

应用巢式 PCR 评价低流行区疟疾诊断结果

陈玉凤¹ 王艳艳¹ 姜杰¹ 李美^{2*}

【摘要】 目的 初步评价大连市疾控人员对疟疾的诊断能力,为低流行区疟疾诊断方法的选择提供理论依据。方法 收集 2010—2012 年大连市上报的 27 例疟疾阳性病例的血液样本,应用巢式 PCR (nest-PCR)方法对诊断结果进行复核;以复核结果为标准,比较镜检和快速诊断试剂盒(rapid diagnosis test, RDT)方法的检测敏感性及对虫种鉴定的正确率。结果 27 份样本的巢式 PCR 结果为恶性疟 23 份,间日疟 2 份,卵形疟 1 份,阴性 1 份,无混合感染。镜检对阳性样本的敏感度为 76.9%(20/26),远低于 RDT 方法的 96.2%(25/26);镜检和 RDT 联合使用,敏感度可达 100%。对虫种的鉴别,镜检对阳性样本的正确检测率为 50%(13/26);RDT 方法仅能鉴别恶性疟和非恶性疟,对恶性疟阳性样本的正确检测率为 100%(23/23)。结论 采用镜检和 RDT 联合应用的方法,能够提高检测的敏感性。建议在有条件的疾控单位建立人体疟原虫的分子检测体系,更有效地防止对疟疾病例的漏诊和误诊。

【关键词】 疟疾诊断;恶性疟原虫;卵形疟原虫;巢式 PCR;消除疟疾

Evaluating malaria diagnosis results in low malaria epidemic area with nest-PCR CHEN Yu-feng¹, WANG Yan-yan¹, JIANG Jie¹, LI Mei^{2*}. ¹Dalian Center for Disease Control and Prevention, Dalian 116021, China ²National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, Ministry of Health, WHO Collaborating Center for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China

Supported by Quality Inspection of Public Welfare Scientific Research Project(2012424056)

*Corresponding author: LI Mei, Email: li_mei76@163.com

【Abstract】 **Objective** To evaluate the diagnostic results in Dalian City to offer reference for selection of malaria diagnosis methods in low malaria epidemic area. **Methods** Blood samples of 27 malaria cases which were microscopy positive or rapid diagnosis test(RDT) positive were collected during 2010-2012 and reviewed with method of nest-PCR. Taking the reviewed results as criterion, sensitivity of microscopy and RDT was calculated. At the same time, the number and rate of samples which were accurately diagnosed applying microscopy and RDT were also counted and compared. **Results** The reviewed results showed that, 27 samples consisted of 23 *falciparum* malaria, 2 *vivax* malaria, 1 *ovale* malaria and 1 malaria negative case. Taking this result as criterion, the sensitivity of microscopy method (76.9%, 20/26) was far lower than that of RDT (96.2%, 25/26). The accuracy rate of microscopy was 50%(13/26) in detecting positive cases. The sensitivity and accuracy rate of RDT test in detecting *P. falciparum* samples were both 100%. Combining microscopy and RDT, the sensitivity to positive cases could achieve 100% (23/23). **Conclusion** The application of microscopy combined with RDT could improve the sensitivity of detection so that no positive samples were missed and no *P. falciparum* malaria samples were false diagnosed. Molecular detection was recommended in the conditional units, for more accurate review and confirmation of malaria cases and more effective prevention of misdiagnosis of malaria cases.

【Key words】 Malaria diagnosis; *Plasmodium falciparum*; *Plasmodium ovale*; Nested-PCR; Malaria-elimination

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4122.2013.06.003

基金项目:质检公益性行业科研专项项目(2012424056)

作者单位:¹116021 大连,大连市疾病预防控制中心;²200025 上海,中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所,卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室,世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心

*通信作者:李美, Email:li_mei76@163.com

目前,我国已进入疟疾消除阶段。及早诊断与及时治疗,防止二代病例的发生,是保障疟疾消除最关键的环节之一。疟疾诊断中常用的检测方法主要有 3 种,血涂片镜检、免疫学快速诊断试剂盒(rapid diagnosis test,RDT)检测和以 PCR 为基础的基因检测。目前,绝大部分市、县及以下的疾控部门主要采用前 2 种方法。在疟疾病例较少和以输入性病例为主的地区,基层人员的镜检水平较低,RDT 法仍存在一定的误诊率和漏诊率,且 RDT 检测仅能鉴别诊断恶性疟和非恶性疟感染,不能同时鉴别 4 种疟原虫。所以,应用这两种方法,是否可满足及早发现患者的需要,尚未见报道。

大连市辖区内均为疟疾三类县^[1],近 3 年无本地感染,均为输入性病例。本研究以该市 2010—2012 年上报的 27 份疟疾阳性病例为样本,应用巢式 PCR (nest-PCR)对其进行复核。以复核结果为标准,统计和比较镜检和 RDT 这 2 种诊断方法的敏感性以及对疟原虫种鉴定的正确率。

1 材料与方 法

1.1 样品来源

27 例样本为 2010—2012 年大连市各医院上报,并由大连市疾病预防控制中心经镜检或 RDT 复核呈阳性的确诊病例,血液样本和血片均由医院提供。镜检参照《中华人民共和国卫生行业标准——疟疾诊断标准》(WS259-2006)^[2]进行鉴定诊断;RDT 检测参照 Dia Med 公司生产的 RDT 疟疾诊断试剂盒的使用说明书进行。27 份样本的检测结果如表 1 所示。

RDT 检测结果显示,恶性疟样本 24 份、非恶性疟阳性样本 2 份、阴性样本 1 份;镜检结果显示为恶性疟样本 12 份、间日疟样本 1 份、恶性疟和间日疟

混合感染样本 4 份、阴性样本 7 份、未分型样本 1 份;两种方法的检测结果差异较大。RDT 检测结果为恶性疟的 24 份样本中,镜检结果为恶性疟的 12 份、间日疟的 1 份、恶性疟和间日疟混合感染的 4 份、阴性的 1 份、未分型的 1 份。RDT 检测结果为非恶性疟阳性的样本中,镜检为间日疟的 1 份、阴性的 1 份;RDT 检测结果为阴性的样本,镜检观察到原虫,并判定为间日疟。任一检测结果阳性即判定样本为确诊疟疾阳性病例。

1.2 巢式 PCR 检测

1.2.1 血样 DNA 提取

应用微量 DNA 提取试剂盒(购自德国 Qiagen 公司)分别提取 27 份血样总 DNA,提取方法参照试剂盒说明书进行,提取的总 DNA 分装为 20 μl/管,-20℃保存备用。

1.2.2 Nest-PCR 扩增

以疟原虫 ssRNA 基因为目标序列,参照 Snounou 等^[3]报道的引物进行扩增,引物由上海英骏生物工程公司合成(表 2)。扩增体系:第 1 轮 PCR 反应体系为 20 μl,其中,DNA 模板 2 μl,疟原虫属特异引物(10 μmol/L)各 0.6 μl,脱氧核糖核酸(dNTP)1.6 μl,10×PCR 缓冲液 2 μl,Taq DNA 聚合酶 0.2 μl(试剂均购自大连宝生物有限公司),加 ddH₂O 补充至 20 μl,设阴性对照 1 个和 4 种人体疟原虫阳性对照各 1 个。反应条件为:94℃ 3 min;94℃ 30 s,60℃ 60 s,72℃ 120 s,共 30 个循环;72℃ 5 min。

第 2 轮 PCR 反应体系以第 1 轮 PCR 反应产物为模板,分两组进行。第一组反应引物应用间日疟

表 1 27 份样本的镜检和 RDT 检测结果

Table 1 Diagnosed results of 27 malaria cases with method of microscopy and RDT

RDT 结果 Results of RDT	镜检结果 Results with method of microscopy					
	恶性疟原虫 <i>P. falciparum</i>	间日疟原虫 <i>P. vivax</i>	恶性疟原虫+间日疟原虫 <i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	阴性 Negative	未分型 Un-identified	合计 Total
	恶性疟原虫 <i>P. falciparum</i>	12	1	4	6	1
非恶性疟原虫阳性 Positive but not <i>P. falciparum</i>	0	1	0	1	0	2
阴性 Negative	0	1	0	0	0	1
合计 Total	12	3	4	7	1	27

原虫和恶性疟原虫的种特异性引物,阴性对照取第 1 轮阴性对照的 PCR 产物、阳性对照取恶性疟原虫和间日疟原虫的第 1 轮 PCR 产物为模板;第二组反应引物应用卵形疟原虫和三日疟原虫的种特异引物,阴性对照为第 1 轮阴性对照的 PCR 产物、阳性对照取三日疟原虫和卵形疟原虫的第 1 轮 PCR 产物为模板。除模板、引物和退火温度(55℃)外,第 2

轮反应的成分和反应条件均与第 1 轮反应条件相同,取第 2 轮 PCR 反应产物 8 μl,进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像仪观察 PCR 反应结果。

2 结果

2.1 疟原虫巢式 PCR 检测结果

应用巢式 PCR 检测,其第 2 轮 PCR 产物经琼

表 2 检测疟原虫巢式 PCR 体系的引物及序列

Table 2 Primers used in nest-PCR to detect malaria parasites

反应轮次及针对疟原虫种类 Round and <i>Plasmodium</i> species	引物 Primer	产物长度(bp) Size of the product(bp)
第一轮(属特异性引物) First round (Primers for <i>Plasmodium</i> genus)	5'-CCTGTGTTGCCTTAAACTTC-3' 5'-TTAAAATTGTGCAGTTAAAACG-3'	1 200
第二轮(种特异性引物) First round(Primers for <i>Plasmodium</i> species)		
恶性疟原虫 <i>P. falciparum</i>	5'-TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT-3' 5'-ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC-3'	205
间日疟原虫 <i>P. vivax</i>	5'-CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC-3' 5'-ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCTTA-3'	120
三日疟原虫 <i>P. malariae</i>	5'-ATAACATAGTTGTACCTTAAGAATAACCGC-3' 5'-AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA-3'	141
卵形疟原虫 <i>P. ovale</i>	5'-ATCTCTTTTGTCTATTTTTTGTAGTATTGGAGA-3' 5'-GGAAAGGACACATTAATTGTATCTAGTG-3'	800

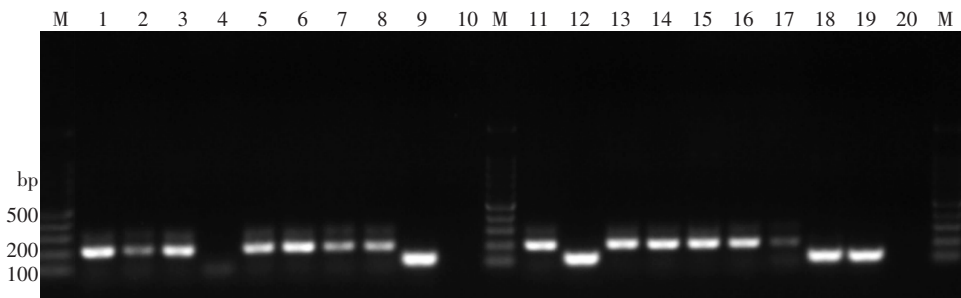


图 1 恶性疟原虫和间日疟原虫种特异引物扩增结果

M:DNA 标志物,1~8:样本 1~8,9 和 19:间日疟原虫阳性对照,10 和 20:阴性对照,11:恶性疟原虫阳性对照,12~18:样本 9~15

Fig. 1 PCR products of malaria samples with *P. falciparum* and *P. vivax* primers

M:DNA marker, 1-8:Samples 1-8, 9 and 19:*P. vivax* positive control, 10 and 20:Negative control, 11:*P. falciparum* positive control, 12-18:Samples 9-15

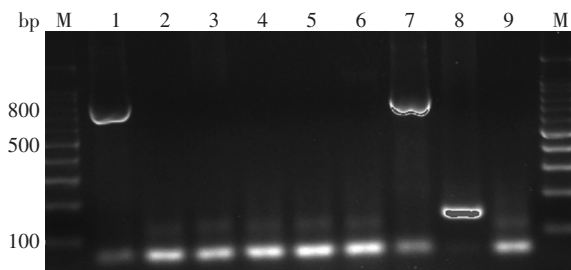


图 2 三日疟原虫和卵形疟原虫种特异引物扩增结果

M:DNA 标志物,1:卵形疟原虫阳性对照,2~4:样本 23~25,5~6:阴性对照,7:样本 26,8:三日疟原虫阳性对照,9:样本 27

Fig. 2 PCR products of malaria samples with *P. malariae* and *P. ovale* primers

M:DNA marker, 1:*P. ovale* positive control, 2-4:Samples 23-25, 5-6:Negative control, 7:Sample 26, 8:*P. malariae* positive control

脂糖凝胶电泳后,恶性疟原虫、间日疟原虫、卵形疟原虫和三日疟原虫可分别出现 205、120、800 和 141 bp 的扩增条带,而阴性对照无条带或仅有非种特异性条带(如引物二聚体等)。27 份疟疾样本的检测结果为恶性疟 23 份、间日疟 2 份、卵形疟 1 份、阴性样本 1 份(部分结果见图 1、2),无混合感染样本。

2.2 现场两种方法的检测结果与巢式 PCR 检测结果的比较分析

RDT 和巢式 PCR 的检测结果如表 3 所示。24 份 RDT 检测结果为恶性疟的样本中,23 份巢式 PCR 检测结果为恶性疟,1 份为阴性,即 RDT 检测结果为恶性疟的 24 份样本中有一份为恶性疟假阳性;2 份 RDT 检测结果为非恶性疟阳性的样本,巢式 PCR 结果为间日疟,2 种方法的检测结果一致;而 RDT 检测为阴性的样本,巢式 PCR 显示为卵形疟,即 RDT 检测结果为假阴性。

表 3 巢式 PCR 和 RDT 检测结果比较

Table 3 Comparison of diagnosed results with method of RDT and nest-PCR

巢式 PCR Nest-PCR	快速诊断试剂盒 RDT			合计 Total
	恶性疟原虫 <i>P. falciparum</i>	非恶性疟原虫阳性 Positive but not <i>P. falciparum</i>	阴性 Negative	
恶性疟原虫 <i>P. falciparum</i>	23	0	0	23
间日疟原虫 <i>P. vivax</i>	0	2	0	2
卵形疟原虫 <i>P. ovale</i>	0	0	1	1
阴性 Negative	1	0	0	1
合计 Total	24	2	1	27

镜检和巢式 PCR 的比较结果见表 4。镜检与巢式 PCR 结果一致的有 12 份恶性疟样本、1 份间日疟样本和 1 份阴性样本,即镜检结果正确的共有 14 份样本。11 份巢式 PCR 为恶性疟的样本,5 份镜检未查到原虫(阴性),1 份被错判为间日疟,4 份间日疟和恶性疟混感及 1 份未分型。1 份巢式 PCR 为间日疟样本被错判为阴性;1 份巢式 PCR 为卵形疟则被错判为间日疟。总的说来,应用镜检方法将阳性样本错判为阴性样本的 6 份,检测到原虫但错判虫种的有 7 份,主要是对恶性疟原虫虫种的错判。

以巢式 PCR 结果为标准,镜检和 RDT 检测的敏感性结果见表 5。镜检方法检测阳性样本的敏感度为 76.9%(20/26),远远低于 RDT 的 96.2%(25/26),但镜检和 RDT 检测结果均阳性的数量(19 个)小于镜检阳性的病例数(20 个),说明有 1 份样本(即卵形疟),是依靠镜检方法判定为阳性的;联合镜检和 RDT 这 2 种方法,对阳性疟疾病例的敏感性可达到 100%。

以巢式 PCR 结果为标准,镜检和 RDT 检测方法对疟原虫种鉴定的准确率见表 6。镜检方法对阳性样本的检测中,对 12 例恶性疟样本(准确率 52.2%,12/23)和 1 例间日疟样本(准确率 50%,1/2)的虫种鉴定准确,仅占阳性样本数的 50%(13/26);应用镜检方法还正确诊断了 1 例阴性样本,因此,本研究中镜检总的检测准确率为 51.9%(14/27)。应用 RDT 方法正确检测出 23 例恶性疟,准确率为 100%,明显高于镜检方法,但对非恶性疟原虫则不能分型。

3 讨论

随着我国疟疾消除行动计划的开展,各地疟疾发病率显著下降,疟疾不再是各医院重点关注的疾

表 4 巢式 PCR 和镜检结果比较

Table 4 Comparison of diagnosed results with method of microscopy and nest-PCR

巢式 PCR Nest-PCR	镜检 Microscopy					合计 Total
	恶性疟原虫 <i>P. falciparum</i>	间日疟原虫 <i>P. vivax</i>	恶性疟原虫+间日疟原虫 <i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	阴性 Negative	未分型 Un-identified	
恶性疟原虫 <i>P. falciparum</i>	12	1	4	1	5	23
间日疟原虫 <i>P. vivax</i>	0	1	0	0	1	2
卵形疟原虫 <i>P. ovale</i>	0	1	0	0	0	1
阴性 Negative	0	0	0	0	1	1
合计 Total	12	3	4	1	7	27

表 5 镜检和 RDT 检测对阳性病例的敏感性

Table 5 Sensitivity of microscopy and RDT to positive malaria samples

巢式 PCR Nest-PCR	数量 No.	镜检和 RDT 均阳性 Both microscopy and RDT positive		镜检阳性 Microscopy positive		RDT 阳性 RDT positive		镜检阳性或 RDT 阳性 Microscopy or RDT positive	
		数量 No.	敏感度(%) Sensitivity (%)	数量 No.	敏感度(%) Sensitivity (%)	数量 No.	敏感度(%) Sensitivity (%)	数量 No.	敏感度(%) Sensitivity (%)
阳性 Positive	26	19	73.1	20	76.9	25	96.2	26	100
阴性 Negative	1	0	0	0	0	1	/	1	/

表 6 镜检和 RDT 检测方法鉴定疟原虫种的准确率比较

Table 6 Comparison of accuracy rate of diagnosed malaria samples applying microscopy and RDT

巢式 PCR Nest-PCR	虫种 Species	数量 No.	镜检 Microscopy		快速诊断试剂盒 RDT	
			数量 No.	准确率(%) Accuracy rate (%)	数量 No.	准确率(%) Accuracy rate (%)
阳性 Positive	恶性疟原虫 <i>P. falciparum</i>	23	12	52.2	23	100
	间日疟原虫 <i>P. vivax</i>	2	1	50.0	2	/
	卵形疟原虫 <i>P. ovale</i>	1	0	0	0	0
	合计 Total	26	13	50.0	/	/
阴性 Negative	/	1	1	/	0	0
合计 Total	/	27	14	51.9	/	/

病,医生对疟疾的诊疗水平也有所下降,这是当前部分输入性病例因误诊和漏诊而造成死亡的主要原因。因此,对低发病率地区疟疾诊断能力的评估,将有助于为我国疟疾消除阶段和消除后疟疾诊断措施的制定提供数据支持。

血涂片的镜检以简便、经济、可靠等优点仍然是世界卫生组织认可的疟疾诊断的金标准,但其敏感性较 RDT 和巢式 PCR 低,且对血片制作质量要求高,虫种鉴定对镜检员的专业水平和经验的依赖性较高。许多医院由于检测人员工作量大、经验不足、血涂片制备水平不达标、采用机器制片等因素的影响,上交到疾控部门的血片质量往往较差,进一步降低了镜检的准确性和敏感性,导致某些疟疾患者和低密度原虫感染者不能被及时确诊^[4],这是当前镜检时阳性病例被误诊和漏诊的主要原因之一。同时,国外疟原虫的形态与我国常见原虫形态存在一定差异,例如,从非洲输入的恶性疟原虫,显微镜下往往只见环状体,且较国内常见恶性疟原虫的环粗大,类似间日疟原虫,而被误诊为间日疟原虫或恶性原虫/间日疟原虫混合感染或不能分型,从而造成对疟疾

种类错判。新的疟原虫虫种或变异类型感染人体的情况也时有发生^[5-6],导致了漏诊和误诊。本研究的 27 份样本中,镜检漏诊 6 份,误判 7 份,其中 6 份为对恶性疟原虫的误判。可见,在目前状况下,疟疾临床诊断和复核中仅仅依靠镜检不能满足及早发现病例的需求。

RDT 以快速、简便、敏感性高等优势被广泛采用,特别是远离城市或中心医院的边远地区,世界卫生组织推荐 RDT 作为首选诊断手段。本研究中,RDT 能够正确检测出绝大多数阳性样本,特别是恶性疟样本,准确率和敏感度均为 100%。但 RDT 对其他疟原虫种,如卵形疟原虫的敏感性远远低于恶性疟原虫;此外,可能由于患者体内残存有疟原虫抗原的原因,有时还会出现假阳性的结果,造成误诊,因此还需要参考其他诊断方法。

本研究中,镜检和 RDT 两种方法检测到的阳性样本总数大于单一方法检测到的数量,且 26 份阳性样本均被判定为阳性。因此,联合应用镜检和 RDT 检测,即任一方法检测阳性即将样本诊断为阳性样本的措施,值得在疟疾流行地区推广。但这两种方法

的检测结果差异较大,且不能弥补 RDT 无法鉴定恶性疟原虫以外其他原虫种及检测结果有假阳性等方面的缺陷。

近年来,国内外学者普遍将以 PCR 为基础的基因检测技术用于疟疾病例的检测^[7]。周水茂等^[8]监测从非洲、东南亚等疟疾高度流行区返回,无任何身体不适的高危人群 157 人,PCR 检测的阳性率为 3.18%,高于镜检的 1.91%。这可能是由于疟原虫感染密度较低,镜检法的灵敏度不及 PCR 法而导致漏检。但巢式 PCR 方法存在需要专门设备、检测单个样本成本花费较高、技术操作要求较高等制约因素,且会有假阳性出现。但有报道称,当用 PCR 方法检测大批样本时,其效率是镜检的 3 倍,且有较高的敏感性和特异性,虽然直接材料费用高,但可节约劳务成本,总平均费用并不高于镜检^[9]。同时,实验操作中的小心处理、设置阳性对照、重复或比对实验等可有效减少假阳性结果的出现,值得在有条件的地区或单位予以推广。

另外,本研究中有一例 PCR 检测诊断为卵形疟的样本,显微镜下确实观察到疟原虫的典型形态,但 RDT 检测为阴性。另经克隆测序分析(待发表)发现,该样本中除卵形疟原虫的典型核糖体小亚基 DNA(18S rDNA)序列外,还检测到与 5 种常见疟原虫的 18S rDNA 序列差异均较大的序列。是样本中有新原虫的存在干扰了 RDT 的检测结果,还是 RDT 对卵形疟原虫的抗不敏感?其具体原因有待进一步分析。此现象提示,一方面,疟疾抗原的改变或人群中疟原虫新种/虫株的出现,可能会影响 RDT 的检测结果;另一方面,在我国消除疟疾阶段,各疾控单位所选用的试剂盒对卵形疟和三日疟是否敏感,值得进一步关注。

综上所述,RDT 以其方便、快捷的优势,在疟疾的临床诊断中将占据主要地位,在无条件建立 PCR 检测体系的地区,其重要性将更加突出。镜检是 3 种方法中唯一可以观察到原虫病原体的方法,对于中、高原虫血症患者来说,比另 2 种方法更直观、更

具说服力,且能发现对 RDT 不敏感的疟疾病例,比巢式 PCR 方法更及时,其重要地位不可取代。巢式 PCR 能够适用于不同原虫血症和疑似患者的诊断,是一种很好的疟疾诊断方法,受到越来越多人的关注。同时,巢式 PCR 方法弥补了 RDT 对恶性疟抗原特别敏感而对卵形疟等原虫抗原不十分敏感,从而造成假阳性和假阴性结果的缺陷。建议可在有条件的疾控单位建立人体疟原虫的分子检测体系,以更精确的复核和确诊病例,更有效地防止疟疾病例漏诊和误诊。

参 考 文 献

- [1] 汤林华,许隆祺,陈颖丹. 中国寄生虫病防治与研究(下)[M]. 北京: 科学技术出版社, 2012: 1019-1024.
- [2] 卫生部. WS259-2006[S]. 疟疾诊断标准, 2006, 7-10.
- [3] Snounou G, Viryakosol S, Zhu XP, et al. 1993 High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction[J]. Mol Biochem Parasitol, 61(2): 315-320.
- [4] 唐克香, 杨恒林. 疟疾病原学检测研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2011, 6(9): 694-696.
- [5] Lee KS, Cox-Singh J, Brooke G, et al. *Plasmodium knowlesi* from archival blood films: Further evidence that human infections are widely distributed and not newly emergent in Malaysian Borneo[J]. Int J Parasitol, 2009, 39(10): 1125-1128.
- [6] Sutherland CJ, Tanomsing N, Nolder D, et al. Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally [J]. J Infect Dis, 2010, 201 (10): 1544-1550.
- [7] 徐军强, 袁方玉, 詹发先, 等. 套式 PCR 检测恶性疟原虫与间日疟原虫方法的建立及其应用研究[J]. 公共卫生与预防医学, 2009, 20(2): 11-14.
- [8] 周水茂, 王重新, 吴凯, 等. 巢式 PCR 技术在输入性疟监测中的应用 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2011, 29 (1): 43-45.
- [9] 张山鹰, 陆惠民, 许龙善, 等. 复式 PCR 用于闽南疟疾监测的效果评价[J]. 中国人兽共患病杂志, 2001, 17(2): 72-74.

(收稿日期:2013-05-07)

(本文编辑:高石)