

- Virology, 1994, 198(2): 489-503.
- [3] Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness[J]. J Gen Virol, 2000, 81(Pt 1): 67-74.
 - [4] Wu F, Wu MJ, Zhuge XL, et al. Correlation of the occurrence of YMDD mutations with HBV genotypes, HBV-DNA levels, and HBeAg status in Chinese patients with chronic hepatitis B during lamivudine treatment[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2012, 11(2): 172-176.
 - [5] Kao JH, Chen PJ, Lai MY, et al. Clinical and virological aspects of blood donors infected with hepatitis B virus genotypes B and C[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(1): 22-25.
 - [6] Sugauchi F, Kumada H, Acharya SA, et al. Epidemiological and sequence differences between subtypes (Ae and Aa) of hepatitis B virus genotype A[J]. J Gen Virol, 2004, 85(Pt 4): 811-820.
 - [7] Huy TT, Ushigima H, Quang VX, et al. Genotype C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups[J]. J Gen Virol, 2004, 85(Pt 2): 283-292.
 - [8] Sugauchi F, Orito E, Ichida T, et al. Epidemiologic and virologic characteristics of hepatitis B virus genotype B having the recombination with genotype C[J]. Gastroenterology, 2003, 124(4): 925-932.
 - [9] 张韧, 王敏, 符瑞佳, 等. HBV 基因型在我国九省市的分布及与临床指标的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2010, 2(3): 152-155.
 - [10] 翁伟, 唐吉斌. 乙型肝炎病毒基因分型研究在抗病毒治疗中的意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2012, 4(2): 126-130.
 - [11] Lindh M, Andersson AS, Gusdal A. Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus—large-scale analysis using a new genotyping method[J]. J Infect Dis, 1997, 175(6): 1285-1293.
 - [12] Lindh M, Gonzalez JE, Norkrans G, et al. Genotyping of hepatitis B virus by restriction pattern analysis of a pre-S amplicon[J]. J Virol Methods, 1998, 72(2): 163-174.
 - [13] Naito H, Hayashi S, Abe K. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(1): 362-364.
 - [14] Kirschberg O, Schüttler C, Repp R, et al. A multiplex-PCR to identify hepatitis B virus—genotypes A—F[J]. J Clin Virol, 2004, 29(1): 39-43.
 - [15] Kato H, Orito E, Sugauchi F, et al. Frequent coinfection with hepatitis B virus strains of distinct genotypes detected by hybridization with type-specific probes immobilized on a solid-phase support[J]. J Virol Methods, 2003, 110(1): 29-35.
 - [16] 孙余婕, 沈佐君. 实时荧光定量 PCR 方法检测乙型肝炎病毒基因型[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2009, 1(3): 148-151.
 - [17] Usuda S, Okamoto H, Tanaka T, et al. Differentiation of hepatitis B virus genotypes D and E by ELISA using monoclonal antibodies to epitopes on the preS2-region product[J]. J Virol Methods, 2000, 87(1/2): 81-89.
 - [18] 游晶, 庄林, 陈红英, 等. 乙型肝炎病毒基因型及其临床意义的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(9): 921-928.
 - [19] 王虹, 万成松, 王省良, 等. 采用 PCR 微板核酸杂交-ELISA 技术进行 HBV DNA 基因分型的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2001, 21(2): 234-236.
 - [20] Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, et al. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989, 86(16): 6230-6234.
 - [21] 邢亚斯, 邹能利, 毛红菊, 等. 基于双纳米金探针杂交法检测 HBV DNA[J]. 高等学校化学学报, 2012, 7(33): 1420-1425.
 - [22] 董梅. 乙肝病毒基因型的研究进展及临床意义[J]. 武警医学院学报, 2005, 14(4): 319-321.
 - [23] 倪晓艳, 曹文. 乙型肝炎病毒基因分型方法的研究进展[J]. 中国医药指南, 2013, 11(1): 77-78.
 - [24] Kao JH, Wu NH, Chen PJ, et al. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy[J]. J Hepatol, 2000, 33(6): 998-1002.
 - [25] Erhardt A, Blondin D, Hauck K, et al. Response to interferon alfa is hepatitis B virus genotype dependent: genotype A is more sensitive to interferon than genotype D[J]. Gut, 2005, 54(7): 1009-1013.

(收稿日期: 2013-05-02)

• 综 述 •

直接免疫荧光法在阴道加德纳菌感染诊断中的应用研究^{*}

蓝玉清, 陆奉科[△]综述, 闭雄杰 审校

(广西科技大学第一附属医院检验科, 广西柳州 545002)

关键词: 直接免疫荧光法; 阴道加德纳菌; 综述

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 18. 040

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)18-2437-03

加德纳菌(GV)是一类革兰阴性或阳性短杆菌, 厌氧, 嗜血, 培养困难。阴道加德纳菌不仅引起尿道炎和阴道炎, 还可导致早产、低体质量儿、绒毛膜炎、羊膜炎、羊水感染、子宫内膜炎、急性输卵管炎、手术后感染和子宫颈癌等^[1]。GV 还可经性接触传播, 与男性非淋菌性尿道炎、男性不育亦有一定关系。细菌性阴道病是妇科和产科感染的高危因素^[2]。临床实践中如果能迅速检测并及时处理, 就可能降低早产及异常妊娠的

发生率。但目前的检测方法学受到诸多影响因素所限, 临床检测不能做到及时预测。因此, 探讨快速准确检测方法一直是临床医学关注的热点。本研究从直接免疫荧光法检测阴道加德纳菌的方法学比较及应用研究等方面作以下综述。

1 研究背景

近年来, 我国有关阴道 GV 和细菌性阴道病(BV)的报道甚多, BV 的发病、诊断及治疗亦日渐受到人们的重视和关注。

^{*} 基金项目: 广西医疗卫生适宜技术与开发项目(S201317-02)。 作者简介: 蓝玉清, 女, 主管技师, 主要从事免疫学研究。 [△] 通讯作者, E-mail: lufengkeliuzhou@126. com。

BV 主要是由阴道加德纳菌和某些厌氧菌混合感染引起,伴有阴道分泌物性质改变的一组症候群,其病理特征无炎症病变和白细胞浸润。据国内外研究资料表明,细菌性阴道病是最常见的阴道感染性疾病,并指出阴道加德纳菌被认为是引起 BV 的最主要的病原体之一。在细菌性阴道病患者中,阴道加德纳菌检出率高达 98%,混合 GV 感染的细菌性阴道病是妇科和产科感染的高危险因素。阴道加德纳菌不仅引起尿道炎和阴道炎,还可导致早产、低体质量儿、绒毛膜炎、羊膜炎、羊水感染、子宫内膜炎、急性输卵管炎、手术后感染等^[3-4]。GV 还可经性接触传播,与男性非淋菌性尿道炎亦有一定关系。精液 GV 感染可影响精子质量,是男性不育的重要原因之一。近年并认为自然流产、早产可能与妊娠期 GV 感染相关联,且研究指出胚胎停止发育与阴道加德纳菌产前、孕早期上行感染有关。因此有必要建立阴道加德纳菌检测项目以开展针对性治疗。

据美国疾控中心统计,平均每年 500 万至 1 000 万阴道炎患者进行临床检测治疗至少花费 500 万美元。以此推算,阴道炎患者阴道加德纳菌阳性检出者平均每年有 150 万至 500 万人。而我国人口庞大,据统计 75% 以上的育龄妇女一生中平均至少患一次阴道炎计算,若建立阴道加德纳菌检测项目将具有广阔的应用前景。目前,阴道加德纳菌的主要检测技术包括:革兰染色法和分离培养法,BV 试验以及聚合酶链反应技术等^[5-6]。革兰染色找线索细胞是一种诊断细菌性阴道病的常规方法,但线索细胞的识别受显微镜的质量、标本的采集以及操作者的经验等诸多因素影响,主观性强,准确率不够。分离培养法是国际确认的金标准,但由于临床上不正规的应用抗菌药物,导致许多病原体在一定程度上受到抑制,给分离培养带来困难,且阴道加德纳菌对培养环境与培养设备要求较高。

免疫荧光技术已成为微生物学、免疫学、病理学及免疫组织中通用的一种免疫学实验方法,在生物物种的超灵敏检测、生物分子的功能研究及生物分子之间相互作用的研究、医学成像等方面得到了广泛的应用^[7-9]。该方法操作简便、快速、经济,具有高灵敏度和高特异性,更适合高危人群的快速筛选。检测结果可作为细菌性阴道病诊断的重要指标,并用于产前筛查、异常妊娠、不孕不育的病原体检测,针对性指导临床用药^[10]。为临床快速准确诊疗,防止阴道加德纳菌性阴道炎带来危害性因素,提供有力技术保障。

2 直接免疫荧光法定义及应用的相关概述

研究人员于 1941 年首次采用荧光素进行标记而获得成功。这种以荧光物质标记抗体而进行抗原定位的技术称为荧光抗体技术^[11-13]。直接免疫荧光技术是在免疫学、生物化学和荧光显微镜技术的基础上建立起来的医学检验技术,其原理为将不影响抗原抗体活性的荧光素直接标记在抗体上,与样本中相应抗原结合后在荧光显微镜下呈现特异性荧光成像,从而提高阳性检出率。用荧光抗体示踪或检查相应抗原的方法称荧光抗体法;用已知的荧光抗原标记物示踪或检查相应抗体的方法称荧光抗原法。这两种方法总称荧光抗体技术,因为荧光色素不但能与抗体球蛋白结合,用于检测或定位各种抗原,也可以与其他蛋白质结合,用于检测或定位抗体,但是在实际工作中荧光抗原技术很少应用,所以人们习惯称为荧光抗体技术,或称为免疫荧光技术。以荧光抗体方法较常用。目前,检测方法学受到诸多影响因素所限,临床检测不能做到准确及时地预测。因此,探讨快速准确检测方法一直是临床医学关注的热点。用直接免疫荧光法检测阴道加德纳菌的研究国外已有些报道^[14-15],但目前国内这方面的研究还相对较少。该检测

技术的主要特点是:特异性好、敏感性高、检验速度快,并且操作简便,对环境、设备要求低,适合应用于临床快速检测诊断。以下是直接免疫荧光法大致操作规程:

(1)涂片:将样本轻柔涂抹在载玻片上,充分晾干。(2)固定:使用无水乙醇固定 10 min,自然晾干。(3)染色:使用移液器及一次性吸嘴吸取 5 μ L 免疫荧光试剂,均匀滴加在玻片涂样处,置于 37 $^{\circ}$ C 温育箱孵育,孵育时间 30 min。(4)洗涤:使用蒸馏水缓缓冲洗玻片多次,每次 5~10 s,再将玻片自然晾干。(5)观察:使用荧光显微镜进行阅片,在 100 $\times$ 物镜下寻找发苹果绿色荧光的目标物。

3 直接免疫荧光法的安全性、有效性及其与现有同类技术比较

在临床和实验病理学及免疫学中,免疫荧光则首先用于检测细胞内或细胞表面的器官特异性、组织特异性或细胞特异性抗原的存在,尤其在性传播疾病方面应用甚广,可直接检测感染部位病原体及潜伏期病原体。该方法操作简便、快速、经济,适合高危人群的快速筛选。如用异硫氰酸荧光素标记的沙眼衣原体外膜蛋白单克隆抗体检测人体内的沙眼衣原体抗原。单克隆抗体的应用不但可检测细胞内的阴道加德纳菌,亦大大减少了非特异荧光染色,使敏感性和特异性显著提高。还可用于不易运送和保存的标本检测。近年来许多人把免疫荧光法作为一项“扩大的金标准”来鉴定培养和非培养法结果相异的标本,其敏感性为 92% 以上,特异性更是达到 97% 或以上。目前,国内外对阴道加德纳菌的实验诊断主要有直接涂片革兰染色找线索细胞、细菌分离培养、BV 试验以及聚合酶链反应技术(PCR)等^[16-17]。对涂片染色找线索细胞、分离培养法、胺试验、PCR 技术等检测方法进行比较。以指导临床实验室快速、准确地检测细菌性阴道疾病。

3.1 涂片染色找线索细胞 革兰染色找加德纳菌和线索细胞,且可同时进行真菌、淋菌等检测,仍然是一种适合临床操作的简便、易行的常规方法。但需要检验人员具备丰富的细菌形态识别能力且带有很强个人主观因素,从而影响阳性检出率。

3.2 阴道加德纳菌的分离培养与鉴定 细菌分离培养是检测 GV 金标准,准确可靠,但其培养条件要求高。病原体用人工合成培养基培养,生长极缓慢,一般需 48 h。而且细胞培养需专业化技术、试剂和设备,要求较高,目前临床一般不采用,仅在科研单位进行科研活动,或作为新诊断试剂方法学评价的金标准。培养法不能快速检测生殖道病原体感染,一般 2~3 d 才能出结果,且易受药物、温度等环境因素的影响。

3.3 BV 试验 BV 试验(细菌性阴道快速诊断试验)采用多胺法,为一种快速敏感、简单易行的方法^[18],因为其检测原理是根据阴道菌群所产生的胺类物质进行鉴定,但其他阴道菌群也能产生的胺类物质,包括其他微生物的产物,均能引起一定程度假阳性,故不能作为确诊试验,而只作为一种常规筛查。

3.4 PCR 检测法 PCR 技术由于其灵敏度高、特异性强、能够进行疾病的早期诊断、对病原体可以定量分析、反映病原体在机体内复制及动力学变化,并可进行基因分型及变化观察,指导临床治疗,且不受抗菌药物影响等优点,开始从实验室研究走向临床应用。但对 PCR 技术由于污染造成的假阳性和操作复杂造成一部分假阴性,同时 PCR 技术需具备标准 PCR 实验室、标准试剂和熟练的操作以及严格的质量控制等方面条件来保证,才能足够保证试验段的准确性。未能适用一般自身条件不足的临床实验室^[19-20]。

4 直接免疫荧光技术在阴道加德纳菌感染诊断中的必要性

细菌性阴道炎感染引起疾病严重影响广大育龄妇女的生殖健康,自 1976 年世界卫生组织把一些因性接触或类似性行为而传染的疾病统称为性传播疾病(STD),STD 的范围越来越大,包括由阴道加德纳菌、沙眼衣原体、奈瑟氏淋球菌、单纯疱疹病毒Ⅱ型、白色念珠菌等在内的一系列病原体单独或混合感染所引起的疾病,其感染率也越来越高。生殖感染疾病在妇科和产科的危害性涉及到诸多方面^[21-22],具体表现在:(1)严重危害女性的生殖健康,所导致的严重妇科疾病包括盆腔炎、子宫内膜炎、急性慢性输卵管炎、宫颈炎、生殖器疱疹、不孕不育、异位妊娠、早产、流产等。(2)在产科上生殖感染还会对新生儿的健康带来影响,阴道加德纳菌的感染可导致新生儿早产、低体质量儿,在孕期引起的上行感染会导致胎儿停止发育;(3)生殖感染还可增加育龄妇女宫颈癌发生的危险。欧洲的研究人员发现,阴道加德纳菌感染者罹患宫颈鳞癌的危险概率远高于正常人群。(4)生殖感染会增加多种疾病混合感染的危险,例如阴道加德纳菌患者感染衣原体、支原体的概率为非感染者的 3~5 倍。综上所述,STD 不单纯是疾病问题,也是一个很重要的社会问题,因此快速、准确诊断 STD 对预防性传播疾病及早期诊断具有重大意义。直接免疫荧光法具有特异性强、简便快速的特点,可用于性活跃的高危人群的广泛筛查。目前,国内已有大型医院用荧光抗体染色法检查 CT、UU,该方法特异性高、诊断周期短,适合高危人群的快速筛选。该方法针对阴道加德纳菌等引起 STD 的系列病原体检测具有特异性强、诊断周期短等技术特点,因而是切实可行,也是非常必要的。

5 展 望

阴道加德纳菌检测对育龄妇女早期诊断、及时治疗、防止性传播扩散非常重要,为男性不育的治疗拓宽了诊断思路。阴道加德纳菌免疫荧光法检测技术可直接快速地检测临床生殖道分泌物样本中的阴道加德纳菌,并具有高度的敏感性和特异性,其对实验室环境条件对检验人员自身素质各项要求不高,方法简捷,准确率高,应用性强,适合于我国基层各级医院推广及应用,必将同步于荧光免疫技术的进步发展,为提高检验医学检测诊断领域,起到意义深远的影响。在实验室方法学鉴定可持续的发展过程中,在临床应用实践中日趋完善,要不断地更新科学技术水平,进一步提高准确率和阳性检出率。为细菌性阴道病的临床诊断、产前常规筛查、异常妊娠与不孕不育的病原体检测等领域取得新突破作出贡献。

参考文献

- [1] 刘杨. 阴道加德纳菌检测结果分析[J]. 湖北中医学院学报, 2009, 11(6): 45-46.
- [2] 周湧, 李明, 王欲扬, 等. 细菌性阴道病加特纳菌检测的临床价值[J]. 实用预防医学, 2010, 17(3): 435-437.
- [3] 刘春萌, 冯京生. 加德纳菌研究进展[J]. 中华男科杂志, 2007, 13(3): 246-249.
- [4] Taylor-Robinson D, Boustouller YL. Damage to oviduct organ cultures by *Gardnerella vaginalis*[J]. Int J Exp Pathol, 2011, 92(4): 260-265.
- [5] 任勇, 任军, 于志湖. 阴道加德纳菌研究近况[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2005, 21(1): 39-41.
- [6] 沈益青, 杨岚, 陆牡丹, 等. 妊娠妇女阴道加德纳菌的感染情况分析[J]. 中国优生优育, 2010, 16(1): 35-36.

- [7] Lin HM, Tsui MS, Tu FC. Detection of *Gardnerella vaginalis* in the vagina and amniotic fluid using the polymerase chain reaction[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2000, 71(3): 221-222.
- [8] Nath K, Sarosy JW, Hahn J, et al. Effects of ethidium bromide and SYBR Green I on different polymerase chain reaction systems[J]. J Biochem Biophys Methods, 2000, 42(1/2): 15-29.
- [9] Obata-Yasuoka M, Ba-Thein W, Hamada H, et al. A multiplex polymerase chain reaction-based diagnostic method for bacterial vaginosis[J]. Obstet Gynecol, 2002, 100(4): 759-764.
- [10] 余玉. 复发性细菌性阴道病的临床治疗[J]. 中国医药导报, 2007, 4(14): 37.
- [11] Lalancette C, Di Giovanni GD, Prévost M. Improved risk analysis by dual direct detection of total and infectious *Cryptosporidium* oocysts on cell culture in combination with immunofluorescence assay[J]. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(2): 566-577.
- [12] Caviness AC, Oelze LL, Saz UE, et al. Direct immunofluorescence assay compared to cell culture for the diagnosis of mucocutaneous herpes simplex virus infections in children[J]. J Clin Virol, 2010, 49(1): 58-60.
- [13] McTaggart LR, Wengenack NL, Richardson SE, et al. Validation of the MycAssay *Pneumocystis* kit for detection of *Pneumocystis jirovecii* in bronchoalveolar lavage specimens by comparison to a laboratory standard of direct immunofluorescence microscopy, real-time PCR, or conventional PCR[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(6): 1856-1859.
- [14] Menard JP, Fenollar F, Raoult D, et al. Self-collected vaginal swabs for the quantitative real-time polymerase chain reaction assay of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* and the diagnosis of bacterial vaginosis[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012, 31(4): 513-518.
- [15] Pleckaityte M, Janulaitiene M, Lasickiene R, et al. Genetic and biochemical diversity of *Gardnerella vaginalis* strains isolated from women with bacterial vaginosis[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2012, 65(1): 69-77.
- [16] 李连青, 朱庆义, 刘俊芬, 等. 阴道加德纳菌对细菌性阴道病的病原学诊断评价[J]. 中华医院感染学杂志, 2005, 15(2): 226-230.
- [17] 汪雪峰. 阴道加德纳菌三种检测方法比较[J]. 蚌埠医学院学报, 2002, 27(2): 168.
- [18] Myziuk L, Romanowski B, Johnson SC, et al. BV blue test for diagnosis of bacterial vaginosis[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(5): 1925-1928.
- [19] 刘佳明, 袁杰利. 细菌性阴道的病因与治疗的研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2001, 13(4): 202-205.
- [20] 刘凤燕. 阴道加德纳菌研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2007, 19(2): 231-232.
- [21] Teixeira GS, Soares-Brandão KL, Branco KM, et al. Antagonism and synergism in *Gardnerella vaginalis* strains isolated from women with bacterial vaginosis[J]. J Med Microbiol, 2010, 59(Pt 8): 891-897.
- [22] Cartwright CP, Lembke BD, Ramachandran K, et al. Development and validation of a semiquantitative, multitarget PCR assay for diagnosis of bacterial vaginosis[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(7): 2321-2329.