

输入性三日疟原虫的实验室诊断

徐明忠¹, 田斌^{1,2}, 张兵¹, 黄非凡¹, 廖瑜¹, 申晓君¹, 文岚¹

1.长沙市疾病预防控制中心,湖南 长沙 410001; 2.中南大学湘雅医学院

摘要: **目的** 分析输入性三日疟疾的实验室诊断,减少三日疟的误诊与漏诊。**方法** 采用厚薄血膜涂片形态学检查、巢氏 PCR 对疟原虫 18S rRNA 基因进行扩增等方法确诊输入性三日疟疾病例。**结果** 经过形态学和巢氏 PCR 检测发现首诊结果为未检出、检出未分型和诊断为恶性疟的 7 例患者感染三日疟原虫,有一例为间日疟原虫和三日疟原虫混合感染。**结论** 在消除疟疾的地区,应当持续的进行疟原虫显微镜镜检技术的培训和分子生物学技术的推广应用,以满足现阶段输入性疟疾病例正确诊断和分型要求,尤其是罕见和少见虫种鉴定要求。

关键词: 三日疟原虫;巢氏 PCR;混合感染;实验室诊断

中图分类号:R446 **文献标识码:**B **文章编号:**1006-3110(2016)11-1391-04 **DOI:**10.3969/j.issn.1006-3110.2016.11.033

Laboratory diagnosis of imported *Plasmodium malariae* infection

XU Ming-zhong*, TIAN Bin, ZHANG Bing, HUANG Fei-fan, LIAO Yu, SHEN Xiao-jun, WEN Lan

* Changsha Municipal Center for Disease Control and Prevention, Changsha, Hunan 410001, China

Corresponding author: TIAN Bin, E-mail: b2002@163.com

Abstract: **Objective** To analyze the laboratory diagnosis of cases of imported *Plasmodium malariae* infection so as to reduce its misdiagnosis and missed diagnosis. **Methods** The cases of imported *Plasmodium malariae* infection were confirmed by morphological test of thick and thin blood smears and nested polymerase chain reaction (PCR) malaria detection assay. **Results** The results of morphological test and nested PCR malaria detection assay showed that 7 cases of *Plasmodium malariae* infection

基金项目:长沙市科技局2013年度指导性科技计划项目(K13ZD051-33)

作者简介:徐明忠(1971-),男,湖南永州人,副主任技师,主要从事临床检验和实验室质量控制工作。

通讯作者:田斌,E-mail:t.b2002@163.com。

及腹泻患者中副溶血弧菌的流行情况及其分子分型。通过对不同来源副溶血弧菌 PFGE 的检测,首次获得丰台区副溶血弧菌分离株的分子特征等信息,为本区副溶血弧菌分子分型数据库的建立奠定了良好基础,也为副溶血弧菌主动监测、暴发调查和传染源追踪提供技术和数据支持。

参考文献

- [1] 陈晨,高永军,丁凡,等. 2005-2012 年我国其他感染性腹泻事件监测分析[J]. 实用预防医学,2014,21(6):695-697.
- [2] 李学云,石向辉,黄慈林,等. 深圳市福田区 2005-2007 年感染性腹泻流行特征分析[J]. 实用预防医学,2009,16(1):88-90.
- [3] 安秀华,宁喜斌,李涛. 水产品中副溶血性弧菌的污染、毒力基因及耐药性研究[J]. 食品科学,2010,31(3):209-212.
- [4] 蒋立新,杨梅,邓凯杰,等. 深圳市水产品中副溶血性弧菌污染现状及耐药性分析[J]. 职业与健康,2010,26(3):287-288.
- [5] 谭海芳,丁丽娜,林凤,等. 肇庆市副溶血性弧菌血清分型和耐药性研究[J]. 实用预防医学,2010,17(2):349-352.
- [6] Yang ZQ, Jiao XA, Zhou XH, et al. Isolation and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from fresh, low-temperature preserved, dried, and salted seafood products in two coastal areas of eastern China[J]. Int J Food Microbiol, 2008, 125(3):279-285.
- [7] 赖晓华,肖新才,王鸣. 珠江口水体及海、水产品致病性弧菌检测[J]. 中国公共卫生,2010,26(4):448-449.
- [8] 程苏云,翁景清,林香娟,等. 副溶血性弧菌食物中毒菌株的血清型、耐药性及基因检测[J]. 中国卫生检验杂志,2002,12(2):141-142.
- [9] 李晓春. 浙南部沿海地区细菌性食物中毒病原检测研究分析[J]. 中国预防医学杂志,2004,5(5):370-373.

- [10] 江艳华,姚琳,宋春丽,等. 青岛市售贝类副溶血性弧菌污染状况及耐药性分析[J]. 中国卫生检验杂志,2012,22(2):375-377.
- [11] 兰进权,雷永良,柳付明,等. 丽水市贝类中副溶血性弧菌的血清分型及耐药性[J]. 中国卫生检验杂志,2010,20(7):1763-1764.
- [12] 安秀华,宁喜斌. 上海市市售水产品中副溶血性弧菌的分离、鉴定及耐药性研究[J]. 中国人兽共患病学报,2009,25(7):657-659.
- [13] 封会茹,曲梅,耿荣,等. 2010-2012 年北京市丰台区感染性腹泻病原菌分布及耐药性分析[J]. 疾病监测,2013,28(2):96-100.
- [14] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(9):2233-2239.
- [15] Safa A, Bhuiyan NA, Alam M, et al. Genomic relatedness of the new *Vibrio cholerae* O1 to the classical and ElTor biotypes as determined by pulsed-field gel electrophoresis[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(3):1401-1404.
- [16] Centers for Disease Control and Prevention. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infections among children associated with farm visits - Pennsylvania and Washington, 2000 [J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2001, 50(15):293-297.
- [17] Gouveia S, Proctor ME, Lee MS, et al. Genomic comparisons and Shiga toxin production among *Escherichia coli* O157:H7 isolates from a day care center outbreak and sporadic cases in southeastern Wisconsin[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(3):727-733.
- [18] 侯凤伶,刘维华,申志新,等. 副溶血性弧菌脉冲场凝胶电泳分型研究[J]. 实用预防医学,2008,15(1):34-37.
- [19] 夏楚才,陈水波,苏华,等. 副溶血性弧菌分子检测与分型研究进展[J]. 现代农业科技,2012,2(22):277-278.
- [20] 苗艳芳. 脉冲场凝胶电泳用于副溶血性弧菌的分子流行病学研究[J]. 中国人兽共患病学报,2010,26(10):935-938.

收稿日期:2016-04-10

which were initially diagnosed with non-*Plasmodium* infection, *Plasmodium* infection and *Plasmodium falciparum* infection were detected, including 1 case of mixed *Plasmodium malariae* and *Plasmodium vivax* infections. **Conclusions** The training about morphological diagnosis of *Plasmodium* species and the related molecular biology techniques should be continuously strengthened and promoted in malaria eliminated areas so as to meet the correct diagnosis and species identification of imported malaria cases at the present stage, especially in rare and seldom species identification.

Key words: *Plasmodium malariae*; Nested PCR; Mixed infection; Laboratory diagnosis

三日疟原虫(*Plasmodium malariae*)是导致人类疟疾的原虫之一,在热带和亚热带地区呈散在分布,在感染人类的疟原虫中占有较小的比例。在我国,三日疟原虫分布散在且较为少见^[1]。因此,国内实验室负责疟疾检测的人员对其认知尚不够普遍,实验室诊断能力参差不齐,能力有待提高。随国际间商业文化、商务及旅游的发展,输入性疟疾疫情不仅长期给我国的疟疾防控体系持续构成压力^[2],同时也对少见和罕见疟原虫的实验室诊断能力提出了较高要求。本文将长沙市 2012-2015 年输入性三日疟的实验室诊断情况进行分析。

1 材料与方法

1.1 标本来源 研究对象为 7 例输入性疟疾患者,均为男性,年龄 22~45 岁,发病均以发热(38℃~39℃)、头痛、发冷为主要临床表现,无恶心、呕吐和腹泻症状。发病出现在回国后 1~119 d。病例来源国家、既往疟疾病史、既往用药情况、首诊单位报告结果和本次检测前有无自行服用抗疟药物等信息见表 1。标本为研究对象的 EDTA 抗凝血,实验室先行制作厚薄血涂片,然后将标本-70℃冻存备检。

表 1 研究对象基本信息^a

序号	来源国家	既往疟疾病史(发作次数)	既往用药情况	首诊单位报告结果 ^a	采样前是否自服抗疟药 ^b	本室镜检结果
1	喀麦隆	1	注射蒿甲醚	未分型	是	<i>Pm</i>
2	南苏丹	5	注射蒿甲醚	<i>p.f</i>	否	<i>Pm</i>
3	刚果金	4	注射蒿甲醚	<i>p.f</i>	否	<i>Pm</i>
4	缅甸	1	注射蒿甲醚	<i>p.f</i>	是	<i>Pm</i>
5	印度尼西亚	2	口服双氢青蒿素片	<i>P.v</i>	是	<i>P.v</i> & <i>Pm</i>
6	几内亚	5	注射蒿甲醚	<i>P.v</i> & <i>p.m</i>	是	<i>Pm</i>
7	安哥拉	2	注射蒿甲醚	未检出	否	<i>Pm</i>

注:a: *p.f*、*P.v*、*p.m* 分别表示恶性疟原虫、间日疟原虫和三日疟原虫;b:“是”为服用了双氢青蒿素片;c:表中涉及的用药剂量因患者不能准确的口述,因此未能具体说明。

1.2 试剂与仪器 Giemsa 染液自配;DNA 提取使用

QIAamp DNA Micro Kit;聚合酶链反应扩增使用 Platinum PCR Super Mix, Invitrogen;显微照相系统为德国 Leica 公司产品;PCR 扩增仪器购自美国 ABI 公司;电泳仪和凝胶成像系统为英国 SYNGENE 公司产品。

1.3 方法 厚薄血膜涂片行 Giemsa 染色后显微镜检查,方法参照^[1]进行。核酸检测参照文献^[2-3]所述巢氏 PCR 方法进行。引物序列见表 2。1 轮:上下游引物(20 μmol/L)各 1 μl,Platinum PCR Super Mix 18 μl, DNA 模板 5 μl,计 25 μl;2 轮:种特异性上下游引物(20 μmol/L)各 1 μl,Platinum PCR Super Mix 18 μl,去离子水 4 μl,第 1 轮反应产物 1 μl。扩增条件:95℃ 5 min;94℃ 30 s,58.5℃ 30 s,72℃ 50 s,37 个循环;72℃ 3 min;4℃ ∞。对第 2 轮扩增产物进行琼脂糖电泳分析。

表 2 巢氏 PCR 扩增 18S rRNA 基因引物序列

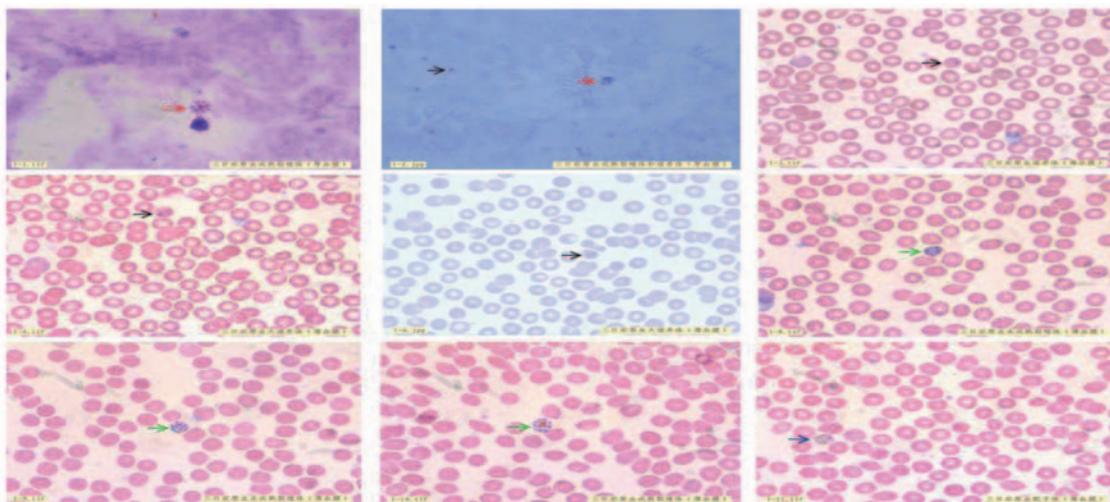
反应轮次	目的	引物名称	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
1	疟原虫属	PLU1	F: CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC	1200
		PLU2	R: TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG	
2	恶性疟原虫	FAL1	F: TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT	205
		FAL2	R: ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC	
	间日疟原虫	VIV1	F: CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC	117
		VIV2	R: ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA	
	三日疟原虫	MAL1	F: ATA ACA TAG TTG TAC GTT AAG AAT AAC CGC	144
		MAL2	R: AAA ATT CCC ATG CAT AAA AAA TTA TAC AAA	
	卵形疟原虫	OVA1	F: ATC TCT TTT GCT ATT TTT TAG TAT TGG AGA	787
		OVA2	R: GGA AAA GGA CAC ATT AAT TCT ATC CTA GTG	

2 结果

2.1 厚薄血膜涂片镜检结果 厚血膜示:三日疟原虫环状体核较恶性和间日原虫粗大,胞浆粗厚见图 1-2;成熟裂殖体,呈玫瑰花瓣样排列,见图 1-1 和 1-2。薄血膜示:三日疟原虫各期均可见,但同一患者同一标本通常以一到两期为主要发育阶段,发育中的滋养体、裂殖体两个阶段出现频率较高,被寄生的红细胞正常大小或稍缩小;早期滋养体(环状体)占感染红细胞 1/3,见图 1-3;大滋养体呈带状,非阿米巴样伪足,核形态

不甚规则,疟色素粗壮,常遮盖虫体的核或浆,见图 1-4 和 1-6;未成熟裂殖体呈圆形或近圆形,无空泡,胞质较致密,几乎占满整个受染红细胞,核呈分裂相,体积较小,见图 1-8;成熟裂殖体占满整个红细胞,含有

6~12 个裂殖子,裂殖子排列成规则的玫瑰花瓣样,疟色素集中成团,见图 1-9 和 1-10,三日疟原虫配子体体积较小,呈圆形,几乎占满整个受染红细胞,核周不染带,可不连续,疟色素较为分散,见图 1-11。

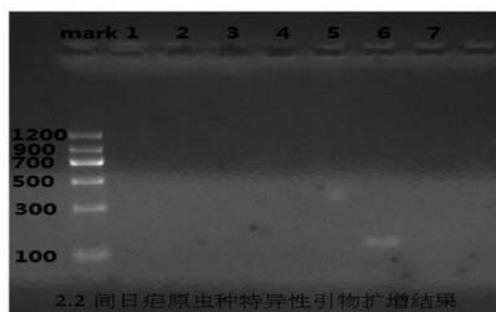
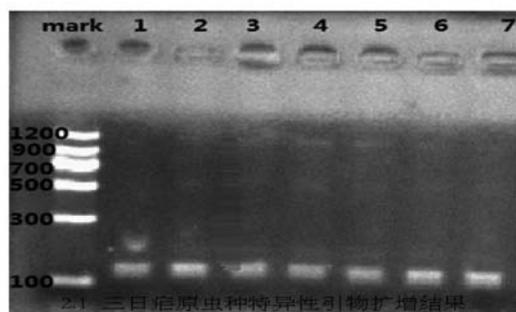


注:1. 图 1-1 和 1-2 为厚血膜染色后的镜下形态;图 1-3 至 1-11 为薄血膜染色后的镜下形态。2. 黑色箭头指示未成熟裂殖体;红色箭头指示成熟裂殖体;蓝色箭头指示配子体。3. 厚薄血膜均采用 Giemsa 染色。放大(10×100)倍。

图 1 厚薄血膜涂片显微照片

2.2 核酸检测结果 7 例患者除 6 号患者同时存在间日疟原虫感染外,其余均单一感染了三日疟原虫,核酸

扩增产物电泳结果见图 2。



注:1~7 指示患者序号。

图 2 患者血标本核酸巢氏 PCR 检测结果

3 讨论

疟疾是有资料记载以来最古老的人类疾病之一。时至今日,除结核病外,疟原虫感染所致死亡人数仍比其他任何微生物要多。三日疟原虫虽无间日疟原虫感染人数众多,没有恶性疟原虫易造成中枢神经系统受累和高的死亡率^[4],但三日疟原虫感染亦有其不容忽视的特点,一是自愈或治疗不彻底的患者可以多年后再次或多次复发,长期处于潜在感染和低原虫血症,可持续几十年^[1],因此对于输入地来说存在继续传播的可能性;二是三日疟原虫的感染虽可以治愈,但因感染而获得的慢性肾小球病通常不能治愈,可持续存在肾病综合征^[5]。

本文研究的 7 例三日疟原虫均为劳务输出人员回

国后输入的疟疾患者,输出地为非洲中部、西部国家和东南亚国家,均位于疟疾流行的热带和亚热带地区。7 例患者前驱症状与间日疟类似,无退热间期的虚脱表现。但有两位患者因其未能及时诊治,出现了高丙种球蛋白血症和一过性蛋白尿的出现。高丙种球蛋白血症与慢性感染时抗原诱导细胞因子 IL-6 有关,一过性蛋白尿由抗原过剩形成的抗原-抗体复合物沉积于肾小球所致^[5-6]。另外从询问病史的情况可以了解劳务输出人员在疟疾流行国家和地区大部分为多次感染疟疾,每次发病后虽口服或注射抗疟药物,但在疟疾流行区几乎没有明确的实验室检测结果,就会被予以不规范的抗疟治疗。虽然无法排除他们再感染的可能性,但这种不合理的用药也在一定程度上造成该类人员的

多次发病。

所有研究对象发病后出现的症状基本相似,即以发热(38℃~39℃)、头痛、发冷为主要临床表现,间歇3d发热的特点均不明显,无恶心、呕吐和腹泻症状;在回国后1~119d发病;4例患者在首诊前自服抗疟药物;除1例患者被首诊单位实验室检出疟原虫并正确分型外,其余6例患者中1例被漏诊,5例未正确分型,而这四家首诊单位不乏省部级综合医院和市直综合性医院。这一诊断结果足以说明输入性的少见或者罕见疟原虫的虫种鉴定对于医疗机构的检验人员存在一定困难,这与检验人员对此类疟原虫的认识仍然只存在于理论层面并未有机会在实际工作中得以总结和提高有关,另外与三日疟原虫感染的固有特点亦密切相关^[7]。笔者认为造成这一结果的原因有以下几个方面:一、由于本地区基本消除疟疾后,仅靠中国消除疟疾工作中的理论培训对检验人员疟疾镜检水平提高帮助有限^[3];二、三日疟原虫感染的红细胞通常为衰老红细胞^[5],因此感染原虫的密度或带虫量相对较小,极易被漏诊;三、一些血清学的辅助诊断方法对三日疟缺乏效能有限,常表现为阴性结果^[7];四、潜伏期长短不一加上发病初期症状并不规则,极易被误诊误治^[8];五、患者都曾经有过疟疾病史,对疟疾的自觉症状较为熟悉,加上疟疾流行区的务工人员都可以通过不同的途径获得口服的抗疟药物,因此在就诊前多服用过抗疟药物,也给实验室的诊断带来了不利因素。

三日疟原虫虽具有诸如红内期周期72h、主要感染衰老红细胞、受染红细胞大小正常或略有缩小、被寄生红细胞少见彩点、环厚、核大、滋养体常横跨细胞呈带状、成熟裂殖体含裂殖子6~12个等特点^[9-11],但这些特点因标本采集、用药以及血涂片制作的影响常常给虫种鉴别带来困难,如果存在混合感染的情况,结果不言而喻会更糟糕。如果三日疟原虫血片中以小滋养体(环状体)为主要阶段,那么与其它3种疟原虫的鉴别是存在困难的,甚至经验丰富的镜检人员也无法正确的鉴定虫种^[12];如以未成熟裂殖体和滋养体或配子体为主要阶段的血涂片,与卵形疟原虫和间日疟原虫的鉴别虽然可以从红细胞的表现和疟色素等方面予以鉴别,但实际以EDTA抗凝血标本制作的涂片上这些特点都已经被不同程度的削弱,鉴别存在一定的困难^[3],未成熟的裂殖体数裂殖子的数目也不可以作为诊断要点;另外,以成熟裂殖子的数目和疟色素的特点来加以鉴别对不熟练的镜检人员也是一件不容易的事情。类似的可能性很多,不能一一列举。本实验室对

首诊单位血涂片复核的结果显示与巢氏PCR检测结果一致。因此,对于技术不熟练的检验人员,巢氏PCR的方法在虫种鉴定方面有优势,而对熟练镜检人员是基本没有差别的,所以分子生物学技术的应用可以在一定程度上对输入性三日疟原虫的实验室诊断加以验证,作为形态学诊断的补充。然而目前PCR检测的方法还不适合临床需要,对每个就诊病例用PCR筛查仍受限制^[13-15]。

因此,在消除疟疾的地区,应当持续的进行疟原虫显微镜镜检技术的培训和分子生物学技术的推广应用,以满足现阶段输入性疟疾病例正确诊断和分型的要求,尤其是罕见和少见虫种的鉴定要求。

参考文献

- [1] 卫生部地方病防治局. 疟疾防治手册[M]. 第3版. 北京:人民卫生出版社,2007:70-78.
- [2] 张兵,田斌,廖瑜,等. 巢氏PCR在输入性疟疾诊断和分型中的应用价值[J]. 实用预防医学,2013,20(2):229-231.
- [3] 田斌,段绩辉,徐明忠,等. 三例输入性卵形疟的实验室诊断[J]. 检验医学,2014,29(8):851-855.
- [4] 魏泓,万正,韩墨,等. 非洲输入性三日疟2例[J]. 中国血吸虫病防治杂志,2014,26(2):232-233.
- [5] Garcia LS. Diagnostic medical parasitology[M]. 5th ed. Washington, DC:ASM Press,2006.
- [6] 张进顺,高兴政. 临床寄生虫检验学[M]. 北京:人民卫生出版社,2009:105-108.
- [7] Baltzell KA, Shakely D, Hsiang M, et al. Prevalence of PCR detectable malaria infection among febrile patients with a negative *Plasmodium falciparum* specific rapid diagnostic test in Zanzibar[J]. Am J Trop Med Hyg,2013,88(2):289-291.
- [8] 邓艳,周瑞敏,张红卫,等. 河南省3例输入性三日疟的诊治分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2014,32(1):61-63.
- [9] Andrade BB, Reis-Filho A, Barros AM, et al. Towards a precise test for malaria diagnosis in the Brazilian Amazon: comparison among field microscopy, a rapid diagnostic test, nested PCR, and a computational expert system based on artificial neural networks[J]. Malar J,2010,9:117.
- [10] Chong C, Cho PY, Na B, et al. Evaluation of the accuracy of the easy test malaria Pf/Pan Ag, a rapid diagnostic test, in Uganda[J]. Korean J Parasitol,2014,52(5):501-505.
- [11] Baiden F, Owusu-Agyei S, Okyere E, et al. Acceptability of rapid diagnostic test-based management of malaria among caregivers of under-five children in rural Ghana[J]. PLoS One,2012,7(9):e45556.
- [12] 王真瑜,张耀光,江莉,等. 上海市1例输血性三日疟病例的实验室检测分析与诊断[J]. 中国血吸虫病防治杂志,2015,27(4):362-366.
- [13] 高世同,张仁利,黄达娜,等. 基于SSUrRNA基因序列的间日疟原虫LAMP检测技术的建立[J]. 中国病原生物学杂志,2011,24(3):197-200.
- [14] 祝卫东. 干血滴中染色体外疟原虫DNA的PCR扩增及测序[J]. 国外医学(寄生虫病分册),1999,37(1):38-39.
- [15] 师永霞,黄吉城,苏锦坤,等. 广东口岸首例输入性卵形疟病例的诊断分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2014,32(2):156-158.

收稿日期:2016-01-19