

- [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[△]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^[1-2]。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^[3]。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^[4],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^[5]。

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^[6]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^[7]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^[8]。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

杆菌数量很少或无。(5)4 级,和 BV 无关,只有革兰阳性球菌存在,无乳酸杆菌存在(需氧性阴道炎微生物菌群)。该方法是通过对镜下细胞所占百分比的估计,而并非如 Nugent 评分法对镜下细胞数目的计算。

2.2 阴道液细菌培养 传统的培养方法已经鉴定出大量和 BV 相关的细菌,包括:阴道加德纳菌、普氏菌、革兰阳性厌氧球菌、动弯杆菌及人型支原体等^[9]。BV 患者培养可分为加德纳菌培养和阴道菌群综合培养,阴道加德纳菌于正常健康女性阴道中检出率较高,对 BV 的诊断缺乏特异性,其他如拟杆菌、厌氧菌及粪链球菌的培养,较之加德纳菌对于 BV 诊断特异性较好,但敏感性差。培养方法虽然是一种非常有用的检测微生物的工具,但并不能检测出许多与 BV 有关苛养菌,且 BV 是由于菌群失调引起,细菌分离培养在 BV 诊断中意义不大。分子生物学技术广泛应用拓宽了与 BV 相关的微生物菌谱,包括加德纳菌、阿托波菌、BV 相关细菌、巨型球菌、动弯杆菌等,且与 BV 相关的细菌已有研究证实能在阴道上皮上形成一种多种微生物相互依存的生物膜^[10]。一些学者提出采用基于分子生物学研究的新的诊断工具^[11]。

2.3 分子生物学方法 基于 16S rRNA 基因聚合酶链反应(PCR)扩增是目前最常用的检测阴道微生物的分子生物学方法。而最常用于微生物分类的 PCR 产物的分离方法包括,(1)PCR 与变性梯度凝胶电泳分析(DGGE)相结合的技术:根据不同的 PCR 产物(包含不同的序列)在不同浓度的变性剂中电泳迁移率的不同,从而将 PCR 产物在变性凝胶条件下分离成不同的片段,主要用于检测到环境中优势菌群的存在。Reid 等^[12]采用 PCR-DGGE 技术对绝经前期女性阴道定居菌研究结果显示,19 例患者中的其中 15 例女性乳酸杆菌的序列分析有高度同源性。(2)末端限制性片段长度多态性技术(T-RFLP)分析:设计带有荧光物质的 PCR 引物,PCR 扩增产物酶切后,通过检测末端带有荧光标记的片段来反映微生物群落组成情况。Yamamoto 等^[13]利用 PCR 扩增结合 T-RFLP 技术,对健康女性阴道微生物群落结构进行分析表明,绝大多数研究对象阴道微生物以乳杆菌为优势菌,其中以惰性乳杆菌、格氏乳杆菌、詹氏乳杆菌和卷曲乳杆菌最常见。(3)核糖体 DNA 扩增片段限制性内切酶分析法(ARDRA):用限制性内切酶消化扩增后的细菌 16S rDNA,通过凝胶电泳分析微生物种群多样性的分子标记技术,这种方法可在短时间内确定细菌的种类和估算出细菌种群数目^[14]。(4)Roche 454 焦磷酸测序法:目前有几种用于分析 PCR 产物的高通量测序平台,但一般读长较短,对于复杂的微生物种系分析不是最佳方法,Roche 454 高通量测序平台对 PCR 扩增产物测序较长,能够更好地进行微生物种系的分析和鉴别^[15]。此外,还有实时荧光定量 PCR(FQ-PCR)、荧光原位杂交技术、DNA 微阵列芯片技术等也逐步开始用于阴道微生物的研究中。利用分子生物学技术可以更加客观、全面地认识阴道微生物种类、数量、分布,探究与 BV 相关的微生物,为临床治疗 BV 和降低 BV 的复发提供依据。

2.4 BV 快速检测法 目前国、内外利用即时的 BV 诊断工具快速检测阴道分泌物中高浓度的加德纳菌或者各种显著的胺类实验,包括唾液酸酶、三甲胺、脯氨酸氨基肽酶,或者联合的 pH 值和胺实验测定^[16]。唾液酸酶法诊断 BV 从 2004 年开始被卫生专业人员在市面上广泛应用,有报道其敏感性和特异性分别达到 90% 和 95%^[17-18],Briselden 等^[19]发现在阴道微生物菌群中,拟杆菌和普雷沃菌是唾液酸酶活性增加的主要病原菌,而加德纳菌、消化链球菌属、动弯杆菌以及人型支原体的存

在与此酶活性无关。而 McGregor 等^[20]在一项研究中发现,加德纳菌、动弯杆菌、沙眼衣原体、酵母菌以及人型支原体与唾液酸酶活性有关,没有具体指出普氏菌或其他厌氧细菌与 BV 的相关性。由于 BV 是多种厌氧细菌增多引起的阴道微生态系统失调,单纯依靠检测分泌物中唾液酸酶的活性,必然会导致漏检其他厌氧细菌增多引起的 BV。脯氨酸氨基肽酶是 BV 相关病原体所分泌的特异性标志酶,由阴道加德纳菌、动弯杆菌和普雷沃菌产生,故阴道分泌物中存在脯氨酸氨基肽酶活性即可诊断 BV^[21]。而 Alexander 等^[21]研究表明,隐蔽拟杆菌、解肝素普雷沃菌和动胶普雷沃菌无脯氨酸氨基肽酶活性。因此,对于单纯由于拟杆菌和普雷沃菌增多引起 BV,该方法从原理上来说存在灵敏度缺陷。BV 相关致病性厌氧菌代谢产生的三甲胺、精胺、尸胺等多胺是 BV 患者阴道分泌物产生腥臭味和 pH 值升高的主要原因,其中最主要的是三甲胺。传统的胺试验敏感度低,受检验人员的主观影响较大,国外有学者报道采用 V-test 离子迁移谱方法能快速检测阴道分泌物中的三甲胺水平^[22]。国内有学者对传统的胺试验进行了改良,采用复式膜技术,报道该法诊断 BV 的敏感性为 92.5%,特异性为 70.0%^[23]。Posner 等^[24]采用 FemExam 测试卡对阴道分泌物的 pH 值和胺联合检测发现此法与革兰染色法相比,特异性较高敏感度稍低,但在设备与实验人员匮乏的地区不失为一种适宜的检测方法。

3 展 望

随着对细菌性阴道病研究的不断深入,产生了各种检测方法,目前 Amsel 法和 Nugent 革兰染色法虽然具有操作费时、客观和主观因素的影响较大等缺点,但是仍为当前国内外诊断细菌性阴道病的金标准。而唾液酸酶法、脯氨酸氨基肽酶活性检测法、胺试验法、pH 检测等临床应用较广泛,对实验室条件要求不高,且随着各种试剂盒的研制问世,检测更加简便快捷,尽管这些测试的易用性,但临床医生不能够根据患者的不适症状给出特异性诊断,通常不恰当的根据临床综合症状给予治疗^[17]。分子生物学法虽然敏感性和特异性均较高,但是对实验室条件和检验人员的专业素质要求较高,且因为阴道微生物菌群的复杂性以及分子生物学技术的目前发展的局限性,是否将作为标准的诊断工具尚未定论。

参考文献

- [1] Leitch H, Bodner-Adler B, Brunbauer M, et al. Bacterial vaginosis as a risk factor for preterm delivery: a meta-analysis[J]. Am J Obstet Gynecol, 2003, 189(1): 139-147.
- [2] Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis[J]. N Engl J Med, 2005, 353(18): 1899-1911.
- [3] 吴晓宁, 黄燕, 韦惠如. 细菌性阴道病交叉感染的调查[J]. 广西医学, 2008, 30(1): 50-51.
- [4] Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, et al. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations[J]. Am J Med, 1983, 74(1): 14-22.
- [5] West B, Morison L, Schim van der Loeff M, et al. Evaluation of a new rapid diagnostic kit(FemExam) for bacterial vaginosis in patients with vaginal discharge syndrome in The Gambia[J]. Sex Transm Dis, 2003, 30(6): 483-489.
- [6] Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation[J]. J Clin Microbiol, 1991, 29(2): 297-301.

- [7] Ison CA, Hay PE. Validation of a simplified grading of Gram stained vaginal smears for use in genitourinary medicine clinics[J]. Sex Transm Infect, 2002, 78(6): 413-415.
- [8] Sherrard J, Dongers G, White D, et al. European guideline for the management of vaginal discharge[J]. Int J STD AIDS, 2001, 12 Suppl 3: S73-77.
- [9] Hillier SL, Krohn MA, Rabe LK, et al. The normal vaginal flora, H₂O₂-producing lactobacilli, and bacterial vaginosis in pregnant women[J]. Clin Infect Dis, 1993, 16 Suppl 4(Suppl 4): S273-281.
- [10] Swidsinski A, Mendling W, Loening-Baucke V, et al. An adherent Gardnerella vaginalis biofilm persists on the vaginal epithelium after standard therapy with oral metronidazole[J]. Am J Obstet Gynecol, 2008, 198(1): 97. e1-97. e6.
- [11] Lamont RF, Sobel JD, Akins RA, et al. The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques[J]. BJOG, 2011, 118(5): 533-549.
- [12] Reid G, Bruce AW, Fraser N, et al. Oral probiotics can resolve urogenital infections[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2001, 30(1): 49-52.
- [13] Yamamoto T, Zhou X, Williams CJ, et al. Bacterial populations in the vaginas of healthy adolescent women[J]. J Pediatr Adolesc Gynecol, 2009, 22(1): 11-18.
- [14] Rajendhran J, Gunasekaran P. Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond[J]. Microbiol Res, 2011, 166(2): 99-110.
- [15] Spear GT, Sikaroodi M, Zariffard MR, et al. Comparison of the diversity of the vaginal microbiota in HIV-infected and HIV-uninfected women with or without bacterial vaginosis[J]. J Infect Dis, 2008, 198(8): 1131-1140.
- [16] Myziuk L, Romanowski B, Johnson SC. BVBlue test for diagnosis of bacterial vaginosis[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(5): 1925-1928.
- [17] Bradshaw CS, Morton AN, Garland SM, et al. Evaluation of a point-of-care test, BVBlue, and clinical and laboratory criteria for diagnosis of bacterial vaginosis[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(3): 1304-1308.
- [18] Hillier SL. Diagnostic microbiology of bacterial vaginosis[J]. Am J Obstet Gynecol, 1993, 169(2 Pt 2): 455-459.
- [19] Briselden AM, Moncla BJ, Stevens CE, et al. Sialidases(neuraminidases) in bacterial vaginosis and bacterial vaginosis-associated microflora[J]. J Clin Microbiol, 1992, 30(3): 663-666.
- [20] McGregor JA, French JI, Jones W, et al. Bacterial vaginosis is associated with prematurity and vaginal fluid mucinase and sialidase: results of a controlled trial of topical clindamycin cream[J]. Am J Obstet Gynecol, 1994, 170(4): 1048-1059.
- [21] Alexander CJ, Citron DM, Hunt Gerardo S, et al. Characterization of saccharolytic Bacteroides and Prevotella isolates from infected dog and cat bite wounds in humans[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(2): 406-411.
- [22] 罗招凡, 王惠英, 丁红, 等. 改良胺试验诊断细菌性阴道病的临床应用评价[J]. 国际医药卫生导报, 2007, 13(3): 73-74.
- [23] West B, Morison L, Schim van der Loeff M, et al. Evaluation of a new rapid diagnostic kit(FemExam) for bacterial vaginosis in patients with vaginal discharge syndrome in The Gambia[J]. Sex Transm Dis, 2003, 30(6): 483-489.
- [24] Posner SF, Kerimova J, Aliyeva F, et al. Strategies for diagnosis of bacterial vaginosis in a resource-poor setting[J]. Int J STD AIDS, 2005, 16(1): 52-55.

(收稿日期: 2013-07-14)

• 综 述 •

循环 DNA 在肺癌早期诊断中的研究进展

金 萍¹综述, 韩崇旭^{2△}审校

(1. 扬州大学医学院; 2. 扬州大学临床医学院, 江苏扬州 225001)

关键词: 肺肿瘤; 早期诊断; 循环 DNA; 循环 RNA

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 23. 043

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)23-3197-03

肺癌是目前世界范围内最常见的恶性肿瘤之一, 在人类癌症发病率和病死率排行中居首位。据统计, 2008 年, 全世界约有 160 万人被确诊为肺癌, 占有肿瘤发生的 13%, 同时约有 140 万人死于肺癌, 占有肿瘤死亡人数的 18%^[1]。由于缺乏有效的肺癌早期检测手段, 3/4 的患者在确诊时已发生远处转移, 造成当今世界范围内肺癌的低存活率。目前, 肺癌患者的 5 年存活率仅约 15%, 若能在早期检测到肺癌病变, 患者 5 年存活率可超过 60%^[2]。因此, 需要发展新的经济有效的早期诊断方法, 提高肺癌患者的生存率。

循环 DNA 主要是由单链或双链 DNA 以及单链与双链 DNA 的混合物组成的一种无细胞状态的胞外 DNA, 存在于血液(血清或血浆)、滑膜液等体液中, 主要以 DNA-蛋白质复合物的形式存在, 但也存在着部分游离的 DNA^[3]。目前研究人员对循环 DNA 的检测主要分为定量和定性两种: 前者检测血

清或血浆中的 DNA 含量, 后者着重于血清或血浆中肿瘤特异性基因的改变。本文就上述两种检测方法在肺癌早期诊断中的研究进展综述如下。

1 循环 DNA 定量检测对肺癌早期诊断的意义

正常情况下, 衰老细胞死亡后释放的 DNA 是循环 DNA 的主要来源, 它的生成和清除处于低水平的动态平衡。机体的异常(如肿瘤的发生、感染性疾病、严重外伤等)将导致外周血循环 DNA 量的改变。有研究显示, 肿瘤患者循环 DNA 的含量是健康人的 10 倍以上^[4]。所以, 有效的循环 DNA 定量检测对疾病的发生、发展有着重要的临床意义。目前, 实时定量 PCR 技术相对于传统方法有着高精度、高灵敏性等优点, 已成为循环 DNA 定量的主流技术。Szpechcinski 等^[5]报道用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)所研究的 30 例未经治疗的非小细胞肺癌(NSCLC)患者和 16 例健康成人中, 健康成人的循环