

欧盟蜱传细菌性疾病诊断纲要

张丽娟 (编译)

关键词: 诊断纲要; 立克次体病; 莱姆病; 蜱传疾病; 无形体病

中图分类号: R376

文献标识码: B

文章编号: 1003-9961(2011)01-0075-06

蜱是能够寄生各种脊椎动物(包括人类)体表专性吸血的节肢动物,是许多自然疫源性疾​​病及人兽共患病的媒介和宿主。蜱呈世界分布。近年来,许多新发蜱传细菌性疾病被发现。自1982年莱姆病病原体伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)发现以来,目前欧洲大陆共发现11种蜱传致病菌。该类疾病诊断困难,需要专业实验室采用特别技术来完成。因此,欧洲临床微生物及传染病学学会-贝氏柯克斯体(*Coxiella*)、无形体(*Anaplasma*)、立克次体(*Rickettsia*)、巴尔通体(*Bartonella*)联合研究组以及欧盟蜱传疾病监测联合组织(EC QIK2-CT-2002-01293)成员共同起草编写了《欧盟蜱传细菌性疾病诊断纲要》^[1],其目的是帮助临床医生及微生物工作者正确认识及诊断蜱传疾病。

1 立克次体病

1.1 病原体与媒介 斑点热群立克次体是蜱传立克次体病的主要成员,该类病原体是专性细胞内寄生菌。许多成员在蜱体内可经期传播(即幼虫-诺虫-成虫)或经卵垂直传播。因此,蜱即可作为媒介也可作为宿主。蜱传立克次体病具有一定的地理分布。病原体主要侵染人内皮细胞导致血管炎,引起系列临床及实验室异常表现。欧洲分布最广的是由康氏立克次体(*R. conorii*)引起的地中海斑点热(MSF),也叫纽扣热。传播媒介主要是血红扇头蜱(*R. sanguineus*)。近期欧洲又发现5种新发蜱传斑点热及输入性非洲蜱咬热^[2]。

1.2 临床表现 蜱咬后6~10 d发热、头痛、肌内痛、皮疹、叮咬部位有焦痂及局部淋巴结肿大。血液及生化非特异表现有血小板减少、白细胞减少及肝酶升高。

1.2.1 实验室诊断

1.2.2 标本采集与保存 采集5 ml肝素或枸橼酸钠抗凝血液。EDTA抗凝血可用于分子生物学诊断。如标本在24 h

内不能检测,最好-70℃保存或更低温度。血清学检测采集急性及恢复期(2周后)血液10 ml。如没有4倍变化,应间隔4~6周采集第3次血液。蜱叮咬部位皮肤标本是培养、免疫组化及PCR检测最好标本。

1.2.3 诊断方法

1.2.3.1 血清学 微量间接免疫荧光实验(MIF)是推荐的参考方法。在法国马赛,IgG滴度 $\geq 1:128$ 和/或IgM $\geq 1:64$ 可考虑康氏立克次体感染。而IgG滴度 $\geq 1:64$ 和/或IgM $\geq 1:32$ 可考虑其他立克次体感染。IgM或IgG血清转换(抗体滴度4倍升高或降低)分别在发病25 d或28 d以后。斑点热群立克次体不同种之间存在抗体交叉反应。表1给出了交叉反应排除实验及结果解释。

表1 法国马赛参考实验室交叉排除实验及结果解释

Table 1 Procedure used for the diagnosis of rickettsioses when cross reaction are noted

- | |
|--|
| 1 当某一病原体特异 IgG 或 IgM 抗体高于另外一种病原体至少 2 个稀释度时,可考虑该病原体感染 |
| 2 当比较病原体抗体滴度 < 2 个稀释度时,做免疫印记,急性期血清检测到某种病原体特异抗体时,可考虑该病原体感染 |
| 3 做免疫印记实验无法进行确证时, IgG/IgM $\geq 128/32$ 时,可考虑交叉吸收实验。
交叉实验特异诊断标准如下: (1)单一抗原免疫荧光实验阳性;
(2)免疫印记对某一单一蛋白显示特异反应 |

1.2.3.2 培养 立克次体分离培养必须在生物安全 P3 实验室进行。标本有肝素或枸橼酸钠抗凝血液、皮肤活检标本(患者体表有焦痂)或蜱标本。离心 shell vial 方法已普遍用于分离培养。有调查结果显示,MIF 抗体滴度 $\leq 1:32$ 时,59% 的患者分离到病原体。Vero 细胞和 L929 细胞是敏感细胞。

1.2.3.3 分子生物学 PCR 是检测立克次体敏感、特异的快速诊断技术。表 2 列举了立克次体检测常用 PCR 引物及扩增基因。

1.2.3.4 病例定义 地中海斑点热病例定义及诊断积分,见表 3。

2 无形体病与埃立克体病

2.1 病原体与媒介 人无形体病是由嗜吞噬无形体(*Anaplasma phagocytophilum*, 曾叫人粒细胞埃立克体)引起的急性传染病。1994 年美国首次被描述。该病原体属于立

基金项目: 国家基础研究项目 - 973 计划 (No. 2010CB530200, 2010CB530206) 和艾滋病和病毒性肝炎等传染病防治科技重大专项 - 病原体实验室网络化监测技术研究 (No. 2008ZX10004-008)

作者单位: 中国疾病预防控制中心传染病所无形体研究室, 北京 102206

作者简介: 张丽娟, 女, 黑龙江人, 主要从事立克次体及无形体病预防控制工作

通信作者: 张丽娟, Tel 010-58900780, Email zhanglijuan@cdc.cn

收稿日期: 2010-11-08

表 2 立克次体感染患者 PCR 检测常用靶基因

Table 2 Targetting genes and primers of detecting rickettsiae

使用基因和种	正向和反向引物 (5' ~ 3')	方法	样本
<i>glA</i> (所有种)	RpCS. 877p GGG GAC CTG CTC ACG GCG G RpCS. 1258r ATT GCA AAA AGT ACA GTG AAC A	普通 PCR	皮肤
Outer membrane protein A (<i>ompA</i>) 所有种 (除了 <i>R. helvetica</i> , <i>R. australis</i> <i>R. bellii</i> , <i>R. canadensis</i>)	Rr190. 70p ATG GCG AAT ATT TCT CCA AAA Rr190. 602r AGT GCA GCA TTC GCT CCC CTT Rr190. 70p ATG GCG AAT ATT TCT CCA AAA Rr190. 701r GTT CCG TTA ATG GCA GCA TCT	普通 PCR 普通 PCR	皮肤
<i>ompA</i>	AF1F: CAC TCG GTG TTG CTG CA AF1R: ATT AGT GCA GCA TTC GCT C AF2F: GCT GCA GGA GCA TTT AGT G AF2R: TAT CGG CAG GAG CAT CAA AF3F: GGT GGT GGT AAC GTA ATC AF3R: CGT CAG TTA TTG TAA CGG C AF4F: GGA ACA GTT GCA GAA ATC AA AF4R: CTG CTA CAT TAC TCC CAA TA	自杀式 PCR ⁽¹⁾ 自杀式 PCR ⁽¹⁾	血清
<i>ompB</i> 所有种 (除了 <i>R. helvetica</i> , <i>R. bellii</i> , <i>R. massilliae</i>)	BG1- 2f GGC AAT TAA TAT CGC TGA CGG BG2- 20 GCA TCT GCA CTA GCA CTT TC	普通 PCR	皮肤

注: (1)只有在专业实验室使用一次,不需要阳性对照,每次筛选实验时,对立克次体其他基因,设计引物对

表 3 地中海斑点热诊断标准⁽¹⁾
Diagnostic criteria for Mediterranean spotted fever

标准	积分
流行病学标准	
流行地区居住	2
5- 10月发病	2
接触蜱	2
临床标准	
发热 > 39℃	5
焦痂	5
皮疹或斑丘疹	5
上述标准中的 2 个	3
上述 3 个标准	5
非特异性实验室异常	
血小板 < 150 U/L	1
SGOT 或 SGPT > 50 U/L	1
细菌学标准	
康氏立克次体血培养阳性	25
皮肤活检检测到康氏立克次体	25
血清学标准	
单份血清 IgG > 1:128	5
单份血清 IgG > 1:128 和 IgM > 1:64	10
双份血清抗体 4 倍升高	20

注: (1)SGOT 血清谷草转氨酶; SGPT 血清谷丙转氨酶; 总积分 ≥ 25 为阳性诊断标准

克次体目, α-原细菌纲。病原体严格细胞内寄生, 主要侵染人及动物中性粒细胞。自 1930 年起欧洲就认识到该病原体对家畜的致病作用, 只有近年才认识其对人类有致病性。欧洲大范围采集的 *Ixodes* 蜱标本检测无形体, 其流行率为 2% ~ 45%。欧洲首例报道是 1995 年斯洛伐克。目前共报告了 22 例确诊病例。

2.2 临床表现及实验室异常 潜伏期为 5~ 21 d(平均 11 d)。4- 10 月为高发季节, 6 月为高峰。主要表现急性发热(体温 > 38.5℃)、寒战、剧烈头痛、全身酸痛或关节痛。男性多于女性, 平均年龄 11~ 73 岁。还有恶心、腹痛、腹泻及咳嗽等症状。少见皮疹及中枢神经系统症状。少数患者有非典型肺炎表现。约 50% 的患者需要住院治疗。并发症及致死

病例少见。常见的实验室异常是血小板减少(90%)和白细胞减少(70%), 同时伴有肝酶升高, 如谷丙转氨酶、谷草转氨酶及乳酸脱氢酶。多数患者有 C-反应蛋白升高。其他表现有贫血、血清尿素氮、肌酐升高。在发病 14 d 这些症状恢复正常。在欧洲北部、中部及东部地区, 该病与蜱传脑炎很难鉴别。

2.3 实验室诊断

2.3.1 标本采集与保存 一般标本应在抗生素使用前, 急性发热期, 这时感染的中性粒细胞含菌浓度最高。EDTA 抗凝血最好, 快速接种, 在室温或 - 20℃ 不超过 48 h, 枸橼酸钠抗凝血室温下病原体存活最长时间为 10 d, 而 4℃, 最长可存活 13 d, 标本应尽快运输, 最长不超过 48 h, 血清检测应采集急性期及 15~ 21 d 后恢复期血清, 4℃ 或 - 20℃ 保存。关于该病抗体动力学变化的观察研究十分有限, 但 40% 的患者在发病 2 年后仍可检测到抗体。血膜包含体检测十分有意义。

2.3.2 诊断方法

2.3.2.1 血清学 间接免疫荧光实验检测循环抗体是首选方法。通常将细胞培养的无形体包被玻片, 用冰丙酮或乙醇固定后 - 20℃ 保存或避光保存。同样纯化后的无细胞抗原也可冰冻保存或 4℃ 下, 1% W/V 叠氮钠磷酸盐保存。

2.3.2.2 培养 无形体分离培养应在 P3 实验室进行。HL60 细胞(ATCC CCL240)是最广泛使用的细胞系。这些细胞保存在无抗生素的含有 2 mmol/L 谷氨酰胺及 20% (V/V) 胎牛血清的 RPMI- 1640 培养基中, 37℃, 5% CO₂ 培养, 一般取 100 μl 新鲜血或 0.5 ml 冻存的白细胞层(EDTA 抗凝血分离后)接种到浓度为 2 × 10⁵ HL60 细胞培养瓶中, 隔日观察, 3~ 7 d 后进行 Giemsa 细胞涂片染色。

2.3.3 分子生物学检测 目前 PCR 方法没有标准化, PCR 扩增的敏感性与使用引物及扩增长度有关。不管扩增那个基因, 必须进行测序鉴定。无论进行那种基因扩增, 临床应用效果是最好的评估方法。常使用的引物及扩增基因见表 4。

表 4 无形体扩增靶基因及使用引物

Table 4 Targetting genes and primers of detecting *A. phagocytophilum*

基因	正向及反向引物 (5' ~ 3')	方法	样本	敏感 特异
16S rRNA	GE9f AAC GGA TTA TTC TTT ATA GCT TGC T GE10r GGA GAT TAG ATC CTT CTT AAC GGA A	普通 PCR	血	86% / 100%
16S rRNA	EC9 AAG GAT CCT ACC TTG TTA CGA CTT EC12 AAT CTA GAT TAG ATA CCC T(A/T/G)G TAG TC C G e9f AAC GGA TTA TTC TTT ATA GCT TGC T G e10r GGA GAT TAG ATC CTT CTT AAC GGA A	巢式 PCR	血清	未评估
<i>Epank1</i>	LA6 GAG AGA TGC TTA TGG TAA GAC LA1 CGT TCA GCC ATC ATT GTG AC	普通 PCR	血	93% / 100%
HGE 44	未发表	普通 PCR	血	未评估
P44 (<i>m-p-2</i>)	P44f1 TTG ATC TTG AGA TTG GTT ACG	巢式自杀式 PCR	血清	未评估
Parabg序列	P44r1 GGC AGA TCA TCA TAA ACR CC P44f2 CAA GGG TAT TAG AGA TAG T			
Gruels	P44r2 AAA CTG AAC AAT ATC CTT AC HS1 TGG GCT GGT A(A/C)T GAA AT HS6 CCI CC IGG IAC I A(C/T)A CCT TC HS43 AT(A/T)G C(A/T)A A(G/A)G AAG CAT AGT C HS45 ACT TCA CG(C/T)(C/T)T CAT AGA C	巢式 PCR	血	未评估

2.3.4 病例定义 无形体病例的确诊主要依据流行病学、临床表现、实验室检查及诊断实验。

人无形体病诊断推荐标准:

(1) 确诊病例 发热,有蜱叮咬或接触史并且证实嗜吞噬细胞无形体血清抗体转换(4倍升高或降低)或者血液PCR检测到无形体特异性基因片段并测序证实或者血液培养分离到嗜吞噬细胞无形体。

(2) 疑似病例 发热,有蜱叮咬或接触史或者 PCR 阳性,但没有测序或测序未成功或者血涂片有包涵体。

3 莱姆病

3.1 病原及媒介 莱姆病是由伯氏疏螺旋体引起的蜱传细菌性传染病,病原体呈螺旋状,长 20 ~ 30 μm,宽为 0.2 ~ 0.3 μm。目前对人致病的有 3 种, *B. burgdorferi sensu stricto* (ss), *Borrelia afzelii* 及 *Borrelia garinii*。北美地区主要有 *B. burgdorferi* ss 而欧洲地区上述 3 种均存在。最新报道的新种有 *Borrelia lonestari*, *Borrelia japonica*, *Borrelia andersonii*, *Borrelia lusitanae*, *Borrelia miyamotoi*, *Borrelia turdae*, *Borrelia tanukii* 及 *Borrelia valaisiana*^[3]。后 3 种对人可能有致病性。所有病原体均为硬蜱传播。蜱的幼虫及诺虫主要寄生各种啮齿动物及鸟类吸血,而成蜱主要寄生各种哺乳动物(如鹿、家养或野生食肉动物)吸血。鸟类,特别是海上迁徙鸟可以携带蜱进行远距离病原体传播输入,因此,该病原体特别是 *Borrelia garinii* 呈世界分布。病原体与宿主之间的关联性如下: *B. burgdorferi* sl spp 与脊椎动物宿主, *B. afzelii* 和小啮齿动物, *B. garinii*, *B. valaisiana* 和鸟类。

3.2 临床表现及实验室异常 *B. burgdorferi* ss *B. afzelii* 和 *B. garinii* 临床表现分为 3 期, I 期为疾病早期,为局部感染期, II 期为波散期, III 期为持续感染期。I 期为局部皮肤损伤如游走红斑, 3 个种均有此症状,起初在蜱叮咬部位,然后逐渐波散。某些病例可发生次级环状损伤。极少数病例可发生非常典型淋巴细胞瘤,通常位于耳垂、乳头或乳晕处。

多发性关节痛病例发病几周或 2 个月后,可有节损伤,在美国, 80% 未治疗病例发生膝关节炎(II 期病程)。目前有人认为莱姆病关节炎与 *B. burgdorferi* ss 感染有关。 *B. garinii* 可引起神经表现,如脑膜炎、大脑炎及脑膜神经根炎。颅神经损伤可导致面瘫。5% 的病例发病后数周可表现心脏受累,心电图显示心肌炎、房室阻断。慢性萎缩性肢皮炎与 *B. afzelii* 感染有关,一般发生游走红斑后数年(III 期病程)。ACA 的主要表现是蓝红色消退,表现硬性渗出,然后进展为皮肤萎缩及硬化改变。

3.3 实验室诊断

3.3.1 标本采集与保存 注意无菌采集标本,不加任何防腐剂,尸检标本放在盛有无菌生理盐水的小容器内。尽量事先与实验室联系,应尽快接种(2~4 h)。血清是莱姆病诊断常用标本,神经病变病例,脑脊液和血清同时采集进行实验室检测。颅内病原体特异抗体检出对于诊断具有明确作用。CSF 也是理想的标本,细菌培养及 PCR 操作检出率为 20%。关节液特别是尸检标本 PCR 检测对于关节炎诊断有意义。皮肤活检标本对 *B. burgdorferi* 分离是理想的材料,对于 EM 患者,分离率高达 86%。蜱是流行病学调查患病风险重要的标本。

3.3.2 诊断方法

3.3.2.1 血清学 多数病例在发病早期可检测到特异抗体,但 IgG 抗体多在 II 期检测到。神经病变患者 CSF 可检测到特异抗体。疾病晚期(III 期)可检测到较高的抗体滴度,特别是关节炎或 ACA 患者。只有 10% ~ 40% 的患者可检测到 IgM 抗体。对于慢性神经病变患者检测 CSF 抗体非常重要。免疫印记也可诊断莱姆病,主要用来疾病分期,如早期, p41, OspC 免疫带呈阳性。任何单一的血清诊断实验都不能明确诊断该病,只有采用多种检测方法才可提高检出阳性率。

3.3.2.2 培养 分离培养只有在参考实验室进行。*B. burgdorferi* 在人工培养基上可生长(改良 Kelly 培养基 - MKP 培养基)。但分离培养费时费力,一般常规实验室难以

进行。对于临床表现典型, 抗体阴性, 或神经损伤病例但 CSF 检测抗体阴性, 或免疫反应缺陷病例, 病原体分离培养是最有用的诊断方法。有时培养对于血清检测阳性病例也起到支持作用, 如有皮肤病变表现, 但不能确定的病例。

3.3.2.3 分子生物学检测 目前没有标准化方法包括 DNA 提取。以 PCR 为基础的各种检测基因包括 *ospA*、*ospB*、鞭毛蛋白 *p66* (克隆 2H1)、16S rRNA 基因、5S/23S rRNA 间隔序列都可用来检测病原体。多基因扩增更有效。除了关

节液标本, 分子生物学诊断敏感性并不优于分离培养。如皮肤活检标本或 CSF 用作 PCR 时, 敏感率分别为 60% 和 25%。莱姆病分子生物学诊断已有综述文献或通过网址 (<http://www.dghm.org/red/index.htm?cname=M%20and%20alpha.mpk.med.uni-muenchen.de/bak/nrzborelia/miqlyme/Framemiq-Microbiological.html>) 进行查阅。

3.4 风险评估 1996年欧联盟协作执行委员会发表了莱姆病诊断评估标准 (EUCALB), 见表 6。

表 5 欧联盟莱姆病诊断标准
Table 5 Diagnostic criteria for Lyme disease

疾病	主要临床依据 (必须标准)	主要临床依据 (辅助标准)	实验室证据 ⁽¹⁾ 主要依据 (不可或缺)	实验室证据 ⁽²⁾ 主要依据 (支持性)
慢性游走性红斑 (EM)	游走的斑块呈粉红或蓝红色, 常常是中央消退边缘颜色深, 对比明显, 没有显著的隆起, 局限于叮咬周围或游走 (少见)	在同一位置被蜱叮咬过	无	通过培养或者从皮肤活检标本 NAT 检测到伯氏包柔螺旋体, 特异性抗体明显升高或者检测到特异性的 IgM
包柔氏体淋巴瘤 (罕见)	蓝红色的斑块常是无痛的, 通常位于耳垂、耳轮、乳头或阴囊, 发生于儿童 (特别是在耳朵) 的概率大于成年人	EM 存在或以前有过	检测存在伯氏包柔螺旋体的抗体 (IgG 和或 IgM) 或其 IgG 抗体明显上升	B-细胞假淋巴瘤组织学特征
慢性萎缩性肢端皮炎	四肢表面长期的红色或蓝红色, 开始时柔软的皮肤会肿起, 斑块最后会萎缩。皮肤会硬结可能超过骨突	血清高滴度特异性 IgG 抗体或伯氏包柔螺旋体典型的组织学迹象以及通过培养或皮肤组织活检 NAT 检测到病原体		
早期神经病变	脑膜神经根炎疼痛伴随或不伴随面瘫或其他的颅神经麻痹 (Garric-Bujadoux-Bannwarth 综合征)。儿童可频繁发生脑膜炎, 独立的当面出现 (间或双面) 面瘫或者其他头盖骨麻痹	EM 存在或以前有过	脑脊液 ⁽³⁾ 中的淋巴细胞增多并且 CSF 检测到特异性抗体 ⁽³⁾ 、或从脑脊液培养或 NAT 检测到伯氏包柔螺旋体	在脑脊液中出现特异性的寡克隆区带; 血清特异性抗体明显升高
慢性神经病变 (罕见)	持续脑炎, 脑膜脑炎, 脑脊髓炎, 神经根炎		脑脊液 ⁽³⁾ 中的淋巴细胞增多并且 CSF 检测到特异性抗体 ⁽³⁾ 、或从脑脊液培养或 NAT 检测到伯氏包柔螺旋体	在脑脊液中出现特异性寡克隆区带
莱姆心肌炎	房室阻断急性发作 (II 度和 III 度)、心率失调、心肌炎或心内膜炎	EM 存在或以前有过	检测存在伯氏包柔螺旋体 IgG 和或 IgM 抗体或其 IgG 抗体明显上升或者在心脏组织活检中培养到伯氏包柔螺旋体	
莱姆关节炎	1 某个或某些大关节炎反复发作, 有时发展成慢性关节炎从临床症状排除其他原因 2 某个或某些大关节炎反复发作, 有时发展成慢性关节炎, 但缺乏典型临床症状及病史		1 高浓度的特异性 IgG 血清抗体或者结合主要临床症状中的第 2 条 2 高浓度的特异性 IgG 血清抗体并且通过 NAT 或者通过从关节滑液和/或滑液活体组织标本培养检测到伯氏包柔螺旋体	

注: EM, 慢性游走性红斑; NAT, 核酸扩增技术; CSF, 脑脊液。(1)就实验结果而言, 本文所列出来的特异性方法可以得到证实。(2)随着疾病的发展或者应用抗生素治疗不久之后, 特异性的血清水平可能会升高; 当疾病康复后它们可能会减少。(3)当疾病开始时或者儿童单侧面瘫, 在短时间内 (几天) 不会发生脑脊液淋巴细胞增多

4 土拉热

4.1 病原及媒介 土拉热是由土拉弗朗西斯菌引起的人兽共患病。病原体需氧, 多形态。病原体可感染 250 多种动物如哺乳动物, 特别是野兔、家兔、啮齿动物、鸟类、鱼、寄生虫等。病原体可通过多途径感染, 人类感染主要是蜱 (革蜱和硬蜱) 的叮咬,

感染的哺乳动物咬伤、鹿蝇及蚊虫叮咬等而发生传播。直接接触、吸入以及摄入污染的水或食物以及职业暴露等均可感染。实验室工作人员、农民、畜牧医生、打猎人员以及肉品加工人员等是职业感染高危人群。65% 病例发生在 5-7 月。33% 的患者在 11 月或 12 月因接触野兔、家兔而感染。

4.2 临床表现与实验室特征 潜伏期 1~21 d, 主要表现

突然发病、寒战、头痛、淋巴病变、全身无力、肌肉痛及疲劳等。体温及脉搏分离现象。临床分为6型:腺溃疡型(4%~75%)、腺型(12.5%~15.9%)、眼及眼腺型(0.5%~3.5%)、口咽型(0~9.2%)、伤寒型(8%~14%)及肺炎型(1.5%~>50%)。WBC正常或偏高,部分患者有异型淋巴细胞。肝脏转氨酶升高。25%患者有脓尿。70%的病例CSF分析结果正常。

4.3 实验室诊断

4.3.1 标本采集与保存 所有可疑病例标本检测应在P3实验室进行。皮肤活检标本(焦痂周边组织)或淋巴结尸检标本以及血液(肝素抗凝血)咽拭子已经痰标本等可用来分离培养,但应快速或储存在-80℃保存。PCR标本可以-20℃保存。血清学检测采集双份血清。

4.3.2 诊断方法

4.3.2.1 血清学方法 血清学方法仍是主要方法。临床症状出现后2周,标准试管凝集实验可检测到特异抗体。单份血清抗体滴度≥1:160差异具有统计学意义。地理分布不同,参考值也不相同。流行区参考值大于非流行区。由于抗体可能会持续相当长时间,单份血清土拉热的诊断是不能确立的。疾病早期采集血清与恢复期血清标本抗体滴度呈4倍升高具有明确诊断意义。因交叉反应,特别是IgM抗体,血清学方法是无法鉴定*F. tularensis*亚种的。

培养 病原体分离十分困难且危害性较大,一般很少用于诊断。有报道分离率只有10%。

病原体的各项操作必须在P3生物安全实验室进行。研究人员建议免疫接种。*F. tularensis*营养要求苛刻,在富含胱氨酸的培养基中37℃,5% CO₂培养2~4d可生长。商售的添加有 IsoVitalex (BBL, Cockeysville, MD, USA) 或 Polyvitex (birm e' rieux Marcy l'Étoile, France)巧克力琼脂可进行分离培养。自动化血培养系统也可分离此病原体。病原体菌落呈蓝灰色、圆形、光滑、较湿润,血平板上菌落周围有α溶血环。

4.3.2.2 分子生物学检测 许多基因如16S rDNA和17kDa脂蛋白基因都可作为检测基因。PCR技术克服了分离培养可能造成的生物安全问题。PCR技术可进行分子分型。基于16S rDNA序列,可以鉴别*F. tularensis* subsp. *Tularensis*和*F. tularensis* subsp. *Palaearctica*。尽管因生物恐怖原因,该病原体基因组序列信息已严格限制,但*F. tularensis* subsp. *F. tularensis* Schu S4全基因组测序的完成,大大促进了分子生物学的应用。诊断标准见表6。

5 蜱传复发热

5.1 病原体与媒介 蜱传复发热(TBRF)是一种传染病,表现败血症性突然高热症状和体征。临床反复间歇性发作。该病呈世界分布,主要由16种不同包柔氏螺旋体属细菌引起,这些细菌寄生在钝缘蜱属中的软蜱类。如果不治疗,TBRF病死率达5%。每种包柔氏螺旋体都有特定的媒介。自然界中,许多啮齿动物、小哺乳动物可作为自然宿主。包柔氏螺旋体可在他们的媒介中持续存活许多年。

表6 土拉热CDC鉴定标准

Table 6 Criteria for diagnosis of tularemia

临床描述	主要临床表现包括以下: 腺溃疡(皮肤溃疡伴随局部淋巴结病) 腺体(局部淋巴结病没有溃疡) 眼(与)腺(结膜炎伴随耳前淋巴结病) 口咽(口腔炎或咽炎或扁桃腺炎和颈淋巴结病) 肠(肠疼痛、呕吐、腹泻) 肺(原发性胸膜疾病) 伤寒(发热性疾病,早期没有表现和体征) 蜱和鹿蝇叮咬及接触哺乳动物宿主组织、接触土拉热弗朗西斯菌或者可能被污染的水等。流行病学病史有助于临床诊断
实验室诊断标准	可疑病例 土拉热弗朗西斯菌血清抗体滴度升高(未证明4倍或以上改变),但没有临床病史 弗朗西斯菌接种后病例或通过荧光实验检测到土拉热弗朗西斯菌 确诊病例 分离到土拉热弗朗西斯菌或土拉热弗朗西斯菌特异抗体滴度4倍升高
病例分类	可疑 临床症状符合,而实验室结果提示可能感染 确诊 临床症状符合且实验结果证实的病例

5.2 临床表现与实验室特征 TBRF表现突然发病,高热、寒战、头痛、乏力、肌肉痛、关节痛及咳嗽等。严重病例可出血、肝、脾肿大、角膜虹膜炎。非洲病例多有腹痛、恶心、呕吐、腹泻及畏光等。初次发热末期可有皮疹。神经症状较常见,甚至较严重。7%的患者有黄疸。病死率为2%~5%。

5.3 实验室诊断

5.3.1 标本采集与保存 疾病发作时采集血标本,暗视野显微镜或光镜下或血膜镜检可见大量病原体(10⁶~10⁸细菌/ml)。急性期血液也可分离培养病原体。血清特异抗体检测对于确诊实验是必需的。

5.3.2 诊断方法 发热期血液检测病原体十分有用。暗视野显微镜或光镜下检测Giemsa或瑞氏染色血膜标本,敏感性达70%。

5.3.3 血清学检测方法 因病原体变异性,血清抗体检测价值十分有限。

5.3.3.1 培养 东非地区TBRF主要是由*Borrelia duttonii*引起,使用BSK II培养可成功培养病原体

5.3.3.2 分子生物学检测 巢式PCR扩增16S rRNA及鞭毛基因可检测血液及蜱标本中TBRF病原体。

5.3.4 蜱标本作为蜱传疾病诊断的重要工具 通常步骤包括蜱分类鉴定及病原分离培养。蜱分类鉴定到种水平。鉴定流程见表7。

5.3.4.1 蜱的鉴定 蜱分类鉴定到科、属及种水平。

5.3.4.2 蜱标本的保存 根据实验目的,可85%湿度下活体保存。根据不同种分别保存在15℃和25℃。吸血前,在95%湿度及0~5℃暗室下,蜱可维持3个月。-80℃保存可以使许多病原体维持感染状态,可进行病原体分离培养。

表7 蜱标本分离和/或鉴定细菌策略
Table 7 Stepwise of isolation and identification of pathogen from ticks

- 1 蜱的物种分类
- 2 染色方法鉴定蜱细胞中细菌种类(活蜱的血淋巴, 冷冻蜱的唾液腺)或者通过PCR方法鉴定(用蜱的一半, 另一半继续冷冻)。如染色阳性, 可用PCR鉴定。
- 3 PCR扩增片段测序并分析比对序列。
- 4 如检测片段和已知片段100%相似, 则可疑标本得到证实
- 5 如检测片段和所有可用片段不同, 则病原体可能为新种, 应从冷冻的另一半蜱标本进一步分离鉴定。

蜱标本(包括死蜱标本)可长期保存用于分子生物学方法检测病原体。

5.3.4.3 携带细菌的检测 将蜱腿远端部分折断, 吸取折断部位的血淋巴进行血淋巴实验, 涂在玻片上染色镜检, 可发现细菌。蜱唾液腺或卵或其他器官可用于组化染色。通过细胞培养可分离蜱标本中的立克次体, 主要技术是离心 shell vial 方法。将一滴血淋巴液接种到 shell vials 单层细胞中。消毒后的死蜱也可用于此操作, 用 1 ml 培养液将蜱浸软, 然后接种到 shell vials 瓶中或特殊的 BSK II 伯氏疏螺旋体培养基培养。

(上接第64页)

剂和细胞毒性药物的应用, 则加重了这一缺陷^[3]。

鉴于 ICU 的高度感染率, 合理使用抗菌药物, 是预防获得性感染和多重耐药菌株传播的重要措施之一。ICU 应加强院内感染病原学检测、监控和管理, 重视致病菌的变异及其耐药性情况的监测, 及时根据院内感染的病原菌特点以及药敏试验结果合理选择抗生素, 对避免二重感染和多重耐药菌株的产生和流行具有重要意义。

总之, 感染是临床治疗难点, 要减少病原菌感染的发生, 提高重症监护患者的救护质量, 首先要提高对医院感染的认识, 加强规范诊疗和护理操作每一个环节严格无菌操作技术避免病原菌感染。据多报道病原菌感染问题严重, 抗生素耐药范围广泛、耐药性发展快, 与临床不合理用药密切相关。从交叉感染和自身感染二方面控制医院感染发生, 科学与合理使用抗生素、严格掌握抗菌药物的适应证, 杜绝因滥用抗生素而导致的耐药菌感染。同时要把医院感染工作作为医院管理的重点来抓, 各职能科室要切实负起责任, 加大监管力度, 定期监测

5.3.4.4 分子生物学检测 许多基因可用来检测蜱传细菌、病毒及寄生虫。

蜱传细菌病原体诊断十分困难, 需要专业实验室, 使用特殊诊断设备及试剂, 需要有经验的实验技术人员完成。实验室数据的科学解释对于诊断也十分重要^[4]。

[致谢: 本文由欧洲委员会 (ECQLK2-CT-2002-01293) 及欧洲临床微生物及传染病学学会支持]

参考文献

- [1] Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, et al Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe [J]. *CMI*, 2004, 10: 1108-1132
- [2] Parola P, Paddock CD, Raoult D. Tick-borne Rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2005, 18(4): 719-756
- [3] Socobovschi C, Medianiuk O, Raoult D. Update on tick-borne bacterial diseases in Europe [J]. *Parasite*, 2009, 16(4): 259-273
- [4] Heyman P, Cochez C, Hofhuis A, et al A clear and present danger: tick-borne diseases in Europe [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2010, 8(1): 33-50.

病原菌耐药率以指导经验用药。针对目前重症监护室的病原菌耐药形势严峻, 合理用好抗生素成为每个医务人员的责任。治疗时应严格对症使用抗生素, 及早控制并发症的发生。

参考文献

- [1] Ni YX, Wang JL, Xu YC, et al Specification of antibiotic susceptibility test [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing House, 2002. (in Chinese)
倪语星, 王金良, 徐英春, 等. 抗微生物药物敏感性试验规范 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002
- [2] Xu X, Xu YQ, Zuo YS, et al Bacterial resistance of nosocomial pneumonia in ICU [J]. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2002, 12(5): 329-331. (in Chinese)
徐昕, 许燕卿, 左亚沙, 等. 重症监护病房医院内肺炎细菌耐药性调查 [J]. 中华医院感染学杂志, 2002, 12(5): 329-331
- [3] Zhang XZ, Yi TZ, Tao FR, et al Resistance mechanism of Gram-negative bacilli from lower respiratory tract of elderly inpatient [J]. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2004, 14(1): 94-96. (in Chinese)
张秀珍, 宜天芝, 陶凤蓉, 等. 老年人呼吸道革兰阴性杆菌感染耐药机制研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2004, 14(1): 94-96