

荧光定量 PCR 技术在疟疾诊断中的应用

焦炳欣 郭杰 陈志海 李兴旺 杨晓玲 何艳群 周淳 周茹 华文浩

【摘要】 目的 探讨荧光定量 PCR 技术在疟疾诊断中的临床应用价值。**方法** 收集本院 2010 年 1 月至 2012 年 3 月疑似疟疾病患者的血样共 67 份和健康人血样 20 份,采用荧光定量 PCR 法进行疟原虫检测,并与镜检法和胶体金免疫层析法的敏感性和特异性进行对比分析。对临床确诊的 20 例疟疾患者在抗疟药治疗前后的虫体密度与 3 种方法检测的疟原虫结果进行对比分析。**结果** 67 份患者血样用荧光定量 PCR 法、镜检法和胶体金免疫层析法检测的疟原虫阳性率,分别为 62.7%、56.7% 和 52.2%,差异无统计学意义($P = 0.471$)。3 种方法检测 20 份健康人血样结果均为疟原虫阴性,特异性为 100%。荧光定量 PCR 检测结果与镜检虫体密度呈直线相关($r = 0.958, P = 0.042$)。原虫血症较高水平时 3 种方法的检测结果差异无统计学意义($P > 0.05$);在药物治疗后原虫血症较低水平时,虫体密度 $< 50/\mu\text{l}$ 时,镜检法与胶体金免疫层析法检测结果均为阴性,而荧光定量 PCR 法检测仍为阳性,总疟原虫拷贝数均值为 2.92×10^2 拷贝/ml,提示荧光定量 PCR 检测方法的敏感性高于镜检法和胶体金免疫层析法。**结论** 荧光定量 PCR 方法检测疟原虫快速敏感,且特异性强,可作为镜检法的补充。

【关键词】 疟疾;诊断;聚合酶链反应;荧光定量;胶体金免疫层析法

Application of fluorescence quantitative PCR assay for malaria diagnosis JIAO Bing-xin, GUO Jie, CHEN Zhi-hai, LI Xing-wang, YANG Xiao-ling, HE Yan-qun, ZHOU Chun, ZHOU Ru, HUA Wen-hao. Department of Clinical Laboratory, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China

Corresponding author: HUA Wen-hao, Email: dtjykhua@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the clinical value of fluorescence quantitative PCR for malaria diagnosis. **Methods** Blood samples of 67 suspected malaria cases and 20 healthy controls from January 2010 to March 2012 in our hospital were collected and assayed by fluorescence quantitative PCR assay, light microscopy (LM) and colloidal gold immunochromatographic assay (GICA), respectively. Methodological parameters such as sensitivity and specificity were compared among the three methods which were also applied to assay parasite density in 20 known malaria patients before and after pharmacotherapy. **Results** Total of 67 samples were tested, the positive rates of PCR, LM and GICA were 62.7%, 56.7% and 52.5%, respectively ($P = 0.471$). There was no significant difference among the three methods. Negative results were obtained when 20 controls were detected by the three methods, indicating 100% specificity. There was a linear correlation between LM assay and PCR ($r = 0.958, P = 0.042$) on parasite density. There was no statistical difference among the three methods while the parasitemia was at high levels ($P > 0.05$). However, when parasitemia reached low levels (parasite density $< 50/\mu\text{l}$) after pharmacotherapy, the results of LM and GICA were negative, while PCR was still positive with a mean value of 2.92×10^2 copy/ml parasitemia. Therefore, PCR assay showed a higher sensitivity than LM and GICA. **Conclusions** Fluorescence quantitative PCR assay for malaria diagnosis is a rapid method with a high sensitivity and specificity, which could be used as a complement to LM.

【Key words】 Malaria; Diagnosis; Fluorescence quantitative polymerase chain reaction; Colloidal gold immunochromatographic assay (GICA)

疟疾是严重危害人类生命和健康的全球性虫媒传染病之一。目前我国的疟疾病例主要来自海外。近年来,由于人群流动和劳务输出的不断增加,输入性疟疾病例呈逐渐上升趋势,恶性疟疾死亡病例也明显增多。因此,准确有效的诊断方法对疟疾的有效控制具有重要意义。世界卫生组织将发展准确且快速诊断疟疾的技术视为防治疟疾优先考虑的对策之一^[1]。本研究采用实时荧光定量 PCR 的方法,对 2010 年 1 月至 2012 年 3 月于本院就诊的疟疾病患者的血样进行检测,并以镜检法和胶体金免疫层析法的检测结果作对比进行分析,报道如下。

资料与方法

一、样本来源

本研究收集的 67 份血样为 2010 年 1 月至 2012 年 3 月本院就诊的疟疾病发区的发热患者。每份血样分别涂制厚、薄血片后留存血样, -20℃ 保存。样本采集均为静脉取血,采用 2% EDTA-Na₂ 抗凝。

二、仪器与试剂

ABI PRISM 7300 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);疟原虫核酸测定试剂盒;恶性疟、间日疟、卵形疟原虫核酸测定试剂盒(上海之江生物科技股份有限公司);OptiMAL-IT 胶体金快速检测试条(瑞士 Diamed 生物医药公司)。

三、方法

1. 镜检法:每份血样涂制厚、薄血膜各 1 张,行吉氏染色。高倍镜下观察血涂片,薄血片观察至少 200 个视野,厚血片观察 20 个视野,未观察到疟原虫作为阴性判断标准^[2],同时计数虫体密度。疟原虫的密度 = 疟原虫数 ÷ 白细胞数 × 血中白细胞数/μl^[3]。

2. 荧光定量 PCR 法:操作参照疟原虫核酸测定试剂盒说明书进行,采用聚合酶链式反应(PCR)技术结合荧光探针技术对疟原虫特异性核酸片段进行检测。

(1) 疟原虫 DNA 的提取:全血标本取 100 μl (震荡混匀 10 s),分别加入 100 μl 核酸提取液,震荡 10 s 后于 99℃ 干浴 10 min,13 000 rpm 离心 10 min,保留上清备用。同时将阳性对照标本进行 10、100 和 1000 倍梯度稀释,备用。

(2) 荧光定量 PCR 检测:荧光反应管置于定量荧光 PCR 仪上,循环参数为 37℃ × 2 min, 94℃ × 2 min, 然后 93℃ × 15 s → 60℃ × 60 s, 循环 40 次;单点荧光检测温度为 60℃,反应体系为 40 μl,上机进行扩增。实验结束后仪器根据标本浓度自动生成标准曲线。循环阈值(Ct 值)与起始模板量呈直线负相关。根据检测样品的 Ct 值,计算起始 DNA 含量。

3. 胶体金快速检测疟疾 OptiMAL 法:是利用乳酸脱氢酶(LDH) 单克隆抗体捕获溶血中的 LDH 抗原的免疫层析技术。以显两条相同红色区带者为阳性,仅质控区带显红色为阴性;若测试带显色弱于质控带为弱阳性。参照胶体金快速试条说明书进行操作。

四、统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件对实验数据进行统计分析,定性资料以频数和频率进行统计描述,组间差异运用卡方检验;定量资料变量间的关系以直线回归方程进行分析。 $\alpha = 0.05$,采用双侧统计检验;以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、镜检结果

来本院就诊的 67 例疑似疟疾患者中,镜检疟原虫阳性者共 38 例,阳性率为 56.72%,其中恶性疟原虫感染者 25 例,间日疟原虫感染者 13 例。

二、荧光定量 PCR 结果

采用荧光定量 PCR 法对样本中疟原虫的特异性 DNA 核酸片段及样本中恶性疟、间日疟、卵形疟的特异性 DNA 核酸片段分别进行检测。结果显示,阳性定量标准曲线的 Ct 值与模板浓度具有良好的线性关系,总疟原虫、恶性疟原虫、间日疟原虫和卵形疟原虫的相关系数 r 分别为 0.995、0.999、0.999 和 0.999。

67 份血样采用荧光定量 PCR 法检测出总疟原虫者 42 例,阳性率为 62.7%,其中 42 份阳性标本分别用间日疟原虫、恶性疟原虫、卵形疟原虫三种荧光定量 PCR 试剂盒进行检测,其中恶性疟原虫阳性者 28 例,间日疟原虫阳性者 14 例,卵形疟原虫检测结果 42 例均为阴性。同时对 20 份健康人血样进行三种方法检测结果全部为阴性,特异性为 100%。

三、胶体金免疫层析法

67 份血样检测出疟原虫阳性者共 35 例,阳性率为 52.2%,其中恶性疟原虫感染者 23 例,间日疟原虫感染者 12 例。20 份健康人血样的检测结果均为阴性,特异性为 100%。

四、疟原虫阳性标本的三种检测方法的结果分析

本研究中镜检法、荧光定量 PCR 法和胶体金免疫层析法检测总疟原虫,三种方法差异无统计学意义($\chi^2 = 1.50, P = 0.4714$);对于恶性疟原虫和间日疟原虫的检测,三种检验方法差异亦无统计学意义(表 1)。

五、荧光定量 PCR 结果(Y)与虫体密度(镜检计数)(X)的相关性

42 份疟原虫阳性血样标本虫体密度与荧光定量 PCR 所测得虫体拷贝数经 SPSS 17.0 统计软件分析,结果显示两者呈直线相关,拟合其直线回归方程为 $Y = 40.30204X + 290772, r = 0.958209 (t = 4.737, P = 0.042)$ 。

六、疟疾患者治疗不同时期的三种检测方法检测结果

疟疾患者在药物治疗的不同时期,随着病情的好转,疟原虫在其血中的虫体密度(\bar{x})(涂片镜检计数)逐渐减少,20 例患者治疗不同时期的血样标本经荧光定量 PCR、镜检法和胶体金免疫层析法的检测结果见表 2。

七、荧光定量 PCR 法检测结果的图形分析

收集镜检法检测疟原虫阴性的 20 例标本行荧光定量 PCR 检测,结果显示当镜检法检测疟原虫结果为阴性时,荧光定量 PCR 法仍能检测出疟原虫的拷贝值。图形分析结果呈典型“S”型曲线(图 1)。

讨 论

迄今为止,疟疾仍严重威胁着人类的生命和健康,准确、及时的诊断对有效预防、治疗及控制疟疾流行具有重要的意义。

目前,临床检测疟原虫仍多采用传统的镜检法,虽然操作简单易行,但存在诸多缺陷,耗时长且易受人为因素影响,不能准确定量,故已难以适应当前疟疾防治和监测的临床需求^[4,5],尤其在低原虫血症和混合感染时易造成漏诊或误诊。

荧光定量 PCR 技术是近年来发展的一种核酸定量技术,该技术在 PCR 反应体系中引入了荧光标记的探针,具有高度的灵敏性、特异性和精确性。应用荧光 PCR 基因扩增技术对疟原虫基因进行检测具有其独特的优势^[6-9]。

本研究中 42 份疟疾患者的血样采用荧光定量 PCR 方法检测并与镜检法、胶体金免疫层析法进行对比分析。结果显示,3 种方法特异性差异无统计学意义,而荧光定量 PCR 敏感性优于其他两种方法,尤其在疟疾尚处于原虫血症较低水平,镜检法不易观察时。本研究中,镜检定量和胶体金法检测疟原虫均为阴性的血样,荧光定量 PCR 法仍能够检测出 2.92×10^2 拷贝/ml 的疟原虫。当原虫密度较低($< 50/\mu\text{l}$)时,镜检法难以观察到原虫,易漏诊^[10]。本研究认为 3 种方法中胶体金免疫层析法快速、简单,可反映药物治疗后原虫数量的下降,但不能进行定量分析,适合疟疾的早期筛查;而荧光定量 PCR 既可作为早期诊断、判断分型和临床用药的疗效观察及判定是否痊愈的指标。恶性疟与间日疟患者治疗方法不同,荧光定量 PCR 法可为疟疾的对症、早期治疗提供依据^[11],本研究结果表明,荧光定量 PCR 法能有效地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能成为镜检法很好的补充,可以提高疟疾监测的质量和效率,对诊断或鉴别间日疟原虫和恶性疟原虫混合感染具有较实用的价值,但并不能完全取代简单易行的镜检方法。因此,作为镜检法的补充,荧光定量 PCR 检测疟原虫适于在临床实验室中推广应用。

表 1 42 份疟原虫阳性标本的三种检测方法结果比较

方法	恶性疟原虫		间日疟原虫	
	总例数	阳性率[例(%)]	总例数	阳性率[例(%)]
镜检法	42	25(59.5)	42	13(30.9)
荧光定量 PCR	42	28(66.7)	42	14(33.3)
胶体金免疫层析	42	23(54.8)	42	12(28.6)
χ^2		1.56		0.22
P		0.5326		0.8946

表 2 疟疾患者治疗不同时期的三种方法检测结果分析

	例数	治疗前	治疗 24 h	治疗 3 d 后	治疗 1 周后	治疗 2 周后
荧光定量 PCR 法(拷贝/ml)	20	2.70×10^7	2.10×10^5	4.27×10^3	2.92×10^2	阴性
镜检法	20	阳性	阳性	阳性	阴性	阴性
胶体金免疫层析法	20	阳性	阳性	弱阳性	阴性	阴性

注:不同治疗时期,伴随病情的好转,虫体密度逐渐降低,治疗前、治疗 24 h、治疗 3 d、治疗 1 周后和治疗 2 周后,涂片虫体密度分别为 $6.1 \times 10^5/\mu\text{l}$ 、 $9.2 \times 10^3/\mu\text{l}$ 、 $100/\mu\text{l}$ 、 $< 50/\mu\text{l}$ 和 $< 50/\mu\text{l}$

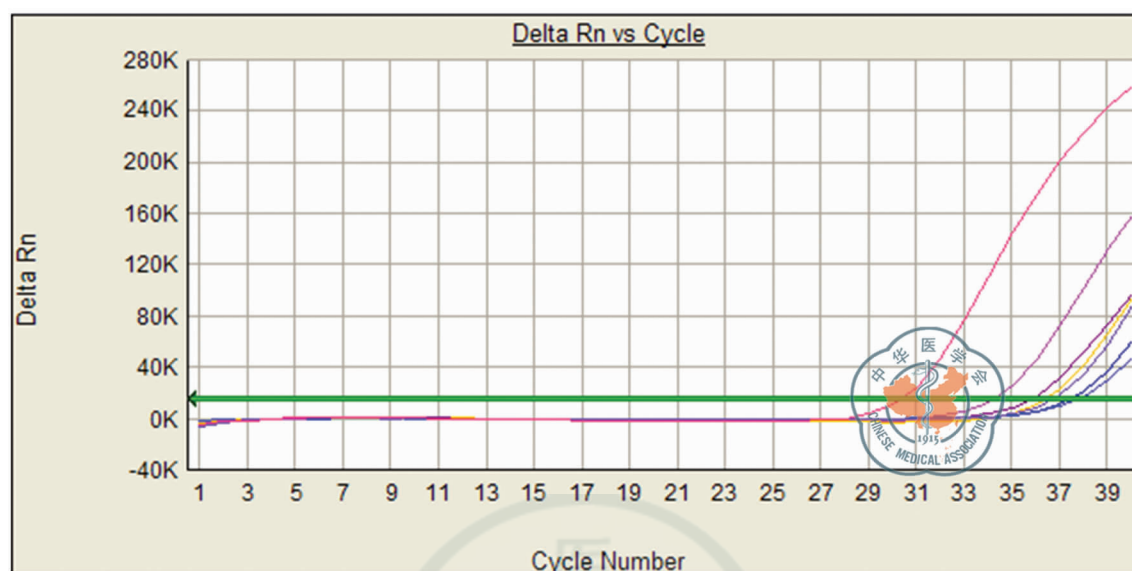


图 1 20 例疟原虫镜检阴性样本 PCR 法检测结果图形分析

注: Cycle: 循环数, Delta Rn: 荧光强度。从左至右 S 型曲线 1 为疟原虫阳性标准, 浓度为 1×10^4 拷贝/ml; 2~7 曲线为疟原虫镜检阴性样本 PCR 法检测的结果

参 考 文 献

- World Health Organization. New perspectives: malaria diagnosis. Joint WHO/USAID informal consultation. World Health Organization. Geneva. 2000;1091.
- 中华人民共和国卫生部医政司. 全国临床检验操作规程. 3 版. 南京: 东南大学出版社. 2006;242-243.
- Greenwood BM, Armstrong JR. Comparison of two simple methods for determining malaria parasite density. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1991, 85(2):186-188.
- Ohrt C, Purnomo, Sutamihardja MA, et al. Impact of microscopy error on estimates of protective efficacy in malaria-prevention trials. *J Infect Dis*, 2002, 186(4):540-546.
- Rubio JM, Buhigas I, Subirats M et al. Limited level of accuracy provided by available rapid diagnosis tests for malaria enhances the need for PCR based reference laboratories. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(7):2736-2737.
- Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, et al. Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(12):5636-5643.
- Perandin F, Manca N, Calderaro A, et al. Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(3):1214-1219.
- Imirzalioglu C, Soydan N, Schaller M, et al. Diagnosis of mixed *Plasmodium malariae* and *P. vivax* infection in a development aid volunteer by examination of bone-marrow specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(6):2307-2310.
- 陶玉滨, 许勇臣, 杨利. 基因扩增检测四种感染人的疟原虫种类、数量的方法. *实用预防医学*, 2008, 15(4):1044-1046.
- Berry A, Fabre R, Benoit-Vical F, et al. Contribution of PCR-based methods to diagnosis and management of imported malaria. *Med Trop*, 2005, 65(2):176-183.
- 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. *中国寄生虫病防治杂志*, 1999, 12(1):16-19.

(收稿日期: 2012-04-19)

(本文编辑: 孙荣华)

焦炳欣, 郭杰, 陈志海, 等. 荧光定量 PCR 技术在疟疾诊断中的应用[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2012, 6(4):308-311.