

# 阴道毛滴虫病检测方法的研究进展

谢辉, 帖超男 综述, 王雅静\* 审校

中图分类号: R382.211

文献标识码: A

阴道毛滴虫(*Trichomonas vaginalis*, TV)是寄生在人体泌尿生殖道的一种常见病原体,可引起阴道毛滴虫病(trichomoniasis)。自1836年首次描述该虫的特点及所致疾病的症状以来<sup>[1]</sup>,至今仍是威胁人类健康的主要的性传播疾病(sexually transmitted disease, STD)之一<sup>[2]</sup>。该病呈全球性分布,人群普遍易感。在女性,除主要引起滴虫性阴道炎外,还与许多围产期并发症相关。TV感染与子宫颈癌可能相关,据Zhang等<sup>[3]</sup>调查,我国4%~5%的子宫颈癌是由于TV感染所致。阴道毛滴虫感染也是引起不孕症的原因之一。在男性,可引起滴虫性疾患(包括尿道炎、前列腺炎、附睾炎及不育等)<sup>[4]</sup>。TV感染是增加人类免疫缺陷病毒(HIV)感染的因素<sup>[5]</sup>。

涂片法、细胞培养、免疫学技术、核酸分子杂交以及聚合酶链反应(PCR)等许多方法已用于TV的实验室检测。本文对TV检测方法研究进展情况综述如下。

## 1 病原学诊断

1.1 生理盐水直接涂片法(湿片法) 取阴道后穹窿分泌物、尿液沉淀物或前列腺液,用生理盐水直接涂片,湿片镜检。此法是诊断滴虫病的传统方法,操作简便、快速,为临床常用的方法。但该方法只能检测活虫,虫体易与白细胞相混淆,检测结果与操作人员技术熟练程度有关,该法敏感度为35%~80%<sup>[1,6,7]</sup>。

1.2 PAP涂片法 PAP(papanicolaou-stained smears)涂片法为妇科检查滴虫病的细胞学常规诊断方法。Krieger等<sup>[1]</sup>比较了湿片法、PAP涂片法、培养法、直接免疫荧光法。共检测600人次,与培养法阳性的88例相比,PAP涂片法的敏感度为56%,其中7例为假阳性,另18例为可疑阳性。认为PAP涂片法在性病流行的人群中有应用价值,但在湿片法检查为阴性的滴虫感染病例中,其敏感度仅14%,故应用PAP涂片法应谨慎。Thomason等<sup>[6]</sup>比较了湿片法,两种培养法[Kupferberg液体培养基(Kupferberg liquid medi-

um)、Hirsch碳琼脂(Hirsch charcoal agar)]以及PAP涂片法,检测88例门诊性病妇女,湿片法和培养法有37例阳性,阳性率为42%,PAP涂片法仅26例阳性,阳性率为34%,认为PAP法不是较敏感的检测方法。

1.3 其他染色方法 包括吉氏液、瑞氏液及吡啶橙染色法等,这些染色方法与PAP涂片法的敏感性相似。

1.4 培养法 培养法的敏感性高,被认为是检测滴虫病的最敏感的方法,先后有数种培养基问世。Diamond培养基曾被誉检测TV的“金标准”<sup>[7]</sup>。Schmid等<sup>[8]</sup>曾对当时的6种培养基进行了比较,检测375份临床标本,结果显示Diamond与改良Diamond培养基的敏感性比较差异无显著性,优于其余4种培养基,敏感度分别为97%和90%;3种配方的Kupferberg's培养基(Kupferberg trichosel, Kupferberg STS, difco Kupferberg)敏感度分别为75%、49%及42%,前者优于后两者。还有一种名为Lash的培养基敏感度为54%。Gelbart等<sup>[9]</sup>比较了TV在改良Diamond培养基和Kupferberg's STS培养基中的生长情况,接种300个TV于改良Diamond培养基中,72h即繁殖了 $10^5$ 个病原体,在短时间内即可繁殖大量原虫,表明改良的Diamond培养基更适用于检测TV。

还研制了一些其他培养基,如改良的thioglycolate培养基<sup>[7]</sup>和InPouch TV。商品化的培养试剂盒(InPouch TV培养基,美国BioMed Diagnostics公司生产),培养效果较为理想,标本接种于上层袋中,可立即用显微镜检测其活动性,阳性即可确诊;如果阴性,标本则进入下层进一步培养<sup>[10]</sup>。Levi等<sup>[11]</sup>比较了InPouch和改良Diamond培养基,共检测715份阴道分泌物标本,两种方法敏感性差异无显著性,80%阳性标本均能在24h检出。Barenfanger等<sup>[10]</sup>研究了关于标本接种于InPouch TV培养基时的时间控制问题,结果表明:标本先接种于上层,阴性标本再接种于下层袋中,这与标本直接接种于下层袋中所得结果的差异无显著性。该种培养方法敏感性高,操作简便,易于检测。另外,改良Columbia琼脂(MCA)等培养基也可使用<sup>[12]</sup>。虽然培养法敏感性较高,但因费时7d,每天都要检查,临床较少应用<sup>[13,14]</sup>。

作者单位:四川大学华西基础医学及法医学院寄生虫学教研室,成都610041

\* 通讯作者 E-mail: yjwang721@yahoo.com.cn



## 2 免疫学诊断

2.1 ELISA 祝红等<sup>[15]</sup>用抗 TV 单克隆抗体包被聚苯乙烯塑料板,检测阴道分泌物的 TV 抗原,加入兔抗 TV 多克隆抗体,再加入羊抗兔辣根过氧化物酶结合物,然后用酶标仪检测,ELISA 双抗体夹心法,可诊断 TV 可溶性抗原,敏感性好,特异性高。斑点-ELISA 可检测全虫抗原。

2.2 荧光抗体检测法 Krieger 等<sup>[11]</sup>应用异硫氰酸荧光黄结合的抗体检测临床标本,用荧光显微镜检查,其敏感度为 86%。Bickley 等<sup>[16]</sup>检测 104 名妇女标本,比较了荧光抗体检测法、吖啶橙染色、湿片、培养等 4 种方法,其敏感度分别为 83%、66%、66% 和 95%。表明荧光抗体检测法敏感性好,特异性高,有望替代培养法成为临床快速诊断的经济、实用方法。

## 3 分子生物学方法

### 3.1 核酸分子杂交技术

3.1.1 荧光 DNA 原位杂交 Muresu 等<sup>[17]</sup>报告以克隆 2.3 kb 的 TV DNA 片段(pROS21)作为探针,用生物素标记;用 PCR 扩增出 pROS21 的一个 600 bp 亚克隆(pLAE1)作为探针,异硫氰酸荧光黄标记,两者均可直接与临床标本 TV 进行原位杂交,荧光显微镜检查,见虫体细胞核中 DNA 重复序列有明显的荧光显色,呈点状,该探针与哺乳动物细胞、酵母及细菌的 DNA 无交叉反应。此技术应用于检测 TV 临床标本有一定的价值。

### 3.1.2 自动化检测(affirm VP 微生物确证实验)

Briselden 等<sup>[18]</sup>报道美国 MircoProbe 公司生产的一种自动化检测系统。该系统是应用脱氧核糖核酸探针(affirm VP DNA 探针)方法,先将样本中的细胞溶解,使虫体释放 RNA,再经处理后 RNA 的靶区域与探针分析卡(probe analysis card, PAC)上的探针杂交,被捕获的靶区域又与标记探针杂交,洗去未结合的标记探针,最后相应的显色系统(抗生物素蛋白链菌素结合的辣根过氧化物酶)显色。如果患者标本中有 TV,则 RNA 就被捕获到 PAC 上,反应显蓝色。DeMeo 等<sup>[13]</sup>分析了 615 位妇女阴道分泌物标本,结果表明该方法敏感度为 90%,只有 1 例假阳性,特异度为 99.8%。

### 3.2 PCR 技术

3.2.1 引物 PCR 引物有多种,主要是针对 TV 基因组的特异区域设计的<sup>[19]</sup>。常用的有:① 针对 TV 的名为 A6p 基因序列的引物对 TVA5、TVA6,扩增出 102 bp 基因序列,该序列具有高度选择性,人 DNA 与其他类型鞭毛虫、细菌未发现此 DNA 序列<sup>[20]</sup>;② 针对

$\beta$ -微管蛋白(beta-tubulin)保守区基因的引物对 BTUB9/2,可扩增出 112 bp 产物<sup>[19]</sup>;③ 针对 18S rRNA 基因的保守区域的引物对 TV1、TV2,扩增出 312 bp 产物<sup>[21]</sup>;④ 针对 TV 特异 DNA 重复序列的引物对 TVK3、TVK7 可扩增出 312 bp 产物,该引物对与人 DNA 及其他感染性病原体无交叉反应<sup>[22]</sup>。

3.2.2 方法 PCR 法:Wendel 等<sup>[22]</sup>曾对 PCR 法与标准诊断法(湿片法与培养法)进行比较,所用引物是 BTUB9/2,检测 337 位妇女阴道分泌物,PCR 敏感度为 84%。由于引物是针对 TV 的特异 DNA 序列,假阳性少,特异度达 94%。实时荧光定量-PCR 法(TaqMan-PCR):TaqMan 荧光探针是可与特异 PCR 扩增产物杂交的寡核苷酸,两端分别标记 1 个荧光发射基团和 1 个荧光淬灭基团。探针完整时,发射基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收;PCR 扩增时,耐热 DNA 聚合酶(Taq 酶)的 5'~3' 外切酶活性将杂交在 PCR 扩增产物的探针酶切降解,使荧光发射基团和荧光淬灭基团分离,从而荧光监测系统可接收到荧光信号,即每扩增 1 条 DNA 链,就有 1 个荧光分子形成,实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步。Jordan 等<sup>[23]</sup>使用的探针为 5' 荧光素和 3' 罗丹明双标记的衍生物,进行 TaqMan-PCR 检测,分析了 552 份妇女阴道分泌物,其敏感度为 97.8%,假阳性少,特异度达 97.4%。聚合酶链反应-酶联免疫吸附测定(PCR-ELISA)法:该法是 PCR 技术与 ELISA 的结合。Kaydos-Danials 等<sup>[24]</sup>应用 PCR-ELISA 检测 2 930 名女性尿标本 TV 时用两种方法,根据 TV 捕获探针(TVK)是否标记而分为:① 未标记的 ELISA 检测,引物对是 5' 生物素标记的 TVK3 和 TVK7,PCR 产物与包被在微反应管中未标记的寡核苷酸 TVK 探针(TVK 探针 3' 端和 TVK7 引物扩增的 DNA 5' 端的一段互补)杂交后,与辣根过氧化物酶连接的亲和素结合,加底物显色,敏感度和特异度分别为 86.4% 和 86.1%;② TVK 标记的 ELISA 检测,PCR 用的引物对是 TVK3 和地高辛标记的 TVK7。实验时,微孔板用亲和素包被,用生物素标记捕获探针 TVK 的 3' 端通过生物素和亲和素的交联作用将捕获探针固定在固相支持物上。在扩增时,用地高辛标记的引物扩增出的产物中就会带有抗原。扩增产物与固相支持物上的捕获探针杂交,靶序列被捕获,用酶联的抗地高辛抗体与靶序列上的抗原结合,加底物显色。这种 PCR-ELISA 的敏感度和特异度分别为 90.8% 和 93.4%。Kaydos-Danials 等<sup>[25]</sup>还用该法检测男性尿标本中的 TV,分析 1 225 例男性患者,敏感度和特异度分别为 88.8% 及 94.5%。尿道棉拭子检测,敏感度和特异度分别为



81.6% 和 97.9%。同时还将 1 513 份女性尿标本用 PCR 检测, 其敏感度和特异性分别为 66.9% 和 98.3%, 显然, PCR 的敏感性明显低于 PCR-ELISA<sup>[22]</sup>。巢式聚合酶链反应(nested PCR, nPCR): 用于 TV 的检测, 并可以半定量检测。Shaio 等<sup>[14]</sup>应用的是单管巢式 PCR, 针对 TV 基因 Tv-E650 家族的 DNA 重复序列。首先用 1 对相对较长的外引物: OPs (OP1, OP2), 退火温度为 62 ℃ 进行第 1 轮 30 个循环, 扩增产物为 521 bp。然后, 用第 2 对较短的内引物: IPs (IP1, IP2), 退火温度为 45 ℃, 针对第 1 轮扩增的 DNA 序列内部特定区域再次扩增 20 个循环, 获 290 bp 产物。琼脂糖凝胶电泳检测结果, 由于在一个反应系统内使用了两对引物并且进行了两轮扩增反应, 因此试验的敏感性和特异性均增强。每 20 μl 阴道分泌物中只要有 1 个虫体就能检出<sup>[26]</sup>。

#### 4 结语

阴道毛滴虫病是一种发病率较高的性传播疾病, 临床上越来越受到重视。选用更为敏感有效的检测方法已成为当前关注的内容。涂片法虽简便快捷, 但敏感性差; 培养法具有高敏感性但耗时多。分子生物学技术是今后检测阴道毛滴虫病的发展趋势, 对于今后进行大规模筛查及流行病学调查将会起到更大的作用。

#### 参 考 文 献

- [1] Krieger JN, Tam MR, Stevens CE, et al. Diagnosis of trichomoniasis. Comparison of conventional wet-mount examination with cytologic studies, cultures, and monoclonal antibody staining of direct specimens[J]. JAMA, 1988, 259:1223-1227.
- [2] Deng HY, Lee JC, Chou SC, et al. Preliminary studies on target antigens for the diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection[J]. J Microbiol Immunol Infect, 1999, 32:14-20.
- [3] Zhang ZF, Graham S, Yu SZ, et al. *Trichomonas vaginalis* and cervical cancer. A prospective study in China[J]. Ann Epidemiol, 1995, 5:325-332.
- [4] 桑红, 周温泉. 男性阴道毛滴虫病的研究进展[J]. 中华男科学, 2002, 8:61-63.
- [5] Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, et al. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*[J]. Clin Microbiol Rev, 1998, 11:300-317.
- [6] Thomason JL, Gelbart SM, Sobun JF, et al. Comparison of four methods to detect *Trichomonas vaginalis*[J]. J Clin Microbiol, 1988, 26:1869-1870.
- [7] Poch F, Levin D, Levin S, et al. Modified thioglycolate medium: a simple and reliable means for detection of *Trichomonas vaginalis*[J]. J Clin Microbiol, 1996, 34:2630-2631.
- [8] Schmid GP, Matheny LC, Zaidi AA, et al. Evaluation of six media for the growth of *Trichomonas vaginalis* from vaginal secretions[J]. J Clin Microbiol, 1989, 27:1230-1233.
- [9] Gelbart SM, Thomason JL, Osypowski PJ, et al. Growth of *Trichomonas vaginalis* in commercial culture media[J]. J Clin Microbiol, 1990, 28:962-964.
- [10] Barenfanger J, Drake C, Hanson C. Timing of inoculation of the pouch makes no difference in increased detection of *Trichomonas vaginalis* by the InPouch TV method[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40:1387-1389.
- [11] Levi MH, Torres J, Pina C, et al. Comparison of the InPouch TV culture system and Diamond's modified medium for detection of *Trichomonas vaginalis*[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35:3308-3310.
- [12] Stary A, Kuchinka-Koch A, Teodorowicz L. Detection of *Trichomonas vaginalis* on modified Columbia agar in the routine laboratory[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40:3277-3280.
- [13] DeMeo LR, Draper DL, McGregor JA, et al. Evaluation of a deoxyribonucleic acid probe for the detection of *Trichomonas vaginalis* in vaginal secretions[J]. Am J Obstet Gynecol, 1996, 174:1339-1342.
- [14] Shaio MF, Lin PR, Liu JY. Colorimetric one-tube nested PCR for detection of *Trichomonas vaginalis* in vaginal discharge[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35:132-138.
- [15] 祝红, 高兴政, 朱永红. 用酶联免疫吸附试验双抗体夹心法检测阴道毛滴虫可溶性抗原的研究[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1998, 11:177-179.
- [16] Bickley LS, Krisher KK, Punsalang A Jr, et al. Comparison of direct fluorescent antibody, acridine orange, wet mount, and culture for detection of *Trichomonas vaginalis* in women attending a public sexually transmitted diseases clinic[J]. Sex Transm Dis, 1989, 16:127-131.
- [17] Muresu R, Rubino S, Rizzu P, et al. A new method for identification of *Trichomonas vaginalis* by fluorescent DNA *in situ* hybridization[J]. J Clin Microbiol, 1994, 32:1018-1022.
- [18] Briselden AM, Hillier SL. Evaluation of affirm VP microbiol identification test for *Gardnerella vaginalis* and *Trichomonas vaginalis*[J]. J Clin Microbiol, 1994, 32:148-152.
- [19] Madico G, Quinn TC, Rompalo A, et al. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection by PCR using vaginal swab samples[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36:3205-3210.
- [20] Riley DE, Roberts MC, Takayama T, et al. Development of a polymerase chain reaction-based diagnosis of *Trichomonas vaginalis*[J]. J Clin Microbiol, 1992, 30:465-472.
- [21] Mayta H, Gilman RH, Calderon MM, et al. 18S ribosomal DNA-based PCR for diagnosis of *Trichomonas vaginalis*[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38:2683-2687.
- [22] Wendel KA, Erbeling EJ, Gaydos CA, et al. *Trichomonas vaginalis* polymerase chain reaction compared with standard diagnostic and therapeutic protocols for detection and treatment of vaginal trichomoniasis[J]. Clin Infect Dis, 2002, 35:576-580.
- [23] Jordan JA, Lowery D, Trucco M. TaqMan-based detection of *Trichomonas vaginalis* DNA from female genital specimens[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39:3819-3822.
- [24] Kaydos-Daniels SC, Swygard H, Wise SL, et al. Development and validation of a PCR-based enzyme-linked immunosorbent assay with urine for use in clinical research settings to detect *Trichomonas vaginalis* in women[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40:89-95.
- [25] Kaydos-Daniels SC, Miller WC, Hoffman I, et al. Validation of a urine-based PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for use in clinical research settings to detect *Trichomonas vaginalis* in men[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41:318-323.
- [26] Paces J, Urbankova V, Urbanek P. Cloning and characterization of a repetitive DNA sequence specific for *Trichomonas vaginalis*[J]. Mol Biochem Parasitol, 1992, 54:247-255.

(收稿日期: 2003-05-19 编辑: 富秀兰)