

文章编号: 1000-7423(2007)-01-0062-03

【防治研究】

甘肃省文县流行区人群婴儿利什曼原虫 无症状感染现状

汪俊云¹, 冯宇², 高春花¹, 金长发¹, 陈生邦², 张丑吉², 何金萍², 杨成明², 杨玥涛¹, 包意芳¹

【摘要】 目的 分析甘肃省文县内脏利什曼病流行区人群利什曼原虫无症状感染现状, 评价 PCR、ELISA 和 rK39 免疫层析试条法检测利什曼原虫无症状感染的潜能。方法 2004 年 10 月在甘肃文县对 269 例无内脏利什曼病现症及病史的人群采取随机取样法采集静脉血, 分别用 RV1-RV2 和 K13A-K13B 两组 PCR 引物检测血样中的利什曼原虫特异 DNA, 以利什曼原虫可溶性抗原为包被抗原的 ELISA 法和 rK39 免疫层析试条法分别检测利什曼原虫特异性抗体, 并比较几种检测方法的敏感性。结果 PCR、ELISA 和 rK39 免疫层析试条法检测人群利什曼原虫无症状感染的阳性率分别为 30.9% (83/269)、24.2% (65/269) 和 0 (0/269)。结论 甘肃省文县内脏利什曼病流行区人群存在大量利什曼原虫无症状感染者, PCR 是检测无症状感染较敏感、特异的方法。

【关键词】 利什曼原虫; 无症状感染; PCR; ELISA; rK39 免疫层析

中图分类号: R 531.6

文献标识码: A

Asymptomatic *Leishmania* Infection in Human Population of Wenxian County, Gansu Province

WANG Jun-yun¹, FENG Yu², GAO Chun-hua¹, JIN Chang-fa¹, CHEN Sheng-bang², ZHANG Chou-ji², HE Jin-ping², YANG Chen-ming², YANG Yue-tao¹, BAO Yi-fang¹

(1 National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, WHO Collaborating Center for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China; 2 Department of Parasitic Disease Control, Gansu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Lanzhou 730020, China)

【Abstract】 Objective To analyze the status of *Leishmania infantum* asymptomatic infection in human population of a Kala-azar endemic area in Wenxian County, Gansu Province, and to evaluate the tests used. **Methods** Blood samples were tested by PCR using two pairs of primers, RV1-RV2 and K13A-K13B, for detecting *Leishmania*-specific DNA. ELISA and rK39-dipstick were used to detect *Leishmania*-specific antibodies. **Results** The positive rate of PCR, ELISA and rK39-dipstick was 30.9% (83/269), 24.2% (65/269) and 0 (0/269) respectively. **Conclusion** The prevalence of asymptomatic infection of *L. infantum* in humans is high in the area. PCR test based on RV1-RV2 and K13A-K13B primer pairs is a sensitive and specific method for detecting the asymptomatic infection.

【Key words】 *Leishmania infantum*; Asymptomatic infection; PCR; ELISA; rK39-dipstick

Supported by TSA project of WHO (No. 1079946)

国外的大量观察表明内脏利什曼病(或称黑热病)疫区居民存在大量无症状感染者^[1], 这部分人群可能作为传染源而在疾病传播中起作用^[2]。利什曼病是一种机会性感染疾病, 利什曼原虫和人类免疫缺陷病毒(HIV)共感染的现象日益严重, 导致利什曼病流行模式发生改变^[3]。内脏利什曼病仍在我国西部流行, 也发现疫区居民有利什曼原虫无症状感染现象^[4], 但

未作系统分析。在当前 HIV 迅速扩散的情况下, 有必要对我国利什曼原虫无症状感染的现状作较准确的估计。本文利用 PCR、ELISA 和 rK39 免疫层析试条法对我国动物源型内脏利什曼病疫区甘肃省文县人群进行检测, 以分析我国婴儿利什曼原虫无症状感染的现状, 并比较这 3 种方法检测人群利什曼原虫无症状感染的潜能。

材料与方法

1 采样

2004 年 10 月在甘肃省文县中寨乡中寨村进行取

基金项目: 世界卫生组织 TSA 基金(No.1079946)

作者单位: 1 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, WHO 疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 上海 200025;

2 甘肃省疾病预防控制中心寄生虫病防制科, 兰州 730020

样。该地为动物源型内脏利什曼病疫区,病原体为婴儿利什曼原虫。取样前先对村民进行问卷调查及体检,随机选取无任何内脏利什曼病症状和体征,也无内脏利什曼病病史的村民进行取样,共 269 份。每人取静脉血 3 ml,其中 1 ml 用于分离血清,2 ml 注入预先加有乙二胺四乙酸二钠 (EDTA)-肝素的离心管中,充分摇匀,所有样品均于 -20°C 保存备用。2 例内脏利什曼病患者的血样(包括抗凝静脉全血和血清)由甘肃省疾病预防控制中心提供(均为骨髓涂片镜检确诊);10 名健康者血样取自上海献血员。所取样品均于 -20°C 冰箱保存备用。

2 检测

2.1 ELISA 法 收集培养的甘肃人源型婴儿利什曼原虫前鞭毛体,经 PBS 洗 3 次后反复冻融 5 次, 4°C $20\,000\times g$ 离心 30 min,所得上清即为可溶性粗抗原,此抗原在本研究中用作包被抗原以检测人血清中婴儿利什曼原虫特异抗体。ELISA 检测按参考文献[5]进行。以 10 个非疫区健康人血清吸光度 (A_{490} 值)均值加 3 倍标准差定为阳性阈值,每一受检样品的 A_{490} 值等于或大于此阈值定为阳性。

2.2 PCR 检测原虫 DNA

2.2.1 DNA 抽提 按参考文献 [6] 方法在抗凝全血中加入 20 倍体积的红细胞裂解液 [NaCl 5 mmol/L, 皂素 1.5% (w/v), EDTA 1 mmol/L],充分混匀,置室温 20 min, $12\,000\times g$ 30 min,去上清,所得沉淀即为白细胞。所得沉淀用 PBS 同法离心洗 3 次后再用 10 倍体积的 NET [100 mmol/L NaCl , 10 mmol/L EDTA , 10 mmol/L Tris 碱]悬浮,加蛋白酶 K 和 N-月桂酰肌氨酸钠(均为美国 Sigma 公司产品)使其终浓度分别为 0.1 mg/ml 和 1.5% (w/v),混匀, 55°C 水浴过夜。次日 100°C 处理 10 min 后用酚/氯仿抽提法抽提 DNA,用乙醇沉淀 DNA,沉淀的 DNA 干燥后加 Tris 碱-EDTA (TE) 于 -20°C 保存备用。

2.2.2 PCR 检测 按参考文献 [7] 方法选取两对检测我国婴儿利什曼原虫最具敏感性和特异性的引物, RV1-RV2 和 K13A-K13B。引物及 PCR 扩增试剂盒均购自上海申能博彩生物技术公司。每个反应所用 DNA 模板相当于 1 ml 静脉血所抽提的 DNA 量。每次扩增均分别以内脏利什曼病患者和非疫区健康人样本 DNA 作阳性和阴性对照,扩增产物以 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳检查。

2.3 rK39 免疫层析试条法 rK39 免疫层析试条(购自美国 InBios 公司)现场检测按产品说明书进行。

3 统计学分析

采用 Excel 2000 进行统计分析,各种方法检测结果用 χ^2 检验进行分析。

结 果

1 ELISA 检测结果

269 份样品中有 65 份血清检测结果为阳性,阳性率为 24.2%。10 份非疫区健康人血清的 A_{490} 值均低于阳性阈值,为阴性。

2 PCR 检测结果

269 份样品同时用两对引物 RV1-RV2 和 K13A-K13B 对同一样品进行利什曼原虫 DNA 检测,结果均为阳性时,判为 PCR 检测阳性。结果有 83 (30.9%) 份样品检测结果为阳性,而 10 份非疫区健康人血样检测结果均为阴性。

3 rK39 免疫层析试条检测结果

在现场用 rK39 免疫层析试条法对 269 份血样进行检测,结果全部为阴性。

4 各方法检测结果比较

用 PCR 和 ELISA 对 269 份样品进行检测,阳性率分别为 30.9% (83/269) 和 24.2% (65/269),两方法检测的结果间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。其中有 22 份样品两种检测方法检测结果均为阳性,即 83 份 PCR 阳性样品中有 22 份样品 ELISA 检测为阳性,与 PCR 检测的阳性符合率为 26.5% (22/83);而 65 份 ELISA 检测为阳性的样品中有 22 份 PCR 检测为阳性,与 ELISA 检测的阳性符合率为 33.8% (22/65)。PCR 和 ELISA 法检测结果与 rK39 免疫层析试条法检测结果间差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。

讨 论

利什曼原虫感染有的可发展成有临床症状的疾病,其潜伏期长短不一。而有的感染由于宿主自身免疫的作用或清除了感染的原虫,或抑制了原虫的生长而不表现任何症状,即所谓无症状感染或称隐性感染。一般以适当检测方法检出的当前人群感染率作为对无症状感染率的估计,而不考虑感染者日后的发展情况,也不考虑感染者带虫与否^[7,8]。本研究表明在我国动物源型内脏利什曼病疫区人群中存在大量利什曼原虫无症状感染者。

骨髓涂片镜检等病原学方法是诊断内脏利什曼病

的金标准, 由于无症状感染者虫荷低而致检测敏感性差, 从而不适合检测人类利什曼原虫无症状感染。目前对无症状感染检测常用的方法有 PCR 法和各种血清免疫学方法等, 前者是较敏感、特异的方法, 而后者由于无症状感染者抗体水平低下而不敏感, 有研究显示, 8 例 PCR 检测为阳性的血样, ELISA 法仅检出 2 例阳性^[2]。本研究应用 PCR、ELISA 和 rK39 免疫层析试条法对内脏利什曼病疫区甘肃省文县的健康居民的血样进行检测, 虽然 PCR 和 ELISA 检测结果差异无统计学意义, 但从符合率看似可认为 PCR 法检测较敏感。

PCR 法检测的是利什曼原虫特异 DNA, 是一种类似病原学检测的方法。PCR 法本身是一种极敏感的检测方法, 另外在本研究 PCR 检测的靶分子是利什曼原虫 kDNA 小环分子序列, 含有上万拷贝这样的分子, 这些分子作为检测靶极大提高了 PCR 检测的敏感性, 因此 PCR 法检测具有极高的敏感性。作者的前期工作^[6]对本研究所应用的两对引物的敏感性和特异性进行了实验, 这两对引物理论上可检测出 0.1 个原虫/ml 样品, 10 例内脏利什曼病患者血样全部检出, 40 例非内脏利什曼病患者血样检测无假阳性出现, 因此虽然没有“金标准”验证 PCR 的检测结果, 但作者认为本研究的 PCR 检测结果真实可靠, 所用的引物对利什曼原虫具有高度的特异性^[2,10], 对非疫区健康人样品的检测全部为阴性; 对同一样品分别用两对引物进行检测进一步保证了检测的可靠性。

检测特异性抗体的血清学方法常用于诊断内脏利什曼病, 但此法用于检测无症状感染则可能低估了感染率, 其原因在于阳性阈值是人为规定, 无症状感染者的体液免疫水平较低^[2], 阳性和阴性结果间的界线不甚分明而使敏感性和特异性不能兼顾, 因此在保证特异性的同时往往牺牲了敏感性。另外检测抗体的免疫学方法也不能区分是当前感染还是既往感染。

rK39 免疫层析试条法检测内脏利什曼病具有快速、简便、敏感和特异等特点, 广泛用于内脏利什曼病的诊断, 而在本研究其检出率为 0。其原因在于所用 rK39 免疫层析试条检测的是特异于亲内脏的利什曼原虫 K39 抗原的抗体, 此抗原只有在疾病处于活动期时原虫才表达^[11,12], 本研究检测的是无症状感染人群, 故无法检出, 由此证明该法不适合检测利什曼原虫无症状感染。

本研究结果证明在我国动物源型内脏利什曼病疫

区人群中存在大量利什曼原虫无症状感染者, PCR 法是检测无症状感染最特异敏感的方法。虽然目前还没有证据表明无症状感染者可作为传染源在疾病传播中起作用, 但 PCR 法在无症状感染者外周血中检测到利什曼原虫 DNA, 表明这部分感染者有可能作为传染源在疾病传播中起作用, 由于其高比例的存在, 在疾病控制中对这部分人群的管理不可忽视, 特别是在与 HIV 共流行地区更要高度关注。

参 考 文 献

- [1] Boelaert M, Criel B, Leeuwenburg J, et al. Visceral leishmaniasis control: a public health perspective [J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2000,94:465-464.
- [2] Costa CN, Stewart J, Gomes RB, et al. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi* [J]. Am Trop Med Hyg, 2002, 66:334-337.
- [3] Alvar J, Carmen C, beatriz GS, et al. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years [J]. Clin Microbiol Rev, 1997,10:298-319.
- [4] Guan LR, Wang JY, Yang YT. Some unsolved problems on the control of leishmaniasis in China [J]. Endemic Dis Bull, 2003,18: 1-5. (in Chinese)
(管立人, 汪俊云, 杨玥涛. 中国利什曼病防治上的几个问题 [J]. 地方病通报, 2003,18:1-5.)
- [5] Riera C, Valladares JE, Gallego M, et al. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate [J]. Vet Parasitol, 1999,84:3-47.
- [6] Wang JY, Bao YF, Yang YT, et al. Preparation of monoclonal antibodies specific to lactate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum* [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2005,23:213-216. (in Chinese)
(汪俊云, 包意芳, 杨玥涛. 恶性疟原虫乳酸脱氢酶特异性单克隆抗体的制备 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005,23:213-216.)
- [7] Gao CH, Wang JY, Yang YT, et al. Study on PCR method for detecting the asymptomatic infection of *Leishmania infantum* [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2006,24:92-96. (in Chinese)
(高春花, 汪俊云, 杨玥涛, 等. PCR 法检测我国内脏利什曼病疫区婴儿利什曼原虫无症状感染的研究 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2006,24:92-96.)
- [8] Caldas AJM, Costa JML, Silva AAM, et al. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil [J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2002,96:21-28.
- [9] Ephros M, Paz AJ, Affe CL. Asymptomatic visceral leishmaniasis in Israel [J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1994,88:651-652.
- [10] Le Fichoux Y, Quaranta JF, Aueuvre JP, et al. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France [J]. J Clin Microbiol, 1999,37:1953-1957.
- [11] Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2002,9:951-958.
- [12] Burns JM, Shrefler WG, Benson DR, et al. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993,90:775-779.

(收稿日期: 2006-03-08 编辑: 伯韦)