

文章编号: 1000-7423(2014)-04-0316-02

## 荧光定量 PCR 确诊 1 例输入性恶性疟病例

曾永, 蔡爱红, 朱海博, 倪晓媚, 柯珍

**【提要】** 采用镜检法和荧光定量 PCR 法对青田县 1 例输入性疟疾患者血样进行检测。镜检结果显示, 患者血样的薄、厚血片中均发现恶性疟原虫, 但其原虫密度均较低, 为 240 个/ $\mu\text{l}$  血; PCR 结果显示, 该血样恶性疟原虫特异性 DNA 片段阳性, 确诊为恶性疟原虫感染。

**【关键词】** 输入性疟疾; 恶性疟原虫; 镜检; 荧光定量 PCR; 诊断

中图分类号: R531.32 文献标识码: B

## Diagnosis of an Imported *Falciparum* Malaria Case by Fluorescence Quantitative PCR

ZENG Yong, CAI Ai-hong, ZHU Hai-bo, NI Xiao-mei, KE Zhen

(Center for Disease Control and Prevention of Qingtian County, Zhejiang Province, Qingtian 323900, China)

**【Abstract】** The whole blood sample from a patient with imported falciparum malaria was tested by microscopic examination and fluorescence quantitative PCR. Microscopic examination results showed that *Plasmodium falciparum* parasites were found in the thick and thin blood films with a low parasite density of 240 parasite/ $\mu\text{l}$  of blood. The specific DNA fragment of *P. falciparum* was amplified by fluorescence quantitative PCR, and this case was further confirmed as *P. falciparum* infection.

**【Key words】** Imported malaria; *Plasmodium falciparum*; Microscopic examination; Fluorescence quantitative PCR; Diagnosis

疟疾是严重危害人类健康的重要虫媒传染病。据 WHO 统计, 2012 年约有 2.07 亿疟疾病例, 估计导致 62.7 万人死亡, 多数疟疾病例和死亡发生在撒哈拉以南非洲<sup>[1]</sup>。近年来, 随着人群流动性增强和劳务输出人数的不断增加, 中国输入性疟疾病例呈逐渐上升趋势, 且由于诊断不及时导致疟疾流行和因治疗不及时导致死亡也时有发生<sup>[2]</sup>。因此, 建立正确有效的诊断方法、及时诊断和治疗对有效控制疟疾的流行和挽救生命具有重要意义。WHO 将发展准确且快速的疟疾诊断技术作为防治疟疾优先考虑的对策之一<sup>[3]</sup>。本研究采用荧光定量 PCR 检测了 1 例输入性疟疾患者的血样, 并以镜检法检测结果作对比进行分析, 现将结果报告报道如下。

### 1 分析对象与方法

**1.1 病例资料** 患者, 女, 23 岁, 浙江省青田县人, 服务员, 于 2013 年 4 月从非洲赤道几内亚回国一直在待在家中, 7 月 15 日出现畏寒、头晕、头痛、口渴、腹泻并间隔发热。于 8 月 16 日至当地县人民医院内科就诊, 体温 37.9 °C, 有头痛等症状。实验室检查: 白细胞  $7.2 \times 10^9/\text{L}$ , 嗜酸性粒细胞 1.0%, 红细胞  $2.59 \times 10^{12}/\text{L}$ , 血红蛋白  $5.5 \times 10^9/\text{g}$ ; 血涂片镜检未查见疟原虫。以感冒治疗 5 d 后未见好转。于 8 月 21 日再次至县人民医院内科就

诊, 医生建议至青田县疾病预防控制中心作疟疾筛查。县疾病预防控制中心采血后镜检并用荧光定量 PCR 进行检测, 并询问既往史。

### 1.2 方法

**1.2.1 主要试剂和仪器** DNA 提取试剂盒 (QIAamp DNA Mini and Blood Mini Kit) 购自德国 QIAGEN 公司, 疟原虫总型 (*Plasmodium* spp.)、卵形疟原虫 (*P. ovale*)、间日疟原虫 (*P. vivax*)、恶性疟原虫 (*P. falciparum*) 和三日疟原虫 (*P. malariae*) real-time PCR 试剂盒购自上海之江生物科技股份有限公司 (广东出入境检验检疫局研制)。LC480 荧光定量 PCR 仪为德国 Light Cycler 公司产品。

**1.2.2 血涂片镜检** 参考全国临床检验操作规程<sup>[4]</sup>, 取患者血样 50  $\mu\text{l}$ , 涂制薄、厚血片, 干燥、固定后, 用吉氏染液染色, 高倍镜下 ( $\times 1000$ ) 观察血涂片, 薄血片观察至少 200 个视野, 厚血片观察 20 个视野, 以未观察到疟原虫作为阴性。同时计数虫体密度<sup>[5]</sup>, 疟原虫密度 = 疟原虫数 / 白细胞数  $\times$  血中白细胞数 /  $\mu\text{l}$ 。

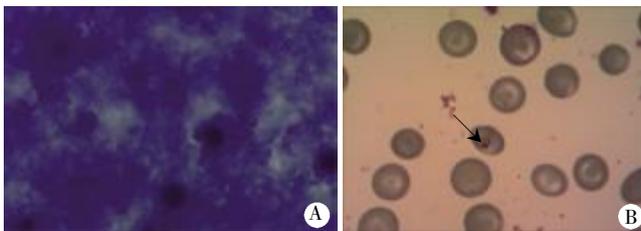
**1.2.3 荧光定量 PCR 检测** 用 DNA 提取试剂盒说明书提取疟原虫基因组 DNA。荧光定量 PCR 反应总体积 40  $\mu\text{l}$ , 包括荧光 PCR 检测混合液 35.6  $\mu\text{l}$ 、酶 (*Taq*+*UNG*) 0.4  $\mu\text{l}$  和 DNA 模板 4  $\mu\text{l}$ , 同时分别以 DEPC H<sub>2</sub>O 和试剂盒内的阳性质粒标准品作为阴性和阳性对照。反应条件: 37 °C 2 min, 94 °C 2 min, 93 °C 15 s, 60 °C 60 s, 共 40 个循环。选择 FAM 荧光通道, 在 60 °C 单点荧

光检测。

## 2 结果

**2.1 流行病学史** 患者于2010年3月至非洲赤道几内亚当百货销售营业员,期间有2~3次疟疾发病,当地医院予以青蒿琥酯片治疗。回国后也曾有发热史,用非洲带回的青蒿琥酯片治疗,症状有好转。

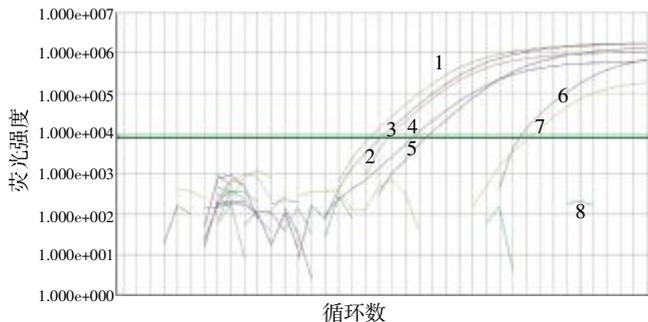
**2.2 镜检结果** 薄、厚血片镜下均可见被寄生的红细胞大小正常、呈圆形,疟原虫环状滋养体,虫体胞浆蓝色,形态与恶性疟原虫相符,其密度较低,厚血膜中疟原虫密度计数约240个/ $\mu\text{l}$  (图1)。



A: 厚血膜; B: 薄血膜 (↑环状体)。

图1 患者血涂片镜检结果 (吉氏染色,  $\times 1000$ )

**2.3 荧光定量PCR结果** 结果显示,该患者血样为恶性疟原虫特异性DNA片段阳性,其他疟原虫特异性DNA片段阴性 (图2)。



1: 间日疟原虫阳性对照; 2: 疟原虫总型阳性对照; 3: 恶性疟原虫阳性对照; 4: 卵形疟原虫阳性对照; 5: 三日疟原虫阳性对照; 6: 疟原虫总型 (患者血样); 7: 恶性疟原虫 (患者血样); 8: 阴性对照。

图2 患者血样荧光定量PCR检测结果

**2.4 治疗与转归** 诊断为恶性疟,给予双氢青蒿素哌喹片 (科泰复),每片含双氢青蒿素40 mg和磷酸哌喹0.32 g,4片/d $\times$ 2d,同时患者凝血送浙江省疾病预防控制中心复核。3个月后患者采血复查,镜检恶性疟原虫为阴性。

## 3 讨论

镜检疟原虫是疟疾确诊的金标准,但该方法易受染液的质量、染色时间,以及镜检人员专业水平等因素的影响。在实际工作中,原虫密度较低或服用抗疟药的患者血样镜检时容易漏诊。2012年全国寄生虫病防治技术竞赛疟原虫检测能力考评结

果显示,参与考评人员的镜检平均得分率为53.4%<sup>[6]</sup>,较2011年的44.6%<sup>[7]</sup>有所提高,但镜检成绩仍不理想,一方面提示镜检人员的技术水平有待进一步提高,另一方面提示建立灵敏度较高的分子生物学检测方法非常紧迫。本研究中,患者曾在当地县医院就诊时曾进行血涂片镜检,但结果为阴性。可能与曾有自行服药史有关,也可能是镜检人员技术水平原因。

荧光定量PCR法具有很高的敏感性、特异性和重复性,对恶性疟原虫的检测下限为0.1713个/ $\mu\text{l}$ 血<sup>[8]</sup>,且所需时间较短,实现高通量样本检测,且能进行疟原虫分型<sup>[9]</sup>。

青田县是中国著名的华侨之乡,现有海外华侨达28万之多,分布在世界100多个国家和地区。该县地处浙江省东南部,亚热带季风气候,气候温暖湿润,曾是疟疾的老疫区,经多年积极防治,于1992年达到省级“基本消灭”标准。但近年来,随着国家经贸往来频繁和侨人群体流动性增加,输入性疟疾病例不断上升。2012年浙江省共报告疟疾140例,其中境外输入病例137例<sup>[10]</sup>,该县共报告境外输入病例17例,恶性疟病例10例,间日疟病例5例,卵形疟病例2例。王芝芳等<sup>[11]</sup>调查结果显示,赴非洲务工的归国人员有既往疟疾史的比例高达90.83%。输入性疟疾的防治形势较严峻,加上传统镜检方法检出率低,增加了诊治难度。本研究用荧光定量PCR确诊了疟原虫密度较低的病例,为及时诊治提供了有效信息。因此对赴非洲返乡的华侨人群中不明原因发热的患者,除进行常规血涂片镜检外,建议结合荧光定量PCR检测,以提高诊断效率。

## 参 考 文 献

- [1] World Health Organization. World Malaria Report [R]. Geneva: World Health Organization, 2013.
- [2] 刘君, 史蕾, 刘春芳. 出入境人员疟疾流行现状及防控措施[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2011, 34(6): 488-492.
- [3] 朱素娟, 金行一, 徐卫民, 等. 杭州市疟原虫镜检人员实践能力调查[J]. 中国病原生物学杂志, 2008, 3(1): 52, 71.
- [4] 中华人民共和国卫生部医政司. 全国临床检验操作规程 [M]. 3版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 242-243.
- [5] Greenwood BM, Armstrong JR. Comparison of two simple methods for determining malaria parasite density[J]. Tran R Soc Trop Med Hyg, 1991, 85(2): 186-188.
- [6] 张少森, 夏志贵, 尹建海, 等. 2012年全国寄生虫病防治技术竞赛成绩分析报告: I. 疟原虫检测能力考评结果分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2013, 31(2): 131-134.
- [7] 付青, 李石柱, 王强, 等. 2011年全国寄生虫病防治技术竞赛成绩分析报告II疟原虫检测能力分析 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2012, 24(3): 274-278.
- [8] Perandin F, Manca N, Calderaro A, et al. Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(3): 1214-1219.
- [9] 李轲, 周水森, 黄芳, 等. 3种PCR方法检测低密度恶性疟原虫血症的比较研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2013, 8(4): 331-335.
- [10] 夏志贵, 丰俊, 周水森. 2012年全国疟疾疫情分析 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2013, 31(6): 413-418.
- [11] 王芝芳, 张希玉, 曲文勇, 等. 赴非洲返回劳务人员疟疾发病调查与控制措施[J]. 中国病原生物学杂志, 2009, 4(7): 541-542, 555.

(收稿日期: 2014-01-15 编辑: 张争艳)