

## · 论 著 ·

## 恙虫病合并慢性血吸虫病发病特点及恙虫病的分型

亚红祥\*, 王静林

**摘要:** 目的 了解恙虫病合并血吸虫病的发病特点以及恙虫病的分型情况。方法 收集病例资料并对其进行分析, 采用外斐反应和间接免疫荧光方法(IFA)检测患者血清中的恙虫病东方体(*Ot*)IgG 抗体, 用巢式 PCR 法扩增患者血液中的 *Ot* 56kD 蛋白基因, 并进行核酸序列测定和分析。结果 患者有血吸虫肝改变、肝功能受损、脾肿大、焦痂。外斐氏反应检测 OXk 1:40, IFA 检测 *Ot* IgG 抗体 Kato 型 1:160、Karp 型 1:40, PCR 检测 *Ot* 56kD 蛋白基因片断阳性, 其序列分析结果与 PG9、P25、CM438 等一些泰国 *Ot* 株同源性最高(98%), 与 *Ot* Karp、Gilliam、Kawasaki、TA678、Kato 株同源性均在 95% 以下。结论 证实了该患者为恙虫病合并慢性血吸虫病, 其 *Ot* 血清型可能为 Kato+Karp, 遗传进化关系与一些泰国 *Ot* 株关系较为密切。

**关键词:** 恙虫病; 慢性血吸虫病; 合并感染

中图分类号: R532.21 R376 文献标识码: A 文章编号: 1009-9727(2012)3-285-03

Analysis of scrub typhus patients complicated with chronic schistosomiasis. YA Hong-xiang, WANG Jing-lin. (Yunnan Institute of Endemic Diseases Control and Prevention Dali 671000 P. R. China Corresponding author: YA Hong-xiang Email: yahongxiang@163.com)

**Abstract:** Objective To understand the characteristics of scrub typhus patients complicated with chronic schistosomiasis and genetic typing of scrub typhus. Methods Epidemiological data of scrub typhus patients complicated with chronic schistosomiasis were collected and the characteristics were analyzed. IgG antibody (Ab) of *Orientia tsutsugamushi* (*Ot*) in serum of patient was tested using both Weil-Felix and IFA method. *Ot* 56kDa protein gene in blood of patient was examined by nested PCR (nPCR), sequenced and analyzed the homology with other known sequences. Results Lesions in the liver, splenomegaly and a skin eschar were recorded in the patient. In serum of patient the OXk titer was 1:40 as detected by Weil-Felix test, the Ab of Karp serotype *Ot* titer 1:40 and the Ab of Kato serotype *Ot* titer 1:160 was detected by IFA respectively. In blood of patient *Ot* 56kDa protein gene was detected by nPCR. Through comparing gene sequence the homology of *Ot* and some Thailand *Ot* strains such as PG9, P25 and CM438 was the highest (98%) and *Ot* Karp, Gilliam, Kawasaki, TA678 and Kato was all under 95%. Conclusions It was confirmed that scrub typhus patients complicated with chronic schistosomiasis and the *Ot* serum type might belong to Kato + Karp. In genetic evolution relationship it was closely related to some Thailand *Ot* strains.

**Key words:** Scrub typhus; Chronic schistosomiasis; Concurrent infection

恙虫病(*Tsutsugamushi* disease)又称丛林斑疹伤寒(Scrub typhus), 是由恙虫病东方体(*Orientia tsutsugamushi*, *Ot*)感染引起的急性传染病<sup>[1]</sup>, 该病常引起多器官损害, 临床表现复杂多变, 容易误诊。云南省为恙虫病流行的主要省份, 近年恙虫病病例较多<sup>[2,3]</sup>, 而且在全省血吸虫病流行区较为常见, 但恙虫病与血吸虫病合并感染者的报告较为少见。为了提高对本病的认识, 现将一例不明原因发热病例分析如下。

## 1 材料与方法

1.1 材料 2010 年 11 月 11 日本实验室收到的患者送检全血样品(编号为: DX1)。

## 1.2 方法

1.2.1 外斐氏反应(Weil-Felix) 参照宁波天润生物药业有限公司变形杆菌 OX19、OX2 和 OXk 诊断菌液(OX19 与 OX2 检测斑疹伤寒抗体, OXk 检测恙虫病抗体)说明书进行。

1.2.2 间接免疫荧光试验(IFA) 用 PBS 从 1:20 开始对被检样本血清作系列稀释至 1:160, 将各稀释度血清分别加到 *Ot* Karp 型和 Kato 型抗原片(均为中国疾病预防控制中心传染病预防控制所无形体实验室提供)孔内, 放入湿盒置 37℃ 孵育 45min, 用 PBS 洗片 3 次, 每次 1~2min, 吹干, 加入荧光素标记的羊

作者单位: 云南省地方病防治所 / 云南省病毒立克次体研究中心, 云南 大理 671000

作者简介: 亚红祥(1979~), 男, 硕士, 主管医师, 主要从事立克次体病防治与研究工作。

\* 通讯作者: E-mail: yahongxiang@163.com

抗人 IgG 抗体(KPL 公司产品)放入湿盒置 37℃ 孵育 30min,用 PBS 洗片 3 次,每次 1~2min,吹干,用 Nikon 荧光显微镜观察结果。荧光明亮,呈黄绿色,病原体均匀分布,即可判定该滴度为阳性。

1.2.3 巢式 PCR 检测 用德国 Qiagen 公司 DNA 提取试剂盒对患者血液(DX1)提取总 DNA,应用文献<sup>[3]</sup>中的引物,引物序列为:1.(5'-TACATTAGCT GCGGG TATGACA-3') 2.(5'-CCAGCATAATTCTTCAACCAAG-3'), 3.5'-GAGCAGAGCTAGGTGTTATGTA-3') 4.(5'-TAGGCATTATAGTAGGCTGAGG-3'),预期能扩增出 Ot 56kD 蛋白基因片断 150~168bp,引物由上海生工公司合成。

1.2.4 DNA 序列测定及分析 PCR 阳性产物送北京博迈德科技发展有限公司进行序列测定。将所得到的序列通过 Internet 网进入美国国家生物技术信息中心(www.ncbi.nlm.nih.gov)站点后,利用“BLAST”工具对序列进行同源性比较,再运用 MEGA5.0 软件构建系统进化树。

## 2 结果

2.1 病例资料 患者男性、43 岁、农民,家住云南滇西血吸虫病流行区。因到田间劳作于 2010 年 11 月 2 日发病,11 月 7 日以发热待诊入住当地医院。患者发病前有田间劳作史和血吸虫病史(已患有血吸虫病数年,至今未全愈,详情不清。)就诊时已发热 7d。主要表现为高热,体温 39.8℃,呈弛张热或不规则热,伴有畏寒、寒战、双下肢乏力、头昏、头痛、全身酸痛。右腋窝处有特异性焦痂(见图 1)。血常规显示:白细胞计数正常,大细胞百分比轻度升高,小细胞百分比轻度降低,红细胞减少,红细胞压积减少,平均红细胞血红蛋白升高,平均红细胞血红蛋白浓度升高,血小板明显减少( $31 \times 10^9/L$ ),平均血小板体积升高(16.0fl),血小板分布宽度升高(19.4fl),血小板压积减少(0.05);尿常规显示:尿液中有少量蛋白、白细胞;血生化显示:TP 减少(50.2g/L),ALB 减少(29.8g/L),AST 升高(83U/L),ALT 升高(83U/L),GGT 升高(139U/L),LDH 升高(339U/L);心电图显示:电轴显著左偏;彩色多普勒超声显示:肝实质回声增粗、增强、不均匀,呈“网格状”改变,脾厚 50mm,长径 135mm,提示血吸虫肝改变并脾肿大,胸部平片正常。

2.2 实验室检查 外斐氏反应结果:OXk 滴度 1:40。IFA 结果:Ot IgG 抗体效价 Kato 型 1:160、Karp 型 1:40。nPCR 检测 Ot 56kD 蛋白基因片断阳性。



图 1 特异性焦痂(患者右腋窝处)

Figure 1 Specific scab(right armpit of the patient)

2.3 序列比对与分析 通过“BLAST”工具(www.ncbi.nlm.nih.gov)将本次获得的样本 DX1 序列(157bp)与 GenBank 中已知序列进行同源性比较,结果 DX1 序列与泰国 PG9(HM777470)、P25(GU377190)、CM438(HM777455)、MH440(HM777462)及台湾 Taitung-1(AF516948)、Taitung-6(583448)、QI08(GU446618)株同源性达 98%,与中国 Ptan(DQ288237)、Shandong-XDM2(DQ514320)株同源性分别为 97%、93%,与 Karp 株(M33004)同源性为 95%,与 Gilliam(DQ485289)、Kawasaki(M63383)、TA678(U19904)、Kato(M63382)株同源性为 92%~88%。

2.4 构建系统进化树 以该样本 DX1 核酸序列与 GenBank 中已知的 Ot 56kD 蛋白基因部分序列运用 MEGA5.0 软件构建系统进化树(Neighbor-joining 法)。进化树显示 DX1 序列与泰国 PG9(HM777470)、P25(GU377190)、CM438(HM777455)、MH440(HM777462)在同一个分支上,亲缘关系较近;与中国 Ptan(DQ288237)、Shandong-XDM2(DQ514320)株及 Karp(M33004)株亲缘关系较远,与 Gilliam(DQ485289)、Kawasaki(M63383)、TA678(U19904)、Kato(M63382)株亲缘关系更远(见图 2)。

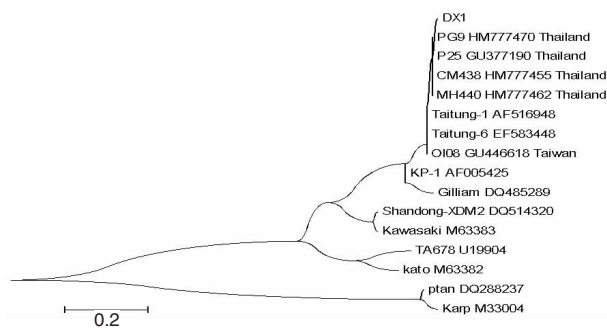


图 2 进化树分析

Figure 2 Phylogenetic tree analysis

## 3 讨论

恙虫病是由恙虫病东方体引起的急性自然疫源性传染病,以鼠类为主要传染源,经恙螨叮咬而传播,临床上以发热、焦痂或溃疡、淋巴结肿大、肝脾肿大及

皮疹为特征,全身毒血症状可致多脏器受累,甚至死亡<sup>[4]</sup>。恙虫病在我国分布广泛,近年来全国病例呈上升趋势<sup>[5]</sup>,我省病例增加尤为迅猛。我省许多地区共同存在恙虫病和血吸虫病疫源地,特别是在血吸虫病流行地区当前恙虫病对当地人们的危害更加严重。本次采用两种血清学方法检测病人血清标本,外斐氏反应为非特异性反应,在诊断中仅有参考意义,而 IFA 为国际上推荐的标准诊断方法<sup>[6]</sup>,特异性和敏感性均较高,为该病例的确定提供了重要依据。该患者来源于我省血吸虫病流行的滇西地区,有血吸虫肝改变并脾肿大,肝功能受损严重,具有典型的恙虫病特异性焦痂,IFA 检测血清 Ot IgG 抗体阳性以及 nPCR 检测 Ot 核酸阳性,可确诊为恙虫病合并慢性血吸虫病。

恙虫病东方体主要存在 Gilliam、Karp、Kato、TA678、TA686、TA716、TA763 和 H1817 共 8 个抗原型<sup>[7]</sup>,各型间有交叉保护力,再次感染者较为罕见。我国以 Gilliam 型为主,其次为 Karp 型,Kato 型较少见,而云南以 Karp 和 Gilliam 型为主<sup>[8]</sup>。本次研究通过 IFA 检测发现 Ot Kato 型与 Karp 型 IgG 抗体同时阳性,提示该患者有可能混合感染了恙虫病 Kato 型与 Karp 型。Ot 56kD 表面蛋白具有型或株特异性,其编码基因 56kD 表面蛋白基因是目前主要作为其基因分型的重要依据。本次利用分子生物学手段对 Ot 56kD 表面蛋白基因片断进行检测以及核酸序列分析,显示该恙虫病与泰国株恙虫病的亲缘关系较近,与 Karp、Gilliam、Kawasaki、TA678、Kato 株亲缘关系较远,提示本次流行的恙虫病可能与泰国流行的恙虫病密切相关。

血吸虫病的临床表现复杂且多样化,是危害我国农民身体健康最严重的寄生虫病之一,一年四季均能发病,但云南以 7~11 月发病较多<sup>[2]</sup>,与恙虫病的主要流行时间基本一致。血吸虫的中间宿主钉螺和恙虫病媒介恙螨具有相似的生存繁衍的主要场所,均适宜孳生于杂草丛生和土壤潮湿的环境。恙病患者大多数临床表现不典型,目前许多病例报告均为回顾性诊断病例,漏诊、误诊严重<sup>[9]</sup>。恙虫病与血吸虫病两者在临床上的表现均以发热、肝脾肿大、肝损伤较常见,来自血吸虫病重灾区的患者,其血吸虫病的临床表现可掩

盖恙虫病的临床表现,从而更加增加了诊断恙虫病的难度。两病合并感染同一患者,加大了临床医生对恙虫病的诊断难度,同时也可能增加对患者机体的损害程度,应引起医务工作者的重视。因此,为了减少漏诊和误诊,今后应加大宣传教育力度,提高医务工作者的认知水平以及对临床病例的诊断能力。

#### 参考文献:

- [1] Tamura A, Ohashi N, Urakami H et al. Classification of Rickettsia tsutsugamushi in a new genus Orientia gen. nov. as Orientia tsutsugamushi comb[J]. Nov. Int J Syst Bacteriol, 1995, 45(3): 589-591.
- [2] Xuan Q, Liu AH, Bao FK. Current progress in research of tsutsugamushi disease in Yunnan Province in China [J]. Chin Trop Med, 2010, 10(10): 1278-1280. (In Chinese)  
(宣群, 柳爱华, 宝福凯. 云南恙虫病研究概况[J]. 中国热带医学, 2010, 10(10): 1278-1280.)
- [3] Zhang S, Song H, Liu Y et al. Scrub typhus in previously unrecognized areas of endemicity in China [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4): 1241-1244.
- [4] Koh GC, Maude RJ, Paris DH et al. Diagnosis of scrub typhus [J]. Am J Trop Med Hyg, 2010, 82(3): 368-370.
- [5] Chinese center for disease control and prevention. Tsutsugamushi disease prevention and control technical manual (Shixing). Paper of China CDC, 2009, 1 (In Chinese)  
(中国疾病预防控制中心. 恙虫病预防控制技术指南(试行). 中疾控疾发, 2009, 1.)
- [6] Blacksell SD, Bryant NJ, Paris DH et al. Scrub Typhus Serologic Testing with the Indirect Immunofluorescence Method as a Diagnostic Gold Standard: A Lack of Consensus Leads to a Lot of Confusion[J]. Clin Infect Dis, 2007, 44(3): 391-401.
- [7] Kelly DJ, Fuerst PA, Ching WM et al. Scrub typhus: the geographic distribution of phenotypic and genotypic variants of Orientia tsutsugamushi[J]. Clin Infect Dis, 2009, 48(Suppl3): S203-S230.
- [8] Lei YM, Feng XG, Chen YM et al. Study on serological typing of Rickettsial tsutsugamushi in Yunnan province [J]. Chin J Zoonoses, 1994, 10(2): 62-63. (In Chinese)  
(雷亚民, 冯锡光, 陈渊民, 等. 云南省恙虫病立克次体血清学分型研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 1994, 10(2): 62-63.)
- [9] Jiang RM, Li XW. Improving clinicians' understanding of rickettsioses [J]. Infect Dis Info, 2010, 23(1): 11-13. (In Chinese)  
(蒋荣猛, 李兴旺. 临床医师应提高对立克次体病的认识[J]. 传染病信息, 2010, 23(1): 11-13.)

收稿日期: 2011-11-12 编辑: 崔宜庆