

文章编号:1000-7423(2000)-04-0253-02

间接荧光抗体试验与聚合酶链反应技术 用于海南省南桥疟区流行病学的调查

(海南省热带病防治研究所,海口 570203) 柳坚 蒙锋 华德

中图分类号:R531.3 文献标识码:D

为了解不同疟区人群疟疾抗体水平和聚合酶链反应(PCR)对带虫者的检测效果,我们于1998年10月应用间接荧光抗体试验(IFAT)与PCR技术对南桥高疟区与大园村低疟区进行流行病学调查,并与镜检法对照比较。

1 材料与方法

选择南桥疟疾流行程度低的大园村(1997年带虫发病率为6.6%,疟史率为7.6%)和流行程度高的大新村(1997年带虫发病率8.6%,疟史率为27.6%)为调查点,每个调查对象采集耳垂滤纸血2份,并制备厚血膜和薄血膜各1片,滤纸血晾干置于有干燥剂的薄膜袋内,低温保存备用。

1.1 IFAT操作 参照作者等报道的改进方法^[1],采有中国预防医学科学院寄生虫病研究所制备的诺氏疟原虫抗原和上海生物制品研究所生产的荧光抗体。每批实验设阳性和阴性对照,阳性者重试并继续稀释终点滴度,以1:20为最低阳性阈值。用荧光显微镜观察结果。

1.2 PCR检测 参照蔡贤铮等和何建文等的检测方法^[2,3],滤纸干血滴用5% cheles-100提取模板DNA; *P. f.* 引物用Tirsophont等(1991)报道的PBRk1-14重复序列片断(206 bp), *P. v.* 引物用何健文等设计的ssurRNA基因序列片断(431 bp);扩增反应和产物按常规操作,于pE480型扩增仪(美国产品)进行;反应参数 *P. f.* 与 *P. v.* 均改为94℃ 2 min后,94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 60 s 32个循环后72℃ 5 min。

1.3 镜检法 血膜以姬姆萨液染色,油镜检查全片厚血膜,阳性血片由2位专业人员鉴定疟原虫虫种。对于初检结果与PCR检测结果不一致的血片,全部经复检作最后确定。

2 结果

2.1 IFAT抗体水平 大园村和大新村2个居民点共44户385人,调查≤15岁儿童121人,16岁≥成人205人,IFAT检查测低年龄组抗体阳性率为11.6%,明显低于高年龄组抗体阳性率的34.6%。但全体人群抗体阳性率均远高于上一年带虫发病率。高流行区的居民抗体水平又显著高于低流行区的居民,见表1。

表1 IFAT与镜检疟原虫的结果

地点	年龄组(岁)	调查人数	IFAT阳性率	阳性GMRT	总体GMRT	疟原虫阳性率*
大园村	1~15	64	6.5	31.8	10.6	4.7
	16~	92	25.0	52.9	14.5	7.6
合计		156	16.7	48.1	12.7	6.4
大新村	1~15	57	19.3	40.0	12.4	10.5
	16~	113	39.8	76.4	20.1	18.6
合计		170	32.6	67.3	17.5	15.9

* 为复检疟原虫阳性率

2.2 血片与PCR检测结果 两疟区调查血检经PCR检出的DNA阳性与血片检查结果见表2。血片初检疟原虫阳性率:大园和大新村依次为3.9%(6/156)和10.0%(17/170)。

前者8例和后者13例PCR初检阳性而镜检阳性,经复查血片间日疟3例,恶性疟7例,混合感染4例,余7例未查见原虫,但PCR复检仍为阳性,PCR法和镜检检测两地居民带虫率分别为13.4%(44/326)和7.1%(23/326)(血片初检),经统计学处理两者间差异具有显著性意义($t=3.8, P<0.05$)两法阳性符合率,初检为54.3%,复检达86.1%,较蔡贤铮等报道的略低^[3],这可能与带虫者原虫密度低血片易漏检有关。

表2 PCR检测与血检疟原虫结果*

村庄	检查人数	PCR检测				血片镜检*					
		阳性人数	阳性率(%)	疟原虫种(例数)		阳性人数	阳性率(%)	疟原虫种(例数)			
				<i>P. v.</i>	<i>P. f.</i>			<i>P. v.</i>	<i>P. f.</i>	混合	
大园村	156	14	9.0	4	10	0	10	6.4	4	6	0
大新村	170	30	17.5	10	15	5	27	15.9	10	15	2

* 均以复检结果统计

2.3 检测阳性者的IFAT抗体滴度 44例PCR阳性者的滴度分布见表3。

表3 PCR阳性者的IFAT抗体滴度分布

年龄组(岁)	调查人数	IFAT抗体		抗体滴度						阳性GMRT	PCR(-) IFAT(+) GMRT	PCR(+) IFAT(-) 例数 No
		例数	%	20	40	80	160	320	640			
≤15	121	7	5.8	3	0	2	2	0	0	53.8	33.6	1
≥16	205	31	15.1	7	8	6	3	4	3	76.5	64.8	5
合计	326	38	11.7	10	8	8	5	4	3	71.7	58.8	6

3 讨论

由调查结果表明疟区人群不同抗体水平与疟疾传播强度呈平行关系。疟疾流行程度低的大园村人群抗体阳性率亦低,而且1~15岁年龄组的抗体阳性率已低于5%,表明疟疾已得到有效控制,但传播尚未完全阻断。疟疾流行程度较高的大新村,人群抗体阳性率在15%以上,且1~15岁低年龄组抗体阳性率高于5%,预示疟疾未得到有效控制或处于流行后期。而两地居民IFAT阳性率均高于年带虫发病率,阳性GMRT亦低偏。表明居民因反复感染或治疗不彻底,而经多次或持久的原虫抗原刺激,其抗体阴转慢,滴度较高,这与郑昆在非稳定疟区,IFAT反映出疟疾的实际流行量远大于疫情报告发病率的调查结果相似。因此,当疟疾发病率降至低度时IFAT能客观地反映当时当地的疟疾流行水平和防治效果。

PCR技术用于疟疾临床诊断方面的研究较多,用于疟疾现场流行病学调查的报道较少。本次PCR法检测两地居民带虫率显著高于镜检法,可提高阳性带虫率6.5%。对镜检阳性或初检阴性及漏检或误诊的带虫者PCR均可检出,并

能纠正镜检法在虫种鉴别上的差错。在 PCR 检出间日疟和恶性疟混合感染 5 例中,血片初检间日疟与恶性疟各 2 例,混合感染仅 1 例,经复检后结果与 PCR 相符。镜检法不仅耗时费力,且对低密度的带虫者和混合感染者的检查甚为困难。调查结果表明 PCR 法用于疟区带虫调查较镜检法更具有特异、敏感及高效等优点。用作疟疾流行病学调查和监测具有实际意义。

由表 3 可见 PCR 检测阳性者的 IFAT 抗体滴度 $\geq 1:40$ 有 28 例,阳性 GMRT 亦较高。表明当地可能有残存病例或当年遗漏病例,因治疗不及时、不规范或未经治疗致抗体滴度下降缓慢。而 PCR 阴性 IFAT 阳性者可能是患疟疾后及时治疗,仅受微弱而短暂的疟原虫抗原刺激,抗体滴度下降较快。6 例 IFAT 阴性,PCR 仍可检出,有可能是由于早期感染未产生抗体所致。可见应用 PCR 技术结合 IFAT 监测,能发现新近感染者和搜索残存传染源,能客观地评价和考核抗疟措施

的实施效果。

本所蓝秀汉同志、南桥卫生院陈雄副院长参加现场采集血样,蔡贤铮教授指导和帮助我们完成 PCR 实验,一并致谢。

参 考 文 献

- [1] 柳坚,何贻基,邢奇芬,等.两种不同疟原虫抗原用于疟疾间接荧光抗体试验的比较.疟疾防治研究资料汇编,1986-1990:18.
- [2] 何健文,蔡贤铮,张永生,等.改良的聚合酶链反应检测间日疟原虫方法及其在海南现场的应用.中国寄生虫学与寄生虫病杂志,(待发表).
- [3] 蔡贤铮,王香凤,华德,等.聚合链反应用于海南岛疟疾流行区检测恶性疟感染的研究.第十四届国际热带医学与疟疾大会论文集,1996:11,165.
- [4] 郑昆生.人群原虫率和 IFA 试验对抗疟后人群感染疟疾情况的评价.中国寄生虫学与寄生虫病防治杂志,1983,1:7.

收稿日期:1999-01-31

(编辑:李雅卿)

文章编号:1000-7423(2000)-04-0254-01

上海市青浦区慢性和晚期血吸虫患者的病原追踪调查

(上海市青浦区疾病预防控制中心,上海 201700) 徐海燕

中图分类号:R532.21

文献标识码:D

我区消灭血吸虫病已达 16 年,其间未出现急性感染新患者、新病畜和阳性钉螺;但与我区毗邻的金山和松江地区至今仍可见残存钉螺,且随近年来人口流动频繁,本市时有极少数外源性血吸虫患者的报道。为做好血吸虫病传播阻断后的成果巩固工作,在做好外源性传染源输入监测的同时,开展了本次对血吸虫病(包括慢性血吸虫病和晚期血吸虫病,以下简称慢血和晚血)患者的病原追踪调查,旨在搞清楚其是否尚具有传染源作用。

1 对象

以我区曾经血吸虫病流行严重、且最后消灭血吸虫病(1983 年)的重固镇郑一村、郑店村和山前村 3 个村为试点,选 100 例血吸虫病患者,其中晚血患者 42 例,慢血患者 58 例。

2 方法

2.1 血吸虫病病原调查 要求每人送粪便 50 次,检查 50 次。用沉淀集卵法检查虫卵,用量杯集卵孵化法检查毛蚴。取粪便 30 g 左右,滤铜筛 40~60 目,反复换水(一般换 3 次)沉淀集卵,孵化前吸沉渣 3~4 滴涂于载玻片查虫卵(每片观察不少于 2 min)。孵化室温度为 25~30℃,分别于孵化 4、8 和 12 h 后观察毛蚴 3 次。水源为自来水加硫代硫酸钠脱氯后应用。由技术熟练的化验员操作,孵化中发现可疑水游动物,由上海市疾病预防控制中心寄生虫病防治科专业人员鉴定。

2.2 血吸虫环卵沉淀试验 由一专业人员采静脉血,另一位专业人员负责化验。

3 结果与讨论

3.1 血吸虫病病原调查 有 99 例均达 50 送 50 检(其中,

1 例达 55 送 55 检,另 1 例仅 15 送 15 检未作统计),结果沉淀集卵法检查虫卵和量杯集卵孵化法检查毛蚴均为阴性。

3.2 血吸虫环卵沉淀试验 检测 99 例,其中有 3 例环沉率 1%,余均为阴性。

高志强报道^[1],对血吸虫病基本消灭地区的 192 例患者 36 送 36 检,病原检查中反复查到第 19 次,发现全部阳性(累积阳性对象 14 例),以后检测的第 20~36 次均未发现新的阳性者。本文 99 例,连续 50 送 50 检,未发现阳性,表明我区现存的慢性和晚期血吸虫病患者已不具有传染源作用。关于血吸虫的确切寿命不详,一般认为存活期为 5~8 年,长者可达 20~30 年^[2]。我区消灭血吸虫病已 16 年,故血吸虫病患者带虫机会极小。本文环卵沉淀试验中有 3 例环沉率为 1%(环沉率 $\geq 3\%$ 为阳性阈值),余均为阴性。结合病原调查连续 50 次均为阴性,我们认为此 3 例为假阳性的可能性较大。通过本次病原调查和环卵试验结果表明,内源性慢性和晚期血吸虫病患者作为残存传染源的可能性极小。结合本市仍有外源性血吸虫患者的流入,传染源监测重点应为外来流动人口,尤其是来自血吸虫病疫区人群(包括来自疫区的居民,滞留疫区一定时间、去疫区旅游或探亲的回沪人员等)。此外,尚可以沟鼠等作为动物传染源监测来加强传染源监测的广度。

本次调查工作得到上海市疾病预防控制中心寄生虫病防治科王克泰主任等专家指导,在此表示由衷地感谢。

参 考 文 献

- [1] 高志强.血吸虫病基本消灭地区应用粪检查潜病人的实验观察.上海市寄生虫病研究所研究技术资料汇编,1972:48.
- [2] 戴白英,徐肇珏主编.传染病学.上海:上海医科大学出版社,1991:213.

收稿日期:1999-12-31

(编辑:富秀兰)