

文章编号:1000-7423(2014)-01-0054-04

【论著】

浙江省 1 例输血性疟疾病例的溯源调查与诊断

阮卫¹, 雷永良^{2*}, 姚立农¹, 张玲玲¹, 刘晓红², 项晓青³, 梅建华², 朱海博³, 於洋², 曾长佑²

【摘要】 目的 对 1 例感染源不明的疟疾病例进行流行病学溯源调查与实验室检测, 以明确其传播方式和传染源。**方法** 收集该病例临床资料, 并开展流行病学溯源调查。采集患者和疑似传染源(供血者)的血样, 采用血涂片镜检、快速疟疾诊断试剂条(RDT)和巢氏 PCR 等 3 种方法进行检测。**结果** 该患者无疟疾流行区外出史, 因手术输血后, 出现畏寒、发热, 骨髓片和外周血涂片镜检均诊断为恶性疟原虫感染, RDT 检测恶性疟原虫阳性。经溯源调查, 疑似传染源的供血者为非洲务工返乡人员, 在献血前曾有似疟疾样发病, 自行服用抗疟药后参与无偿献血, RDT 检测血站存留血样为恶性疟原虫阳性, 后采集该供血者血样涂片镜检为恶性疟原虫阳性, 将患者血样和供血者血样进一步进行巢式 PCR 检测均为恶性疟原虫阳性, 2 份血样的正反两段 Small subunit rRNA (SSU rRNA) 序列比对相似率均为 100%, 且均为恶性疟原虫 K1 型和 MAD20 型混合感染。**结论** 该病例为输血性恶性疟, 因输入非洲返乡人员的血液而感染恶性疟原虫。

【关键词】 疟疾; 输血; 溯源调查

中图分类号: R532.13

文献标识码: A

Tracing Investigation and Diagnosis of One Transfusion-transmitted Malaria Case in Zhejiang Province

RUAN Wei¹, LEI Yong-liang^{2*}, YAO Li-nong¹, ZHANG Ling-ling¹, LIU Xiao-hong², XIANG Xiao-qing³, MEI Jian-hua², ZHU Hai-bo³, YU Yang², ZENG Chang-you²

(1 Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China; 2 Center for Disease Control and Prevention of Lishui City, Lishui 323000, China; 3 Center for Disease Control and Prevention of Qingtian County, Qingtian 323900, China)

【Abstract】 Objective To identify the sources of infection and the mode of transmission of a malaria case with unknown origin. **Methods** Clinical data of the case were collected and the epidemiological investigation was conducted. The blood samples of the patient and the suspected infection source(blood donor) were detected by microscopy, rapid diagnostic test strip (RDT) and nested PCR. **Results** The patient did not visited malaria endemic areas. After a blood transfusion, the patient had chills and fever, and was confirmed as falciparum malaria by microscopy with bone marrow and peripheral blood smears and RDT. The blood donor was a worker returned from Africa. Before blood donation she was sick like malaria carrier, and took anti-malarial drug. She was then confirmed as falciparum malaria by RDT and microscopy. The blood samples from the patient and the blood donor were diagnosed as falciparum malaria by nested PCR, and the similarity of the small subunit rRNA (SSU rRNA) sequence was 100%, showing they were mix-infected with K1 and MAD20 genotypes of *Plasmodium falciparum*. **Conclusion** This patient is confirmed *P. falciparum* infection via blood transfusion from a donor who returned from Africa.

【Key words】 Malaria; Blood transfusion; Tracing investigation

Supported by the Medical Science and Technology Project of Zhejiang Province (No. 2013KYA041, 2013KYB053)

* Corresponding author, E-mail: ls2123365@126.com

输入含疟原虫的全血或成分血而导致疟原虫感染的报道已有 100 余年历史, 但目前大多数国家未把

疟原虫感染检测作为献血者筛检的必查项目, 因而输血引起的疟疾发病时有发生^[1,2]。1963–1999 年美国因输血传播的疟疾病例共 93 例, 分布在全国的 28 个州^[3]。20 世纪 90 年代, 因输血感染疟原虫而发病是中国较为严重的用血安全问题^[4,5]。近 5 年来, 中国

基金项目: 浙江省医药卫生科技项目 (No. 2013KYA041, 2013KYB053);

作者单位: 1 浙江省疾病预防控制中心, 杭州 310051; 2 丽水市疾病预防控制中心, 丽水 323000; 3 青田县疾病预防控制中心, 青田 323900

* 通讯作者, E-mail: ls2123365@126.com

疟疾疫情得到有效控制, 年报告病例数已在 5 000 例以下, 因输血感染引起疟疾发病的报道逐渐减少^[6]。随着中国经济的不断发展, 输出到疟疾流行较为严重的非洲、东南亚等地经商、务工和旅游的人群也呈持续增长。由于该人群在外对疟疾防范意识不强, 用药不规范, 回国后除部分人员发病外, 仍有一些轻度感染的无症状带虫者未被发现。如果无症状带虫者进行无偿献血, 则可能会导致受血者感染疟原虫, 从而引发输血性疟疾。

2013 年 8 月, 浙江省报告了 1 例无外出史、近期有输血史的恶性疟病例。通过对该病例及相关供血人员的流行病学溯源调查和实验室检测, 确认该病例输入的其中一份血源来自一名非洲返乡人员。现将溯源调查和实验室诊断结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 病例资料 收集该例疟疾患者发病、诊断和治疗过程等相关资料。

1.2 流行病学调查 对该例患者进行流行病学调查, 包括居住地周围情况、外出史和输血史等; 并对可能的传播方式和传染源进行溯源调查, 包括了解所有相关输血源的供血员信息。

1.3 主要试剂和仪器 全血 DNA 抽提试剂盒购自德国 QIAGEN 公司, PCR 反应混合物购自美国 Promega 公司, 琼脂糖、TBE 缓冲液购自生工生物 (上海) 股份有限公司, DNA 标志物购自宝生物工程 (大连) 有限公司, 核酸染料 GelRed 购自美国 Biotium 公司, 快速疟疾诊断试纸条 (RDT) 购自深圳康百得生物科技有限公司。

1.4 方 法

1.4.1 血涂片镜检 采集患者的骨髓、外周抗凝全血及疑似传染源的供血者外周抗凝全血涂制厚薄血片, 干燥、固定后吉氏染色, 镜检疟原虫。

1.4.2 RDT 检测 参照说明书对患者及其供血者的血样进行 RDT 检测。取 5 μ l 全血, 垂直加入检测卡上“加样孔 A”内, 然后在“样品孔 B”上垂直滴加 4 滴裂解液, 15 min 内判读结果。

1.4.3 分子生物学检测 参照文献 [7] 合成疟原虫属特异性引物以及恶性疟原虫、间日疟原虫、三日疟原虫和卵形疟原虫的种特异性引物, 引物分别为 rPLU5/rPLU6、rFAL1/rFAL2、rVIV1/rVIV2、rMAL1/rMAL2 和 rOVA1/rOVA2, 引物由生工生物 (上海) 股份有限公司合成。按全血 DNA 抽提试剂盒说明书提取患者及其供血者血样 DNA。参照文献 [7] 中的方法进行疟原虫巢式 PCR 检测, 产物送生工生物 (上海)

股份有限公司测序。

参照文献 [8] 方法合成恶性疟原虫裂殖子表面蛋白 1 (PfMSP-1) 基因扩增引物序列, 分别为 pfMSP1F/pfMSP1R、K1FK1R、MAD20F/MAD20R 和 RO33F/RO33R, 引物由生工生物 (上海) 股份有限公司合成。应用巢式 PCR 方法对患者及其供血者血样 DNA 中的 PfMSP-1 基因进行分型^[9], 产物送生工生物 (上海) 股份有限公司测序。

2 结 果

2.1 病例描述 患者麻某, 女, 46 岁, 浙江省丽水市缙云县人, 2013 年 7 月 23 日因跌倒导致脑外伤入住当地县人民医院。7 月 24 日行双侧硬膜下脑内血肿消除手术, 期间输入红细胞悬液 1 600 ml、血浆 210 ml。手术后, 患者体温、血常规基本在正常范围。8 月 16 日起, 患者体温突然升高并伴有畏寒, 最高达 39.8 $^{\circ}$ C, 隔日发热。8 月 19 日开始, 患者的血常规出现异常, 白细胞 1.6×10^9 , 中性粒细胞 68.1%、淋巴细胞 23.1%、嗜酸粒细胞 1.9%。血红蛋白 69 g/L, 血小板 69×10^9 /L, C 反应蛋白 106.1 mg/L; 肝功能总蛋白 43.8 g/L, 白蛋白 25.3 g/L, 其他基本正常。8 月 22 日后, 体温基本维持在 38.5 $^{\circ}$ C 左右, 每日发热。经抗感染、退热等治疗后, 体温无明显下降。8 月 27 日转入市级中心医院就诊, 入院后输红细胞 300 ml。8 月 28 日, 市中心医院骨髓涂片检测结果为高度疑似恶性疟原虫感染。8 月 29 日, 市疾病预防控制中心派专家会诊, 采集外周抗凝全血涂片镜检确诊为恶性疟原虫感染。

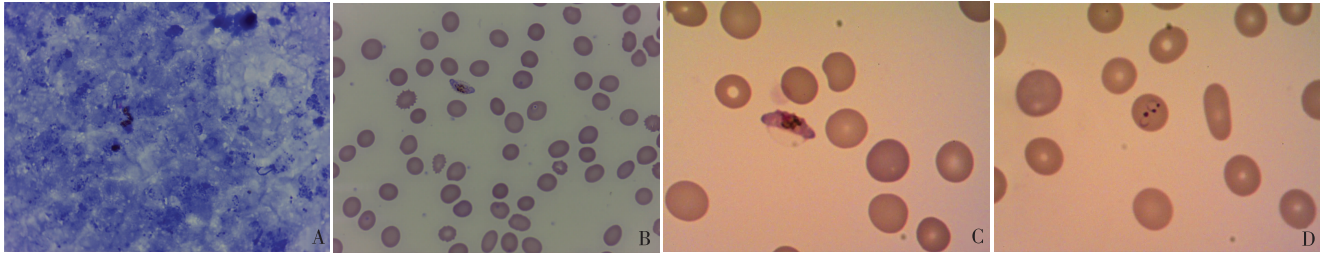
2.2 流行病学溯源调查 患者无疟疾流行区外出史, 本次外伤手术前无输血史, 恶性疟原虫感染方式和传染源均不明确。所居住县属于疟疾流行三类县, 为恶性疟非流行区; 当地传疟媒介为中华按蚊, 近二十年未发现嗜人按蚊、微小按蚊等传播恶性疟的媒介, 多年无恶性疟本地感染病例报告。患者 8 月 16 日出现畏寒、高热前有大量输血史, 故高度怀疑为输血所致的恶性疟原虫感染。

8 月 30 日, 经市疾病预防控制中心多方协调, 从市中心血站调取了 8 份供血者的信息和血样, 对 3 份抗凝全血和 5 份血清进行 RDT 检测, 发现 1 份血样为恶性疟原虫阳性。该阳性血样的供血者为潘某 (女, 21 岁), 为同一地区青田县人。青田县疾病预防控制中心对该献血者进行查找, 并开展流行病学调查和采集抗凝全血。潘某在赤道几内亚生活近 3 年, 于 2013 年 4 月份回国。自诉从回国至献血前曾有发热史, 用非洲带回的青蒿琥酯片治疗后好转, 身体无不适, 于 7 月 11 日左右在青田县义务献血车上无偿献血 300 ml。

2.3 实验室检测结果

2.3.1 病原学检测 市中心医院8月27日在患者骨髓片中找到疟原虫。市疾病预防控制中心8月29日血涂片中找到形态典型的恶性疟原虫环状体和配子体 (图1), 厚血膜中疟原虫密度计数为36 000个/ μl 。疑似传

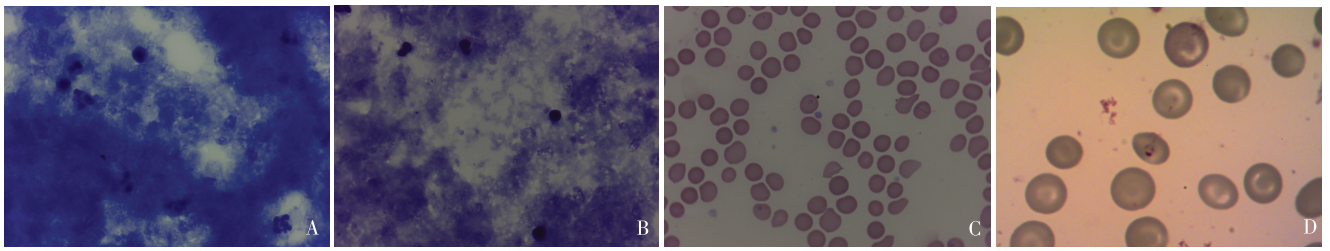
染源的供血者血样 (在血液中心存留) 的厚、薄血涂片上未找到疟原虫。8月30日下午重新采集供血者的血样, 厚、薄血涂片均能找到密度较低、形态典型的恶性疟原虫 (图2), 厚血膜中疟原虫密度计数为240个/ μl 。厚血膜疟原虫密度计数由省疾控中心进行。



A: 厚血膜; B、C、D: 薄血膜。A: Thick blood film; B, C, D: Thin blood film.

图1 患者血片镜检结果 (吉氏染色, $\times 1000$)

Fig.1 Microscopic examination results of patient's blood film (Giemsa staining, $\times 1000$)



A、B: 厚血膜; C、D: 薄血膜。A, B: Thick blood film; C, D: Thin blood film.

图2 供血者血片镜检结果 (吉氏染色, $\times 1000$)

Fig.2 Microscopic examination results of blood donor's blood film (Giemsa staining, $\times 1000$)

2.3.2 RDT检测 患者抗凝全血和血清经RDT检测, 结果均显示恶性疟原虫阳性。对市血液中心存留的8位供血者的3份抗凝全血和5份血清进行RDT检测, 结果显示供血者潘某为恶性疟原虫阳性。对疑似传染源供血者于8月30日重新采集的抗凝血样RDT检测, 结果为恶性疟原虫弱阳性。

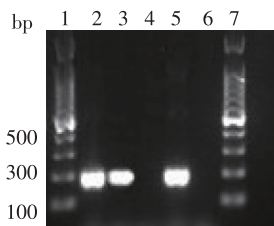
物进行测序, 正反两条SSU rRNA序列经BLAST在线比对, 相似率分别为98%和99%, 去除测序峰图头尾不稳定碱基后, 2份血样的正反两段序列相似率均为100%。

2.3.3 巢式PCR检测 巢式PCR第2轮结果显示, 患者8月29日血样和疑似传染源供血者8月30日血样均扩增出与恶性疟原虫阳性对照一致的条带, 但供血者血库保存的血样未扩增出条带 (图3)。2份PCR阳性产

2.3.4 pfMSP-1基因分型 患者和疑似传染源供血者血样DNA经巢式PCR扩增pfMSP-1基因片段, 均扩增出K1型条带 (约220bp) 和MAD20型条带 (约180bp), 未扩增出RO33型的特异性条带 (图4), 提示患者和供血者均为恶性疟原虫K1型和MAD20型混合感染。

2.4 溯源结果 患者麻某有输入供血者潘某血液史; 两者的血片镜检中均查到恶性疟原虫; 在患者输入的所有血源中, 潘某的库存血样和外周新采集抗凝血经RDT检测为恶性疟原虫感染; 患者麻某和供血者潘某血样的SSU rRNA基因片段相似率为100%; 二者的MSP-1基因分型结果均为恶性疟原虫K1型和MAD20型混合感染。

2.5 治疗和转归 患者麻某, 于8月30日给予青蒿琥酯注射液5日疗法, 60 mg肌注, 每日1次, 首剂加倍; 用药1 d后, 患者体温降至正常; 5 d后给予双氢青蒿素哌喹片 (科泰复), 每片含双氢青蒿素40 mg、磷酸哌喹0.32 g, 4片/d \times 2 d。9月7日出院, 出院时采静脉

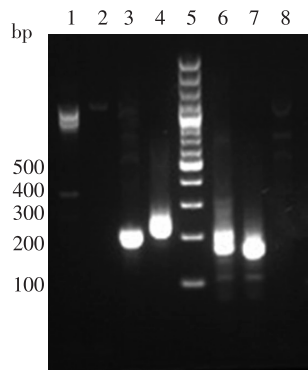


1、7: DNA 标志物; 2: 患者血样; 3: 供血者血样; 4: 供血者库存血样; 5: 阳性对照; 6: 阴性对照。

1, 7: DNA marker; 2: Patient's blood sample; 3: Blood donor's blood sample; 4: Blood donor's blood sample in blood bank; 5: Positive control; 6: Negative control.

图3 巢式PCR第2轮结果

Fig.3 The second round results of nested PCR



M: DNA 标志物; 1, 2: 患者和供血者血样第1轮扩增条带; 3, 4: 患者和供血者血样以K1F/K1R为引物的扩增条带; 5, 6: 患者和供血者血样以MAD20F/MAD20R为引物的扩增条带; 7, 8: 患者和供血者血样以RO33F/RO33R为引物的扩增条带。

M: DNA marker; 1, 2: The first round amplification products of blood samples of patient and donor; 3, 4: The amplified products with K1F/K1R primers; 5, 6: The amplified products with MAD20F/MAD20R primers; 7, 8: The amplified products with RO33F/RO33R primers.

图4 pfMSP-1基因分型结果
Fig. 4 Genotyping results of pfMSP-1 gene

抗凝血2 ml, 经疟原虫巢式PCR检测为阴性; 10月15日随访, 采集滤纸血片, 经疟原虫巢式PCR检测为阴性。供血者潘某, 于8月30日给予科泰复, 4片/d×2 d。3个月后采血制片, 镜检为阴性。

3 讨论

输血除传播艾滋病、肝炎等多种疾病以外^[10], 较为常见的是传播疟疾。输血性疟疾的临床症状与常见的蚊传疟疾基本一致, 表现为周期性发冷、发热、出汗, 并可继发贫血和脾肿大。其传染源多为无症状而又具有免疫力的疟原虫携带者, 对寄生于人体的4种疟原虫, 受血者均可通过输血及其多种血液制品而感染。输血性疟疾通常在原发疾病尚未痊愈时发病, 易被原发疾病的临床特征所干扰, 常不能及时诊断, 并延误有效治疗的时机, 这对免疫功能较低的人群会引起致命的危险。本病例虽未出现严重的症状, 但从出现不明原因发热到明确诊断, 长达12 d。因此, 对输血性疟疾及时诊治至关重要。

输血性疟疾的潜伏期长短与输入的疟原虫数量和受血者的易感性有密切关系, 一般为1周至1个月^[11]。通常情况下, 通过静脉输血的潜伏期较短, 恶性疟发病约为 (10.5 ± 4.9) d^[12]。本病例潜伏期为23 d, 超过文献报道的恶性疟发病最长15.4 d的潜伏期, 这可能是供血者体内原虫密度较低所致。根据实验室检测结果, 供血者库存血仅RDT检测为阳性, 镜检和巢式PCR检测均为阴性; 而8月30日采集的血样检测结果

均为阳性, 说明该供血者在7月12日献血时, 血液中疟原虫密度处于极低水平。这主要是供血者在非洲曾感染过恶性疟原虫, 有一定的免疫力, 受免疫抑制作用, 原虫与机体处于一种相对平衡状态, 即带虫免疫。

我国疟疾流行时期, 与输血相关的疟疾大多是间日疟和三日疟, 供血传染源多为本地疟疾病例。2010年以来, 我国疟疾疫情已得到有效控制, 疟疾正从控制阶段进入到消除阶段。现阶段, 除云南边境等仍有恶性疟本地传播的病例外, 其余省份的恶性疟病例均以境外输入为主。

预防输入性疟疾对血液制品及受血者的危害, 需关注以下方面: 在选择献血者时应认真询问病史, 凡3年内有疟疾史者和脾肿大者均不应作为献血者, 并建议在献血前的常规检查中, 增加疟原虫的检测项目; 其次, 对潜在的献血人群做好健康教育宣传工作, 尤其对高疟区返乡人员需加强输血性疟疾相关知识的宣教, 使更多的人了解从非洲、东南亚等高疟区回国后3年内不能参与无偿献血。

参 考 文 献

- [1] Nahlen BL, Lobel HO, Cannon SE, et al. Reassessment of blood donor selection criteria for United States travelers to malarious areas[J]. Transfusion, 1991, 31(9): 789.
- [2] Dodd RY. Transmission of parasites by blood transfusion[J]. Vox Sang, 1998, 74(2): 161.
- [3] Mungai M, Tegtmeier G, Chamberland M, et al. Transfusion-transmitted malaria in the United States from 1963 through 1999 [J]. N Engl J Med, 2001, 344(26): 1973-1978.
- [4] 曹健, 杨桂启, 张延记. 输血相关疟疾的流行与临床诊治[J]. 中国输血杂志, 1999, 12(1): 51-52.
- [5] 单成启, 张敏, 程远国. 输血性疟疾防治概况 [J]. 热带医学杂志, 2002, 2(4): 384-386.
- [6] 夏志贵, 杨曼尼, 周水森. 2011年全国疟疾疫情分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2012, 30(6): 419-422.
- [7] 汤林华. 输入性疟疾的诊治与管理 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2010: 70-73.
- [8] Lopez AC, Ortiz A, Coello J, et al. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* in Honduras [J]. Malar J, 2012, 11: 391.
- [9] Schoepflin S, Valsangiacomo F, Lin E, et al. Comparison of *Plasmodium falciparum* allelic frequency distribution in different endemic settings by high-resolution genotyping[J]. Malar J, 2009, 8: 250.
- [10] 姚立农, 阮卫, 曾长佑, 等. 1例人感染巴贝虫的诊断与病原体鉴定 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2012, 30 (2): 118-121.
- [11] 王水邦, 季阳, 陈怀录. 输血与疟疾 [J]. 实用寄生虫病杂志, 1994, 2(1): 41-42.
- [12] 卞茂红, 吴基. 输血性疟疾防治研究进展 [J]. 临床输血与检验, 2002, 4(1): 68-70.

(收稿日期: 2013-11-20 编辑: 衣凤芸)