

疟疾病原体检测技术的研究进展

刘文雄 莫善颖

作者单位: 545000 广西壮族自治区柳州, 柳州市工人医院医学检验科

通信作者: 刘文雄, Email: 107356673@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2021.04.016

【摘要】 疟疾是一种在热带及亚热带地区流行的传染病, 曾在我国广泛流行, 严重危害人民生命健康安全。随着我国卫生健康工作的开展, 疟疾在我国得到了很好的控制。但随着国门开放及人员往来的不断增加, 外来输入性疟疾病例在不断增加。及时、准确的诊断对有效预防疟疾外来输入、控制其流行传播、给予患者及早治疗都具有重要意义。目前我国疟疾检测方法主要有病原学诊断技术、免疫学诊断方法和聚合酶链反应(PCR)检测技术, 该文从以上 3 个方面对近年来国内外疟原虫检测技术的研究进展进行综述。

【关键词】 疟疾; 检验技术; 研究进展; 分析

基金项目: 广西壮族自治区柳州市科技计划项目(2020NBAB0834)

Research progress of detection technology for malaria pathogen

Liu Wenxiong, Mo Shanying. Department of Clinical Laboratory, Liuzhou Workers' Hospital, Liuzhou 545000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Corresponding author: Liu Wenxiong, Email: 107356673@qq.com

【Abstract】 Malaria is an infectious disease which is widely prevalent in the tropical and subtropical regions. It has been widely prevalent in China and seriously endangers human health. With the development of China's health work, malaria has been well controlled in China. However, with the opening of gate of China and increasing of personnel exchanges, the number of imported malaria cases is increasing. Timely and accurate diagnosis is of great significance to effectively prevent external input of malaria, control its epidemic transmission and give patients early treatment. At present, the main malaria detection methods in China are pathogenic diagnosis technology, immunological diagnosis method and polymerase chain reaction (PCR) detection technology. This paper summarizes the research progress of malaria detection technology at home and abroad in recent years.

【Key words】 Malaria; Inspection technology; Research progress; Analysis

Fund Program: Project of Science and Technology Plan of Liuzhou City, Guangxi Zhuang Autonomous Region (2020NBAB0834)

疟疾是一种在热带及亚热带地区广泛流行, 由于被雌性按蚊叮咬或输入了带有患者的血液而被疟原虫感染所致的虫媒传染性疾病, 尤其处于疫区的幼儿、孕妇、老年人、机体免疫能力和抵抗能力差等人群均属于易感人群。按蚊叮咬、血液传播和母婴传播是感染疟疾的主要途径, 疟疾的发病过程是疟原虫进入人体, 入侵肝细胞后生长发育, 并进入血液中的红细胞持续繁殖, 最终导致红细胞破裂。疟疾的常见表现为突发性寒战、全身高热、大量出汗并伴随头晕、头痛、身体酸痛、疲乏、厌食、呕吐等症状, 病情严重者会出现昏迷、休克、代谢性酸中毒、急性肾功能衰竭或急性肺水肿等表现, 导致人体器官组织受到严重损伤, 也给人们的生命安全造成较大威胁^[1-2]。疟疾是一种世界范围的传染病, 目前

在亚洲和非洲地区仍然是威胁人类健康最严重的寄生虫疾病之一^[3], 且病例主要集中在非洲和东南亚地区^[4]。目前全球 104 个疟疾流行国家和地区中已有 19 个国家和地区正处于消除疟疾前阶段或消除疟疾阶段^[5]。

近年来, 疟疾得到很好的控制, 病例数大幅下降, 但仍有部分病例因延误诊治而导致患者死亡。因此, 寻求精确、快速的诊断方法是控制疟疾传播以及降低治疗成本和病死率的关键。外周血涂制厚、薄血膜镜检法目前在世界范围内仍被广泛应用, 已成为疟疾实验室诊断的“金标准”^[6], 但传统的镜检法结果受诸多因素影响, 容易造成误诊或漏诊, 作为“金标准”已越来越难以用于评价诊断效率^[7]。因此, 本文对近年来国内外疟疾诊断方法的

研究进展进行简要概述。

1 病原学诊断

1.1 镜检法 使用镜检法理论上每 μL 血液样本中可检出 4 个疟原虫^[8],但该方法费时、费力,对低原虫血症和混合感染容易漏诊,但因操作简单,经济实用,仍是基层单位检测疟疾的主要手段。

1.2 吡啶橙包被的毛细管法(quantitative buffy coat technique, QBC) 该方法利用受感染的红细胞比正常红细胞轻,但比白细胞略重这一原理,使用含抗凝剂和吡啶橙荧光染液的毛细管采集末梢血,经分层离心后,被染色的红细胞富集于棕黄色层下。QBC 法的优点在于检测速度快,敏感度和特异度均较高,但该方法对虫株的鉴别和计数较困难,操作步骤多,耗材费用高^[9-10]。

1.3 苯并硫羧基嘌呤(benzothiocarboxypurine, BCP) 染色法 对各发育期的疟原虫进行染色,被感染的网织红细胞可见独特的点状分布,白细胞的细胞质呈亮绿色,存活的白细胞及血膜中的异物不着色,因此易于镜检者的观察和区别。Makler 等^[11]首次采用 BCP 法对恶性疟原虫进行荧光染色检查,该方法的敏感度与姬姆萨染色法基本一致。随后,张庆军^[12]研究结果显示,BCP 法的检测敏感度较高,且该方法操作简便、快速,且染色稳定性高于姬姆萨染色法,不易过染,较易识别,镜检快速,对镜检者的技术要求低。

1.4 吡啶橙(acridine orange, AO) 染色法 AO 是一种非常敏感的核酸荧光染料,含 DNA 和 RNA 的细胞在染色后分别激发黄绿色荧光和橘红色荧光,根据染色后所呈现的颜色对病原体进行鉴别。早在 20 世纪 90 年代初期, Kawamoto^[13]就设计了 AO 滤色系统和卤素光源,使之可以在传统光学显微镜下进行观察,从而在临床上得到广泛应用。黄亚铭等^[14]研究表明, AO 染色法比传统检测方法的速度快,阳性率高。另外, AO 染液有毒性,检验人员在操作时需戴手套和避光, AO 法还存在染色无特异性的缺点,因此镜检人员应接受相关培训。

2 免疫学诊断

2.1 间接免疫荧光抗体法(indirect immunofluorescent antibody test, IFAT) IFAT 是在待测血清抗体与抗原结合后,加入荧光标记的第二抗体,洗涤后在荧光显微镜下观察特异性荧光。该方法具有较高的敏感度和特异度,且重复性较好,但有一定主观性,标本无法保存。房文等^[15]研究显示,随着存放温度的上

升和存放时间的延长,抗体量逐渐下降,需在荧光显微镜下观察,且只有高滴度 IFAT 才适用于无症状带虫者的确定和临床诊断^[16]。

2.2 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 将已知的抗原或抗体吸附在固相载体表面,以酶标记的抗原或抗体与黏附在载体上相应的抗体或抗原结合,用洗涤法将液相中的游离成分洗除,再与酶底物作用,根据底物显色深浅定性、定量检测抗原和抗体。该方法敏感性好,特异性强,稳定性高,且由其衍生出斑点 ELISA (Dot-ELISA) 等一系列方法,均可用于临床检验。李全贞等^[17]的研究表明,直接检测患者血清中疟原虫抗体,可减少筛选的盲目性,而且简便、快速,适合于大规模疟原虫抗体的筛选。

2.3 免疫层析技术

2.3.1 恶性疟原虫富组氨酸蛋白 2(histidine-rich protein-2, HRP-2) 抗原检测 该方法是一种直接检测血液中恶性疟原虫 HRP-2 抗原(一种可溶性蛋白)的免疫吸附定性测试, ParaSight-F 浸条法和快速免疫色谱测试法(immunochromatographic test, ICT)是近年来应用较多的两种检测疟原虫 HRP-2 抗原的方法。杨亚明等^[18]对 ParaSight-F 浸条法与 PCR 进行比较,结果显示 ParaSight-F 浸条法操作简便,无需特殊设备,且检测效果较好, 7~10 min 即可获得诊断结果。郑香等^[19]与张再兴等^[20]比较 ICT 法与镜检法,结果显示两种方法的符合率高,操作快速方便。ParaSight-F 法只能检测恶性疟原虫,而 ICT 法还可检测间日疟原虫及混合感染。当类风湿因子(rheumatoid factor, RF)存在时, ParaSight-F 法与 ICT 法会出现假阳性结果,且假阳性率随着 RF 滴度的增加而升高^[21]。有学者使用胶体碳作为免疫层析的信号标签,与镜检法进行比较,其敏感度、特异度、符合率均可达到 95% 以上,扫描检测带的灰度值能够实现对疟原虫的定量检测^[22]。免疫层析技术目前也应用于很多其他感染性疾病的检测,如流行性感、社区获得性肺炎等^[23]。

2.3.2 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH) 抗原检测 单克隆抗体免疫层析法(OptiMAL)原理是用 LDH 单克隆抗体捕获溶于血液中的 LDH 抗原,由于血液中 LDH 的水平与虫体血症存在相关性,可作为疟原虫检测的标志物。雷露等^[24]研究中,单克隆抗体免疫层析法、镜检法和 PCR 法在 102 份疟疾疑似病例血样的检测中阳性率分别为 63.73%、

54.90%、70.59%，单克隆抗体免疫层析法和 PCR 法的阳性率均高于镜检法。在常规疟疾检测工作中，单克隆抗体免疫层析法或 PCR 法均可作为镜检法的有效补充，能进一步提高疟疾病例的临床诊断水平。焦炳欣等^[25]还认为 OptiMAL 法可反映药物治疗后疟原虫数量的下降，能够评估治疗效果和鉴定抗药疟原虫株的出现。

2.3.3 谷氨酸脱氢酶 (glutamate dehydrogenase, GDH) 抗原检测 GDH 以其独特的物理化学性质成为用于疟疾诊断新的候选分子，李妍等^[26]建立的 GDH 胶体金层析法检测恶性疟的敏感度为 86.66%，特异度为 96.43%。

3 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR)

3.1 普通 PCR 该技术原理与细胞内的 DNA 复制相似，是一种体外快速扩增靶基因或 DNA 序列的方法。目前，PCR 技术已广泛应用于病原体诊断、基因表达、遗传病检测等生命科学研究领域^[27]。华德等^[28]应用普通 PCR 技术对保存 1~5 年的血样进行检测，PCR 结果与原镜检结果的总符合率为 98.4%，表明长期保存标本不影响 PCR 结果。

3.2 实时荧光定量 PCR 该技术是在普通 PCR 的基础上发展起来的核酸荧光定量技术。实时荧光定量 PCR 的检测敏感度可达到每 μL 血液 0.2~4.0 个疟原虫^[29]。张国斌^[30]采用镜检和实时荧光 PCR 分别检测疟原虫阳性和阴性血样各 20 份，实时荧光定量 PCR 在检测时具有快速、准确度高、阳性检出率高的特点。李素华等^[31]将实时荧光 PCR 与镜检和巢式 PCR 进行比较，荧光定量 PCR 的阳性检出率为 93.7%，高于其他两种方法，且敏感度和特异度更高，用时更短。

3.3 巢式 PCR 该技术利用两对 PCR 引物进行两次 PCR 扩增，从而使靶序列得到两轮扩增，可增加 PCR 检测技术的敏感度和特异度。Yentur Doni 等^[32]采用巢式 PCR 和显微镜观察两种方法对 153 例疑似疟患者血样进行检测和比较发现，巢式 PCR 检出阳性标本 15 份 (占 9.8%)，显微镜观察检出阳性标本 11 份 (占 7.2%)，两种方法的阳性符合率为 73.3%。吴冬妮等^[33]对疟疾快速诊断试剂盒 (rapid diagnostic tests, RDTs)、显微镜检法和巢式 PCR 3 种方法进行比较分析，在恶性疟原虫的鉴定能力上，RDTs 最佳，符合率为 100.00%；巢式 PCR 次之，符合率为 97.49%；镜检法的符合率为 91.40%。

3.4 多重 PCR 多重 PCR 又称多重引物 PCR 或

复合 PCR，是以传统 PCR 技术为基础，可同时检测两对以上疟原虫的引物，对多个 DNA 模板或不同区域片段进行扩增，从而减少操作步骤，且省时省力^[34]。黄雨婷等^[35]对间日疟原虫、恶性疟原虫、卵形疟原虫和三日疟原虫进行单一及混合疟原虫 DNA 模板检测，结果显示，4 种疟原虫单一感染检出的最低浓度均接近每 μL 血液中 1 个疟原虫。魏晓光等^[36]用多重 PCR 法和荧光定量 PCR 法对 55 例临床疟疾病例标本进行检测，其中多重 PCR 法检出疟原虫 42 份，阳性率为 76.36%，荧光定量 PCR 法检出疟原虫 41 份，阳性率为 74.55%，两种 PCR 方法的敏感度、特异度均较高，有较高推广应用价值。上述研究结果均提示，多重 PCR 方法具有敏感度和特异度高、操作简便快速、检测结果易于判断的优点，一次反应即可确定 4 种人体疟原虫。

3.5 多重荧光定量 PCR 该技术由实时荧光 PCR 与多重 PCR 优化发展而来，通过将几种不同的探针荧光基团混合，可同时检测基因序列不同的疟原虫。何晓翔等^[37]研究表明，恶性疟疾可检测到每 mL 10^2 个拷贝，间日疟原虫、三日疟原虫、卵形疟原虫可检测到每 mL 10^3 个拷贝。多重荧光定量 PCR 检测 4 种疟原虫的特异度较高，重复性较好，且敏感度较高，可用于疟原虫快速筛查及分型鉴定。

4 结语

目前以传统镜检法为基础的病原学诊断方法仍是疟疾诊断的“金标准”，具有价格低廉、对设备要求低、易于基层开展等优点，但其敏感度低，且费时费力，需要有相当经验的人员才能做出正确的诊断。另外，低疟原虫血症和混合感染也使传统的诊断方法不能适应现代疟疾监控的要求。

近年来，疟疾诊断技术在免疫学和 PCR 技术方面均有较大的发展。在免疫学方面，免疫层析技术操作简单、快速，使实验室外的患者自我检测成为可能，较适合现场人群筛查，但其敏感度较低，检测无症状带虫者时易出现假阴性结果。在 PCR 技术应用方面，PCR 对疟原虫诊断及虫种鉴定均具有较高的敏感度和特异度，特别是对于低密度疟原虫感染的病例较容易检测到^[5]；但 PCR 检测技术需要特殊的设备，且仪器体积较大，不易移动，不利于现场应用，检测操作较费时，成本较高，因此该技术适用于医疗设备条件好且技术人员充足的大型医院，而在基层单位的推广仍面临很大困难。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- 1 王玉水, 王海东, Pascal Mongoy. 中西医结合治疗儿童疟疾罕见病例 12 例 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2006, 13 (2): 110. DOI: 10.3321/j.issn.1008-9691.2006.02.021.
- 2 高世同, 李晓恒, 谢旭, 等. 一宗境外输入性疟疾死亡个案的流行病学调查 [J]. 中国公共卫生管理, 2013, 29 (3): 376-377.
- 3 车河龙, 林栋. 疟疾的防控现状及进展 [J]. 热带医学杂志, 2010, 10 (2): 218-220.
- 4 田睿, 徐惠芳, 朱小燕, 等. 全球疟疾流行现状及我国输入性疟疾疫情态势分析 [J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2013, 36 (6): 425-427.
- 5 杨和仙, 李加全. 云南省保山市 2013-2019 年境外输入性疟疾流行特征分析 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2020, 38 (5): 660-663. DOI: 10.12140/j.issn.1000-7423.2020.05.022.
- 6 FLEISCHER B. Editorial: 100 years ago: Giemsa's solution for staining of plasmodia [J]. Trop Med Int Health, 2004, 9 (7): 755-756. DOI: 10.1111/j.1365-3156.2004.01278.x.
- 7 BARBER B E, WILLIAM T, GRIGG M J, et al. Limitations of microscopy to differentiate *Plasmodium* species in a region co-endemic for *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* [J]. Malar J, 2013, 12: 8. DOI: 10.1186/1475-2875-12-8.
- 8 迟淑萍, 刘佳, 洪炜, 等. 细胞形态学镜检恶性疟原虫配子体临床病例分析 [J]. 检验医学与临床, 2011, 8 (8): 956-957. DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.08.030.
- 9 韦守福, 谢贤. 静脉血与末梢血在使用血细胞分析仪进行血常规检测中结果的稳定性 [J/CD]. 临床检验杂志(电子版), 2018, 7 (2): 183-185.
- 10 刘佩娜, 王兴振, 朱声华, 等. 新型荧光光源吡啶橙染色和 QBC 技术快速诊断间日疟的现场评价 [J]. 地方病通报, 1999, 14 (2): 41-43. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3711.1999.02.014.
- 11 MAKLER M T, RIES L K, RIES J, et al. Detection of *Plasmodium falciparum* infection with the fluorescent dye, benzothiocarboxypurine [J]. Am J Trop Med Hyg, 1991, 44 (1): 11-16. DOI: 10.4269/ajtmh.1991.44.11.
- 12 张庆军. BCP 荧光染色法诊断疟疾的实验研究 [J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 1998, 5 (1): 17-20.
- 13 KAWAMOTO F. Rapid diagnosis of malaria by fluorescence microscopy with light microscope and interference filter [J]. Lancet, 1991, 337 (8735): 200-202. DOI: 10.1016/0140-6736(91)92159-y.
- 14 黄亚铭, 傅伟忠, 韦海燕, 等. 全蚊压片荧光吡啶橙染色法快速检查蚊体内孢子 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1997, 15 (2): 63. DOI: 10.1007/BF02951625.
- 15 房文, 潘嘉云, 郑香, 等. 两种疟原虫抗原片不同保存温度及时间稳定性比较 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2012, 24 (3): 326-328, 349. DOI: 10.3969/j.issn.1005-6661.2012.03.019.
- 16 许建卫, 郑汝成, 陈爱康, 等. 间接荧光抗体实验疟原虫镜检和疟史访问结果间的关系 [J]. 中国地方病学杂志, 2004, 23 (4): 55-57. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-4955.2004.04.018.
- 17 李全贞, 李英杰, 欧阳明辉, 等. 用斑点酶联免疫吸附试验筛选抗恶性疟原虫单克隆抗体及检测恶性疟抗原 [J]. 免疫学杂志, 1990, 6 (4): 284. DOI: 10.13431/j.cnki.immunol.j.19900076.
- 18 杨亚明, 刘惠, 李春富, 等. Parasight-F 法检测滤纸干血滴恶性疟原虫 [J]. 实用寄生虫病杂志, 2000, 8 (1): 27. DOI: 10.3969/j.issn.1672-2116.2000.01.010.
- 19 郑香, 汤林华, 许永湘, 等. 快速免疫色谱测试卡诊断恶性疟和间日疟的效果评价 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1999, 17 (4): 45-46. DOI: 10.1361/105497199770335938.
- 20 张再兴, 杨煌, 杨继红, 等. 快速免疫色谱法诊断恶性疟原虫试验研究 [J]. 医学动物防制, 2000, 16 (10): 548-550.
- 21 IQBAL J, SHER A, RAB A. Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2-based immunocapture diagnostic assay for malaria: cross-reactivity with rheumatoid factors [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38 (3): 1184-1186. DOI: 10.1128/JCM.38.3.1184-1186.2000.
- 22 何卓, 李正祥, 庄世锋, 等. 疟原虫胶体碳试纸条的研制 [J]. 热带医学杂志, 2017, 17 (3): 323-327.
- 23 廖远泉. 感染性疾病实验诊断实用技术—免疫层析试验 [J]. 实用检验医师杂志, 2020, 12 (2): 127-128. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2020.02.019.
- 24 雷露, 刘学升, 毛玲玲, 等. 3 种实验室检测方法在疟疾诊断中的应用比较 [J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2015, 26 (2): 206-207, 210. DOI: 10.11853/j.issn.1003.4692.2015.02.027.
- 25 焦炳欣, 华文浩, 陈志海, 等. 三种检测方法在疟疾诊断和疗效中的应用评估 [J]. 中国医药导报, 2012, 9 (27): 98-99, 102. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7210.2012.27.040.
- 26 李妍, 宁云山, 李莉, 等. 抗恶性疟原虫谷氨酸脱氢酶单克隆抗体的研制与胶体金免疫层析方法的建立 [J]. 第一军医大学学报, 2005, 25 (4): 435-438. DOI: 10.3321/j.issn.1673-4254.2005.04.017.
- 27 王非, 蒋建一, 华炯刚, 等. 聚合酶链反应技术及其在应用 [J]. 动物医学进展, 2006, 27 (6): 103-107. DOI: 10.3969/j.issn.1007-5038.2006.06.027.
- 28 华德, 蔡贤铮, 王香凤. 疟疾 PCR 检测不同保存时间的滤纸血斑的结果 [J]. 海南医学, 2000, 11 (6): 4-5. DOI: 10.3969/j.issn.1003-6350.2000.06.003.
- 29 陈旭, 齐凤坤, 康立功, 等. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及其在应用 [J]. 东北农业大学学报, 2010, 41 (8): 148-155. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9369.2010.08.029.
- 30 张国斌. 疟疾的实时荧光 PCR 快速检测方法探讨 [J]. 中国医药指南, 2017, 15 (7): 17-18. DOI: 10.15912/j.cnki.goem.2017.07.011.
- 31 李素华, 李静, 高丽君, 等. 荧光定量 PCR 在疟疾实验室诊断中的应用 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2019, 37 (2): 232-234. DOI: 10.12140/j.issn.1000-7423.2019.02.021.
- 32 YENTUR DONI N, YILDIZ ZEYREK F, SEYREK A. Detection of *Plasmodium* using filter paper and nested PCR for patients with malaria in Sanliurfa, in Turkey [J]. Malar J, 2016, 15 (1): 299. DOI: 10.1186/s12936-016-1334-2.
- 33 吴冬妮, 夏菁, 李凯杰, 等. 万孚疟原虫检测试剂盒 (RDTs) 在湖北省输入性疟疾检测中的应用研究 [J]. 公共卫生与预防医学, 2020, 31 (3): 46-49.
- 34 陈梦妮, 毛祥华, 邓艳, 等. 云南省疟疾疫情病例原虫镜检疑难形态的鉴定 [J]. 中国病原生物学杂志, 2017, 12 (3): 227-232. DOI: 10.13350/j.cjpb.170308.
- 35 黄雨婷, 余丹娅, 卢丽丹, 等. 单管单轮多重 PCR 检测 4 种疟原虫混合血样 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2015, 33 (3): 200-205.
- 36 魏晓光, 王增国, 李芳. 4 种检测方法在用药后疟疾诊断中的应用分析 [J]. 医学动物防制, 2017, 33 (5): 515-517. DOI: 10.7629/yxdwz201705014.
- 37 何晓翔, 雷永良, 王晓光, 等. 多重荧光定量 PCR 测定疟原虫方法建立 [J]. 中国现代医生, 2016, 54 (23): 4-6, 10, 169.

(收稿日期: 2021-09-10)

(本文编辑: 邵文)