

文章编号: 1000-7423(2011)-01-0043-03

【论著】

巢式 PCR 技术在输入性疟疾监测中的应用

周水茂, 王重新, 吴凯, 毛重喜, 杨燕

【摘要】 目的 评价巢式 PCR 技术在高疟区回国人员疟疾监测中的应用价值。方法 收集 2007-2009 年自非洲、东南亚等疟疾流行区回国人员中疟疾现症患者及其他无症状高危人群的滤纸血, 采用巢式 PCR 技术检测疟原虫 ssRNA 基因, 并与血片镜检结果进行比对。结果 巢式 PCR 检测 53 例血检确诊的疟疾现症患者均为阳性, 两法的阳性符合率为 100%, 其中 PCR 检出恶性疟、间日疟混合感染 6 例, 高于镜检检出的 3 例。检测疟疾流行区返回的高危人群 157 人, 镜检阳性 3 例, 阳性率 1.91%; 巢式 PCR 阳性 5 例, 阳性率为 3.18%; 其中, 镜检阳性、巢式 PCR 阴性的 1 例, 镜检阴性、巢式 PCR 阳性的 3 例, 两种方法的阳性符合率为 66.7%, 阴性符合率为 98.1%, 两法检测结果一致的血样占检测血样的 97.5%。结论 巢式 PCR 技术对输入性疟疾的监测具有实用价值。

【关键词】 输入性疟疾; 巢式 PCR; 回国人员

中图分类号: R382.31

文献标识码: A

Application of Nested PCR in Diagnosis of Imported Malaria

ZHOU Shui-mao, WANG Chong-xin, WU Kai, MAO Chong-xi, YANG Yan

(Wuhan Municipal Centre for Disease Control and Prevention, Wuhan 430015, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the usefulness of nested PCR method in the diagnosis of imported malaria. Methods A total of 210 blood smears and blood samples on filter paper were taken from persons returned from highly malaria endemic countries. The results of both nested PCR and microscopy for 210 samples were compared. Results Among the 210 persons, 43 were hospitalized due to malaria, and positive by nested PCR test. Among the rest 157 people at high risk of getting malaria, 3 were found plasmodium-positive by microscope (1.91%), and 5 were positive by nested PCR (3.18%). In four samples with discrepancy between the two methods, 1 was microscopy positive and PCR negative, and 3 were microscopy negative and PCR positive. Positive and negative coincidence rate between the two tests was 66.7% and 98.1%, respectively. The coincidence between the two methods was 97.5%. Conclusion Nested PCR is useful for monitoring, identification and diagnosis of imported malaria.

【Key words】 Imported malaria; Nested PCR; Returned person

疟疾是严重危害人类健康的全球性虫媒传染病之一, 我国许多疟疾流行程度较低或已达到基本消灭疟疾的地区, 疟疾流行条件并未得到根本改变, 媒介按蚊仍然存在。随着我国经济的发展, 改革开放的不断深入, 人群流动和劳务输出不断增加, 近年来境外感染疟疾病例输入逐年增多^[1]。流动人口的增加, 加剧了疟疾的传播和流行, 阻碍了我国消除疟疾的进程, 也是现阶段我国疟疾控制规划中面临的普遍问题。武汉市地处长江中游, 境内水系繁多, 属亚热带季风气候, 适合按蚊孳生和疟疾传播, 在历史上是疟疾重度流行区之一^[2], 以间日疟为主。经过大规模防治, 全市疟疾发病率逐年下降, 为非稳定性低度疟疾流行区, 年发病率低于 1/10 万, 达到基本消除疟疾的标准。武汉市 2007-2009 年输入疟疾病例占总病例数

73.9%~92.1%^[3]。本研究评价巢式 PCR 技术在输入性疟疾监测中的作用, 为掌握回国人员疟疾感染情况, 做好输入性疟疾的防治工作奠定基础。

材料与方 法

1 样品采集

收集 2007-2009 年从非洲、东南亚等疟疾流行区回国人员中疟疾现症患者 53 例和无症状高危人群 157 人(在疟疾重度流行区且疟疾感染风险 IV^[4]的国家生活和工作过的人员)的血片和滤纸血标本。从手指或耳垂取血, 分别制作 2 张厚薄血片和 2 个直径约 1.2 cm 的滤纸血滴(每个血滴相当于全血量 20 μ l), 作好标记, 滤纸自然干燥后封入塑料袋, 4 $^{\circ}$ C 或室温保存。

2 显微镜检查

以吉氏染色法染色厚薄血片并镜检疟原虫，参照中华人民共和国卫生行业标准——疟疾诊断标准 (WS259-2006)(国家标准单行本)^[5]，阳性者确诊为疟疾患者。

3 巢式 PCR 检测

3.1 巢式 PCR 模板的制备 剪下滤纸干血滴，置于 1.5 ml 离心管中，加入蒸馏水 1 ml 溶血 1~2 h，吸取溶液于另一 1.5 ml 离心管中 5 000×g 离心 10 min，弃上清，加入蒸馏水 0.5 ml 洗涤 2 次，弃上清，加入蒸馏水 10 μl 备用。

3.2 巢式 PCR 引物 以疟原虫 ssRNA 基因为目标序列^[6]，已有的疟原虫属特异性引物 rPLU5 和 rPLU6，间日疟原虫和恶性疟原虫特异性引物 rVIV1 和 rVIV2、rFAL1 和 rFAL2，均由上海生工生物工程公司合成(表1)。

表 1 疟原虫巢式 PCR 引物

Table 1 Primers in nested PCR assay for malaria parasites

引物 Primer	引物序列 Sequence (5'→3')	产物 Product (bp)
rPLU5	CCT GTT GTT GCC TTA AAC TCC	1 100
rPLU6	TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG	
rFAL1	TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT	205
rFAL2	ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC	
rVIV1	CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC	120
rVIV2	ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA	

3.3 巢式 PCR 反应 第 1 次 PCR 反应体系为 25 μl，其中，DNA 模板 2 μl，10×PCR 缓冲液 2.5 μl，Taq DNA 聚合酶、脱氧核糖核酸 (dNTP)、rPLU5 和 rPLU6 各 0.5 μl，ddH₂O 补充至 25 μl。反应条件为：94℃ 5 min；94℃ 1 min，60℃ 2 min，72℃ 2 min，共 30 个循环；72℃ 10 min。第 2 次 PCR 反应体系为 25 μl，其中，10×PCR 缓冲液 2.5 μl，TaqDNA 聚合酶、dNTP、rPLU5、rPLU6 各 0.5 μl，以 1 μl 第 1 次 PCR 产物为模板进行扩增。反应条件为：94℃ 5 min；94℃ 1 min，55℃ 2 min，72℃ 2 min，共 30 个循环；72℃ 10 min。取第 2 次 PCR 反应产物 8 μl，用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察。

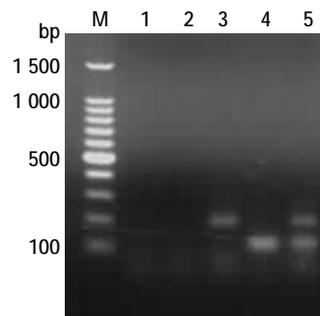
结 果

1 镜检结果

镜检 2007-2009 年非洲、东南亚等疟疾流行区回国人员 210 人。包括现症患者 53 例，镜检结果均为阳性，其中恶性疟 29 例，间日疟 21 例，混合感染 3 例；高危人群 157 例，检测结果显示，镜检阳性 3 例，其中恶性疟 2 例，间日疟 1 例，检出率为 1.91%。

2 巢式 PCR 检测

2.1 巢式 PCR 扩增间日疟原虫和恶性疟原虫 DNA 方法的建立 经巢式 PCR 反应，间日疟患者血样模板扩增出 1 条 120 bp 条带；恶性疟患者血样模板扩增出 1 条 205 bp 条带；间日疟原虫和恶性疟原虫混合感染者血样模板扩增出 120 bp 和 205 bp 两个条带。健康人血液 DNA 模板和空白对照，均无特异性扩增带(图 1)。



M: DNA 标志物; 1: 空白对照; 2: 健康人对照; 3: 恶性疟; 4: 间日疟; 5: 混合感染。

M: DNA marker; 1: Blank control; 2: Healthy control; 3: Pv; 4: Pv; 5: Pv+Pf.

图 1 巢式 PCR 检测结果

Fig.1 Results of the nested PCR test

2.2 现症患者检测 巢式 PCR 检测 53 例疟疾现症患者，结果均为阳性，其中，间日疟 19 例，恶性疟 28 例，恶性疟、间日疟混合感染 6 例。

2.3 高危人群检测 巢式 PCR 检测 157 例无症状高危人群，其中，间日疟 1 例，恶性疟 4 例，检出率为 3.18%。

3 镜检与巢式 PCR 检测结果比较

检测 53 例现症患者，巢式 PCR 与镜检阳性符合率为 100%，且 PCR 技术检出恶性疟、间日疟混合感染 6 例，高于镜检检出的 3 例。

检测 157 例高危人群，镜检与巢式 PCR 结果同为阳性有 2 例，同为阴性有 151 例，镜检阳性而巢式 PCR 结果为阴性的 1 例，镜检阴性而巢式 PCR 结果为阳性的 3 例，两种方法的阳性符合率为 66.7%，阴性符合率为 98.1%，两法检测结果一致的血样占检测血样的 97.5%。

讨 论

随着武汉市经济的发展，改革开放的不断深入，国际往来和贸易十分频繁，人群频繁流动和劳工不断输出，近年来境外感染的输入疟疾病例逐年增多，占武汉市总疟疾病例的 73.9%~92.1%^[3]，且境外感染疟疾病例感染度高，有的由于患者忽视或被误诊，延误了治疗，已成为武汉市疟疾传播的主要传染源^[3]。

53 例疟疾患者镜检和巢式 PCR 检测均为阳性, 厚、薄血膜染色镜检法简单且价廉, 但间日疟原虫和恶性疟原虫混合感染时, 难以鉴别虫种和作出准确诊断^[7]。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, 巢式 PCR 检出阳性率 (3.18%) 比镜检结果 (1.91%) 高, 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, 也可能是 PCR 假阳性。镜检法是目前临床疟疾诊断的主要手段, 但检测灵敏度不够高, 难以适应低密度原虫地区的流行病学调查, 且由于基层疟防专业人员接受的技术培训少, 有时对疟疾患者未能作出及时诊断, 延误治疗。传统镜检需耗费大量人力、物力, 检测时间长, 检测效率较低, 为准确评价人群疟疾的感染状况带来困难^[8,9]。而巢式 PCR 的检测灵敏度和准确性高, 易检出传染原。但 PCR 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。研究表明, 用 PCR 方法检测大批样本效率是镜检的 3 倍, 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]。

巢式 PCR 方法不仅适用于低原虫血症和疑似患者的诊断, 而且在确定疟原虫种与混合感染方面具有一定潜力。由于恶性疟与间日疟患者治疗方法并不相同, 该法可为疟疾的对症、早期治疗提供依据, 故对临床应用具有实用价值^[10]。本研究表明, rPLU5+rPLU6/rVIV1+rVIV2 或 rFAL1+rFAL2 是高灵敏度的检测引物, 能有效鉴别间日疟原虫和恶性疟原虫, 尤其在低虫血症和混合感染时更能成为镜检的补充, 提高疟疾监测的质量和效率, 对诊断或鉴别诊断间日疟原虫和恶性疟原虫混合感染具有实用价值, 适合疟疾流行病学调查, 还可用于血检质量的监控, 阻止疟疾二代患者的产生。

参 考 文 献

- [1] Chen JY, Ye DG, Zheng P. Analysis of 63 cases with imported malaria in Fuzhou[J]. J Med Pest Control, 2003, 19(7): 411-412. (in Chinese)
(陈家英, 叶道光, 郑萍. 福州市 63 例输入性疟疾病例分析[J]. 医学动物防制, 2003, 19(7): 411-412.)
- [2] Pei SJ, Huang GQ, Gui AF, et al. Analysis of malaria epidemic situation in the past ten years in Hubei Province[J]. J Pub Hlth Prev Med, 2004, 15(6): 12-14. (in Chinese)
(裴速建, 黄光全, 桂爱芳, 等. 湖北省近 10 年疟疾流行态势分析[J]. 公共卫生与预防医学, 2004, 15(6): 12-14.)
- [3] Wu K, Wang CX, Sun DG, et al. Analysis of the malaria incidence and management of floating population in Wuhan 2005-2008[J]. J Pub Hlth Prev Med, 2009, 20(5): 42-43. (in Chinese)
(吴凯, 王重新, 孙东光, 等. 武汉市 2005~2008 年疟疾发病情况及流动人口的管理措施[J]. 公共卫生与预防医学, 2009, 20(5): 42-43.)
- [4] Tang LH. Diagnosis, Treatment and Management of Imported Malaria Cases [M]. Shanghai: Shanghai Science & Technology Press, 2010: 24-25. (in Chinese)
(汤林华. 输入性疟疾的诊治与管理[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2010: 24-25.)
- [5] Ministry of Health of the People's Republic of China. Health Industry Standard of the PRC, Diagnostic Criteria for Malaria (WS259-2006)[S]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2006. (in Chinese)
(中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国卫生行业标准, 疟疾诊断标准(WS259-2006)[S]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.)
- [6] Stephanie PJ, Norman JP, Maniphet VX, et al. PCR as a confirmatory technique for laboratory diagnosis of malaria [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(3): 1087-1089.
- [7] Lin M, Gao ST. Field application on malaria mixture infection used by PCR technique [J]. Chin J Parasit Dis Control, 2004, 17(3): 162-163. (in Chinese)
(林敏, 高世同. PCR 检测疟疾混合感染的现场应用研究[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2004, 17(3): 162-163.)
- [8] Hua D, Liu J, Meng F. Investigation comparison of the population in malaria endemic area using PCR and microscope assay [J]. J Hainan Med, 1999, 10(4): 210-211. (in Chinese)
(华德, 柳坚, 蒙锋. 聚合酶链反应与镜检法对疟区人群调查结果的比较[J]. 海南医学, 1999, 10(4): 210-211.)
- [9] Zhang SY, Lu HM, Xu LS, et al. Evaluation of the effect of multiplex polymerase chain reaction for malaria surveillance in southern Fujian[J]. Chin J Zoonoses, 2001, 17(2): 72-74. (in Chinese)
(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.)
- [10] Zhu XP, Liu Q, Zhou L, et al. Study on diagnosis of *P. falciparum* and mixed infection using nested PCR[J]. Chin J Parasit Dis Control, 1999, 12(1): 16-19. (in Chinese)
(诸欣平, 刘强, 周蕾, 等. 套式聚合酶链式反应诊断恶性疟原虫及混合感染的研究[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1999, 12(1): 16-19.)

(收稿日期: 2010-09-09 编辑: 高石)