

复式 PCR 检测恶性疟原虫与间日疟原虫的研究

陈 姝¹ 陆惠民¹ 高 琪² 唐学恒¹

1 苏州医学院寄生虫学教研室 苏州 215007
2 江苏省寄生虫病防治研究所 无锡 214064

提要 目的: 建立在同一次扩增中即可鉴别患者感染的疟原虫虫种的复式 PCR 检测方法。方法: 根据恶性疟原虫 (*P. f.*) 中度重复基因序列 pBRK1-14 和间日疟原虫 (*P. v.*) 线粒体细胞色素 C 氧化酶基因 CO III 合成引物, 采用经优化的 PCR 反应体系, 对疟原虫 DNA 模板进行扩增。结果: *P. f.* 与 *P. v.* 分别被扩增出 206 和 370 bp 大小的 DNA 片段, 与人白细胞 DNA 无交叉; 用该反应体系至少可检测出原虫血症为 5×10^{-7} 的 *P. f.* 感染和 1.02×10^{-6} *P. v.* 感染; 自云南疟疾流行区采集的 783 份滤纸干血滴样本中, 复式 PCR 法阳性检出率为 85.8%, 误诊率为 0, 漏诊率为 0.1%, 而镜检法依次分别为 84.9%、3.1% 和 1.0%, 两者符合率为 95.8%。结论: 本复式 PCR 检测疟原虫较镜检敏感、特异, 适用于我国恶性疟与间日疟混合流行区的疟疾诊断、流行病学调查、药物的疗效考核和献血员的筛选等。

关键词 复式 PCR 检测 恶性疟原虫 间日疟原虫

聚合酶链反应 (PCR) 技术具有敏感、特异、简便和快速的特点, 已广泛用于病原生物的检测。90 年代国内外学者开始将 PCR 技术应用于疟疾诊断研究, 现已可特异地检测出血样内的 4 种疟原虫, 其敏感性与特异性已超过或至少达到镜检水平。但多数研究只采用单一 PCR 检测恶性疟原虫 (*P. f.*) 或间日疟原虫 (*P. v.*)^[1-7], 对复式 PCR 同时检测 *P. f.* 与 *P. v.* 仅作了初步尝试^[8,9]。本研究在选用经过筛选的引物及样本处理方法的基础上(另文发表), 调整与优化反应体系, 建立了在同一扩增反应中可检测出 *P. f.*、*P. v.* 及两者混合感染的复式 PCR 检测技术, 并试用于患者的诊断。

材料与方 法

样本收集 1992 年采集云南西双版纳疟疾流行区镜检阳性的恶性疟或间日疟患者静脉血样 138 份, 肝素抗凝, -20℃ 低温保存; 1997 年自云南勐腊县疟疾流行区采集镜检阳性的恶性疟或间日疟患者及发热待查患者滤纸血样 783 份, 采集本院健康学生滤纸血样 80 份。滤纸血样的采集为取耳垂血 2~3 滴, 分别滴于普通新华滤纸上, 室温待干, 封存于塑料薄膜袋内, 室温保存。按常规方法进行 *P. f.* FCC/YN 株体外培养, 俟原虫血症约 5% 时, 收集原虫; 自云南勐腊县采集镜检阳性的间日疟患者肝素抗凝静脉血样 2 份, 行原虫计数。以正常人血按 1:10 倍比稀释, 用于反应体系敏感度检测。

引物 根据 *P. f.* 中度重复基因序列 pBRK1-14 和 *P. v.* 线粒体细胞色素 C 氧化酶基因 CO III 设计。

P. f. 引物上游序列为:

5'-GCTACA TATGCTA GTTGCCA GAC-3'
下游序列为:

5'-CGTGTACCA TACA TCCTACCAAC-3'^[8]

P. v. 引物上游序列为:

5'-GTA TCTTA TCCTTCA TTAACA TC-3'
下游序列为:

5'-CTA GAAA TTTCTAAACTCA TTCC-3'

(马来西亚医学研究所 Patricia Lim Kim Chooi 惠赠)。

PCR 模板的制备 滤纸干血滴样本: 取直径约 1 cm 大小的滤纸干血滴 (约相当于 15 μ l 全血) 置 1.5 ml 离心管内, 加 400 μ l 生理盐水溶血, 室温下置 15 min, 弃溶血液; 加 400 μ l 双蒸水洗涤, 弃洗涤液; 加 100 μ l 双蒸水, 沸水浴 10 min, 上清备用。

抗凝静脉血样本: 按 Tran Van Be 等方法^[9], 稍作改进。取抗凝静脉血 20 μ l, 置 1.5 ml 离心管内, 加 200 μ l 裂解液 (0.2% NaCl, 1% Triton X-100, 1 mmol/L EDTA), 混悬数秒; 7 500 g 离心 5 min, 弃上清; 加 500 μ l 洗涤液 (10 mmol/L Tris-HCl pH 8.4, 50 mmol/L KCl, 0.1% Triton X-100), 混匀, 7 500 g 离心 5 min, 弃上清; 加 100 μ l 双蒸水, 沸水浴 10 min, 上清备用。

PCR 扩增 复式 PCR: 取上述经处理的上清 20 μ l 加入总体积为 40 μ l 的反应体系中。包括 1 \times PCR buffer (10 mmol/L Tris-HCl pH 8.4, 50 mmol/L KCl, 0.1% Triton X-100); *P. f.* 引物各 0.15 μ mol/L, *P. v.* 引物各 0.5 μ mol/L; 1 U Taq 聚合酶 (上海普洛麦格生物公司产品)。覆盖 30 μ l 石

蜡油后, 置 PCR 扩增仪 (国产, 90AD 型) 在 94 变性 45 s, 55 退火 45 s, 72 延伸 45 s 条件下扩增 35 个循环, 最后一个循环的延伸为 5 min。

单一 PCR: 将样本处理上清 20 μl 加入总体积为 40 μl 的反应体系中。包括 1× PCR buffer, 1.5 mmol/L MgCl₂, dATP、dCTP、dGTP 及 dTTP 各 50 μmol/L, *P. f.* 引物各 0.1 μmol/L (或 *P. v.* 引物各 0.4 μmol/L; 0.8 U Taq 聚合酶。扩增循环参数同上。

PCR 产物电泳检测 取 12 μl PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 μg/ml 溴化乙锭) 电泳, 置紫外透射仪观察, 摄影记录。

复式 PCR 反应体系的优化 取一混合感染患者样本处理上清 20 μl 作为 PCR 扩增模板。在复式 PCR 反应体系中, 只改变 *P. f.* 引物浓度, 以 0.2 μmol/L 递增 (0.1 μmol/L, 0.3 μmol/L, 0.5 μmol/L,

0.7 μmol/L) 分别进行 PCR 扩增, 根据电泳结果, 确定引物的大概浓度后, 再在此浓度上下, 以 0.05 μmol/L 递增或递减几个浓度来确定引物的最适浓度。按此方法, 依次进行 *P. v.* 引物、dNTPs、Mg²⁺ 及 Taq 酶量等的优化。

结 果

复式 PCR 反应体系优化的结果 *P. f.* 引物最适浓度为 0.15 μmol/L, 低于此浓度扩增产物量降低, 高于此浓度扩增产物量无明显增加, 相反, 增加了引物二聚体形成的机率; *P. v.* 引物最适浓度为 0.5 μmol/L, 低于此浓度扩增产物量下降明显, 甚至无明显扩增带; 最适 Mg²⁺ 浓度为 2.5 mmol/L, 低于此浓度, *P. f.* 扩增产物量无明显减少, 而 *P. v.* 产物量下降明显, 甚至不能见到明显的扩增条带 (图 1); 最适 dNTP 浓度各为 100 μmol/L, Taq 酶量为 1 U。

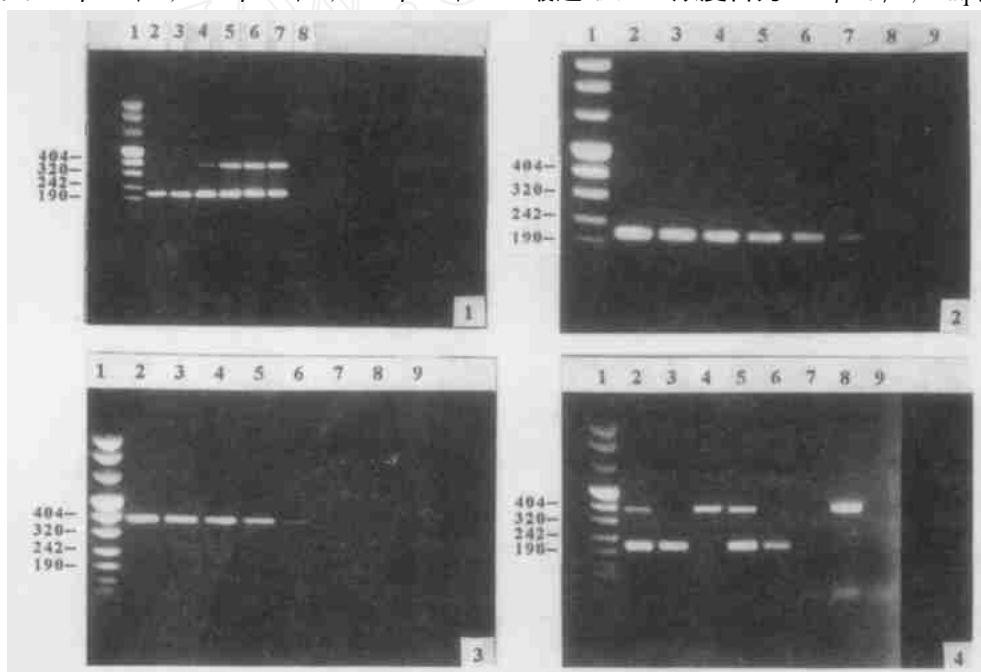


图 1 Mg²⁺ 浓度对复式 PCR 反应的影响 1 DNA 标准分子量标志物 2 1.0 mmol/L Mg²⁺ 3 1.5 mmol/L Mg²⁺ 4 2.0 mmol/L Mg²⁺ 5 2.5 mmol/L Mg²⁺ 6 3.0 mmol/L Mg²⁺ 7 3.5 mmol/L Mg²⁺ 8 阴性对照 图 2 复式 PCR 检测恶性疟原虫感染的敏感性 1 DNA 标准分子量标志物 2 原虫血症 5% 恶性疟原虫培养血样 3~8 培养血样 1 10 梯度稀释 9 阴性对照 图 3 复式 PCR 检测间日疟原虫感染的敏感性 1 DNA 标准分子量标志物 2 原虫血症 1.02% 感染血样 3~8 感染血样 1 10 梯度稀释 9 阴性对照 图 4 现场血样样本的复式 PCR 检测结果 1 DNA 标准分子量标志物 2 阳性对照 3, 6 *P. f.* 感染 4, 8 *P. v.* 感染 5 混合感染 7 正常人 9 阴性对照

Fig. 1 Effect of Mg²⁺ concentration on the multiplex PCR 1 DNA molecular weight marker 2 1.0 mmol/L Mg²⁺ 3 1.5 mmol/L Mg²⁺ 4 2.0 mmol/L Mg²⁺ 5 2.5 mmol/L Mg²⁺ 6 3.0 mmol/L Mg²⁺ 7 3.5 mmol/L Mg²⁺ 8 negative control Fig. 2 Sensitivity of the multiplex PCR method in detection of *P. f.* infection 1 DNA molecular weight marker 2 5% parasitemia in *P. f.* cultured blood 3-8 series dilution (1/10) of *P. f.* cultured blood 9 negative control Fig. 3 Sensitivity of the multiplex PCR method in detection of *P. v.* infection 1 DNA molecular weight marker 2 1.02% parasitemia in *P. v.* infected blood 3-8 series dilution (1/10) of *P. v.* infected blood 9 negative control Fig. 4 Typical agarose gel electrophoresis pattern of multiplex PCR products from field-collected samples 1 DNA molecular weight marker 2 positive control 3, 6 *P. f.* infection 4, 8 *P. v.* infection 5 mixed infection 7 normal blood sample 9 negative control

敏感性 将原虫血症为 5% 的 *P. f.* 培养血, 以正常人血按 1 : 10 倍比稀释, 经复式 PCR 分别扩增, 稀释至 5×10^{-7} 时, 均仍可见清晰的扩增条带, 表明该复式 PCR 体系至少可检测出原虫血症为 5×10^{-7} 的 *P. f.* 感染水平 (图 2), 其敏感度与单一 PCR 一致, 且复式 PCR 反应体系中加入 *P. v.* 模板, 不影响其检测 *P. f.* 的敏感度。

将原虫血症为 1.02% 的间日疟患者血样, 以正常人血按 1 : 10 倍比稀释, 至 1.02×10^{-6} 时, 复式 PCR 与单一 PCR 均仍可见清晰的扩增条带, 表明该复式 PCR 体系至少可检测出原虫血症为 1.02×10^{-6} 的 *P. v.* 感染水平 (图 3), 其敏感度与单一 PCR 一致, 且复式 PCR 体系中加入 *P. f.* 模板, 不影响其检测 *P. v.* 的敏感度。

特异性 在复式 PCR 反应体系中加入培养 *P.*

f. 的模板, 只被扩增出 1 条 206 bp 的 DNA 条带; 加入间日疟患者血样模板, 只被扩增出 1 条 370 bp 的 DNA 条带; 同时加入 *P. f.* 与 *P. v.* 模板, 则被扩增出 206 bp 和 370 bp 两条扩增条带; 而加入正常人血模板和空白对照, 均无特异性扩增条带。

复式 PCR 检测现场血样本的结果 采用复式 PCR 法检测 783 份采集云南疟疾流行区的滤纸干血滴样本, 并与镜检结果比较 (表 1)。复式 PCR 法阳性率为 85.8% (672/783), 误诊率为 0, 漏诊率为 0.1% (1/783); 而镜检法阳性率为 84.9% (665/783), 误诊率为 3.1% (24/783), 漏诊率为 1.0% (8/783), 两者符合率为 95.8% (750/783)。复式 PCR 检测 138 份 5 年前采集的抗凝静脉血样本与镜检法符合率为 94.9%, 镜检法误诊率 5.1%; 80 份正常人血样全部阴性 (图 4)。

表 1 复式 PCR 检测现场血样本与镜检法结果比较

Table 1 Comparison of results of microscopy and multiplex PCR for the detection of field-collected blood samples

| 复式 PCR Multiplex PCR | 显微镜检查 Examination by microscopy | | | | 总计 Total |
|-------------------------|---------------------------------|---------------------|-------------------------|----------------|-------------|
| | 恶性疟 <i>P. f.</i> | 间日疟 <i>P. v.</i> | 混合感染 Mixed infection | 阴性 Negative | |
| 恶性疟 <i>P. f.</i> | 285 | 13* | 0 | 3* | 301 |
| 间日疟 <i>P. v.</i> | 4** | 353 | 0 | 5** | 362 |
| 混合感染 Mixed infection | 5*** | 2*** | 2 | 0 | 9 |
| 阴性 Negative | 0 | 1** | 0 | 110 | 111 |
| 总计 Total | 294 | 369 | 2 | 118 | 783 |

* 镜检复查为 *P. f.* 感染 *P. f.* positive upon microscopic re-examination

** 镜检复查为 *P. v.* 感染 *P. v.* positive upon microscopic re-examination

*** 镜检复查为 *P. f.* 与 *P. v.* 混合感染 *P. f.* and *P. v.* positive upon microscopic re-examination

讨 论

我国南方边陲地区及安徽等疟疾流行区为间日疟与恶性疟混合流行区, 其它各地亦有输入型恶性疟的存在。单一 PCR 检测 *P. f.* 或 *P. v.* 需分别进行, 操作繁复, 不能适应混合流行区的检测需求, 因此建立在同一次 DNA 扩增中即可鉴别患者感染的疟原虫虫种的复式 PCR 检测方法已是当务之急。

复式 PCR 在同一反应体系中同时使用多对引物, 每对引物针对不同病原体的靶序列, 不同引物介导的扩增产物在长度上有明显差别, 从而实现一步扩增法诊断多种疾病。国内外学者在采用复式 PCR 检测 *P. f.* 与 *P. v.* 方面做了初步的探索。Tran Van Be^[9]等在单一 PCR 反应体系中同时加入 *P. f.* 与 *P. v.* 引物, 发现其检测 *P. f.* 的敏感度较单一 PCR 有所降低, 无法在现场应用; Tirasophon 等^[8]将 $1 \times$ PCR buffer (含 Mg^{2+}) 改为 $2 \times$ PCR buffer,

尽管有敏感度高的特点, 但特异性欠佳, 且扩增产物片段仅相差 23 bp。结果均不太理想。本研究在引物筛选的基础上, 选用的 *P. f.* 与 *P. v.* 引物, 其扩增产物片段相差 164 bp, 便于结果分析。并对反应体系中的引物浓度、 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度等进行调整与优化, 使复式 PCR 反应体系处于最佳反应状态。结果表明, 引物浓度, 特别是 Mg^{2+} 浓度较单一 PCR 需适当增加, 达到一定的浓度, 方可使复式 PCR 同时对 *P. f.* 与 *P. v.* 进行有效扩增。否则, 则严重影响扩增产物量, 而使敏感度下降。可能原因是因为 DNA 模板、引物及 dNTP 的磷酸基均可与 Mg^{2+} 结合, 而复式 PCR 反应体系中引物、dNTP、Taq 酶等的浓度较单一 PCR 为高, 降低了 Mg^{2+} 的实际浓度, 而 Mg^{2+} , 且游离状态的 Mg^{2+} 是 Taq 酶活性所必需的。

检测 783 份现场滤纸干血滴样本, 复式 PCR 法与镜检法符合率为 95.8%。但有 13 份镜检为 *P. v.*,

而复式 PCR 法检测为 *P. f.* , 4 份镜检为 *P. f.* , 而复式 PCR 为 *P. v.* , 经镜检复查, 结果与复式 PCR 一致。显微镜检查, 特别是在原虫发育阶段的早期, 易造成误诊。8 份镜检为阴性, 而复式 PCR 法 3 份为 *P. f.* , 5 份为 *P. v.* , 延长镜检时间, 均找到疟原虫。在低原虫密度时, 镜检易造成漏诊。5 份镜检为 *P. f.* , 2 份为 *P. v.* , 而复式 PCR 法为混合感染。显微镜检查, 特别是 1 个虫种占优势, 而另 1 个虫种相对较少时, 不容易发现混合感染。1 份镜检为 *P. v.* , 而复式 PCR 法为阴性, 镜检复查为 *P. v.* , 复式 PCR 仍为阴性, 其原因尚不完全清楚。显然, 复式 PCR 法较镜检更为敏感、特异, 且可发现更多的混合感染。1 份样本从处理、PCR 扩增到电泳分析结果仅需 2 h, 且可批量地集中在实验室进行, 具有比镜检更简便的优点。此外, 复式 PCR 经 1 次扩增即可鉴别虫种及混合感染, 其敏感度与单一 PCR 一致, 避免了单一 PCR 的重复操作, 节省成本费用及时间一半以上。

综上所述, 本研究建立了一种敏感、特异、简易、快速的复式 PCR 方法, 可同时检测 *P. f.* 与 *P. v.* , 尤其适用于我国恶性疟与间日疟混合流行区的疟疾诊断, 在相当程度上取代镜检, 提高工效和准确性, 并可望用于疟疾的流行病学调查, 药物的

疗效考核和献血员的筛选等。

参 考 文 献

- 1 Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, et al High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of the nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 61: 315- 320
- 2 Tirasophon W, Ponglikitmongkol M, Wilairat P, et al A novel detection of a single *Plasmodium falciparum* in infected blood. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 175: 179- 184
- 3 Sethabutr O, Brown AE, Panyim S, et al Detection of *Plasmodium falciparum* by polymerase chain reaction in a field study. *J Infect Dis* 1992; 166: 145- 148
- 4 Zalis MG, Banic DM, Akrim W, et al Malaria diagnosis: standardization of a PCR for the detection of *P. f.* parasites in individuals with low-grade parasitemia. *Parasitol Rec* 1996; 82: 612- 616
- 5 Kain KC, Brown AE, Mirabelli L, et al Detection of *Plasmodium vivax* by polymerase chain reaction in a field study. *J Infect Dis* 1993; 168: 1323- 1326
- 6 Humar A, Harrington MA, Kain KC, et al Evaluation of nonisotopic polymerase chain reaction-based assay to detect and predict treatment failure of *Plasmodium vivax* malaria in travellers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997; 91: 406- 409
- 7 Barker RH Jr, Banchongakorn T, Courval JM, et al A simple method to detect *Plasmodium falciparum* directly from blood samples using the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 46: 416- 426
- 8 Tirasophon W, Rajkulchai P, Ponglikitmongkol M, et al A highly sensitive, rapid, and simple polymerase chain reaction-based method to detect human malaria (*Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*) in blood samples. *Am J Trop Med Hyg* 1994 sep; 51: 308- 313
- 9 Tran Van Be, Phan Ngoc Tran, Le Thiet Thanh, et al Screening donor blood for malaria by polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995; 89: 44- 47

1998 年 10 月 5 日收稿 1999 年 5 月 28 日修回
(编辑: 庄兆农)

STUDIES ON DETECTION OF PLASMODIUM FALCIPARUM AND PLASMODIUM VIVAX IN BLOOD SAMPLES BY MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION

CHEN Shu¹, LU Huimin¹, GAO Qi², TANG Xueheng¹

1 Department of Parasitology, Suzhou Medical College, Suzhou 215007
2 Jiangsu Provincial Institute of Parasitic Diseases, Wuxi 214064

ABSTRACT

AM: To establish a sensitive and specific PCR-based method to detect *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in blood samples in a single amplification reaction. **METHODS:** Malaria parasite DNA in blood was amplified by the multiplex polymerase chain reaction using two sets of primers derived from the *P. f.* moderately-repetitive DNA sequence and CO III gene of *P. v.* **RESULTS:** A 206-bp product for *P. f.* and a 370-bp product for *P. v.* were amplified by multiplex PCR, being able to detect parasitemia level as low as 5×10^{-7} for *P. f.* and 1.02×10^{-6} for *P. v.* and having no cross-reaction with human leucocyte DNA. A total of 783 blood samples on the filter paper collected from patients attending to malaria clinics in malaria endemic areas were detected. The positive rate of multiplex PCR was 85.8%, the misdiagnosis rate was 0, and the under-diagnosis rate was 0.1%, while these three rates of microscopic examination were 84.9%, 3.1% and 1.0%, respectively. The concordance between the two methods was 95.8%. **CONCLUSION:** The multiplex PCR method made the malaria detection more sensitive and specific than the microscopic examination and should be suitable for the diagnosis of malaria in mixed endemic areas, large-scale epidemiological studies, follow-up of drug treatment and donor blood screening.

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

