

文章编号: 1000-7423(2008)-04-0277-04

【论著】

套式/多重 PCR 方法应用于疟疾诊断与监测的初步评价

郭传坤¹, 黎学铭¹, 林珍¹, 王光泽², 杨亚明³, 李锦辉¹, 蒋智华¹, 黄天谊^{4*}

【摘要】 目的 与镜检法比较评价标签引物-套式/多重 PCR (UT-PCR) 在疟疾监测中的应用价值。方法 在海南、云南省恶性疟和间日疟混合流行区和广西疟疾控制区的疟疾监测中, 采集初诊为疟疾或疑似疟疾的发热患者的血片与滤纸血样 400 份, 在双盲条件下比较镜检法与 UT-PCR 的初检结果, 对结果不一致的血片再次镜检复查, 同时对其滤纸血样重复 PCR 2~3 次; 评估 UT-PCR 与镜检法的敏感性和特异性。结果 400 例发热患者血样中, 镜检法初检出疟原虫阳性 234 例, 其中恶性疟 125 例, 间日疟 109 例; UT-PCR 检出疟原虫阳性 235 例, 其中恶性疟 124 例, 间日疟 109 例; 恶性疟和间日疟混合感染 2 例。两法初检结果一致的血样占 92.5% (370/400), 其中阴性 154 例, 阳性 216 例 (间日疟 117 例, 恶性疟 99 例)。复查 25 份初检结果不一致的血样, 包括镜检阴性 PCR 阳性 11 例, 镜检阳性 PCR 阴性 10 例, 镜检为恶性疟 PCR 为间日疟 3 例, 镜检为间日疟而 PCR 为混合感染 1 例, 其中 15 份与 UT-PCR 的初检结果一致, 7 份“假阳性”原因不明, 仅 3 份为 PCR 的假阴性。根据复查结果评估 PCR 的敏感性为 99.6%, 特异性为 98.8%。结论 采用更敏感的 UT-PCR 疟疾诊断方法有助于解决疟疾诊断与鉴别诊断中的疑难问题, 提高疟疾监测的质量和效率。

【关键词】 疟疾诊断; 间日疟; 恶性疟; 套式/多重 PCR

中图分类号: R531.3, R446.6 文献标识码: A

Primary Evaluation on the Application of Nested/Multiplex PCR in Malaria Diagnosis and Surveillance

GUO Chuan-kun¹, LI Xue-ming¹, LIN Zheng¹, WANG Guang-ze², YANG Ya-ming³,
LI Jin-hui¹, JIANG Zhi-hua¹, HUANG Tian-yi^{4*}

(1 Guangxi Center for Disease Control and Prevention, Nanning 530028, China; 2 Hainan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Haikou 570203, China; 3 Yunnan Provincial Institute of Parasitic Disease Control and Prevention, Puer 665000, China; 4 Guizhou Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guiyang 550004, China)

【Abstract】 **Objective** To compare the usefulness of Tag-primer nested/multiplex PCR (UT-PCR) method with microscopy in malaria diagnosis and surveillance. **Methods** 400 blood smears and blood samples on filter paper were taken from febrile patients which were initially diagnosed as malaria or suspected malaria during surveillance in mixed endemic areas of *Plasmodium falciparum* (Pf) and *P. vivax* (Pv) in Hainan and Yunnan provinces and a malaria-controlled area in Guangxi Zhuang Autonomous Region. The initial test results of both UT-PCR and microscopy for the 400 samples were compared under double blind condition. Blood smears with discrepant results between the two methods were retested by an experienced microscopist, and also repeated by UT-PCR for 2-3 times. The sensitivity and specificity of the two methods were evaluated following the Tjitra's method. **Results** Among the 400 blood samples, 234 were found plasmodium-positive by microscopy with 125 Pf and 109 Pv; 235 were positive by UT-PCR including 124 Pf, 109 Pv and 2 mixed infection. Altogether, the coincidence between the two methods stood for 92.5% (370/400), including 154 negatives and 216 positives (Pv 117, Pf 99). 25 samples with discrepancy from the initial detections were retested, which covered 11 microscopy negative and PCR positive, 10 microscopy positive and PCR negative, 3 microscopy Pf positive and PCR Pv positive, 1 microscopy Pv positive but PCR mixed infection. 15 of the 25 samples showed same UT-PCR results, 7 “false positives” and 3 “false negatives”. Therefore, the sensitivity and specificity of UT-PCR was 99.6% and 98.8% respectively. **Conclusion**

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划项目 (No. 0632007-3B)

作者单位: 1 广西壮族自治区疾病预防控制中心, 南宁 5300021; 2 海南省疾病预防控制中心, 海口 570203;

3 云南省寄生虫病防治研究所, 普洱 665000; 4 贵州省疾病预防控制中心, 贵阳 550004

* 通讯作者, E-mail: tyhuang@163.com

As a diagnosis method, UT-PCR is useful for confirmation of malaria diagnosis and differentiation of *Plasmodium* species, also for improving the effectiveness and quality of malaria surveillance.

【Key words】 Malaria diagnosis; *Plasmodium vivax*; *Plasmodium falciparum*; Nested/multiplex PCR

Supported by a Project of Guangxi Science and Technology Development (No. 0632007-3B)

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

长期以来发热患者依靠厚、薄血膜显微镜检查(镜检法)确诊疟疾。然而镜检法因其费时费力、技术要求高、检出低原虫密度和混合感染能力差、虫种鉴定困难、以及结果判断上有一定的主观性等问题,已不能完全适应检测大量样本的需要。目前,许多报道^[1-10]证明套式 PCR 检出疟原虫的敏感性优于镜检法,但由于操作复杂以及特异性和稳定性等问题有待解决,尚难推广应用。因此,作者在前期工作^[10]的基础上对实验进行了优化,在保持高度敏感性的同时提高了特异性和稳定性,初步达到试剂盒的要求。本研究在疟疾流行区和已控制地区的疟疾监测中,使用镜检法与标签引物-套式/多重 PCR(UT-PCR)检测恶性疟和间日疟,并对其结果进行比较评估。

材料与方法

1 标本来源

2004-2006 年在恶性疟与间日疟混合流行区海南省的三亚、东方和乐东三市(县),云南省瑞丽县,及疟疾控制区的广西壮族自治区的全州、陆川和龙州等 3 县,在疟疾监测的被动侦察过程中,采集初诊疟疾患者或疑似疟疾发热病人的厚、薄血片和滤纸血样共 400 份。同一患者的血片与滤纸血样实行同一编号,滤纸血样自然干燥后密封于薄膜袋内;血片由当地县疾控中心专业人员染色、镜检,并将血片及镜检结果邮寄至实验室备用。

2 显微镜检查

所有血片初检由当地有经验镜检员按常规吉氏液染色,检查 200 个油镜视野,记录有无原虫,并判定虫种。海南样本的初检结果由海南省寄生虫病研究所专家核查,其中部分阳性血片进行原虫计数。UT-PCR 与镜检结果不一致的血片,由广西 CDC 专家在未知 UT-PCR 结果的情况下,复查 200 个视野并记录原虫数和白细胞数,按以下公式估算每微升血中的原虫数=(原虫数/白血球数)×6 000;如 200 个视野内未见原虫,则继续镜检全片以判定有无原虫。

3 UT-PCR 检测

按文献^[10]的方法制备滤纸血模板 DNA,进行

UT-PCR 试验,试剂组成和反应程序(温度/时间)参见文献^[10]。每次试验设阳性对照(确诊的恶性疟和间日疟患者血样)和阴性对照(健康人血样)各一。

4 PCR 扩增产物的分析与鉴定

取 10 μl UT-PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外仪(WD-9403C,北京市六一仪器厂)观察并照相。根据恶性疟和间日疟的特异引物序列重新合成测序引物 F1: 5'-TAAGAAGCTCTATAAATAACCAGACT-3', V1: 5'-GCAAGTGTAAACATGCTGTCATACATGATGCACT-T-3';恶性疟和间日疟阳性血样的 UT-PCR 扩增产物各一(H196 和 D33),应用 DNA 纯化试剂盒(上海生物工程技术有限公司)提纯 DNA,送至捷瑞生物工程(上海)公司测序,使用 ABI3730XL-DNA 测序仪(Applied Biosystems,美国应用生物系统公司)测序。

5 统计学分析

用 Office2003 Excel 进行统计分析,按照文献^[4]的评估方法,测量的变量包括:真阳性数(TP),即镜检与 PCR 均阳性者;真阴性数(TN),即镜检与 PCR 均阴性者;假阳性数(FP),即镜检阴性而 PCR 阳性者;假阴性数(FN),即镜检阳性而 PCR 阴性者。性能指标包括:敏感性,为 $[TP/(TP+FN)]$;特异性,为 $[TN/(TN+FP)]$;阳性预测值,为 $TP/(TP+FP)$;阴性预测值,为 $TN/(TN+FN)$ 。试验准确性,为 $[(TP+TN)/试验样本总数]$,可靠性,为 J 指数= $[(TP \times TN) - (FP \times FN)] / [(TP+FN) \times (TN+FP)]$ 。

结 果

1 扩增产物鉴定

所有恶性疟原虫(Pf)阳性血样均扩增出长约 611 bp 特异条带,间日疟原虫(Pv)阳性血样扩增的特异条带长约 255 bp。H196(Pf)和 D33(Pv)两份阳性血样扩增产物的测序结果,分别获得可读序列 522 bp 和 175 bp(不含引物序列)均与相应的(Pf, Pv) *cox1* 基因设计扩增的序列完全吻合。

2 UT-PCR 与镜检法初检结果的比较

400 例发热病人血样中, 镜检法初检疟原虫阳性者 234 例, 其中 Pf 125 例, Pv 109 例; UT-PCR 检出疟原虫阳性者 235 例, 其中 Pf 124 例, Pv 109 例; Pf 和 Pv 混合感染 2 例。两法检测结果一致的血样 370 份, 其中阴性 154 例, 阳性 216 例 (间日疟 117 例, 恶性疟 99 例)(表 1)。原虫计数的 167 份阳性血片统计结果(表 2)显示, 低密度血片(1~499 个/ μl)占总阳性血片的 15.0%(25/167)。

表 1 400 份血样镜检与 UT-PCR 结果比较

Table 1 Comparison of UT-PCR and microscopy in examining 400 blood samples

镜检法 Microscopy	UT-PCR Tag-primer nested/multiple PCR				合计 Total
	恶性疟 Pf	间日疟 Pv	混合感染 Pf+Pv	阴性 Negative	
恶性疟 Pf	117	5	1	2	125
间日疟 Pv	2	99	1	7	109
混合感染 Pf+Pv	0	0	0	0	0
阴性 Negative	7	5	0	154	166
合计 Total	126	109	2	163	400

表 2 167 例血检阳性现症患者原虫血症*

Table 2 Parasitemia of 167 positive patients*

原虫数/ μl 血 Parasites/ μl blood	恶性疟原虫 <i>Plasmodium falciparum</i>		间日疟原虫 <i>Plasmodium vivax</i>		合计 Total	
	例数 No.	构成比(%) Proportion	例数 No.	构成比(%) Proportion	例数 No.	构成比(%) Proportion
$\geq 10\ 000$	56	54.4	8	12.5	64	38.2
1 000~9 999	37	35.9	24	37.5	61	36.5
500~999	5	4.9	12	18.8	17	10.2
100~499	3	2.9	17	26.6	20	11.8
1~99	2	1.9	3	4.7	5	3.0
合计 Total	103	100	64	100	167	100

注: * 234 例疟原虫阳性病例中仅 167 例计数原虫。

Note: * Parasite density calculated in 167 out of 234 plasmodium positive cases.

3 UT-PCR 与镜检法的效率性能比较

按 Tjitra 等^[1]评估方法, 以镜检法初检结果为参考标准, UT-PCR 初检的各项性能指标在 88%~96% 之间。若以两法各自初检与复查结果相比较, UT-PCR 的各项性能指标均在 98% 以上, 而镜检法在 91%~96% 之间, 显示 UT-PCR 的可重复性优于镜检法(表 3)。

4 复查结果

30 份两法检测结果不一致血片(其中 5 份血片缺失)中, 15 份的复查结果支持 UT-PCR 初检结果, 其中 4 份“假阳性”复查证实为镜检初检误判(Pv 3 份, Pf 1 份); 7 份“假阴性”复查未见疟原虫证实镜检初检漏检; 3 份镜检初检为 Pf, UT-PCR 初检为 Pv 的血片, 复查见 Pv 大滋养体证实为镜检初检误判; 1

表 3 UT-PCR 与镜检法检测发热患者血样的效率评估

Table 3 Evaluation on UT-PCR and microscopy in testing blood samples of febrile patients

效率性能 Performance character	UT-PCR 初检* UT-PCR initial test	UT-PCR 复查** UT-PCR retest	镜检法复查** Microscopy retest
敏感性 Sensitivity	96.0%	99.6%	96.0%
特异性 Specificity	88.0%	98.8%	94.7%
阳性预期值 Positive predictive value	91.1%	99.1%	96.0%
阴性预期值 Negative predictive value	94.5%	99.4%	94.7%
试验准确性 Accuracy	92.5%	99.2%	93.7%
J 指数 J index	0.84	0.98	0.91

注: * 参考镜检初检结果, ** 参考各自初检结果。

Note: * Related to initial test of microscopy, ** Related to the initial test of the responded method.

份镜检初检为 Pv 而 UT-PCR 检出混合感染, 复查见 Pv 和 Pf 两种疟原虫证实为镜检初检误判。其余 10 份血片的复查结果为, 6 份“假阳性”和 1 份“假阴性”血片复查维持初检结果, 但 UT-PCR 复查 2~3 次亦维持初检结果, 原因不明; 仅 3 份“假阴性”复查见疟原虫, 证实为 UT-PCR 初检误判。

讨 论

传统镜检法的局限性以及熟练镜检人员的缺乏导致疟疾病例的确诊与鉴别诊断困难, 成为疟疾监测中新的挑战。Coleman 等^[6]报告在泰国西部疟疾主动侦察血片中, <250 个/ μl 的低密度(无症状)带虫者约占阳性总数的 76.2%~90%。然而即使是有经验的专业镜检员检测原虫低密度样本, 镜检的敏感性和特异性也会显著下降。因此, 使用传统的镜检法作“金”标准已难于评价效率较高的诊断方法^[4-6]。

本文用镜检法和 UT-PCR 检测 400 份疟疾监测发热病人血样, 两法初检结果一致的样本占 92.5% (370/400)。Tjitra 等^[1]的评估方法以镜检法初检结果为参考标准, 两法结果不一致时即视为“假阳性”或“假阴性”, 由此计算 UT-PCR 的敏感性(96.0%)和特异性(88.0%)均低于镜检法(100%)。但两法结果不一致血片的复查结果显示, 多数(15/25)属于镜检法的误判, 仅 3 份“假阴性”血样证实为 PCR 初检错误, 其余 7 份两法复查结果均维持原判。若以比较两法的可重复性判定优劣^[6], 将各自的初、复检结果进行比较以检验其可重复性, 结果显示 UT-PCR 的可重复性(敏感性 99.6%, 特异性 98.8%)高于镜检法(敏感性 96.0%, 特异性 94.7%)。本研究检测对象的原虫密度

较高, 74.7%大于 1 000 个/μl, 两法检测结果不一致的比例较低, 镜检法误诊漏检率为 6.4%(15/234), 如在常规监测低密度带虫比例较高时, 镜检法误诊(或漏检)的情况会更加严重。

UT-PCR 法使用的 D1、D2 两管试剂, 包括除 *Taq* DNA 酶外的全部试剂, 采用简易的滤纸采样和模板 DNA 制备法, 试验步骤简化为单管 2 步扩增, 试剂和耗材仅为常规套式 PCR 的 1/3~1/5^[10], 费用大幅度下降, 2 步反应时间缩短为 3 h 40 min, 能够同时检出恶性疟原虫和间日疟原虫。只要具备 PCR 仪和电泳仪, 普通实验室即可完成套式/多重 PCR, 进行疟疾的确诊和鉴别诊断。特别适用于疟疾监测、防治研究和药物疫苗研究中检测大量样本, 可提高疟疾监测的效率和质量。

参 考 文 献

[1] Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, et al. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections[J]. Mol Biochem Parasitol, 1993, 58(2): 283-292.

[2] Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction[J]. Mol Biochem Parasitol, 1993, 61(2): 315-320.

[3] Zaman S, Tan L, Chan HH, et al. The detection of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in DNA-extracted blood samples using polymerase chain reaction [J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2001, 95(4): 391-397.

[4] Ndao M, Bandyayera E, Kokoskin E, et al. Comparison of blood

smear, antigen detection, and nested-PCR methods for screening refugees from regions where malaria is endemic after a malaria outbreak in Quebec, Canada[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(6): 2694-2700.

[5] Johnston SP, Pieniazek NJ, Xayavony MV, et al. PCR as a confirmatory technique for laboratory diagnosis of malaria[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(3): 1087-1089.

[6] Coleman RE, Sattabongkot J, Promstaporm S, et al. Comparison of PCR and microscopy for the detection of asymptomatic malaria in a *Plasmodium falciparum*/*vivax* endemic area in Thailand [J]. Malaria J, 2006, 5(1): 121-127.

[7] José RC, Martha M, Simone LA. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection—a review. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2006, 101(3): 229-237.

[8] Rodulfo H, Donato MD, Mora R, et al. Comparison of the diagnosis of malaria by microscopy, immunochromatography and PCR in endemic areas of Venezuela [J]. J Med Biol Res, 2007, 40(4): 535-543.

[9] Huang TY, Wang SH, Li XM, et al. Tag primer-nested/multiplex PCR for detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2005, 23(3): 140-142. (in Chinese)
(黄天谊, 王世海, 黎学铭, 等. 标签引物-套式/多重 PCR 检测恶性疟原虫和间日疟原虫的研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(3): 140-142.)

[10] Guo CK, Li XM, Li JH, et al. Sensitivity, specificity and stability of the Tag-primer nested/multiplex PCR for malaria diagnosis [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2007, 25(3): 213-216. (in Chinese)
(郭传坤, 黎学铭, 李锦辉, 等. 套式/多重 PCR 诊断疟疾的敏感性、特异性和稳定性初探[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25(3): 213-216.)

[11] Tjitra E, Suprianto S, Dyer M, et al. Field evaluation of the ICT malaria P.f/P.v immunochromatographic test for detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in patients with a presumptive clinical diagnosis of malaria in eastern Indonesia [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(8): 2412-2417.

(收稿日期: 2007-12-28 编辑: 杨频)

(上接第 276 页)

法(左氧氟沙星和甲基强地松龙及大量液体对症治疗), 体温下降 2 d 后给予维持治疗方案。由于作者等在利比里亚维和二级医院执行任务期即将结束, 且所携带驱虫药物已用完, 故该患者在入院后第 5 天转送至其首都蒙罗维亚的约旦维和三级医院继续治疗。

讨 论

粪类圆线虫是一种广泛分布于热带和亚热带地区的肠道线虫, 感染人体机率很低(约 2%以下), 国内仅有散在的报道^[1]。该虫常定居于小肠, 还可定居于肺部, 寄生肺部的雌虫, 侵入支气管产卵, 孵出杆状蚴随痰排出^[2]。严重感染可致多个脏器受损, 甚至危及生命^[3]。

机体免疫力低下和应用免疫抑制剂是粪类圆线虫重症感染的主要因素。粪类圆线虫轻度感染可无任何症状, 但 HIV 感染者自身免疫力低下, 使粪类圆线虫在体内大量繁殖, 加重了患者的营养不良。本例患者可能在出国前已感染 HIV, 在赴利比里亚维和期间发病, 表现为体重锐减。通常罹患肠道粪类圆线虫感染者可出现灼烧样腹痛伴有腹泻, 粪便隐血等。但该患者却无明显的临床症状, 粪便隐血试验为阴性, 易被漏诊或误

诊。另外, 该患者肺部症状较重, X 线显示肺部炎性病变, 但其无痰, 故未做痰检, 但不排除肺部感染粪类圆线虫杆状蚴。本文提示 HIV 感染者, 在积极治疗原发病的同时, 应注意预防粪类圆线虫感染。

参 考 文 献

[1] Hu JY, Tong ZM. The report of one case infection of *Strongyloides stercoralis* [J]. Chin J Parasit Dis Control, 2003, 16(4): 228-228. (in Chinese)
(胡建雁, 汤中敏. 粪类圆线虫病 1 例 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2003, 16(4): 228-228.)

[2] Peng WW. Contemporary zymotic disease and infection [M]. Beijing: Science and Technology Publishing House, 2000. 1640-1642. (in Chinese)
(彭文伟. 现代感染疾病与传染病 [M]. 北京: 科技出版社, 2000. 1640-1642.)

[3] Zhong ZY, Liu JM. Infection of *Strongyloides stercoralis* (two cases report and literature review)[J]. Guangxi Med J, 2001, 6(23): 645-647. (in Chinese)
(赵子瑜, 刘家明. 粪类圆线虫感染(附 2 例报告并文献复习)[J]. 广西医学, 2001, 6(23): 645-647.)

(收稿日期: 2007-06-05 编辑: 盛慧锋)