

文章编号: 1000-7423(2006)-04-0273-04

【论著】

自然感染诺氏疟原虫患者血片样本 PCR 鉴定

郑徽^{1,2}, 朱淮民^{1*}, 宁北芳¹, 李翔宇¹

【摘要】 目的 对云南省 1 例诊断为“间日疟”患者血片中形态不典型的疟原虫种进行分子生物学鉴定。方法 分别抽提待鉴定血片和已知感染虫种的 4 种疟原虫(间日疟原虫、恶性疟原虫、诺氏疟原虫、食蟹猴疟原虫)血片疟原虫基因组 DNA, 再根据疟原虫小核糖体亚基(SSU rRNA)序列合成疟原虫属特异性引物, 以及恶性疟原虫、间日疟原虫、诺氏疟原虫种特异性引物, 然后对包括待鉴定血片在内的疟原虫 DNA 分别进行 PCR 鉴定。结果 用诺氏疟原虫特异性引物从待鉴定血片 DNA 中扩增出约 150 bp 条带, 测序结果表明该序列与诺氏疟原虫 SSU rRNA 序列完全一致。结论 云南省该例疟疾患者感染了猴疟原虫——诺氏疟原虫。

【关键词】 诺氏疟原虫; 人体自然感染; SSU rRNA

中图分类号: R382.313

文献标识码: A

Molecular Identification of Naturally Acquired Plasmodium knowlesi Infection in a Human Case

ZHENG Hui^{1,2}, ZHU Huai-min^{1*}, NING Bei-fang¹, LI Xiang-yu¹

(1 Department of Etiological Biology, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2 Department of Nephrology, No.101 Hospital of PLA, Wuxi 214000, China)

【Abstract】 Objective To confirm the diagnosis of a human case with atypical vivax-malaria from Yunnan Province by molecular technique. Methods DNA was extracted from blood films of unidentified sample, and of four known Plasmodium species (*P. vivax*, *P. falciparum*, *P. knowlesi*, and *P. cynomolgi*). A DNA-based diagnosis with the polymerase chain reaction (PCR) method targeting the small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) genes of genus- and species-specific (two human malaria species and *P. knowlesi*) was introduced. Results The PCR amplification with primer pair specific for *P. knowlesi* produced a single fragment of 150 bp. Sequence analysis showed that the amplified fragment was identical to the sequence of *P. knowlesi*. Conclusion The patient was naturally infected with *P. knowlesi*.

【Key words】 Plasmodium knowlesi; Natural infection; Human; SSU rRNA

Supported by the Department of Science and Technology, “Construction of Platform for Natural Resources” (No. 2004DKA30480, 2005DKA21104)

* Corresponding author, E-mail: zhuhm22@yahoo.com

一般认为, 感染人类的疟原虫有恶性疟原虫、间日疟原虫、卵形疟原虫及三日疟原虫。近来, Jongwutiwes 等^[1]和 Singh 等^[2]分别报道泰国和马来西亚多例灵长类疟原虫(诺氏疟原虫)感染人类的病例, 这一情况将使疟疾防治工作更加复杂化。作者在复习采自云南省的 1 例被诊断为“间日疟”患者血片时, 发现其形态特别, 疑似恶性疟原虫与三日疟原虫混合感染, 后经查阅文献发现与泰国报道的感染人体的诺氏疟原虫形态相似^[1,2], 同时根据患者的病史情况, 高度怀疑该例疟疾病人是感染了灵长类疟原虫^[3]。

疟原虫小核糖体亚基(SSU rRNA)通常用来分析不同种疟原虫基因组差异的保守序列^[4]。为了明确该血片上疟原虫种类, 作者根据 SSU rRNA 序列分别合成了疟原虫属、种特异性引物, 对血片上疟原虫 DNA 进行 PCR 鉴定。

材料与方法

1 待鉴定疟原虫薄血片

由同济大学医学院医学寄生虫学教研室提供。该血片于 1998 年 7 月采自云南省思茅地区墨江哈尼族自治县龙坝乡。患者男性, 30 岁, 居住于高山上。发病前, 曾在中缅边境缅甸一侧伐木, 返乡后渐感不适, 连续发热 2 d。既往无明确遭猴或其他动物袭击或被其抓破皮肤的病史。当地医生诊断为“间日疟”。按照常规推荐剂量给予口服“青蒿素”和“氯喹、伯喹”等, 以及静脉注射“蒿甲醚”治疗, 痊愈。

基金项目: 国家科技部“自然资源平台建设项目(No.2004DKA30480, 2005DKA21104)

作者单位: 1 第二军医大学病原生物学教研室, 上海 200433; 2 解放军第 101 医院肾内科, 无锡 214000

* 通讯作者, E-mail: zhuhm22@yahoo.com

镜下观察该例患者的血片,可见疟原虫感染的 1 个红细胞内可见多个小滋养体(环状体)或者 1 个环状体双核或多核,环状体较恶性疟原虫稍大稍粗,且多数是双核和重复感染。被感染红细胞边缘也可见疟原虫寄生。多数晚期滋养体呈阿米巴样,有些晚期滋养体不到红细胞体积的 2/3,胞浆致密不变形;也有些晚期滋养体形状有易于形成带状的趋势,接近三日疟原虫的“带状”晚期滋养体。其成熟裂殖体中央通常聚集 8~16 个裂殖子,裂殖体未占满整个红细胞。晚期滋养体和裂殖体有浓密的黑褐色疟色素。疟原虫配子体充满红细胞的绝大部分或者完全充满,形态同间日疟原虫,但略小。根据上述形态学特征,经对照文献,初步认为该例患者感染的可能是灵长类疟原虫。并进一步对其进行 PCR 鉴定。

2 其他 4 种疟原虫血涂片

恶性疟原虫薄血片及间日疟原虫薄血片,分别采自海南省三亚市雅亮乡及云南省个旧市蔓耗镇,均为本教研室保存的教学标本片。食蟹猴疟原虫抗原片及诺氏疟原虫薄血片,由中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所提供。

3 阴性对照血液标本

阴性对照人血标本,于 2003 年 12 月采自山东省济宁市精神卫生中心。

4 引物

根据文献报道^[2,5],选择针对疟原虫 SSU rRNA 序列引物,分别合成疟原虫属通用引物(rplu3、rplu4),以及 3 种疟原虫的种特异性引物(rFAL1、rFAL2、rVIV1、rVIV2,PMK8、PMK9)。

属特异性引物:

rplu3 5'-TTTTTATAAGGATAACTACGAAAAGCTGT-3'

rplu4 5'-TACCCGTCATAGCCATGTTAGGCCAATACC-3',

退火温度 62℃;

恶性疟原虫引物:

rFAL1 5'-TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT-3'

rFAL2 5'-ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC-3',

退火温度 58℃;

间日疟原虫引物:

rVIV1 5'-CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC-3'

rVIV2 5'-ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA-3',

退火温度 58℃;

诺氏疟原虫引物:

PMK8 5'-GTTAGCGAGAGCACAAAAAAGCTAAT-3'

PMK9 5'-ACTCAAAGTAACAAAATCTTCCATA-3',
退火温度 60℃。

5 疟原虫基因组 DNA 抽提

上述恶性疟原虫、间日疟原虫、食蟹猴疟原虫、诺氏疟原虫及待鉴定的血片各取 2 张(共 10 张),先用二甲苯清洗,除去血片上残留的香柏油,然后将血片置于甲醇中脱色 2 h,再用清水冲洗、晾干。分别用无菌刀片完整地刮下薄血膜,放入 1.5 ml 微量离心管(eppendorf 管)中,加入 250 μl 裂解液[50 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris·HCl (pH 7.4), 10 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA), 1% (V/V) Triton X-100, 200 μg/ml 蛋白酶 K], 37℃ 温浴过夜,用酚-氯仿法抽提 DNA,再用异丙醇和 3 mol/L 醋酸钠沉淀 DNA,75% 乙醇洗涤后用 30 μl 的 ddH₂O 溶解,作为疟原虫基因组 DNA 模板。

6 DNA 纯度测定

经检测,DNA 在 260 nm 处有最大的吸收峰,蛋白质在 280 nm 处有最大的吸收峰。作者用 260 nm 波长测定 DNA 吸光度(A₂₆₀值),当 A₂₆₀=1 时,相当于大约 50 μg/ml 双链 DNA。测得 DNA 纯品的 A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.8,故根据 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值可以估计 DNA 的纯度。若比值较高说明含有 RNA,比值较低说明有残余蛋白质存在。

7 PCR 扩增

用高保真 PCR 酶(KOD 酶)分别对抽提的疟原虫基因组 DNA 模板样品进行 PCR 扩增。反应体积为 50 μl,循环参数为 94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,55~62℃ 退火 30 s(不同特异性引物的退火温度不同),68℃ 延伸 1 min,30 个循环;68℃ 再延伸 5 min。扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。

8 T 载体(T-vector)的构建

用 2% 琼脂糖凝胶电泳回收 PCR 产物,于 16℃ 与 T 载体(T-vector,购自日本 TaKaRa 公司)连接 30 min,转化 XL-10 大肠埃希菌(由第四军医大学病原生物学教研室提供)后,涂布氨苄青霉素抗性的 LB 培养基平板,过夜培养,挑取单克隆菌落置于 5 ml LB 培养液中摇菌过夜。

9 PCR 鉴定阳性克隆

取培养 6 h 菌液 200 μl,离心后菌体用 50 μl H₂O 重悬,沸水浴 3~5 min,离心后取 10 μl 上清作

为模板进行 PCR，2% 琼脂糖凝胶电泳筛选出正确的重组菌落。

10 DNA 序列测定

阳性克隆载体由上海英骏生物技术有限公司测序，测定结果与已发表的诺氏疟原虫 SSU rRNA 序列进行比较分析。

表 1 从血片上抽提的疟原虫基因组 DNA 纯度分析
Table 1 Quality of DNA extracted from blood films

纯度分析 Analysis of quality	恶性疟原虫 <i>P. falciparum</i>	间日疟原虫 <i>P. vivax</i>	食蟹猴疟原虫 <i>P. cynomolgi</i>	诺氏疟原虫 <i>P. knowlesi</i>	待鉴定样品 Unidentified
浓度(μg/ml) Concentration	16.34	15.76	18.30	13.95	17.77
吸光度(A ₂₆₀ 值) Absorbency	0.334	0.322	0.374	0.285	0.362
吸光度(A ₂₈₀ 值) Absorbency	0.230	0.227	0.243	0.210	0.242
A ₂₆₀ /A ₂₈₀	1.45	1.42	1.54	1.36	1.50

很高，但 DNA 的浓度已能够满足进一步 PCR 扩增的需要。

2 PCR 鉴定

用疟原虫属特异性引物 (rplu3、rplu4) 扩增后，每种疟原虫 DNA 样品均得到约 240 bp DNA 条带 (图 1)。再用疟原虫种特异性引物 (rFAL1、rFAL1, rVIV2、rVIV2, PMK8、PMK9) 分别对恶性疟原虫、间日疟原虫和待鉴定的 DNA 样品进行 PCR 扩增，结果表明待鉴定样品用诺氏疟原虫特异性引物扩增得到约 150 bp 条带 (图 2)，测序结果表明该片段与 GenBank 中的诺氏疟原虫 SSU rRNA 序列 (U83876) 完全吻合。

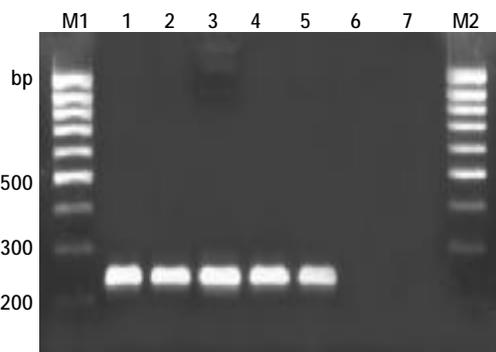


图 1 疟原虫属特异性引物扩增后电泳图
Fig.1 Detection of Plasmodium spp. with Plasmodium-specific primers

结 果

1 抽提血片疟原虫 DNA

取上述 5 种血片制备的疟原虫基因组 DNA 模板各 30 μl，从中各取 10 μl 稀释到 60 μl，分别检测其含量 (μg/ml) 及其吸光度 (A₂₆₀ 及 A₂₈₀ 值) (表 1)。由于疟原虫血片保存的时间较长，抽提的 DNA 质量并不是

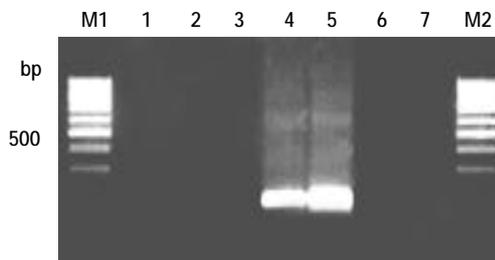


图 2 诺氏疟原虫特异性引物 PCR 扩增后电泳图
Fig.2 PCR amplification with *P. knowlesi*-specific primers

讨 论

确诊疟疾病例具体感染了何种疟原虫，通常是从患者的症状、体征、以及镜检患者血涂片中疟原虫形态 (包括被疟原虫寄生的红细胞特点) 判断。目前看来，这些证据并不十分可靠，因为在鉴别多核间日疟原虫时，往往是以已知感染人的 4 种疟原虫为基础，容易忽略其他种疟原虫感染的可能，例如，某些灵长类疟原虫 (诺氏疟原虫、食蟹猴疟原虫等) 就可以感染人类。此外，国内外已有较多关于“形态特别的间日疟原虫”的报道 [6-8]，但大多数仅限病例报道，有些经 PCR 扩增最终仍鉴定为间日疟原虫 [9]。

SSU rRNA 因具有高拷贝、多重重复性、变异少等特点而日益受到重视。研究证明，rRNA 属于丰富基因簇，即在基因组中以高拷贝的形式存在，转录单位数量达 100~5 000 个，在染色体上呈串联状重复排

列。不同物种 rRNA 转录单位的基因定位在不同的染色体上,并具有变异小区和保守小区交替散布的结构特点。SSU rRNA 也是最常用来分析不同种疟原虫基因组差异的保守序列,疟原虫的 SSU rRNA 基因全长为 1 622~1 640 bp,编码核糖体 18S 小亚基^[4]。不同种疟原虫在生活史的孢子增殖期和裂殖体期会形成互不相同的 SSU rRNA 序列^[10,11]。因此,SSU rRNA 被认为是理想的种、株、期鉴别依据,是进化、分类研究中频繁使用的分子标志序列。本研究正是利用不同种疟原虫基因组内 SSU rRNA 序列的差异,设计了针对恶性疟原虫、间日疟原虫、诺氏疟原虫的 PCR 引物,又设计了疟原虫属特异性的 PCR 引物,证实此例患者感染了诺氏疟原虫。该结果为人体感染疟原虫种类提供了新的资料。

近来,在马来西亚婆罗洲地区诊断为三日疟患者中,经疟原虫核酸测序发现,58%是感染了诺氏疟原虫。据此结果,WHO “Roll Back Malaria”计划的资深科学顾问 Nahlen 指出,“该项研究提出了严峻的问题,猴疟已经或将会成为人-人传播的疾病。一旦诺氏疟原虫在人体感染并持续传播,其危险性较三日疟原虫更大。因为诺氏疟原虫是每天完成一次裂体增殖周期”。美国 CDC 疟疾专家 Barnwell 指出,虽然目前诺氏疟原虫对氯喹治疗是敏感的,但重要的是有出现新的人类疾病的潜在危险。在马来西亚很小的范围出现如此高的诺氏疟原虫人体感染率,说明很有可能已经存在人-人感染。这也说明为什么一直有新现疾病出现,以及可能出现新的人类疟疾。根据疟原虫进化分析,间日疟原虫起源于东南亚,来自 40 000~60 000 年前猴疟原虫种群^[12]。WHO 西太区东南亚地区疟疾顾问 Palmer 也认为值得作进一步的研究,因为这不仅是公共卫生问题,同时也反映了诺氏疟原虫已经或正在适应于在人类的传播,人类将要面临出现第五种疟疾的问题^[13]。

致谢 第二军医大学病原生物学教研室瞿逢伊教授提供国内参考文献,并参与实验讨论。中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所顾政诚副主任技师、郑香主管技师提供诺氏疟原虫和石蟹猴疟原虫血片

标本,谨表谢意。

参 考 文 献

- [1] Jongwutiwes S, Putaporntip C, Iwasaki T. Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* malaria in human, Thailand [J]. *Emerg Infect Dis*, 2004, 10: 2211-2213.
- [2] Singh B, Kim Sung L, Matusop A, et al. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human being [J]. *Lancet*, 2004, 363: 1017-1024.
- [3] Zhu HM, Li J, Zheng H. Human natural infection of *Plasmodium knowlesi* [J]. *Chin J Parasitol parasit Dis*, 2006, 24: 70-71. (in Chinese)
(朱淮民, 李军, 郑徽. 诺氏疟原虫自然感染人体 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2006, 24: 70-71.)
- [4] Escalante AA, Ayala FJ. Phylogeny of the malarial Genus *Plasmodium*, derived from rRNA gene sequences [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 11373-11377.
- [5] Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, et al. A genus and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1999, 60: 687-692.
- [6] Jiang JB, Yu XR. Comparison of *P. vivax* multinucleatum with two similar *Plasmodium* species [J]. *Acta Parasitol*, 1965, 2: 333. (in Chinese)
(江静波, 余锡尧. 间日疟原虫多核亚种与相近两种疟原虫的比较 [J]. *寄生虫学报*, 1965, 2: 333.)
- [7] Yang BL. Morphologic characteristic of *Plasmodium vivax* in Henan and Guizhou Province [J]. *Zool Res*, 1982, 3(Suppl):173-177. (in Chinese)
(杨柏林. 我国豫桂两地区间日疟原虫的形态特征 [J]. *动物学研究*, 1982, 3(suppl): 173-177.)
- [8] Qian YL, Dai ZR, Li CJ, et al. Abnormal morphology of *Plasmodium vivax* in Huaibei, Anhui Province [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 1984, 5: 67-68. (in Chinese)
(钱永乐, 戴祖瑞, 李从军, 等. 安徽省淮北市间日疟原虫的异常形态 [J]. *第二军医大学学报*, 1984, 5: 67-68.)
- [9] Mazars E, Laberrenne JE, Snounou G, et al. Relapsing *Plasmodium vivax* malaria with atypical parasite forms and phagocytosis by peripheral neutrophils [J]. *Parasite*, 1997, 4: 263-267.
- [10] Li J, McConkey GA, Rogers MJ, et al. Transition of *Plasmodium vivax* ribosome types corresponds to sporozoite differentiation in the mosquito [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1994, 65: 283-289.
- [11] Li J, McConkey GA, Rogers MJ, et al. *Plasmodium*: the developmentally regulated ribosome [J]. *Exp Parasitol*, 1994, 78: 437-441.
- [12] Escalante AA, Barrio E, Ayala FJ. Evolutionary origin of human and primate malarial: evidence from the circumsporozoite protein gene [J]. *Mol Biol Evol*, 1995, 12: 616-626.
- [13] Fleck F. Monkey malaria could represent a new human strain [J]. *Bull WHO*, 2004, 82:392-393.

(收稿日期:2006-03-28 编辑:富秀兰)

《国际医学寄生虫病杂志》2007 年征稿征订启事

【消息】

《国际医学寄生虫病杂志》(原《国外医学寄生虫病分册》)为双月刊,大 16 开,56 页,刊号:ISSN 1673-4122, CN31-1961/R,是由中华人民共和国卫生部主管,中华医学会、中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所主办的全国性专业学术期刊。主要报道危害人类健康的各种寄生虫病的病原、医学媒介生物及其基础、病因、流行病学、临床、防治研究等方面的综述、论著及进展类文章,介绍国内、外寄生虫学研究领域的新成果、新经验、新进展和新动态。主要栏目设置有述评、综述、论著、标准与指南、网络快讯、学术争鸣、国外学者专栏、学术会议动态、年度学科进展、经验交流、继续医学教育等。 征稿内容:与医学寄生虫及其媒介相关的综述、论著、国外科研新闻、国际会议综述、现场研究报告、病例报告等与前述栏目相关的稿件,本刊欢迎作者用英文撰写稿件。对立项课题、基金资助项目及研究生综述、毕业论文等优先刊登。投稿请寄打印稿及介绍信一份,同时把电子版经 E-mail 传至编辑部邮箱。为了方便与作者联系,投稿时请务必注明联系电话、E-mail 地址及详细的通讯地址。投稿请寄:200025,上海市瑞金二路 207 号《国际医学寄生虫病杂志》编辑部,联系电话:021-64451195,021-64377008-1304, E-mail: gjyxjcb@vip.citiz.net, jscbc2002@yahoo.com.cn。到当地邮局订阅,邮发代码:4-190,每期定价:6.00 元,全年 36 元。