

## 阜阳市 2015 年恙虫病实验诊断及 IgG 持续时间探索

刘晓宁 陈 振 刘伯玉 任翠平 柳 燕

**摘要** 建立恙虫病的实验诊断方法,探索 IgG 抗体维持时间对恙虫病暴发流行的意义。运用巢式 PCR (nested-PCR) 和间接免疫荧光 (IFA) 方法检测核酸和抗体阳性率及抗体变化情况。结果显示急性期血标本 nested-PCR 扩增恙虫病 56-ku 基因核酸阳性率 63.4% (149/235), IFA 检测恙虫病 IgM 抗体阳性率 86.38% (203/235); 双份血清恙虫病 IgG 抗体效价有 4 倍及以上下降的占 74.46% (35/47)。混合抗原 IgM 抗体检测敏感性高于 nested-PCR; IgG 抗体效价  $\geq 1:1280$  时, nested-PCR 检测阳性率下降; IgG 抗体出现早, 效价下降快, 维持时间短。

**关键词** 不明原因发热; 恙虫病; 实验室诊断; 临床特征

中图分类号 R 376.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)11-1828-04  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.11.034

恙虫病亦称丛林斑疹伤寒,是恙螨叮咬人体感染恙虫病东方体 (*Orientia tsutsugamushi*, *O. ts*) 而引起的人畜共患传染病<sup>[1]</sup>。全球 50% 以上人口生活在恙虫病疫区,每年约有 100 万人感染恙虫病<sup>[2]</sup>。在我国,1985 年以前恙虫病主要在长江以南(北纬 31°) 地区流行<sup>[3]</sup>; 1986 年后在长江以北出现恙虫病,证实了恙虫病疫源地北移<sup>[4-5]</sup>。2008 年秋阜阳市暴发的不明原因发热疫情,证实为恙虫病疫情<sup>[6-7]</sup>; Cao et al<sup>[8]</sup> 于 2016 年报道了安徽省滁州市散发恙虫病病例。恙虫病极易与其他发热性疾病相混淆,出现误诊误治情况<sup>[9]</sup>。因此,收集阜阳市 2015 年 9~11 月的不明原因发热病例标本进行病原学 and 血清学检测及实验方法相互验证,对病历资料归纳分析,以期对安徽省乃至全国恙虫病的实验室和临床诊断及精准用药和有效防治提供科学依据。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 病例资料、血清标本采集

收集 2015 年 9~

11 月阜阳市不明原因发热疫情临床病例资料,采集发病后 6~17 d 急性期血液标本 235 份,发病后 4 个月采集恢复期血液标本 47 份。

**1.2 主要试剂和仪器** DNA 提取试剂盒(德国 QIAGEN 公司); pMDTM18-T 载体克隆试剂盒(日本 TaKaRa 公司); 羊抗人 IgM、羊抗人 IgG(北京中衫金桥生物技术有限公司); Gilliam、Karp 和 Kato 混合标准株抗原片(美国 University of Texas Medical Branch 惠赠); PCR 仪(德国 Jena 公司); 荧光显微镜(日本 OLYMPUS TMT3-21 型)。

**1.3 间接免疫荧光(indirect immunofluorescence, IFA)** 恙虫病 IgM 抗体定性检测,血清 1:80 稀释; 恙虫病 IgG 抗体定量检测,血清按 1:80、1:160、1:320、1:1280、1:5120、1:10240、1:20480 进行梯度稀释。血清为一抗与抗原片进行反应,37℃、45 min,用 PBS 洗涤 4 次,每次 5 min,晾干。二抗为 FITC 标记羊抗人 IgM 和 IgG,重复上述步骤,晾干后滴加 90% 甘油覆盖抗原片,荧光显微镜下观察。

**1.4 巢式 PCR(nested polymerase chain reaction, nested-PCR) 和产物克隆测序** 急性期血标本核酸经 nested-PCR 扩增 *O. ts* 56-ku 蛋白特异性基因片段。外引物为 56 ku-out-f: 5'-TACATTAGCT-GCGGGTATGACA-3' 和 56 ku-out-r: 5'-CCAGCATA-ATTCTTCAACCAAG-3'; 内引物为 56 ku-in-f: 5'-GAGCAGAGCTAGGTGTTATGTA-3' 和 56 ku-in-r: 5'-TAGGCATTATAGTAGGCTGAGG-3'<sup>[6]</sup>。反应条件为 95℃、5 min,1 个循环; 94℃、45 s,55℃、45 s,72℃、1 min,35 个循环; 72℃、10 min,1 个循环。1.2% 琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物。将 PCR 产物连接到 T 载体中以构建 DNA 重组质粒。氨苄抗性 LB 平板培养基培养,蓝白筛选重组质粒,细菌摇瓶培养后送 GENERAL BIOSYSTEMS 公司测序。

**1.5 统计学处理** 采用描述性流行病学方法进行分析。Epidata 3.1 建立数据库,运用 Excel 2010 和 SPSS 20.0 软件进行统计和分析。率的比较采用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2019-06-12 接收

基金项目 “十三五”国家科技重大专项(编号:2018ZX10711001); 国家自然科学基金(编号:81571963、81772203)

作者单位:安徽医科大学基础医学院微生物教研室,合肥 230032

作者简介:刘晓宁,女,硕士研究生;

柳 燕,女,博士,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: yliu16888@163.com

## 2 结果

### 2.1 实验室检查

**2.1.1 nested-PCR 和 IFA 检测结果比较** nested-PCR 检测和测序分析 235 例急性期血液标本核酸阳性率为 63.40% ( 149/235) ,IFA 检测 235 例急性期血清 IgM 抗体阳性率为 86.38% ( 203/235) ;nested-PCR 检测核酸和 IgM 抗体检测阳性率之间进行配对  $\chi^2$  检验 结果显示两种方法之间差异有统计学意义(  $\chi^2 = 6.17, P < 0.05$  ) ,IgM 抗体检测阳性率高于核酸检测( 表 1) 。当急性期血清 IgG 抗体效价  $\geq 1 : 1 280$  时 ,抗体检测和核酸检测结果呈负相关 ,  $OR = 0.22$  。nested-PCR 检测核酸和 IFA 检测 IgG 抗体阳性率差异有统计学意义(  $\chi^2 = 4.73, P < 0.05$  ) ,即当急性期血清 IgG 抗体效价  $< 1 : 1 280$  时 ,可同时检测到病原和抗体;当急性期血清 IgG 抗体效价  $\geq 1 : 1 280$  时 ,nested-PCR 检测核酸的阳性率下降 ,双份血清抗体检测敏感性高于核酸检测( 表 2) 。

表 1 235 例急性期血液标本 nested-PCR 和 IgM 检测阳性率比较 [n( % ) ]

IgM	PCR		合计
	+	-	
+	135( 57.45)	68( 28.94)	203( 86.38)
-	14( 5.96)	18( 7.66)	32( 13.61)
合计	149( 63.40)	86( 36.60)	235( 100.00)

表 2 47 例急性期血清的 nested-PCR 和 IgG 结果比较( 例)

组别	PCR		合计
	阳性	阴性	
IgG 效价 $\geq 1 : 1 280$	15	13	28
IgG 效价 $< 1 : 1 280$	16	3	19
合计	31	16	47

**2.1.2 双份血清 IgG 抗体检测** 免疫荧光检测 47 例急性期和恢复期血清恙虫病 IgG 抗体 ,IgG 抗体在发病后的第 6 天即被检测到 ,效价达到 1 : 80; 随着时间的推移 ,抗体效价逐渐增加 ,其变化趋势如( 图 1) 。76.60% ( 36 例) 的急性期 IgG 抗体的效价集中在 1 : 320 ~ 1 : 5 120。恢复期血清抗体效价降低的 35 ( 74.46% ) 例 ,其中效价有 4 倍降低的 17 例 ,16 倍降低的 10 例 ,64 倍降低的 2 例; 抗体效价有 4 倍及以上升高的 6 例 ,效价无变化的有 6 例 ,各占 12.77% ( 表 3) 。78.57% ( 33 例) 恢复期效价集中在 1 : 80 ~ 1 : 320。

**2.2 一般结果** 人群对恙虫病易感 ,40 ~ 49 岁人群的发病率最高; 女性有 208 例 ,占 88.51%; 男性有 27 例 ,占 11.49%; 农民占有所有患者人数的 96.60% ( 227/235) 。发病时间集中在 10 月 11 日 ~ 11 月 10 日 ,呈现出暴发流行态势。恙虫病最长潜伏期为 11 d ,最短为 4 d ,平均潜伏期为 ( 6.85  $\pm$  2.38) d。

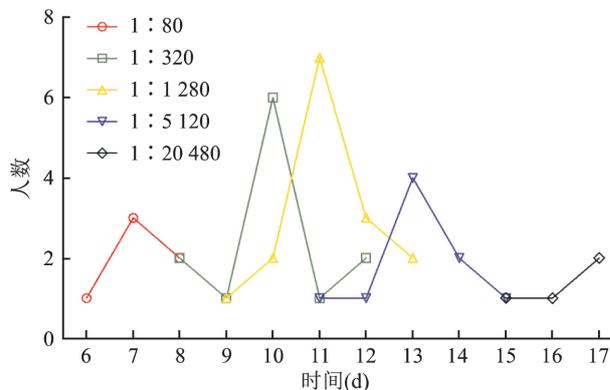


图 1 IgG 抗体出现时间和效价变化趋势

表 3 IFA 检测恙病患者双份血清 IgG 抗体效价结果( 例)

效价	急性期 IgG	恢复期 IgG			恢复期 IgG	
		4 倍升高	效价无变化	4 倍下降		
1 : 80	6	3	1	0	1	13
1 : 320	13	2	2	7	1	20
1 : 1 280	15	0	2	12	1	6
1 : 5 120	9	0	1	8	0	3
1 : 20 480	4	0	0	3	1	0
总计	47	6	6	30	5	42

### 2.3 临床体征

**2.3.1 发热** 所有病例均有发热 ,平均持续 ( 7.00  $\pm$  4.89) d ,平均体温 ( 38.99  $\pm$  0.52)  $^{\circ}C$  。包括稽留热 3 例 ,弛张热 8 例 ,不规则热 224 例。

**2.3.2 焦痂或溃疡** 235 例病例中有 156 例 ( 66.38% ) 有焦痂和溃疡。分布在: 腹股沟( 21 例) 、腋窝( 24 例) 、胸部或乳房( 29 例) 、腰带压迫部位( 31 例) 、腘窝( 7 例) 、上肢( 8 例) 、脚踝( 13 例) 、腿部( 6 例) 、背部( 8 例) 、肛周( 4 例) 、会阴部( 5 例) 。

**2.3.3 其他症状和体征** 除了发热、焦痂或溃疡外 ,头痛 195 ( 82.98% ) 例 ,畏寒 140 ( 59.57% ) 例 ,淋巴结肿大 85 ( 36.17% ) 例 ,皮疹 155 ( 65.96% ) 例。

**2.4 临床检查** 血常规检查中各项指标多在正常范围内。生化检查中 ,107 例 ( 70.39% ) C 反应蛋白升高 202 例 ( 85.96% ) 丙氨酸氨基转移酶升高 ,191 例 ( 81.62% ) 天冬氨酸氨基转移酶升高; 总蛋白、白

蛋白、球蛋白、总胆红素和碱性磷酸酶多数在正常范围内。136例(63.85%)谷氨酰转氨酶升高;134例(74.03%)乳酸脱氢酶升高;177例(86.76%) $\alpha$ -羟丁酸脱氢酶升高;74例(87.06%)肌酸激酶升高;肌酸激酶同工酶多数在正常范围内。

2.5 治疗和预后 临床多给予阿奇霉素(500 mg/d)进行抗感染经验治疗,5 d左右恢复正常,患者预后较好,治愈率达到100%。

### 3 讨论

恙虫病是存在于自然界中的人畜共患传染性疾病,中国是其主要流行地区<sup>[10]</sup>。阜阳市自2008年秋季发生了一起恙虫病疫情后<sup>[11]</sup>,每年10~12月呈现季节性发病。对235例2015年9~11月阜阳市不明原因发热患者血液标本进行分子生物学、生物信息学、血清学实验的相互验证分析,并统计归纳出阜阳恙虫病的临床特征,以便指导长江以北地区恙虫病的实验室诊断、治疗和预防工作。

nested-PCR检测证明,阜阳市2015年秋季的不明原因发热疫情是以恙虫病为主的急性传染病,核酸阳性率为63.4%,IgM抗体阳性率为86.38%,证明了免疫荧光实验中使用Gilliam、Karp和Kato混合抗原能够提高恙虫病感染的早期检出率。核酸检测感染早期阳性率低于IgM抗体阳性率,可能是由于样本抗体滴度较高,导致病原体含量减少,且释放到胞外的病原体少不能被检测到。急性期IgG抗体效价 $\geq 1:1280$ 时,nested-PCR检测的阳性率随恙虫病抗体效价升高而下降。由此判断,当急性期患者血液恙虫病核酸检测为阴性时,如恙虫病血清IgG抗体效价 $\geq 1:1280$ 时,对恙虫病的诊断具有辅助意义。

47份配对双份血清中,恙虫病IgG抗体在患者发病后6d即可检测到,抗体效价达1:80,在发病后15~17d达到1:20480。恙虫病IgG抗体产生较早,且抗体水平增长较迅速。恢复期血样采集于治疗后4个月,有35份(74.46%)血清抗体效价有4倍以上下降甚至消失,说明感染恙虫病东方体后机体产生的IgG抗体维持时间不长,4个月左右有明显下降,甚至消失。据此,可认为恙虫病东方体的IgG抗体对机体的保护力及保护时间有待进一步研究。当然,如果是恢复期连续样本采集和研究,会给出更好的IgG抗体升、降时间曲线。

恙虫病发病存在职业和性别差异,农民是恙虫病的高危人群,且以40~69岁女性为主,这可能与

阜阳市是农民工输出大市有关,青壮年劳动力多外出务工,乡下的劳动力以中老年女性为主。暴发流行时间集中在10月11日~11月10日,与江苏、山东等地报道<sup>[4]</sup>的恙虫病发生时间吻合,为“秋冬季型恙虫病”。

综上,2015年阜阳市的不明原因发热为“秋冬季型恙虫病”疫情。混合抗原IgM抗体检出恙虫病阳性率高,IgG抗体检测可辅助nested-PCR检测提高检出率。人体感染恙虫病后,机体产生IgG抗体时间早,效价升高迅速。在发病治疗后4个月后IgG抗体有较大程度降低甚至消失,说明恙虫病IgG抗体维持时间短,推测可能为恙虫病每年暴发流行的因素之一。

### 参考文献

- [1] Duong V, Mai T T, Blasdel K, et al. Molecular epidemiology of orientia tsutsugamushi in cambodia and central vietnam reveals a broad region-wide genetic diversity [J]. *Infect Genet Evol* 2013, 15: 35-42.
- [2] Kelly D J, Fuerst P A, Ching W M, et al. Scrub typhus: the geographic distribution of phenotypic and genotypic variants of *Orientia tsutsugamushi* [J]. *Clin Infect Dis*, 2009, 48 Suppl 3: S203-30.
- [3] Wei Y, Luo L, Jing Q, et al. A city park as a potential epidemic site of scrub typhus: a case-control study of an outbreak in Guangzhou, China [J]. *Parasit Vectors* 2014, 7: 513.
- [4] Liu Y X, Feng D, Suo J J, et al. Clinical characteristics of the autumn-winter type scrub typhus cases in south of Shandong province, northern China [J]. *BMC Infect Dis* 2009, 9: 82.
- [5] Hu J, Tan Z, Ren D, et al. Clinical characteristics and risk factors of an outbreak with scrub typhus in previously unrecognized areas, Jiangsu province, China 2013 [J]. *PLoS One* 2015, 10(5): e0125999.
- [6] 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): 1241-4.
- [7] 孙良, 宋秀萍, 万俊峰, 等. 安徽省阜阳市2008-2010年恙虫病疫情流行病学分析 [J]. *中华疾病控制杂志*, 2012, 16(2): 152-4.
- [8] Cao M, Che L, Zhang J, et al. Determination of scrub typhus suggests a new epidemic focus in the Anhui province of China [J]. *Sci Rep* 2016, 6: 20737.
- [9] Walker D H. Scrub typhus - scientific neglect, ever-widening impact [J]. *N Engl J Med* 2016, 375(10): 913-5.
- [10] Zhang W Y, Wang L Y, Ding F, et al. Scrub typhus in mainland China, 2006-2012: the need for targeted public health interventions [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013, 7(12): e2493.
- [11] 方益荣, 吴家兵. 2008年安徽省阜阳市恙虫病疫情分析 [J]. *中国农村卫生事业管理*, 2010, 30(12): 1051-3.

网络出版时间: 2019-9-19 10:05 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190917.1059.035.html>

## 富血小板凝胶在兔糖尿病溃疡模型中的研究

方颖, 曹东升, 谢娟, 吕阳

**摘要** 制作糖尿病兔溃疡模型观察富血小板凝胶的疗效。将 24 只糖尿病兔建立溃疡创面模型, 在每只兔子脊柱两侧各做 1 个创面, 分别用富血小板凝胶(实验组)和常规换药(对照组)治疗, 比较各组创面愈合的情况。比较 1 周末和 2 周末免疫组织化学标记血管内皮生长因子及胰岛素样生长因子。富血小板凝胶(APG)治疗组平均光密度值高于对照组( $P < 0.05$ )。与常规换药相比, APG 能明显加速糖尿病溃疡创面的愈合。

**关键词** 自体富血小板凝胶; 糖尿病溃疡; 糖尿病兔模型

**中图分类号** R 622

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2019)11-1831-04

**doi:** 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.11.035

伤口愈合是一个复杂的过程, 它涉及多个细胞群、细胞外基质和可溶性介质, 如生长因子和细胞因子<sup>[1]</sup>。如果正常的愈合过程被中断, 糖尿病溃疡会由于缺乏生长因子和细胞因子而在本质上成为慢性

溃疡。糖尿病溃疡传统治疗方法伤口愈合缓慢, 治疗时间长, 治疗成本高, 给患者带来痛苦。自体富血小板凝胶(autologous platelet-rich gel, APG)是一种生物活性化合物, 自 1985 年问世以来, 由于其具有激活和诱导细胞增殖和血管生成, 加速伤口愈合的优点, 被广泛运用于治疗创面<sup>[2]</sup>。该研究通过制作兔糖尿病皮肤溃疡动物模型, 将富血小板凝胶应用于糖尿病兔溃疡创面, 观察其疗效, 分析该方法的临床效果和可行性, 为临床治疗难治性糖尿病性溃疡创面的新思路。

### 1 材料与方法

**1.1 试验对象** 24 只新西兰雄性白兔, 约 3 月龄, 2.5~3 kg, 在环境温度为(22±2)℃, 湿度为(55±5)%的条件下, 在安徽医科大学动物实验中心饲养。保持室内通风良好, 实验前预饲养 1 周使其适应环境。在整个实验期间, 兔子随意喂食和水。

### 1.2 糖尿病兔模型及皮肤创面的建立

**1.2.1 糖尿病兔建模** 将 5 g 四氧嘧啶(北京索莱宝科技有限公司)溶解在 100 ml 氯化钠中, 制备 5% 四氧嘧啶溶液。在每只兔子通过体重秤称重后, 立即通过无菌注射器取出试剂以 120 mg/kg 将其注射

2019-07-10 接收

基金项目: 安徽省卫生计生委科研项目(全科医学临床科研课题)(编号: 2016QK062)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院整形外科, 合肥 230601

作者简介: 方颖, 女, 硕士研究生;

曹东升, 男, 主任医师, 责任作者, E-mail: dscao1966@126.com

## Experimental diagnosis and IgG maintenance time of scrub typhus in Fuyang city in 2015

Liu Xiaoning, Chen Zhen, Liu Boyu, et al

(Dept of Microbiology, School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract** Establishing the laboratory diagnosis method and explore the significance of IgG antibody maintenance time for scrub typhus outbreak. Nested-PCR and IFA methods were used to detect the positive rates of nucleic acids and antibodies and the changes of antibodies. The positive rate of 56-ku gene of acute stage blood samples tested by nest-PCR was 63.4% (149/235). IgM antibody positive rate of *Orientia tsutsugamushi* tested by IFA was 86.38% (203/235). And 87.23% (41/47) titer of IgG antibody in paired sera increased or decreased in four or more times. The detection sensitivity of IgM antibody was higher than nested-PCR and the positive rate of nested-PCR test decreased when the titer of IgG antibody was greater than or equal to 1:1280. IgG antibody appeared earlier, titer decreased quickly and maintaining time is short.

**Key words** undifferentiated febrile illness; scrub typhus; laboratory diagnosis; clinical characteristics