

济宁市鼠类肺螨病的调查

秦茂华¹ 韩琳琳¹ 田营营¹ 王雪楠^{2*}

摘要 :目的 调查在木材、面粉加工场所鼠类肺螨的病原并分析其病理特征。方法 提取鼠类肺组织总 RNA ,设计肺螨变应原引物进行分子生物学检测 ,对阳性鼠的肺组织进行病理检查。结果 调查济宁市内木材、面粉加工场所以及社区 12 处 ,共捕鼠 27 只 ,PCR 检测 3 只发现螨类变应原阳性条带 ,阳性肺组织经病理验证与肺螨病的典型特征相吻合。结论 调查显示肺螨病的流行与特定的环境有关 ,肺螨变应原方法有利于肺螨病的诊断。

关键词 肺螨病 ;变应原 ;病理

中图分类号 :R519.8 文献标识码 :A 文章编号 :1009-9727(2012)9-1074-03

Survey of pulmonary acariasis in rodents in Jining City. QIN Mao-hua, HAN Lin-lin, TIAN Ying-ying, et al. (1. Department of Respiratory Medicine, The Affiliated Hospital of Jining Medical College, Jining, 272013, Shandong, P.R. China; Corresponding author: WANG Xue-nan, E-mail: wangxn72@163.com)

Abstract: Objective To survey the pathogen and pathological features of pulmonary acariasis in wood processing sites and flour mills. Methods Total RNA was extracted from the rodent lung tissue. Pulmonary acaria allergen primers were designed for molecular biology detection and rodent lung tissue was pathologically tested. Results Three pulmonary acariasis were obtained from 27 rodents. The positive results of pathological verification were in accordance with the typical characteristics of pulmonary acariasis. Conclusion The epidemic of pulmonary acariasis was associated with the environment and the mite allergen method can be used for the diagnosis of pulmonary acariasis.

Key words: Pulmonary acariasis; Allergen; Pathology

肺螨病是螨类经呼吸道侵入 ,并寄生于肺部所导致的一类寄生性呼吸系统疾病。由于肺螨病临床上未引起足够的重视 ,故常误诊为其他呼吸道疾病而影响治疗^[1]。为了探讨肺螨病的性质 ,螨的侵入途径及肺螨病的流行规律 ,2011 年课题组选择肺螨病多发的城郊村镇小加工厂进行鼠类自然感染肺螨的研究 ,以期防治肺螨病提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 标本采集 选择入住济宁医学院附属医院诊断为肺螨病(或疑似)患者的工作及居住地进行捕鼠 ,采用鼠笼(夹)加食饵捕鼠 ,每次 100 笼(夹)/d,下午 17:00 左右布置 ,次日上午 8:00 收回。回收后立即解剖采集鼠肺组织-80℃保存。共调查济宁市内木材、面粉加工场所以及社区 12 处 ,检测鼠类肺螨发病情况 ;同时在普通居民小区进行捕鼠作为对照。

1.2 试剂 总 DNA 提取试剂盒、凝胶回收试剂盒 ,购自 QIAGEN 公司 ,Pyrobest DNA Polymerase、dNTP、DNA 分子量标准 2000、RNA 酶、蛋白酶抑制剂均购自 Takara 公司 ,引物由 AUGCT 公司合成 ;Rotor Gene 3000 PCR 仪购自美国 Orbett Research 公司。

1.3 总 DNA 提取及 RT-PCR 用 QIAGEN 公司的 DNeasy Blood & Tissue Kit 试剂盒提取基因组 DNA。

分别取 300mg 左右鼠肺组织 ,倒入液氮碾磨 ,加入 180μl Buffer ATL ,倒入 1.5ml 的离心管中。加入 20μl 蛋白酶 K ,混匀 ,56℃ 放置至组织完全溶解 ,短暂离心。加入 200μl Buffer AL ,混匀 ,加入 200μl 无水乙醇 ,混匀。将上步混合液移入柱中 ,8000rpm,1min,弃废液 ,更换新的收集管。加入 500μl Buffer AW1 ,离心 ,8000 转/min,1min ,弃废液 ,加入 500μl Buffer AW2 ,离心 ,14 000rpm,3min。将吸附柱放入新的 1.5ml 的离心管 ,直接加入 200μl Buffer AE 至吸附膜的中间。室温孵育 1min ,离心 ,8000rpm,1min。-20℃ 保存备用。

1.4 扩增引物 据 GenBank 粉尘螨 Der F 变应原 cDNA 设计两对特异性引物 ,引物序列为 :引物 1 :上游 :5' -ATATTTCCAAAATCTTGTGCCT、-3' ,下游 :5' -ATAAATCACGGATTTTAGC GTGGG-3'。预期扩增大小为 420-450bp ;引物 2 :上游 :5' -ATCAGCCAAGGTCTGATCAATTC-3' ,下游 :5' -AAGAGGTTGTTTCCGGCTTGGA-3' ,预期扩增大小为 600-620bp。反应体系为 50μl ,含有 10×Pyrobest Buffer 5μl ;Pyrobest DNA Polymerase 0.25μl ;dNTP 4μl ;基因组 DNA 2μl ;primer1(或 primer2)0.5μl ,94℃ 5 min ,94℃ 30 S ,57℃ 2 min ,70℃ 2 min ,30 个循环 ;

基金项目 :山东省自然科学基金联合专项(No.ZR2010HL020) ;济宁市科技局(济科字[2010]85)

作者单位 :1.济宁医学院附属医院呼吸内科 山东 济宁 272029 ;2.济宁医学院附属医院生殖医学科 山东 济宁 272029

作者简介 :秦茂华(1971~) ,女 ,山东人 ,主管护师 ,主要从事重症监护及呼吸内科疾病的临床护理研究。

*通讯作者 E-mail:wangxn72@163.com

72 ℃ 10 min 4℃ 保存。取5μlPCR产物进行1%的琼脂糖凝胶电泳。按琼脂糖凝胶回收试剂盒(美国 Omega 公司)说明书从凝胶中回收 PCR 产物,送上海生工生物技术有限公司进行序列测定。

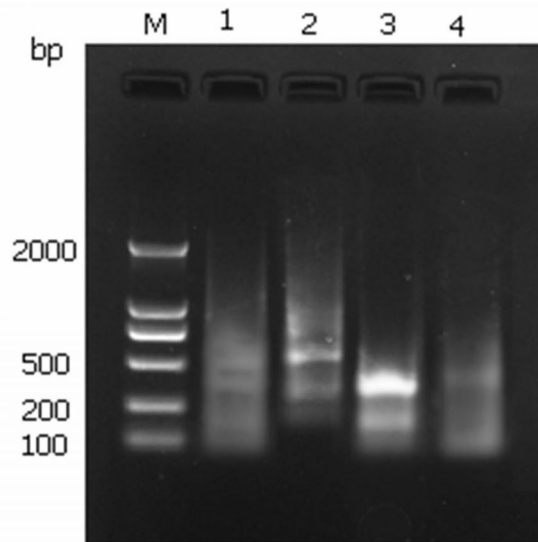
1.5 病理组织学 HE 染色 将有阳性条带的鼠肺组织进行病理检查,取肺组织以10%甲醛固定,石蜡切片,HE染色,光镜下观察组织变化。

1.6 统计分析 应用 χ^2 检验比较不同环境鼠类肺病的差异,应用SPSS16.0软件进行分析。

2 结果

2.1 仓储螨类的调查 选择济宁市内木材、面粉加工场所以及社区共调查面粉加工厂、木材加工厂和普通居民房舍12处,共捕鼠27只(黄鼬1只),其中居民房舍周围12只。

2.2 PCR 扩增螨变应原 Der F 目的基因 以设计的两组变应原引物引物进行PCR扩增,1%的琼脂糖凝胶电泳结果显示,居民区捕获的12只均没有发现阳性条带,加工厂15只中有3只在相应的位置发现阳性条带,阳性率20%,村镇木材、面粉小加工场所鼠类肺螨携带率显著高于居民社区,有显著性差异($\chi^2=146.33$, $p<0.01$)。阳性条带中2组条带位于450bp左右,1组条带位于600bp左右,测序结果基因片段与预期变应原基因相一致。(见图1)



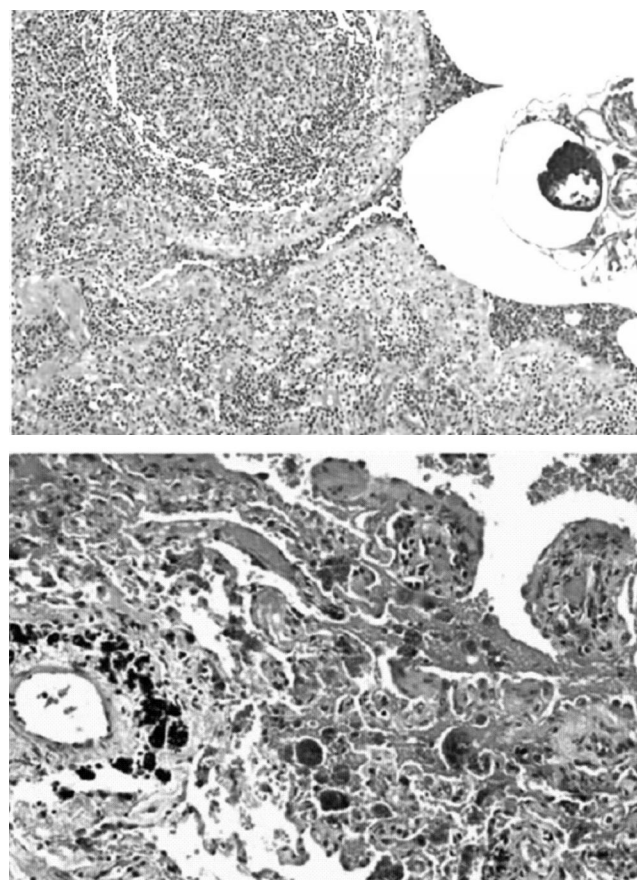
M: marker; 1,4 阴性结果 2,3: Der F 目的基因阳性结果
M: marker; 1,4. Total RNA 2,3. Der F gene

图1 PCR扩增螨变应原 Der F 基因结果

Fig 1 Results of PCR test of Der F

2.3 病理组织学结果 镜下主要为细支气管及其周围肺实质病变,有不同程度的坏死脱落的炎性肉芽组织及纤维组织,其内含有淡黄色、折光性强的PAS阳性物质和多核异物巨细胞,有明显的嗜酸粒细胞浸润;部分肺泡膈毛细血管扩张充血,且伴有巨噬细胞、中

性粒细胞、淋巴细胞等炎性细胞的浸润,颇似间质性肺炎^[2]。(见图2)



1.肺螨阳性组(100×)2.肺螨阳性组(×400)

1. Positive group (100×)2. Positive group(×400)

图2 鼠类肺组织病理切片(HE染色)

Fig 2 Conventional staining of rodent lung with HE

3 讨论

城郊村镇木材、面粉等小加工场环境卫生状况较差,粉尘取样显示孳生了大量螨类,螨虫随木屑、面粉等播散在空气中,充沛的食物和隐蔽条件又使鼠类动物密度较高,鼠类在该环境中觅食和移徙可能是造成自然感染肺螨较高的重要原因。

粉尘螨是居室、厂矿常见变应原,近年来李朝品等^[3,4]对肺螨病原螨的生态学、病理学等方面进行了系统的研究,获得中国部分地区粉尘螨变应原 Der F cDNA 序列,为进一步表达重组的 Der f 变应原用于尘螨过敏性疾病的诊治打下基础。本研究对现场鼠类自然感染肺螨的探索研究进一步验证了该方法的可行性,为进一步表达重组的变应原用于螨类变应性疾病的诊治奠定了基础。

目前,有关肺螨病的临床报道尚少,也引起临床大夫足够的重视。肺螨病无特异性症状,故常被误诊为间质性肺炎、慢性支气管炎和肺结核等其他呼吸道

疾病。通过对感染肺螨的鼠类肺部进行病理观察,可以推测环境中的螨类被吸入呼吸道以后,螨体活动而致明显的肺组织机械性损伤,肺部病变常表现为急性炎症反应,有较多的巨噬细胞、中性粒细胞和淋巴细胞浸润。其细胞浸润和纤维增生或许是形成结节性病灶的原因之一。螨体或代谢抗原所引起的免疫病理反应可导致机体的过敏反应,以致在肺部可见有明显的嗜酸性粒细胞浸润。陈兴保^[5]等通过对豚鼠接种螨类后的肺部病变,分析发现豚鼠血清 IgG、IgA 和 IgE 均有明显增高,提示机体产生了体液免疫反应。这些抗原物质可同时具有免疫原性和过敏原性,证实嗜碱性粒细胞处于对螨抗原致敏状态,从而验证了过敏反应在肺螨病致病机制中具有重要意义。肺部结节与免疫病理反应的关系还有待进一步研究。总之,肺螨病的流行与特定的环境有关,肺螨变应原方法可辅助于肺螨病诊断。

参考文献:

- [1] Chen X. Epidemiological survey of pulmonary acariasis in Jining City [J]. China Trop Med, 2008, 8(9):1601-1602. (In Chinese)
 - (陈欣. 济宁市肺螨病流行病学调查[J]. 中国热带医学, 2008, 8(9): 1601-1602.)
 - [2] Marcia C, Anderade, Renato S, et al. Histopathologic findings of pulmonary acariasis in a Rhesus Monkeys breeding unit [J]. Rev Bras. Parasitol, 2007, 16(4): 229-234.
 - [3] Yang QG, Li CP. Construction and expression of prokaryotic expression plasmid of Der f1 cDNA of Dermatophagoides farinae [J]. Immunolog J, 2004, 20(6):472-474. (In Chinese)
(杨庆贵, 李朝品. 粉尘螨 I 类抗原 cDNA 的克隆表达和初步鉴定 [J]. 免疫学杂志, 2004, 20(6):472-474.)
 - [4] Li CP, Yang QG. Construction and expression of prokaryotic expression plasmid of cDNA coding for group II allergen of Dermatophagoides farinae [J]. Chin J Parasit Dis Con, 2004, 17(6):369-371. (In Chinese)
(李朝品, 杨庆贵. 粉尘螨 II 类抗原 cDNA 原核表达质粒的构建与表达 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2004, 17(6):369-371.)
 - [5] Chen XB, Zhang SF, Sun X, et al. Pulmonary Pathological changes caused by introduced mites into the tracheae of Guinea-pigs and comparison on the pathogenesis of 5 specise of common stored mites [J]. Endemic Dis Bull, 1991, 6(1):42-45. (In Chinese)
(陈兴保, 张世馥, 孙新, 等. 豚鼠接种螨类后的肺部病变和五种螨致病性的比较观察 [J]. 地方病通报, 1991, 6(1):42-45.)
- 收稿日期: 2012-06-07 编辑: 崔宜庆
-
- (上接第 1064 页)
- Chinese)
- (吴杏杉, 陈春杏, 杨杰, 等. 海口市铅膳食暴露评估 [J]. 中国热带医学, 2011, 11(7):844-845.)
- [4] Navas-Acien A, Guallar E, Sibergeld E K, et al. Lead exposure and cardiovascular disease - A systematic review [J]. Environ Health Perspect, 2007, 115(3): 472-482.
 - [5] Li YQ, Shun CJ, Ye WY, et al. Physical and chemical analysis of food [M], 2008. (In Chinese)
(黎源倩, 孙长颢, 叶蔚云, 等. 食品理化检验 [M], 2008.)
 - [6] Yu J. Research progress of dietary exposure assessment method [J]. Food research and development, 2010, 31(8): 224-225. (In Chinese)
(余健. 膳食暴露评估方法研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2010, 31(8): 224-225.)
 - [7] M Joao Paulo, Hilko vander Voet, risk assessment of dietary exposure to pesticides using a Bayesian method [J]. Pest Management Science, 2005, 61:759-766.
 - [8] Zhang L, Gao JQ, Li XW, et al. The study of total diet in China - the dietary intake of lead in different age and gender groups in 2000 [J]. J hygiene research, 2007, 36(7):459-467. (In Chinese)
 - (张磊, 高俊全, 李筱薇, 等. 2000 年中国总膳食研究 - 不同性别年龄组人群膳食铅摄入量 [J]. 卫生研究, 2007, 36(7):459-467.)
 - [9] Zhang L, Gao JQ, Li XW, et al. The study of total diet in China - the dietary intake of cadmium in different age and gender groups in 2000 [J]. J hygiene research, 2008, 37(3):338-342. (In Chinese)
(张磊, 高俊全, 李筱薇, 等. 2000 年中国总膳食研究 - 不同性别年龄组人群膳食镉摄入量 [J]. 卫生研究, 2008, 37(3):338-342.)
 - [10] Jin SG, Zhai FY, He YN, et al. The survey of nutrition and health in China. The data of status for nutrition and health. 2002:46-52. (In Chinese)
(金水高, 翟凤英, 何宇纳, 等. 中国居民营养与健康状况调查报告之十. 营养与健康状况数据集 [C]. 2002:46-52.)
 - [11] Yang B, Zhai FY. The survey of nutrition and health in Hainan. The master's thesis of china center for disease control and prevention in 2007. (In Chinese)
(杨斌, 翟凤英. 海南省居民营养与健康状况调查 [C]. 2007 中国疾病预防控制中心 2007 级硕士论文.)
- 收稿日期: 2012-06-19 编辑: 符式刚