

DOI:10.13350/j.cjpb.220307

• 论著 •

上海市 1 例输入性婴儿利什曼原虫引起的黑热病 实验室检测与溯源分析^{*}

王真瑜, 张耀光, 朱民, 江莉, 潘浩, 马晓疆, 余晴^{**}

(上海市疾病预防控制中心, 上海 200336)

【摘要】 目的 对上海市 1 例输入性黑热病病例进行实验室检测与基因溯源分析。 **方法** 收集该病例的临床资料, 并进行流行病学调查。对患者的骨髓穿刺液涂片进行显微镜镜检, 对血样进行快速免疫层析法检测和 PCR 检测。扩增产物测序后比对并构建系统发育树。 **结果** 该患者出生于并有往返于黑热病流行区的流行病学史, 伴有不规则的反复发热、贫血及脾肿大等症状。骨髓穿刺液涂片查见大量利什曼原虫无鞭毛体。快速免疫层析法检测利什曼原虫 IgG 抗体阳性。分别用引物 K13A/K13B 和 LITSR/L5.8S 对患者的血样进行利什曼原虫动基体基因和 ITS-1 基因扩增, 分别得到 120 bp 和 350 bp 片段, 与预期目的产物大小一致。对 LITSR/L5.8S 扩增产物片段测序进行比对分析, 与婴儿利什曼原虫序列相似性为 100%。基于 ITS-1 基因序列构建的系统发育树显示, 该患者感染虫株与来源地山西省阳泉市的婴儿利什曼原虫虫株亲缘关系最近。 **结论** 根据基因序列和流行病学分析, 明确该内脏利什曼病病例的病原体为婴儿利什曼原虫, 为山西省阳泉市输入。

【关键词】 黑热病; 婴儿利什曼原虫; 骨髓涂片; 实验室检测; 基因溯源

【中图分类号】 R531.6

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)03-0283-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Mar;17(3):283-287, 292.]

Laboratory analysis and diagnosis of an imported case of kala-azar caused by *Leishmania infantum* in Shanghai City

WANG Zhen-yu, ZHANG Yao-guang, ZHU Min, JIANG Li, PAN Hao, MA Xiao-jiang, YU Qing
(Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China)

【Abstract】 Objective To diagnose an imported case of kala-azar in Shanghai by laboratory detection and molecular traceability. **Methods** The clinical data of the case was collected and the epidemiological survey was conducted. The bone marrow smears of the patient were detected by microscopy. And the blood samples of the patient were detected by Nova Bios® Leishmania IgG/IgM Ab Rapid diagnostic Test (RDT). The QIAamp DNA Mini Kit was used to extract the DNA of patient's blood, and two pairs of specific K13A/K13B and LITSR/L5.8S primers were synthesized according to kinetoplast DNA (kDNA) and the ribosomal second internal transcribed spacer (ITS1) gene sequence, and the template DNA was amplified by PCR. After sequencing and comparing the amplified products, the phylogenetic tree was constructed by Neighbor-joining method, and evaluated by Boots trapping method. **Results** The patient was born and had been in the kala-azar epidemic area, as well as with symptoms such as recurrent irregular fevers, splenomegaly and anemia. A large amount of Leishmania amastigotes were found in the bone marrow smears, and the antibody of IgG was positive by RDT. The PCR products of K13A/K13B and LITSR/L5.8S were 120 bp and 350 bp, respectively. The results were consistent with the desired target product fragment. The sequence analysis showed that the amplified band of LITSR/L5.8S was 100% homology to the sequence of *L. infantum*. Phylogenetic tree analysis based on ITS-1 gene showed that the patient had a close relationship with the species from Yangquan City of Shanxi Province. **Conclusion** The case was diagnosed as visceral leishmaniasis, and the pathogen is *L. infantum*, imported from Yangquan, Shanxi Province, China.

【Key words】 Kala-azar; *Leishmania infantum*; Bone marrow smears; Laboratory detection; Traceability

^{***} 内脏利什曼病 (visceral leishmaniasis) 又称黑热病 (kala-azar), 是由利什曼原虫引起的通过媒介白蛉传播的一种人兽共患寄生虫病^[1]。我国黑热病的病原体主要有杜氏利什曼原虫 (*Leishmania donovani*) 和婴儿利什曼原虫 (*Leishmania infantum*) 两种^[2]。该病临床表现为长期不规则发热, 脾 (95% 以上)、肝、淋巴

^{*} **【基金项目】** 上海市卫生健康委员会科研项目 (No. 201940099); 上海市第五轮公共卫生体系建设三年行动计划重点学科项目 (No. GWV-10.1-XK13)。

^{**} **【通讯作者】** 余晴, E-mail: yuqing_1@scdc.sh.cn

【作者简介】 王真瑜 (1982-), 女, 浙江兰溪人, 硕士, 副主任医师。研究方向: 寄生虫病检测与诊断。
E-mail: wangzhenyu@scdc.sh.cn

结肿大和全血细胞减少性贫血。患者若不加以适当治疗,大都在发病后1~2年内病情恶化而死亡,被世界卫生组织/热带病培训与研究特别规划署(WHO/TDR)列为严重危害人类的十大热带病之一^[3]。在我国建国初期,人体利什曼病流行广泛,主要分布于长江以北的16个省、市、自治区的650多个县市。据新中国成立初期的调查显示,当时利什曼病患者53万人,之后开展了大规模防治,采取查治病人、杀灭病犬和消灭传播媒介白蛉等综合措施,于1958年基本消灭了黑热病^[4]。近年来,利什曼病主要流行于新疆、内蒙古、甘肃、四川、陕西、山西6个省、自治区^[5-6]。上海市作为非流行区域,此种病例较为罕见,临床上极易造成误诊、漏诊。

核糖体DNA内转录间隔区I(ITS-1)是核糖体DNA中介于18S和5.8S之间的序列,该区域受外界环境因素的影响较小,所受选择压力小,进化速度快,在绝大多数物种间表现出极为广泛的序列多态性,可以作为分子遗传标记用于种间或种内群体的鉴定,在利什曼原虫的种间分类鉴定中也有广泛的应用性^[7-9]。利什曼原虫动基体DNA(kinetoplast DNA, kDNA)基因对于检测我国婴儿利什曼原虫显示出较好的特异性和敏感性^[10]。

2020年7月,上海市报告了1例输入性黑热病病例。本研究通过基因测序比对后构建基于ITS-1基因序列的系统发育树,并结合病例资料和流行病学调查等手段溯源该病例的病原体,结果报告如下。

材料与方法

1 流行病学调查

收集该患者发病、诊断和治疗过程等相关资料,包括外出史、居住地周围情况等,并对其可能的感染途径和传播方式进行追溯调查。

2 实验室检测

2.1 仪器和试剂 核酸提取试剂盒 QIAamp DNA Mini Kit(Cat. No. 51304)购于 QIAGEN 公司,PCR 反应混合物(PT 102-01)购自上海莱枫生物科技有限公司,100 bp DNA Ladder (Dye Plus) (Cat. No. 3422B (A×2))购自宝日医生物技术(北京)有限公司(TaKaRa),PCR 产物纯化试剂盒 QIAquick PCR Purification Kit(Cat. No. 28104)购于 QIAGEN 公司,利什曼原虫快速诊断 Nova Bios® Leishmania IgG/IgM Ab Rapid Test 试剂盒(18020703A)购于美国 NovaBios Laboratories Diagnostics 公司。基因扩增仪(Dyad Peltier Thermal Cyclor, Bio-Rad)、水平电泳仪(Mupid-2 plus, Advance)、凝胶成像系统(Universal Mood, Bio-Rad),OLYMPUS CX31 光学显微镜(日本

OLYMPUS 公司)。

2.2 病原学检测 对患者进行骨髓穿刺,取穿刺物涂片,经干燥、甲醇固定后姬姆萨染色,显微镜镜检^[2]。

2.3 快速免疫诊断检测 使用 Nova Bios® Leishmania IgG/IgM Ab Rapid Test 试剂盒对患者的血样进行检测。按说明书操作,滴加 35 μ l 全血于加样孔,再滴加 2 滴缓冲液,15 min 后从视窗中读取结果。

2.4 分子生物学检测 采用全血 DNA 提取试剂盒提取患者血样 DNA。合成特异性引物 K13A/K13B 和 LITSR/L5.8S,分别扩增利什曼原虫动基体 DNA(kDNA)和核糖体 DNA 内转录间隔区 I(ITS-1)基因片段^[11-13],预期扩增片段分别为 120 bp 和 350 bp。引物序列见表 1,由赛默飞世尔科技(中国)有限公司合成。PCR 反应体系(总体积 20 μ l): ddH₂O 7.0 μ l, 上、下游引物(20 μ mol/L)各 0.5 μ l, 2×Taq PCR 预混液 10 μ l, DNA 模板 2.0 μ l。扩增后各取 10 μ l PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后观察结果,并将产物纯化后送上海生工生物工程有限公司测序。

表 1 PCR 检测引物序列
Table 1 Primer sequences for detection by PCR

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')
K13A	GTGGGGGAGGGCGTTCT
K13B	ATTTTACACCAACCCAGTT
LITSR	CTGGATCATTTTCCGATG
L5.8S	TGATACCACTTATCGCACTT

2.5 系统发育树构建及评估 使用 MEGA 11.0.8 软件中的 Clustal W 法进行序列比对。序列分别为本病例测序得到的 ITS-1 序列,文献^[14]中 13 条(No. 1-13)山西省及周边地区和 GenBank 下载的 12 条(No. 14-25)利什曼原虫不同种以及同种不同地区分离到的利什曼原虫的 ITS-1 序列(表 2),应用 Neighbor-joining 方法构建系统进化树,采用 Boots traping 方法进行评估。

结 果

1 流行病学调查

患儿 2017 年 5 月出生于山西省阳泉市。2017 年 9 月随父母来到上海市。2018 年 8 月,患儿随父母回山西省阳泉市老家,当年 9 月返回上海。2019 年 3 月上旬,患儿随父母再次返回山西省老家,停留 4 至 5 d 后返沪,未再离沪。患儿于 2020 年 5 月开始出现反复发热、贫血、各类血细胞降低和脾肿大等症状,后行骨髓穿刺检查。据患儿母亲介绍,老家位于山西省阳泉市郊区的一个农村,自建平房,5~6 间,另有卫生间和厨房间,否认家中饲养犬类等任何动物,但乡村中豢养犬类和流浪犬情况比较普遍。

2 实验室检测

2.1 病原学检测结果 骨髓穿刺液涂片显示骨髓增生活跃,镜下查见大量卵圆形利什曼原虫无鞭毛体聚集于吞噬细胞周围(图 1)。

2.2 快速诊断试剂检测结果 对患者血样进行利什曼原虫快速诊断检测,质控线(C)和检测线(T1)均显色,判定为利什曼原虫 IgG 抗体阳性(图 2)。

表 2 利什曼原虫虫株来源地及序列号
Table 2 Isolated regions and accessions of Leishmania species

序号 No.	虫种 Species	ITS-1			
		序列号 Accession	样品编号 Sample ID	长度 Length(bp)	来源地 Region
No. 1	<i>L. infantum</i>	-	BWD-Shanxi	315	山西省阳泉市
No. 2	<i>L. infantum</i>	-	FYJ-Shanxi	316	山西省阳泉市
No. 3	<i>L. infantum</i>	-	FL-Shanxi	316	山西省阳泉市
No. 4	<i>L. infantum</i>	-	HFG-Shanxi	316	山西省临汾市
No. 5	<i>L. infantum</i>	-	HHS-Shanxi	316	山西省阳泉市
No. 6	<i>L. infantum</i>	-	HLH-Shanxi	316	山西省阳泉市
No. 7	<i>L. infantum</i>	-	KJD-Shanxi	316	山西省平定县
No. 8	<i>L. infantum</i>	-	LQX-Hebei	316	河北省邢台市
No. 9	<i>L. infantum</i>	-	WH-Shanxi	316	山西省阳泉市
No. 10	<i>L. infantum</i>	-	YWH-Gansu	316	甘肃省陇南市
No. 11	<i>L. infantum</i>	-	YBY-Shanxi	316	山西省阳泉市
No. 12	<i>L. infantum</i>	-	SQS-Shaanxi	315	陕西省渭南市
No. 13	<i>L. infantum</i>	-	ZGB-Shanxi	315	山西省
No. 14	<i>L. infantum</i>	KU975159.1	MHOM/CN/2009/KSF-7	302	新疆
No. 15	<i>L. donovani</i>	MH450079.1	MHOM/CN/94/KXG-Xu	312	新疆克拉玛依
No. 16	<i>L. donovani</i>	MH450082.1	IMJW/CN/92/KXG-927	312	新疆克拉玛依
No. 17	<i>L. donovani</i>	HM130608.1	IPHL/CN/77/XJ771	297	新疆乌鲁木齐
No. 18	<i>L. infantum</i>	MK474640.1	-	189	突尼斯
No. 19	<i>L. infantum</i>	MH347953.1	Sanliurfa_MHOM/SR/2017/HRURFA153	290	土耳其
No. 20	<i>L. infantum</i>	KJ567482.1	HSJT	392	摩洛哥
No. 21	<i>L. tropica</i>	KU680854.1	HU12 Kerman/Iran	461	伊朗
No. 22	<i>L. tropica</i>	KC145159.1	IPM-MorES-5	400	摩洛哥
No. 23	<i>L. major</i>	MG755824.1	L. M74. IR. Mir	213	伊朗南部
No. 24	<i>L. mexicana</i>	KU680857.1	MNYC/BZ/62/M379	477	巴西
No. 25	<i>L. braziliensis</i>	MF802823.1	AM30	301	巴西

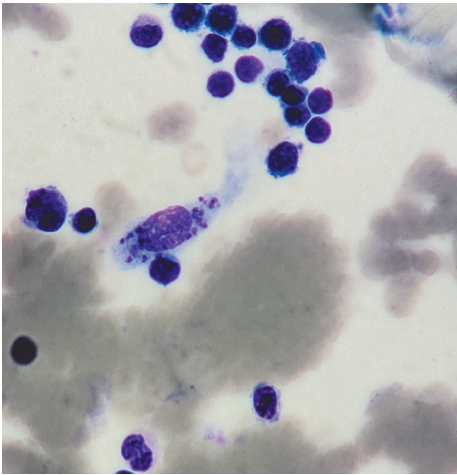


图 1 患者骨髓穿刺液涂片中利什曼原虫无鞭毛体 (姬姆萨染色,1 000×)

Fig. 1 Microscopic examination results of patient's bone marrow film(Giemsa staining,1 000×)

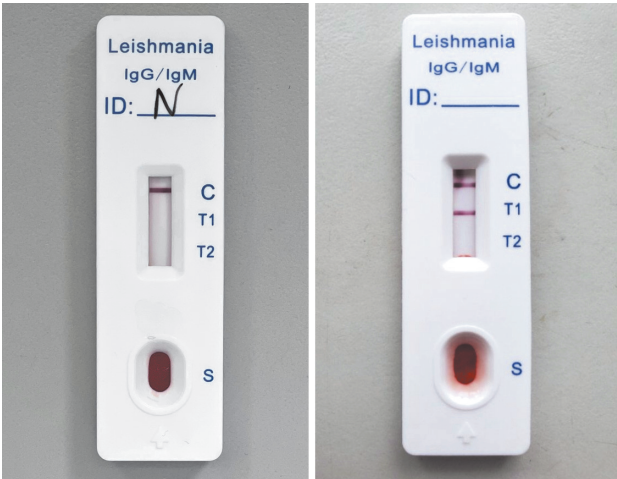


图 2 健康人与患者血样 RDT 结果

Fig. 2 RDT results of healthy human and patient's blood

2.3 PCR 检测结果 取患者血样分别以 K13A/K13B 和 LITSR/L5.8S 为引物进行 PCR 扩增,扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳分析,分别为 120 bp 和 350 bp,与预期目的产物片段大小一致(图 3)。

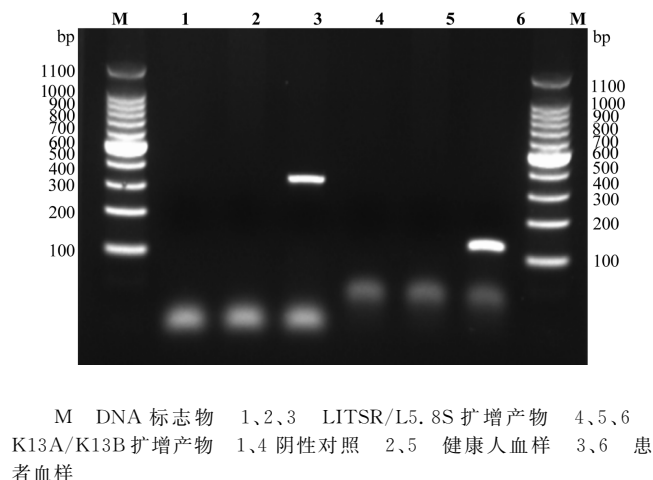


图 3 患者血样 PCR 扩增结果

M DNA marker 1,2,3 Amplified products of LITSR/L5.8S
4,5,6 Amplified products of K13A/K13B 1,4 Negative control
2,5 Healthy human blood sample 3,6 Patient's blood sample

Fig. 3 PCR results of patient's blood

2.4 测序及序列比对分析 LITSR/L5.8S 扩增产物纯化后测序,将所得基因序列在 NCBI 数据库中进行序列比对,与婴儿利什曼原虫序列相似性为 100% (图 4)。

Sequences producing significant alignments

Download

Select columns

Show

100

☒ select all 100 sequences selected

GenBank

Graphics

Distance tree of results

MISA Viewer

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Leishmania infantum isolate 3828 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infantum	411	100%	2e-110	100.00%	273	MT416148.1	
☒	Leishmania infantum isolate 268 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infantum	411	100%	2e-110	100.00%	273	MT416140.1	
☒	Leishmania infantum isolate 263 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infantum	411	100%	2e-110	100.00%	273	MT416139.1	
☒	Leishmania infantum isolate 252 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infantum	411	100%	2e-110	100.00%	273	MT416138.1	
☒	Leishmania infantum isolate 22 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infantum	411	100%	2e-110	100.00%	319	MF605352.1	
☒	Leishmania infantum isolate 22 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infantum	411	100%	2e-110	100.00%	319	MF605352.1	
☒	Leishmania infantum isolate 42 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infantum	411	100%	2e-110	100.00%	312	MF605352.1	
☒	Leishmania infantum isolate 37 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infantum	411	100%	2e-110	100.00%	316	MF605352.1	
☒	Leishmania infantum isolate 20 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infantum	411	100%	2e-110	100.00%	319	MF622063.1	
☒	Leishmania infantum isolate 35 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infantum	411	100%	2e-110	100.00%	319	MF622062.1	
☒	Leishmania infantum isolate 19 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infantum	411	100%	2e-110	100.00%	306	MF622059.1	
☒	Leishmania infantum isolate 17 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infantum	411	100%	2e-110	100.00%	306	MF622058.1	
☒	Leishmania infantum isolate 49 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infantum	411	100%	2e-110	100.00%	291	MF622057.1	
☒	Leishmania infantum isolate 54 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infantum	411	100%	2e-110	100.00%	276	MF622056.1	
☒	Leishmania infantum isolate MO-98 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infantum	411	100%	2e-110	100.00%	314	MF649380.1	
☒	Leishmania infantum isolate MO-103 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infantum	411	100%	2e-110	100.00%	314	MF649377.1	
☒	Leishmania infantum isolate 2019, SFB internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infantum	411	100%	2e-110	100.00%	316	MF649373.1	
☒	Leishmania infantum isolate C6G51941 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infantum	411	100%	2e-110	100.00%	316	MF648767.1	
☒	Leishmania infantum isolate C6G51925 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infantum	411	100%	2e-110	100.00%	316	MF648765.1	
☒	Leishmania infantum isolate C6G51908 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infantum	411	100%	2e-110	100.00%	307	MF648763.1	
☒	Leishmania infantum isolate C6G51945 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infantum	411	100%	2e-110	100.00%	316	MF648763.1	
☒	Leishmania infantum isolate C6G51941 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infantum	411	100%	2e-110	100.00%	320	MF648760.1	
☒	Leishmania infantum isolate C6G51939 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infantum	411	100%	2e-110	100.00%	317	MF648759.1	
☒	Leishmania infantum isolate C6G51934 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infantum	411	100%	2e-110	100.00%	316	MF648758.1	
☒	Leishmania infantum isolate C6G51922 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infantum	411	100%	2e-110	100.00%	316	MF648755.1	

图 4 测序结果在线比对

Fig. 4 Results of sequence alignment online

2.5 基于 ITS-1 基因序列系统发育树的构建与分析 应用 Neighbor-joining 方法,基于 ITS-1 基因序列构建该患者感染株利什曼原虫与其他 25 株什曼原虫的系统发育树,结果见图 5。该患者感染虫株与婴儿利什曼原虫均聚到一个分支上,说明感染虫株为 *Leishmania infantum*,且与来源地为山西省阳泉市的 No. 1 虫株亲缘关系最近,证明为山西省阳泉市婴儿利什曼原虫虫株。

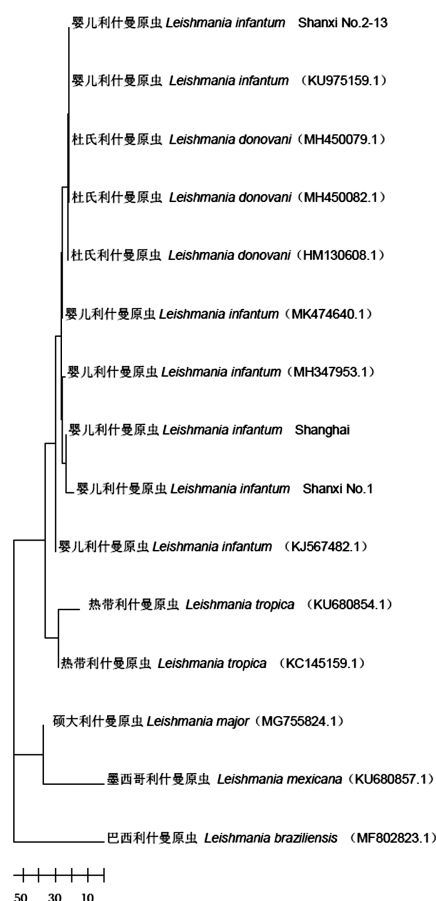


图 5 基于 ITS-1 基因序列构建的利什曼原虫株系统发育树(NJ 法)

Fig. 5 Construction of phylogenetic tree based on ITS-1 sequences between patient of Shanghai and other *Leishmania* species (NJ method)

讨论

利什曼病曾被列为“五大寄生虫病”之一,严重危害人体健康并影响社会经济发展^[15]。利什曼原虫生活史中有两种形态,在脊椎动物体内为无鞭毛体,在媒介动物白蛉体内为前鞭毛体。感染前鞭毛体的雌性白蛉刺叮人或易感的哺乳动物,前鞭毛体即进入宿主的皮下组织。部分前鞭毛体被白细胞吞噬消灭,一部分则进入单核—吞噬细胞系统进一步发育增殖。我国以内脏利什曼病为主,临床特征主要表现为持续不规则发热、脾肿大,全血细胞减少性贫血及白蛋白/球蛋白比例倒置等症^[16]。

本例患者早期主要症状为反复持续不规则发热并伴有两肺少许渗出,考虑感染性病变,医院拟“肺炎”将患儿收治入呼吸科。这与文献报道多数患者最初症状类似急性上呼吸道感染,首诊为“感冒”情况相似,但抗感染治疗无明显效果,甚至会加重病情,进而延误诊断和治疗^[17]。该患者在沪居住地址为宝山区顾村镇,否认家中饲养包括犬在内的任何动物,否认家中种植任何绿植,小区和家中卫生条件均尚可,无白蛉孳生地存

在。利什曼原虫的媒介中华白蛉(*Phlebotomus chinensis*)广泛分布在北纬 $18^{\circ}\sim 42^{\circ}$,东经 $102^{\circ}\sim 124^{\circ}$ 之间,成虫通常栖息于室内外阴暗、潮湿、避风的场所,如畜舍、地窖、窑洞等处,其飞翔和繁殖能力都较弱,在平原地带的居民点已很难查见中华白蛉^[18-19]。上海市历史上无传播媒介白蛉,且已有60多年无本地病例发生^[20-21]。鉴于患者老家山西省阳泉市为黑热病流行区,近几年均有病例报告^[22]。患儿幼时在老家生活,且于2018年8月和2019年3月均有返乡探亲史。虽然白蛉活动季节为5~9月份,但文献显示1~12月仍有黑热病患者发病,其原因可能是气候变暖会缩短白蛉幼虫的发育时间并延长了成蛉活动季节长度,从而使传播季节时间变长以及与黑热病潜伏期长短不一有关^[23]。该病潜伏期较长,据资料显示最长可达数年^[24],因此判定患儿于山西省暴露感染可能性较大,为输入性病例。

内脏利什曼病的诊断是防控和治疗的关键环节,其确诊依据是在骨髓、脾脏、肝脏或淋巴结等穿刺物中查到利什曼原虫的无鞭毛体^[2]。但在实际操作中需有丰富的实验室经验和相应检测技能,费时费力,且检测的敏感性与所检部位相关,有文献数据显示脾脏穿刺物病原学检查和原虫培养的敏感性最高,但其风险较骨髓穿刺高很多,这在大规模流行病学调查中是难以实施的^[13]。病原学检测虽被视为“金标准”,但无法鉴别出不同虫种的利什曼原虫。免疫学检测如免疫层析试条法快速简便适用于现场操作,阳性检出率较高,适用于基层和大规模筛查使用,但由于许多生物具有高度同源性的蛋白质会导致免疫学检测产生交叉反应,影响疾病的诊断^[25]。分子生物学检测方法敏感性显著高于病原学检查,且可以鉴定虫种^[26]。利什曼原虫种属内的系统发育关系可根据不同的DNA序列进行分析,ITS-1基因序列已被广泛应用到利什曼原虫种群间的系统发育关系研究^[27-28]。本研究将LITSR/L5.8S扩增产物测序后进行比对分析,与婴儿利什曼原虫序列相似性为100%。基于ITS-1基因序列构建利什曼原虫虫株的系统发育树,显示上海患者感染虫株与婴儿利什曼原虫均聚到一个分支上,且与来源地为山西省阳泉市的No.1虫株亲缘关系最近,最终明确其病原体为山西省阳泉市婴儿利什曼原虫虫株。

随着经济的发展和人口流动的加剧,以及国内和国际旅行的增加,输入性内脏利什曼病例越来越多,非流行区的医务人员面临更大的挑战,建议加强有关内脏利什曼病的检测技能和治疗的培训,提高对输入性利什曼病的防控意识,能结合病原学、免疫学和分子生物学多方法来确诊,避免漏诊、误诊,做到早发现、早诊断和早治疗,尽量减轻病患的身体痛苦和因误诊而造成

成的经济负担^[29-30]。同时完善输入性寄生虫病病例报告系统,加强监测特别是针对从流行区返回和来自流行区的人员,对检出的病例及时治疗和处置,防止病情发展恶化;进一步提高临床医生对输入性寄生虫病的诊断能力,加强输入性寄生虫病预防健康教育,提高患病后及时就诊的意识至关重要。

【参考文献】

- [1] 诸欣平,苏川. 人体寄生虫学[M]. 9版. 北京:人民卫生出版社,2018:43-44.
- [2] 汪俊云,管立人,柴君杰,等. WS 258-2006 黑热病诊断标准[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:1-3.
- [3] World Health Organization. Control of the leishmaniasis[R]. Geneva:WHO,2010:5-12.
- [4] 王兆俊,熊光华,管立人,等. 新中国内脏利什曼病流行病学与防治成就[J]. 中华流行病学杂志,2000,21(1):51-54.
- [5] 周正斌,李元元,张仪,等. 2019年我国内脏利什曼病疫情分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2020,38(5):602-607.
- [6] 韩帅,伍卫平,薛垂召,等. 2004-2016年中国内脏利什曼病疫情分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2019,37(2):189-195.
- [7] 赵桂华,屈金辉,王洪法,等. 我国不同疫区杜氏利什曼原虫 ITS-1 片段序列的多态性分析[J]. 中国病原生物学杂志,2010,5(7):520-523.
- [8] Berzunza-Cruz M, Cabrera N, Crippa-Rossi M, et al. Polymorphism analysis of the internal transcribed spacer and small subunit of ribosomal RNA genes of *Leishmania mexicana* [J]. Parasitol Res,2002,88(10):918-925.
- [9] Ghatee MA, Sharifi I, Kuhls K, et al. Heterogeneity of the internal transcribed spacer region in *Leishmania tropica* isolates from southern Iran [J]. Exp Parasitol,2014(144):44-51.
- [10] 高春花,汪俊云,杨玥涛,等. PCR 检测婴儿利什曼原虫无症状感染的研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2006,24(2):92-96.
- [11] el Tai NO, Osman OF, el Fari M, et al. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing [J]. Trans R Soc Trop Med Hyg,2000(94):575-579.
- [12] Cortes S, Rolao N, Ramada J, et al. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania s. l.*-specific kinetoplastid primers [J]. Trans R Soc Trop Med Hyg,2004(98):12-17.
- [13] 李素华,高丽君,张雅兰,等. 河南省1例输入性内脏利什曼病的实验室诊断[J]. 中国血吸虫病防治杂志,2019,31(4):456-459.
- [14] 吴云,安亦军,齐志群,等. 山西省及周边地区利什曼原虫 SSU rRNA 基因和 ITS-1 序列克隆及序列系统进化分析[J]. 寄生虫与医学昆虫学报,2021,28(1):14-22.
- [15] 李玉凤,仲维霞,赵桂华,等. 我国黑热病的流行概况和防治现状[J]. 中国病原生物学杂志,2011,6(8):629-631.
- [16] 吴观陵. 人体寄生虫学[M]. 4版. 北京:人民卫生出版社,2013:92-101.
- [17] 晁荣,王莉,朱生东,等. 儿童黑热病继发噬血细胞综合征两例并文献复习[J]. 现代医学,2021,49(4):453-456.

(下转 292 页)

- [1] Yu SH, Lee JH, Kim MC, et al. Ten-year prevalence trends of phenotypically identified community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in clinical specimens[J]. Ann Lab Med, 2021, 41(4): 386-393.
- [2] Mitevska E, Wong B, Surewaard BG, et al. The prevalence, risk, and management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Infection in diverse populations across Canada: a systematic review [J]. Pathogens, 2021, 10(4): 393.
- [3] Ou J, Bassiouni A, Drilling A, et al. The persistence of intracellular *Staphylococcus aureus* in the sinuses: a longitudinal study[J]. Rhinology, 2017, 55(4): 305-311.
- [4] 徐国超, 关若为, 朱明武, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌院内感染分布及耐药机制研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(4): 477-482.
- [5] 文强强, 刘岩, 苏子龙, 等. 金黄色葡萄球菌骨髓炎发病机制的研究进展[J]. 实用骨科杂志, 2020, 26(10): 901-906.
- [6] Jin T, He P, Yang R, et al. CHI3L1 promotes *Staphylococcus aureus*-induced osteomyelitis by activating p38/MAPK and smad signaling pathways[J]. Exp Cell Res, 2021, 403(1): 470-479.
- [7] Li Y, Liu X, Li B, et al. Near-infrared light triggered phototherapy and immunotherapy for elimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm infection on bone implant [J]. ACS Nano, 2020, 14(7): 8157-8170.
- [8] 万佳宏, 常佳伟, 魏彦琴, 等. 金黄色葡萄球菌 Agr 群体感应系统及其抗毒力治疗研究进展[J]. 中国病原生物学杂志 2020, 15(1): 115-118.
- [9] Thammavongsa V, Kim HK, Missiakas D, et al. Staphylococcal manipulation of host immune responses[J]. Nat Rev Microbiol, 2015, 13(9): 529-543.
- [10] 李雅倩, 胡同平. 金黄色葡萄球菌毒力因子的研究进展[J]. 中华医院感染学杂志, 2020, 30(17): 2712-2717.
- [11] 秦小彬, 伍晨露, 彭远义. 细菌脂蛋白功能的研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2018, 40(7): 650-656.
- [12] Carlos JS, Catherine LW, Desiree RR, et al. *Staphylococcus aureus* biofilms decrease osteoblast viability, inhibits osteogenic differentiation, and increases bone resorption in vitro [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2013, 14: e187.
- [13] Gimza BD, Cassat JE. Mechanisms of antibiotic failure During *Staphylococcus aureus* osteomyelitis[J]. Front Immunol, 2021, 12(12): e638085.
- [14] Ahmadi K, Pouladfar G, Kalani M, et al. Epitope-based immunoinformatics study of a novel Hla-MntC-SACOL0723 fusion protein from *Staphylococcus aureus*: Induction of multi-pattern immune responses[J]. Mol Immunol, 2019, 114(5): 88-99.
- [15] Phillip K, Nair N, Samanta K, et al. Maternal transfer of neutralizing antibodies to *B. burgdorferi* OspA after oral vaccination of the rodent reservoir [J]. Vaccine, 2021, 39(31): 4320-4327.
- [16] Martinon-Torres F, Gimenez-Sanchez F, Bernaola-Iturbe E, et al. A randomized, phase 1/2 trial of the safety, tolerability, and immunogenicity of bivalent rLP2086 meningococcal B vaccine in healthy infants[J]. Vaccine Res, 2014, 32(40): 5206-5211.
- [17] Mohammad M, Na M, Hu Z, et al. *Staphylococcus aureus* lipoproteins promote abscess formation in mice, shielding bacteria from immune killing[J]. Commun Biol, 2021, 4(1): 432.
- [18] Schmalzer M, Jann NJ, Ferracin F, et al. Lipoproteins in *Staphylococcus aureus* mediate inflammation by TLR2 and iron-dependent growth in vivo[J]. J Immunol, 2009, 182(11): 7110-7118.
- [19] Halladin DK, Ortega FE, Ng KM, et al. Entropy-driven translocation of disordered proteins through the Gram-positive bacterial cell wall[J]. Nat Microbiol, 2021, 6(8): 1055-1065.

【收稿日期】 2021-11-13 【修回日期】 2022-01-05

(上接 287 页)

- [18] 诸欣平, 苏川. 人体寄生虫学[M]. 9 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 217.
- [19] 管立人, 高春花. 利什曼病及其防治[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2018, 36(4): 418-424.
- [20] 张宸翌, 蔡黎. 几种罕见的可能输入性寄生虫病的风险浅析[J]. 上海预防医学, 2018, 30(5): 416-420.
- [21] Wang JY, Cui G, Chen HT, et al. Current epidemiological profile and features of visceral leishmaniasis in People's Republic of China[J]. Parasites & Vectors, 2012, 5: 31.
- [22] 周正斌, 李元元, 张仪, 等. 2015-2018 年我国内脏利什曼病疫情分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2020, 38(3): 339-345.
- [23] 段秀红. 山西省阳泉市 82 例黑热病病例回顾性调查分析[J]. 山西医药杂志, 2021, 50(13): 2019-2020.
- [24] 吴观陵. 人体寄生虫学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 102-103.
- [25] 岳凤娇, 吕建丽, 张莉, 等. 皮肤利什曼病诊断技术研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(6): 731-734.
- [26] 曾祥嫒, 官亚宜, 伍卫平. 分子生物学技术在利什曼病诊断中的应用[J]. 中国病原生物学杂志, 2014, 9(1): 92-96.
- [27] 程芳洲, 高春花, 杨玥涛, 等. 我国不同利什曼病流行区利什曼原虫分离株核糖体内转录间隔区 1 的多态性分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2019, 37(2): 196-201.
- [28] 刘东立, 王凤萍, 王安礼, 等. 陕西株利什曼原虫 ITS-1 基因片段序列多态性分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(3): 282-286.
- [29] 张鹏, 沈兆媛, 张亚萍, 等. 我国内脏利什曼病临床流行病学特征与防治研究现状[J]. 西北国防医学杂志, 2019, 40(11): 703-708.
- [30] 杜海娟, 闻礼永, 周晓农, 等. 3 种重要输入性寄生虫病的流行现状及新的挑战[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2019, 31(4): 353-355.

【收稿日期】 2021-11-04 【修回日期】 2022-02-01