

海南省 2010 年网报疟疾病例实验室复核结果分析

李雨春,王光泽,胡锡敏,蒙锋,林翠芬,刘莹,王善青*

摘要:目的 对海南省 2010 年网络报告的疟疾病例进行横向监测。方法 采用镜检和 PCR 相结合的方法 2010 年海南省网报疟疾病例进行确认和复核。结果 全省共有 13 个市县报告疟疾病例,累计报告疟疾病 78 例,其中实验室诊断病例 31 例,临床诊断病例(未分型)47 例,省 CDC 共收集实验室诊断病例样本 18 例,临床诊断样本 20 例,全省实验诊断病例样本平均采集完成率为 58%,临床病例样本平均采集完成率 42.5%,两种采集完成率之间差异无统计学意义($\chi^2=0.61$ $P>0.05$)。所有检测结果均与镜检结果进行比对。结果一致率达到 99%,1 例错检。结论 加强对网络报告病例疟疾病例样本收集并进行基因检测和基因分型可以有效准确发现传染源,对实现消除疟疾具有参考价值。

关键词: 疟疾;PCR 检测;监测

中图分类号 R531.3 文献标识码 A 文章编号:1009-9727(2012)2-155-03

Results of laboratory re-examination of online reported malaria cases in Hainan in 2010. LI Yu-chun, WANG Guang-ze, HU Xi-min et al. (Hainan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Haikou 570203, Hainan P. R. China)

Abstract Objective To study the cross-sectional monitoring result of malaria cases online reported and verified in the laboratory in Hainan province in 2010. Methods Malaria cases reported from the China information system for disease control and prevention were confirmed by microscopy of blood slides assisted with polymerase chain reaction (PCR). Results Totally 78 malaria cases including laboratory and clinical diagnosed cases were reported from 13 counties in Hainan. 18 of 31 laboratory diagnosed cases (58%) and 20 of 47 clinically diagnosed cases (42.5%) were collected and verified by Hainan provincial CDC, showing no statistically significant difference ($\chi^2=0.61$ $P>0.05$) between them. The results of re-examination of microscopy were compared with that of PCR with an coincidence rate of 99% and only one case failed in the re-examination. Conclusion To strengthen sample collection through the network and perform genetic detection and genotyping can effectively and accurately detect infectious foci and that possess reference value in elimination of malaria in this province.

Key words: Malaria cases; PCR diagnosis; Monitoring

近年来,海南省疟疾报告疫情逐年下降,由 2008 年疟疾年发病率 22/ 十万下降到 2010 年疟疾年发病率 0.9/ 十万,发病例数同期减少 1 805 例^[1]。2010 年 7 月,由卫生部等 13 部委联合颁发了《中国消除疟疾行动计划(2010-2020)》,正式提出消除疟疾,海南省疟疾防控策略逐渐也由控制疟疾转换为消除疟疾。海南省作为历史上疟疾高发省份之一,虽然近年来疟疾疫情下降很快^[1,2],但大劣按蚊、微小按蚊等传疟媒介一直存在^[3],仍有对消除疟疾进程和消除疟疾后期有效监测管理构成威胁。为了更好监测海南省网报疟疾病例,采用两种方法横向比较全省疟疾病例报告病例检测结果,为海南省消除疟疾提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 样本收集对象和范围 收集的样本来源于全省各医疗单位通过中国疾病预防控制中心信息系统上报的疟疾病例,包括疟疾确诊病例和临床诊断病例。

每一个病例要求送检单位采集滤纸血,干燥后装入预先放置干燥剂封口袋中,20℃低温保存。4℃运输,送到海南省疾控中心统一进行检测。

1.2 显微镜检测 各网报疟疾病例由县市负责对血片进行初步复核,部分阳性血片送省 CDC 进行复核。

1.3 PCR 检测 采用 chelex100 法^[4]对上送样本进行 DNA 提取和巢式 PCR 检测^[5],外引物: Out primer F: CggTCgCgTCCgg AgCgTCTAATgCCTAgAcgTATTCCTgATTATCCAg Out primer R CgCATCACCTCTgggCCgCgTgTTTgCTTgggAgCTgTAATCATAATgTg Inner Primer F: gAgAATTATggAgTggATggTg Inner Primer F TggTAATgACATCCAATCC;反应条件 95℃ 变性 5min,35 个循环 95℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 90s,72℃ 延伸 5min,PCR 反应产物进行琼脂糖电泳检测。

2 结果

2.1 样本收集情况 在 2010 年 1~12 月期间,全省共

作者单位 海南省疾病预防控制中心,海南 海口 570203

作者简介 李雨春(1983~),男,研究生,研究实习员,主要从事疟疾分子生物检测。

* 通讯作者 E-mail: wangsqkevin@hotmail.com

有 13 个市县报告疟疾病例，累计报告疟疾病 78 例，其中实验室诊断病例 31 例，临床诊断病例(未分型)47 例，省 CDC 共收集实验室诊断病例样本 18 例，临床诊断样本 20 例，全省实验诊断病例样本平均采集完成率是 58%，临床病例样本平均采集完成率 42.5%，两种采集完成率之间差异无统计学意义

($\chi^2=0.61$, $P>0.05$) ,见表 1。
2.2 样本检测结果 样本检测分为两大类进行，网报疫情实验室诊断病例采用单管单样 PCR 扩增，对于扩增阳性样本进行种型鉴定。对于临床诊断病例采用 Pooling 策略进行 PCR 检测。所有检测结果均与镜检结果进行比对。结果一致率达到 99% ,1 例错检。见表 2。

表 1 各市县不同疟疾样本收集结果
Table 1 Results of malaria sample collection from cities or counties

市县 Cities or counties	网报疟疾病例 Case from network					
	实验室诊断病例 laboratory diagnosed cases			临床诊断病例 Clinical diagnosed cases		
	上报数 No.reported	样本上送数 No.collected	样本收集数(率) Rate(%)	上报数 No.reported	样本上送数 No.collected	样本收集数(率) Rate(%)
白沙县 Baise County	5	5	100%	8	6	75%
万宁市 Wanning City	2	0	0	10	3	33%
琼中县 Qiongzong County	0	0	-	7	7	100%
乐东县 Ledong County	0	0	-	1	0	50%
保亭县 Baoting County	13	10	77%	5	3	60%
陵水县 Lingshui County	0	0	-	2	0	0
三亚市 Sanya City	0	0	-	1	0	0
东方市 Dongfang City	3	1	33%	5	0	0
昌江县 Changjiang County	3	0	0	2	0	0
定安县 Dingan County	0	0	0	2	0	0
儋州市 Danzhou City	3	1	33%	0	0	0
海口市 Haikou City	2	1	50%	4	1	33%
合计 Total	31	18	58%	47	20	42.5%

表 2 不同检测方法对各种疟疾病例检测结果
Table 2 Results of malaria cases with two different detection methods

市县 Cities or counties	网报疟疾病例 case from nets			
	镜检结果 Results of blood slide examination		PCR 结果 Results of PCR	
	实验室诊断病例 No.lab diagnosed	临床诊断病例 No.clinical diagnosed	实验室诊断病例 No.lab diagnosed	临床诊断病例 No.clinical diagnosed
白沙县 Baise County	5	6	5	6
万宁市 Wanning City	0	3	0	3
琼中县 Qiongzong County	0	7	0	7
乐东县 Ledong County	0	0	0	0
保亭县 Baoting County	10	3	10	3
东方市 Dongfang City	1	0	1	0
儋州市 Danzhou City	1	0	1	0
海口市 Haikou City	1	1	0	2
合计 Total	18	20	17	21

3 讨论

显微镜镜检是常用的现有或潜在疟疾病例的主要手段，是疟疾检测诊断的金标准^[6]。据文献报道显微镜检测的敏感性最佳为 10~30 虫 /μ l 以上^[7]。PCR 也作为疟原虫检测方法之一，灵敏度显著高于镜检^[7]。我国于 2010 年 7 月正式提出消除疟疾，疟疾防控策略也由控制疟疾转变为消除疟疾。有效准确的监测每一报告疟疾病例在消除疟疾阶段就显得尤为重要。为了有效检测和监测海南省疟疾病例，本研究对海南省 2010 年网络报告的疟疾病例进行横向检测分析，从全省上

送的各种疟疾病例来看，我省网络报告病例血片送检完成率平均完成率达到 48.7%左右，实验室诊断病例送检率略高于临床诊断病例送检率，这一点提示我们需要加强对个别单位重点督导，有针对性的加强网络报告疟疾病例血片送检，防止错漏误检疟疾报告病例。送检样本检测结果来看，所有检测结果均与镜检结果进行比对。结果一致率达到 99% ,错检一例经复核后为阴性病例。综上所述，为了加强疟疾病例管理，除继续加强基层镜检人员培训维持镜检水平外，继续加强对网络报告疟疾病例进行基因检测（下转第 159 页）

定安县、白沙县、东方县等血片染色质量较差,中优等级血片分别为 78.55%、74.46%、68.70%。血片染色效果不佳,脏而无法镜检,将严重影响镜检结果的准确性,是造成漏检、错检的重要原因之一,其根本原因在于镜检人员对血片染色技术要领掌握不好,工作不认真,不重视所致。

综上所述:通过对 16 市县的血片抽样复检结果分析,全省平均符合率都很高,说明我省绝大部分市县镜检水平有了明显的提高,但个别市县假阳性病例和染色差等级血片仍然很多,虽然漏检病例只是个别市县,但仍会对疟疾的传播与扩散造成威胁。今后随着消除疟疾工作的不断深入开展,疟疾病例将逐年减少,势必造成镜检人员的技术日渐生疏,对疟疾病例的有效检测与监测提出了新的挑战,因此,要进一步加强基层标准镜检站的建设^[4],有针对性地对不同地区的基层镜检人员采取多种形式的培训和复训^[5],同时不定时的进行能力考核,这样才能不断巩固镜检人员的镜检技术,确保疟疾消除工作的顺利实施。

参考文献:

- [1] Dan ZX, Yu XB. Advance in malaria diagnosis [J]. CHIN Trop. Med. 2001, 1(1): 47-50. (In Chinese)
(单志新, 余新炳. 疟疾诊断方法的研究进展[J]. 中国热带医学, 2001, 1(1): 47-50.)
- [2] Lin CF. Analysis in Results on Re-check Blood Slides from high-transmitted malaria area in Hainan Province [J]. CHIN Trop. Med. 2002, 2(3): 363-364. (In Chinese)
(林翠芬. 海南省高疟区三市县“四热”病人血片复检结果分析, 中国热带医学, 2002, 2(3): 363-364)
- [3] W.G. Metzger et al. Assessment of routine malaria diagnosis in the Venezuelan Amazon [J]. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 2011(105): 262-268.
- [4] Huang BP, Ding HH, Zhang JY, et al. The role of malaria microscope in malaria control in Jiangsu province [J]. 1988, 6(3): 178-181. (In Chinese)
(黄伯平, 丁焕洪, 张君炎, 等. 疟疾镜检站在江苏省疟疾防治中的作用[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1988, 6(3): 178-181.)
- [5] M.M. Kettelhut, P.L. Chiodini, H. Edwards, A. et al. Moody. External quality assessment schemes raise standards: evidence from the UKNEQAS parasitology subschemes [J]. J. Clin. Pathol. 2003(56): 927-932.

收稿日期 2011-12-23 编辑 吴中菲

(上接第 156 页)

和基因分型。

致谢: 感谢海南省 18 市县疟疾工作人员对本项工作提供了大力支持

参考文献:

- [1] Health bureau of disease prevention and control. National wide table on schistosomiasis malaria and echinococcosis control and prevetion in 2009 [M]. 2011, 85, 103. (In Chinese)
(卫生部疾病预防控制局. 2009 年度全国血吸虫病、疟疾和包虫病防治工作年报表 [M]. 2011, 85, 103.)
- [2] Health bureau of disease prevention and control. National wide table on schistosomiasis malaria and echinococcosis control and prevetion in 2004 [M]. 2005, 85, 103. (In Chinese)
(卫生部疾病预防控制局. 2004 年度全国血吸虫病、疟疾和包虫病防治工作年报表 [M]. 2005, 85, 103.)
- [3] Zeng LH, Wang SQ, Sun DW, et al. Resistance Assay of Malaria Vectors To Four Kinds of Common Insecticides in Some Endemic Areas of Hainan Province [J]. Chin Parasite J. 2011, 29(3): 200. (In Chinese)
曾林海, 王善青, 孙定炜, 等. 海南省部分地区传疟媒介按蚊对 4 种常用杀虫剂的抗药性测定 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2011/03.
- [4] Liu H, ZHANG GS, Yang Ym, et al. Evaluation on five DNA extraction method from Plasmodium falciparum [J]. CHIN Trop Med J. 2002, 2(2): 139-140. (In Chinese)
(刘慧, 张国森, 杨亚明, 等. 5 种提取恶性疟原虫 DNA 方法用于 PCR 的结果评价中国热带医学 [J]. 2002, 2(2): 139-140.)
- [5] Nicolas Steenkeste, Sandra Incardona, Sophy Chy, et al. Towards high-throughput molecular detection of Plasmodium: new approaches and molecular markers [J]. Malaria Journal. 2009, 8: 1-12.
- [6] Gilles HM. Diagnostic methods in malaria—Essential Malariology [M]. 3rd Edition. London: Edward Arnold, 1993, 78-95.
- [7] Balbir S. A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction [J]. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1999, 60(4): 687-692.

收稿日期 2011-12-27 编辑 谢永慧