

· 论 著 ·

## 基于孢子阳性率和混合样本对疟疾进行早期预警时的临界感染率检验

孙庆文<sup>1</sup>, 宋茂海<sup>1</sup>, 朱淮民<sup>2\*</sup>, 方影<sup>1</sup>

(1. 第二军医大学基础部数理教研室, 上海 200433; 2. 基础部病原生物学教研室, 上海 200433)

**[摘要]** **目的:** 给出基于混合样本的最小检测次数法和序贯检验法, 以检验孢子阳性率是否超过导致疟疾流行的临界水平。**方法:** 在控制两类错误概率的前提下, 推导两种方法的期望检测次数和检验功效的数学表达式。对最大期望检测次数进行数学优化, 求解最优混合样本的大小, 并通过计算机模拟对有关结果进行验证。**结果:** 给出了最小检测次数法和序贯检验法的最优混合样本计算方法、MATLAB程序和具体操作步骤。前者可用于日常监测, 后者可用于早期预警。**结论:** 利用本文给出的最优混合样本和检测步骤, 在获得比较满意的检验功效(两类错误概率均低于5%)的同时, 可以有效降低检测次数。

**[关键词]** 孢子阳性率; 疟疾; 最优混合样本大小; 混合样本量

**[中图分类号]** R 531.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)05-0465-05

### Hypotheses testing of critical infection rates for early warning of malaria epidemics: a study using pooled sampling method and sporozoite rate

SUN Qing-wen<sup>1</sup>, SONG Mao-hai<sup>1</sup>, ZHU Huai-min<sup>2\*</sup>, FANG Ying<sup>1</sup> (1. Department of Mathematics and Physics, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Etiological Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To provide a minimum sample size approach and a sequential sampling approach for testing whether the sporozoite rate has exceeded the critical level of malaria epidemics using the pool sampling method. **Methods:** Formulas of the expected pooled sample size and the power of tests were deduced while controlling the probability of type I and type II errors. The optimal pool sizes of the 2 approaches were given by minimizing the expected pooled sample size; computer simulation was used to verify the outcomes. **Results:** The optimal pool size, programming of MATLAB, and the steps of trials of the 2 approaches were given. The minimum sample size approach could be used for routine surveillance and sequential sampling approach could be used for early warning. **Conclusion:** The optimal pool size in the present study can obtain satisfactory testing power (type I and type II errors are both lower than 5%) and can effectively decrease the pooled sample size.

**[KEY WORDS]** sporozoite rate; malaria; optimal pool size; pooled sample size

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(5): 465-469]

疟疾暴发流行与否的影响因素非常多, 有季节转换、天气变化、人群流动、人群免疫力状况、蚊虫叮人率等等。在非稳定疟区, 这些传播因素中任何一项发生变化, 都可能打破平衡, 造成疟疾的流行。早期预警的警戒线(critical level)可以根据既往发病率或病例数的简单统计量确定(例如既往病例数的百分位数, WHO推荐的“均值±k标准差”等<sup>[1-2]</sup>), 也可以采用上述其中一种或几种因素, 并根据该因素与疟疾流行趋势的相关性分析, 确定早期监测的流行阈值和正常值。例如, Lindblade等<sup>[3]</sup>用室内按蚊密度作为早期预警指标, 并给出了检测按蚊密度是否超过阈值或低于安全值的统计检验方法。

从流行动力学角度看, 与室内按蚊密度、叮人率等相比, 蚊虫孢子阳性率与疟疾流行应该有更大的相关性<sup>[4]</sup>, 用孢子阳性率作为早期预警指标理论上应该可以做得更好。但即便是在疟疾高发期,

蚊虫孢子阳性率仍然很低, 例如, 在我国非稳定性疟区, 疟原虫孢子阳性率(感染率)一般都低于0.1%。因此, 如果用通常的统计检验方法来判断孢子阳性率是否超过警戒线, 意味着必须捕获大量的蚊虫样本并在显微镜下逐个解剖, 不仅成本高而且可能延误时间。随着分子和免疫检测技术的特异性和灵敏度的提高(例如, Medical Analysis Systems公司的孢子检测试剂盒 VecTest™ Malaria, 用针对疟原虫孢子期环子孢子蛋白重复区单克隆抗体检测蚊虫体内的孢子, 能够区分恶性疟原虫和间日疟原虫 210株和 247株), 可以考虑将若干蚊虫样

**[基金项目]** “十五”国家科技攻关课题(2004BA718B13)。Supported by Key Project of the 10th National Five-Year Plan for Science and Technology(2004BA718B13)。

**[作者简介]** 孙庆文, 硕士, 副教授。E-mail: stevensun1968@126.com

\* Corresponding author. E-mail: zhuhm22@yahoo.com.cn

本混合起来(捣烂在一起),做成一个混合样本(称为一个 pool),一次检测即可判定其是否阳性,然后检测若干个这样的混合样本,再根据混合样本的阳性数对阳性率进行统计推断(其中的难点是,当一个混合样本显阳性时,我们并不知道到底有多少个蚊虫样本的子孢子是阳性的)。检测试剂的发明以及混合检测(pool testing)的思路,使得基于子孢子阳性率对疟疾进行早期预警成为可能。

基于混合样本的阳性率极大似然估计(maximum likelihood estimation)最早由 Walter 等<sup>[5]</sup>提出。为了在达到一定估计精度的同时,尽可能地减少检测次数,目前对混合样本方法的讨论主要集中在最小感染率(minimum infection rate, MIR)估计和极大似然估计中混合样本的大小(pool size, 即一个混合样本中包含多少个蚊虫样本)如何确定的问题<sup>[6-7]</sup>。例如,是否存在最优大小的混合样本,混合样本大小是固定不变(constant size pooling)比较好还是可变(variable size pooling)比较好,应该检测多少个混合样本(the pooled sample size, 称之为混合样本量或检测次数),应该说,从充分挖掘混合样本方法降低检测次数的潜力方面看,这些问题并没有得到很好的解决。

从疟疾早期预警的角度看,如果能根据流行动力学的理论推算和其他方法(包括专家经验)确定警戒线和安全值,那么,就不一定需要对感染率进行精确估计,而只须通过统计检验来判断子孢子阳性率是否超过警戒线或低于安全值。如果检验方法设计合理,与估计问题相比,所需要的蚊虫样本和检测次数应该还可以再减少。本研究在警戒线和安全值已知的前提下,探讨如何设计基于混合样本的检验方法。通过理论推导、MATLAB 编程计算和模拟,我们设计了“最小检测次数法”和“序贯检验法”,给出了最优混合样本的计算方法和具体操作步骤。前者适宜用于日常监测,当其发出警报时(可能有虚假警报),立即转

入序贯检测程序,两种方法配套使用可以确保当阳性率真值低于安全值时发出虚假警报的可能性低于5%,而当阳性率真值高于流行阈值时可以做出预警的机会超过95%。模拟结果表明,两种方法可以获得满意的检验功效,所需检测次数亦很小。

### 1 原理和方法

1.1 最小检测次数法(minimum sample size approach) 假设流行阈值  $p_2$ , 要判断蚊虫孢子阳性率  $p$  是否超过阈值, 即, 检验假设  $H: p \leq p_2 \leftrightarrow K: p > p_2$ 。最小检测次数法的想法是: 对大小为  $m$  的混合样本, 先指定一个自然数  $n$ , 若检测不超过  $n$  个混合样本时即发现阳性混合样本, 停止检测并拒绝  $H$ , 做出预警; 若直到第  $n$  个混合样本时仍然没有出现阳性混合样本, 停止检测, 并接受  $H$ 。

该检验的功效为  $\gamma(p) = 1 - (1 - q)^n = 1 - (1 - p)^{nm}$ , 其中  $q = 1 - (1 - p)^m$  是混合样本的阳性率。当  $p > p_2$  时,  $\gamma(p) \geq 1 - (1 - p_2)^{nm}$ , 故只须  $1 - (1 - p_2)^{nm} = 0.95$  即可保证第二类错误(当阳性率真值超过  $p_2$  时错误地接受  $H$  并认为没有爆发流行的可能)概率不超过5%。在此前提下, 为了使最大的期望检测次数  $\max_{p \in (0,1)} \{E_p(n) = \frac{1 - (1 - p)^{nm}}{1 - (1 - p)^m}\}$  达到最小(参照二项分布情形即可得到该表达式<sup>[8]</sup>), 注意到  $\frac{1 - (1 - p)^{nm}}{1 - (1 - p)^m} \geq 1$ , 故只须选择  $n = 1$  即可[此时, 对任意的  $p \in (0, 1)$ ,  $E_p(n) \equiv 1$ ]。这样一来,  $m = \frac{\ln 0.05}{\ln(1 - p_2)}$ 。实际操作时应四舍五入取整数, 记为:  $m = \text{round} \left( \frac{\ln 0.05}{\ln(1 - p_2)} \right)$  (1)

我们将其称为最小检测次数法: 检测一个混合样本, 阳性则拒绝  $H$ , 发出预警; 阴性则不拒绝(接受)  $H$ 。混合样本大小由公式(1)确定。表1给出了部分结果。

表1 采用最小检测次数法不同临界感染率时的最优混合样本大小及混合样本量  
Tab 1 Optimal pool size and pooled sample size of minimum sample size approach corresponding to several critical levels of infection rates

Critical level ( $p_2$ )	0.1	0.05	0.01	0.005	0.001	0.0005	0.0001	0.00005
Optimal pool size ( $m$ )	28	58	298	598	2994	5990	29956	59913
Pooled sample size ( $n$ )	1	1	1	1	1	1	1	1

### 1.2 序贯检测法(sequential sampling approach)

假设流行阈值  $p_2$ , 安全值为  $p_1 (p_1 < p_2)$ , 要判断蚊

虫孢子阳性率  $p$  是否超过阈值或低于安全值, 即检验假设  $H: p < p_1 \leftrightarrow K: p > p_2$ 。我们选用序贯概率比检验 (sequential probability ratio test, SPRT), 第一、第二类错误概率设定为  $\alpha$  和  $\beta$ 。步骤如下:

第一步: 检测第一个混合样本, 计算  $A_1 = c + d_1$  和  $B_1 = c + d_2$ 。若混合样本阳性数  $s_1 = x_1 < A_1$  则不拒绝 (接受)  $H$ ; 若  $s_1 > B_1$  则拒绝  $H$  并做出预警; 若  $A_1 < s_1 < B_1$ , 暂不做结论, 继续检测。其中常数  $c, d_1, d_2$  由公式 (2) 确定:

$$c = \frac{-\ln \frac{1-q_2}{1-q_1}}{\ln \frac{q_2}{q_1} - \ln \frac{1-q_2}{1-q_1}} (>0)$$

$$d_1 = \frac{\ln A}{\ln \frac{q_2}{q_1} - \ln \frac{1-q_2}{1-q_1}} (<0)$$

$$d_2 = \frac{\ln B}{\ln \frac{q_2}{q_1} - \ln \frac{1-q_2}{1-q_1}} (>0)$$

$$q_i = 1 - (1 - p_i)^m (i=1, 2)$$

$$A = \frac{\beta}{1-\alpha}, B = \frac{1-\beta}{\alpha} \quad (2)$$

第二步: 检测第二个混合样本, 计算  $A_2 = 2c + d_1$  和  $B_2 = 2c + d_2$ 。若混合样本阳性数  $s_2 = x_1 + x_2 < A_2$  则不拒绝 (接受)  $H$ ; 若  $s_2 > B_2$  则拒绝  $H$  并做出预警; 若  $A_2 < s_2 < B_2$ , 暂不做结论, 继续检测。

第三步: 检测第三个混合样本, 计算  $A_3 = 3c + d_1$  和  $B_3 = 3c + d_2$ 。若混合样本阳性数  $s_3 = x_1 + x_2 + x_3 < A_3$  则不拒绝 (接受)  $H$ ; 若  $s_3 > B_3$  则拒绝  $H$  并做出预警; 若  $A_3 < s_3 < B_3$ , 暂不做结论, 继续检测。

以此类推……

将标准的证明过程<sup>[9]</sup>略加变通, 即知, 上述序贯程序经过有限步的检测一定可以做出结论。该检验的功效 (拒绝原假设的概率) 为  $\gamma(p) \approx \frac{B^h - 1}{B^h - A^h}$ 。其中  $h$  满足方程  $(1-p)^m (\frac{1-p_2}{1-p_1})^{mh} + [1 - (1-p)^m]$

$$[\frac{1 - (1-p_2)^m}{1 - (1-p_1)^m}]^h = 1。$$

若  $F = [1 - (1-p)^m] \ln \frac{1 - (1-p_2)^m}{1 - (1-p_1)^m} + m(1-p)^m \ln \frac{1-p_2}{1-p_1} \neq 0$ , 该检验的期望混合样本量 (平均检测次数) 为

$$E_n(p) \approx \frac{[1 - \gamma(p)] \ln A + \gamma(p) \ln B}{F} \quad (3)$$

对给定的  $p_1, p_2, \alpha$  和  $\beta$ , 存在一个最优的混合样本, 使最大平均检测次数  $\max_{0 < p < 1} E[n(p)]$  达到最小。我们利用 MATLAB 对近似公式 (3) 进行了数值分析, 部分结果见表 2。其中, “最优”意为已经使最大期望检测次数达到了最小。

表 2 SPRT 在不同临界感染率和安全感染率时的最优混合样本大小及最大平均混合样本量

Tab 2 Optimal pool size and maximum expected pooled sample size of SPRT corresponding to several critical and normal levels of infection rates

Critical level ( $p_2$ )	0.1	0.05	0.01	0.005	0.001	0.000 5	0.000 1	0.000 05
Normal level ( $p_1$ )	0.05	0.01	0.005	0.001	0.000 5	0.000 1	0.000 05	0.000 01
Optimal pool size ( $m$ )	21	68	219	693	2 193	6 942	21 938	69 429
Maximum expected pooled sample size	25	5	27	5	27	5	27	5

## 2 模拟和计算实例

根据安徽舒城芦镇 1982~1985、1996~1999 年的实际数据, 结合专家经验, 初步确定当地孢子阳性率的警戒线和安全线分别约为  $p_2 = 0.092 1\%$  和  $p_2 = 0.039 6\%$ 。我们将第一类错误和第二类错误的概率均设为  $5\%$ , 根据公式 (1) 即可确定最小检测次数法的最优混合样本大小约为  $m = 3 251$ , 根据公式 (3) 并用 MATLAB 进行数值分析, 即可确定 SPRT 方法的最优混合样本大小约为  $m = 2 560$ 。

日常监测阶段 (最小检测次数法): 检测一个大小为  $m = 3 251$  的混合样本: 若检测结果为阴性, 不做预警, 并进行日常监测; 若检测结果为阳性, 则进入下面的“早期预警阶段”, 做进一步检测和判断。理论上, 当真实的孢子阳性率超过警戒线时, 应该预警而没有进入下面“早期预警阶段”从而出现漏报的可能性低于第二类错误概率  $5\%$  (模拟结果表明, 实际上远低于  $5\%$ )。

早期预警阶段 (序贯检测法): 根据最优混合样本大小  $m = 2 560$ , 根据公式 (2), 计算  $A_k = kc + d_1$

和  $B_k = kc + d_2, k = 1, 2, 3, \dots$ , 即可得到“序贯检测法用于安徽舒城芦镇疟疾早期预警时混合样本阳性

数的警戒线和安全线”。具体数据如表 3(只列出了前 10 个)。

表 3 序贯检测法用于安徽舒城芦镇疟疾早期预警时混合样本阳性数的警戒线和安全线

Tab 3 Critical and normal levels of cumulative positive number of pooled sample of SPRT for early warning of malaria epidemics in Luzhen, Shucheng, Anhui Province

Cumulative pooled sample size	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Critical level of cumulative positive number of pooled samples	2.53	3.32	4.11	4.91	5.70	6.49	7.29	8.08	8.87	9.66
Normal level of cumulative positive number of pooled samples	-0.94	-0.15	0.64	1.44	2.23	3.02	3.81	4.61	5.40	6.19

表 3 的使用方法如下:逐次检测大小为  $m = 2560$  的混合样本,一旦累计混合样本阳性数超过“警戒线”,立即发出警报;一旦累计混合样本阳性数低于“安全线”,停止检测,不必报警;如果累计混合样本阳性数介于两者之间,继续检测下一个混合样本,直到得出明确的结论。

我们利用 MATLAB 编程,进行了模拟检测。图 1 是两种检测方法的检验功效,图 2 是 SPRT 的期望检测次数。其中,Formula( $m = 2560$ )为近似公式的计算结果,Simulation( $m = 2560$ )是 1 000 次模拟结果的平均值(对每个感染率真值,按序贯检测法的步骤和要求,不断随机生成大小为  $m = 2560$  的混合样本,直到得出“预警”或“不报警”的结论,记录检测次数;然后重复 1 000 次,计算检测次数平均值)。图 2 表明,模拟结果与近似公式(3)的计算结果差距不大,说明公式(3)的近似程度可以满足实际需要。

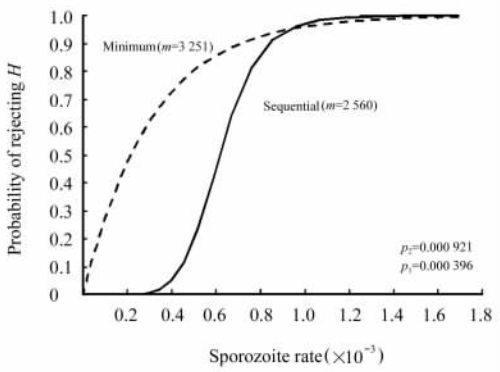


图 1 检验功效曲线

Fig 1 Power curves of minimum sample size approach and sequential sampling approach

Solid line indicates the probability of rejecting  $H$  of sequential sampling approach corresponding to the critical level 0.092 1% and the normal level 0.039 6%; dashed line indicates the probability of rejecting  $H$  of minimum sample size approach corresponding to the critical level 0.092 1%

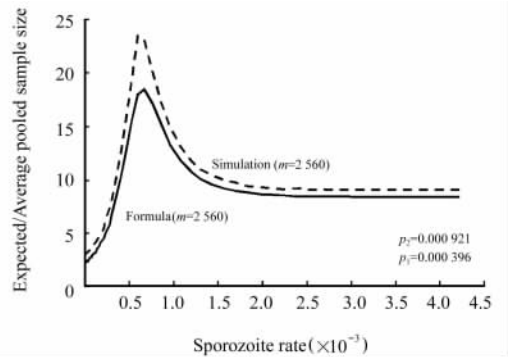


图 2 SPRT 的期望检测次数曲线

Fig 2 Expected/Average pooled sample size of SPRT

Solid line indicates the expected pooled sample size given by the formula (3) in the text; dashed line indicates the average pooled sample size given by stochastic simulation

图 1 表明,当  $H$  为真时,最小检测次数法犯第一类错误的概率比较大,因而常会发出虚假警报。图 2 显示,SPRT 的期望检测次数具有如下规律:当感染率真值处于警戒阈值和安全值之间时,期望检测次数比较大,而当感染率真值超过流行阈值或低于安全值时,所需检测次数非常小,可以很快做出判断(两类错误概率均低于 5%)。

### 3 讨论

当阳性率真值低于流行阈值时,最小检测次数法经常会发出虚假警报,但其漏报的可能性低于 5%。由于只需一次检测,其作用有二:其一,不论出于什么原因,当人们怀疑实际阳性率可能上升时(例如,雨季过后),就可以用该方法进行初步侦查,如果结论是感染率没有超过流行阈值,那么,就没有必要再进行大量的流行病学调查。反之则应该谨慎从事,转而采用序贯方法做进一步分析和研究。其二,最小检测次数法可以作为一种常规手段,用来对感染率状况进行日常监测。当其发出警报时(可能有虚假警报),立即转入序贯检测程序,两种方法配套

使用可以确保当阳性率真值低于安全值时,发出虚假警报的可能性低于5%,而当阳性率真值高于流行阈值时,可以立即做出预警的机会超过95%。但是,如前所述,疟疾暴发流行与否的影响因素很多,任何单一指标早期预警方法的结果都不宜轻率地作为定论(但可以让人警觉或未雨绸缪),在可能的情况下,人们应该尽量多选择一些早期预警指标,从不同角度对疟疾病是否暴发流行进行推断,或构建更加复杂的多因素模型,乃至地理信息系统,以便做出更加准确的判断。

从方法学方面看,本文或许可以为后续工作提供两点启示。首先,与阳性率估计问题不同的是,在基于混合样本的阳性率是否超过临界水平的统计检验问题中,最优混合样本是存在的。而且,用最优混合样本可以有效降低检测次数,节约成本。例如,对图2范围内的阳性率真值( $0 < p < 0.0045$ ),用最优混合样本  $m=2560$ ,最大检测次数为18(1000次模拟结果为22.77),平均检测次数为4.47(模拟结果为5.43)。如果不用最优混合样本,例如  $m=500$ ,则最大检测次数为46(模拟结果为53.08),平均检测次数为12.84(模拟结果为13.89)。其次,当阳性真值处于警戒水平和安全水平之间时,如果希望进一步降低发出虚假警报的概率,取得更好的检验功效,可以考虑在序贯检测法的基础上,再用固定样本方法做进一步的检测和统计检验(限于篇幅,本文没有提供基于混合样本的固定样本统计检验方法,其中当然也存在着最优混合样本及混合样本量的确定问

题)。当然,固定样本方法所需要的检测次数无疑将增加(事实上,检测次数将会增加很多),检测成本上升。

## [参考文献]

- [1] Teklehaimanot H D, Schwartz J, Teklehaimanot A, et al. Alert threshold algorithms and malaria epidemic detection[J]. Emerg Infect Dis, 2004, 10: 1220-1226.
- [2] Hashimoto S, Murakami Y, Taniguchi K, et al. Detection of epidemics in their early stage through infectious disease surveillance[J]. Intern J Epidemiol, 2000, 29: 905-910.
- [3] Lindblade K A, Walker E D, Wilson M L. Early warning of malaria in African highlands using anopheles (Diptera: Culicidae) indoor resting density [J]. J Med Entomol, 2000, 37: 665-674.
- [4] 朱淮民. 疟疾监测及早期预警系统[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25: 5-8.
- [5] Walter S D, Hildreth S W, Beaty B J. Estimation of infection rates in populations of organisms using pools of variable size [J]. Am J Epidemiol, 1980, 112: 124-128.
- [6] Gu W, Lampman R, Novak R J. Assessment of arbovirus vector infection rates using variable size pooling[J]. Med Veterin Entomol, 2004, 18: 200-204.
- [7] 孙庆文, 朱淮民, 陆柳, 等. 混合样本方法检测蚊虫孢子阳性率数学模型的再研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2002, 20: 351-353.
- [8] 陈希孺. 数理统计引论[M]. 北京: 科学出版社, 1981: 338-339.
- [9] 陈家鼎, 孙山泽, 李东风, 等. 数理统计学讲义[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 2006: 329-350.

[收稿日期] 2007-02-12

[修回日期] 2007-04-09

[本文编辑] 尹茶

## · 消 息 ·

## 我校8项课题获2006年度省部级一等奖以上科研奖项

### 国家自然科学基金二等奖

恶性肿瘤磷酸化调控的信号转导研究(第二军医大学东方肝胆外科医院生物信号转导研究室 王红阳等)

### 中华科学科技一等奖、上海市自然科学一等奖、上海市医学科技一等奖

免疫应答调控的细胞与分子机制研究(第二军医大学基础部医学免疫学教研室 曹雪涛等)

### 上海市科技进步一等奖

微创治疗泌尿系结石新技术的应用研究(第二军医大学长海医院泌尿外科 孙颖浩等)

幽门螺杆菌致病因子(CagA、VacA)的生物学特性及其临床应用研究(第二军医大学长海医院消化内科 李兆申等)

退变性颈脊髓压迫症的基础与临床研究(第二军医大学长征医院骨科 贾连顺等)

### 上海市技术发明一等奖

抗肿瘤坏死因子受体抗体融合蛋白的研制(第二军医大学国际肿瘤研究所 郭亚军等)

### 军队医疗成果一等奖

严重胸部战创伤的急救与救治研究(第二军医大学长征医院胸心外科 徐志飞等)

常染色体显性多囊肾病(第二军医大学长征医院肾内科 梅长林等)