

文章编号:1000-7423(2012)-02-0118-04

【论著】

1 例人感染巴贝虫的诊断与病原体鉴定

姚立农¹, 阮卫¹, 曾长佑², 李祖火², 张轩¹, 雷永良², 陆巧绎¹, 陈华良¹

【摘要】 目的 对首诊为疟原虫感染的巴贝虫感染者进行确诊及临床诊治情况分析。方法 收集患者的临床发病资料, 并对患者及其居住环境进行流行病学调查; 采集骨髓样和血样, 吉氏染色涂片后镜检; 并以巴贝虫 (*Babesia*) 18s 核糖体 RNA 属和种特异性引物分别扩增患者血样基因组 DNA, 扩增产物测序后进行 BLAST 分析。结果 该患者反复发热 20 余天, 出现贫血(红细胞 2.59×10^{12} 和血红蛋白 5.5 g/L), CT 示肝脾肿大。骨髓涂片和外周血涂片吉氏染色后镜检, 发现有疑似恶性疟原虫或巴贝虫感染。经流行病学调查, 该患者无外出史, 但有输血史和被蜱叮咬史。患者血样经巴贝虫属和种特异性引物扩增, 分别出现约 400 bp 和 1 600 bp 条带。测序的序列经 BLAST 分析, 与田鼠巴贝虫 (*Babesia microti*) 的同源性为 99%, 登录号分别为 JQ609305 和 JQ609304。结论 结合患者的临床发病资料、流行病学史、病原学和分子生物学检测结果, 确诊为田鼠巴贝虫感染。

【关键词】 人; 田鼠巴贝虫; 感染; 诊断

中图分类号: S852.729

文献标识码: A

Pathogen Identification and Clinical Diagnosis for One Case Infected with *Babesia*

YAO Li-nong^{1*}, RUAN Wei¹, ZENG Chang-you², LI Zu-huo², ZHANG Xuan¹, LEI Yong-liang², LU Qiao-yi¹, CHE Hua-liang¹

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

【Abstract】 **Objective** To identify the pathogen and make diagnosis on a case who was misdiagnosed as malaria. **Methods** Clinical and epidemiological information of the suspected case was collected. Blood samples during hospitalization were collected and examined microscopically. Genomic DNA from the blood samples was amplified by *Babesia* 18S RNA genus- and species- specific primers, respectively, and the amplified products were used in sequencing and BLAST sequence analysis. **Results** The case had a fever over 20 days repeatedly with anaemia (RBC 2.59×10^{12} , HB 5.5 g/L) and hepatosplenomegaly. The unidentified parasites were found in the bone marrow and blood smear after Giemsa staining. Epidemiological information revealed that this case had a history of blood transfusion and tick bites. 1 625 bp and 449 bp band generated by PCR amplification from blood sample using *Babesia* genus- and species-specific primers, and the sequence homology was 99% in comparison to *Babesia microti* (AB241632) with BLAST analysis. **Conclusion** The clinical information, epidemiological history, and the PCR identification confirm the diagnosis of *Babesia microti* infection.

【Key words】 Human; *Babesia microti*; Infection; Diagnosis

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

巴贝虫病 (babesiosis) 由寄生于哺乳动物红细胞的巴贝虫感染引起, 是一种由蜱传播的新现的人兽共患病^[1]。该病的临床表现轻重不一, 典型的症状是在感染后 1~4 周出现, 以发热、寒战、头痛、血小板减少、轻到重度的溶血性贫血为特征。全身症状包括乏力、不适、肌痛、厌食和嗜睡等, 重症多见于老年

和脾脏切除的患者^[2-4]。1888 年, 匈牙利研究者在动物体内检出巴贝虫; 1957 年, 南斯拉夫报道了首例人巴贝虫病的确诊病例^[1]。随后, 欧洲各国和美国相继有巴贝虫感染病例报道, 而我国少有相关病例资料^[2,5-7]。现将 1 例被误诊为疟原虫的巴贝虫感染者的诊断和治疗情况进行报告, 为该病的临床诊治积累资料。

病例资料与诊断方法

1 病例资料收集

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

* 通讯作者, E-mail: ylinong@163.com

收集该患者自 2011 年 9 月来的发病过程、诊断和治疗的所有资料。

2 流行病学调查

对患者进行流行病学调查,包括离开居住地的外出情况、有无输血史和蜱虫叮咬史等。

3 病原学检测

3.1 骨髓样检查 10 月 13 日,当地医院采集骨髓片进行骨髓细胞形态学检查。

3.2 血样检查 10 月 22 日、11 月 5 日和 11 月 12 日,分别采集患者血样涂制薄血片,干燥、固定后吉氏染色、镜检($\times 1000$)。

4 分子生物学检测

4.1 主要试剂 DNA 抽提试剂盒购自德国 QIAGEN 公司, *Taq* DNA 酶购自宝生物工程(大连)有限公司。

4.2 PCR 扩增 用试剂盒提取 10 月 22 日血样的基因组 DNA,分别用疟原虫引物和巴贝虫引物进行 PCR 扩增。疟原虫 PCR 检测方法参照文献 [8]。参照文献 [9] 方法设计巴贝虫属和种特异性引物(表 1),扩增巴贝虫核糖体 DNA 的基因片段;实验设间日疟原虫阳性对照和空白对照。巴贝虫 PCR 扩增反应体系:10 \times PCR 缓冲液(含 $MgCl_2$) 5 μ l, dNTP (dATP、dTTP、dGTP 和 dCTP 各 2.5 mmol/L) 3 μ l, 10 μ mol/L 上、下游引物各 0.5 μ l, *Taq* DNA 聚合酶 2.5 U, 模板 DNA 3 μ l, 加水至 50 μ l;反应条件为 94 $^{\circ}C$ 5 min; 94 $^{\circ}C$ 1 min, 55 $^{\circ}C$ 1 min, 72 $^{\circ}C$ 1 min, 循环 35 次。

4.3 PCR 扩增产物测序 由生工生物工程(上海)有限公司进行测序,并采用 BLAST 分析序列同源性。

表 1 巴贝虫 PCR 扩增引物序列
Table 1 Primer sequences of PCR

基因名称 Gene name	正向引物 Forward primer	逆向引物 Reverse primer	产物/bp Product/bp
巴贝虫属引物 <i>Babesia</i> sp. 18s RNA	F:5'-GACACAGGGAGGTAGTGACAAG-3'	R:5'-CTAAGAATTTACCTCTGACAGT-3'	446
巴贝虫种引物 <i>Babesia microti</i> 18s RNA	F:5'-AAGCCATGCATGTCTAAGTATAAGCTTTT-3'	R:5'-CTTCTCCTTCCTTTAAGTGATAAGGTTTCAC-3'	1 600

结 果

1 病例描述

潘某,女,48 岁,浙江省南部地区某县人。2011 年 10 月 13 日患者因“反复发热、咳嗽 20 余天”到当地市级人民医院就诊,以发热待查收入院。入院体查:体温 36 $^{\circ}C$, 血压 130/81 mm Hg, 神清, 精神不佳, 表情淡漠, 两肺呼吸音粗, 未闻及干湿罗音, 腹软, 无压痛, 无其他异常。实验室检查:白细胞 3.6×10^9 , 嗜酸性粒细胞 1.1%, 红细胞 2.59×10^{12} , 血红蛋白 5.5 g/L; 丙氨酸转氨酶 49 U/L, 天冬氨酸转氨酶 79 U/L, 白/球蛋白比 26.2/29.4。乙肝三系示:乙肝表面抗原弱阳性, E 抗体阳性, 核心抗体阳性。肾功能无异常。血糖正常。血、痰细菌培养阴性。腹部 CT 示:胆囊炎、肝脾肿大。胸部 CT 示:两侧胸腔少量积液、左肺上叶舌段少量纤维化病灶; 10 月 18 日骨髓涂片, 发现有似疟原虫虫体。

2 流行病学调查结果

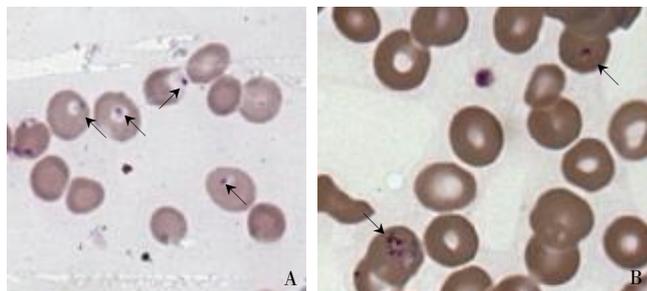
经详细询问病史,该患者长期居住于农村,无浙江省外出游史。有“子宫肌瘤”病史 5 年。2011 年 1

月在当地医院行“左乳房肿块切除术”。2011 年 8 月在当地医院行“子宫次切术+左输卵管切除术”,术后恢复尚可,于 9 月 2 日出院。两次手术中均有接受血液制品输入史。曾于 2011 年 6~7 月,在下地干农活时有不明虫体叮咬史。居住房屋依山面湖,以旱地为主,散放鸡鸭较多,家庭饲养猪、羊和狗等,由于当地疾控部门考虑为恶性疟感染,已对患者居住的房屋和周围环境进行了药物喷洒灭虫,因此未能抓到蜱等昆虫进行检测。

3 病原学检查结果

3.1 骨髓片镜检 反复查阅骨髓片,根据可疑的虫体形态和结构排除疟原虫,拟诊断为巴贝虫。巴贝虫胞浆呈淡蓝色,量少而稀薄,具有恶性疟原虫的一些特性,包括一个红细胞感染多个虫体、多核、核趋边性等;但与疟原虫红色核不同,巴贝虫核为深蓝色,无疟色素,无裂殖体、配子体(图 1)。

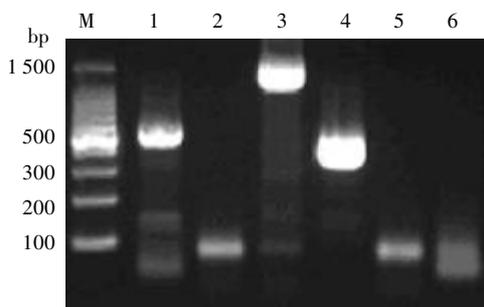
3.2 血片镜检 10 月 22 日取患者血样镜检,在红细胞内发现有核呈圆形且致密、胞浆呈环形且纤细的小体,与疟原虫极为相似。其中,发育更为成熟的虫体则呈阿米巴状。



A: 骨髓片 Bone marrow smear; B: 血片 Blood smear.
图 1 红细胞中巴贝虫 (吉氏染色, ×1000)
Fig.1 Babesia in erythrocytes
 (Giemsa's staining, ×1000)

4 PCR 检测结果

患者 10 月 22 日血样用恶性疟原虫和间日疟原虫引物进行多重 PCR 扩增, 未获得阳性条带。血样同时用巴贝虫属引物进行扩增, 出现条带位于约 400 bp, 间日疟原虫阳性对照条带位于 500~600 bp; 田鼠巴贝虫种引物扩增, 出现条带位于约 1 600 bp, 间日疟原虫阳性对照和空白对照均无条带 (图 2)。



1、4: 巴贝虫属引物扩增; 2、3: 巴贝虫种引物扩增。M: DNA 标志物; 1、2: 间日疟原虫阳性血样; 3、4: 患者血样; 5、6: 空白对照。
 1, 4: *Babesia* genus-specific primers; 2, 3: *Babesia*-species specific primers. M: DNA marker; 1, 2: *Plasmodium vivax* positive sample; 3, 4: Patient sample; 5, 6: Control.

图 2 PCR 扩增结果

Fig.2 The result of PCR amplification for the protozoan

PCR 产物纯化后经双向测序、拼接, 其中巴贝虫属引物扩增序列为 449 bp, 经 BLAST 序列比对, 与巴贝虫属 (登录号为 HQ187781) 和田鼠巴贝虫 (登录号为 AB241632) 的同源性分别为 96% 和 99%; 田鼠巴贝虫种引物扩增序列为 1 625 bp, 与田鼠巴贝虫 (登录号为 AB241632) 序列比对, 同源性为 99%; 而扩增的间日疟原虫序列与疟原虫及巴贝虫序列均无同源性, 应属非特异性序列。

5 治疗及转归

患者自 10 月 13 日住院来反复发热, 呈间歇性,

最高温度达 40.1 ℃, 给予抗感染治疗, 未见效果。10 月 20 日经复查骨髓片后初步排除恶性疟原虫感染, 考虑为巴贝虫感染。10 月 22 日 (第 1 次) 采血涂片镜检, 巴贝虫感染密度较高, 给予口服青蒿琥酯片治疗 (100 mg/d, 首剂加倍, 连服 5 d), 症状减轻, 但仍时有发热。11 月 2 日 (第 2 次) 采血涂片镜检, 巴贝虫感染密度降低, 给予服用磷酸氯喹片 (0.5 g/d, 首剂加倍, 连服 3 d) 和克林霉素 (600 mg/d+生理盐水 500 ml 静脉滴注, 连续 10 d), 用药 3 d 后退热, 症状明显好转。11 月 10 日 (第 3 次) 采血涂片镜检, 未再找到巴贝虫。2011 年 12 月和 2012 年 1 月两次电话随访, 患者均未再出现发热等症状。

讨 论

巴贝虫主要感染野生动物和家畜, 人被带原虫的蜱类叮咬而致感染发病。另外, 输入带虫者的血液亦可感染。近 30 年来, 人巴贝虫病例增多, 还发现有隐性或亚临床感染者, 也从无症状的供血者血液中分离到原虫^[2]。

人巴贝虫病根据病情轻重, 可分为轻、中和重等 3 型。轻型患者, 体温正常或仅有低热, 略有疲惫和不适感、轻微头痛, 以及食欲不振等; 中型患者, 起病急骤, 高热 (39~40 ℃), 头痛剧烈, 肌痛, 甚至周身关节疼痛, 有精神抑郁或烦躁不安, 神志恍惚, 脾脏轻度至中度肿大; 重症患者, 出现溶血性贫血, 并发展迅速, 伴黄疸、蛋白尿、血尿和肾功能障碍等。有脾脏摘除的患者, 临床表现常较严重, 而因输血引起的感染者, 通常发病缓慢。另外, 隐性感染较普遍, 但一般感染者不会出现再次感染^[4,5,8]。

本例患者有反复发热史, 最高体温达 40.1 ℃, 有重度贫血及脾肿大, 属于中度巴贝虫感染。镜下虫体较小, 以环状体多见, 一个红细胞中含有 1~3 个虫体, 呈环形、圆形、椭圆形和小杆状形等不同形态。在薄血片中, 巴贝虫和恶性疟原虫形态较为相似^[10], 均有圆形的核, 纤细、环形的胞浆, 易引起误诊。

尽管该患者在当地市级医院的骨髓涂片镜检结果为疟原虫感染, 但经省级疾控中心复核骨髓片, 拟排除恶性疟原虫感染。因该患者未曾到过疟疾流行区, 且浙江省已十余年未见当地感染的恶性疟病例, 故谨慎考虑可能为其他“原虫”感染。结合该患者有输血和野外虫叮咬史, 骨髓片和血片中原虫形态特征以及疟原虫 PCR 检测为阴性, 故排除为疟原虫感染的可能, 初步考虑为巴贝虫感染。对患者血样经进一步用巴贝虫 18s 核糖体 RNA 属和种引物进行 PCR 扩增, 扩增产物序列进行与田鼠巴贝西原虫的同源性为

99%，确诊该病例为田鼠巴贝虫感染。

巴贝虫感染的治疗，如单独使用青蒿琥酯片，仅能缓解发热等症状，可杀灭部分虫体，用药 11 d 后复查血片仍可见少量巴贝虫；而采用氯喹（口服 3 d）+ 克林霉素（静脉滴注 10 d）治疗效果显著，用药 3 d 后退热，用药 8 d 后复查血样镜检未见巴贝虫，达到治愈效果。

中国家畜巴贝虫感染分布较广，但人感染巴贝虫报道较少，故在临床诊治过程中应引起关注。另外，巴贝虫除可通过蜱传播外，还可通过输血传播，该患者发病前因患病曾接受过多次输血，故不排除为输血感染。所以建议有关部门应加强血源管理，对供血者的有关血传疾病加强检测，并开展溯源技术研究。

参 考 文 献

- [1] Liu CY, Fan SY. Human babesiosis [J]. Chin J Zoonoses, 1993, 9(5): 53-55. (in Chinese)
(刘朝一, 范生尧. 人巴贝虫病 [J]. 中国人兽共患病杂志, 1993, 9(5): 53-55.)
- [2] Wormser GP, Lombardo G, Silverblatt F, et al. Babesiosis as a cause of fever in patients undergoing a splenectomy [J]. Am Surg, 2011, 77(3): 345-347.
- [3] Liang WJ, Pei FQ. Human babesiosis [J]. Parasit Dis Foreign Med

Sci, 2000, 27(2): 67-71. (in Chinese)

(梁文佳, 裴福全. 人体巴贝虫病 [J]. 国外医学: 寄生虫病分册, 2000, 27(2): 67-71.)

- [4] Herwaldt BL, de Bruyn G, Pieniazek NJ, et al. Babesia divergens-like infection, Washington State [J]. Emerg Infect Dis, 2004, 10(4): 622-629.
- [5] Su GG, Zhao NF, Ye YX. Reported case of babesiosis [J]. Chin J Zoonoses, 2002, 18(5): 112. (in Chinese)
(苏关关, 赵年丰, 叶有新. 巴贝虫病病例报道 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2002, 18(5): 112.)
- [6] Chiang E, Haller N. Babesiosis: An emerging infectious disease that can affect those who travel to the northeastern United States [J]. Travel Med Infect Dis, 2011, 9(5): 238-342.
- [7] Shi ZB, Li ZZ, Gao QR, et al. A case of Babesia infection [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1996, 14(3): 240. (in Chinese)
(石珍宝, 李珍珍, 高权荣, 等. 人体感染巴贝虫一例 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1996, 14(3): 240.)
- [8] Ruan W, Yao LN, Yang TT, et al. Study on the diagnosis of malaria and mixed infection with multiplex PCR [J]. Chin Prev Med, 2010, 11(7): 650-654. (in Chinese)
(阮卫, 姚立农, 杨婷婷, 等. 多重 PCR 技术诊断疟疾及混合感染的研究 [J]. 中国预防医学杂志, 2010, 11(7): 650-654.)
- [9] Oosthuizen MC, Zwegarth E, Collins NE, et al. Identification of a novel Babesia sp. from a sable antelope [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(7): 2247-2251.
- [10] Byrnes V, Chopraf S, Kozie MJ. Resolution of chronic hepatitis C following parasitosis [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(31): 4268-4269.

(收稿日期: 2011-12-14 编辑: 瞿麟平, 盛慧锋)

(上接第 117 页)

和虫体形态学观察，提示该地区流行的带绦虫为亚洲带绦虫。建议需对该地区加强卫生宣教，改变居民食生猪肝、猪肉的习惯，及野外大小便的习惯，并加强粪便管理等，以减少带绦虫在人-猪间的传播。

志谢 现场调查中，中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制中心的许隆祺、陈颖丹两位研究员给予指导，弥渡县新街乡卫生院、弥渡县血防站和弥渡县疾控中心的部分同志参与调查，在此一并致谢！

参 考 文 献

- [1] Ma YX, Xu ZB, Fan PC. Taeniasis asiatica [J]. J Trop Dis, 2003, 1(4): 248-254. (in Chinese)
(马云祥, 许焯漂, 范秉真. 亚洲带绦虫病 [J]. 热带病与寄生虫学, 2003, 1(4): 248-254.)
- [2] Wu GL. Human Parasitology [M]. 3th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005: 530-534. (in Chinese)
(吴观陵. 人体寄生虫学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 530-534.)
- [3] Zhang LL, Tao H, Zhang BX, et al. First discovery of Taenia saginata asiatica infection in Yunnan Province [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis Dec, 1999, 17(2): 95-96. (in Chinese)
(张莉莉, 陶洪, 张炳翔, 等. 亚洲无钩绦虫感染在云南省首次发现 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1999, 17(2): 95-96.)
- [4] Lang SY, Guo ZF, Bao HE. An investigation of taeniasis in Binyang and Rongshui Counties of Guangxi Autonomous Region [J]. J Guiyang Med Coll, 2008, 33(1): 10-11. (in Chinese)
(郎书源, 郭智芳, 包怀恩. 广西宾阳县和融水县带绦虫病的调查

[J]. 贵阳医学院学报, 2008, 33(1): 10-11.)

- [5] Wang ZR, Bao HE. Identification of Taenia saginata by mtCO I in four areas of Yunnan and Guizhou Provinces [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2003, 21(1): 20-23. (in Chinese)
(王正蓉, 包怀恩. 用 mtCO I 技术测定云南及贵州四地区的牛带绦虫 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2003, 21(1): 20-23.)
- [6] Zhang CY, Bao HE, Yang M, et al. Molecular identification of Taenia in three regions of Yunnan and Guizhou Provinces; Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the first internal transcribed spacer (ITS1) of ribosomal DNA [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis Con, 2005, 18(5): 330-332. (in Chinese)
(张朝云, 包怀恩, 杨明. 云贵两省三地带绦虫的分子鉴定: 核糖体 DNA 第一内转录间隔区 (ITS1) 限制性酶切片长度多态性 (RFLP) 分析 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2005, 18(5): 330-332.)
- [7] Zhang K, Yang M, Bao HE. The analysis of the rDNA-ITS2 sequence of Taenia saginata from five different areas in China [J]. Chin J Zoonoses, 2006, 22(10): 918-921. (in Chinese)
(张科, 杨明, 包怀恩. 我国 4 省区 5 地牛带绦虫 rDNA2-ITS2 序列分析 [J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(10): 918-921.)
- [8] Zhuang L, Bao HE, Yang M. Detection and analysis on the sequence of internal transcribed space-1 (ITS1) in ribosomal DNA of Taenia saginata from nine regions of six provinces in western China [J]. Chin J Zoonoses, 2007, 23(10): 1009-1012. (in Chinese)
(庄丽, 包怀恩, 杨明. 我国西部 6 省 9 地牛带绦虫 rDNA2-ITS1 序列测定及分析 [J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(10): 1009-1012.)

(收稿日期: 2011-07-13 编辑: 瞿麟平, 盛慧锋)