

- [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] Martínez-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,

· 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 vaginalis*)。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 vaginalis*)。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

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)

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%, 阳性预测值(PVP)89.9%, 阴性预测值(PVN)99.0%。Amsel 法简单可行, 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

的结果漏判、误判。目前已有国内的学者研制出新的底物 2-O-五甲蓝-a-D-N-乙酰唾液酸(MSTT)，其为 BV BLUE 试剂盒底物 IBX-4041 的类似物，阳性反应结果呈蓝色，且经过临床验证其敏感性为 92%，特异性为 98%，与 BV BLUE 检验结果具有很高的符合率(96%)^[13]，具有极高的推广价值。

3.1.2 脂肪酸氨基肽酶(PIP)活性检测法 PIP 由 GV、动弯杆菌和普雷沃菌产生，是 BV 相关病原体所分泌的特异性标志酶，故阴道分泌物中存在 PIP 活性即可诊断 BV^[14]。PIP Test Card 的检测原理是：阴道分泌物中的 PIP 与 L-脯氨酸-β-萘胺作用，分解 L-脯氨酸-β-萘胺释放出 β-萘胺，并显示出颜色变化，红色或黄色表示 BV 阳性，该方法的 SN 与 SP 分别为 83% 和 95%^[15]。2000 年 Nagy 等^[16]报道了 PIP 的定量测定方法：通过一个微细胞电流分析装置，利用石墨和 Ag/AgCl 参比电极对阴道液中 PIP 活性进行测定，根据其研究结果，健康妇女阴道液 PIP 活性为(66±145)mU/mL，BV 患者阴道液 PIP 活性为(704±145)mU/mL。

3.1.3 胺试验 阴道感染时，分泌物中可检出大量的单胺(如三甲胺)和精胺、尸胺、腐胺等多胺，BV 的致病菌产生的主要是三甲胺。传统的胺试验客观性差，敏感度低，受检验人员的主观影响较大。现在国内已有学者对传统的胺试验进行了改良，使用最新的复式膜技术，将阴道分泌物中的胺类物质提取后，经反应板多步放大显色，在反应板的观察窗膜上经划线显示墨绿色至蓝紫色线条为阳性，结果更加客观。本法诊断 BV 的 SN 为 92.5%，SP 为 70.0%^[17]。目前国外用的多是三甲胺试剂盒，其对 BV 诊断的 SN 和 SP 都在 90% 以上，已经是一项非常成熟和有效的诊断技术。

3.1.4 气-液相色谱分析法 1980 年 Spiegel 等^[18]用气-液相色谱法分析阴道分泌物中不易挥发的脂肪酸(如丁二酸盐)，以诊断 BV。在健康妇女的阴道液中，乳酸是主要的成分，仅有少量的丁二酸盐。临床以丁二酸盐和乳酸的比例大于 0.4 作为诊断 BV 的临界值。比较临床诊断 BV 的标准，气-液相色谱法的 SN 为 78%，SP 为 81%，PVP 为 48%^[19]。但气-液相色谱仪价格较贵，不是实验室常备的仪器，不适合广泛应用，具有局限性。

3.2 GV 检测法

3.2.1 革兰染色积分标准(Nugent 标准) 该标准由 Robert P. Nugent 于 1991 年首先提出，之后被视为实验室诊断 BV 的“金标准”。该方法是将阴道分泌物涂片，固定，革兰染色，然后在油镜下选定 4 种优势菌形态并用半定量评估法对分泌物标本进行评分，4 种优势菌形态的代表菌是乳酸杆菌(革兰阳性大杆菌)、GV 和普雷沃菌(革兰阴性菌小杆菌或球杆菌)、动弯杆菌(革兰染色不定弯曲杆菌)。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 4 种细菌形态分值之和，BV 的诊断标准为大于或等于 7 分，4~6 分为临界范围，1~3 分为正常^[20]。

3.2.2 宫颈巴氏染色涂片 线索细胞及菌群的变化也可在宫颈巴氏染色涂片中见到。BV 的宫颈涂片特点与 Nugent 革兰染色评分相似，但其诊断 BV 的敏感性、特异性和阳性预测值低均与 Nugent 革兰染色，其诊断 BV 的 SN 和 SP 分别是 85% 和 95%^[21]。

3.2.3 GV 培养法 GV 为苛氧菌，在一般培养基上难以生长，在人血或兔血培养基上可以出现 β 溶血环，其生化反应特

点为：氧化酶、触酶阴性，葡萄糖发酵产酸，麦芽糖发酵，不发酵甘露醇，水解马尿酸，产生硫化氢，还原硝酸盐，V-P 试验阴性^[22]。比较临床的诊断方法，GV 培养诊断 BV 的 SN 为 92%，SP 为 69%，PVP 仅为 41%。由于 GV 也可以在 40%~50% 的健康妇女和 40% 治疗后的女性患者中分离到，所以目前认为该方法并不是 BV 理想的诊断方法。

3.2.4 免疫荧光技术 取宫颈或阴道分泌物涂片，自然干燥，甲醛固定 10 min，吹干，GV 免疫标记特异性抗体试剂染色，用荧光显微镜观察，阳性者可见无荧光的阴道脱落上皮细胞上黏附有大量亮绿色荧光的细菌，长约 1~2 mm，两端钝圆。

3.2.5 分子生物学法 寡核苷酸探针法：用 GV-DNA 探针技术检测阴道分泌物中 GV 的浓度，当 GV $\geq 2 \times 10^7$ cfu/mL，结合 pH > 4.5 时诊断 BV，SN 为 95%，SP 为 99%^[2]。VPⅢ微生物确认试验：是一种半定量病原体核糖体 RNA 检测系统，利用 DNA 探针检测 GV 的 16S rRNA，从而达到诊断的目的，其 SN 和 SP 分别为 95%~97% 和 71%~98%^[23]。定量 PCR：有报道 GV 的 ILS-23s rRNA 基因区为特异性引物序列，扩增片段：433 bp，引物 1：5'-TTA TCA ATT TCA CCC GGT-3'，引物 2：5'-CCG TCA CAG GCT GAA CAG-3'。取分泌物适量，提取其 DNA 上清做模板进行 PCR 反应，反应总体积为 25 μL。取扩增产物 15 μL，经琼脂糖凝胶电泳 30 min，于紫外灯下观察结果，出现 433 bp 扩增带者为阳性，未见 433 bp 扩增带者为阴性。该方法可特异且敏感地检测 GV 致病菌株且不受抗生素药物治疗的影响^[24-25]。但其需要具备 PCR 标准实验室且检验人员需持证上岗，应用也具有局限性。

4 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 法因操作费时，且受各种客观和主观因素的影响较大，已逐渐被新的方法取代。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，具有一定的局限性。而唾液酸酶法、PIP 活性检测法、胺试验法、革兰染色法、GV 培养法等临床应用较广泛。检测细菌产生的特异性酶的方法敏感性和特异性均较高，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，从定性检测向定量检测方向发展可克服主观判断因素的影响，具有广阔的发展和应用前景。

参考文献

- [1] 金爱群，湛东进. 湿涂片法和革兰染色法在妊娠期无症状细菌性阴道病诊断中的比较研究[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(6): 566-567.
- [2] 曹泽毅. 中华妇产科学[M]. 北京：人民卫生出版社，1999: 1205.
- [3] Culhane JF, Nyirjesy P, McCollum K, et al. Variation in vaginal immune parameters and microbial hydrolytic enzymes in bacterial vaginosis positive pregnant women with and without Mobiluncus species[J]. Am J Obstet Gynecol, 2006, 195(2): 516-521.
- [4] Lim KH, Brooks H, McDougal R, et al. Is there a correlation between bacterial vaginosis and preterm labour in women in the Otago region of New Zealand? [J]. Aust N Z J Obstet Gynaecol, 2010, 50(3): 226-229.
- [5] Denney JM, Culhane JF. Bacterial vaginosis: a problematic infection from both a perinatal and neonatal perspective[J]. Semin Fetal Neonatal Med, 2009, 14(4): 200-203.
- [6] Donders GG, Van Calsteren K, Bellen G, et al. Predictive value for

- preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy [J]. BJOG, 2009, 116(10): 1315-1324.
- [7] Laxmi U, Agrawal S, Raghunandan C, et al. Association of bacterial vaginosis with adverse fetomaternal outcome in women with spontaneous preterm labor: a prospective cohort study [J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2011, 15(3): 468-471.
- [8] Marx G, John-Stewart G, Bosire R, et al. Diagnosis of sexually transmitted infections and bacterial vaginosis among HIV-1-infected pregnant women in Nairobi [J]. Int J STD AIDS, 2010, 21(8): 549-552.
- [9] 吴晓宁, 黄燕. 细菌性阴道病交叉感染的调查 [J]. 广西医学, 2008, 30(1): 50-51.
- [10] 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.
- [11] Thomason, Gellbart, Anderson, et al. Statistical evaluation of diagnostic criteria for bacterial vaginosis [J]. Am J Obstet Gynecol, 1990, 162(1): 155-160.
- [12] 蔡昀, 童明庆. 细菌性阴道病的实验室诊断 [J]. 医学综述, 2005, 11(6): 551-551.
- [13] 朱园园, 沈佐君, 万士林. 一种检测细菌性阴道病方法的建立及临床评价 [J]. 检验医学, 2009, 24(5): 350-354.
- [14] Hillier SL. Diagnosis microbiology of bacterial Vaginostie [J]. Am J Obstet Gynecol, 1993, 169(2Pt2): 455-459.
- [15] Thromason JL, Gelbart SM, Wilcoski LM. Proline aminopeptidase activity as a rapid diagnostic test to confirm bacterial vaginosis [J]. Obstet Gynecol, 1988, 71(4): 607-611.
- [16] Nagy G, Gyurcsanyi RE, Cristalli CA, et al. Screen-printed amperometric microcell for proline iminopeptidase enzyme activity assay [J]. Biosens Bioelectron, 2000, 15(5-6): 265-272.
- [17] 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.
- [18] Spiegel CA, Amsel R, Eschenbach D. Anacrobic bacteria in non-specific vaginitis [J]. N Engl J Med, 1980, 303(11): 601-607.
- [19] Mastrobattista JM, Bishop KD, Newton ER. Wet smear compared with gram stain diagnosis of bacterial vaginosis in asymptomatic pregnant women [J]. Obstet Gynecol, 2000, 96(4): 504-506.
- [20] 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.
- [21] Discacciati MG, Simoes JA, Amaral RG, et al. Presence of 20% or more clue cells: an accurate criterion for the diagnosis of bacterial vaginosis in Papanicolaou cervical smears [J]. Diagn Cytopathol, 2006, 34(4): 272-276.
- [22] Teixeira GS, Soares-Brandao KL, Branco KM, et al. Antagonism and synergism in Gardnerella vaginalis strains isolated from women with bacterial vaginosis [J]. J Med Microbiol, 2010, 59(8): 891-897.
- [23] Brown HL, Fuller DD, Jasper LT, et al. Clinical evaluation of af- firm VPIII in the detection and identification of Trichomonas vaginalis, Gardnerella vaginalis, and Candida species in vaginitis/vaginosis [J]. Infect Dis Obstet Gynecol, 2004, 12(1): 17-21.
- [24] Fredricks DN, Fiedler TL, Thomas KK, et al. Targeted PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(10): 3270-3276.
- [25] Fredricks DN, Fiedler TL, Thomas KK, et al. Changes in vaginal bacterial concentrations with intravaginal metronidazole therapy for bacterial vaginosis as assessed by quantitative PCR [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(3): 721-726.

(收稿日期: 2011-10-09)

· 综 述 ·

以逆境生理理论分析肿瘤的发病机制

葛才保 综述, 陈六生 审校

(溧水县人民医院检验科, 江苏南京 211200)

关键词: 肿瘤; 逆境生理; 腺苷三磷酸; 钠钾交换 ATP 酶**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.03.037**文献标识码:**A**文章编号:** 1673-4130(2012)03-0337-04

1 引 言

1.1 肿瘤发生与细胞受损及功能异常密切相关。病因学研究表明, 外在化学、物理、生物等因素均可能使机体细胞受到损害; 内环境紊乱、免疫功能下降等则使机体抗肿瘤能力降低。内外因素共同作用致基因突变, 突变细胞降低生长因子需求, 表现出肿瘤细胞的不死性特点。细胞膜葡萄糖转运增强、ATP 酶活性增高、细胞内无氧代谢增强及特异性肿瘤标志物分泌等特点表明肿瘤细胞存在细胞功能异常。细胞功能异常和肿瘤发生密切相关。

1.2 细胞生存环境和 K-Na ATPase 活性在肿瘤发病机制中的作用值得深入研究。流行病学研究表明, 肿瘤发生与环境因素密切相关, 细胞生存环境更值得深入研究。各种化学、物理、生物因素都可引起细胞生存环境的改变, 使机体细胞处于生存逆境状态。因细胞膜负责细胞与其环境的隔离和物质交换的

重任, 所以细胞膜的功能状态又与细胞的功能状态密切相关, 代表细胞膜转运状态的 K-Na ATPase 活性在肿瘤的发病机制中具有重要的作用。本文旨在通过论证逆境生理的生物学共性而应用于肿瘤发病机制分析, 以细胞外 ATP(extracellular ATP, eATP) 不足和 K-Na ATPase 活性的变化为切入点, 分析肿瘤细胞的生存环境和代谢特点, 进而分析机体细胞逆境生理, 探讨肿瘤的发病机制。

2 逆境生理理论^[1]

植物细胞学研究表明, 细胞能对逆境作出反应和适应, 并已形成完整的逆境生理理论。

K-Na ATPase 活力下降是逆境存在依据, K-Na ATPase 活力增强是逆境适应依据: 植物细胞能对生存逆境作出反应和适应。在逆境中, 细胞膜系统最先受到损伤, 细胞膜 ATP 酶(K-Na ATPase 等)活力降低, 细胞膜转运下降, K-Na ATPase