·论　著·

平行诊断试验监测疟疾流行区归国人员疟原虫感染者的性能评价*

文　岚[1]，田　斌[1,2△]，申晓君[1]，廖　瑜[1]，张　兵[1]

（1. 长沙市疾病预防控制中心临床检验科 410003；2. 中南大学湘雅医学院，长沙 410001）

摘　要：目的　评价厚血涂片和疟原虫快速检测（RDT）组成的平行诊断试验用于疟疾流行区归国人员疟原虫感染监测的性能。**方法**　使用厚血涂片、RDT 和巢氏 PCR 分别检测长沙市 4 家涉非洲劳务派遣单位归国人员静脉血 484 份，对检测结果进行统计分析。**结果**　单独使用厚血涂片和 RDT 的敏感度分别为 0.628 和 0.744，平行试验的敏感度可达到 0.930；平行诊断试验 ROC 曲线下面积为 0.930（95%*CI*：0.895～0.986），高于厚血涂片的 0.814（95%*CI*：0.724～0.904）和 RDT 的 0.847（95%*CI*：0.769～0.926）。**结论**　厚血涂片和 RDT 组成的平行试验可以有效提高对疟疾流行区归国人员疟原虫感染者监测敏感度和准确度，值得推广应用。

关键词：疟原虫；　厚血涂片；　疟原虫快速检测；　性能；　平行诊断试验

DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2017.01.003　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2017)01-0007-03

Performance of parallel test in detecting malaria infection for returnees from malaria endemic area*

WEN Lan[1], *TIAN Bin*[1,2△], *SHEN Xiaojun*[1], *LIAO Yu*[1], *ZHANG Bing*[1]

(1. *Department of Clinical Laboratory, Center for Disease Control and Prevention, Changsha, Hunan* 410003, *China*; 2. *Xiangya School of Medicine, Center South University, Changsha, Hunan* 410001, *China*)

Abstract: Objective　To evaluate the performance of parallel test in detecting malaria infection for returned person from malaria endemic area. **Methods**　The blood samples of 484 returnees from malaria endemic area were analyzed and detected by thick blood smear, rapid diagnostic test (RDT) and nest PCR in four companies involving the African labor dispatching. **Results**　The sensitivity of thick blood smear and RDT was 0.628 and 0.744 respectively, which of the parallel test was 0.930. On the other hand, the area under the curve (AUC) of parallel test was 0.930 (95%*CI*: 0.895－0.986), which was higher than thick blood smear[0.814 (95%*CI*: 0.724－0.904)]and RDT[0.847 (95%*CI*: 0.769－0.926)]. **Conclusion**　Thick blood smear and RDT, which consist of parallel test, could improve the detection sensitivity and accuracy for returnees from malaria epidemical area effectively. This approach is worthy of popularization and application

Key words: plasmodium;　thick blood smear;　rapid diagnostic test;　performance;　parallel test

疟疾作为全球极为重要的传染性疾病一直备受关注，其危害非常严重，尤其是对无疟疾流行区无免疫力人群、幼童和孕妇影响更加严重。我国已进入了基本消除疟疾的阶段，在这一阶段能够早期发现和治疗疟原虫感染者或疟疾患者是疟疾防治工作的重中之重已经成为事实和共识[1]。要实现早期发现疟原虫感染者或疟疾患者，必须大力提升实验室检测能力。但是目前基层医疗机构的疟疾检测能力并不理想[2]。随着国际间交流的增加和劳务输出规模的扩大，全国输入性疟疾呈现出上升趋势，因此作为疟疾控制的基层医疗机构必须进行疟疾检测技术的革新和优化，提升检测技术水平，应对输入性疟疾造成的挑战，巩固多年努力所取得的消除疟疾行动的成果。为探讨适合基层医疗机构发现疟原虫感染者或疟疾患者的检测策略，遂将疟原虫厚血膜法与疟原虫快速检测（RDT）两种方法组合成平行诊断试验并评价这一策略的性能。

1　材料与方法

1.1　标本来源　2013－2015 年长沙市 4 家涉非洲劳务派遣单位归国人员静脉血标本 484 份。

1.2　仪器与试剂　CareStar™ malaria HRP2/pLDH Combo Test 由疟疾全球基金统一采购。核酸提取试剂盒采用 QIAGEN 公司的 QIAamp　DNA Blood Mini Kit。吉氏染色液为 BASO 公司产品。

1.3　方法　厚血涂片镜检按文献[3]介绍的方法采用静脉血制作厚血涂片，进行双人阅片，镜检 100 个以上油镜视野的厚血膜未发现疟原虫报告为未检出疟原虫。

1.3.1　巢氏 PCR 检测　疟原虫 DNA 模板制备严格按照试剂盒说明书操作，疟原虫核酸巢氏 PCR 检测采用文献[4]介绍的方法。

1.3.2　HRP2/pLDH RDT 检测　CareStar™ malaria HRP2/pLDH Combo Test 试剂盒，取 5 μL 全血加入样品槽，加 60 μL 测定缓冲液于测定孔中，然后计时（20±1）min 后读取检测结果。

1.3.3　平行诊断试验的设计与评价　将收集的静脉血分别进行厚血涂片和 RDT 检测，任何一项检测结果为阳性则认为该样品为阳性，然后取剩余全血进行巢氏 PCR 检测，并以巢氏 PCR 检测结果为金标准对平行诊断试验进行评价，巢氏 PCR 检测只要核酸阳性即为阳性，不细分虫种或是否有混合感染。

*　**基金项目：**长沙市科技局项目（K13ZD051-33）。

作者简介：文岚，男，副主任技师，主要从事病原微生物检验方向的研究。　△　**通信作者**，E-mail：t.b2002@163.com。

1.4　统计学处理　采用 SPSS18.0 统计软件进行数据的分析。方法间的比较采用配对样本的 χ^2 检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。试验方法准确度采用平行诊断试验和组分试验的受试者工作特征(ROC)曲线分析。

2　结　　果

2.1　巢氏 PCR 检测结果　484 份样品经巢氏 PCR 检测阳性标本 43 例，阳性率 8.9%。其中疟原虫感染 31 例，占阳性例数的 72.1%(31/43)，间日疟 6 例，占阳性例数的 14.0%(6/43)，三日疟和卵形疟各 1 例，分别占阳性例数的 2.3%(1/43)，混合感染 4 例，占阳性例数的 9.3%(4/43)。

2.2　平行诊断试验与厚血涂片和 RDT 的比较　平行诊断试验共发现阳性标本 62 例，62 例阳性标本中有 27 例厚血涂片阳性，54 例 RDT 阳性，由两种方法共同检测为阳性的标本数是 19 例，8 例标本为厚血膜法单独发现，35 例标本由 RDT 单独发现。经配对资料的 χ^2 检验发现平行诊断试验结果与厚血涂片法和 RDT 法的结果差异具有统计学意义($P<0.001$)。见表 1。

表 1　平行诊断试验与厚血涂片和 RDT 对的比较(n)

平行诊断试验	厚血涂片		RDT	
	阴性	阳性	阴性	阳性
阴性	422	0	422	0
阳性	35	27	8	54
χ^2	194.632		413.706	
P	<0.001		<0.001	

2.3　平行诊断试验与金标准的比较　将平行诊断试验与金标准即巢氏 PCR 检测结果比较发现，巢氏 PCR 检测 43 例阳性标本中平行诊断试验发现了 40 例，有 3 例阳性标本未能被平行试验发现。另外平行试验发现的 22 例阳性病例未能被巢氏 PCR 证实含有疟原虫。χ^2 检验显示平行试验与金标准间差异具有统计学意义($\chi^2=271.866$，$P<0.001$)。见表 2。

表 2　平行诊断试验与金标准的比较(n)

平行诊断试验	巢氏 PCR		合计
	阴性	阳性	
阴性	419	3	422
阳性	22	40	62
合计	441	43	484

2.4　平行诊断试验和组分试验的 ROC 曲线　从平行诊断试验和其组分试验的 ROC 曲线可以看出特异度最高的诊断方法是厚血涂片法，平行诊断试验次之，特异度最差的试验方法是 RDT，见图 1。从敏感度的角度来看，敏感度最高的方法是平行诊断试验，RDT 和厚血涂片法依次降低。从 ROC 曲线下面积来看，平行诊断试验线下面积为 0.930 (95%CI：0.895～0.986)超过 0.900 表示该方法准确度较高，而厚血涂片法和 RDT 法线下面积分别为 0.814 (95%CI：0.724～0.904)和 0.847(95%CI：0.769～0.926)均介于 0.700～0.900，说明这两种方法单独使用在监测疟疾流行区归国人员疟原虫感染者上准确度中等。见表 3 。

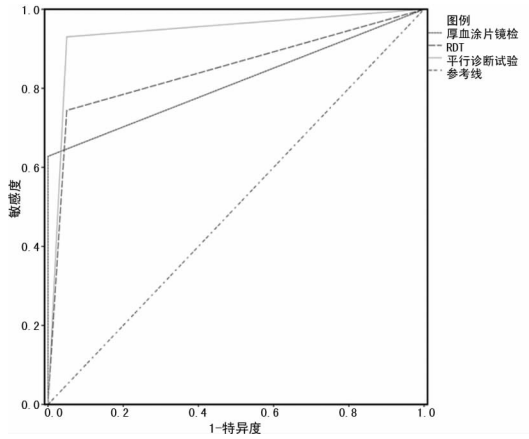

图 1　平行诊断试验和组分试验的 ROC 曲线

表 3　平行诊断试验和组分试验的受试者 ROC 特征

方法	敏感度	1－特异度	曲线下面积	SD	P	95%CI
厚血涂片	0.628	0.000	0.814	0.046	<0.001	0.724～0.904
RDT	0.744	0.050	0.847	0.040	<0.001	0.769～0.926
平行诊断试验	0.930	0.050	0.940	0.023	<0.001	0.895～0.986

3　讨　　论

疟疾的实验室诊断方法是疟疾控制策略中的重要环节，是发现疟疾患者和疟原虫感染者等疟疾传染源的重要手段。对于诊断试验的诊断能力即敏感度和特异度的分析通常能够很好地反映该项试验对患者的检出能力和排除能力[5]。在实际工作中往往单一的诊断试验在一些情况下很难获得较为满意的诊断能力，如本文探讨的适合基层医疗机构发现疟原虫感染者或疟疾患者的检测策略，其目的就在于想通过价格低廉、操作简便和无需特殊设备的疟原虫厚血涂片镜检和 RDT 两项检测技术组成的平行试验提高针对上述人群的诊断能力。

通过这一组合应用，其敏感度由单独使用厚血涂片法的 0.628 和单独使用 RDT 法的 0.744 提高到了 0.930，充分发挥了平行诊断试验的优势。有几个研究报道都表明了 RDT 与厚血涂片镜检的方法相比较，的确具有较高的敏感度[6-8]。与 RDT 试剂设计的最低检测限 200 个虫体每微升全血相比，制作厚血涂片通常用血 4～5 μL，以 5 μL 来计算那么在血膜制作过程中没有疟原虫转移或丢失的理想状态下，在直径0.8～1.0 cm 的厚血膜中存在 1 000 个虫体。以常规光学显微镜每视野的视场面积约 0.025 45 mm^2 计算[9]，这 1 000 个虫体将分布在最少 493 个视野内[(3.14×42)/ 0.025 45)]，那么每个视野可能存在 2 个虫体，如果考虑到因染色过程造成的虫体的转移或丢失以、染液的浮渣或红细胞碎片及镜检技术人员的主观因素的影响，要在每个视野中寻找 2 个虫体较小的疟原虫几乎不可能完成。因此，RDT 的确具有比厚血涂片镜检方法更高的灵敏度。但另有事实证明 RDT 试剂通常对少见或罕见的三日疟原虫和卵形疟原虫感染通常情况下会表现出假阴性[7-8,10-12]，以及也有实验证明其在疟原虫虫体内完全清除后的一段时间内仍然会表现出假阳性[13-14]。厚血涂片的应用在一定程度上实现了对 RDT 假阴性所漏诊的患者或感染者进行了查漏。另外在实际应用中也可以对 RDT 阳性的标本有针对

性地详细检查,有效缩短疟疾诊断实验室标本周转时间,达到快速诊断的目的。

从 ROC 曲线下面积来看,平行诊断试验线下面积为 0.930,超过了厚血涂片法线下面积 0.814 和 RDT 法的0.847。说明平行诊断试验的使用较两个组分方法的单独使用,可提高准确度。不可否认这一平行诊断试验的应用并不能达到对疟疾患者或疟原虫感染者进行分型的要求。

总之,厚血涂片和 RDT 组成的平行试验可以有效提高对疟疾流行区归国人员疟原虫感染者监测敏感度和准确度,值得推广应用。

参考文献

[1] Hviid L. Naturally acquired immunity to Plasmodium falciparum malaria in Africa[J]. Acta Trop,2005,95(3):270-275.

[2] 张少森,夏志贵,尹建海,等.2012 年全国寄生虫病防治技术竞赛成绩分析报告:Ⅰ.疟原虫检测能力考评结果分析[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2013,31(2):131-134.

[3] 张进顺,高兴政.临床寄生虫检验学[M].北京:人民卫生出版社,2009.

[4] 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.

[5] 李雪迎.应用联合试验优化诊断能力[J].中国介入心脏病学杂志,2012,20(4):184.

[6] 董莹,陈梦妮,徐艳春.免疫快速诊断卡检出疟原虫感染的准确性荟萃分析[J].中国病原生物学杂志,2016,11(4):353-358.

[7] 王艳琴,朱韩武,陈婕.镜检、RDT 和 Nest-PCR 诊断疟疾的应用比较研究[J].社区医学杂志,2016,14(12):4-6.

[8] 营雅茹,李卫东,张滔,等.快速检测试剂条、镜检和 PCR 在疟疾诊断中的应用研究[J].中华疾病控制杂志,2014,18(2):163-165.

[9] 王钊,马云祥,车立刚,等.疟疾学[M].青岛:青岛海洋大学出版社,1992:1058.

[10] Fransisca L,Kusnanto JH,Satoto TB,et al. Comparison of rapid diagnostic test Plasmotec Malaria-3,microscopy,and quantitative real-time PCR for diagnoses of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax infections in Mimika Regency,Papua,Indonesia[J]. Malar J,2015,14(1):103.

[11] 李卫东,张滔,姜静静,等.国产试剂 RDT 诊断疟疾效果评价[J].中国病原生物学杂志,2013,8(12):1099-1101.

[12] Tiono AB,Diarra A,Sanon S,et al. Low specificity of a malaria rapid diagnostic test during an integrated community case management trial[J]. Infect Dis Ther,2013,2(1):27-36.

[13] Meatherall B,Preston K,Pillai R. False positive malaria rapid diagnostic test in returning traveler with typhoid fever[J]. BMC Infect Dis,2014,14(1):1-4.

[14] Chong Kyu,Cho Yun,Na Kuk,et al. Evaluation of the accuracy of the EasyTest? malaria Pf/Pan Ag,a rapid diagnostic test,in Uganda[J]. Korean J Parasitol,2014,52(5):501-505.

(收稿日期:2016-07-30　修回日期:2016-10-20)

(上接第 6 页)

[4] Cao W,Peters JH,Nieman D,et al. Macrophage subtype predicts lymph node metastasis in oesophageal adenocarcinoma and promotes cancer cell invasion in vitro[J]. Br J Cancer,2015,113(5):738-746.

[5] 徐原林,王华庆,钱正子,等.M2 型巨噬细胞和调节性 T 细胞在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤组织中的含量及其与患者预后的关系[J].中华肿瘤杂志,2013,35(6):450-455.

[6] 沈悌.血液病诊断及疗效标准[M].2 版.北京:科学出版社,1997.

[7] Kim DW,Min HS,Lee KH,et al. High tumour islet macrophage infiltration correlates with improved patient survival but not with EGFR mutations,gene copy number or protein expression in resected non-small cell lung cancer[J]. Br J Cancer,2008,98(6):1118-1124.

[8] Gordon S,Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity[J]. Nat Rev Immunol,2005,5:953-964.

[9] Edwards JP,Zhang X,Frauwirth KA,et al. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations[J]. J Leukoc Biol,2006,80(6):1298-1307.

[10] Gordon S,Martinez FO. Alternative activation of macrophages:mechanism and functions[J]. Immunity,2010,32(5):593-604.

[11] Ohri CM,Shikotra A,Green RH,et al. Macrophages within NSCLC tumour islets are pre-dominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival[J]. Eur Respir J,2009,33(1):118-126.

[12] 李海涛,谭超,田书梅,等.肿瘤相关巨噬细胞在肿瘤微环境中的作用新进展[J].肿瘤防治研究,2015,42(11):1165-1168.

[13] Sica A,Larghi P,Mancino A,et al. Macmphage polarization in tumour progre-ssion[J]. Semin Cancer Biol,2008,18(5):349-355.

(收稿日期:2016-08-11　修回日期:2016-10-30)