

- [8] Obata K, Katsura H, Miyoshi K, et al. Toll-like receptor 3 contributes to spinal glial activation and tactile allodynia after nerve injury[J]. J Neurochem, 2008, 105(6): 2249-2259.
- [9] Olson JK. Immune response by microglia in the spinal cord[J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1198: 271-278.
- [10] Colton CA. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain[J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2009, 4(8): 399-418.
- [11] Cao L, Palmer CD, Malon JT, et al. Critical role of microglial CD40 in the maintenance of mechanical hypersensitivity in a murine model of neuropathic pain[J]. Eur J Immunol, 2009, 39: 3562-3569.
- [12] Vallejo R, Tilley DM, Vogel L, et al. The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain[J]. Pain Pract, 2010, 10(16): 167-184.
- [13] Kawasaki Y, Zhang L, Cheng JK, et al. Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord[J]. J Neurosci, 2008, 28(33): 5189-5194.
- [14] Nakagawa T, Kaneko S. Spinal astrocytes as therapeutic targets for pathological pain[J]. J Pharmacol Sci, 2010, 114(2): 347-353.
- [15] Carpentier PA, Duncan DS, Miller SD. Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity[J]. Brain Behav Immun, 2008, 22(1): 140-147.
- [16] Gao YJ, Ji RR. Chemokines, neuronal-glial interactions, and central processing of neuropathic pain[J]. Pharmacol Ther, 2010, 126(1): 56-68.
- [17] Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation[J]. N Engl J Med, 2006, 354(4): 610-621.
- [18] Miller RJ, Rostene W, Apartis E, et al. Chemokine action in the nervous system[J]. J Neurosci, 2008, 28(23): 11792-11795.
- [19] Zhang J, De Koninck Y. Spatial and temporal relationship between monocyte chemoattractant protein-1 expression and spinal glial activation following peripheral nerve injury[J]. J Neurochem, 2006, 97(5): 772-783.
- [20] Thacker MA, Clark AK, Bishop T, et al. CCL2 is a key mediator of microglia activation in neuropathic pain states[J]. Eur J Pain, 2009, 13(2): 263-272.
- [21] Abbadie C, Bhangoo S, De Koninck Y, et al. Chemokines and pain mechanisms[J]. Brain Res Rev, 2009, 60(1): 125-134.
- [22] Dansereau MA, Gosselin RD, Pohl M, et al. Spinal CCL2 pronociceptive action is no longer effective in CCR2 receptor antagonist-treated rats[J]. J Neurochem, 2008, 106(4): 757-769.
- [23] Zhang J, Shi XQ, Echeverry S, et al. Expression of CCR2 in both resident and bone marrow-derived microglia plays a critical role in neuropathic pain[J]. J Neurosci, 2007, 27(25): 12396-12406.
- [24] Gao YJ, Zhang L, Samad OA, et al. JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain[J]. J Neurosci, 2009, 29(1B): 4096-4108.
- [25] Zhuang ZY, Kawasaki Y, Tan PH, et al. Role of the CX3CR1/p38 MAPK pathway in spinal microglia for the development of neuropathic pain following nerve injury-induced cleavage of fractalkine[J]. Brain Behav Immun, 2007, 21(5): 642-651.
- [26] Clark AK, Yip PK, Grist J, et al. Inhibition of spinal microglial cathepsin S for the reversal of neuropathic pain[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(17): 10655-10660.
- [27] Moalem G, Xu K, Yu L. T lymphocytes play a role in neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats[J]. Neuroscience, 2004, 129(5): 767-777.
- [28] Hu P, Bembrick AL, Keay KA, et al. Immune cell involvement in dorsal root ganglia and spinal cord after chronic constriction or transection of the rat sciatic nerve[J]. Brain Behav Immun, 2007, 21(4): 599-616.
- [29] Cao L, DeLeo JA. CNS-infiltrating CD4⁺ T lymphocytes contribute to murine spinal nerve transection-induced neuropathic pain[J]. Eur J Immunol, 2008, 38(3): 448-458.
- [30] Verma-Gandhu M, Bercik P, Motomura Y, et al. CD4⁺ T-cell modulation of visceral nociception in mice[J]. Gastroenterology, 2006, 130(12): 1721-1728.
- [31] Kleinschmitz C, Hofstetter HH, Meuth SG, et al. T cell infiltration after chronic constriction injury of mouse sciatic nerve is associated with interleukin-17 expression[J]. Exp Neurol, 2006, 200(4): 480-485.

(收稿日期: 2011-10-09)

• 综 述 •

蜡样芽胞杆菌聚合酶链式反应实验室检测技术进展

黄永亮 综述, 金雄章 校审

(广西壮族自治区百色市乐业县疾病预防控制中心 533200)

关键词: 芽胞杆菌, 蜡状; 聚合酶链式反应

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 03. 035

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)03-0333-03

蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*, *B. cereus*)是一种革兰阳性需氧芽孢杆菌,广泛分布于植物和土壤等环境中,它是一种食源性致病菌,通常引起食物中毒的 *B. cereus* 为呕吐型和腹泻型两类,常在世界范围内引起食物中毒^[1-3]。检测 *B. cereus* 的传统方法是培养法,但其敏感性低且耗时长。聚合酶链式反应(PCR),是一种 DNA 扩增技术,当存在模板 DNA、底物、上下游引物和耐热 DNA 聚合酶时,经过多次“变性-复性-延伸反应”的循环过程,模板 DNA 就可得到大量扩增。2004 年, *B.*

cereus 的全基因组测序已经完成,并在其 36 个基因序列中确定了 *bcr1*~18 等 18 个不同的 DNA 重复片段;根据 *B. cereus* 不同性质的重复片段可分为 3 组^[4]: A 组是 *bcr1*~3,每株具有从 4~116 高度可变的拷贝数,是染色体之间的非保守区域,该区域的基因编码与炭疽芽胞杆菌及苏云金芽胞杆菌具有高度的同源性;B 组在 *bcr4*~6 区域,其保守性介于 A 组和 C 组之间;C 组分布在 *bcr7*~18,为高度保守基因区域。根据 *B. cereus* 特异性基因片段中的开放阅读框架部份序列设计引物,可

进行 PCR 检测。现将 *B. cereus* 的 PCR 检测技术进展作如下综述。

1 常规 PCR

常规 PCR 是一种级联反复循环的 DNA 合成反应过程。DNA 模板通过热变性,引物复性结合到单链靶序列上,在热稳定 DNA 聚合酶催化下,复性引物引导新生的 DNA 链延伸聚合反应。常规 PCR 需要确定待扩增目的序列片段,根据这一序列设计 1 对相应的引物,引物设计首先考虑选择特异性高的靶基因。Kim 等^[5]选取产催吐毒素 *B. cereus* 的 *CER* 基因作引物,并用 *B. cereus* 的其他基因 *EM1*、*RE234*、*CES*、*Ces3R*、*CESR2* 等作对比,建立常规 PCR,对 160 株 *B. cereus*,其中 40 株为产催吐毒素型同时进行检测,结果 *CER* 引物准确率最高(97.5%),其敏感性和特异性分别为 100% 和 96.7%。Martinez-Blanch 等^[6]用 23S 和 16S rRNA 两者之间区域内的基因片段,设计 1 对引物即 1387V:5'-GCC TTG TAC ACW CCG CCC-3'和 118R:5'-GTT NCC CCA TTC RGA-3'进行常规 PCR,并通过多种方法同时检测 *B. cereus* 进行对比分析后认为,23S 和 16S rRNA 两者之间区域的基因能够鉴别 *B. cereus* 的群内菌种。常规 PCR 扩增后需做凝胶电泳鉴定,比较繁琐,同时扩增产物极易受到污染造成假阳性。

2 限制性片段长度多态性-PCR

限制性片段长度多态性-PCR(PCR-RFLP)即先通过 PCR 扩增 DNA 片段,再选择适当的限制性核酸内切酶,消化 PCR 产物,经电泳可得到有特异性的电泳谱带,从而达到鉴定不同基因型的目的。Jensen 等^[7]采用 PCR-RFLP 技术鉴定蜡样芽胞杆菌群,他们以 *gyrB* 作为靶基因进行扩增,扩增产物为 362 bp 片段,对 12 株 *B. cereus*、25 株苏云金芽胞杆菌、25 株蕈状芽胞杆菌和 2 株炭疽芽胞杆菌进行扩增,随后用 *Sau3A1* 消化产物,经电泳谱带鉴别,结果除蜡样芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌无法区分开来外,其他菌株都能鉴别出来。由于该法扩增后需要对产物进行消化,增加了操作的复杂性,临床上应用不多。

3 随机扩增多态性-PCR

随机扩增多态性-PCR(RAPD-PCR)技术,是由美国科学家 Williams 和 Welsh 于 1990 年分别研究提出的,又称任意引物 PCR。是指在对模板顺序一无所知的情况下,通过随意设计或选择 1 个非特异性引物,在 PCR 反应体系中,首先在不严格条件下使引物与模板 DNA 中许多序列通过错配而复性。Lee 等^[8]选取 10 个碱基(5'-GTG ATC GCA G-3')作为引物,经过扩增复性后,用琼脂糖凝胶电泳分析,在所检测的 *B. cereus* 菌中全部得到 1 个特异性的 0.91 kb 区带。该方法敏感,在污染的食品中,可以检测出数量较少的 *B. cereus* 的细胞,但 0.91 kb 的区带有时与 0.88 kb 的枯草芽胞杆菌区带不易辨认,可以通调整电泳条件如琼脂糖凝胶含量,列入参考菌株也有助于与其他同源菌株的区别。与常规 PCR 相比,RAPD-PCR 简便易行、省时省力,不需要限制性内切酶片段长度多态性分析的预备性工作:如克隆的制备、同位素标记、Southern 印记反应及分子杂交。RAPD-PCR 易于程序化,利用一套随机引物可得到大量的分子标记,并可借助于计算机系统进行分析。

4 多重 PCR

多重 PCR(multiplex-PCR, M-PCR)是在同一 PCR 反应体系里加上 2 对以上引物,同时扩增出多个核酸片段的 PCR 反应,其反应原理、反应试剂和操作过程与常规 PCR 相同。由于 *B. cereus* 有多种不同特性的基因,只针对 1 种基因作单一

PCR,有时会漏检。Park 等^[9]用 *B. cereus* 的 *gyrB* 和 *groEL* 基因作诊断标记,建立多重 PCR,并检测不同种类的食品作为评价。结果 *groEL* 扩增产物中,所有的 *B. cereus* 试验株均得到 400 bp 的 DNA 片段,*gyrB* 基因得到 475 bp,他们观察来自 29 个其他致病菌的 DNA 片段,没有出现非特异性扩增。多重 PCR 是一种操作简单、快速、有效的方法。

5 实时荧光定量 PCR

实时荧光定量 PCR(real-time PCR)是一种在 PCR 反应体系中加入荧光基团,通过对 PCR 扩增反应中每一个循环产物荧光信号的实时检测,从而实现对起始模板定量及定性的分析。其化学原理包括探针类和非探针类两种^[10],都需要加入荧光物质作为监测信号。常用于检测 *B. cereus* 的荧光物质有两种:荧光染料和荧光探针。Wehrle 等^[11]采用荧光染料(SYBR GreenI)作为荧光基团,以腹泻(*nheA*、*hblD*、*cytK1*)和呕吐(*ces*)毒素基因为靶基因设计引物,建立多重实时荧光定量 PCR,该方法的最低检出限量为 101 CFU/g。他们对 337 株菌进行检测,并用常规 PCR、免疫及细胞毒性试验确证,结果相关性良好。在同一个反应体系里,同时对不同的靶基因进行扩增,能全方位地检测 *B. cereus*,多重检测与实时 PCR 结合后,省去了用电泳确认的分析,使操作简单化。最近,Fernández-No 等^[12]用 *B. cereus* 的 16S rRNA 靶基因设计引物,采用 TaqMan 荧光探针,建立了量化的测定 *B. cereus* 方法。他们构建了 2 条标准曲线,一条的 DNA 从 *B. cereus* 培养物的连续稀释系列中提取,另一条是从消毒食物产品接种稀释系列中提取,2 条标准曲线的 r^2 值分别为 0.996 9 和 0.995 8,线性范围都是 $1.65 \times 10^1 \sim 1.65 \times 10^6$ CFU/mL,他们对该方法进行测试,没有出现非特异性扩增。实时荧光定量 PCR 实现了从定性到定量的飞跃,而且与常规 PCR 相比,由于采用完全闭管荧光检测,有效解决了 PCR 污染问题,具有特异性更强、自动化程度高等特点。

6 结 语

B. cereus 食物中毒病原菌的检测方法,目前仍以传统培养方法为主,耗时长(>48 h),重复性差,无法精确定量,20 世纪 90 年代,随着分子生物学的发展以及 PCR 技术的出现,使得 *B. cereus* 的检测在数小时内就能完成。PCR 检测需要特异性高的靶基因,引起食物中毒绝大多数是产腹泻毒素型和产呕吐毒素型蜡样芽胞杆菌,而这两型的基因具有高度的特异性。因此,根据临床症状选择特异性高的靶基因作为引物,可进行 PCR 快速检测。但由于 PCR 方法需要一定仪器,操作繁琐且费用高,目前还不能在基层广泛应用。随着中国国力的增强和检测技术的不断完善,PCR 特别是实时荧光定量 PCR 将会有更广泛的应用前景。

参考文献

- [1] Kim JB, Jeong HR, Park YB, et al. Food poisoning associated with emetic-type of *Bacillus cereus* in Korea[J]. Foodborne Pathog Dis, 2010, 7(5): 555-563.
- [2] Chaves JQ, Pires ES, Vivoni AM. Genetic diversity, antimicrobial resistance and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* isolated from food in Brazil over three decades[J]. Int J Food Microbiol, 2011, 147(1): 12-16.
- [3] Choi KB, Lim HS, Lee K, et al. Epidemiological investigation for outbreak of food poisoning caused by *Bacillus cereus* among the workers at a local company in 2010[J]. J Prev Med Public Health, 2011, 44(2): 65-73.

[4] Kristoffersen SM, Tourasse NJ. Interspersed DNA repeats bcr1-bcr18 of *Bacillus cereus* group bacteria form three distinct groups with different evolutionary and functional patterns[J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(2):963-983.

[5] Kim JB, Kim JM, Park YB, et al. Evaluation of various PCR assays for the detection of emetic toxin producing *Bacillus cereus*[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2010, 20(7):1107-1113.

[6] Martinez-Blanch JF, Sánchez G, Garay E, et al. Evaluation of phenotypic and PCR-based approaches for routine analysis of *Bacillus cereus* group foodborne isolates[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2011, 99(3):697-709.

[7] Jensen GB, Fisker N, Sparsø T, et al. The possibility of discriminating within the *Bacillus cereus* group using *gyrB* sequencing and PCR-RFLP[J]. *Int J Food Microbiol*, 2005, 104(1):113-120.

[8] Lee J, Kwon GH, Park JY, et al. A RAPD-PCR method for the rapid detection of *Bacillus cereus*[J]. *J Microbiol Biotechnol*,

2011, 21(3):274-276.

[9] Park SH, Kim HJ, Kim JH, et al. Simultaneous detection and identification of *Bacillus cereus* group bacteria using multiplex PCR[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2007, 17(7):1177-1182.

[10] 王娟, 方存磊. 实时荧光 PCR 检测军团菌研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2010, 31(9):964-966.

[11] Wehrle E, Didier A, Moravek M, et al. Detection of *Bacillus cereus* with enteropathogenic potential by multiplex real-time PCR based on SYBR Green I[J]. *Mol Cell Probes*, 2010, 24(3):124-130.

[12] Fernández-No IC, Guarddon M. Detection and quantification of spoilage and pathogenic *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by real-time PCR[J]. *Food Microbiol*, 2011, 28(3):605-610.

(收稿日期:2011-10-09)

• 综 述 •

细菌性阴道病实验诊断方法的研究进展

刘 锐 综述, 沈佐君 审校

(安徽医科大学附属省立医院/安徽省临床检验中心, 合肥 230001)

关键词: 阴道病, 细菌性; 加特纳菌; 诊断

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 03. 036

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)03-0335-03

细菌性阴道病(BV)是妇科最常见的疾病之一,在健康妇女中 BV 患病率为 18.9%,在妇科门诊有异常阴道分泌物的患者中为 43.3%,远远高于阴道滴虫与霉菌感染发病率之和,在性乱人群中检出率为 36.7%,在妊娠期患病率为 12%~22%^[1],但本病患者约 10%~50%无临床症状^[2],主要依靠实验室诊断。本文参照国内外有关研究文献,就 BV 的实验诊断方法及其进展作一综述。

1 概 述

BV 是由于阴道内微生态平衡失调,以阴道乳酸杆菌减少或消失,革兰阴性菌和厌氧菌增多为主要微生物特点的临床症候群。以前曾命名为非特异性阴道炎、加特纳菌性阴道炎(*Gardnerella vaginitis*)。1955 年有研究者从非特异性阴道炎患者的阴道分泌物中分离出阴道嗜血杆菌,认为是本病的病原菌,因而称此病为阴道嗜血杆菌性阴道炎(*corynebacterium vaginitis*)。1980 年研究者通过 DNA-DNA 杂交试验、电镜观察及细菌外膜生化分析证实此菌是一独立新菌种,并命名为阴道加特纳菌(*Gardnerella vaginalis*, GV),改称此病为加特纳菌性阴道炎。但由于 GV 并不是导致该病的唯一病原体,还有其他厌氧菌和支原体等存在,尤其此病的炎性表现并不明显,分泌物中白细胞稀少,也无脓细胞存在。因此,在 1984 年的瑞典国际会议上被正式命名为“细菌性阴道病”。在阴道正常菌群中,厌氧菌与需氧菌的比例为 5:1,而在 BV 患者阴道中其比例可达 100:1 到 1 000:1。通过对 BV 患者的阴道分泌物进行培养后发现, BV 患者阴道中分离到的菌种大约是正常阴道中菌种的 2 倍,其中普沃氏菌属、卟啉单胞菌属、消化链球菌属、动弯杆菌属、阴道加特纳菌属和不产 H₂O₂ 的乳杆菌都与 BV 有关^[3]。该病可以引起许多妇产科并发症,如早产、胎膜早破、绒毛膜炎、产褥感染、新生儿感染等^[4-6],甚至与妇科肿瘤

有关^[7]。GV 能刺激 HIV 在单核-巨噬细胞系统、T 淋巴细胞中的表达,增加 HIV 的易感性^[8]。另外, BV 患者中交叉感染支原体、真菌、滴虫非常普遍^[9]。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。

2 BV 的诊断标准

Amsel 法是传统诊断 BV 的金标准^[10],该方法规定符合下列 4 项中的 3 项者,可诊断为 BV,其中第 4 项是必备的:(1)稀薄均质的阴道分泌物;(2)pH>4.5;(3)胺试验阳性;(4)在阴道分泌物中镜检出线索细胞(clue cell)。线索细胞是 BV 的特征性改变, Thomason 等^[11]证实线索细胞是单项诊断 BV 的最可靠指标,其敏感度(SN)为 98.2%,特异性(SP)为 94.3%,阳性预示值(PVP)89.9%,阴性预示值(PVN)99.0%。Amsel 法简单易行,但易受人为因素及与 BV 感染无关的因素影响,主观性强,操作费时,已逐渐被其他方法所取代。

3 BV 实验诊断

3.1 细菌代谢产物检测法

3.1.1 唾液酸酶(神经氨酸酶)法 唾液酸酶由阴道菌群中的厌氧菌如双路普雷沃菌(*Prevotella bivia*)和类杆菌等产生,该酶活性与毒力因子很相似,可以破坏黏蛋白,增强细菌黏附性,而且通过损害 IgA 的免疫反应性来对抗其他毒力因子。该法的检测原理是,人工合成唾液酸酶底物,并以其酶与底物反应后显示颜色的不同来诊断 BV,其 SN 和 SP 分别达到 95.6%和 96.3%,阳性预测值(PVP)和阴性预测值(PVN)分别为 95.6%和 96.4%^[12]。该法操作简便快速,技术易于掌握,不需要特殊的仪器设备,敏感性和特异性较高,大大地提高了 BV 的诊断水平和效率,是一种较好的辅助诊断方法,适宜推广应用。不足之处是,唾液酸酶法是通过颜色的变化来判断结果,而多数国产试剂盒的阳性结果呈红色,易导致对一些血性标本