Groups	病例数 (n)	Hp阳性例数 The positive cases of Hp	感染率(%) Infection rate(%)
胃镜 Gastroscope	慢性浅表性胃炎 Chronic superficial gastritis	112	86	76.8 ^a
	萎缩性胃炎 Atrophic gastritis	78	65	83.3 ^a
	胃溃疡 Gastric ulcer	96	88	91.7 ^a
	十二指肠溃疡 Duodenal ulcer	63	59	93.7 ^a
	胃粘膜正常 Normal gastric mucosa	19	0	0
病理 Pathology	轻度浅表性炎症 Soft superficial inflammation	49	38	77.6 ^b
	中、重度浅表性炎症 Mediate and severity of inflammation	63	56	88.9 ^b
	萎缩性炎症 Atrophic inflammation	78	70	89.7 ^b
	炎性坏死 Inflammatory necrosis	124	116	93.5 ^b
	腺体不典型增生 Atypical hyperplasia of gland	35	18	51.4 ^b

注:组间比较 a: $\chi^2=19.38, P<0.01$; b: $\chi^2=43.26, P<0.01$

矿工中存在较高的胃、十二指肠疾病(349/368),而且以中重度为主,其炎症越重, Hp 检出率越高,与文献报道相符^[7,8]。但在胃粘膜腺体不典型增生的患者,其 Hp 检出率相对较低,这可能与组织异化, Hp 不适宜在其上生长有关。此外,本研究中以 Warthin-Starry 银染色直接找到 Hp 菌诊断为现症 Hp 感染,阳性者 Hp 血清学阳性的 81.0%。 Hp 呈灶性分布,病理标本的含菌量与取材部位有关,切片成功与否及染色是否均匀等也影响检出率。 Hp 感染通常呈现慢性持续性终身感染, Takahashi 等^[9]证实大部分 Hp 感染发生在儿童期,胃粘膜随年龄增长逐渐发生萎缩,并最终形成胃癌。本组病例中有 35 例胃

粘膜腺体呈不典型增生,虽然异型增生不一定伴有癌变形成,但一般认为腺体的不典型增生为癌前病变的一种形式,且胃癌患者胃粘膜伴异型增生超过 70 %^[10],故 Hp 感染者应积极进行 Hp 根除治疗,并通过胃镜检查评价治疗效果及炎症的恢复情况,及时调整治疗方案。非 Hp 感染者应注意饮食规律,劳逸结合,戒烟酒,预防 Hp 感染及其相关胃、十二指肠疾病的发生。

【参考文献】

[1] Brigic E, Hodzic L, Zildzic M. *Helicobacter pylori* and gastroduodenal disease in our patients: 2-year experience[J]. Med Arh,2000,54:313 - 316.

[2] Alexander GA. Association of *Helicobacter pylori* infection with gastric cancer[J]. Mil Med,2000,165:21 - 27.

[3] Aguemou BD, Struelens MJ, Massougbdji A, et al. Prevalence and risk-factors for *Helicobacter pylori* infection in urban and rural Beninese populations[J]. Clin Microbiol Infect,2005,11(8):611 - 617.

[4] Wong BC, Ching CK, Lam SK, et al. Differential north to south gastric cancer-duodenal ulcer gradient in China[J]. J Gastroenterol Hepatol, 1999,14:851 - 858.

[5] Fendrick AM. The role of economic evaluation in the diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori* infection[J]. Gastroenterol Clin North Am, 2000,29:837 - 851.

[6] Bakka AS, Salih BA. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in asymptomatic subjects in Libya[J]. Diagn Microbiol Infect Dis,2002,43: 265 - 268.

[7] 李冰冰,康宏庄. ¹³C-尿素呼气试验定量值与胃镜检测幽门螺杆菌比较[J]. 中国当代儿科杂志,2001,3(6):705 - 706.

[8] 沈小明,许春娣,陈舜年. 532 例小儿胃十二指肠疾病的临床与病理特点[J]. 临床儿科杂志,1999,17(3):133 - 135.

[9] Takahashi S. Long-term *Helicobacter pylori* infection and the development of atrophic gastritis and gastric cancer in Japan[J]. J Gastroenterol, 2002,37:24 - 27.

[10] 庄小强,林三仁. 胃癌前病变中幽门螺杆菌分布的感染研究[J]. 中华消化杂志,2000,20(4):274 - 275.

【收稿日期】2006-08-01 【修回日期】2006-12-19

(上接 18 页)

仍比肺组织病毒含量低。脾脏组织存在 H5N1 病毒,究竟是病毒入血被带入脾脏储留,还是在脾脏中存在 H5N1 病毒的复制,尚需进一步研究。从已经建立的 H5N1 禽流感病毒感染的动物模型来看, H5N1 病毒仅在猴呼吸道上皮细胞或肺组织中复制,在肺外组织包括脾、心脏或脑中均未见感染细胞,即不存在呼吸道外的复制;而在 BALB/c 小鼠, H5N1 病毒除了在肺组织中快速增殖外,病毒也在肺外其他组织中增殖和扩散^[4,5]。对于 H5N1 禽流感病毒在人体内的增殖、扩散和病毒滴度的变化情况目前还不清楚,值得研究和探讨。

【参考文献】

[1] World Health Organization. Cumulative number of confirmed human ca-

ses of avian influenza A/ (H5N1) reported to WHO. http://www.who.int/csr/don/2006_12_29/en/

[2] de Jong MD, Cam BV, Qui PT, et al. Fatal avian influenza a(H5N1) in a child presenting with diarrhea followed by coma[J]. N Engl J Med, 2005,352:686 - 691.

[3] Salin C, Parvapan B, Surangrat S, et al. H5N1 influenza a virus and infected human plasma[J]. Emerg Infect Dis,2006,12(6):1041 - 1042.

[4] Rimmelzwaan GF, Kuiken T, Amerongen GVAN, et al. Pathogenesis of influenza a (H5N1) virus infection in a primate model[J]. J Virol, 2001,75(14):6687 - 6691.

[5] Katz JM, Lu X, Frace AM, et al. Pathogenesis of and immunity to avian influenza a H5 viruses[J]. Biomed Pharmacother,2000,54(4):178 - 187.

【收稿日期】2006-06-19 【修回日期】2006-12-03