

嗜肺军团菌环介导等温扩增快速检测方法的建立与应用

朱水荣 王志刚 张政 卢亦愚 梅玲玲 占利

【摘要】 目的 建立一种适合基层检验部门及小型实验室使用的快速检测嗜肺军团菌的方法。方法 应用环介导等温扩增技术(LAMP), 针对嗜肺军团菌 *mip* 基因设计 5 条引物(2 条内引物、2 条外引物及 1 条环引物), 并对 LAMP 反应条件和反应体系进行优化。为验证该方法的特异性、敏感性, 针对种系背景明确的 12 株嗜肺军团菌实验对照菌株、45 株嗜肺军团菌地方分离株、6 株非嗜肺军团菌、11 株其他细菌以及 59 份外环境水样本进行检测, 并将其结果与传统培养分离方法及定量 PCR 方法比较。结果 所检测的菌株样本中不同血清型嗜肺军团菌经 LAMP 检测均呈绿色为阳性, 非嗜肺军团菌及其他菌株检测均呈橙色为阴性。实验结果表明, LAMP 方法的检出率高于传统培养分离方法及定量 PCR。应用该方法从菌株核酸的提取至检测完成仅需 1.5 h 左右, 该体系检测灵敏度为 5 cfu/ml, 而且其检测结果在日(灯)光下通过肉眼即可判断。结论 实验建立的 LAMP 方法能够快速、灵敏、特异地检测嗜肺军团菌, 适合基层检验部门及小型实验室与现场监测等使用。

【关键词】 嗜肺军团菌; 环介导等温扩增技术; 建立与应用

Establishment and application of loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of *Legionella pneumophila* ZHU Shui-rong, WANG Zhi-gang, ZHANG Zheng, LU Yi-yu, MEI Ling-ling, ZHAN Li. The Institute of Microbiology, Zhejiang Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China

【Abstract】 **Objective** To develop a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid diagnosing of *Legionella pneumophila* in the Pathogen Detection Department (PDD) or in small-scale laboratory. **Methods** Five primers (2 Inner Primers, 2 Outer Primers and a Loop Primer) for the LAMP test were designed by targeting the *mip* gene of *L.pneumophila* and reaction system of LAMP reaction was optimized. 12 strains of *L.pneumophila*, 45 local strains, 6 non-*L.pneumophila* strains, 11 other strains and 59 environmental water samples were analyzed to evaluate the specificity and sensibility of the LAMP amplification. At the same time, the results of the LAMP were also compared with biochemical culture and quantitative PCR methods. **Results** The amplification products of *L.pneumophila* turned green by visual inspection and had ladder-like pattern on the gel, but non-*L.pneumophila* and other products from the strains remained orange by visual examination and had no band on the gel. The detection rate of LAMP was higher than the biochemical culture and the real-time PCR methods. Reaction time of the LAMP method was only 1.5 h and the detection limit of LAMP assay was 5 cfu/reaction. In addition, the LAMP results could be determined only by visual inspection. **Conclusion** LAMP assay targeting the *mip* gene of *L.pneumophila* appeared to be rapid, specific, and sensitive for the detection of *L.pneumophila*. This method not only reduced the dependence of complicated equipment but also had a potential for wider use in the PDD, small-scale laboratory, emergency motor vehicle or for field survey.

【Key words】 *Legionella pneumophila*; Loop-mediated isothermal amplification; Establishment and application

军团菌病是由军团菌感染而引起的一种急性呼吸道疾病^[1]。现已发现 90% 以上的军团菌肺炎都是由嗜肺军团菌引起的。目前对军团菌的检测主要依赖于传统培养方法、生化和血清学鉴定方法, 这些检

验方法较为繁琐, 费时费力, 报告检验结果至少需要 14 天以上, 难以适应快速检验的要求。Notomi 等^[2]开发出的一种新的 DNA 环介导恒温扩增法(loop-mediated isothermal amplification, LAMP), 因其具有操作简便易行、结果判读可靠等特点, 可在基层实验室使用并被广泛应用于各种病原微生物的快速检测。本研究针对嗜肺军团菌 *mip* 基因设计一套

LAMP 引物,对嗜肺军团菌进行检测,优化反应条件,验证方法的特异性和灵敏度,并实际应用于外环境水样本的直接检测。

材料与方 法

1. 材料: ①菌株: 12 株种系背景明确的实验对照株嗜肺军团菌(LP1、LP3~LP13)及 6 株非嗜肺其他军团菌(*L. bozemaniae*、*L. longbeach*、*L. dumoffii*、*L. gormanii*、*L. micdadei*、*L. jordanis*)DNA 模板均由中国疾病预防控制中心(CDC)提供; 45 株嗜肺军团菌地方株由本实验室分离,其他 11 株非军团菌实验对照株为浙江省 CDC 菌种室保存。②外环境水样: 分别由衢州、舟山、东阳市 CDC 上送。③培养基: 军团菌基础培养基(BCYE)及选择培养基(GVPC)购自广州乐通泰试剂有限公司。④主要试剂与仪器: DNA 提取试剂盒及 dNTP、DEPC 处理水购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司; Bst 酶购自纽英伦生物技术有限公司; 甜菜碱、MgSO₄、MnCl₂、钙黄绿素购自 Sigma 公司。Mx3000p 荧光定量 PCR 仪购自美国 Stratagene 公司; CO₂ 培养箱购自美国 Thermo 公司; MiniRunGe-100 型凝胶电泳仪及成像仪购自 Bio-Rad 公司; 恒温水浴箱购自嘉兴市中新医疗仪器有限公司; WH-2 微型涡漩混合仪购自上海沪西分析仪器厂; DB-20 金属裂解仪购自英国 Techne 公司; 浊度仪 Densimat bioMerieux 购自法国梅里埃公司; 军团菌胶乳凝集试剂盒购自广州乐通泰试剂有限公司。⑤引物(F3、B3、FIP、BIP、LB): 针对嗜肺军团菌 *mip* 基因保守序列, 设计 LAMP 引物 5 条, 由 TaKaRa 生物公司合成(表 1)。

表 1 *mip* 基因 LAMP 扩增引物序列

| 引物 | 引物序列(5' ~ 3') | 产物长度(bp) |
|-----|--|----------|
| F3 | GCA ATG TCA ACA GCA ATG G | 19 |
| B3 | AAC TTG TTA AGA ACG TCT TTC A | 22 |
| FIP | TCC CCA AAT CGG CAC CAA TGC GAT GC CAC ATC ATT AGC T | 39 |
| BIP | ATC AAG GCA TAG ATG TTA ATC CGG GGT TAA AGC CAA TTG AGC G | 43 |
| LB | AAG CAA TGG CTA AAG GCA TGC AA | 23 |

2. 方法:

(1) 菌株培养: 军团菌地方株划种于 GVPC/BCYE 选择/基础培养基平板上培养 3 天后, 挑取单个菌落制备模板; 11 株非军团菌其他菌株均划种于普通营养琼脂平板上培养, 挑取单个菌落制备模板。

(2) 模板制备: 采用热裂解法和 DNA 提取试剂盒方法制备 DNA 模板。热裂解法: 挑取单个菌落

于装有 100 μl DEPC 处理水的 eppendorf 管中, 放于金属裂解仪中 100℃ 10 min 后, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 4℃ 保存备用; DNA 提取试剂盒方法按操作说明书进行。外环境水样: 取浓缩水样各 1 ml, 1500 r/min 离心 15 min, 取上清, 再 12 000 r/min 离心 5 min 取沉淀后, 加 100 μl DEPC 处理水, 12 000 r/min 离心 5 min, 去上清再加入 100 μl 的裂解液于 100℃ 水浴 15 min, 取上清 4℃ 保存备用。

(3) 嗜肺军团菌的稀释与计数: 取菌量为 5 × 10⁷ cfu/ml 的 LP1 型嗜肺军团菌, 用灭菌双蒸水进行 10 倍稀释, 从 10⁻¹ ~ 10⁻¹⁰ 稀释液中吸取 100 μl 到 BCYE 基础培养基上, 用 L 棒及时涂布均匀, 每个稀释度做 5 个平皿, 于含 5% CO₂ 的培养箱, 37℃ 培养 3 ~ 5 d 后进行计数。同时再取每个稀释度的菌液, 制成 100 μl 的模板, 用做 LAMP 敏感性试验。

(4) LAMP 扩增反应: ① LAMP 扩增体系和反应条件: 总反应体系为 25 μl, 包括 Bst 酶、Tris-HCl、KCl、(NH₄)₂SO₄、MgSO₄、TritonX-100、钙黄绿素、MnCl₂、dNTP、引物(F3、B3、FIP、BIP、LB)、甜菜碱、模板等。② 反应条件: 58 ~ 65℃ 30 ~ 60 min, 80℃ 2 ~ 8 min。③ 引物、MnCl₂、钙黄绿素最佳浓度优化: 以相同 DNA 浓度(LP1)为 LAMP 反应模板, 引物浓度(20 μmol/L)不变, 将引物量从 0.15 ~ 0.45 μl 以 0.1 μl 递增; 钙黄绿素、MnCl₂ 浓度(10 μmol/L)不变, 钙黄绿素、MnCl₂ 量从 0.5 ~ 1 μl 以 0.1 μl 递增, 优选引物、钙黄绿素及 MnCl₂ 等的最佳浓度。

(5) LAMP 方法验证: ① 敏感性检验: 取上述 10 倍系列不同稀释度活菌菌液 100 μl(LP1)分别用水煮法或试剂盒提取法提取 DNA, 用以进行方法敏感性检测。② 特异性检验: 对种系背景明确的实验对照菌株 12 株嗜肺军团菌及 6 株非嗜肺军团菌、45 株嗜肺军团菌地方株以及 11 株非军团菌其他菌株的 DNA 提取液, 用 LAMP 反应系统进行检测, 验证 LAMP 方法的特异性。

(6) LAMP 阳性结果判定: 肉眼观察产物颜色变化, 出现明显绿色判定为阳性, 橙色为阴性, 橙绿色则通过 2% 琼脂糖进行凝胶电泳(或取相应 LAMP 产物 2 μl 再次 LAMP, 观察颜色变化)观察条带是否出现, 电泳条带明显者判定为阳性, 不明显者判定为阴性。每次试验均做阴阳性对照。

(7) 外环境水样本检测: 对分别来自舟山、衢州、东阳市 CDC 的 59 份冷却塔/冷凝水样本, 分别采用传统分离培养法(部分工作为相应下级 CDC 实验室人员所做)、荧光定量 PCR 法和 LAMP 法进行检

测,并对结果进行分析。

结 果

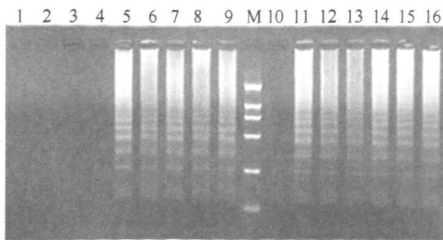
1. LAMP方法建立与条件优化:经改变内外引物的比例、反应温度、反应时间、dNTP、甜菜碱、钙黄绿素、MgSO₄、MnCl₂等浓度,目测颜色变化并电泳有否产物扩增,最后得到该方法最佳反应体系(25 μl):1.6 μmol/L FIP、1.6 μmol/L BIP、0.2 μmol/L F3、0.2 μmol/L B3、0.4 μmol/L LB、0.6 mmol/L dNTP、0.8 mol/L 甜菜碱、20 mmol/L Tris-HCl (pH 值 8.8)、10 mmol/L KCl、10 mmol/L (NH₄)₂SO₄、4 mmol/L MgSO₄、0.1% TritonX-100、25 μmol/L 钙黄绿素、0.5 mmol/L MnCl₂。

2. 内外引物比例:参照文献[3-7]方法,以4:1~10:1的比例对所要研究的嗜肺军团菌实验体系进行内外引物最佳比例试验,结果表明,本方法最佳内外引物的浓度比例为8:1。

3. 反应温度与时间:试验发现其中温度影响最大,当反应温度达到58℃时出现阶梯状条带,而反应温度为60℃时则达到最佳扩增效果。结果表明,该方法的最佳反应条件分别为60℃ 1 h, 80℃ 2 min。

4. 环状引物:通过多次重复实验加以验证该引物是否对本实验有影响,结果表明,在模板浓度较低时加入环状引物的PCR管其颜色更绿,也即环状引物加与不加对目测结果有影响(否则颜色不明显),但不影响电泳结果。

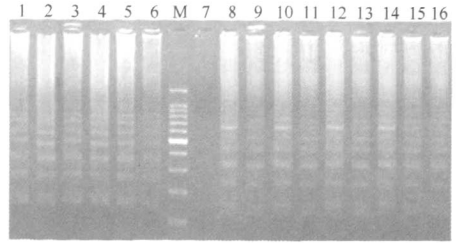
5. 特异性试验:特异性试验结果见图1~4(图中相同血清型菌株均为不同来源株),仅中国CDC提供的12株嗜肺军团菌及45株嗜肺军团菌地方株出现绿色或经电泳图片出现LAMP特有的阶梯状扩增条带,6株非嗜肺军团菌及11株非军团菌其他菌株均未出现绿色或相应电泳条带(表2)。



注: M: Marker; 1~4: *L.bozemaniae*, *L.dumoffii*, *L.longbeach*, *L.gormanii*; 5~9: LP1; 11~16: LP3~LP12; 10: 阴性对照

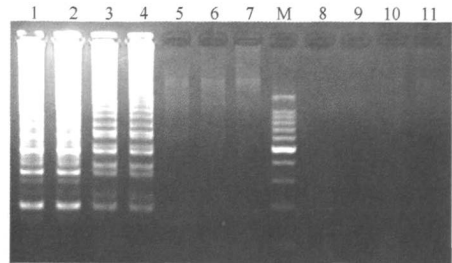
图1 部分菌株LAMP特异性检测电泳结果

6. 敏感性试验: 试验发现随着菌液浓度的降低,生成的颜色渐淡,其特异性条带亮度也逐渐变



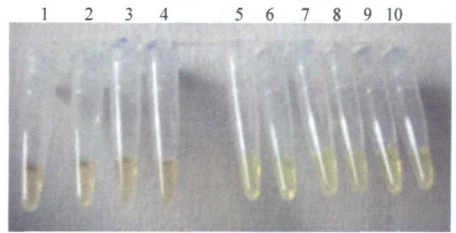
注: M: Marker; 1~4: LP1; 5: LP2; 6: LP3; 8~10: LP9; 11~13: LP4; 14~16: LP12; 7: 阴性对照

图2 部分嗜肺军团菌地方株LAMP检测电泳结果



注: M: Marker; 1, 2, 5~7: 冷却塔水样二次LAMP结果; 3, 4, 9~11: 冷却塔水样一次LAMP结果; 8: 阴性对照

图3 部分冷却塔水样LAMP检测电泳结果



注: 1: 阴性对照; 2~4: *L.bozemaniae*, *L.dumoffii*, *L.longbeach* 军团菌; 5, 6: LP1; 7, 8: LP3; 9, 10: LP9

图4 部分军团菌LAMP检测结果

表2 不同菌株LAMP检测结果

| 菌株 | mip 基因 | 菌株 | mip 基因 |
|---------------------|--------|----------------------|--------|
| LP1 | + | <i>L.micdadei</i> | - |
| LP3 | + | <i>L.jordanis</i> | - |
| LP4 | + | <i>L.longbeach</i> | - |
| LP5 | + | <i>L.gormanii</i> | - |
| LP6 | + | O157:H7大肠埃希菌 882364 | - |
| LP7 | + | CMCC 大肠埃希菌 44825 | - |
| LP8 | + | ATCC 大肠埃希菌 25922 | - |
| LP9 | + | CMCC 弗劳地枸橼酸菌 48001 | - |
| LP10 | + | ATCC 金黄色葡萄球菌 25923 | - |
| LP11 | + | ATCC 绿脓假单胞菌 27853 | - |
| LP12 | + | CMCC 产酸克雷伯菌 46101 | - |
| LP13 | + | CMCC 伤寒沙门菌 50097 | - |
| 嗜肺军团菌地方株 | + | CMCC 福氏 2a 志贺菌 51573 | - |
| <i>L.bozemaniae</i> | - | CMCC 表皮葡萄球菌 28008 | - |
| <i>L.dumoffii</i> | - | 流感嗜血杆菌地方株 | - |

注: +: 阳性; -: 阴性

弱,至菌液稀释 10^{-8} 扩增无产物,结果显示该法最低检测限为5 cfu/ml(表3)。

表3 LAMP敏感度检测

| 0.5 麦氏比浊浓度 稀释度(1:) | 平板计数法 (菌落数,cfu/ml) | LAMP(1次) | | LAMP(2次) | |
|-----------------------|-----------------------|----------|----|----------|----|
| | | 电泳 | 颜色 | 电泳 | 颜色 |
| 10^{-1} | 多不可计 | + | 绿色 | + | 绿色 |
| 10^{-2} | 多不可计 | + | 绿色 | + | 绿色 |
| 10^{-3} | 397 | + | 绿色 | + | 绿色 |
| 10^{-4} | 156 | + | 绿色 | + | 绿色 |
| 10^{-5} | 57 | + | 绿色 | + | 绿色 |
| 10^{-6} | 13 | + | 橙色 | + | 绿色 |
| 10^{-7} | 3 | + | 橙色 | + | 绿色 |
| 10^{-8} | 0 | - | 橙色 | - | 橙色 |
| 10^{-9} | 0 | - | 橙色 | - | 橙色 |

7. 外环境样本检测: 59份水样本,经不同方法进行检测,发现LAMP法检出率最高,其次为定量PCR,检出率最低的为传统分离培养方法,其中分离培养阳性的水样另外2种方法检测也均为阳性,一致性为100%(表4)。

表4 不同方法检出率比较

| 来源 | 样本数 | 培养分离 | LAMP | 定量PCR |
|--------|-----|----------|-----------|-----------|
| 衢州 CDC | 22 | 6(27.27) | 13(59.10) | 12(54.55) |
| 舟山 CDC | 21 | 3(14.29) | 13(61.90) | 13(61.90) |
| 东阳 CDC | 16 | 8(50.00) | 9(56.25) | 8(50.00) |

注:括号外数据为检出的样本数;括号内数据为检出率(%)

讨 论

本研究中根据嗜肺军团菌的 *mip* 基因设计 LAMP 引物 5 条,具体方法主要参照 Tomita 等^[3]报道,在 LAMP 反应体系中加入适量 $MgSO_4$ 、 $MnCl_2$ 、钙黄绿素,反应结果在日(灯)光下通过肉眼观察绿色是否生成而进行判定,实现反应及产物检测一步完成。该方法是在 Notomi 等^[2]的方法基础上加以改进的最新方法,结果在日(灯)光下通过肉眼观察是否产生绿色钙锰复合物来判断靶基因存在与否,它比以往通过肉眼观察有否产生白色焦磷酸镁沉淀更易于判断。由于 LAMP 扩增的反应体系较为复杂,因而对影响整个反应的主要成分,如甜菜碱、 $MgSO_4$ 、 $MnCl_2$ 、钙黄绿素的浓度和内、外引物及环状引物的浓度比例均要进行优化,各成分的最佳浓度是因具体试验结果来确定的。经试验,本体系中最为适宜的内外引物浓度比为 8:1。Nagamine 等^[8]研究认为,在 LAMP 扩增体系中加入未变性的模板并不影响扩增结果,模板 DNA 的变性在等温扩增中并

不是必须步骤。但本试验表明,试验前模板仍需变性,否则大大降低靶基因物的生成量,使得生成颜色不明显,导致结果难以判断。Nagamine 等^[9]报道,环状引物能使反应时间缩短至 1/2 或更少而且可以加大产量。本次试验时也给军团菌设计了一个环状引物 LB,在反应体系中加入特定的环状引物后,确实加快了反应的速度,而且也加大了反应的生成量,使阳性产物与阴性产物的颜色形成鲜明的对比,反应结果更易于肉眼判断。本研究中还对不同反应温度与时间(55~65℃ 30 min 至 1 h, 80℃ 2~8 min)进行了探索,结果发现,当反应温度为 60℃ 时则达到最佳扩增效果。试验表明,本方法的最佳反应条件分别为 60℃ 1 h, 80℃ 2 min。总之,本方法经对上述各反应条件进行优化后,一是特异性好,扩增嗜肺军团菌共 57 株均呈绿色阳性结果,而扩增非嗜肺军团菌及其他非军团菌菌株均呈橙色阴性结果;二是灵敏度高,用本体系直接对不同稀释度军团菌 DNA 提取液进行检测,其灵敏度达到 5 cfu/ml,稍优于定量 PCR 法检测嗜肺军团菌的检测限 10 cfu/ml^[10],明显大于用普通 PCR 法检测军团菌的检测限 10^3 cfu/ml^[11]。

将本方法实际应用于外环境水样本中嗜肺军团菌的检测,并与传统培养方法及定量 PCR 方法相比,结果表明,前者检出率明显高于传统培养方法,稍优于定量 PCR 方法。本次水样本中 DNA 提取时分别采用直接水煮法及 DNA 提取试剂盒 2 种方法,经比较直接水煮法优于 DNA 提取试剂盒法;分析原因可能由于部分水样本中含菌量极少,而 DNA 提取试剂盒方法步骤多,可能导致部分 DNA 丢失或降解。值得注意的是,部分水样本因含菌量较少,其 LAMP 结果颜色生成并不明显,但电泳条带仍存在,故取一次 LAMP 产物 2 μ l 再次 LAMP,结果颜色明显易于判断。本方法检测成本低,不需要使用昂贵、精密的仪器设备,仅需金属裂解仪/恒温水浴装置;耗时短,在恒温条件下进行反应,1 h 左右即可完成,大大缩短了该菌的检测周期(从菌株核酸的提取至检测完成仅需 1.5 h 左右);日光下通过肉眼目测反应体系颜色变化即可进行结果判断,实现反应及产物检测一步完成,操作简便。

综上所述,本研究建立的嗜肺军团菌 LAMP 检测方法具有特异性强、灵敏度高、方便快捷、成本低等特点,具有在基层/小型实验室、现场监测/外环境水的卫生学评价、临床诊断/应急等方面广泛使用的优势,为嗜肺军团菌的检测提供了一种新的技术方法。

参 考 文 献

[1] 邵祝军. 军团菌病的监测与防治. 疾病监测, 2005, 20(6): 281-282.

[2] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): E63.

[3] Tomita N, Mori Y, Kanda H, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. Nat Protoc, 2008, 3(5): 877-882.

[4] Sasaki Y, Komatsu K, Nagumo S. Rapid detection of Panax ginseng by loop-mediated isothermal amplification and its application to authentication of Ginseng. Biol Pharm Bull, 2008, 31(9): 1806-1808.

[5] Saleh M, Soliman H, El-Matbouli M. Loop-mediated isothermal amplification as an emerging technology for detection of *Yersinia ruckeri* the causative agent of enteric red mouth disease in fish. BMC Vet Res, 2008, 4(1): 31.

[6] Njiru ZK, Mikosza AS, Armstrong T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *trypanosoma brucei rhodesiense*. PLoS Negl Trop Dis, 2008, 6: 2(1): e147.

[7] Maeda H, Kokeguchi S, Fujimoto C, et al. Detection of periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* by loop-mediated isothermal amplification method. FEMS Immuno Med Microbiol, 2005, 43(2): 233-239.

[8] Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, et al. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template. Clin Chem, 2001, 47(9): 1742-1743.

[9] Nagamine K, Hase T, Notomi T, et al. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Mol Cell Probes, 2002, 16: 223-229.

[10] 朱水荣, 张政, 卢亦愚, 等. 嗜肺军团菌荧光定量PCR检测. 中国公共卫生, 2008, 24(9): 1111-1113.

[11] 陈悦, 沈健民, 王刚毅, 等. 军团菌聚合酶链反应检测技术的研究. 中国公共卫生, 2003, 19(3): 351-352.

(收稿日期: 2008-12-11)
(本文编辑: 尹廉)

• 疾病控制 •

人附红细胞体病一例

郭丽萍 毕丽鑫 吕静 李继红 刘树卿 阎锡新

患者男性, 72岁, 河北省平山县农民。2008年11月2日发热(>38℃), 伴有寒战, 同时有双下肢肌肉疼痛, 但不影响行走、站立等活动, 热退时疼痛减轻。经当地医院“抗炎”治疗1周, 病情无好转前来就诊。患者1年前家中10余头猪患病死亡, 曾为病猪接生。入院查体: 体温38.1℃, 贫血貌, 全身皮肤及巩膜黄染, 眼睑轻度浮肿, 两肺呼吸音低, 左肺底可闻及少许细湿啰音, 心率100次/min。肝缘肋下触及1.5 cm, 质软, 轻压痛, 脾未触及, 双下肢中度指凹性水肿。白细胞计数 $19.8 \times 10^9/L$, 中性粒细胞84.2%, 红细胞 $3.45 \times 10^{12}/L$, 血红蛋白11.7 g/L, 红细胞压积32.1%, 网织红细胞3.9%。尿常规检查: 潜血(+), 蛋白(+); 肝功能检测: 总胆红素41.6 μmol/L, 直接胆红素19.0 μmol/L, 间接胆红素22.6 μmol/L, 白蛋白24 g/L。血沉103 mm/h。血培养3次均阴性。骨髓穿刺涂片检查呈感染性骨髓像。胸部CT: 两侧胸腔少量包裹积液伴右下肺组织膨胀不良, 心包积液, 右肺中叶少许慢性炎症, 右肺中叶内侧段及左肺上叶舌段多发纤维条索。患者先后诊断为“肺炎? 败血症? 胆囊炎? 成年人Still病等”。入院后给予抗感染及对症治疗, 体温始终不降。20日末梢血涂片直接镜检发现: 红细胞表面可见大小不一、黄褐色闪闪发光的圆形小体, 大部分红细胞呈棘形、齿轮状、星芒状或不规则状外观; 瑞氏染色: 油镜下可见红细胞表面有蓝色的圆形、泪滴形或不规则形具有折光性的小体, 标本送石家庄市疾病预防控制中心确认红细胞表面的附着物为附红细胞体(附红体), 油镜(1000×)下计数100个红细胞发现染有附红体的红细胞占85%左右; 为重度感染(凡染有附红体的红细胞<

30个为轻度感染; 30~60个为中度感染; >60个为重度感染)。确诊后立即给患者口服四环素, 同时静脉点滴阿米卡星和头孢素, 2周后患者体温降至正常。出院后继续口服四环素, 1个月后随访患者血中附红体基本消失。患者出院诊断为附红细胞体病。

附红细胞体病是一种人畜共患传染病。患者主要临床表现为发热、贫血、黄疸及红细胞压积降低, 另外可有乏力, 易出汗, 嗜睡, 白细胞增多, 肝、脾肿大, 淋巴结肿大, 胸腔、腹腔及心包积液等。由于该病临床所见病例甚少, 目前尚未引起足够重视, 大多数临床医生对该病缺乏认识。人体感染附红体后又多呈潜伏状态, 常规的检查也很容易忽视。此外, 由于其临床表现多种多样(长期发热、贫血和肝脾肿大), 常与感冒、疟疾、黑热病、血液病等疾病的症状相似, 而容易造成误诊和漏诊。对于经常接触牲畜的人, 尤其是儿童, 在该病流行的夏秋季节凡有不明原因发热者, 伴贫血、黄疸、四肢酸痛等症状时, 应注意该病的可能。

本例患者特点为长期发热, 临床表现有贫血、肌痛、黄疸及红细胞压积降低, 白细胞增多, 并出现肺(肺炎、胸膜炎)、肝(肿大、黄疸、低蛋白)、肾(血尿、蛋白尿)等多器官损害, 虽经多种抗生素治疗但无效, 后经血涂片发现附红体, 又经流行病学调查得知患者有病猪接触史, 诊断才得以证实。

目前, 附红细胞体病尚无规范的治疗方案。但是青霉素、链霉素治疗效果不佳。可选用四环素、强力霉素、庆大霉素、丁胺卡那霉素、左旋氧氟沙星等, 有报道华蟾素和青蒿素也有效, 一般疗程7~10 d。本例患者为重度感染, 虫体清除较困难, 采取联合用药, 总疗程长达1.5个月。一般来说, 对于轻中度感染, 如果及时治疗, 预后较好。

(收稿日期: 2008-12-23)
(本文编辑: 张林东)