

[文章编号] 1005-6661(2012)01-0067-05

• 论著 •

基于油镜的全自动显微图像扫描采集系统改进和优化及在疟疾血片复审的应用

高原¹, 纵兆民¹, 杨佩才¹, 张洪英¹, 魏德会¹, 李燕青¹, 黄景章², 周晓农³

[摘要] **目的** 对基于油镜的全自动显微图像扫描采集系统(图象系统)软件部分进行修改和优化,并观察该改进和优化后的系统在疟疾血片复审中的应用效果。**方法** 对基于油镜的全自动显微图像扫描采集系统进行了软件部分的修改和优化。用改进和优化后的图象系统对云南省腾冲县的4个乡镇医疗机构门诊镜检站镜检员人工常规镜下读片的115张疟疾血片进行复审,比较该图象系统和人工镜下读片的准确度、敏感度和特异度。**结果** 改进和优化后的图象系统扫描速度得到了提升,实际操作更加方便简捷。扫描的图片自动保存后,可以反复研读,集体判读。并可以通过网络建立血片复审机制和远程诊断。在疟疾血片复审中显示,图象系统诊断疟疾的整体准确度为100%,高于人工常规镜检的准确度(95.5%)($P=0.002$);敏感度和特异度均为100%,亦高于人工常规镜检法(分别为91.30%和94.52%)(P 均 <0.05)。**结论** 改进和优化后的图象系统功能强大,扫描速度快,操作简便快捷,在疟疾读片的速度、准确度、敏感度和特异度方面均优于人工常规镜下读片,适于在基层推广使用。

[关键词] 疟原虫;油镜;全自动;扫描;镜检;复审

[中图分类号] R531.3 **[文献标识码]** A

Improvement of fully automatically microscopic scanning system based on the oil-lens and its application in reading of malaria blood smears

Gao Yuan¹, Zhong Zhao-min¹, Yang Pei-cai¹, Zhang Hong-ying¹, Wei De-hui¹, Li Yan-qing¹, Huang Jing-zhang², Zhou Xiao-nong³

1 Nanjing Municipal Center for Disease Control and Prevention, Jiangsu Province, Nanjing 210003, China; 2 Nanjing Municipal Bureau of Health, Jiangsu Province, China; 3 National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, China

[Abstract] **Objective** To improve the automatically microscopic scanning system based on the oil-lens and apply it in reading of malaria blood smears. **Methods** The software of the system was modified and optimized. A total of 115 blood films from Tengchong City of Yunnan Province were examined by the automatically systematic method or read by blood smear examination staff of Tengchong City and the accuracy, sensitivity and specificity were determined and compared between the two methods. **Results** The scanning of the system was speedier and the actual operation was more simple and convenient. The accuracy, sensitivity and specificity of the system were better than those of the professional staff. There was a significant difference of accuracy between the two methods ($P=0.002$) and there was a significant difference of comprehensive sensitivity and specificity between the two methods ($P<0.01$). Moreover, the system had the function of automatically saving scanning pictures which could be read again by everyone through the Internet. **Conclusions** The fully automatically microscopic scanning system based on the oil-lens has many functions and the operation is simple. It can improve the speed, accuracy, sensitivity and specificity of malaria blood smears and those indices are much better than those of the reading smears under a microscope by the professional staff. Therefore, it is easier to be applied at the grassroots level.

[Key words] *Plasmodium*; Oil-lens; Automation; Scanning; Microscopy; Review

疟疾是人类最重要的热带传染病之一,世界上超过40%的人生活在疟疾疫区,全球每年约有2亿~3亿

人患病,超过100万人死于疟疾,绝大多数为5岁的儿童^[1-2]。我国目前有23个省(自治区、直辖市)流行疟疾,2009年全国报告疟疾发病14 491例,发病率为0.11/万,报告疑似病例59 741例,死亡12例^[3-4]。

随着免疫学诊断及近代分子生物学研究的发展^[5],疟疾的诊断也有了长足的进步。目前,疟疾诊断方法主要分为3类:以传统的镜检法为基础的病

[基金项目] 江苏省卫生厅项目(X200925)

[作者单位] 1 江苏省南京市疾病预防控制中心(南京 210003); 2 江苏省南京市卫生局; 3 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所

[作者简介] 高原,男,副主任医师。研究方向:血吸虫病、寄生虫病、地方病防治

原学诊断、免疫学诊断和分子生物学诊断。近年来出现的一些新技术,如杂交瘤单克隆抗体技术、核酸杂交技术、聚合酶链反应等在疟疾诊断上的应用已受到重视,并进行了多方面的研究^[6-15]。这些方法虽有应用前景,但由于受到试剂、实验室条件等方面的限制,仍未广泛应用于临床和流行病学现场。因此,从疟疾患者或疑似疟疾病人血液中查获疟原虫仍为主要的确诊手段。

在疟疾的病原学诊断方面,许多专家进行过多方面的研究,但均没有实质性突破。所以目前在疟疾诊断中仍然以传统的血片染色镜检方法作为疟疾诊断的金标准^[16-17]。该方法通过手动移片对焦,并用肉眼和普通显微镜下观察来进行结果判读,劳动强度大,镜检人员常因眼睛疲劳而导致读片准确性和工作效率降低,长期镜下作业会引起镜检员眼部疼痛、视力下降等不良后果。各级镜检站的镜检人员迫切需要一种能替代人眼在目镜下读片的自动化机器,以减轻工作强度,提高读片的效率和准确性。

2010年南京市疾病预防控制中心(疾控中心)和上海北昂医疗技术有限公司共同开发了基于油镜的全自动显微图像扫描采集系统(简称图像系统),以代替传统的人工镜下读片,旨在提高疟疾镜检效率和疟原虫检出率。用该系统进行现场读片试验结果显示,该系统较传统读片速度提高了30.58%,读片的总符合率提高了13.33%,效果令人满意^[18]。2011年我们根据实际操作中出现的问题,对图像系统进行了改进和优化,并于2011年7月在云南省腾冲县对其下辖的4个乡(镇)的部分血片进行了复审,取得了良好的效果,现报告如下。

内容与方法

1 图像系统研发简介

在传统光学生物显微镜的基础上,开发全自动扫描硬件装置和软件,高速扫描油镜下疟原虫图像,并保存在电脑中,实现用电脑屏幕替代人眼直接在显微镜下读片。该系统能对图像进行编辑、标注、疟原虫和白细胞计数、报告单打印等操作。本系统由光学显微镜、数码摄像机/模拟摄像机、控制软件和普通电脑组成,其中,X、Y、Z 3轴的自动移位扫描、灯光的强弱全部由电脑指令控制。血片放入载物台后,可用鼠标在软件界面上进行X、Y、Z轴的自动粗对焦和精确对焦,确定扫描图片张数后,点击扫描按钮可进行自动图像扫描,并把扫描的图像自动储存于电脑硬盘中。

检验人员利用电脑屏幕进行读片,可进行疟原虫和白细胞的标注和计数,并能添加文本文字,可将选定的图像打印在报告单上。

2 图像系统的改进与优化

2.1 系统改进 主要是软件部分的改进,在原有系统的基础上增加了数据库和分级网络结构,可通过拓扑结构设置各级权限连接上下级数据库;增设更加实用的按钮,增加了鼠标对焦的功能,使得设置变得更加方便和实用。

2.2 系统优化 对系统界面、扫描速度、图像清晰度、自动回位和复位功能、标注和技术功能以及报告单设计和打印功能等进行了全面的优化。

3 在疟疾血片复审中的应用

3.1 疟疾血片和镜检员 血片采自云南省腾冲县固东、五合、滇滩、猴桥等4个乡镇,共计115张,由这4个乡镇的当地医疗机构镜检员人工镜检完毕后,再由南京市疾控中心的2名镜检员在腾冲当地用图像系统进行复审。所有血片以南京市疾控中心3名经验丰富镜检员经反复镜检确认的血片结果作为金标准,分别与当地镜检员人工读片和图像系统复审读片结果进行比较。

3.2 图像系统读片方法 采用盲法,即不告知镜检员读片结果的情况下,由南京市疾控中心镜检员用图像系统采集图像并读片。

3.3 观察指标 记录每张血片读片结果,计算基层门诊镜检站人工读片和图像系统读片这两种方式的敏感度、特异度和准确度,并进行 t 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。各公式为:敏感度=真阳性血片数/(真阳性血片数+假阴性血片数) $\times 100\%$;特异度=真阴性血片数/(真阴性血片数+假阳性血片数) $\times 100\%$;准确度=(真阳性血片数+真阴性血片数)/受检血片数 $\times 100\%$ 。

结 果

1 主要的系统改进

增加了鼠标调焦功能,勾选功能框后,将鼠标放置图片上点击后即可实现鼠标焦校功能,尤其是在镜下观察时,此功能非常方便实用。在操作界面增加了3个可以自定义的按钮,可以根据扫描标本的需要设置按钮的功能,为大批量的图片扫描提供了方便。同时还增加了数据库和分级网络结构,可通过拓扑结构连接省、市、区(县)以及乡(镇)级的终端,设置各级的权限连接上下级数据库。

2 主要的系统优化

对主界面进行了美化,对图形显示框、按钮等位置进行了优化,更趋合理美观。图像扫描速度从1.5 s/张缩短到1 s/张左右,大大提高了扫描速度。系统改进前扫描100张图片需2.5 min,系统优化后仅需1.6 min左右,提高了工作效率。同时优化了化验单的编辑功能,检验人员可根据不同用途自定义化验单的样式和文字,也可将扫描得到的图片编辑到化验单中,可添加多达8张图片,提高了化验单的实用性。对扫描框中的图片增加了空格键翻页的功能,极大地方便了看图操作。而且还更改了图片格式,将原用的BMP图片格式更改成JPG格式,大大缩小了图片体积,从而增加了硬盘存储图片的数量。对原有的标注、划线等功能进行了优化,增加了大量的编辑功能,使得该项操作更加灵活实用。对自动复位功能也进行了优化,使自动复位功能更加准确,在血片复审中能更准确地找到某区域在血片上的物理位置,为血片复审提供了方便。

3 图像系统在血片复审中的应用效果

南京市疾控中心镜检员采用图像系统在腾冲当地进行血片复审,共审读4个乡镇的血片115张,经反复确认,共检出阳性血片46张,阴性血片69张。南京市疾控中心镜检员以盲法再对该115张血片进行常规镜下读片,结果与图像系统复审符合率为100%。115张中,当地镜检人员共检出间日疟阳性血片32张,经复审结果实际为29张;其中3张血片中,有2张实际为间日疟与恶性疟混合感染,1张为间日疟假阳性。另外,还有1例间日疟漏检,1例恶性疟误判为间日疟(表1)。

采用 t 检验对图像系统和当地常规镜检结果进行统计分析发现,当地疟疾镜检员人工常规读片的敏感度、特异度均低于图像系统,差异有统计学意义($P < 0.05$),尤其在间日疟血片的判读上,图像系统显示出较大优势($P = 0.021$)(表2)。图像系统和当地镜检员人工常规镜检准确度差异有统计学意义($P = 0.002$),图像系统优于常规镜检(表3)。

表1 腾冲县疟疾血片复审结果

Tablet 1 Review results of malaria blood films from Tengchong County

乡(镇) Town	初检结果 Results of blood smear examination staff from Tengchong				复审结果 Review results of blood smear examination staff from Nanjing CDC			
	阳性/真阳性 Positive/true positive			阴性/真阴性 Negative/true negative	阳性/真阳性 Positive/true positive			阴性/真阴性 Negative/true negative
	pv ⁽¹⁾	pf ⁽¹⁾	pv+pf		pv	pf	pv+pf	
固东 Gudong	4/5	0/0	0/0	32/31	5/5	0/0	0/0	31/31
五合 Wuhe	14/12	10/10	1/3	16/16	12/12	10/10	3/3	16/16
滇滩 Diantan	2/1	1/1	0/0	21/22	1/1	1/1	0/0	22/22
猴桥 Houqiao	12/11	2/2	0/0	0/0	11/11	3/3	0/0	0/0
合计 Total	32/29	13/14	1/1	69/69	29/29	14/14	3/3	69/69

(1)pv:间日疟;pf:恶性疟。

(1)pv:*P. vivax*;pf:*P. falciparum*。

表2 图像系统与基层镜检敏感度及特异度比较

Tablet 2 Comparison of sensitivity and specificity of reading blood films by the automatically microscopic scanning system and blood smear examination staff from Tengchong

感染虫种	基层手动镜检		自动图像系统		P
	Results by blood smear examination staff from		Results by automatically microscopic		
	Tengchong		scanning system		
	敏感度	特异度	敏感度	特异度	
	Sensitivity(%,n/N)	Specificity(%,n/N)	Sensitivity(%,n/N)	Specificity(%,n/N)	
pv ⁽¹⁾	96.55(28/29)	95.35(82/86)	100(29/29)	100(86/86)	0.021
pf ⁽¹⁾	92.86(13/14)	100(101/101)	100(14/14)	100(101/101)	0.422
pv+pf	33.33(1/3)	100(112/112)	100(3/3)	100(112/112)	0.422
合计 Total	91.30(42/46)	94.52(69/73)	100(46/46)	100(69/69)	0.048

(1)pv:间日疟;pf:恶性疟。

(1)pv:*P. vivax*;pf:*P. falciparum*。

表3 图像系统与基层镜检准确度比较
Table 3 Comparison of accuracy of reading blood films by the automatically microscopic scanning system and blood smear examination staff from Tengchong (% ,n/N)

乡(镇) Town	基层手动镜检准确度 Accuracy by blood smear examination staff from Tengchong	自动图像系统准确度 Accuracy by automatically microscopic scanning system
固东 Gudong	97.22(35/36)	100(36/36)
五合 Wuhe	95.12(39/41)	100(41/41)
滇滩 Diantan	95.83(23/24)	100(24/24)
猴桥 Houqiao	92.86(13/14)	100(14/14)
合计 Total	95.65(110/115)	100(115/115)

讨 论

随着科学技术的不断进步,疾病诊断技术的机械化、电子化势在必行。近年来,众多的自动化医疗器械广泛应用于疾病诊疗、预防的各个层面,如全自动尿沉渣检测仪、全自动血球分析仪、全自动生化分析仪等^[19-21],但是在疟疾的病原学诊断中仍然沿用的是传统的血液涂片染色人工镜下检查疟原虫的方法。由于传统的镜检是用普通手动移片和对焦的生物显微镜,用眼部紧靠目镜进行读片,持续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。由南京市疾控中心和上海北昂公司共同开发的基于油镜的全自动显微图像扫描系统,力求最大程度地减少使用眼睛,降低长期读片引起的眼部疲劳,从而提高检出率,取得了初步成果。本文是在对该图像系统改进和优化的基础上,在云南腾冲所做的现场读片的对比试验,结果令人满意。

从现场运用的效果来看,图像系统的扫描速度得到了提升,扫描每张图片的时间从1.5 s缩短到1 s。操作界面更趋人性化,增加的各种快捷按钮,可以很方便的进行各种需求设定,例如,可以自定义各种形式的化验单,并把图像加入其中。另设置了快速定义的按钮,方便了检验人员的操作。在实际操作的过程中,要发挥该系统的最佳效能,尚需在读片前期的推片方面进行改进和规范,在推片过程中,因为是手工操作,往往厚血膜和薄血膜的位置偏差较大,血片放置载物台后常需要重新定位,影响了整体扫描速度。

图像系统与传统镜检读片比较结果显示,图像系

统诊断疟疾的整体准确度远高于人工镜下读片($P = 0.02$)。为了更详细地比较图像系统与传统镜检两种方法在腾冲几个乡(镇)的实际应用效果,本文对其敏感度与特异度进行了综合比较,图像系统的敏感度和特异度要高于传统镜检($P < 0.05$)。选择进行敏感度和特异度的综合比较,是因为这样的结果描述比较客观,也比较容易理解。敏感度和特异度的分开统计比较会使敏感度结果与特异度结果产生分离,不容易作总体评价。基于相同的原因,本文对间日疟、恶性疟和两者混合感染的血片也进行了敏感度和特异度的综合比较,结果显示图像系统诊断间日疟的能力要优于传统镜检($P < 0.05$),而诊断恶性疟和混合感染的能力与传统镜检无统计学差异($P > 0.05$),这可能与混合感染血片数量少有关。之所以将3种血片分开比较,是因为血片中不同的病原,其形态学和分布各不相同。

图像系统不但在操作上大大减轻了镜检员的工作量,而且在结果判断上实际优于基层读片的质量,尤其是在间日疟的判读上有较大的优势。该系统的功能优势还在于,扫描的图片自动保存后,可以反复研读,集体判读。还可以利用网络的拓扑结构上下级联网,只要下级单位把扫描的图片放入数据库,上级单位可以随时审读,大大方便了审片过程,且结果可靠,该系统还可以进行远程诊断,值得推广应用。

[参考文献]

[1] World Health Organization. World malaria report 2010[M]. Geneva: WHO Press, 2010.
[2] Feachem RG, Phillips AA, Hwang J, et al. Shrinking the malaria map: progress and prospects[J]. Lancet, 2010, 376(9752): 1566-

- 1578.
- [3] 周水森, 王漪, 夏志贵. 2009年全国疟疾疫情分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2011, 29(1): 1-3.
- [4] 高琪. 我国消除疟疾面临的机遇与挑战[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2011, 23(4): 347-349.
- [5] 祁兆平. 疟疾病原学检查方法的研究及使用现状[J]. 国外医学: 临床化学与检验学分册, 1992, 13(5): 149-151.
- [6] 华德, 林世干, 邢奇芬. 双重PCR用于高疟区疑似疟疾病人诊断效果评价[J]. 中国热带医学, 2011, 11(8): 924-926.
- [7] 唐莉娜, 徐建军, 王世海, 等. 套式/多重PCR检测疟疾感染的应用研究[J]. 热带医学杂志, 2007, 7(8): 813-815.
- [8] 阮卫, 姚立农, 杨婷婷, 等. 多重聚合酶链反应技术诊断疟疾及混合感染的研究[J]. 中国预防医学杂志, 2010, 11(8): 822-825.
- [9] 周增桓, 李海燕, 李英杰, 等. 单克隆抗体夹心斑点免疫金银染色法诊断恶性疟的初步研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1991, 9(3): 169-173.
- [10] 黄玉政, 王玠, 周华云, 等. 流式细胞术诊断疟疾的初步应用[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2010, 22(4): 379-380.
- [11] 汪圣强, 周华云, 李宗, 等. SYBR Green I染料法定量PCR用于人体疟原虫定量检测及虫种鉴别的研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2011, 23(6): 677-681.
- [12] Tao ZY, Zhou HY, Xia H, et al. Adaptation of a visualized loop-mediated isothermal amplification technique for field detection of *Plasmodium vivax* infection[J]. Parasit Vectors, 2011, 4: 115.
- [13] Elbashir HM, Salih MM, Elhassan EM, et al. Polymerase chain reaction and histology in diagnosis of placental malaria in an area of unstable malaria transmission in Central Sudan[J]. Diagn Pathol, 2011, 6(1): 128.
- [14] Merwyn S, Gopalan N, Singh AK, et al. Monoclonal antibodies against recombinant histidine-rich protein 2 of *Plasmodium falciparum* and their use in malaria diagnosis[J]. Hybridoma (Larchmt), 2011, 30(6): 519-524.
- [15] Karl S, Gutiérrez L, House MJ, et al. Nuclear magnetic resonance: a tool for malaria diagnosis? [J]. Am J Trop Med Hyg, 2011, 85(5): 815-817.
- [16] 袁方玉, 陈国英, 黄光全, 等. 疟疾快速诊断技术的研究与应用[J]. 公共卫生与预防医学, 2008, 3(19): 41-42.
- [17] 中华人民共和国卫生部. ws259-2006疟疾诊断标准[J]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [18] 高原, 崔玉峰, 周云, 等. 基于油镜的全自动显微图像扫描采集系统研发及在疟疾诊断中的应用[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2010, 22(2): 168-170.
- [19] 朱琼媛, 朱妹媛, 邓德跃, 等. 尿液沉渣标准化检查与UF-100流式尿沉渣全自动分析仪结果比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(11): 2022-2071.
- [20] 孙俊. 全自动血细胞分析仪对CRP与白细胞联合检测的临床应用评价[J]. 中国医药导报, 2011, 8(11): 128-129.
- [21] 张瑞镐, 王美娟, 居漪, 等. 国产全自动生化检测系统的应用评价[J]. 检验医学, 2008, 23(6): 660-662.

[收稿日期] 2011-11-09 [编辑] 钱熠礼

(上接第66页)

- ods for recovering migrating *Ascaris suum* larvae from the liver and lungs of pigs[J]. J Parasitol, 1996, 82(4): 612-615.
- [6] Slotved HC, Eriksen L, Murrell D, et al. Comparison of methods for recovery of *Ascaris suum* larvae from tissues of mice[J]. Int J Parasitol, 1997, 27(11): 1305-1310.
- [7] 刘素兰, 包志明. 酶联免疫吸附试验诊断蛔虫感染的可行性研究[J]. 中国校医, 1997, 11(1): 76-77.
- [8] Fujiwara TR, Zhan B, Mendez S, et al. Reduction of worm fecundity and canine host blood loss mediates protection against hookworm infection elicited by vaccination with recombinant Ac-16[J]. Clin Vaccine Immunol, 2007, 14(3): 281-287.
- [9] Sun JB, Mielcarek N, Lakew M, et al. Intranasal administration of a *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase-cholera toxoid conjugate vaccine evokes antiparasitic and antipathological immunity in mice[J]. J Immunol, 1999, 163(2): 1045-1052.
- [10] William FG, Agnes K. The abundant larval transcript-1 and -2 genes of *Brugia malayi* encode stage-specific candidate vaccine antigens for filariasis[J]. Infect Immun, 2000, 68(7): 4174-4179.
- [11] Bradley JE, Tuan RS, Shepley KJ, et al. *Onchocerca volvulus*: characterization of an immunodominant hypodermal antigen present in adult and larval parasites[J]. Exp Parasitol, 1993, 77(4): 414-424.
- [12] Tsuji N, Suzuki K, Kasuga-Aoki H, et al. Intranasal immunization with recombinant *Ascaris suum* 14-kDa antigen coupled with cholera toxin B subunit induces protective immunity to *A. suum* infection in mice[J]. Infect Immun, 2001, 69(12): 7285-7292.
- [13] Tsuji N, Suzuki K, Kasuga-Aoki H, et al. Mice intranasally immunized with a recombinant 16-kilodalton antigen from the roundworm *Ascaris* parasites are protected against larval migration of *Ascaris suum*[J]. Infect Immun, 2003, 71(9): 5314-5323.
- [14] Tsuji N, Kasuga-Aoki H, Isobe T, et al. Cloning and characterisation of a highly immunoreactive 37 kDa antigen with multi-immunoglobulin domains from the swine roundworm *Ascaris suum*[J]. Int J Parasitol, 2002, 32(14): 1739-1746.
- [15] Islam MK, Miyoshi T, Tsuji N, et al. Vaccination with recombinant *Ascaris suum* 24-kilodalton antigen induces a Th1/Th2-mixed type immune response and confers high levels of protective against challenged *Ascaris suum* lung-stage infection in BALB/c mice[J]. Int J Parasitol, 2005, 35(3): 1023-1030.
- [16] Abraham D, Leon O, Leon S, et al. Development of a recombinant antigen vaccine against infection with the filarial worm *Onchocerca volvulus*[J]. Infect Immun, 2001, 69(1): 262-270.
- [17] Wang T, He GZ, Yang GY, et al. Cloning, expression and evaluation of the efficacy of a recombinant *Baylisascaris schroederi* Bs-Ag3 antigen in mice [J]. Vaccine, 2008, 26(52): 6919-6924.
- [18] He GZ, Wang T, Yang GY, et al. Sequence analysis of Bs-Ag2 gene from *Baylisascaris schroederi* of giant panda and evaluation of the efficacy of a recombinant Bs-Ag2 antigen in mice[J]. Vaccine, 2009, 27(22): 3007-3011.

[收稿日期] 2011-03-23 [编辑] 邓璐