

生殖道感染的实验室检测方法

Laboratory Tests for the Detection of Reproductive
Tract Infections

陈祥生 尹跃平 译 徐文严 校

STI

HIV



人民卫生出版社

113488

生殖道感染的实验室检测方法

Laboratory Tests for the
Detection of Reproductive
Tract Infections

陈祥生 尹跃平 译

徐文严 校



人民卫生出版社

解放军医学图书馆(书)



C0210278

生殖道感染的实验室检测方法

1999 年由世界卫生组织出版

本书经世界卫生组织授权翻译成中文版

E204/22

© 世界卫生组织 1999

根据《世界版权公约》第二条规定, 世界卫生组织出版物享有版权保护。版权所有, 不许翻印。

本出版物采用的名称和陈述的材料, 并不代表世界卫生组织秘书处关于任何国家、区域、城市或地区或其当局, 或关于国界或边界划分方面的任何观点。

本出版物中提及的某些公司或某些制造商的产品, 并不意味着比其他未提及的同类公司或产品优先得到世界卫生组织的认可或推荐。为避免差讹和遗漏, 专利产品第一个字母均用大写字母以示区别。

生殖道感染的实验室检测方法

译者: 陈祥生 尹跃平

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 67616688)

地址: (100078)北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

网址: <http://www.pmph.com>

E-mail: pmph@pmph.com

印刷: 北京人卫印刷厂

经销: 新华书店

开本: 850×1168 1/32 印张: 2

字数: 42 千字

版次: 2001 年 3 月第 1 版 2001 年 3 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 7-117-04234-6/R·4235

定价: 9.00 元

著作权所有, 请勿擅自用本书制作各类出版物, 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

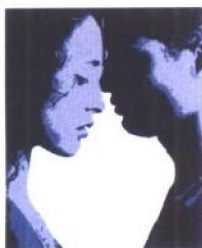
缩 略 语

BV	细菌性阴道病
DFA	直接免疫荧光法
DNA	脱氧核糖核酸
dNTP	脱氧核苷三磷酸
dUTP	脱氧尿苷三磷酸
EDTA	乙二胺四乙酸
EIA	酶免疫测定
ELISA	酶联免疫吸附试验
FTA-ABS	荧光螺旋体抗体吸收试验
GAC-EIA	IgG 抗体捕获 EIA
HIV	人类免疫缺陷病毒
HPV	人类乳头瘤病毒
HSV	单纯疱疹病毒
IQS	内参照定量标准
LCR	连接酶链反应
LE	白细胞酯酶试验
LIA	线性免疫法
LPS	脂多糖
MHA-TP	梅毒螺旋体微量血凝试验
NASBA	核酸序列扩增反应
PCR	聚合酶链反应
RNA	核糖核酸
RPR	快速血浆反应素试验

RTI	生殖道感染
STI	性传播感染
STD	性传播疾病
TMA	转录介导的扩增反应
UNG	尿嘧啶-N-糖基化酶
VDRL	性病研究实验室试验
WB	蛋白印迹法

致 谢

世界卫生组织西太平洋地区办事处对本手册的主要撰写者 J Kuyper 女士，以及审阅者 P Rowe 博士、P Shrestha 博士、S Lazarri 博士、Yoke-Fong Chiew 博士和 SM Garland 博士表示感谢。



生殖道感染的实验室检测方法

Laboratory Tests for the Detection of Reproductive Tract Infections

NIH/ITS

目 录

缩略语	iii
致 谢	v
1 引 言	1
2 特定疾病的实验室检测	4
念珠菌病	4
滴虫病	7
细菌性阴道病	10
衣原体病	13
淋病	18
梅毒	22
生殖器疱疹	26

软下疳	28
杜诺凡病	30
人类乳头瘤病毒	32
人类免疫缺陷病毒	35
3 分子学检测方法注释	38
4 参考文献	46

1 引言



对于以下方面需要应用有效的实验室手段：

- 在实验室条件能够提供且易及的情况下，对可疑的生殖道感染 (RTI) 进行确诊；
- 在无症状个体中发现感染；
- 调查对常规治疗产生耐药的病例；
- 监测病原菌对抗生素敏感性的变化趋势；以及
- 开展 STI 患病率和发病率的研究。

用于诊断感染的最佳实验室方法应该是操作简便、敏感、特异、可重复、客观、快速和价廉，以及不需要特殊的仪器。

近年来，应用先进的分子生物学技术已经开发了多种检测 RTI 的新方法。这些新方法中的一部分已经满足了最佳检测方法的多项标准，并且已经改进了 RTI 的诊断。另一方面，那些比较老的标准化的方法仍然有效，并且仍应继续应用。

分子检测技术并不依赖于培养的能力或直接观察完整的病原体，而是被设计用来检测特定的细胞抗原或核酸。因此，对于临床标本不再需要严格的运送要求。可以检测标本中的存活和非存活的微生物。分子检测方法的开发使得能够应用同一份标本或在一种检测方法中检测多种病原体，以及检测方法的自动化。由于新开发的核酸扩增系统具有非常高的敏感性，因此，在这些方法中可以采用通过无创性方法收集的标本，包括病人自采的标本和收集的尿液。此外，有些方法可以用来测定标本中核酸拷贝的数量。在分子学检测方法注释中详细介绍了用于检测 RTI 的分子学方法的一般技术。

本书讨论了检测 11 种 RTI 的主要方法。所有这些方法归纳为 7 类，包括病原微生物的直接显微镜检查、代谢产物的检测、培养、特定抗体、抗原、DNA 或 RNA 的检测。并非各种检测方法都能检测出所有的病原体，以及并非所有的实验室都能开展各种检测。因此，这里总结了检测各种病原菌最常用的方法，以及它们的标本收集步骤、实验室检测的敏感性、特异性、优缺点、适用于哪一级实验室、需要作什么培训及所需的设备、操作的难易程度、试剂费用（美国目前的价格）。

有关操作各项试验的详细说明见附在各种检测试剂盒内的生产厂家手册，并且应该严格遵

循。一种检测方法的敏感性和特异性将根据使用的标准方法以及受检人群的疾病患病率而有所不同。本书中有关方法的敏感性和特异性指标是基于多种不同来源的数值范围，包括各类患病人群。

2 特定疾病的实验室检测

念珠菌病



念珠菌是正常阴道菌群中可见的一种常见共生酵母菌。绝大多数念珠菌定植的妇女无感染症状，而在部分人群中，这种定植可以发展为有症状的疾病。在症状不典型的病人中往往需要实验

室进行念珠菌病的确诊。感染通常（但不一定）与酵母菌数量的增加和存在菌丝相以及炎症反应（多形核白细胞）有关。正常菌群、革兰氏染色阳性的乳酸杆菌和假白喉菌属是一直存在的。然而，病原体的数量与感染之间的关系尚不明确^[1]。

检测方法

显微镜检查

将阴道分泌物的拭子置于生理盐水中，在玻片上滴上一滴，并与一滴氢氧化钾溶液混合，立即进行酵母菌的镜检。氢氧化钾溶解了标本中患

者的细胞,使得酵母菌易于观察。也可以将拭子在玻片上转动,固定并进行革兰氏染色。这种玻片不一定需要立即染色和镜检。上述两种玻片均在光学显微镜 (400×) 下检查酵母菌或其菌丝型,以及炎症反应。

培养法检测 阴道分泌物的拭子或阴道冲洗液标本在采集后的数小时内接种到萨布罗 (Sabouraud) 琼脂上,并在 37℃ 下孵育约两天。通过革兰氏染色方法鉴定酵母菌的菌落 (念珠菌在马血琼脂上也生长,形成灰白色菌落)。进行酵母菌的计数,每 ml 阴道分泌物中的集落生成单位在 10^3 以上时通常与疾病有关。

念珠菌抗原的检测 将阴道分泌物拭子或一滴阴道冲洗液在玻片上与已商品化的乳胶小珠溶液混合,后者包被有抗甘露聚糖抗体。甘露聚糖是一种可溶性多糖,为念珠菌细胞壁的主要成分,在阴道内出现念珠菌时可见。观察抗原-抗体复合物形成的悬浮性凝集。需要应用阳性和阴性对照。

念珠菌 DNA 的检测 一种已商品化的 40 分钟非同位素的自动检测方法^[2]是应用 DNA 探针直接检测阴道拭子标本中的念珠菌、毛滴虫和加德纳 (Gardnerella) 菌的杂交方法 (注释 1)。使用拭子采集样本,置于试剂盒所提供的标本收集管中,保存于 4℃,并在 24 小时内检测。

表 1 念珠菌检测方法的特点

	显微镜 湿片检查	培 养 >10 ³ cfu/ml	抗原检测	DNA 检测
敏感性 ¹	35%~45%	67%	61%~81%	80%
特异性 ¹	99%	66%	97%	98%
优点	快速、廉价	敏感	快速, 同时 检测滴虫	快速、客观, 同 时检测滴虫和加 德纳菌
缺点	主观	需要 24 小时	价格昂贵	昂贵, 需要特殊 的仪器设备并在 实验完成后立即 检测
实验室级别	检查室, 现场实验 室	初级实验室, 中等实验室	检查室, 初级 实验室	中级实验室, 参 比实验室
培训	中等	中等	初级	中等
设备	光学显微镜	孵箱, 光学显 微镜	无	加热器, 特殊处 理器
操作难易程 度	容易	中等	容易	容易到中等, 自 动化
费用	1 美元	2 美元	12 美元 (包括毛滴虫 检测)	12 美元 (包括毛滴虫和 加德纳菌检测)

¹敏感性和特异性是对外阴阴道念珠菌病的体征和症状而言。

滴虫病

阴道毛滴虫是引起阴道炎症的一种寄生性原虫。毛滴虫的感染可以表现为伴有阴道分泌物的严重性阴道炎，也可以是无症状的携带者。由于无症状携带者的比例可以高达 50%，因此其诊断不能单纯依赖临床表现^[3]。有必要进行该寄生虫的实验室检测来确诊。

检测方法

显微镜检查 将后穹隆部采集的阴道分泌物置于生理盐水中，并立即在光学显微镜 (100×) 下观察。可在显微镜下直接观察到具有运动性特征的寄生虫。

培养法检测 阴道后穹隆部采集的分泌物拭子在采样的 6 个小时内接种到 Diamond 改良培养基的试管中。在 35℃ 下孵育培养至 4 天，每天应用湿片法检查活动性毛滴虫。目前有一种两室袋 (two-chambered bag) 的培养系统，在拭子接种后，该系统可以通过其本身的上部培养室进行培养物的孵育，并应用显微镜进行湿片的及时检查^[4]。

阴道毛滴虫抗原的检测 应用毛滴虫直接酶免疫法和荧光直接免疫法检测阴道毛滴虫抗原。阴道分泌物拭子在玻片上转动，并在检查室内晾干。在 1 小时实验过程中，在玻片上加过氧化酶混合物或荧光素标记的

抗各种阴道毛滴虫抗原的单克隆抗体, 孵育、冲洗, 并通过可变色或发出荧光的底物进行检测。对于比色检测的方法是在光学显微镜下观察玻片, 而对荧光检测方法则在荧光显微镜下观察。

另一种方法是应用阴道分泌物拭子或一滴阴道冲洗液在玻片上与商品化提供的、包被有抗阴道毛滴虫抗体的胶乳小珠溶液混合。观察抗原-抗体复合物形成的悬浮性凝集。

阴道毛滴虫 DNA 的检测 一种商品化的 40 分钟非同位素的自动杂交检测方法^[2]是应用 DNA 探针直接检测阴道拭子标本中的念珠菌、毛滴虫和加德纳菌 (注释 1)。使用拭子采集标本, 置于试剂盒所提供的标本收集管中, 保存于 4℃, 并在 24 小时内检测。

阴道毛滴虫 DNA 的扩增与检测 该方法尚未商品化^[5]。可用自我采样的拭子在阴道口采样或通过病人自己将棉塞 (商品化的阴道棉条) 插入阴道并立即取出这样的技术收集标本。该标本放入运送培养液中, 并在标本采集后的 1 个月内检测。从标本中提取 DNA, 并加到聚合酶链反应 (PCR) 混合液 (注释 2) 中, 该混合液中含有能够扩增阴道毛滴虫 DNA 之 102bp 片段的两种引物 TVA5 和 TVA6。在扩增过程中, 特异的阴道毛滴虫 DNA 片段被标记, 并应用 TVB 探针的 DNA 杂交方法检测, 这是一种用于检测 PCR 扩增产物的半自动化 ELISA 方法 (注释 3)。

表 2 毛滴虫检测方法的特点

	显微镜	培 养	抗原检测	DNA 检测	
				杂交方法	PCR
敏感性 ¹	38%~82%	98%	86%	88%~91%	93%
特异性 ¹	100%	100%	99%	100%	96%
优点	快速、廉价	敏感, 用于男病人诊断	快速	快速、客观, 同时检测加德纳菌和念珠菌	非常敏感, 病人可以自己采样
缺点	敏感性低, 必须立即观察, 主观	需要 1~4 天	价格昂贵	价格昂贵, 需要特殊的仪器设备并在实验完成后立即读结果	价格昂贵, 需要一定的经验和技巧
实验室级别	检查室, 现场实验室	现场实验室, 中等实验室	检查室, 现场实验室	中等, 高一级的实验室	高一级的实验室
培训	中等	中等	中等/初级	中等	范围广泛
设备	光学显微镜	孵箱, 光学显微镜	光学或荧光显微镜/无	加热器, 特殊处理器	热循环仪, 酶标仪
操作难易程度	容易	容易	中等/容易	容易至中等, 自动化	复杂, 自动化
费用	1 美元	3 美元	6~12 美元 (包括念珠菌检测)	12 美元 (包括念珠菌和加德纳菌检测)	11 美元

¹ 敏感性和特异性是对湿片加培养的结果诊断滴虫性阴道炎而言。