

- [6] Gross M, Kost SB, Ennis B, et al. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on mouse mammary tumor(GR) cells: evidence for receptors, cellular uptake, inhibition of growth and alteration in morphology at physiologic concentrations of hormone[J]. J Bone Miner Res, 1986, 1(5): 457-467.
- [7] Skowronski RJ, Peehl DM, Feldman D. Vitamin D and prostate cancer: 1,25 dihydroxyvitamin D3 receptors and actions in human prostate cancer cell lines[J]. Endocrinology, 1993, 132(5): 1952-1960.
- [8] Zhuang SH, Schwartz GG, Cameron D, et al. Vitamin D receptor content and transcriptional activity do not fully predict antiproliferative effects of vitamin D in human prostate cancer cell lines[J]. Mol Cell Endocrinol, 1997, 126(1): 83-90.
- [9] Wu W, Zhang X, Zanello LP. 1 $\alpha$ , 25-Dihydroxyvitamin D(3) antiproliferative actions involve vitamin D receptor-mediated activation of MAPK pathways and AP-1/p21(waf1) upregulation in human osteosarcoma[J]. Cancer Lett, 2007, 254(1): 75-86.
- [10] Costa JL, Eijk PP, van de Wiel MA, et al. Anti-proliferative action of vitamin D in MCF7 is still active after siRNA-VDR knock-down[J]. BMC Genomics, 2009, 10: 499-500.
- [11] Liu M, Lee MH, Cohen M, et al. Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937[J]. Genes Dev, 1996, 10(2): 142-153.
- [12] Moffatt KA, Johannes WU, Hedlund TE, et al. Growth inhibitory effects of 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D(3) are mediated by increased levels of p21 in the prostatic carcinoma cell line ALVA-31[J]. Cancer Res, 2001, 61(19): 7122-7129.
- [13] Rao A, Coan A, Welsh JE, et al. Vitamin D receptor and p21/WAF1 are targets of genistein and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human prostate cancer cells[J]. Cancer Res, 2004, 64(6): 2143-2147.
- [14] Peehl DM, Shinghal R, Nonn L, et al. Molecular activity of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in primary cultures of human prostatic epithelial cells revealed by cDNA microarray analysis[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2004, 92(3): 131-141.
- [15] Swami S, Raghavachari N, Muller UR, et al. Vitamin D growth inhibition of breast cancer cells: gene expression patterns assessed by cDNA microarray[J]. Breast Cancer Res Treat, 2003, 80(1): 49-62.
- [16] Singletary K, Milner JD. Autophagy, and cancer: a review[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008, 17(7): 1596-1610.
- [17] Hoyer-Hansen M, Bastholm L, Mathiasen IS, et al. Vitamin D analog EB1089 triggers dramatic lysosomal changes and Beclin 1-mediated autophagic cell death[J]. Cell Death Differ, 2005, 12(10): 1297-1309.
- [18] Zou M, Lu N, Hu C, et al. Beclin 1-mediated autophagy in hepatocellular carcinoma cells: implication in anticancer efficiency of oroxylin A via inhibition of mTOR signaling[J]. Cell Signal, 2012, 24(8): 1722-1732.
- [19] Lee HJ, Liu H, Goodman C, et al. Gene expression profiling changes induced by a novel Gemini Vitamin D derivative during the progression of breast cancer[J]. Biochem Pharmacol, 2006, 72(3): 332-343.

(收稿日期: 2013-06-13)

• 综 述 •

## 吡啶橙荧光染色诊断附红细胞体病研究进展及评价

蔡淑梅<sup>1</sup>, 安淑娟<sup>1</sup>综述; 金凤玲<sup>2△</sup> 审核

(兰州大学第一医院: 1. 检验科; 2. 感染管理科, 甘肃兰州 730000)

**关键词:** 支原体感染; 吡啶橙; 诊断

**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 23. 041

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2013)23-3193-03

附红细胞体(eperythrozoön)是寄生于多种动物和人的红细胞表面、血浆及骨髓中的一种单细胞原生物,所引起的人畜共患传染病称之为附红细胞体病(EPE)。已有越来越多的报道说明在中国人群中附红细胞体感染率有逐年递增的趋势,如文海蓉等<sup>[1]</sup>用血涂片镜检的方法检测南昌地区的不同人群764人,结果显示南昌地区人群附红细胞体总感染率为8.25%;和春桐等<sup>[2]</sup>用涂片染色及压片法在云南贡山地区附红细胞体感染率为68.18%,感染率以农村(77.34%)高于城市(30.29%);於雪琴等<sup>[3]</sup>对青浦区人附红细胞体感染率结果共调查320人,总感染率为16.25%;张敏娟等<sup>[4]</sup>对于宁夏居民及门诊患者检测附红细胞体感染率高达41.00%。附红细胞体感染对象为免疫力低下的人群和特殊人群(如猪饲养员、猪肉屠宰和销售人员等)<sup>[5]</sup>。王剑飏等<sup>[6]</sup>对高原人附红细胞体研究中,附红细胞体的传播有垂直传播。人感染附红细胞体后,并不一定出现明显症状,即有“隐性感染”,在免疫力低下或者病原体数量超过一定量的时候才会出现症状,对人类健康造成

严重的危害甚至导致死亡<sup>[1-2,7]</sup>。

人畜共患的EPE分布于世界各地,人感染附红细胞体的临床表现多种多样,且没有特异的临床症状。由于本病在临床上常与感冒、黑热病、疟疾等疾病的症状相似,容易混淆;同时导致红细胞破坏和血浆游离血红蛋白升高<sup>[8]</sup>;人感染附红细胞体时很容易造成误诊、漏诊<sup>[5,9-12]</sup>,故目前临床迫切需要一个特异性强、灵敏度高的实验来诊断该病。

### 1 附红细胞体的理化性质及病原分离培养

附红细胞体一般在血液和骨髓中寄生,在血浆中大小不一,可成单个或者成团存在,一般直径在0.3~1.0  $\mu\text{m}$ ,最大可达1.5  $\mu\text{m}$ ,运动十分活跃,呈翻滚或扭转运动,一旦附着在红细胞表面,就停止运动,在骨髓中运动远不如在血浆中活跃。

附红细胞体对干燥和化学消毒药物抵抗力较弱,一般消毒剂几分钟即可杀死,但在酸性溶液中活性反而会增强;60  $^{\circ}\text{C}$ 、30 min即可使附红细胞体失去致病活性。对低温抵抗力较强,在4  $^{\circ}\text{C}$ 的血液中可存活1个月,不受红细胞溶解的影响,在

低温冷冻情况下附红细胞体可存活数年之久。附红细胞体外培养条件十分苛刻<sup>[13]</sup>,但是 Nonaka 等<sup>[14]</sup>对猪附红细胞体的体外培养特性进行了研究,利用含 10% 小牛血清的 REM 培养液,在厌氧或 5% CO<sub>2</sub> 条件培养成功。张守发等<sup>[15]</sup>用 RPMI 1640、M199 和 DMEM 等 3 种培养液作为基础培养基和 40% 的小牛血清,体外培养牛附红细胞体获得成功。房春林等<sup>[16]</sup>用 RPMI 1640 和小牛血清体外培养猪和兔附红细胞体也获得成功,但目前尚无关于人附红细胞体在体外培养成功的报道。

## 2 附红细胞体实验诊断方法的特点及现状

附红细胞体实验室诊断的方法有很多,包括:血清学方法、悬滴法、直接涂片法、染色检查法、聚合酶链反应(PCR)、原位杂交技术、DNA 杂交技术等。由于附红细胞体抗体水平波动比较大,且免疫血清或抗体多数含有交叉反应,血清学试验特异性和敏感性均不稳定,不能作为确诊标准<sup>[17]</sup>。已知附红细胞体种类有 10 余种,而目前 GenBank 中只收录了猪、牛、羊、猫、鼠 5 种动物附红细胞体的基因序列,所以 PCR 引物设计无法涵盖其他附红细胞体,并且在试验检测的一些问题尚未解决,所以尽管基因测序作为金标准,但对人类感染的诊断仍有其局限性。

根据感染性疾病诊断原则,在标本中清晰地观察到附红细胞体能作为诊断 EPE 的依据,王剑飏等<sup>[6]</sup>通过瑞氏-吉姆萨染色法以及吡啶橙荧光染色法检测体检健康人和白血病人以及肾移植患者各 50 名的附红细胞体感染率,表明吡啶橙荧光染色最适宜作为临床工作对附红细胞体的检测方法。

## 3 吡啶橙染色法的应用

吡啶橙是极灵敏的荧光染料,可对细胞中的 DNA 和 RNA 同时染色并显示不同颜色的荧光,其激发峰为 492 nm,荧光发射峰为 530 nm(DNA)、640 nm(RNA),它与双链 DNA 的结合方式是嵌入双链之间,而与单链 DNA 和 RNA 则由静电吸引堆积在其磷酸根上。在蓝光(502 nm)激发下,细胞核发亮绿色荧光(约 530 nm),核仁和胞质 RNA 发橘红色荧光(>580 nm),荧光的强度与核内 DNA 与浆内 RNA 的含量成正比关系,DNA 含量越多,荧光越黄越亮。吡啶橙的阳离子也可以结合在蛋白质、多糖和膜上而发荧光,但细胞固定可阻抑这种结合。

吡啶橙荧光染色具有检出率高、特异性强,不易受红细胞形态学变化所影响等特点,即使附红细胞体的数量较少,以常规染色法难以做出诊断的血液标本,使用吡啶橙染色时,呈现桔黄色的病原体极容易与暗绿色的背景区别开来,从而做出明确诊断。但由于吡啶橙染色,底物主要是 DNA 和 RNA<sup>[18]</sup>,故容易受到血液中有核细胞的影响,如网织红细胞、豪焦小体等,可能会出现假阳性<sup>[19]</sup>。

郑丽艳等<sup>[20]</sup>在对猪附红细胞体研究实验中,以 0.01 g 吡啶橙加入 0.05 mol/L, pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液 100 mL 配制吡啶橙染色液。染色方法是:将标本载玻片用甲醇液固定,待甲醇挥发干后,将玻片置于湿盒内,加适量吡啶橙染液,37℃,100 min;用 Ph 7.4 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)液冲洗后加 0.1 mol/L 氯化钙溶液分色 2 min,用 PBS 冲洗 2 次后在荧光显微镜下观察。以红细胞边缘出现淡绿色荧光小体者为阳性。实验对象为 20 例疑似 EPE 的患猪,吡啶橙染色阳性率为 85%,而 PCR 的阳性率为 80%。

王剑飏等<sup>[6]</sup>和 Groebel 等<sup>[21]</sup>EPE 的研究中则使用 0.25 μg/mL 的吡啶橙染色液,方法是取乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝全血,推血片 1 张,放入无水乙醇固定 5 min,晾干后使用

吡啶橙染色,避光放置 1 h 后用蒸馏水冲洗阴干,加 PBS 液,盖上盖玻片,在荧光显微镜下进行观察。如果在红细胞周围有不规则排列的黄绿色的荧光颗粒,则判断为阳性。该方法首次应用于人 EPE 的诊断。本组实验中以健康体检、白血病人、肾移植者各 50 名,吡啶橙荧光染色法的阳性率分别为 24%、62%、68%,而瑞氏-吉姆萨染色的阳性率分别为 32%、94%、88%,在瑞氏-吉姆萨染色中,变形的红细胞、染色剂等附着在红细胞上造成假阳性,甚至有可能因为推片出现假阳性,而吡啶橙荧光染色法却不会因此出现假阳性,从而吡啶橙荧光染色法更适合作为 EPE 的临床检测方法。

## 4 吡啶橙染色法的循证评价

**4.1 纳入标准** 研究对象为用吡啶橙荧光染色诊断红细胞体病;以 PCR 作为参考方法,并设正常阴性对照,测量指标包括敏感性、特异性,最后提供检测结果的四格表。

**4.2 排除标准** 排除研究结果中通过计算不能得到四格表原始数据的研究。

**4.3 方法** 以“EPE”、“附红细胞体”、“附红细胞体”、“吡啶橙荧光染色”、“吡啶橙”等为检索词检索维普中文期刊数据库、国内中国期刊全文数据库、万方数据库、中国生物医学文献服务系统数据库;以“Eperythrozoon”、“Eperythrozoonosis”、“EPE”、“acridine orange fluorescent”、“acridine orange fluorescence(ao-f) staining”、“ao-f staining”等为检索词检索中国生物医学文献服务系统数据库、Medline 数据库。所有数据库均检索至 2013 年 1 月,初步检索出中文文献 69 篇,外文文献 18 篇,经去重、阅读题名、摘要及全文,筛查吡啶橙染色法与 PCR 对比诊断附红细胞体的研究,最终纳入符合标准研究 2 篇<sup>[18,22]</sup>,使用 Meta-disc 软件合并分析,结果显示敏感性合并为 0.970[95%(0.096, 1.000)],特异性合并为 0.857[95%(0.000, 1.000)],阳性似然比为 1.595[95%(0.334, 7.620)],阴性似然比为 0.520[95%(0.072, 3.768)],诊断比值比合并为 3.073[95%(0.099, 94.894)],说明了吡啶橙染色法是高特异性、高敏感性的诊断性实验。

## 5 结 语

现有资料表明,在诊断 EPE 时,吡啶橙染色法有很高的诊断价值,值得推广。附红细胞体的病原体分类目前还不能统一,有待进一步研究<sup>[23]</sup>,也有待 GeneBank 数据库进一步完善附红细胞体的基因系列<sup>[6]</sup>。综合分析现有资料,目前吡啶橙染色法是一种特异性、敏感性均较高的染色诊断方法<sup>[24]</sup>,在附红细胞体感染数量较少的时候就能检查出来<sup>[25]</sup>。该方法的不足之处是以荧光染料染色的标本不易保存,难以作回顾性诊断。期待有更多研究,为临床 EPE 的及时诊断提供更好依据。

## 参考文献

- [1] 文海蓉,熊丽,吴景文,等.南昌地区人体附红细胞体流行病学调查[J].现代预防医学,2012,39(17):4361-4362.
- [2] 和春桐,丰永生,李玉兰,等.云南贡山附红体感染人群的流行病学调查[J].实用预防医学,2007,14(2):382-383.
- [3] 於雪琴,张小萍,王真瑜,等.青浦区人附红细胞体感染状况的调查[J].中国病原生物学杂志,2012,7(3):203-204+207.
- [4] 张敏娟,凌学静,冯月梅.银川市居民和门诊病人附红细胞体感染情况分析[J].宁夏医学院学报,2002,24(1):60-61.
- [5] 石泉贵,鞠明兵,陈洪章,等.高原人附红细胞体致家兔红细胞损伤的实验研究[J].国际检验医学杂志,2011,32(18):2079-2081.
- [6] 王剑飏,樊绮诗,倪麟,等.人附红细胞体感染实验诊断方法的建立[J].检验医学,2011,26(11):784-790.

- [7] 尚德秋,李兰玉,栾景辉,等. 附红细胞体感染人畜的流行病学调查[J]. 中华流行病学杂志,1995,17(3):143-146.
- [8] 石泉贵,李素芝,陈洪章. 高原人附红细胞体研究概况[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(20):2452-2455.
- [9] 邓水秋,余宗阳. 成人附红细胞体病误诊为鼻咽癌 1 例分析[J]. 中国误诊学杂志,2009,9(19):4660-4661.
- [10] 林乐生,于正翠,鞠涛,等. 人感染附红细胞体病的探讨[J]. 健康必读:下旬刊,2010,1(7):158.
- [11] 朱明,谢汉国,刘兰香,等. 成人附红细胞体病高热及腹泻一例[J]. 中华内科杂志,2005,44(10):793.
- [12] 朱明,谢汉国,刘兰香,等. 成人附红细胞体病致高热 2 例[J]. 罕少疾病杂志,2006,13(2):61-62.
- [13] 赵晓薇,巴彩凤. 附红细胞体病的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报,2007,23(10):1047-1049.
- [14] Nonaka N, Thacker BJ, Schillhorn van Veen TW, et al. In vitro maintenance of Eperythrozoon suis[J]. Vet Parasitol,1996,61(3/4):181-199.
- [15] 张守发,张国宏,宋建臣,等. 牛附红细胞体体外培养试验[J]. 中国兽医科技,2002,32(8):27-29.
- [16] 房春林,杨光友. 猪和兔附红细胞体的体外培养[J]. 中国兽医科技,2005,35(3):190-193.
- [17] 王柯棣,王章云. 附红细胞体病研究进展[J]. 教育教学论坛,2012(34):29-31.
- [18] Jasper DE, Jain NC. Histochemical observations on Mycoplasma after staining with acridine orange[J]. Appl Microbiol,1966,14(5):720-723.
- [19] 王天有,赵恒章. 附红细胞体病原学诊断方法的研究[J]. 安徽农业科学,2006,34(1):15-16,18.
- [20] 郑丽艳,张衍俊,常维山. 附红细胞体病瑞氏-姬姆萨、吡啶橙染色法及 PCR 检测法的比较研究[J]. 中国人兽共患病学报,2006,22(3):243-245.
- [21] Groebel K, Hoelzle K, Wittenbrink MM, et al. Mycoplasma suis invades porcine erythrocytes[J]. Infect Immun,2009,77(2):576-584.
- [22] 张伟,刁有祥,臧大鹏,等. 犬附红细胞体病 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 西南师范大学学报:自然科学版,2009,34(1):67-71.
- [23] 罗锋,韦进钟,卢庆. 附红细胞体病的病原生物学与诊断研究进展[J]. 中国动物检疫,2009,26(1):65-68.
- [24] 路义鑫,宋铭哲,王君伟. 奶牛附红细胞体病三种检测方法的比较研究[J]. 东北农业大学学报,2006,37(6):783-787.
- [25] Brun-Hansen H, Grønstøl H, Waldeland H, et al. Eperythrozoon ovis infection in a commercial flock of sheep[J]. Zentralbl Veterinärmed B,1997,44(5):295-299.

(收稿日期:2013-06-13)

• 综 述 •

## 细菌性阴道病实验检测方法研究进展

林子刚,徐瑞宏,李晶晶,汪 丹 综述;刘利利<sup>△</sup>审校  
(中国人民解放军第四二一医院皮肤科,广东广州 510318)

**关键词:** 阴道病,细菌性; 实验检测; 进展

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2013.23.042

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2013)23-3195-03

细菌性阴道病(BV)是育龄妇女最常见的阴道感染性疾病,与阴道内微生态平衡失调相关,患者阴道内乳杆菌减少,尤其是产过氧化氢乳杆菌减少,而阴道加德纳菌、阴道阿托波菌、动弯杆菌、人型支原体以及其他厌氧菌的异常增多<sup>[1-2]</sup>。BV与妇科手术感染、胎膜早破、自然流产、早产、绒毛膜炎、产褥感染、宫颈上皮细胞内瘤样变等发生相关,可增加人类免疫缺陷病毒(HIV)感染概率。另外,BV患者中交叉感染支原体、真菌、滴虫非常普遍<sup>[3]</sup>。因此,BV的检测对女性生殖系统疾病的诊断和防治具有重要的意义。

### 1 BV 诊断标准

Amsel 法为目前临床诊断 BV 的金标准<sup>[4]</sup>,以下 4 个临床标准符合 3 个即可诊断为 BV:(1)阴道 pH>4.5;(2)阴道分泌物增多、变稀呈均质状、有异味;(3)胺试验阳性;(4)线索细胞(cluecell)阳性,Amsel 法是临床诊断 BV 最常用的方法,此法简单易行,但临床无症状的患者不能用此法诊断 BV,同时 Amsel 法易受人为因素与 BV 感染无关因素(如近期性交,滴虫感染,阴道灌洗,处于月经期或绝经后)等诸多因素的影响,主观性强。因此,临床医生多采用改进的或 Amsel 标准中的部分标准组合来诊断 BV<sup>[5]</sup>。

### 2 BV 实验诊断

#### 2.1 革兰染色法

**2.1.1 Nugent 革兰染色法** 该法由 Nugent 等<sup>[6]</sup>于 1991 年首先提出,为实验室诊断 BV 的“金标准”。根据正常人和 BV 患者阴道分泌物中的优势菌形态用半定量评估法对分泌物标本进行评分。3 组优势菌是:乳杆菌(大型革兰阳性杆菌)、阴道加德纳菌或拟杆菌形态(革兰染色变异或阴性球杆菌)和动弯杆菌(革兰染色变异弯曲弧形杆菌)。根据每个视野细菌数量的多少换算成积分(0~10 分),标本总分值是 3 组细菌形态分值之和,BV 患者标本分值为 7~10 分。将阴道菌群分为正常态(0~3 分)、过渡态(4~6 分)和 BV 态(7~10 分)。

**2.1.2 Hay-Ison 革兰染色法** 2002 年由 Ison 等<sup>[7]</sup>提出的微生物菌群分级系统能够更好地在革兰染色基础上对 BV 阴道微生物菌群进行评估,且与 Amsel 诊断标准和其他评分系统有良好的相关性,此法已经得到英国性健康和艾滋病协会(BASHH)的认可,2011 年世界卫生组织欧洲阴道炎管理指南将其列为 BV 实验室诊断标准之一<sup>[8]</sup>。该方法将阴道微生物菌群分为 5 级:(1)0 级,与 BV 无关,仅有上皮细胞存在,无乳酸杆菌;表明近期有过抗菌药治疗。(2)1 级(正常菌群),乳酸菌微生物形态占优势。(3)2 级(过渡态),乳酸杆菌和加德纳菌、动弯杆菌微生物形态并存的混合菌群。(4)3 级(BV),加德纳菌或者动弯杆菌微生物形态占优势,线索细胞存在。乳酸