

沉积, 泡球蚴组织缺乏能够清除碘油的单核巨噬细胞系统和淋巴系统。碘油能够携带阿苯达唑进入泡球蚴组织内, 缓慢释放阿苯达唑, 发挥持续化疗作用。并且碘油颗粒存留于泡球蚴组织能够阻断营养供给, 发挥部分栓塞作用, 加速泡球蚴组织的缺血坏死或钙化。

此外, 治疗过程中死亡 3 只大鼠。提示本实验门静脉主干直接穿刺法对大鼠肝功能损害较大, 进一步实验可选择大动物模型以超选择插管至供养泡球蚴病灶的门静脉分支血管, 以最大限度提高泡球蚴病灶药物浓度, 并可保护正常肝脏组织。门静脉灌注阿苯达唑脂质体的体内药物代谢动力学, 肝动脉与门静脉的双重介入化疗栓塞治疗有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Mantion G, Bresson-Hadni S, Vuitton DA, *et al.* Treatment of alveolar echinococcosis: a multidisciplinary task [J]. Bull Acad Natl Med, 2008, 192(6): 1151-1157.
- [2] Parsak CK, Demiryurek HH, Inal M, *et al.* Alveolar hydatid disease: imaging findings and surgical approach[J]. Acta Chirurgica Belgica, 2007, 107(5): 572-577.
- [3] Bresson-Hadni S, Blagosklonov O, Knapp J, *et al.* Should possible recurrence of disease contraindicate liver transplantation in patients with end-stage alveolar echinococcosis? A 20-year follow-up study[J]. Liver Transpl, 2011, 17(7): 855-865.
- [4] 唐群科, 张瑛, 李永寿, 等. 肝泡球蚴病的非根治性手术治疗观察[J]. 中国地方病学杂志, 2009, 28(6): 668-669.
- [5] Brunetti E, Kern P, Vuitton DA, *et al.* Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans[J]. Acta Trop, 2010, 114(1): 1-16.
- [6] Eckert J, Gemmell MA, Meslin FX, *et al.* WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern[J]. Parasitology, 2001, 123(6): 265.
- [7] 蒋次鹏. 包虫病学[M]. 北京: 台海出版社, 2001: 121-123.
- [8] 刘章锁, 杨文光, 温浩, 等. 阿苯达唑脂质体对泡状棘球蚴作用的病理形态学观察[J]. 新疆医科大学学报, 2000, 23(4): 192-194.
- [9] 樊玉祥, 任伟新, 迪理木拉提·巴吾冬, 等. DSA 评价大鼠肝泡状棘球蚴病血供[J]. 中国介入影像与治疗学, 2012, 9(1): 37-40.
- [10] 任伟新, 肖湘生, 陈鹏, 等. 肝泡状棘球蚴病的 DSA 表现及介入治疗[J]. 介入放射学杂志, 2004, 13(6): 496-498.
- [11] 张金辉, 温浩, 栾梅香, 等. 阿苯达唑新剂型抗包虫病的药效学实验研究[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2003, 16(3): 162-166.
- [12] Rodrigues JM Jr, Bories C, Emery I, *et al.* Development of an injectable formulation of albendazole and *in vivo* evaluation of its efficacy against *Echinococcus multilocularis* metacestode [J]. Int J Parasitol, 1995, 25(12): 1437-1441.
- [13] Adas G, Arikan S, Kemik O, *et al.* Use of albendazole sulfoxide, albendazole sulfone, and combined solutions as scolicidal agents on hydatid cysts (*in vitro* study)[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(1): 112-116.

(收稿日期: 2013-04-09 编辑: 衣凤芸)

文章编号: 1000-7423(2014)-01-0061-03

【研究简报】

河南省 3 例输入性三日疟的诊治分析

邓艳, 周瑞敏, 张红卫*, 钱丹, 刘颖, 陈伟奇, 赵旭东

【摘要】 采用吉氏染色镜检、CareStart™ 疟疾快速诊断试剂盒和巢式 PCR 等 3 种方法, 对 2011 年河南省 3 例自安哥拉和赤道几内亚归国的三日疟患者血样进行检测。2 例自安哥拉归来的患者分别于回国后 15 d 和 27 d 发病; 另 1 例患者曾在赤道几内亚发病, 归国 2 个月后再次发病。3 例患者均有发热、头痛和畏寒等症状, 但发热规律不典型。2 例患者出现总胆红素升高、脾大等临床表现。3 例患者镜检均可见典型的三日疟原虫形态, 巢式 PCR 检测均扩增出与三日疟预期一致的特异性条带, 但 CareStart™ 疟疾快速诊断试剂盒检测结果均为阴性, 3 例患者均经复方青蒿素类药物 (ACT) 治愈。

【关键词】 输入病例; 三日疟; 诊断; 治疗; 巢式 PCR

中图分类号: R382.31 文献标识码: B

Diagnosis and Treatment for Three Imported *Plasmodium malariae* Malaria Cases in Henan Province

DENG Yan, ZHOU Rui-min, ZHANG Hong-wei*, QIAN Dan, LIU Ying, CHEN Wei-qi, ZHAO Xu-dong

(Henan Center for Disease Control and Prevention, Zhengzhou 450016, China)

【Abstract】 Giemsa-stained blood film microscopy, CareStart™ rapid detection and PCR were used to detect the

基金项目: 河南省科技攻关计划项目 (No. 092102310007)

作者单位: 河南省疾病预防控制中心, 郑州 450016

* 通讯作者, E-mail: zhwei69@163.com

three cases who returned from Angola and Equatorial Guinea to Henan Province. Onset of malaria symptoms for two patients occurred 15 d and 27 d after their return from Angola, respectively. Two months after returning home, another case relapsed who had suffered from malaria in Equatorial Guinea. All three patients had the symptoms such as irregular fever, headache, chills and so on. Two cases had elevated total bilirubin and splenomegaly. The cases were confirmed as *P. malariae* infection by microscopic morphological examination. Amplified bands were produced by 18S rRNA nested PCR, which was the same with *P. malariae* in size, whereas the results of CareStart™ repaid detection test were all negative. They were cured by using artemisinin-based combination therapy (ACT).

【Key words】 Imported case; *Plasmodium malariae*; Diagnosis; Treatment; Nested polymerase chain reaction

Supported by Science and Technology Project of Henan Province (No.092102310007)

* Corresponding author, E-mail: zhwei69@163.com

三日疟原虫主要分布于热带和亚热带地区，特别是非洲东部和西部^[1]，在中国疟疾流行区呈散发，较为少见。20 世纪 80 年代以来，广东、湖北、广西、四川和云南等地相继出现由输血引起的三日疟病例^[2]。近年来仅云南^[3]、广东^[4]、湖南^[5]、中缅边境^[6]和福建^[7]发现个别当地感染或输入性病例。河南省 20 世纪 60 年代曾在信阳和南阳地区发现三日疟病例^[8]，此后未见报道。本文应用病原学和分子生物学方法对 2011 年河南省 3 例输入性三日疟病例进行了确诊，并对其诊疗过程进行了整理和分析。

1 材料与方 法

1.1 病例资料 3 例患者均为男性，35~38 岁，出国前均未患过疟疾，无其他传染病、慢性病和遗传病史。病例 1 和 2 自安哥拉归来，分别于回国后 15 d 和 27 d 发病；病例 3 曾在赤道几内亚发病，归国 2 个月后再次发病。3 例患者均有发热、头痛和畏寒等症状，但发热规律不典型。当地县疾病预防控制中心采集患者外周血制作厚、薄血膜和 Whatman903 滤纸血各 2 张。采集患者静脉血 2 ml，乙二胺四乙酸 (EDTA) 抗凝，-20℃ 保存。

1.2 主要试剂和仪器 CareStart™ 疟疾快速诊断试剂盒购自美国 Access Bio 公司，核酸提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司，PCR Master Mix 购自美国 Promega 公司，凝胶成像系统为美国 Bio-Rad 公司产品。

1.3 吉氏染色镜检 厚、薄血膜经吉氏染色镜检，通过疟原虫在红细胞内形态鉴别别种，计数 200 个以上白细胞，计算疟原虫密度 (按照 8 000 个白细胞/μl 计算)。

1.4 CareStart™ 疟疾快速诊断试剂盒检测 用 CareStart™ 疟疾快速诊断试剂盒对患者血样进行检测，按使用说明操作，并对结果进行判断。

1.5 巢式 PCR 检测 用核酸提取试剂盒提取滤纸血中疟原虫基因组 DNA，按照说明书操作。参照文献 [9] 的方法，合成针对疟原虫 18S rRNA 属特异性引物和 4 种疟原虫种特异性引物，第 1 轮引物为 rPLU5: 5'-CCTGTGTGCTTAAACTTC-3'，rPLU6: 5'-TTAAATTCGTGACGTTAAACG-3'，预计片段大小为 1 200 bp，第 2 轮引物见表 1，引物均由上海生工生物工程有限公司合成。反应体系：2×PCR Master Mix 10 μl，上、下游引物 (10 μmol/μl) 各 0.6 μl，模板 DNA (50 ng/μl) 2 μl (第 1 轮)，用 ddH₂O 补至 20 μl。反应条件：94℃ 3 min；94℃ 30 s，58℃ 30 s，72℃ 60 s，共 35 个循环；72℃ 5 min。第 1 轮 PCR 产物 1 μl 为第 2 轮模板 DNA，反应体系和反应条件相

表 1 巢式 PCR 引物及其扩增片段长度

疟原虫种类	引物序列 (5'-3')	产物长度/bp
恶性疟原虫	TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC	205
间日疟原虫	CGTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA	117
三日疟原虫	ATAACATAGTTGTCAGTTAAGAATAACCGC AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA	144
卵形疟原虫	ATCTCTTTTGCTATTTTTAGTATTGGAGA GGAAAAGGACACATTAATTGTATCCTAGTG	787

同。2%琼脂糖凝胶电泳鉴定第 2 轮 PCR 扩增产物，凝胶成像系统观察结果。

2 结 果

2.1 基本情况 3 例患者临床症状均有畏寒、发热和出汗退热等疟疾典型症状，除病例 1 发热间隔时间约为 48 h，其余无明显发热规律，发热最高病例 40.6℃。患者多有头痛，病例 1 有腰膝关节痛，且热退后膝关节疼痛持续数月方自愈。病例 2 合并上呼吸道感染；查体结果，除病例 1 巩膜有轻度黄染外，其余无明显阳性体征。

2.2 辅助检查 B 超显示，病例 1 和 2 脾脏轻度肿大；肝功能总胆红素分别为 28.4 μmol/L 和 20 μmol/L，提示轻度黄疸。血常规检查，病例 1 贫血 (血红蛋白 3.8×10¹²/L) 伴血沉增高 (35 mm/h) 和巨细胞病毒抗体弱阳性，病例 2 血小板减少 (35×10⁹/L) 伴尿蛋白++。病例 1 和 3 分别在省级医院和市级疾病预防控制中心进行疟原虫检测，但均未检出三日疟原虫，后将患者血样送至河南省疾病预防控制中心复查后确诊。病例 2 直接前往河南省疾病预防控制中心就诊，诊断为三日疟。病例 1、2 和 3 从发病到确诊时间间隔分别为 15、5 和 75 d。

2.3 镜检结果 3 例患者的血涂片均观察到典型的三日疟原虫形态，滋养体胞质深蓝色，多数呈圆形，偶有带状，环粗壮，疟色素呈深褐色粗大颗粒状，多分布于虫体边缘，被寄生的红细胞不胀大 (图 1)。病例 1、2 和 3 的疟原虫密度分别为 1 872/μl、2 400/μl 和 3 886/μl。

2.4 快速诊断结果 3 例患者血样均只在 C 区 (质量控制区) 出现一条色带，结果判读均为阴性。

2.5 巢式 PCR 检测结果 PCR 扩增结果显示，3 例患者血样在约 140 bp 处出现条带，与三日疟原虫预期片段大小相符，恶性疟原虫、间日疟原虫和卵形疟原虫引物均未扩增出相应条带 (图 2)。

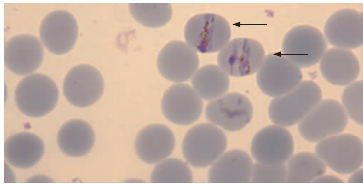
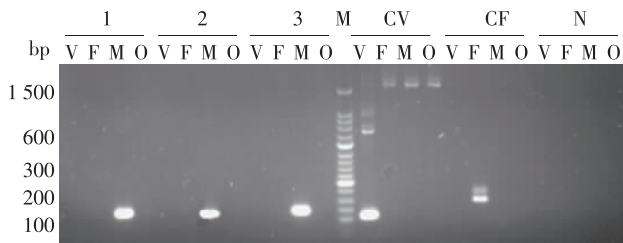


图 1 病例 1 红细胞内三日疟原虫滋养体 (吉氏染色, $\times 1000$)



1: 病例 1; 2: 病例 2; 3: 病例 3; V: 间日疟原虫引物; F: 恶性疟原虫引物; M: 三日疟原虫引物; O: 卵形疟原虫引物; CV: 间日疟原虫; CF: 恶性疟原虫; N: 阴性对照。

图 2 巢式 PCR 检测结果

2.6 治疗与转归情况 病例 1 与病例 2 应用双氢青蒿素哌喹 (每片含双氢青蒿素 40 mg 和磷酸哌喹 0.32 g) 进行治疗, 2 片/次, Bid $\times 2$ d 为 1 疗程, 半月后照此方案重复治疗。病例 3 应用青蒿琥酯静脉注射, 60 mg/次, qd $\times 7$ d 为 1 疗程, 半月后加服双氢青蒿素哌喹片重复治疗 1 疗程。3 例患者至 2012 年 8 月随访时均未出现再燃。

3 讨论

近年来河南省本地感染的疟疾病例大幅下降, 但输入性疟疾病例数逐年增加, 2011 年河南省共报告输入性疟疾病例 145 例, 死亡 2 例, 77.9% 系自非洲归国人员, 并首次在河南省疾病预防控制中心检出了较为罕见的三日疟 3 例和卵形疟 1 例^[10], 说明该省近年来实施的“两封信一承诺”(即“致赴非洲、东南亚等疟疾高发区人员的一封信”, “致全省医疗卫生机构临床医生的一封信”和乡防保医生承诺将对本辖区自高疟区归国发热病人及时进行疟疾排查)是十分必要的。

本组 3 例患者均有寒战、间歇性发热和大汗等临床症状, 但发病初期症状不典型, 因此对于自疫区归来的发热患者, 无论有无典型症状, 均应考虑为疟疾的可能。三日疟的致病性虽没有恶性疟严重, 但检测结果显示患者肝、肾等脏器已有不同程度的病理损伤, 及时确诊和治疗非常重要。国家卫生与计划生育委员会关于抗疟药使用原则和用药方案(2009 年修订稿)中认为三日疟可以参照间日疟的治疗方案, 刘慧等^[11]应用青蒿琥酯与磷酸哌喹伍用治疗三日疟患者 2 例效果很好。本组 3 例患者均采用青蒿素类药物进行治疗, 并在第 1 疗程结束后的 15 d 增加 1 个疗程青蒿素类复合制剂的抗再燃治疗, 疗效佳, 但三日疟病例使用青蒿素类药物治疗是否适宜有待进一步论证。同时鉴于三日疟原虫在人体存活时间较长^[12], 建议进行长期随访。

因大多数检验人员对三日疟原虫和卵形疟原虫镜下形态不熟悉, 加之患者服用多种药物的影响, 给临床诊断带来很大困难, 其感染率可能被低估^[13]。本组 2 例患者首诊时检验人员均

未能从血涂片中发现三日疟原虫, 加之 CareStartTM 疟疾快速诊断试剂盒检测结果为阴性, 极易做出错误判断, 因此应重视和加强对罕见疟原虫镜检技能的培训。疟疾快速检测技术已在疟疾的诊断和研究中得到广泛应用^[14], 镜检水平较低的基层医疗卫生机构更是把它作为重要的疟疾检测手段。CareStartTM 疟疾快速诊断试剂盒主要针对恶性疟设计, Heutmekers 等^[15]对其效果的评估表明, 其对恶性疟的敏感性达 94.7%, 但对三日疟的敏感性仅为 31.9%。本文 3 例血样的检测结果均为阴性, 因此医疗卫生机构不能过于依赖快速诊断技术, 其结果阴性时仍应结合病史、临床表现和血片镜检结果, 必要时通过分子生物学技术进行综合诊断。周水茂等^[16]应用巢式 PCR 技术对输入性恶性疟和间日疟进行监测, 认为该法适合疟疾流行病学调查和血检质量的监控, 其对三日疟等罕见疟疾的诊断也有很高的应用价值。

参 考 文 献

- [1] Sitalakshmi S, Srikrishna A, Damodar P. *Plasmodium malariae* malaria—a case report[J]. Indian Med Assoc, 2005, 103(10): 547-550.
- [2] 刘建桐. 国内输血性三日疟病例分析[J]. 哈尔滨医药, 2001, 21(3): 38-39.
- [3] 王加志, 刘慧, 李新和, 等. 云南腾冲县内源型三日疟 1 例[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2009, 27(6): 475-482.
- [4] 郑木平. 深圳市疟疾报告 [J]. 广东医学院学报, 1996, 14(4): 366.
- [5] 张传禄, 张权义, 段绩辉, 等. 湖南省桂阳县三日疟调查分析 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2004, 17(2): 105.
- [6] 李春富, 刘慧, 聂仁华, 等. 缅甸佤邦北部萨尔温江流域 5 例三日疟病例报告[J]. 中国热带医学, 2008, 8(12): 2125.
- [7] 李莉莎, 谢汉国, 欧阳榕, 等. 福建输入性三日疟 1 例报告[J]. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21(5): 442.
- [8] 许隆祺, 余森海, 徐淑惠. 中国人体寄生虫分布与危害 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 75.
- [9] 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.
- [10] 陈伟奇, 苏云普, 邓艳, 等. 河南省 2011 年输入性疟疾疫情分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2012, 30(5): 387-390.
- [11] 刘慧, 李春富, 聂仁华, 等. 青蒿琥酯与磷酸哌喹伍用治疗三日疟 2 例[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2009, 21(2): 135.
- [12] 张传禄, 张权义, 段绩辉, 等. 湖南省桂阳县三日疟调查分析 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2004, 17(2): 105.
- [13] Zhou M, Liu Q, Wongsrichanalai C, et al. High prevalence of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* in malaria patients along the Thai-Myanmar border, as revealed by acridine orange staining and PCR-based diagnoses [J]. Trop Med Int Health, 1998, 3(4): 304-312.
- [14] Nzeyimana I, Henry MC, Dossou-Yovo J, et al. The epidemiology of malaria in the southwestern forests of the Ivory Coast(Tai region)[J]. Bull Soc Pathol Exot, 2002, 95(2): 89-94.
- [15] Heutmekers M, Gillet P, Maltha J, et al. Evaluation of the rapid diagnostic test CareStart pLDH Malaria (PF-pLDH/pan-pLDH) for the diagnosis of malaria in a reference setting[J]. Malar J, 2012, 11(1): 204.
- [16] 周水茂, 王重新, 吴凯陈, 等. 巢式 PCR 技术在输入性疟疾监测中的应用 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2011, 29(1): 43-45.

(收稿日期: 2013-03-11 编辑: 衣凤芸)