

• 论 著 •

滤纸干血斑制备疟原虫 DNA 模板的方法评价

朱红娥¹, 田 斌^{2,3△}

(1. 安乡县疾病预防控制中心, 湖南安乡 415600; 2. 长沙市疾病预防控制中心, 湖南长沙 410001;
3. 中南大学湘雅医学院, 湖南长沙 410078)

摘要:目的 评价滤纸干血斑制备疟原虫 DNA 模板的方法。方法 采用常规 DNA 抽提程序和 PCR 扩增程序, 收集并检测 47 份疑似输入性疟疾患者标本, 统计分析配对设计的检测结果。结果 滤纸干血斑 PCR 与厚薄血涂片检测结果比较 $Kappa=0.492$, 与全血标本 PCR 检测结果比较 $Kappa=0.686$; 分别以厚薄血片镜检和全血标本进行的 PCR 检测为金标准, 滤纸干血斑采集血样进行 PCR 检测的灵敏度分别为 75.0% 和 71.4%, 特异度分别为 78.9% 和 100.0%。结论 滤纸干血斑采集血液标本进行 PCR 检测尚不能取得良好的效果, 仍需进一步研究。

关键词:疟原虫; DNA; 聚合酶链反应; 干血斑

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.20.040

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)20-3016-03

Method evaluation of plasmodium DNA template extraction from dried blood on filter paper

Zhu Hong'e¹, Tian Bin^{2,3△}

(1. Anxiang Center for Disease Control and Prevention, Anxiang, Hunan 415600, China;

2. Changsha Center for Disease Control and Prevention, Changsha, Hunan 410001, China;

3. Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha, Hunan 410078, China)

Abstract: Objective To evaluate the method of plasmodium DNA template extraction from dried blood on filter paper. **Methods** Collected and tested 47 blood samples of suspected imported malaria patients, the DNA was extracted and tested by using conventional procedures and PCR, then count and analyze test results of matched design. **Results** The Kappa value was 0.492 when compared filter paper dried blood spots with thick and thin blood smear test results, and the Kappa value was 0.686 when compared with whole blood sample. Using the results of thick and thin blood smear and whole blood samples as the gold standard to evaluate the sensitivity and specificity of filter paper dried blood spot method respectively, the sensitivity was 75.0%, 71.4% and specificity was 78.9%, 100.0%. **Conclusion** Collected blood samples using filter paper can't get good results in PCR test, still needs further research.

Key words: plasmodium spp; DNA; polymerase chain reaction; dried blood spots

疟疾是全球重要的热带寄生虫病, 其较高的感染率和病死率给目前 97 个流行国家特别是撒哈拉沙漠以南资源匮乏国家带来了极重的负担^[1]。我国虽已进入消除疟疾的进程, 但国际间交流及劳务输出所致输入性疟疾病例持续存在, 并且国内部分输入地区具备疟疾传播的条件。另外无症状和带虫疟疾患者的存在^[2], 同样给现阶段疟疾防治提出了新的要求。早期、快速、准确的实验室诊断是消除疟疾阶段及消除疟疾以后疟疾防治工作的重点, 也是有效治疗及疗效判定的前提条件。厚薄血涂片检查疟原虫虽是疟疾诊断的金标准, 但对带虫小于 50 p/μL 的患者假阴性率较高, 且对检验医生技术要求较高, 易造成疟疾的漏诊和误诊, 不利于患者的发现和治疗^[3]。多种类型的核酸检测方法以其较高的灵敏度和特异度为疟疾患者的发现和治疗发挥了重要作用^[1]。抽提高质量的疟原虫 DNA 模板是核酸检测成败的关键, 操作简便且保存和运输成本低廉的可靠耗材也是研究的重点, 以滤纸为载体的干血斑以其操作简便, 成本低廉, 运输简单, 无需冷链, 保存条件要求不高^[4-6], 近年来备受关注。为评价滤纸干血斑疟原虫 DNA 模板制备方法, 采用常用的 DNA 抽提程序和 PCR 扩增方法进行了以下研究。

1 材料和方法

1.1 标本来源 以疟疾流行区归国且发热的患者为研究对象, 每人采集外周静脉血 2 mL 于乙二胺四乙酸二钠抗凝管中。轻柔匀速摇匀采血管内全血后常规制作厚薄血涂片 3 张, 并参照程序进行吉姆萨染色^[7]; 取 25 μL 混匀后的全血悬滴于滤纸上, 室温干燥, 干燥后每份样本单独封口袋封口冻存于 -70 °C 冰箱。分别取 25 μL 全血于 Eppendorf 离心管中, -70 °C 冻存备用。所有样本均在采集后 30 d 内完成所有检测。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 每例研究对象所准备的滤纸干血斑及全血样本分别采用 Pure Link genomic DNA kits 提取。全血标本直接在 Eppendorf 离心管中加灭菌纯水 400 μL, 颠倒混匀 1 min, 10 000 r/min 离心 3 min, 移液管弃上清 400 μL 后按试剂盒说明书提供的程序处理; 滤纸干血斑样本采用洁净剪刀剪取所有含血滤纸片于 Eppendorf 管中, 加灭菌纯水 1 000 μL, 静置 30 min 后, 用无菌镊子夹取、挤干并丢弃滤纸片, 然后 10 000 r/min 离心 3 min, 操作过程中严格控制交叉污染, 弃 1 000 μL 上清后按试剂盒说明书处理沉淀。

1.2.2 巢式 PCR 扩增 巢式 PCR 扩增采用文献应用的方法进行扩增^[8-9],以扩增目的片段的有、无衡量不同类型样本的存储效果。

1.2.3 质量控制 每例研究对象的 3 张厚薄血片均由经验丰富的两名镜检人员阅片,并最终确定镜检结果。

1.3 统计学处理 对吉姆萨染色的厚薄血涂片显微镜检查结果及巢式 PCR 检测结果均录入 SPSS 18.0 统计软件包,配对设计两组频数分布资料进行 *Kappa* 检验。

2 结 果

2.1 总体情况 本研究共收集并检测 47 份标本,经厚薄血涂片镜检和巢式 PCR 实验室确诊疟疾患者 36 例,确诊率 76.6%。厚薄血片镜检阳性 28 份,阳性率 59.6%,其中 1 份标本未能由巢式 PCR 验证;巢式 PCR 共检出阳性标本 35 份,阳性率 74.5%,其中 8 份标本厚薄血片未检出。

2.2 厚薄血片镜检结果与滤纸干血斑巢式 PCR 检测结果比较 见表 1, *Kappa*=0.492, *t*=5.944, *P*=0.000。

表 1 厚薄血片镜检与滤纸干血斑巢式 PCR 检测结果比较(n)

厚薄血片镜检	滤纸干血斑巢式 PCR						合计
	p. f	p. v	p. m	p. o	mix	neg	
p. f	6	0	0	0	1	5	12
p. v	2	4	0	1	1	1	9
p. m	1	0	1	0	0	0	2
p. o	0	0	0	1	0	0	1
mix	1	1	0	0	2	0	4
neg	2	1	0	0	0	16	19
合计	12	6	1	2	4	22	47

p. f:恶性疟;p. v:间日疟;p. m:三日疟;p. o:卵形疟;mix:混合感染;neg:阴性。

2.3 全血标本与滤纸干血斑巢式 PCR 检测结果比较 见表 2, *Kappa*=0.686, *t*=8.828, *P*=0.000。

表 2 配对设计全血标本与滤纸干血斑巢式 PCR 检测结果联列表

全血标本巢氏 PCR	滤纸干血斑巢式 PCR						合计
	p. f	p. v	p. m	p. o	mix	neg	
p. f	12	0	0	0	0	7	19
p. v	0	5	0	0	0	2	7
p. m	0	0	1	0	0	0	1
p. o	0	0	0	2	0	0	2
mix	0	1	0	0	4	1	6
neg	0	0	0	0	0	12	12
合计	12	6	1	2	4	22	47

p. f:恶性疟;p. v:间日疟;p. m:三日疟;p. o:卵形疟;mix:混合感染;neg:阴性。

2.4 对滤纸干血斑巢式 PCR 的评价 分别以厚薄血片镜检和全血标本巢式 PCR 检测结果作为金标准评价滤纸干血斑巢式 PCR 的灵敏度和特异度。若采用厚薄血片镜检作为金标

准,滤纸干血斑巢式 PCR 检测的灵敏度和特异度分别为 75.0%和 78.9%;若采用全血标本巢式 PCR 作为金标准,滤纸干血斑巢式 PCR 检测的灵敏度和特异度分别为 71.4%和 100.0%。

3 讨 论

在偏远或交通不便地区,滤纸干血斑采集疑似疟疾患者样品替代厚薄血涂片和全血标本,在一定程度上解决了样品储存和运输问题^[5,6,10]。此次研究结果显示,该方法与厚薄血片和全血样本检测相比,并没有表现出很好的一致性。

滤纸干血斑巢式 PCR 与厚薄血涂片结果经 *Kappa* 检验, *Kappa*=0.492,一致性一般。差异主要存在于两个方面。(1)虫种鉴定方面,即滤纸干血斑巢式 PCR 与厚薄血涂片对于阳性标本的虫种鉴定存在差异。可能是方法学的根本差异造成,另外检验人员在厚薄血片检测过程中的主观因素,以及大部分归国疟疾患者都随身携带抗疟原虫和抗菌药物,在就诊前已经服用等因素也可造成方法间的差异^[11-13]。(2)带虫密度较少的标本未能被检出。本次厚薄血涂片的检测虽未进行带虫密度的计算,但回顾分析发现厚涂片疟原虫平均数量小于 5 个/油镜视野的患者中 37.5%(6/16)的标本被滤纸干血斑巢式 PCR 漏检。这一结果进一步说明滤纸干血斑对带虫密度较小的样品表现并不十分理想^[1,6]。

如果因形态学分类与分子生物学灵敏度或分类存在差异,导致了滤纸干血斑巢式 PCR 与厚薄血片检测结果差异较大,那么同为同一分子生物学检测技术、同样标本量(25 μ L)的全血标本巢式 PCR 检测阳性率 74.5%(35/47)明显高于滤纸干血斑巢式 PCR 的阳性率 53.2%(25/47), *Pearson's* χ^2 = 18.312, *P*=0.000,两种方法结果一致性检验 *Kappa*=0.686。因此,这两种方法仍存在差异,主要和滤纸干血斑保留的样本所抽提的 DNA 浓度和质量有关,究其原因可能是滤纸干血斑在标本量较少的情况下采用现有的抽提方法所得到的 DNA 浓度或纯度不能够完全满足 PCR 扩增的要求^[14],而非疟原虫密度低或血标本量较少造成的。

另外,分别以厚薄血片镜检和全血标本进行的巢式 PCR 检测为金标准,滤纸干血斑采集血样进行巢式 PCR 检测的灵敏度分别为 75.0%和 71.4%,特异度为 78.9%和 100.0%。该方法的灵敏度和特异度未能超过 95%,因此该方法尚不能充分适用于实验室检测。

总之,滤纸干血斑采集血液标本进行 PCR 检测尚不能取得良好的效果,仍需进一步研究,即从干血斑制作条件、使用材料、提取方法方面进一步研究,发挥其保存及运输的优势,更好地服务于流行病学、临床诊治及消除疟疾计划。

参考文献

[1] Miguel RB, Coura JR, Samudio F, et al. Evaluation of three different DNA extraction methods from blood samples collected in dried filter paper in Plasmodium subpatent infections from the Amazon region in Brazil[J]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2013, 55(3): 205-208.

[2] Martínez-de la Puente J, Ruiz S, Soriguer R, et al. Effect of blood meal digestion and DNA extraction protocol on the success of blood meal source determination in the malaria vector Anopheles atroparvus[J]. Malar J, 2013, 12(1):109. (下转第 3029 页)

Ruxolitinib 在体外有重要的抗 ETP-ALL 白血病效应,也许可靶向抑制癌基因转录因子具有重要的治疗意义^[11]。因 ETP-ALL 白血病停滞在 T 细胞分化早期且具有髓系分化潜能,髓系白血病化疗方案也许有治疗 T-ALL 的潜能^[3,10]。通过抑制相关基因阻止已转化的 ETPs 进入 T 细胞分化途径,从而使其对常规治疗敏感也许是其治疗选择^[2]。

综上所述,ETP-ALL 是急性淋巴细胞白血病非常高危的一类亚型,属于早期非成熟 T-ALL 的一种,其免疫分型及基因表达有一定特异性及诊断价值,其预后差,也许在获得一次缓解后及时行异基因干细胞移植可获得长期生存率。

参考文献

[1] Haydu JE, Ferrando AA. Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia[J]. *Curr Opin Hematol*, 2013, 20(4):369-373.

[2] Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, et al. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia[J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10(2):147-156.

[3] Ma M, Wang X, Tang J, et al. Early T-cell precursor leukemia: a subtype of high risk childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. *Front Med*, 2012, 6(4):416-420.

[4] Bell JJ, Bhandoola A. The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential[J]. *Nature*, 2008, 452(7188):764-767.

[5] Treanor LM, Zhou S, Janke L, et al. Interleukin-7 receptor mutants initiate early T cell precursor leukemia in murine thymocyte progenitors with multipotent potential[J]. *J Exp Med*, 2014, 211(4):701-713.

[6] Mok MM, Du L, Wang CQ, et al. RUNX1 point mutations potentially identify a subset of early immature T-cell acute lymphoblastic leukaemia that May originate from differentiated T-cells[J]. *Gene*, 2014, 545(1):111-116.

[7] Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia[J]. *Nature*, 2012, 481(7380):157-163.

[8] Shochat C, Tal N, Bandapalli OR, et al. Gain-of-function mutations in interleukin-7 receptor- α (IL7R) in childhood acute lymphoblastic leukemias[J]. *J Exp Med*, 2011, 208(5):901-908.

[9] Zenatti PP, Ribeiro D, Li W, et al. Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Nat Genet*, 2011, 43(10):932-939.

[10] Weng AP, Ferrando AA, Lee W, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Science*, 2004, 306(5694):269-271.

[11] Patrick K, Wade R, Goulden, et al. Outcome for children and young people with Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia treated on a contemporary protocol, UKALL 2003[J]. *Br J Haematol*, 2014, 166(3):421-424.

[12] Li L, Leid M, Rothenberg EV. An early T cell lineage commitment checkpoint dependent on the transcription factor Bcl11b[J]. *Science*, 2010, 329(5987):89-93.

[13] Ikawa T, Hirose S, Masuda K, et al. An essential developmental checkpoint for production of the T cell lineage[J]. *Science*, 2010, 329(5987):93-96.

[14] Gutierrez A, Dahlberg SE, Neuberg DS, et al. Absence of biallelic TCRgamma deletion predicts early treatment failure in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(24):3816-3823.

[15] Della Gatta G, Palomero T, Perez-Garcia A, et al. Reverse engineering of TLX oncogenic transcriptional networks identifies RUNX1 as tumor suppressor in T-ALL[J]. *Nat Med*, 2012, 18(3):436-440.

[16] Grossmann V, Kern W, Harbich S, et al. Prognostic relevance of RUNX1 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Haematologica*, 2011, 96(12):1874-1877.

[17] Taniuchi I, Osato M, Ito Y. Runx1: no longer just for leukemia[J]. *EMBO J*, 2012, 31(21):4098-4099.

[18] Howcroft TK, Weissman JD, Geron A, et al. A T lymphocyte-specific transcription complex containing RUNX1 activates MHC class I expression[J]. *J Immunol*, 2005, 174(4):2106-2115.

(收稿日期:2015-04-22)



(上接第 3017 页)

[3] 肖婷,徐超,李瑾,等. 3 种方法提取血膜疟原虫 DNA 的比较研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2014, 27(5):447-451.

[4] 罗恩杰,王继春,牟玲,等. 薄血膜及滤纸片干血滴分离疟原虫 DNA 方法的比较[J]. *中国医科大学学报*, 2001, 30(1):74-75.

[5] Strøm GE, Tellevik MG, Hanevik K, et al. Comparison of four methods for extracting DNA from dried blood on filter paper for PCR targeting the mitochondrial Plasmodium genome[J]. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2014, 108(8):488-494.

[6] Baidjoe A, Stone W, Ploemen I, et al. Combined DNA extraction and antibody elution from filter papers for the assessment of malaria transmission intensity in epidemiological studies[J]. *Malar J*, 2013, 12(3):272.

[7] 张奎. 疟原虫镜检[M]. 上海:科学技术出版社,1957.

[8] 张兵,田斌,廖瑜,等. 巢式 PCR 在输入性疟疾诊断和分型中的应用价值[J]. *实用预防医学*, 2013, 20(2):229-231.

[9] 田斌,段绩辉,徐明忠,等. 三例输入性卵形疟的实验室诊断[J].

检验医学, 2014, 29(8):851-855.

[10] Morris U, Aydin-Schmidt B, Shakely D, et al. Rapid diagnostic tests for molecular surveillance of Plasmodium falciparum malaria -assessment of DNA extraction methods and field applicability[J]. *Malar J*, 2013, 12(1):106.

[11] 王秀珍. 斑点杂交试验诊断恶性疟:特异性、敏感性和现场适用性[J]. *国外医学:寄生虫病分册*, 1987, 9(5):221-222.

[12] 林敏,吴少庭,高世同,等. 疟原虫 DNA 模板制备用于 PCR 诊断方法的研究[J]. *中国寄生虫病防治杂志*, 1998(4):22-25.

[13] 李雨春,王善青,胡锡敏,等. 群组 PCR 策略高通量筛选疟疾患者的可行性研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2014, 27(11):1009-1011.

[14] Färnert A, Arez AP, Correia AT, et al. Sampling and storage of blood and the detection of malaria parasites by polymerase chain reaction[J]. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1999, 93(1):50-53.

(收稿日期:2015-06-15)