

· 短篇论著 ·

表现为急性不明原因发热的疑似恙虫病患者临床特征及病原学分析(8 例)

周海慧¹ 林金² 奚娜¹ 周继恩¹ 陈序伟³ 王其泰³ 徐苗燕³ 陈景丹³ 杨章女⁴

¹浙江省三门县疾病预防控制中心检验科, 台州 317100; ²浙江省三门县疾病预防控制中心传染病防治科, 台州 317100; ³浙江省三门县人民医院感染科, 台州 317100; ⁴浙江省疾病预防控制中心微生物所, 杭州 310051

通信作者: 周海慧, Email: 496812322@qq.com

【关键词】 发热; 病原学诊断; 恙虫病; 恙虫病东方体; 基因型

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20220302-00045

Clinical characteristics and etiological analysis of suspected scrub typhus cases presenting as acute fever of unknow origin (8 cases)

Zhou Haihui¹, Lin Jin², Xi Na¹, Zhou Jien¹, Chen Xuwei³, Wang Qitai³, Xu Miaoyan³, Chen Jingdan³, Yang Zhangnyu⁴

¹Experimental Department, Sanmen County Center for Disease Control and Prevention, Taizhou 317100, China;

²Department for Infectious Disease Control and Prevention, Sanmen County Center for Disease Control and Prevention, Taizhou 317100, China; ³Department for Infectious Diseases, Sanmen County People's Hospital, Taizhou 317100, China;

⁴Department of Microbiology, Zhejiang Province Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China

Corresponding author: Zhou Haihui, Email: 496812322@qq.com

【Key words】 Fever; Pathogen diagnosis; Scrub typhus; *Orientia tsutsugamushi*; Genotype

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20220302-00045

临床诊疗中以发热为首发症状就诊的患者很多,其病因复杂多样,是临床上面临的挑战。感染是发热的主要病因,致病原包括细菌、病毒、真菌、放线菌、支原体、衣原体、螺旋体和立克次体。本研究对浙江省三门县部分不明原因发热患者进行血清学和分子生物学检测,探索其病因并分析基因型。

对象与方法

一、患者和样本采集

将 2021 年 4—11 月三门县人民医院接诊的,经常规检查无法明确病因的 8 例急性发热患者纳入研究。临床医生结合流行病学史,判断为疑似恙虫病,故采集急性期和恢复期血液样本进行恙虫病病原学诊断;同时由于恙虫病和斑点热的临床表现极其相似,因此对所有病例进行斑点热病原学检测。所有病例均对本研究知情同意,研究符合赫尔辛基宣言。

二、立克次体感染检测

患者急性期血液样本进行恙虫病东方体、斑点热群

(SFGR)和斑疹伤寒群(TGR)立克次体核酸检测。核酸提取:取 200 μL 全血,采用 Qiagen DNA Blood Mini Kit(QIAGEN, Hilden, Germany)提取全血 DNA,按说明书进行。实时荧光定量 PCR(RT-qPCR):采用实时荧光 PCR 法恙虫病东方体核酸检测试剂盒和立克次体属核酸检测试剂盒(硕世生物科技股份有限公司,江苏)检测恙虫病东方体、SFGR 和 TGR 核酸,按说明书进行。巢式 PCR(n-PCR):参照中国 CDC《立克次体病诊断与处置手册》^[1],分别靶向恙虫病东方体和立克次体属 *groEL* 基因片段。

三、序列比对和系统发育分析

PCR 扩增产物目标条带测序由擎科生物技术有限公司进行。获得的核苷酸序列进行 BLAST 比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>),初步确定病原学分类地位。从 Genbank 中检索相关 *groES* 基因序列,选择部分在中国和亚太地区具有代表性的基因型序列。应用 MEGA7.0 (<https://www.megasoftware.net/>)软件,进行系统发育分析。

四、间接免疫荧光(IFA)

按照国家 CDC《立克次体病诊断与处置手册》进行^[1],恙虫病和斑点热特异性抗原片由浙江省 CDC 微生物所提供,抗人 IgG 荧光抗体购自 Sigma 公司,患者血清 1:16 起倍比稀释,以 $\geq 1:32$ 为阳性参考值,双份血清 4 倍及以上增高或单份血清 $\geq 1:512$ 认为现症感染。

结 果

一、一般资料

8 例不明原因发热患者中, 男性 7 例, 女性 1 例(病例 6);职业均为农民;发病前 2 周内均有上山或灌木草丛等野外活动史;5 例患者有特异性焦痂和/或皮疹, 其中 2 例有淋巴结肿大,伴有轻度肝损害。病例 4 为重症患者,发热,咳嗽,无痰,活动时胸闷气促,伴有肺炎、胸腔积液、肝肾功能不全和凝血功能异常等并发症。

二、实验室检查结果

8 例患者实验室检测结果见表 1, 共计 5 例患者实验室确认为恙虫病东方体感染。病例 4 在病程第 2 天时, WBC $2.6 \times 10^9/L$, 中性粒细胞 90%, 血小板 $19 \times 10^9/L$, ALT 86 U/L, AST 182 U/L, 碱性磷酸酶 253 U/L, γ -谷氨酰转肽酶 213U/L, 总胆红素 84.8 $\mu\text{mol/L}$, 直接胆红素 55.3 $\mu\text{mol/L}$, 总蛋白 46.2 g/L, 白蛋白 24.4 g/L, 球蛋白 21.8 g/L, 血肌酐 370 $\mu\text{mol/L}$, 尿素 23.22 $\mu\text{mol/L}$ 。该病例的凝血功能常规检查+D-二聚体(DD)结果显示, 病程第 5 天:凝血酶原国际标准化比值为 1.18, 活化部分凝血活酶时间(APTT)59.5 s, DD18.59 mg/L; 病程第 9 天:纤维蛋白原(FIB)1.47 g/L, 纤维蛋白降解产物(FDP)6 633 $\mu\text{g/L}$; 病程第 10 天:血肌酐 417 $\mu\text{mol/L}$, 尿素 29.70 $\mu\text{mol/L}$, 血尿酸 491 $\mu\text{mol/L}$ 。

三、影像学检查

病例 4 在病程第 4 天时, CT 平扫结果显示, 慢性支气管

炎, 肺气肿, 两肺散在感染, 两侧少量胸腔积液, 两侧腋窝多发淋巴结肿大;颈部彩超探及双侧淋巴结。在病程第 9 天时, 慢性支气管炎, 肺气肿, 两肺炎症及肺水肿, 两肺胸腔积液伴两肺下叶部分萎缩, 两肺散在纤维增生灶, 右肺中叶肺气囊, 纵膈及两侧腋窝数枚淋巴结肿大。其他病例肺部影像学无明显改变。

四、核酸检测结果

3 例患者急性期血液 RT-qPCR 法恙虫病东方体核酸阳性, 他们的 Ct 值均 ≤ 30.98 , 其中 2 份的 n-PCR 结果扩增到约 360 bp 核酸片段(图 1)。所有样本 RT-PCR 和 n-PCR 均未检测到立克次体属核酸。

2 份 n-PCR 核酸阳性扩增产物的 DNA 片段测序, 获得其 365 bp 的核苷酸序列, 分别是 Fang/2021(病例 6)和 Jing/2021(病例 7)。BLAST 比对 2 份样本均属恙虫病东方体, 应用 MEGA7.0 软件, 构建了 2 条序列和中国及亚太地区部分相关基因型序列的系统发育树(图 1)。2 条序列在系统发育树拓扑结构的不同支系, 表明 2 例患者感染了不同基因型的恙虫病东方体, Fang/2021 与 Karp 原型株有一个碱基的差异(2 次核酸提取, PCR 扩增测序结果相同), 属于无义突变; Jing/2021 与浙江-2 型 Liu/2011^[2]一致性为 100%。

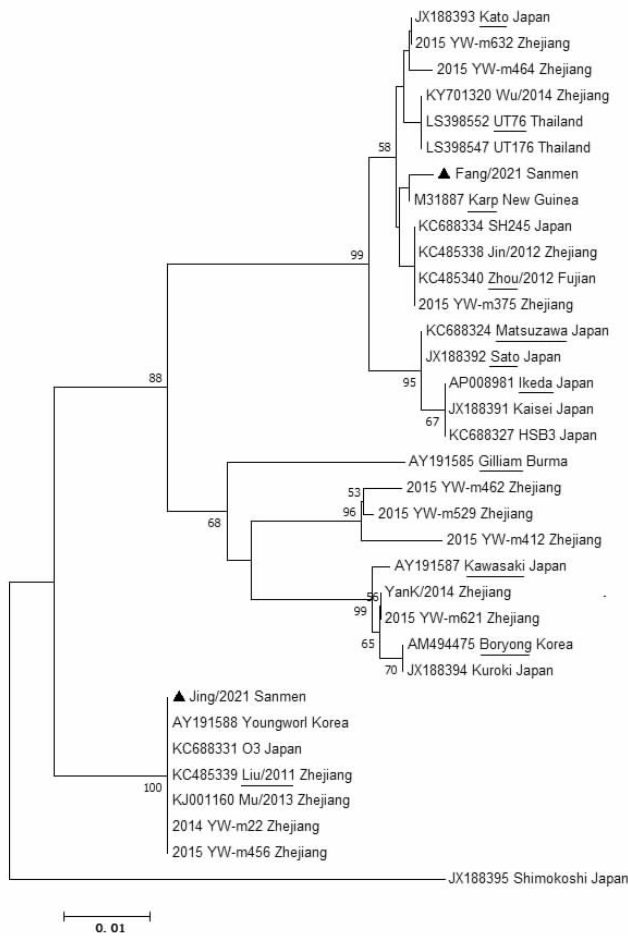
五、病原学诊断

3 例急性期恙虫病东方体核酸阳性患者, 其中 2 例同时采集到恢复期血清, 双份血清抗恙虫病 IgG 抗体滴度 4 倍以上增高; 另有 2 例急性期恙虫病东方体核酸阴性患者, 其中 1 例双份血清抗恙虫病 IgG 抗体滴度 4 倍以上增高, 1 例单份滴度血清 $\geq 1:512$ 。IFA 检测抗恙虫病 IgG 抗体结果表明, 病例 5 病程第 4 天滴度达 1:512, 其余病例 1~5 d 阴性或在临界值; 4 例患者采集到恢复期血清, 其中 3 例抗恙虫病 IgG 抗体滴度 $\geq 1:1 024$ 。所有血清抗斑点热抗体阴性。其余 3 例未得到恙虫病东方体感染确认的病例, 病例 1 和病例 2 诊断为

表 1 8 例急性不明原因发热疑似恙虫病患者的部分实验室检测结果

病例号	年龄(岁)	采血病程(d)		急性期部分实验室指标检测结果					抗恙虫病抗体	
		急性期	恢复期	RT-qPCR	n-PCR	WBC($\times 10^9/L$)	N (%)	PLT($\times 10^9/L$)	急性期	恢复期
1	76	4	/	-	-	9.4	96.2	122	-	-
2	53	4	/	-	-	5.4	60.7	60	-	-
3	64	4	36	-	-	2.9	85.2	73	1:32	$\geq 1:1 024$
4	66	2	21	+	-	2.6	90.8	19	-	$\geq 1:1 024$
5	76	4	/	-	-	11.6	93.4	118	1:512	-
6	67	5	26	+	+	5.3	83.9	59	1:32	$\geq 1:1 024$
7	54	2	/	+	+	-	-	-	-	-
8	69	2	70	-	-	3.2	62.6	35	1:32	1:32

注: RT-qPCR: 实时荧光定量 PCR; n-PCR: 巢式 PCR; WBC: 白细胞计数; N: 中性白细胞比例; PLT: 血小板计数; “-”: 阴性; “+”: 阳性



注: ▲三门县患者血液中检测到的核酸序列;下划线:原型株

图 1 364 bp 恙虫病东方体 *groEL* 基因序列系统发育树

急性上呼吸道感染, 病例 8 为不明原因感染性发热。

六、治疗

8 例患者中, 5 例患者为恙虫病, 其中 4 例轻型, 1 例重症。4 例轻型恙虫病经口服多西环素肠溶胶囊及其他对症治疗痊愈。1 例重症恙虫病经多西环素肠溶胶囊和特治星抗感染治疗, 基本痊愈。其余 3 例病例经抗感染治疗后均治愈出院。

讨 论

本研究对流行季节并有野外活动史的急性发热患者进行了恙虫病东方体和斑点热立克次体的核酸和特异性抗体检测, 病原学确认三门地区存在散发恙虫病东方体感染。我国为恙虫病重点疫区之一, 2006—2016 年, 国家疾病监测系统共记录 93 481 例恙虫病病例, 总体实验室确诊比例仅为 4.7%^[2-3]。国内立克次体病常见致病原为恙虫病东方体和斑点热立克次体, 分别引起恙虫病和斑点热, 都以高热、皮疹、特

征性焦痂、淋巴结肿大典型临床特征, 仅依据临床表现难以鉴别^[4]。

8 例发热并有野外活动史患者中, 5 例恙虫病确诊患者有特异性焦痂和/或皮疹, 其中 1 例仅有皮疹, 如果不进行病原学检测, 很容易漏诊。恙虫病东方体感染可引起多种并发症, 其中并发肺炎和胸腔积液报道较多^[5-6], 本研究 1 例恙虫病重症患者并发肺炎、胸腔积液和凝血功能异常, 其胸部 CT 影像与其它感染引起的肺炎无特征性差别。多西环素和哌拉西林钠/他唑巴坦钠抗感染治疗有效。恙虫病治疗有特效敏感的抗菌素, 但早期临床症状不典型, 易造成误诊和漏诊, 导致病情加重。因此, 精确和快速的病原学诊断对于恙虫病的确诊和治疗具有非常重要的意义。

本研究检测到恙虫病东方体核酸, 序列分析表明为不同基因型, 分别为 Karp 相关和 Liu/2011 相关, 但由于获得序列较短, 还不能确切鉴定基因型。值得注意的是, 恙虫病东方体血液样本内载量较低; 对四环素类、大环内酯类和喹诺酮类等抗菌素敏感, 菌血症维持时间短; 常温下样本内恙虫病东方体存活时间短, DNA 极易降解, 给核酸检测尤其是序列分析带来困难。因此, 临床要在发热期、使用有效抗菌素之前尽快采集血液和焦痂样本, 低温运输和贮藏, 尽快检测。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 周海慧: 酝酿和设计实验、实验研究、采集数据、分析解释数据和撰写文章; 林金、奚娜、周继恩、陈序委、王其泰、徐苗燕、陈景丹: 采集数据; 杨章女: 指导研究

参 考 文 献

- [1] 中国疾病预防控制中心传染病所立克次体研究室. 立克次体病诊断与处置手册[M]. 北京: 卫生部办公厅, 2008.
- [2] Xin HL, Yu JX, Hu MG, et al. Evaluation of scrub typhus diagnosis in China: analysis of nationwide surveillance data from 2006 to 2016[J]. Infect Dis Poverty, 2019,8(1):59. DOI: 10.1186/s40249-019-0566-0.
- [3] 李贵昌, 栗冬梅, 李焱, 等. 2006—2016 年我国恙虫病流行特征分析[J]. 疾病监测, 2018, 33(2): 139-143. DOI: 10.3784/j.issn.1003-9961.2018.02.007.
- [4] Lu Q, Yu J, Yu L, et al. *Rickettsia japonica* infections in humans, Zhejiang Province, China, 2015[J]. Emerg Infect Dis, 2018, 24(11): 2077-2079. DOI: 10.3201/eid2411.170044.
- [5] 卓树洪, 叶晓光, 廖云珍, 罗润齐. 恙虫病并发肺部损害的临床表现[J]. 广东医学, 2016, 37(7): 1040-1042. DOI: 10.13820/j.cnki.gdyx.2016.07.022.
- [6] 杨松, 张耀亭, 邱跃灵. 58 例恙虫病并发肺部感染的流行病学及临床分析[J]. 临床肺科杂志, 2016, 21(8): 1439-1442. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6663.2016.08.025.

(收稿日期: 2022-03-02)