

# 应用聚合酶链反应在海南检测 间日疟原虫的效果\*

何建文<sup>1</sup> 蔡贤铮<sup>2</sup> 张永生<sup>1</sup> 王香凤<sup>2</sup> 华德<sup>2</sup> 王赛梅<sup>2</sup>

1 上海第二军医大学长海医院实验诊断科 上海 200433

2 海南省热带病防治研究所 海口 570203

**摘要** 目的: 建立适合疟疾流行区现场应用的 PCR 检测间日疟的方法, 并在现场与常规涂片镜检法进行比较。方法: 通过改良血样的采集及模板处理, 设计引物及优化反应条件等, 建立简便、敏感与特异的 PCR 检测间日疟原虫的方法, 并在海南省疟疾流行区对 310 例间日疟患者与镜检法进行比较。结果: PCR 检测间日疟原虫具有特异性, 其敏感性为 10 个原虫/ $\mu\text{l}$ 。PCR 检测和镜检法的阳性率分别为 34.2% 和 31.9%, 与 PCR 比较, 镜检法有 5 例误诊或漏诊。结论: 此 PCR 法可用于现场检测间日疟患者。

**关键词** 间日疟原虫 聚合酶链反应 检测

疟疾仍是危害我国人民健康的一大问题, 其中间日疟流行广泛, 发病率较高, 目前在现场主要检测手段仍是涂片染色镜检。该法对镜检人员技术要求较高, 检测效率低, 不利于批量标本的检测, 而且, 有时不能鉴别虫种。ParaSight-F 使用方便, 但只用于诊断恶性疟, 也有出现漏检, 且费用较高。聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 敏感、特异及可快速检测病原体, 已有报道用于检测疟原虫感染, 其敏感性比镜检法高 100~1 000 倍<sup>[1]</sup>, 但所报道的方法由于操作较为复杂<sup>[2]</sup>, 不易在现场推广。本研究通过改良 PCR 一些操作步骤, 建立了一种适合流行区现场应用的 PCR 检测间日疟原虫的方法, 并在海南省疟疾流行区应用。

## 材料与方 法

**患者** 为海南疟疾流行区乐东县保显农场和万宁南林农场医院门诊发热病人, 共 310 例, 其中男性 184 例, 女性 126 例, 年龄 7 个月~85 岁。少数民族 (黎族为主及少数苗族) 239 例, 汉族 71 例。1 年内有疟疾病史者 86 例, 曾上山住宿者 115 例。并对 *P. v.* 患者的民族、疟史和上山住宿等资料用 *U* 检验法分析。

**疟原虫分离株** 伯氏疟原虫 (*Plasmodium berghei*, *P. b.*)、约氏疟原虫 (*P. yoelii*, *P. y.*) 和食蟹猴疟原虫 (*P. cynanolti*, *P. c.*) 为海南省热带病防治研究所保种, 有 6 例间日疟原虫血为云南省疟疾防治研究所赠送。

**涂片镜检** 现场采集手指或耳垂血涂制 2 张直径为 1 cm 的厚血膜, 经姬姆萨液染色, 初检由现场检验员镜检, 复检由海南省热带防治研究所的一

名技术熟练的主管技师统一镜检。镜检每张厚血膜 100 个视野 ( $5 \times 100$ ), 若未查见原虫时, 则检测整张厚血膜。原虫密度按原虫数/100 个 WBC, 再以疟区疟疾患者的外周 WBC 平均常数为 5 300 WBC/ $\mu\text{l}$  血计算原虫数/ $\mu\text{l}$ 。

**PCR 采样及标本处理** 采手指或耳垂血在 Whatman 3 mm 滤纸上涂制 2 个直径为 1.2 cm 的血斑, 待自然干燥后, 逐个封入塑料袋中, 室温或 4℃ 保存, 待处理。处理标本时, 将血样滤纸约 8 mm<sup>2</sup> 剪下分别置于 0.5 ml 的微量离心管中, 加入 100  $\mu\text{l}$  专门配制的裂解液 [Chelex-100 (Bio-Rad)、Np-40 及 Tris-HCl 等], 充分振荡 30 s, 煮沸 10 min, 12 000 g 离心 5 min, 取上清作 PCR 扩增模板。

**PCR 引物设计** 间日疟原虫 PCR 引物设计根据 EMBL 数据库中的 *P. v.* 及 *P. c.* 的 SSU rRNA 基因序列, 用 PCGENE 软件的 PCR primer designing 程序设计, 所有引物均在上海生工生物工程公司合成。引物序列:

PV 3 5'-CGA TCA GA TACCGTCGTAA TC-3

PV 5 5'-CAACCGAA TTCA GTCCCA CGT-3

**PCR 扩增及产物鉴定** 取上述 DNA 模板 5  $\mu\text{l}$ , 分别加入各反应管中, 反应条件为 30  $\mu\text{l}$  反应体积中包括引物各 16 pmol/L, 4  $\times$  dNTP (购自上海生工生物工程公司) 各 0.2 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mmol/L、Taq DNA 聚合酶 1.0 U。将 PCR 反应液置于基因扩增仪上 (PE480 型) 94℃ 3 min 后, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 3 min, 32 个循环后, 于 72℃ 延伸 5 min。反应结束后, 取 10  $\mu\text{l}$  反应液加入 2  $\mu\text{l}$

\* 获 WHO/TDR 部分资助 (No. D920374)

溴酚蓝缓冲液, 点样于 2% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 μg/ml 溴乙锭), 经电泳 (8 V/cm) 15~ 20 min, 紫外分析仪下判断结果, 在 431 bp 处有一清晰的条带作为间日疟原虫阳性。

### 结 果

**PCR 方法的敏感性检测** 用正常人全血对高原虫密度 *P. v.* 血样进行 1:10 梯度稀释, 分别在 Whatman 3 mm 滤纸上点样, 扩增后检测 *P. v.* 的敏感性为 10 个原虫/μl (图 1)。

**PCR 方法的特异性检测** 分别用人基因组 DNA、*P. b.*、*P. y.*、*P. c.* 及海南 *P. v.* 和云南 *P. v.* 分离株, PCR 检测引物 PV 3 和 PV 5 可扩增所检测的海南和云南 *P. v.*, 与人基因组 DNA、*P. b.* 和 *P. y.* 无交叉反应, 但与 *P. c.* 可出现交叉反应 (图 2)。*P. c.* 不感染人, 对人疟的检测无影响, 但可影响对蚊体的检测。为在对蚊体的检测中应用 PCR 技术, 另根据对我国 *P. c.* 的部分基因序列测定的结果, 已设计引物可鉴别 *P. v.* 和 *P. c.*。

### 310 例发热病人的镜检法和 PCR 法检测 镜

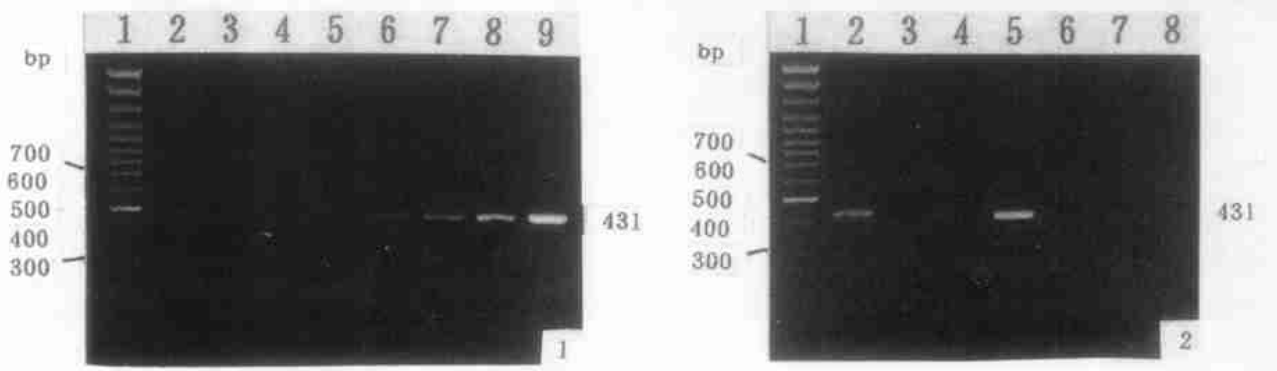


图 1 改良的 PCR 方法检测间日疟原虫的敏感性 1 DNA 分子量标志物 2 阴性对照 3 0.1 个原虫/μl 4 1 个原虫/μl 5 10 个原虫/μl 6 10<sup>2</sup> 个原虫/μl 7 10<sup>3</sup> 个原虫/μl 8 10<sup>4</sup> 个原虫/μl 9 10<sup>5</sup> 个原虫/μl 图 2 改良的 PCR 方法检测间日疟原虫的特异性 1 DNA 分子量标志物 2 食蟹猴疟原虫 3 约氏疟原虫 4 伯氏疟原虫 5 间日疟原虫 6 恶性疟原虫 (FCC1/HN) 7 人基因组 DNA 8 阴性对照

Fig 1 Sensitivity of the modified PCR for detection of Plasmodium vivax Lane 1 DNA molecular weight marker Lane 2 Negative control Lanes 3- 9 10<sup>-1</sup>- 10<sup>5</sup> parasites/μl respectively Fig 2 Specificity of the modified PCR for detection of Plasmodium vivax Lane 1 DNA molecular weight marker Lane 2 Plasmodium cynomolgi Lane 3 Plasmodium yoelii Lane 4 Plasmodium berghei Lane 5 Plasmodium vivax Lane 6 Plasmodium falciparum (FCC1/HN) Lane 7 Human genomic DNA Lane 8 Negative control

检和 PCR 检测 310 例发热病人中, 分别发现 *P. v.* 阳性者 99 例和 103 例, 其阳性率分别为 31.9% 和 33.2%, 平均原虫密度分别为 4 926 个/μl 和 4 550 个/μl, 两者的符合率为 95.2%。显示流行区专门人员的镜检技术较高, 误诊率和漏诊率很低, 但其中 5 例两法检测结果不一 (表 1)。镜检法出现的误诊或漏诊的疟疾患

(43/71) 和 25.1% (60/239), 两者间差别具有显著性意义 ( $U = 5.57, P < 0.01$ )。PCR 检测 1 年内有疟史者与 1 年内无疟史者的阳性率分别为 42.2% (38/86) 和 29.0% (65/224), 两者间差异具有显著性意义 ( $U = 2.54, P < 0.05$ )。PCR 检测有上山住宿者和无上山住宿者的阳性率分别为 46.1% (53/115) 和 25.1% (50/195), 两者间差别亦具有显著性意义 ( $U = 3.69, P < 0.01$ )。

表 1 镜检法和 PCR 法检测 5 例疟疾患者的比较

Table 1 Comparison of results of microscopy and PCR in 5 cases

例数 No. cases	检查结果 Results		PCR
	初检 First exam.	复检 Re-exam.	
2	<i>P. f.</i>	<i>P. f.</i>	混合感染 Mixed infection
1	阴性 Negative	<i>P. v.</i>	<i>P. f.</i>
1	阴性 Negative	阴性 Negative	<i>P. v.</i>
1	阴性 Negative	<i>P. f.</i>	<i>P. v.</i>

### 讨 论

PCR 检测疟原虫的实验研究方面报道已较多, 现场应用方面尚很少<sup>[3-6]</sup>。主要原因是 PCR 涉及的操作技术和实验条件的限制, 处理方法较繁琐, 提取模板效率较低, 尚需具有一定设备条件。但传统的镜检方法检测疟原虫, 由于受血片制作、染色质量及检测人员的技术水平等因素影响, 不易控制质量, 大批量标本的检测又费力费时。本文通过改良血样采集和标本处理方法, 设计特异引物, 优化反应条件等, 建立了简便的 PCR 检测 *P. v.* 的方法, 并

者的原虫密度为 636 个/μl

*P. v.* 感染与民族、疟史及上山住宿的关系 少数民族和未上山住宿者的阳性率分别为 60.6%

在现场与镜检法进行了比较。我们认为可以根据各个疟区的具体条件，作为临床诊断、疑难病例确诊和现场检测的方法。建立的方法有如下优点：用 Whatman 3 mm 滤纸采样，仅用 10 μl 手指或耳垂血，可室温运输和保存，无需抗凝血标本及试管；用 Chelex-100 匀浆等多种成分配制的裂解液可简便高效的处理标本，提取模板 DNA 的过程约 20 min，敏感性达 10 个原虫/μl 该裂解液尚可对抗凝血和未染血片标本进行处理和检测；参照国外发表的 *P. v.* 引物序列及应用国内的一些引物，发现可与 *P. b.*、*P. y.* 或 *P. c.* 有交叉反应，本研究重新设计的 PV3 和 PV5 引物适用于人间日疟原虫的检测；为简化 PCR 操作，本法将所有试剂配成反应液，使用时仅需加模板 DNA 和 TaqDNA 聚合酶即可，适合在流行区应用。

用 PCR 法检测了疟疾流行区 310 例发热病人，其中有 5 例镜检法和 PCR 法结果不一致，经复检证实镜检对混合感染者漏诊或将 *P. f.* 误诊为 *P. v.*，个别因血片原虫密度较低而漏诊。结果其敏感性和特异性均比镜检法高。提示 PCR 法可结合镜检作为现场应用的质量控制方法。Humar 等<sup>[9]</sup>报道，在 *P. v.* 患者的治疗初期 PCR 技术尚可作为预测疗效的手段，PCR 也可检测疟原虫的药物抗性。PCR 更适合对疟疾的早期检测。应用 PCR 对蚊体内的疟原虫 DNA 的检测，可为流行区的疫情预报及控制提供可靠的依据。

汉族发热病人的间日疟原虫感染率较疟区内当地少数民族的高，这可能与汉族中大多数是外来流

动人口，其易感性较高，感染机会较多有关。上山住宿者显示 *P. v.* 感染明显增高，系因当地传疟媒介大劣按蚊属野栖，上山者又缺少蚊帐等防护，致使山上的传播比村内更为严重。至于有疟史者发病较高，可能与 *P. v.* 易于复发有关。故应加强对流动人口和上山住宿者的防护措施及发病者的正规服药根治，才能更有效地控制这类地区的疟疾流行。

致谢 谨对第二军医大学管惟滨教授及海南省医学生物技术应用研究所陈历昌教授所给予的指导表示衷心的感谢

参 考 文 献

- 1 Bottius E, Guanzirolli A, Trape JF, et al Malaria: even more chronic in nature than previously thought; evidence for subpatent parasitaemia detectable by the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 15- 19
- 2 Kano S, Tsuzuki K, Inaba H, et al DNA diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria by single-tube PCR. *Kansenshogaku Zasshi* 1997; 71: 1090- 1092
- 3 Brown AE, Kain KC. *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections undetected by conventional microscopy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86: 609- 612
- 4 于洋, 何建文, 蔡龙荣, 等 用固相聚合酶链反应检测恶性疟原虫特异片段. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志* 1994; 12: 122- 124
- 5 黄天谊, 程勤, Allan Saul, 等 不同地区间日疟原虫孢子基因两侧翼 DNA 序列的比较. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志* 1994; 12: 85- 92
- 6 詹斌, 张龙兴, 王聚君, 等 聚合酶链反应(PCR)技术在恶性疟诊断中的应用. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志* 1994; 12: 37- 39
- 7 孙明林, 陈培霞, 薛采芳, 等 套式 PCR 法检测间日疟原虫的研究. *地方病通报* 1996; 11: 17- 20
- 8 高世同, 吴少廷, 陈观今, 等 间日疟原虫孢子蛋白基因片段的扩增应用于诊断间日疟感染的研究. *中国寄生虫病防治杂志* 1997; 10: 22- 26
- 9 Humar A, Harrington MA, Kain KC, et al Evaluation of a non-isotopic polymerase chain reaction-based assay to detect and predict treatment failure of *Plasmodium vivax* malaria in travelers microscopic threshold. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997; 91: 406- 409  
1998 年 5 月 8 日收稿 1999 年 6 月 21 日修回  
(编辑: 李雅卿)

## DETECTION OF PLASMODIUM VIVAX BY POLYMERASE CHAIN REACTION IN HAINAN\*

HE Jianwen<sup>1</sup>, CAIXianzheng<sup>2</sup>, ZHANG Yongsheng<sup>1</sup>, WANG Xiangfeng<sup>2</sup>, HUA De<sup>2</sup>, WANG Samei<sup>2</sup>

1 Department of Clinical Laboratory of Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433  
2 Hainan Provincial Institute of Tropical Diseases, Haikou 570203

### ABSTRACT

**AM:** To establish a modified polymerase chain reaction (PCR) method for the detection of *Plasmodium vivax* in the endemic areas of malaria and compare the method with the conventional light microscopy in the field. **METHODS:** A PCR method was modified by improving the collection procedures of blood samples, template extraction, primer design and optimizing the reaction condition. The method was evaluated by examining blood samples from 310 patients with vivax malaria and compared with the conventional light microscopy in endemic areas of Hainan Province. **RESULTS:** The positive rates of the modified PCR method and microscopic method were 34.2% and 31.9%, respectively. **CONCLUSION:** The modified PCR method is simple, sensitive and specific for the detection of vivax malaria patients in endemic areas.

**Key words:** *Plasmodium vivax*, PCR, detection

\* Supported in part by WHO/TDR grant (D 920374)

