

• 论 著 •

湖北省首例输入性卵形疟原虫 wallikeri 亚种的病原学诊断分析

孙凌聪,张华勋[△],裴速建,夏 菁,吴冬妮,林 文
(湖北省疾病预防控制中心寄生虫病防治研究所,武汉 430079)

摘要:目的 应用巢式 PCR 技术对 1 例罕见卵形疟原虫 wallikeri 亚种进行诊断和鉴定。方法 采集初诊为输入性间日疟患者血样,进行疟疾快速诊断试剂盒、显微镜镜检和巢式 PCR 检测,并进行测序分析。结果 该患者疟疾快速诊断试剂盒检测阴性;镜检查见寄生于红细胞内的疟原虫环状体和滋养体;采用卵形疟原虫 wallikeri 亚种特异性引物(rOVA1v/rOVA2v)进行巢式 PCR,在 760 bp 处有特异性扩增条带,测序后经 Blast 比对,与 GenBank 数据库中卵形疟原虫 wallikeri 亚种部分序列的一致性为 99%。结论 该患者经巢式 PCR 和序列分析确诊为湖北省首例卵形疟原虫 wallikeri 亚种感染。

关键词:输入性疟疾; 卵形疟原虫 wallikeri 亚种; 巢式聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.14.022

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)14-1956-03

Analysis on etiological diagnosis of first case of imported Plasmodium ovale wallikeri subspecies in Hubei Province

SUN Lingcong, ZHANG Huaxun[△], PEI Sujian, XIA Jing, WU Dongni, LIN Wen

(Research Institute of Parasitic Diseases, Hubei Provincial Center for Disease Control and Prevention, Wuhan, Hubei 430079, China)

Abstract: Objective To use the nested PCR technology to diagnose and identify a case of imported Plasmodium ovale wallikeri subspecies. Methods Blood sample was collected from 1 case of initially diagnosed imported tertian malaria and performed the examination of microscopy, rapid diagnostic tests (RDTs) and nested-PCR. Moreover the sequencing was conducted. Results RDTs showed the negative result; the ring form and trophozoite of Plasmodium could be observed in the blood smear by microscopy; the Plasmodium ovale wallikeri subspecies specific primer rOVA1v/rOVA2v was adopted for conducting nested PCR, the specific amplification band appeared at 760 bp, after sequencing and Blast aligning, its coincidence with the partial sequence of Plasmodium ovale wallikeri subspecies in the Genbank database was 99%. Conclusion This patient is the first case of Plasmodium ovale wallikeri subspecies infection in Hubei province by nested PCR and sequencing analysis.

Key words: imported malaria; plasmodium ovale wallikeri; nested polymerase chain reaction

卵形疟原虫(Plasmodium ovale)于 1922 年首次由 Stephens 描述并因其在红细胞内的卵圆形态而被命名^[1]。其主要分布于非洲,尤其是西非及东南亚国家。最近研究发现,卵形疟除经典亚种(Plasmodium ovale curtisi)外还存在另一变异亚种(Plasmodium ovale wallikeri),两者无法通过镜检从形态上区分^[2]。湖北省历史上未见卵形疟本地病例报道,但随着境外劳务输出的日益频繁,输入性卵形疟呈较大幅度增加,但未见 wallikeri 亚种报道^[3]。本研究对湖北省 1 例初诊为输入性间日疟病例,采用巢式 PCR 鉴定,并进行测序分析,结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 患者男,31 岁,荆门人,2013 年 11 月赴非洲加纳从事野外金矿开采,务工期间曾多次感染疟疾(感染虫种不详),均采用注射 1~2 d 抗疟药治疗,2014 年 8 月回国约 6 个月后,出现发热、寒战、全身酸痛等症状,经县人民医院采血制片镜检诊断为间日疟,后经市级疾控中心镜检复核为输入性间日疟。采集该患者 EDTA-Na₂ 抗凝全血送省级疾控中心复核。

1.2 仪器与试剂 全血 DNA 抽提试剂盒(QIAamp DNA Mini Kit)购自 QIAGEN 公司,DNA 聚合酶(PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase)购自 Takara 公司,PCR 预混反应体系(DreamTaq PCR Master Mix)购自 Fermentas 公司,疟疾快速诊断试剂盒(Malaria rapid diagnostic tests, RDTs)购自广州万孚生物技术有限公司。显微镜相系统购自 Leica 公司,PCR 扩增仪和电泳仪购自 Bio-Rad 公司,凝胶成像系统购自 Ultra-Violet

公司。

1.3 方法

1.3.1 RDTs 检测 取 5 μ L 患者抗凝血,参照 RDTs 说明书进行检测。

1.3.2 血涂片显微镜镜检 取患者抗凝血制作有厚、薄血膜的血涂片,干燥、固定后采用 Giemsa 染色,油镜($\times 1\,000$)下镜检疟原虫。

1.3.3 巢式 PCR 检测小亚基核糖体 RNA(SSU rRNA) (1) 参考文献[4-5]设计疟原虫属特异性引物 rPLU5/rPLU6 和间日疟、恶性疟、三日疟、卵形疟 curtisi 亚种和卵形疟 wallikeri 亚种 5 种疟原虫的种特异引物(分别为 rVIV1/rVIV2、rFAL1/rFAL2、rMAL1/rMAL2、rOVA1/rOVA2 和 rOVA1v/rOVA2v)。由宝生物工程(大连)有限公司合成,见表 1。(2)DNA 提取参照 QIAamp DNA Mini Kit 试剂盒提取全血 DNA, -20 $^{\circ}$ C 保存。(3)SSU rRNA 第一轮扩增:20 μ L 反应体系中包含 3 μ L 模板 DNA, 0.2 μ L Taq DNA 聚合酶, 1.1 μ L 6 μ mol/L 属特异性引物, 1.6 μ L 2.5 mmol/L dNTPs, 4.0 μ L 5 $\times$ Buffer 和 9.0 μ L 水;反应条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共扩增 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。SSU rRNA 第二轮扩增:20 μ L 反应体系中包含第一轮扩增产物 2 μ L, 4 对种特异性引物上、下游引物各 1.0、10 μ L 2 $\times$ DreamTaq PCR Master Mix 和补水至 20 μ L;扩增条件与第一轮扩增相同。(4)琼脂糖凝胶电泳:取 2.0 μ L 6 $\times$ 上样缓冲液与 10 μ L 第二轮 PCR 扩增产物混匀,取 6 μ L 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳(90 V 电泳 40 min),凝胶成像系统观察。(5)测序分析:将第二

轮扩增产物送生工生物(上海)股份有限公司进行测序,测序结果在 NCBI 上进行 Blast 同源性分析。

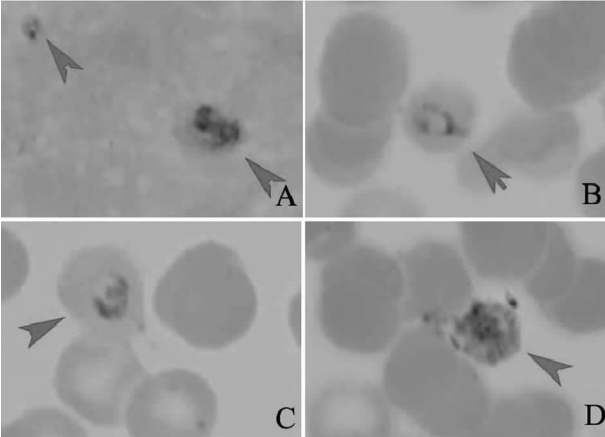
表 1 基于 SSU rRNA 基因的疟原虫巢式 PCR 扩增体系

扩增顺序	引物名称和序列(5'~3')	预期长度(bp)
属特异性(第一轮)	rPLU5:CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC	1 200
	rPLU6:TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG	
种特异性(第二轮)	rVIV1:CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC	120
	rVIV2:ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA	
	rFAL1:TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT	205
	rFAL2:ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC	
	rMAL1:ATA ACA TAG TTG TAC GTT AAG AAT AAC CGC	144
	rMAL2:AAA ATT CCC ATG CAT AAA AAA TTA TAC AAA	
	rOVA1:ATC TCT TTT GCT ATT TTT TAG TAT TGG AGA	787
	rOVA2:GGA AAG GAC ACA TTA ATT GTA TCC TAG TG	
	rOVA1v:ATC TCC TTT ACT TTT TGT ACT GGA GA	782
	rOVA2v:GGA AAA GGA CAC TAT AAT GTA TCC TAA TA	

2 结 果

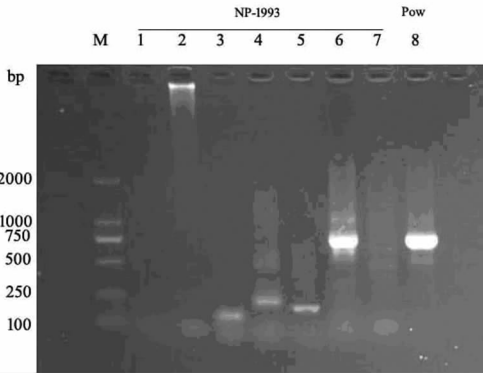
2.1 RDTs 检测结果 患者抗凝血样经 RDTs 检测,结果为疟原虫阴性。

2.2 血涂片显微镜镜检结果 血涂片镜检厚血膜查见环状体和大滋养体;薄血膜中,被寄生的红细胞大小正常或略缩小,环状体和早期滋养体核较大,胞质较厚,大滋养体呈圆形,细胞质坚实,空泡不显著(图 1)。



注:A 为厚血膜中的环状体和大滋养体;B~D 均为薄血膜,其中 B 为环状体,C 为早期滋养体,D 为大滋养体。

图 1 血涂片中的疟原虫(Giemsa 染色,×1 000)



注:M 为 DNA 标志物;NP-1993 为采用 NP-1993 PCR 体系;Pow 为采用卵形疟 wallikeri 亚种引物;1 为空白对照;2 为阴性对照;3~6 分别为间日疟、恶性疟、三日疟和卵形疟 curtisi 亚种阳性对照;7、8 为患者标本。

图 2 全血 DNA 巢式 PCR 检测结果

2.3 巢式 PCR 检测结果 采用 NP-1933 体系,患者样本扩增阴性;而以 rOVA1v/rOVA2v 为引物 PCR 扩增出大小约 760 bp 的特异性条带(图 2)。

2.4 扩增片段的序列分析结果 扩增产物经测序,长度约为 754 bp,采用 NCBI 中 Blast 程序对扩增序列(通过 Bankit 提交 NCBI,GenBank 登录号为 KU315239)进行同源性比对,与 GenBank 中 Plasmodium ovale wallikeri 克隆 GC-1 18S rRNA 基因全序列(GenBank 登录号 KF696359. 1)及卵形疟 SUU rRNA 基因(GenBank 登录号 AJ001527. 1)一致性均为 99%。

3 讨 论

卵形疟每年在非洲引起超过 1 500 万病例,由于其形态与间日疟相似和隔日发作特点,常被误诊为间日疟或三日疟而导致其感染率被低估^[6]。而目前被基层广泛使用的 RDTs 产品对卵形疟、三日疟的诊断敏感性显著低于间日疟和恶性疟,卵形疟假阴性时常发生^[7]。湖北省近几年才陆续有输入性卵形疟报道,基层医疗单位对卵形疟认识不足,从而导致本例患者误诊为间日疟。同时,卵形疟与间日疟一样,有肝细胞期休眠子的存在,可导致复发^[8]。本研究中的患者回国 6 个多月才发病,如遇适当的传播媒介,引起输入性疟疾在本地传播的风险较大。此外,虽然卵形疟在其流行地区很少引起人类严重疾病,但可在外来人群中引起严重的临床疾病^[9]。因此,加强基层医疗单位对卵形疟的认识和诊断能力,对防止漏诊和重症病例发生非常重要。

卵形疟原虫两个亚种形态上无法区分,仅潜伏期长短和潜在临床症状有所区别^[10],只有通过分子生物学方法才能区分。按照中国消除疟疾行动计划和疟疾诊断参比实验室的相关文件要求,各省应对每个疟疾病例按照国家疟疾比实验室推荐的巢式 PCR 方法(NP-1993 体系^[4])进行基因检测以明确感染虫种^[11]。但研究发现,自 wallikeri 亚种被发现并正式命名后,传统的 NP-1993 体系仅对 curtisi 亚种敏感^[12]。随后针对新亚种卵形疟的诊断技术和方法也不断更新,并取得了很多成果^[3]。本研究中患者采用 NP-1993 体系进行巢式 PCR 检测阴性后,采用 Calderaro 等^[5]报道的卵形疟原虫 wallikeri 亚种特异性引物(rOVA1v/rOVA2v),扩增出特异性条带。扩增产物测序后在 NCBI 上进行同源性比对,确诊为卵形疟 wallikeri 亚种。

随着中国前往非洲、东南亚等地区务工人员不断增多,我国输入性疟疾疫情逐年上升,一些国内较为少见的疟疾类型,如三日疟、卵形疟及诺氏疟原虫。也不断增多^[11]。湖北省

2013 年后已无本地疟疾病例报告,但随着输入性疟疾不断增加,卵形疟病例显著增加^[4]。因此,加强基层医疗单位对少见疟疾种类的培训,并在传统镜检、RDTs 方法基础上,结合 PCR 等分子生物学诊断技术,对降低少见输入性疟疾病例的漏诊、误诊,减少重症病例发生及防止输入性疟疾在本地传播,巩固消除疟疾的成果有重要意义。

参考文献

[1] Stephens JWW. A new Malaria parasite of man[J]. Proceedings of the Royal Society of London, 2016, 87(596): 375-377.

[2] Fuehrer HP, Noedl H. Recent advances in detection of Plasmodium ovale; implications of separation into the two species Plasmodium ovale wallikeri and Plasmodium ovale curtisi[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(2): 387-391.

[3] 黄光全, 胡乐群, 张华勋, 等. 湖北省输入性疟疾病发态势及防控措施分析[J]. 中国热带医学, 2013, 13(12): 1490-1493.

[4] Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction[J]. Mol Biochem Parasitol, 1993, 61(2): 315-320.

[5] Calderaro A, Piccolo G, Perandin F, et al. Genetic polymorphisms influence Plasmodium ovale PCR detection accuracy[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(5): 1624-1627.

[6] Sutherland CJ, Tanomsing N, Nolder D, et al. Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite

Plasmodium ovale occur globally[J]. J Infect Dis, 2010, 201(10): 1544-1550.

[7] De Laval F, Oliver M, Rapp C, et al. The challenge of diagnosing Plasmodium ovale malaria in travellers; report of six clustered cases in French soldiers returning from West Africa[J]. Malar J, 2010, 9: 358.

[8] Tordrup D, Virenfeldt J, Andersen FF, et al. Variant plasmodium ovale isolated from a patient infected in Ghana[J]. Malar J, 2011, 10: 15.

[9] De Laval F, Simon F, Bogreau H, et al. Emergence of plasmodium ovale malaria among the French armed forces in the republic of Ivory Coast; 20 years of clinical and biological experience[J]. Clin Infect Dis, 2014, 58(8): 122-128.

[10] Rojo-Marcos G, Rubio-Muñoz JM, Ramírez-Olivencia G, et al. Comparison of imported Plasmodium ovale curtisi and P. ovale wallikeri infections among patients in Spain, 2005-2011[J]. Emerg Infect Dis, 2014, 20(3): 409-416.

[11] 李美, 夏志贵, 汤林华. 卵形疟原虫 wallikeri 亚种及其基因检测体系的研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2014, 32(1): 64-67.

[12] Fuehrer HP, Habler VE, Fally MA, et al. Plasmodium ovale in Bangladesh: genetic diversity and the first known evidence of the sympatric distribution of Plasmodium ovale curtisi and Plasmodium ovale wallikeri in southern Asia[J]. Int J Parasitol, 2012, 42(7): 693-699.

(收稿日期: 2016-01-17 修回日期: 2016-03-20)

(上接第 1955 页)

亚型 21 例 (42.0%), HLA-B2704 亚型 4 例 (8.0%), HLA-B2705 亚型 2 例 (4.0%), 经统计分析, 两组差异有统计学意义 ($P=0.002$)。证实本地区 AS 患者中 HLA-B27 主要亚型分布为 B2704 亚型与 B2705 亚型, 且 B2704 亚型为优势亚型; 而 B2706 亚型及 B2709 亚型仅见于 HLA-B27 阳性健康者, 提示 B2706 亚型及 B2709 亚型为本地区保护亚型。

综上所述, 通过对宝鸡地区 HLA-B27 阳性的患者及健康对照人群 HLA-B27 分型研究, 发现了本地区 HLA-B27 基因主要致病亚型和可能的保护亚型, 对于症状体征不典型患者和疑难患者的诊断和鉴别诊断具有一定价值。但由于检测病例数量有限, 未能涉及本地区 HLA-B27 基因动态表达量与 AS 患者疾病活动指数的相关性, 后续将进一步开展这方面的工作, 为本地区 AS 的防治提供必要的探索。

参考文献

[1] 高风云. HLA-B27 检测应用于强直性脊柱炎的临床意义[J]. 吉林医学, 2012, 33(6): 1164.

[2] Werner S, Alzheimer C. Roles of activin in tissue repair, fibrosis, and inflammatory disease[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2006, 17(3): 157-171.

[3] 李梦远, 姚中强, 刘湘源. HLA-B27 与强直性脊柱炎免疫

学机制的研究进展[J]. 生理科学进展, 2011, 42(1): 16-20.

[4] 李微, 王可鹏, 张广繁. 强直性脊柱炎与 HLA-B27 相关性的理论与实践[J]. 中国实用医药, 2009, 4(10): 101.

[5] Khan MA. HLA-B27 polymorphism and association with disease[J]. J Rheumatol, 2000, 27(5): 1110-1114.

[6] Duangchanchot M, Puapairoj C, Romphruk A, et al. HLA-B*27 subtypes in Northern and Northeastern Thais, Karen, and Bamars determined by a high-resolution PCR-SSP technique[J]. Tissue Antigens, 2009, 73(6): 590-594.

[7] López-Larrea C, Sujirachato K, Mehra NK, et al. HLA-B27 subtypes in Asian patients with ankylosing spondylitis Evidence for new associations[J]. Tissue Antigens, 1995, 45(3): 169-176.

[8] 汪薇, 李志强. HLA-B*27 基因亚型与强直性脊柱炎的相关性研究[J]. 临床输血与检验, 2009, 11(4): 376-379.

[9] 陆君, 汪薇, 李志强. 强直性脊柱炎患者 HLA-B*27 基因亚型及序列研究[J]. 中国输血杂志, 2011, 24(9): 743-745.

(收稿日期: 2016-01-19 修回日期: 2016-03-22)