

运用实时荧光 RT-PCR 方法检测疟原虫的研究

鲁少平¹, 邓中平², 龙妍娇³, 陆雯⁴, 付亚成², 王晓丽¹,

1.湖南出入境检验检疫局, 长沙 410004; 2.湖南圣湘生物科技有限公司, 长沙 410205; 3.广东国际旅行卫生保健中心, 广州 510635; 4.珠海市人民医院, 珠海519000

摘要: 目的: 对比 金标准的厚薄血膜显微镜检查法(以下简称“镜检法”), 对国产疟原虫核酸实时荧光 PCR 检测试剂(以下简称“RT-PCR 检测试剂”)进行研究。**方法:** 首先提取全血样本的 DNA, 加入 RT-PCR 检测试剂进行荧光定量 PCR 检测, 比较其相关指标。**结果:** 2 种方法经配对比较, RT-PCR 检测试剂检测 45 份全血临床标本的总符合率达 93.33%, 经测序对 3 例不符样本进行复检, 3 例镜检法检测为阴性, 经 RT-PCR 检测试剂检测为阳性的样本经测序结果显示均含有疟原虫核酸序列。**结论:** RT-PCR 检测试剂与镜检方法在各项指标的差异无显著性, 甚至在样本处理的时效性和阳性率等方面更具有明显的优势, 该实时荧光 PCR 试剂有良好的检测质量, 特别适用于口岸、进出境等单位疟原虫 DNA 的检测。

关键词: 疟疾; 疟原虫 DNA; 诊断; 研究

Real-Time Reverse Transcription PCR on Detection of Plasmodium

Lu Shao-Ping¹; Deng Zhong-Ping², Long Yan-Jiao³, et al.

(1.Hunan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changsha, 410004, china;2.Hunan Sansure Biotechnology Co., Ltd., Changsha, 410205, china; 3.Guangdong International Travel Healthcare Center, Guangzhou, 510635, china; 4.Zhuhai People's Hospital, Zhuhai, 519000, china)

第一作者简介: 鲁少平, (1966--) 男, , 湖南检验检疫局卫生处, 主要从事出入境卫生检疫工作。

Abstract: Objective: Compare new domestic parasites nucleic acid real-time fluorescent PCR rapid detection reagent (hereinafter referred to as the RT-PCR detection reagent) and the thickness of the gold standard blood membrane microscope (hereinafter referred to as the "microscope method") and research both of them. Methods: Extract the DNA of whole blood samples, add RT-PCR detection reagent for fluorescence quantitative PCR detection and compare related indicators. Results: Two methods by paired comparison, the total coincidence rate of 45 whole blood clinical samples is 93.33% by RT-PCR. 3 cases of microscope method test is negative, after testing positive by RT-PCR detection reagent contain Plasmodium DNA sequences by sequencing detection of samples. Conclusions: New method of RT-PCR detection reagent and microscopy there is no significant difference in the indicators. The real-time fluorescent PCR reagents have good detection quality, especially suitable for the port, entry-exit inspection and quarantine department Plasmodium DNA detection.

Key words: Malaria; The Plasmodium DNA; Diagnosis; Research

疟疾 (*malaria*) 诊断一直是出入境人员疟疾防治工作的一个重要环节。利用显微镜检查血液中疟原虫的方法目前仍是诊断疟疾的主要手段。在疟疾监测中, 人群带虫率低, 加上国外疟区人群普遍服用抗疟药物而影响了原虫的正常形态, 导致镜检所耗费的人力较大, 对镜检技术的要求也更高。近年来, 越来越多方便快捷的疟原虫检测手段层出不穷, 如: 胶体金方法 (*Colloidal gold*)、聚合酶链反应 (*Polymerase chain reaction, PCR*)、荧光定量 PCR 方法 (*Real-time PCR*) 等^[1-2]。这些方法都以其特异、敏感和快速等优点, 已被广泛应用于多种疾病的诊断研究, 在疟疾检测中的报道也日益增多, 但这些方法都有对疟原虫样本进行前期处理, 提取疟原虫核酸等步骤, 而这一步骤直接影响到样本检测的实效性和成功率^[3-5]。本研究使用一种 RT-PCR 检测试剂, 选择特异性最佳的引物和探针, 使用荧光定量 PCR 方法, 并着重优化疟原虫样本前期处理过程, 以期建立方法灵敏、取样方便快捷、便于现场使用的快速方法用于出入境

[在此处键入]

人员等相关人员疟疾的监测和诊断。

1 材料与方法

1.1 标本

从湖南省出入境单位采集得到的输入性镜检法检测为阳性的恶性疟疾全血样本 22 例、镜检法检测为阳性的间日疟疾全血样本 8 例，共 30 例。镜检法检测为阴性的全血样本 15 例。全血样本放于 EDTA 抗凝的采血管中，置 4℃ 冰箱保存。

1.2 主要仪器和试剂

1.2.1 仪器

荧光定量 PCR 仪 (*real-time qPCR*)、漩涡混合仪 (*Vortex mixing apparatus*)。

1.2.2 试剂

RT-PCR 检测试剂：采用湖南圣湘生物科技有限公司自主研发的核酸释放剂提取的疟原虫 DNA，用荧光 PCR 仪检测疟原虫核酸。该 RT-PCR 检测试剂设置疟原虫 DNA 内标，该内标 TaqMan 探针 5' 末端标记 HEX 荧光素，以检测内标是否正常，监测待测标本中是否具有 PCR 抑制物，避免 PCR 假阴性。同时设置 UNG 酶+ dUTP 防污染措施，以排除假阳性结果。

1.3 疟原虫 DNA 模板的制备

取出全血样本，充分混匀，取出 200ul 于 1.5ml 离心管，加入 800ul 红细胞裂解液，充分震荡混匀，至透明清亮；12000rpm/min 离心 1min，可见管底明显白色沉淀，去上清（避免沉淀损失）；再向沉淀中再加入 800ul 核酸释放剂，充分震荡混匀，12000rpm/min 离心 1min，去上清（避免沉淀损失）；管底白色沉淀即为分离得到的核酸，取 5ul，作为待测样本备用。

1.4 引物与探针的设计

针对恶性疟原虫和间日疟原虫的 18sRNA 基因共有保守序列设计引物及探针。首先下载 NCBI 流感数据库中 2009 年至今所有恶性疟原虫和间日疟原虫，然后采用 Clustal version 2.1 进行多序列比对，运用生物信息学方法和引物设计软件，确定引物探针如下：P. falciparum: FAL-F 5 -

[在此处键入]

GCTTTTGAGAGGTTTTGTTACTTTGAGT; FAL-R 5 -
 TGTTATTCCATGCTGTAGTATTCAAACAC; FAL probe (FAM) 5 -
 TGTTTCATAACAGACGGGTAGTCATGATTGAGTTCA。 P. vivax: VIV-F 5 -
 ACGCTTCTAGCTTAATCCACATAACT; VIV-R 5 - CTCAAAGTAACAAGGACTTCCAAGC; VIV
 probe (TET) 5 - TTCGTATCGACTTTGTGCGCATTTTGC; 同时，设计用于内部控制的
 内标引物和探针，其探针 5' 端采用 HEX 荧光基团标记。所有引物和探针在
 NCBI 上进行引物和探针特异性比对后，交由大连-宝生物公司合成。

1.5 PCR 扩增

荧光反应管置于荧光定量 PCR 仪上，循环参数设 94℃5 分钟；94℃15 秒，
 57℃ 1 分 31 秒，45 个循环；25℃ 30 秒；单点荧光检测在 57℃。反应体系为
 50ul，上机进行扩增。

1.6 结果判定

该实时荧光 PCR 试剂提供的检测临床标本的最低检出限为 400copies/ml。
 待检样品 FAM 通道 Ct 栏显示 UNDET 或者 40 表示检测样品低于检测限，报告
 为阴性；待检样品 FAM 通道 Ct≤38，检测结果报告为阳性；待检样品 FAM 通
 道 Ct 值在 38~40 之间，重复检测一次，如果重复检测 Ct 值仍在 38~40 之间，
 则判为阴性。

1.7 结果不一致的标本

对于用 RT-PCR 检测试剂扩增和镜检法检测结果不一致的样本，分别统计
 待考评试剂和对照试剂与测序结果的符合情况，并进行进一步分析。

1.8 质粒构建、克隆和测序

将 PCR 产物送上海生工公司完成质粒构建、克隆和测序。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测试剂检测与镜检法的一致性

分别采用镜检法和 RT-PCR 检测试剂对 45 份临床标本进行复检，结果如表
 1 和表 2 所示，在 45 份临床标本中，有 42 份一致，总符合率达 93.33%。

表 1 2 种检测方法对 45 例临床样本检测结果

样本号	镜检法		RT-PCR 检测试剂	
	恶性疟	间日疟	恶性疟	间日疟

[在此处键入]

NJ-031	+		+	-
NJ-032	+		+	-
NJ-033		+	-	+
NJ-034	+		+	-
NJ-035	+		+	-
NJ-036	+		+	-
NJ-037	+		+	-
NJ-038	+		+	-
NJ-039	+		+	-
NJ-040	+		+	-
NJ-041		+	-	+
NJ-042	+		+	-
NJ-043	+		+	-
NJ-044		+	-	+
NJ-045	+		+	-
NJ-046	+		+	-
NJ-047	+		+	-
NJ-048	+		+	-
NJ-049	+		+	-
NJ-050	+		+	-
NJ-051	+		+	-
NJ-052	+		+	-
NJ-053	+		+	-
NJ-054	+		+	-
NJ-055		+	-	+
NJ-056	+		+	-
NJ-057		+	-	+
NJ-058		+	-	+
NJ-059		+	-	+
NJ-060		+	-	+
zc-006	-		-	-
zc-007	-		+	-
zc-008	-		-	-
zc-009	-		-	-
zc-020	-		-	-
zc-021	-		-	-
zc-022	-			+
zc-023	-			+
zc-024	-		-	-
zc-025	-		-	-
zc-026	-		-	-
zc-027	-		-	-
zc-028	-		-	-
zc-029	-		-	-

[在此处键入]

表 2 两种方法对比检测结果比较统计表

RT-PCR 检测试剂	镜检法		合计
	+	—	
+	30	3	33
—	0	12	12
合计	30	15	45

2.2 不符样本的复核情况

根据临床样本检测结果，有 3 例镜检法检测与 RT-PCR 检测试剂检测结果不符，都为镜检法检测阴性，RT-PCR 检测试剂阳性。对复检不符样本再进行测序复核，结果见表 3。其中，3 份标本(编号 ZC-007、ZC-022 和 ZC-023)镜检法检测为阴性，经 RT-PCR 检测试剂检测为阳性。针对这 3 份标本，课题组在 RT-PCR 检测试剂检测靶基因区域外，设计引物进行 PCR 扩增，同时严格设置阳性和阴性对照，扩增产物经克隆测序（每份标本测序不少于 2 个克隆）证实，编号 ZC-017、ZC-022 和 ZC-023 标本为疟原虫基因序列，序列长度为 158 bp，与理论序列长度一致。克隆测序结果与疟原虫基因型标准序列进行进化树分析（图 1），证明均为疟原虫。测序结果如图 2 所示，将测序结果与公布的疟原虫序列比对，序列完全正确。

表 3 不符样本检测及复核结果

样本编号	初次检测结果		复检结果		测序复核
	A	B	A	B	
ZC-007	阴性 (-)	阳性 (+)	阴性 (-)	阳性 (+)	含恶性疟疟原虫核酸序列
ZC-022	阴性 (-)	阳性 (+)	阴性 (-)	阳性 (+)	含间日疟疟原虫核酸序列
ZC-023	阴性 (-)	阳性 (+)	阴性 (-)	阳性 (+)	含间日疟疟原虫核酸序列

注：A 代表镜检法检测结果；B 代表 RT-PCR 检测试剂检测结果。

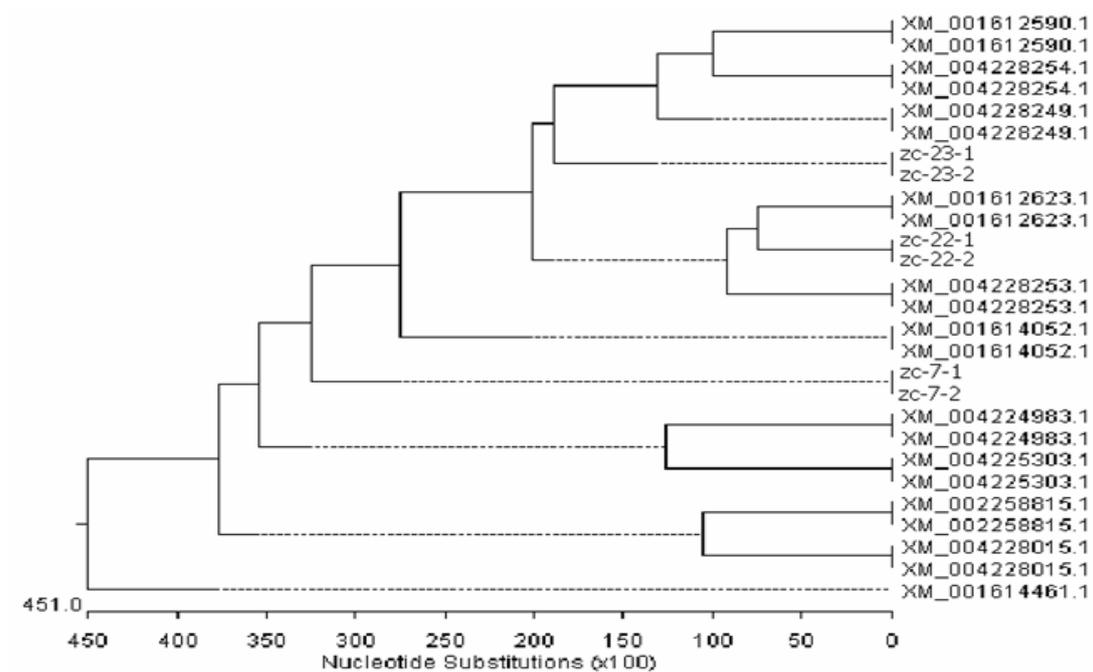


图1 ZC-007、ZC-022 和 ZC-023 样本克隆测序结果进化树分析

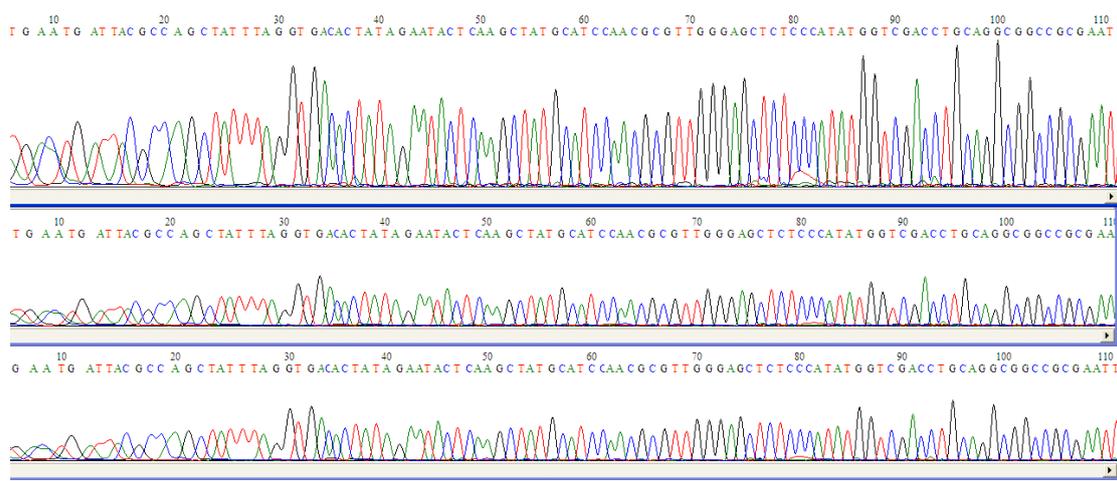


图2. 疟原虫样本 PCR 产物测序结果

3 讨论

疟疾仍是严重危害人类健康的传染病，全球约 20 亿人受疟疾威胁，每年约 2.5 亿人发病，100 万人死亡。所以疟原虫实时荧光 PCR 检测对于分析疟原虫感染的疾病进展、治疗的疗效评估均具有重要意义。目前国内生产的疟原虫 DNA 实时荧光 PCR 试剂有多种，这些试剂的各类型样本适应能力、疟原虫 DNA 病毒各型检测阳性率度等方面参差不齐。通过对比不难发现，造成上述现象的根本原因在于核酸提取及其纯化方法的不足。原始的镜检法检测在疟原虫

[在此处键入]

DNA 载量较低时往往难以检出、或不能反映疟原虫的真实水平。

本研究表明，分析其原因可能与该试剂中引物、探针的设计主要针对我国的疟原虫流行类型有关。在临床样本评价中，全血样本使用 RT-PCR 检测试剂检测与镜检法结果的总符合率高达 93.33%。其中有 3 份样本，RT-PCR 检测试剂与镜检法检测不一致(RT-PCR 检测试剂检测为阳性，但镜检法检测为阴性)，后对这几份样本进行重复检测并测序证实均含有疟原虫核酸序列。通过测序进行比对发现，新型检测试剂检全血样本更加的全面，能更有效地减少假阴性结果的产生。

由于未能收集足够数量的临床标本，本研究未能对该种实时荧光 PCR 试剂的线性范围进行严格评价。但通过选取口岸一线采集的样本和金标准进行对比试验，该检测试剂能灵敏、可靠地检测疟原虫 DNA。

参考文献

- [1]刘忠湘,孙明林,赵亚,等.不同血样收集和模板制备方法 聚合酶链反应检测疟疾比较[J].中华检验医学杂志, 2001,24(1):21-23
- [2]李鹏;苗晋华,原艳明,赵喜荣.免疫层析技术在维和医疗中对疟疾诊断的实用价值[J];华北国防医药; 2010,4(1): 817-819
- [3]李欢,王晓春.分子技术在快速检测疟疾中的应用进展[J].广东医学,2013,16(1) :24-26
- [4]李柯,周水森,等.3 种 PCR 方法检测低密度恶性疟原虫血症的比较研究[J].中国病原生物学杂志, 2013,4(4)276-278
- [5]陈江涛,刘配芬,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].分子诊断与治疗杂志,2013,4(2)12-16