

人粒细胞无形体病预防控制技术指南(试行)

中华人民共和国卫生部办公厅

人粒细胞无形体病(human granulocytic anaplasmosis, HGA)是由嗜吞噬细胞无形体(*Anaplasma phagocytophilum*, 曾称为“人粒细胞埃立克体, *human granulocytic ehrlichiae*”)感染人末梢血中性粒细胞引起,以发热伴白细胞、血小板减少和多脏器功能损害为主要临床表现的蜱传疾病。自1994年美国报告首例人粒细胞无形体病病例以来,美国每年报告的病例约600~800人。2006年,我国在安徽省发现人粒细胞无形体病病例,其他部分省份也有疑似病例发生。该病临床症状与某些病毒性疾病相似,容易发生误诊,严重者可导致死亡。为指导临床医生和疾病预防控制专业人员做好该病的发现、报告、诊断、治疗、个人防护、实验室检测和疫情防控与应急处置工作,加强公众健康教育,制定本技术指南。

一、目的

1. 指导各级医疗机构正确开展人粒细胞无形体病的诊断和治疗,及时报告病例并做好个人防护和院内感染的控制工作。
2. 指导各级疾病预防控制机构开展人粒细胞无形体病流行病学调查、实验室检测和疫情监测控制工作。
3. 指导各地开展人粒细胞无形体病流行病学、病原学及防控策略的研究。
4. 指导各地做好预防人粒细胞无形体病的健康教育工作。

二、疾病概述

(一)病原学

嗜吞噬细胞无形体属于立克次体目、无形体科、无形体属。无形体科是一类主要感染白细胞的专性细胞内寄生革兰阴性小球杆菌,其中对人致病的病原体主要包括无形体属(*Anaplasma*)的嗜吞噬细胞无形体、埃立克体属(*Ehrlichia*)的查菲埃立克体(*E. chaffeensis*)和埃文氏埃立克体(*E. ewingii*)、新立克次体属(*Neorickettsia*)的腺热新立克次体(*N. sennetsu*),分别引起人粒细胞无形体病、人单核细胞埃立克体病(human monocytic ehrlichiosis, HME)、埃文氏埃立克体感染、腺热新立克次体病。

90年代初期,美国在多例急性发热患者的中性粒细胞胞质内发现埃立克体样包涵体。1995年,Goodman等从患者的血标本分离到该种嗜粒细胞病原体,将它非正式命名为人粒细胞埃立克体,其所致疾病称为人粒细胞埃立克体病。后经16S rRNA基因序列的系统发育分析,发现该种嗜粒细胞病原体与无形体属最相关,因此,将其归于无形体属的一个新种,命名为嗜吞噬细胞无形体,其所致疾病也改称为人粒细胞无形体病。

1. 形态结构及培养特性:嗜吞噬细胞无形体呈球状多型性,革兰染色阴性,主要寄生在粒细胞的胞质空泡内,以膜包裹的包涵体形式繁殖。用 Giemsa 法染色,嗜吞噬细胞无形体包涵体在胞质内染成紫色,呈桑葚状(图1)。

嗜吞噬细胞无形体为专性细胞内寄生菌,缺乏经典糖代谢途径,依赖宿主酶系统进行代谢及生长繁殖,主要侵染人中性粒细胞。嗜吞噬细胞无形体的体外分离培养使用人粒细胞白血病细胞系(HL-60),主要存在于 HL-60 细胞内与膜结构相连的空泡内,生长繁殖迅速。其感染的空泡内无查菲埃立克体感染所形成的纤维样结构。嗜吞噬细胞无形体早期的形态多为圆形、密度较大的网状体,后期菌体变小且密度增大。嗜吞噬细胞无形体的外膜比查菲埃立克体外膜有更多的皱折(图2)。

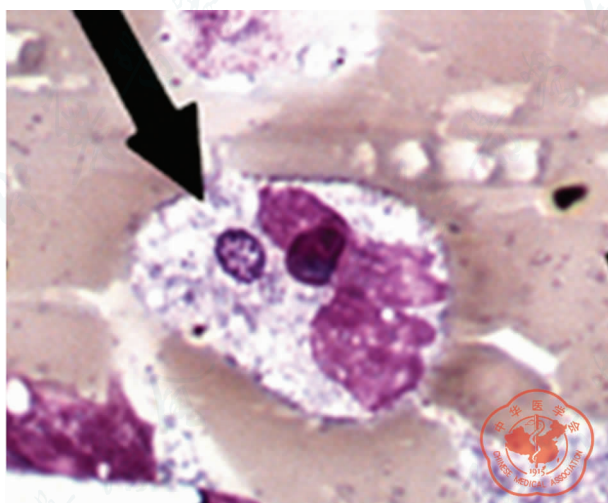


图1 人血液中性粒细胞内无形体包涵体
(X1000, JS Dumler)

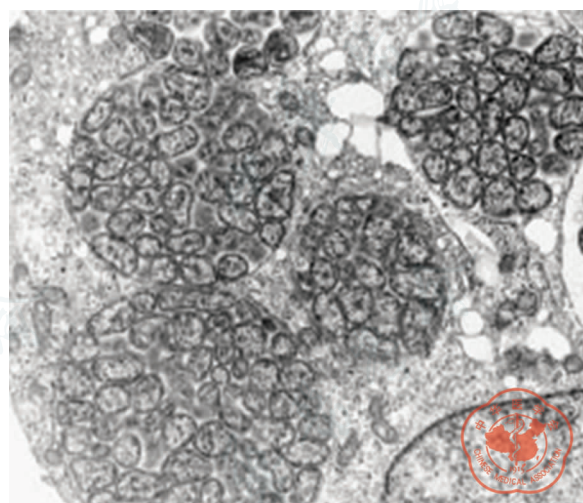


图2 电镜下的无形体包涵体
(X21960, JS Dumler)

2. 遗传及表型特征:嗜吞噬细胞无形体的基因组为 1 471 282 个碱基对, (G + C) 含量为 41.6%, 含有 1369 个编码框(ORF)。特征性基因为 msp 2 以及 Ank A 基因, 100% 的菌株具有 msp 2, 70% 的菌株具有 Ank A 基因。

(二) 流行病学

1. 宿主动物与传播媒介:动物宿主持续感染是病原体维持自然循环的基本条件。国外报道,嗜吞噬细胞无形体的储存宿主包括白足鼠等野鼠类以及其他动物。在欧洲,红鹿、牛、山羊均可持续感染嗜吞噬细胞无形体。

国外报道,嗜吞噬细胞无形体的传播媒介主要是硬蜱属的某些种(如肩突硬蜱、篦子硬蜱等)。我国曾在黑龙江、内蒙古及新疆等地的全沟硬蜱中检测到嗜吞噬细胞无形体核酸。

我国的储存宿主、媒介种类及其分布尚需做进一步调查。

2. 传播途径:(1)主要通过蜱叮咬传播。蜱叮咬携带病原体的宿主动物后,再叮咬人时,病原体可随之进入人体引起发病。(2)直接接触危重患者或带菌动

物的血液等体液,有可能导致传播,但具体传播机制尚需进一步研究证实。国外曾有屠宰场工人因接触鹿血经伤口感染该病的报道。

3. 人群易感性:人对嗜吞噬细胞无形体普遍易感,各年龄组均可感染发病。

高危人群主要为接触蜱等传播媒介的人群,如疫源地(主要为森林、丘陵地区)的居民、劳动者及旅游者等。与人粒细胞无形体病危重患者密切接触、直接接触患者血液等体液的医务人员或其陪护者,如不注意防护,也有感染的可能。

4. 地理分布和发病季节特点:目前,已报道有人粒细胞无形体病的国家有美国、斯洛文尼亚、法国、英国、德国、澳大利亚、意大利及韩国等,但仅美国和斯洛文尼亚分离到病原体。根据国外研究,该病与莱姆病的地区分布相似,我国莱姆病流行区亦应关注此病。

该病全年均有发病,发病高峰为5~10月。不同国家的报道略有差异,多集中在当地蜱活动较为活跃的月份。

(三) 主要病理改变及临床表现

病理改变包括多脏器周围血管淋巴组织炎症浸润、坏死性肝炎、脾及淋巴结单核吞噬系统增生等,主要与免疫损伤有关。嗜吞噬细胞无形体感染中性粒细胞后,可影响宿主细胞基因转录、细胞凋亡,细胞因子产生紊乱、吞噬功能缺陷,进而造成免疫病理损伤。

潜伏期一般为7~14 d(平均9 d)。急性起病,主要症状为发热、全身不适、乏力、头痛、肌肉酸痛,以及恶心、呕吐、厌食、腹泻等。实验室检查外周血象白细胞、血小板降低,肝酶升高。严重者可发展为多脏器功能衰竭、弥漫性血管内凝血,甚至死亡。老年患者及免疫缺陷患者感染本病后病情多较危重。

三、诊断、治疗和报告

医疗机构应按照《人粒细胞无形体病诊疗方案(试行)》(附件1)做好诊断和治疗。同时,应加强医务人员的个人防护和院内感染控制工作。

各级医疗机构发现符合病例定义的人粒细胞无形体病疑似、临床诊断或确诊病例时,应参照乙、丙类传染病的报告要求于24 h内通过国家疾病监测信息报告管理系统进行网络直报,报告疾病类别选择“其他传染病”。符合《国家突发公共卫生事件相关信息报告管理工作规范(试行)》要求的,按照相应的规定进行报告。

四、实验室检测

各级疾病预防控制机构专业人员和临床医务人员发现疑似病例时,应认真按照《人粒细胞无形体病实验室检测方案(试行)》(附件3)进行标本的采集、包装、运送和实验室检测。省级实验室无检测条件或无法鉴定时,应将原始标本及病原分离物送中国疾病预防控制中心进行检测。

五、流行病学调查

疾病预防控制机构接到疫情报告后,应按照《人粒细胞无形体病流行病学调查方案(试行)》(附件2),立即组织专业人员开展流行病学调查,追溯可能的感

染来源,调查传播途径及相关影响因素,填写《人粒细胞无形体病个案调查表》。

出现聚集性病例时,应开展病例的主动搜索,并通过对传染源、传播途径、传播媒介及相关影响因素等的调查分析,及时提出有针对性的预防控制措施。

六、专题调查

有条件的地区,疾病预防控制机构可根据当地疫情的特点,参照《人粒细胞无形体病专题调查方案(试行)》(附件4),组织开展人群血清流行病学、宿主动物和传播媒介等方面的专题调查。

七、预防控制措施

1. 做好公众预防的指导和健康教育:避免蜱叮咬是降低感染风险的主要措施。预防该病的主要策略是指导公众、特别是高危人群减少或避免蜱的暴露。有蜱叮咬史或野外活动史者,一旦出现疑似症状或体征,应及早就医,并告知医生相关暴露史。

蜱主要栖息在草地、树林等环境中,应尽量避免在此类环境中长时间坐卧。如需进入此类地区,尤其是已发现过患者的地区,应注意做好个人防护,穿着紧口、浅色、光滑的长袖衣服,可防止蜱的附着或叮咬,且容易发现附着的蜱。也可在暴露的皮肤和衣服上喷涂避蚊胺(DEET)等驱避剂进行防护。在蜱栖息地活动时或活动后,应仔细检查身体上是否有蜱附着。蜱常附着在人体的头皮、腰部、腋窝、腹股沟及脚踝下方等部位。如发现蜱附着在身体上,应立即用镊子等工具将蜱除去。因蜱体上或皮肤破损处的液体可能含有传染性病原体,不要直接用手将蜱摘除或用手指将蜱捏碎。

蜱可寄生在家畜或宠物的体表。如发现动物体表有蜱寄生时,应减少与动物的接触,避免被蜱叮咬。

2. 开展医疗卫生专业人员培训:各地应开展对医务人员和疾控人员的培训工作,提高医务人员发现、识别人粒细胞无形体病的能力,规范其治疗行为,以降低病死率;提高疾控人员的流行病学调查和疫情处置能力,控制疫情的蔓延和流行。

3. 提高实验室诊断能力:发现疑似病例时,应及时采集标本开展实验室检测。各省级疾病预防控制中心应逐步提高对该病的实验室检测能力,建立实验室检测的相关技术和方法。已发生或可能发生疫情的地区及有条件的地市级疾病预防控制中心和医疗机构也应逐步建立该病的实验室诊断能力。

4. 媒介与宿主动物的控制:出现暴发疫情时,应采取灭杀蜱、鼠和环境清理等措施,降低环境中蜱和鼠的密度。

5. 患者的管理:对患者的血液、分泌物、排泄物及被其污染的环境和物品,应进行消毒处理。一般不需要对患者实施隔离。

附件:

1. 人粒细胞无形体病诊疗方案(试行)

2. 人粒细胞无形体病流行病学调查方案(试行)
3. 人粒细胞无形体病实验室检测方案(试行)
4. 人粒细胞无形体病专题调查方案(试行)

(本文编辑:孙荣华)

中华人民共和国卫生部办公厅. 人粒细胞无形体病预防控制技术指南(试行)[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2010,4(3):350-365.

附件 1

人粒细胞无形体病诊疗方案(试行)

为指导各地及时、有效地开展人粒细胞无形体病的诊断和救治工作,减少危重和死亡病例,防止院内感染的发生,特制定本方案。

一、临床表现

潜伏期一般为 7 ~ 14 d(平均 9 d)。急性起病,主要症状为发热(多为持续性高热,可高达 40℃ 以上)、全身不适、乏力、头痛、肌肉酸痛,以及恶心、呕吐、厌食、腹泻等。部分患者伴有咳嗽、咽痛。体格检查可见表情淡漠,相对缓脉,少数患者可有浅表淋巴结肿大及皮疹。可伴有心、肝、肾等多脏器功能损害,并出现相应的临床表现。

重症患者可有间质性肺炎、肺水肿、急性呼吸窘迫综合症以及继发细菌、病毒及真菌等感染。少数患者可因严重的血小板减少及凝血功能异常,出现皮肤、肺、消化道等出血表现,如不及时救治,可因呼吸衰竭、急性肾衰等多脏器功能衰竭以及弥漫性血管内凝血死亡。

老年患者、免疫缺陷患者及进行激素治疗者感染本病后病情多较危重。

二、实验室检查

实验室检查外周血象白细胞、血小板降低,异型淋巴细胞增多。合并脏器损害的患者,心、肝、肾功能检测异常。病原学和血清学检查阳性。其中:

血常规:白细胞、血小板减少可作为早期诊断的重要线索。患者发病第一周即表现有白细胞减少,多为 $1.0 \sim 3.0 \times 10^9/L$; 血小板降低,多为 $30 \sim 50 \times 10^9/L$ 。可见异型淋巴细胞。

尿常规:蛋白尿、血尿、管形尿。

血生化检查:肝、肾功能异常;心肌酶谱升高;少数患者出现血淀粉酶、尿淀粉酶和血糖升高。

部分患者凝血酶原时间延长,纤维蛋白原降解产物升高。可有血电解质紊乱,如低钠、低氯、低钙等。少数患者还有胆红素及血清蛋白降低。

三、并发症

如延误治疗,患者可出现机会性感染、败血症、中毒性休克、中毒性心肌炎、急性肾衰、呼吸窘迫综合症、弥漫性血管内凝血及多脏器功能衰竭等,直接影响病情

和预后。

四、病例诊断

依据流行病学史、临床表现和实验室检测结果进行诊断。

(一)流行病学史。

1. 发病前2周内被蜱叮咬史
2. 在有蜱活动的丘陵、山区(林区)工作或生活史
3. 直接接触过危重患者的血液等体液。

(二)临床表现。

急性起病,主要症状为发热(多为持续性高热,可高达40℃以上)、全身不适、乏力、头痛、肌肉酸痛,以及恶心、呕吐、厌食、腹泻等。个别重症病例可出现皮肤瘀斑、出血,伴多脏器损伤、弥漫性血管内凝血等。

(三)实验室检测

1. 血常规及生化检查:(1)早期外周血象白细胞、血小板降低,严重者呈进行性减少,异型淋巴细胞增多;(2)末梢血涂片镜检中性粒细胞内可见桑葚状包涵体;(3)谷丙(丙氨酸氨基转移酶,ALT)和/或谷草(天冬氨酸氨基转移酶,AST)转氨酶升高。

2. 血清及病原学检测:(1)急性期血清间接免疫荧光抗体(IFA)检测嗜吞噬细胞无形体IgM抗体阳性;(2)急性期血清IFA检测嗜吞噬细胞无形体IgG抗体阳性;(3)恢复期血清IFA检测嗜吞噬细胞无形体IgG抗体滴度较急性期有4倍及以上升高;(4)全血或血细胞标本PCR检测嗜吞噬细胞无形体特异性核酸阳性,且序列分析证实与嗜吞噬细胞无形体的同源性达99%以上;(5)分离到病原体。

(四)诊断标准

疑似病例:具有上述(一)、(二)项和(三)项1项中的(1)、(3)。部分病例可能无法获得明确的流行病学史。

临床诊断病例:疑似病例同时具备(三)项1项中的(2),或(三)项2项中的(1)或(2)。

确诊病例:疑似病例或临床诊断病例同时具备(三)项2项中(3)、(4)、(5)中的任一项。

五、鉴别诊断

1. 与其他蜱传疾病、立克次体病的鉴别:人单核细胞埃立克体病(HME)、斑疹伤寒、恙虫病、斑点热以及莱姆病等。

2. 与发热、出血及酶学指标升高的感染性疾病的鉴别:主要是病毒性出血性疾病,如流行性出血热、登革热等。

3. 与发热、血白细胞、血小板降低的胃肠道疾病的鉴别:伤寒、急性胃肠炎、病毒性肝炎。

4. 与发热及血白细胞、血小板降低或有出血倾向的内科疾病的鉴别:主要是

血液系统疾病,如血小板减少性紫癜,粒细胞减少、骨髓异常增生综合征。可通过骨髓穿刺及相应病原体检测进行鉴别。

5. 与发热伴多项酶学指标升高的内科疾病鉴别:主要是免疫系统疾病,如皮炎、系统性红斑狼疮、风湿热。可通过自身抗体等免疫学指标进行鉴别。

6. 其他:如支原体感染、钩端螺旋体病、鼠咬热、药物反应等。

六、治疗

及早使用抗生素,避免出现并发症。对疑似病例可进行经验性治疗。一般慎用激素类药物,以免加重病情。

(一)病原治疗

1. 四环素类抗生素:(1)强力霉素。为首选药物,应早期、足量使用。成人口服:0.1 g/次,1日2次,必要时首剂可加倍。8岁以上儿童常用量:首剂4 mg/kg;之后,每次2 mg/kg,1日2次。一般病例口服即可,重症患者可考虑静脉给药;

(2)四环素。口服:成人常用量为0.25~0.5 g/次,每6小时1次;8岁以上儿童常用量为一日25~50 mg/kg,分4次服用。静脉滴注:成人一日1~1.5 g,分2~3次给药;8岁以上儿童为一日10~20 mg/kg,分2次给药,每日剂量不超过1 g。住院患者主张静脉给药。四环素毒副作用较多,孕妇和儿童慎用。

强力霉素或四环素治疗疗程不少于7 d。一般用至退热后至少3 d,或白细胞及血小板计数回升,各种酶学指标基本正常,症状完全改善。早期使用强力霉素或四环素等药物,一般可在24~48 h内退热。因人粒细胞无形体病临床表现无特异性,尚缺乏快速的实验室诊断方法,可对疑似病例进行经验性治疗,一般用药3~4天仍不见效者,可考虑排除人粒细胞无形体病的诊断。

2. 利福平:儿童、对强力霉素过敏或不宜使用四环素类抗生素者,选用利福平。成人450~600 mg,儿童10 mg/kg,每日一次口服。

3. 喹诺酮类:如左氧氟沙星等。磺胺类药物有促进病原体繁殖作用,应禁用。

(二)一般治疗

患者应卧床休息,高热量、适量维生素、流食或半流食,多饮水,注意口腔卫生,保持皮肤清洁。

对病情较重患者,应补充足够的液体和电解质,以保持水、电解质和酸碱平衡;体弱或营养不良、低蛋白血症者可给予胃肠营养、新鲜血浆、白蛋白、丙种球蛋白等治疗,以改善全身机能状态、提高机体抵抗力。

(三)对症支持治疗

1. 对高热者可物理降温,必要时使用药物退热。

2. 对有明显出血者,可输血小板、血浆。

3. 对合并有弥漫性血管内凝血者,可早期使用肝素。

4. 对粒细胞严重低下患者,可用粒细胞集落刺激因子。

5. 对少尿患者,应碱化尿液,注意监测血压和血容量变化。对足量补液后仍少尿者,可用利尿剂。如出现急性肾衰时,可进行相应处理。

6. 心功能不全者,应绝对卧床休息,可用强心药、利尿剂控制心衰。

7. 应慎用激素。国外有文献报道,人粒细胞无形体病患者使用糖皮质激素后可能会加重病情并增强疾病的传染性,故应慎用。对中毒症状明显的重症患者,在使用有效抗生素进行治疗的情况下,可适当使用糖皮质激素。

(四) 隔离及防护

对于一般病例,按照虫媒传染病进行常规防护。在治疗或护理危重患者时,尤其患者有出血现象时,医务人员及陪护人员应加强个人防护。做好患者血液、分泌物、排泄物及其污染环境和物品的消毒处理。

(五) 出院标准

体温正常、症状消失、临床实验室检查指标基本正常或明显改善后,可出院。

(六) 预后

据国外报道,病死率低于1%。如能及时处理,绝大多数患者预后良好。如出现败血症、中毒性休克、中毒性心肌炎、急性肾衰、呼吸窘迫综合症、弥漫性血管内凝血及多脏器功能衰竭等严重并发症的患者,易导致死亡。

附件 2

人粒细胞无形体病流行病学调查方案(试行)

为做好人粒细胞无形体病疫情的流行病学调查,准确描述和分析疫情特征,科学制订防控策略和措施,特制定本方案。

一、调查目的

(一) 为病例的核实诊断提供流行病学证据。

(二) 为了解该病在我国的流行病学及临床特征积累数据。

二、调查对象

(一) 散发病例:包括疑似病例、临床诊断病例、实验室确诊病例。

(二) 聚集性病例:在同一村庄,或在同一山坡、树林、茶园、景区等地劳动或旅游的人员中,2周内出现2例及以上人粒细胞无形体病(疑似)病例,或在病例的密切接触者中出现类似病例。

三、调查内容和方法

(一) 个案调查和标本采集。

发现人粒细胞无形体病病例后,应及时开展流行病学个案调查。调查内容包括病例的基本情况、家庭及居住环境、暴露史、发病经过、就诊情况、临床表现、实验室检查、诊断、转归、密切接触者情况等(见附表《人粒细胞无形体病个案调查表》),并采集相关标本(见附件3《人粒细胞无形体病实验室检测方案(试行)》)。

1. 基本情况:包括年龄、性别、住址、职业、文化程度、旅行史等。

2. 临床资料:通过查阅病历及化验记录、询问经治医生及病例、病例家属等方法,详细了解病例的发病经过、就诊情况、临床表现、实验室检查结果、诊断、治疗、

疾病进展、转归等情况。

3. 病例家庭及居住环境情况:通过询问及现场调查,了解病例及其家庭成员情况、家庭居住位置、环境、家禽及家畜饲养情况等。

4. 暴露史及病例发病前活动范围:(1) 询问病例发病前2周内劳动、旅行或可疑暴露史,了解其是否到过有蜚生长的场所,是否有蜚叮咬史。(2) 询问病例发病前2周内与类似病例的接触情况,包括接触时间、方式、频率、地点、接触时采取的防护措施等。

5. 密切接触者:如病例出现出血并污染周围环境、物品时,应对医务人员、陪护人员或其他密切接触者开展追踪调查,必要时采集相关标本进行检测。

(二) 聚集性病例的调查

在出现聚集性病例或暴发疫情时,应注意调查感染来源。如怀疑有人传人可能时,应评估人群感染及人传人的风险。应组织疾控人员或医务人员,采用查看当地医疗机构门诊日志、住院病历等临床资料、入户调查等方式,开展病例的主动搜索,并对搜索出的疑似病例进行筛查、随访。追踪疑似病例、临床诊断病例及实验室确诊病例的密切接触者,必要时采集相关样本进行检测。

通过查阅资料、咨询当地相关部门等方法,了解当地自然生态环境、媒介分布,以及相关的人口、气象、生产、生活资料等情况。

四、调查要求

(一) 调查者及调查对象

应由经过培训的县(区)级疾病预防控制机构专业人员担任调查员。现场调查时,应尽可能直接对患者进行访视、询问。如患者病情较重,或患者已死亡,或其他原因无法直接调查时,可通过其医生、亲友、同事或其他知情者进行调查、核实或补充。

(二) 调查时间及调查内容

应在接到疫情报告后迅速开展流行病学调查,调查内容见附表《人粒细胞无形体病个案调查表》。调查表应填写完整,实验室检测结果、患者转归等情况应及时填补到调查表中,以完善相关信息。

(三) 调查者的个人防护

在流行病学调查及标本采集过程中,调查者应采取相应的个人防护措施,尤其应注意避免被蜚叮咬或直接接触患者的血液、分泌物或排泄物等。

五、调查资料的分析、总结和利用

1. 在疫情调查处理进程中或结束后,应及时对流行病学资料进行整理、分析,撰写流行病学调查报告,并及时向上级疾病预防控制机构及同级卫生行政部门报告。

2. 疫情调查结束后,各省级疾病预防控制机构应及时将人粒细胞无形体病流行病学个案调查表及流行病学调查报告上报中国疾病预防控制中心。

3. 疫情调查结束后,各地疾病预防控制机构应将流行病学调查的原始资料、

分析结果及调查报告及时整理归档。

附件 3

人粒细胞无形体病实验室检测方案(试行)

为保证及时、科学地采集、运送人粒细胞无形体病病例(包括疑似病例)及疫源地调查的各种类型标本,规范人粒细胞无形体病的实验室检测程序,提高检测质量,为明确诊断或开展相关的科学研究提供实验室依据,特制定本方案。

一、样本采集对象

1. 人粒细胞无形体病病例(包括疑似病例,以下同)。
2. 病例密切接触者或其他健康人群。
3. 疫源地可疑宿主动物(野生动物及狗、羊、牛等家畜)、媒介蜱。

二、标本种类及采集方法

1. 抗凝血:常用 EDTA 抗凝管或枸橼酸盐抗凝管采集血液 5 ml,用于病原分离。应尽可能在患者使用抗生素前进行血液的采集。

2. 非抗凝血:用无菌真空管,采集病例、健康人群及宿主动物非抗凝血 5 ml,用于血清抗体及 PCR 检测。采集后,应及时分离血清,将血清、血球分别保存。急性期抗体及 PCR 检测用血液采集尽可能在发病后 1 周内,恢复期抗体检测标本采集至少间隔 2~3 周。如第 2 份血清在 1 个月之内抗体升高不明显的,应建议间隔 2~4 周后采集第 3 份血液标本。

3. 包涵体检测血涂片的制备:采集血液标本后,制作厚血片,进行红细胞裂解处理等。

4. 媒介蜱标本的采集:采集动物体表媒介蜱,用镊子夹取,放入铺垫有潮湿滤纸或纱布的青霉素小瓶或试管中,用纱布包紧瓶口以防止蜱爬出。实验室接到蜱标本后,首先应进行种属鉴定,然后按类别分组(1~5 只蜱/组),采用 75% 酒精浸泡 30 min 后,用无菌蒸馏水反复冲洗 3 次。最后进行分组研磨,研磨液用于提取 DNA,进行 PCR 扩增。

5. 有条件时,可采集活检或尸检标本,冰冻、福尔马林固定或石蜡包埋后进行实验室检测。具体方法参照病理实验室相关要求和卫生部《传染患者或疑似传染患者尸体解剖查验规定》的相关要求。

三、标本采集和保存注意事项

标本采集应符合无菌操作要求。抗凝血如不能立即床边接种,应置于 4℃ 环境保存,避免冰冻(不超过 2 周)。非抗凝血应及时进行无菌分离血清,血清用于抗体检测,血球部分研磨后提取 DNA 用于 PCR 检测。如不能及时检测,可暂置于 -20℃ 环境保存。所有标本应置入大小适合、带螺旋盖、内有垫圈的冻存管内,拧紧管口。标本采集后,应认真填写采样登记表。

四、实验室检测

(一)包涵体的检测

1. 血片及白细胞涂片制备:采集的抗凝血标本尽快用血球层推血片,待干燥后冷丙酮固定 10 min;或提取抗凝血中的白细胞并进行涂片,待干燥后冷丙酮固定 10 min。

2. 染色:通常采用瑞氏(Wright)染色法、姬氏(Giemsa)染色法及瑞-姬混合染色法。有条件的实验室,可使用美国 CDC 推荐的染色方法。

3. 染液配置方法:(1)瑞-姬染液:取瑞氏染料和姬氏染料各 0.5 g,以甲醇研溶,加甲醇 500 ml 保存,每天摇匀 1 次,1 周后可使用。(2)改良 Mc Donald 法瑞-姬染色剂:75 ml 甘油(分析纯)中加入磷酸盐缓冲液(Na_2HPO_4 1 g 和 KH_2PO_4 2 g),以 4 ml 蒸馏水溶解,37℃水浴 24 h 溶解混匀,用滤纸过滤,保存于密封的棕色瓶中备用。上述甘油缓冲液 1.5 ml 加瑞-姬染色剂 50 ml,混匀后备用。

4. 染色步骤:血推片或白细胞涂片分别以两种染色剂染色 2 min,再加蒸馏水作用 5 min,用自来水冲洗。

5. 结果观察:中性粒细胞中可见桑葚状包涵体(见图 1),并注意保存相关标本,以便进行复核。

(二)血清学检测

常用血清学方法为间接免疫荧光(IFA)法。采集急性期(发热初期,一般发病 1 周内)与恢复期(至少间隔 2~3 周)双份血清。如恢复期血清抗体检测阴性,应建议医生采集第 3 份血液样本(间隔 2~4 周)。

1. 试剂:使用国际推荐的、经过 ISO 质量认证的产品。

2. 方法及操作按说明书进行。

3. 结果解释。

IFA 检测结果解释按说明书进行。

如果同时检测双份血清,IgG 抗体 4 倍升高,则结果强烈支持嗜吞噬细胞无形体感染。如果急性期抗体升高,而恢复期没有升高或轻微升高,则应采集第 3 份血液样本(间隔 2~4 周)进行进一步检测。

(三)嗜粒细胞无形体核酸 PCR 检测。

目前,国际推荐使用 16 S rRNA 基因检测方法,有条件的实验室,可进一步选用热休克蛋白基因 groEL 扩增方法。

1. DNA 提取:用急性期、未使用抗生素的 EDTA 抗凝血或非抗凝血血球部分、白细胞及脾研磨液提取 DNA。最后,以 AE 缓冲液 50 ? 1 抽滤以提高回收的 DNA 浓度。如采用血液白细胞层提取 DNA,可明显提高阳性检出率。实验时,应采集当地正常人血液同时提取 DNA,作为 PCR 的阴性对照。2. PCR 扩增:(1)16 S rRNA 基因检测:16 S rRNA 高度保守,是 PCR 检测最常用的扩增靶基因,巢式 PCR 检测可提高检测灵敏度和特异度,采用属特异及种特异引物同时进行检测。

PCR 检测应分区进行,避免污染。使用引物序列见表 1。

表 1 巢式 PCR 检测无形体及埃立克体 16S rRNA 基因常用引物

引物名称	序 列	片段长度 (bp)
Eh-out1 (AF414399)	5'-TTG AGA GTT TGA TCC TGG CTC AGA ACG-3'	653
Eh-out2 (AF414399)	5'-CAC CTC TAC ACT AGG AAT TCC GCT ATC-3'	
Eh-gs1 (AF414399)	5'-GTA ATA CT GTA TAA TCC CTG-3'	282
Eh-gs2 (AF414399)	5'-GTA CCG TCA TTA TCT TCC CTA-3'	
HGA1	5'-GTC GAA CGG ATT ATT CTT TAT AGC TTG -3'	389
HGA2	5'-TAT AGG TAC CGT CAT TAT CTT CCC TAC-3'	

PCR 反应混合物的准备按常规进行。第一轮反应采用外引物对 Eh-out1 和 Eh-out2, DNA 模板 10 μ l (白细胞提取的 DNA 可适当减少)。PCR 反应体系总体积为 25 μ l 或 50 μ l (需要进行 PCR 测序或克隆时,应适当扩大反应体系),其它成分的浓度按常规进行。反应程序如下:94 $^{\circ}$ C 5 min,40 循环:94 $^{\circ}$ C 45 s,55 $^{\circ}$ C 50 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 总延伸 5 min。第二轮反应使用 2 对引物分别进行巢式 PCR。2 对引物分别是无形体属及埃立克体属通用内引物(Eh-gs1、Eh-gs2);以及 HGA 种特异性引物(HGA1 及 HGA2)。检测样本取第一轮产物 1~2 μ l 为模板,阳性对照取 0.5 μ l 为模板。反应程序同第一轮反应。

(2) 热休克蛋白基因 groEL 扩增

与 groEL 基因的应用相比,16 S rRNA 基因的应用更为广泛,但 groEL 基因在不同种属间具有较大的变异性。因此,对于诊断及菌株的鉴定,groEL 基因均具有重要意义。该基因扩增使用巢式 PCR,引物序列见表 2。

表 2 groEL 基因扩增常用引物

引物名称	序 列	退火温度	片段长度 (bp)
HS1	5'-TGG GCT GGT A(A/C)TGA AAT	52 $^{\circ}$ C	1431
HS6	5'-CCI CCI GGI ACI A(C/T)ACC TTC		
HS43	5'-AT(A/T)GC(A/T) AA(G/A)GAA GCA TAG TC	55 $^{\circ}$ C	HGA480
HS45	5'-ACT TCA CG(C/T)(C/T)TCA TAG AC		HME528

DNA 提取同上。PCR 检测时,反应混合物的准备按常规进行。DNA 模板量同 16S rRNA 基因检测。巢式 PCR 第一轮反应采用外引物对 HS1 及 HS6。

反应程序如下:3 循环:94 $^{\circ}$ C 1 min,48 $^{\circ}$ C 2 min,70 $^{\circ}$ C 90 s;37 循环:88 $^{\circ}$ C 1 min,52 $^{\circ}$ C 2 min,70 $^{\circ}$ C 90 s,68 $^{\circ}$ C 总延伸 5 min。

第二轮 PCR 引物采用 HS43 及 HS45。检测样本取第一轮产物 1~2 μ l 为模板,阳性对照取 0.5 μ l 为模板。反应程序同第一轮反应。反应程序同第一轮反应,但退火温度由 52 $^{\circ}$ C 改为 55 $^{\circ}$ C。

3. 测序及分析:对扩增产物进行测序并进行同源比较,分析当地流行株与其

它地区的变异性。

(四)病原体分离培养

多用 HL-60 进行嗜吞噬细胞无形体的分离培养。最常用的分离方法是将白细胞部分接种培养基,然后将 100 ~ 500 μl 抗凝血接种到悬浮有 2×10^5 或 1×10^6 细胞内,每 2 ~ 3 天染色检查包涵体,一般 5 ~ 10 d 可查见包涵体。由于分离可能受到红细胞的影响,因此,建议使用以下方法:

1. 白细胞分离:采用密度梯度离心方法(Ficoll-Paque)。一般采用 2 ~ 3 ml EDTA 抗凝血,用 2 倍体积的无菌 Hanks 平衡盐溶液稀释,最后采用 Histopaque 密度梯度离心分离白细胞,可以获得较高的白细胞,用以分离 HGA。采用白细胞分离方法进行接种时,应注意防止操作过程中的污染。2. 红细胞裂解后收集白细胞(NHCl4 裂解法)。

3. 在使用含有红细胞的标本培养后,另加入宿主未感染的细胞,建立混合培养。

血液白细胞悬浮于 2 ml 体积、含有 5% ~ 10% 胎牛血清的培养基中,且在 25 cm^2 培养瓶内与培养细胞作用 3 h。37℃、5% CO_2 条件下振荡孵育,可增加病原体与细胞的作用。

病原体的鉴定:可通过种特异引物进行 PCR 鉴定。

五、生物安全

在标本采集、运输及实验室工作过程中,生物安全应参照《病原微生物实验室生物安全管理条例》中的有关要求。

(一)实验室生物安全

标本灭活、病原 DNA 标本提取及病原体分离操作应在生物安全 II 级实验室进行。非感染性材料的检测可在生物安全 I 级实验室进行。

(二)血液标本采集安全注意事项

采集病例的标本时,应做好个人防护。采集者应戴乳胶手套,尽量避免病例的血液外溢或直接接触。如发生血液外溢污染环境时,应及时采用 75% 酒精或常用消毒剂进行消毒处理。应按照对传染性样本的要求,对采集标本的器具及患者止血棉球及时进行消毒处理。防止锐器扎伤皮肤,一旦发生,应按临床外科要求,及时进行伤口清创。如直接沾染了临床诊断病例或确诊病例的血液,除及时消毒皮肤外,应口服强力霉素预防感染,服用剂量参照《人粒细胞无形体病诊疗方案(试行)》(附件 1)。

(三)采集动物宿主与媒介蜱标本个人防护

野外采集标本时,应穿着颜色明亮的防护服,并将衣袖或裤管口扎紧以防蜱叮咬人体,且容易发现蜱的附着。一旦发现有蜱附着体表,应用镊子夹取,不要用手直接摘除。野外作业或活动的人员可使用驱避剂或防蚊油喷涂皮肤,也可用硫化钾代替防蚊油。

(四) 标本运输安全注意事项

应参照《病原微生物实验室生物安全管理条例》中的有关要求(B类)进行。

(五) 在诊疗及标本的采集、包装和实验室检测等过程中所产生的医疗废物, 应依照《医疗废物管理条例》和《医疗卫生机构医疗废物管理办法》等相关规定处理。

附件 4

人粒细胞无形体病专题调查方案(试行)

为指导发生疫情的地区开展人粒细胞无形体病的调查, 增进对该病病原学、传播机制、危险因素及临床诊断等的认识, 为制订相应的防控策略和措施提供科学依据, 特制订本方案。

一、调查目的

1. 了解人粒细胞无形体病疫区人群感染状况及抗体水平。
2. 了解人粒细胞无形体病主要的潜在传播媒介的种类、分布及带菌状况。
3. 了解人粒细胞无形体病常见的动物宿主种类、分布及带菌状况。

二、调查内容与方法

(一) 血清流行病学调查

1. 调查对象:(1)可能暴露者:与患者有类似暴露史的人员(暴露于有可疑野生动物或蜱的生境)。(2)密切接触者:与患者密切接触者(参与救治的医护人员、护理患者的家属等)。(3)一般人群:与患者无密切接触,也无可疑生境暴露者。

2. 标本采集:对所有密切接触者应采集双份血清,间隔3~4周,另应采集可能暴露者及一般人群血清各30~50份。每次采集静脉血5 ml,分离血清送检。血清标本的包装、贮存及运送见《人粒细胞无形体病实验室检测方案(试行)》(附件3)。

3. 标本检测:采集的标本应及时送有条件的省级疾病预防控制中心进行抗体检测。如当地无检测条件,应送中国疾病预防控制中心进行检测。检测方法及注意事项见《人粒细胞无形体病实验室检测方案(试行)》(附件3)。

(二) 宿主动物调查

根据流行病学调查的线索,确定是否进行宿主动物的调查。

1. 调查地点和时间:在病例可能感染的地点,或根据当地的地理景观,选择宿主动物调查的地点。调查时间可选择在疫情发生后或宿主动物活动高峰季节。

2. 捕获方法:(1)居民区采用笼夜法。在鼠类经常出没的场所,于傍晚时在每15 m²的房间放置鼠笼一个,并做好标记。诱饵用花生米或油条、油饼等(同一地区应选用同一种诱饵)。次日清晨取回鼠笼,将捕获鼠的鼠笼放入布鼠袋内,系紧袋口,做好记录,并编号。(2)野外采用夹(笼)夜法。在有鼠活动的场所,于

傍晚时布放鼠夹(笼),夹(笼)的行距应在30 m以上,夹(笼)间距为5 m,并做好标记。诱饵应统一。次日清晨取回夹(笼),将捕获鼠放入布鼠袋内,系紧袋口,做好标记,并编号。如捕白天活动的鼠,采用夹(笼)日法。(3)鼠类以外的其它野生宿主动物(如野兔等)可通过有关渠道获取。

3. 标本处理:(1)采集动物血标本待检。(2)解剖前,将所捕宿主动物(如鼠等)置于密闭容器内,用乙醚深度麻醉。将动物(鼠)置于白瓷盘中,先用镊子夹取盘中和动物(鼠)体表的寄生物,如蜱、螨、蚤等,寄生物按鼠只分别置入盛有75%酒精的密闭容器中,并标记相应鼠只的编号;然后,采用无菌方法解剖动物(鼠),取其脾、肝、肾标本,置入相应编号的无菌冻存管内,于液氮罐内保存。无液氮罐保存条件的,应置-20℃环境保存。

上述标本送回实验室后,应尽快检测。否则,应置-80℃超低温、或-20℃低温冰箱内保存。

4. 动物的分类、鉴定:参考《医学动物鉴定手册》等相关专业资料,鉴定宿主动物的种类、学名等。

5. 核酸检测及病原分离:(1)采用PCR扩增动物血液标本的DNA,并测定核苷酸序列。(2)有条件的实验室应对阳性标本进行病原体分离。阳性病原分离物送中国疾病预防控制中心作进一步鉴定。

方法见附件3《人粒细胞无形体病实验室检测方案(试行)》。

6. 计算动物(鼠)种的构成、密度及其带菌率。

(三) 蜱的调查

1. 调查地点和时间:在病例可能感染的地点,或根据当地的地理景观选择媒介蜱的调查地点。调查时间可选择在疫情发生后,或蜱活动高峰季节。

2. 捕获方法:(1)布旗法。用约1平方米大小的白绒布旗,在调查地段内定时进行拖蜱。拖蜱时,手持旗杆伸向一侧,使布旗平铺于草丛上,以等速缓步向前行走,每步行2 m观察一次,将附着于旗上的蜱捡入玻管内保存。每小时检获蜱数即为蜱密度,单位为只/布旗人工小时,每次捕蜱时间不少于1 h(如蜱密度单位采用只/布旗人工分钟,每次捕蜱时间一般不少于30 min)。同时,检查拖蜱者身体上是否附着有蜱,如有,将蜱捡入另一玻管内保存,以区别于布旗法捕获的蜱。凡拖过蜱的地方,短时间内不应在原地重复调查。

(2)带蜱指数调查法。用鼠笼在有蜱活动的地方捕捉活鼠,鼠体上蜱的采集可参照宿主动物体外寄生物采集方法进行。平均每只鼠体上的蜱数即为带蜱指数,单位为只/鼠。家养动物或其它野生动物用适当方式制动固定后,可直接检蜱,计算带蜱指数。

3. 蜱的分类、鉴定:参考有关专业资料,对捕获的蜱进行分类、鉴定、命名(学名)。若当地无法鉴定,可将采集到的雌、雄蜱各若干只置于75%乙醇溶液中保存,送中国疾病预防控制中心传染病所鉴定。

4. 核酸检测及病原分离:(1)采用PCR扩增蜱标本的DNA,并测定核苷酸序

列。(2)有条件的实验室应对阳性蜱标本进行病原分离。阳性病原分离物送中国疾病预防控制中心作进一步鉴定。

方法见附件3《人粒细胞无形体病实验室检测方案(试行)》。

5. 计算蜱种的构成、总带菌率及各种蜱的带菌率。

三、资料的收集、管理和利用

(一)一般背景资料的收集

收集当地的一般背景资料,如调查时当地的气象资料(气温、降雨量、湿度、风力、风向等)、地理状况(地理位置、地形、地貌、湖泊、河流、流域等)、人口统计学资料、生产及生活方式(农、牧业、狩猎等活动)、生活及卫生习惯、特殊风俗、社会经济状况以及其他相关资料等。

(二)专题调查相关资料的收集

收集专题调查的相关资料,包括各种采样(人体血清、宿主动物标本、媒介蜱)登记表、检测登记表、检测报告,以及各类专题调查(血清采集、宿主动物调查、媒介蜱调查)统计表等。

(三)资料的管理和利用。

现场调查结束后,应及时撰写专题调查报告,上报上级疾控机构及同级卫生行政部门,并将专题调查的原始记录、汇总整理资料、分析数据及调查报告等及时整理、归档。实验室检测工作结束后,应及时将检测结果反馈给当地疾病预防控制中心,由当地疾病预防控制中心告知相关单位及被调查者。