

• 综述 •

疟疾病原学检测研究进展

唐克香¹ 综述, 杨恒林^{1,2*} 审校

(1. 大理学院病原与媒介生物研究所, 云南大理 671003; 2. 云南省寄生虫病防治所, 云南省疟疾研究中心)

【摘要】 疟疾威胁人类的健康和生命, 特别是在贫困、不发达的国家, 疟疾的危害更加严重。本文概括了目前疟疾病原学的诊断方法及其研究和应用进展。

【关键词】 疟疾; 检测方法; 病原学; 综述

【中图分类号】 R531.3 【文献标识码】 A 【文章编号】 1673-5234(2011)09-0694-03

[*Journal of Pathogen Biology*. 2011 Sep; 6(9): 694—696.]

Advances in the determination of malaria etiology

TANG Ke-xiang¹, YANG Heng-lin^{1,2} (1. *Institute of Pathogen and Vectors of Dali University, Dali 671003, Yunnan, China*; 2. *Yunnan Institute of Parasitic Diseases, Malaria Research Center of Yunnan Province*)

【Abstract】 Malaria is a serious infectious disease which that threatens the health and life of people around the world, and especially those in poorer countries. This paper summarizes the most common methods of determining malaria etiology and research on those methods as well as advances in their use.

【Key words】 Malaria; method of diagnosis; etiology

引起人类疟疾的疟原虫有 4 种, 分别是恶性疟原虫、间日疟原虫、卵形疟原虫和三日疟原虫。世界范围内, 疟疾每年导致约 100 万人死亡, 绝大部分集中在非洲^[1~5]。近年来, 随着国际交往日益频繁, 以及中国对外经济援助、派遣维和人员等国际事务日趋增多, 特别是同高疟区国家的往来, 不可避免地将疫区流行的疟疾引入我国。准确、及时诊断是安全有效地治疗疟疾的基础。本文综述了目前疟原虫病原学诊断方法的研究进展。

1 传统显微镜检查法

检出疟疾的病原体—疟原虫, 是明确诊断的最直接证据。目前最常用的是显微镜检查法, 检查标本为外周末梢血涂制厚、薄血膜, 划皮取组织液涂制厚、薄血膜及取脑脊液涂制厚、薄血膜, 其中外周末梢血涂制厚、薄血膜为最常用的方法。具有操作简便、敏感、价廉和可鉴别虫种等优点, 显微镜检查疟原虫被广泛地用于疟疾的病原学诊断。其主要是通过手动移片和对焦的生物显微镜, 用眼部紧靠目镜进行读片。这种持续的工作可使读片准确性和工作效率降低, 甚至可诱发检验人员的眼部疾病, 加之病原检查对镜检者技术要求较高, 镜检阳性率非常主观化, 不同的镜检者可能会得出不一样的结果。其影响因素如下。

(1) 由于抗疟药对外周血疟原虫有很强的抑制作用, 所以对服用有抗疟药的患者进行检查, 其结果常常为假阴性。因此询问是否服用抗疟药对病情诊断十分重要。

(2) 大多数再次复诊的患者, 其检测结果也有可能为假阴性。这主要是因为患者体内已经产生针对疟原虫的有效抗体。厚片法检测可以降低其发生率, 但是该法对镜检人员的技术要求较高。

(3) 有些初发患者, 其外周血的疟原虫密度很低; 这也可能导致检测中出现假阴性结果; 因此可以采取多次检测的方法。甚至有专家认为, 疟原虫的血片检查时间应至少在 10 min 以

上, 才能报告阴性的结果^[6,7]。

(4) 此外, 有些隐形感染者, 其临床表现常常无疟疾的特征, 只是伴有轻度的贫血; 针对此种情况, 骨髓检查是非常关键的。因此, 可以通过骨髓检测对不明原因的且身处于疫区内的贫血患者进行疟疾感染的排除诊断。

2 荧光显微镜镜检

一般来说, 正常的成熟红细胞内是不含有 DNA 和 RNA 的, 而疟原虫却含有; 因此可根据该原理对疟原虫进行荧光染料检测。较常用的荧光染色显微镜镜检技术为吖啶橙染色法、QBC 技术以及 BCP 法。

2.1 吖啶橙(acridine orange, AO)染色法 AO 是一种非常敏感的荧光染料。含 DNA 的细胞和含 RNA 的细胞在染上此种材料后分别呈黄绿色荧光, 桔红色荧光, 因此可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^[8]就设计了 AO 滤色系统和卤素光源, 使之可以在传统光镜下进行检查并得到广泛应用; 此法较适用于薄血膜上固定的原虫检查, 对于厚血膜原虫来说, 效果并不理想^[9]。Lowe 等^[10]参照常规的染色镜检法, 用薄血膜 AO 法检测肯尼亚的 200 例患者, 结果显示该法的敏感性和特异性分别为 97.9% 和 86.5%, 原虫密度在低于 100 个/ μ l 的情况下, 其敏感性也随之降为 83.3%; 此外该法只能鉴定恶性疟原虫, 而不能正确鉴定三日疟原虫和卵形疟原虫, 由此认为 AO 法除虫种鉴别困难外, 其他方面优于姬氏染色法。

AO 法的优点在于其简单、快速、敏感, 因此特别适用于流行区内大规模的定性筛选。但由于存在染色无特异性的缺点, 使得所有类型细胞的核酸都可着色, 这就要求镜检者需从含核

* 【通讯作者】 杨恒林, E-mail: yang_henglin@yipd.org

【作者简介】 唐克香(1976—), 女, 大理学院在读硕士研究生。研究方向: 病原生物学。E-mail: tkexiangdl@126.com

酸的其他细胞中区分虫体。另外染液量与血膜厚薄也影响着该法的染色效果,过深或过浅均不能识别虫体;为此镜检人员需接受专业培训,并为普通光镜安装激发光源或滤光片。

2.2 QBC技术(Quantitative Buffy coat technique) 通常情况下,受染的红细胞要比正常红细胞轻,但比白细胞略重;因此用抗凝剂和荧光素包被的特制毛细管定量采末稍血,经离心分层,受染红细胞被浓集于正常红细胞压积与棕黄色素层之间,经荧光素染色的原虫胞核呈黄绿色,胞浆呈桔红色,故而易被检出。该法又称血沉棕黄层定量分析法。该法的优点在于易操作、检测速度快、敏感性和特异性较强,较适用于大面积低原虫血症疟疾的定性筛选。该方法的缺点是:1)耗材设备的费用高;2)虫株的鉴别和计数较为困难^[11];3)检测结果仅能保存几小时,故仍需与厚、薄血膜涂片同时进行。QBC技术在现场应用中仍受到客观因素的限制,但对于大面积低原虫血症疟疾普查的定性筛选,该方法还是较为实用的。

2.3 BCP(Benzothiocarboxypurine)荧光染色法 BCP是一种具有某些染色特征的荧光染色剂,它可以对疟原虫的各发育期进行染色。此外被染的网织红细胞呈独特的点状,白细胞胞浆呈亮绿色,存活的白细胞不着色,血膜中的异物也不呈荧光色,因此易于镜检者的观察和区别。Makler等^[12]首次采用BCP对恶性疟原虫进行荧光染色检查,其灵敏度可达到0.01%。随后,Hunt等^[13]通过对冈比亚疟疾流行区的研究也表明,此法的敏感性和特异性均大于90%,并认为该法可替代姬氏染色法。此外我国张庆军等^[14]对泰国恶性疟和间日疟病人厚血膜进行检测,发现其敏感性和特异性分别为97.4%、91.2%和66.7%、50.0%。这些证据都说明该法的敏感性、操作简便性、检测速度以及染色后的稳定性都要高于姬氏染色法,即使是对储存120 d后的厚血膜,其着色效果也比较好。该法的准确性不受血片质量、疟原虫期和原虫密度的影响,对镜检者的技术也要求不高,唯一的缺点就是需配置高电流强度的水银灯或卤素光源的显微镜。

3 暗视野镜检法

疟色素是疟原虫消化血红蛋白的剩余物,它不被溶解和吸收;在裂体增殖完成时入血流被吞噬细胞清除,或存在于含疟色素的受染红细胞中被直接吞噬。Jamjoom等^[15]在认识到这一特性后,对疟色素进行了暗视野显微镜检查,受检的38例恶性疟样本结果与厚血膜姬氏染色检出率相同,其吻合率高达90%。Metger等^[16]通过研究发现,存在于白细胞中的疟色素是评估预后的一个敏感指标;他们对热带非洲高疟流行区的104例恶性疟原虫感染者进行检测发现,外周血中83%的单核细胞和50%的嗜中性粒细胞中都含有疟色素。一般来说,疟色素短时间出现于少数噬中性粒细胞,此情况主要见于感染严重疟疾的儿童;而较长时间的出现于单核细胞中,并见于所有年龄段的患者。居于此特点,再加上该法简易、快速,且极易发现疟原虫的色素^[15],有学者认为,在抗疟药自由应用的疟区中,应大力推广此方法;特别是对于严重发热疾病的鉴别诊断非常有价值。

4 细胞浓聚镜检法

Petitthory等^[17]早在1997年就曾采用福尔马林和硫柳汞的等渗皂液作溶剂和固定剂进行姬氏染色。结果显示,检出的60名阳性疟疾患者中57名厚血片法阳性,获得的裂殖体和

配子体密度大大高于后者,并较易找到含疟色素的白细胞。并能估算其在白细胞总数中的百分比;据此他们认为该法可作血中滋养体已消失的疟疾患者的回顾性诊断。有学者还认为该法较优于厚血片法,因其避免了一些繁琐步骤,诊断迅速,收集的虫体和含色素白细胞数目多且形态完整;此外,该法所用的试剂价格低廉,易于基层工作的推广。

5 疟原虫的多角度偏振光散射技术(MAPSS)

MAPSS为近年来发展的新技术,其主要以CD-3500和CD-3000型血细胞分析仪为代表。其原理是通过多角度偏振光散射技术进行白细胞分类计数,偏振激光束可射照单个排列细胞(集中于直径30 μm 的小股液流中),并进一步分辨细胞,该技术采用了其他仪器很少用的 10° 窄角和偏振加消偏振检测法,使得其分辨能力大大提高。寄生在红细胞内期的疟原虫噬血红蛋白,并通过代谢转化形成疟色素,被单核细胞吞噬;含有疟色素的单核细胞发生非典型消偏振,与典型的单核细胞消偏振出现明显区别。该技术还采用特定程序自动储存分析数据,并经电脑软件处理。通过简单的血常规检查就可以对疟疾进行“筛查”,并且通过电脑软件系统发出报警。

该方法的主要优点有:1)MAPSS技术可在血常规检查时发现轻型带虫者,而血涂片镜检法无法应用于这些患者,因为轻症患者一般没有临床症状。而MAPSS可以通过分辨白细胞内疟色素对其进行诊断,这对于感染疟疾的患者是高度特异性的;2)MAPSS技术能够在没有其他临床证据时提示疟疾的存在,为临床筛选疟疾提供了重要信息;3)MAPSS技术是对血涂片诊断的很好补充,MAPSS技术可以在血常规检查中对疟疾进行筛查,在不增加太大工作量的同时大大减少临床漏诊率;4)传统的疟原虫镜检技术需要高水平的疟原虫镜检专家作质量保障,在疟疾得到有效控制,进入疟疾消除阶段,很难培养出这样的专家,而MAPSS技术最大的特点是无需高水平的疟原虫镜检专家。

尽管如此,该法仍然存在许多缺点:1)MAPSS技术无法在红细胞外期、潜伏期检测到疟原虫,由于此期间单核细胞吞噬不到疟色素;2)在红细胞内期间,疟原虫感染的红细胞初期在没有形成疟色素前,没有单核细胞非典型消偏振现象,此为MAPSS技术的盲点,时间为1~3 d(不同疟原虫的增值周期不同);3)MAPSS能够在没有其他临床证据时对患者进行诊断,但是该法不能区分阳性患者是否活体疟原虫,对阳性发热病人,仍需要血涂片常规染色镜检法确定。

国外学者对MAPSS技术进行大量研究,取得可喜成果^[18]。在疟疾的临床诊断中,与以往的全血计数诊断相比,MAPSS技术效果明显^[19]。有一些研究证明了单核细胞和中性粒细胞的数量与疾病的严重程度有密切的相关性,也有研究证明这种方式与以往的检测方法相比有较好的预测性^[20]。

6 结语

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意义。传统的镜检和以传统的镜检法为基础的病原学诊断仍是诊断疟疾的金标准。其具有价格低廉、对设备要求低、易于基层开展等优点,但其敏感性低,且费时费力,需要有相当经验的人员才能做到正确的诊断。因此,不适合大规模样品的检测。低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,因此新的诊断技术应运而生。我国疟防工

作进入清除阶段,传染源监测与发现显得十分重要。由于发病呈大幅度下降,镜检人员难以见到疟原虫,无法提高镜检技术,从而使传统的镜检方法难以发挥其作用。建议加强对 MAPSS 技术在内的检测方法的评价研究,尽快提供以消除疟疾相适应的检测方法和技术。

目前,疟疾诊断方法的研究很多,除了上述介绍的方法在我国广泛应用以外,PCR 技术发展很快,许多学者探索出多种 PCR 技术,最具有发展潜力的标签引物一套式/多重 PCR 技术有很高的敏感性、特异性和稳定性,为研发新疟原虫的诊断方法提供了前景。

【参考文献】

- [1] Centers for Disease Control and Prevention. Malaria surveillance United States[M]. Morb Mortal Wkly Rep, 2003, 25—39.
- [2] Mangold KA, Manson RU, Koay ESC, et al. Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium spp*[J]. ClinMicrobio, 2005, 43; 2435—40.
- [3] Myjak P, Nahorski W, Pieniazek NJ, et al. Usefulness of PCR for diagnosis of imported malaria in Poland [J]. Eur J Clin Microbio Infect Dis, 2002, 21; 215—8.
- [4] Kockaerts Y, Vanhees YS, Knockaert DC, et al. Imported malaria in the 1990s: a review of 101 patients [J]. Eur JE Merg Med, 2001, 8; 287—90.
- [5] Hamza AB, Petra S. Application of molecular methods for monitoring transmission stages of malaria parasites [J]. Biomed Mate, 2008, 3(12); 1—12.
- [6] 张莉尼, 陈忠. 在非洲感染恶性疟原虫 1 例[J]. 临床检验杂志, 2003, 21(3); 188.
- [7] 梁剑宁, 李仲笑. 恶性疟原虫的隐性感染与纯红细胞再生障碍性贫血[J]. 临床误诊误治, 2002, 15(14); 283.
- [8] Kawamoto F. Rapid diagnosis of malaria by fluorescence microscopy with light microscope and interference filter [J]. Lancet, 1991, 337; 200—2.
- [9] Kawamoto F, Billingsley PF. Rapid diagnosis of malaria by fluorescence microscopy[J]. Parasitology Today, 1992, 8(2); 69—

71.

- [10] Lowe BS, Jeffa NK, New L, et al. Acridine orange fluorescence techniques as alternatives to traditional Gtensa staining for the diagnosis of malaria in developing countries[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1996, 90(1); 34—6.
- [11] Warhurst DC, Wiltiams JE. Laboratory diagnosis of malaria[J]. J Clin Pathol, 1996, 49(7); 533—8.
- [12] Makler MT, Ries LK, Ries J, et al. Detection of plasmodium infection with the fluorescent dye, benzothio-carboxypurine[J]. Am J Trop Med Hyg, 1991, 44(1); 11—6.
- [13] Hunt CA, Morris JS, Horton J, et al. Evaluation of benzothio-carboxypurine for malaria diagnosis in an endemic area [J]. Frans R Soc^o Trop Med Hyg, 1993, 87(5);549.
- [14] 张庆军, Joubert J, Suptra T, 等. 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); 15—8.
- [15] Jamjoom GA. Improvement in darkfield microscopy for the rapid detedtion of malaria parasites and its adaptation to field conditions [J]. Frans R Soe Trop Med Hyg, 1991, 85(1); 38—9.
- [16] Metger WG, Mordmuller BG, Kremsner IG. Malaria pigment in leukocytes [J]. Frans R Soc Trop Med Hyg, 1991, 85(1); 38—9.
- [17] Petitthory JC, Ardoin F, Ash LR, et al. Microscopic of blood parasites following a cytoconcentration technique[J]. Am J Trop bled Hyg, 1997, 57(6); 637—42.
- [18] De Langen AJ . Automated malaria diagnosis in northern Namibia[J]. Tropical Medicine and International Health, 2006, 2(6); 809—16.
- [19] Hanscheid T, Pinto BG, Pereira I, et al. Avoiding misdiagnosis of malaria: a novel automated method allows specific diagnosis, even in the absence of clinical suspicion[J]. Emerg Infect Dis, 1999, 5; 836—8.
- [20] Nguyen PH, Day N, Pram TD, et al. Intraleucocytic malaria pigment and prognosis in severe malaria[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1995, 89; 200—4.

【收稿日期】 2011-04-21 【修回日期】 2011-07-05

(上接 717 页)

清淡、温性、可口、易消化的流质或半流质饮食,禁食冰冷、辛辣、咸等刺激性食物,对因拒食拒水而造成脱水、酸中毒者,要给予补液,及时纠正水电解质平衡紊乱。不宜让患者喝生水、吃生冷食物,食物温度也不宜过高。

5 小结

手足口病既往每年均有散在发病,以 5~8 月份多见^[5,6],主要传播途径是接触病人的粪便、疱疹液和呼吸道分泌物及其污染物,重在预防,且该病无特效治疗方法,主要以对症治疗和护理为主。护理上主要在于消毒隔离,积极防治并发症,防止疱疹、溃破感染等。经积极治疗和精心护理,本组 21 例患者均全治愈。手足口病是可防可治的,积极有效的护理护理是手足口病治疗中极其重要的一环,是提高治愈率的重要保证,不仅影响疾病的转归,还能切断手足口病的传播途径,有利于控制手足口病的暴发流行,保护易感人群。

【参考文献】

- [1] 黄学勇,刘国华,陈豪敏,等. 河南省肠道病毒 71 型(EV71)血清流行病学调查[J]. 中国病原生物学杂志,2010,5(8);617—8.
- [2] 王世富,张乐海,马丽霞,等. 山东省部分地区肠道病毒 71 型的 RT-PCR 检测及基因特征分析[J]. 中国病原生物学杂志,2009,4(12);884—6.
- [3] 朱渭萍,薛曹怡,沈迪莘. 上海市浦东新区手足口病流行病学调查及影响因素分析[J]. 中国妇幼保健,2010,25(17);2401—3.
- [4] 孙大鹏,王显军,方立群,等. 2009 年临沂市手足口病流行特征及重症病例危险因素分析[J]. 中国病原生物学杂志,2011,6(2);108—10.
- [5] 许华茹,成洪旗,常彩云. 2007~2009 年济南市手足口病疫情分析[J]. 中国病原生物学杂志,2010,5(12);935—7.
- [6] 周慧,蔡晶娟. 153 例手足口病临床特点分析[J]. 现代医药卫生, 2010,26(3);354—5.

【收稿日期】 2011-07-22 【修回日期】 2011-08-23