

不同方法对外阴阴道假丝酵母菌病的检出效果

董一红¹, 王丽芳^{2*}, 张 梦¹, 车冬丽¹, 王 雪¹, 高 莹¹,
王迎辰¹, 李 格¹, 刘 勃¹, 李 佩¹, 张 岩^{1△}, 谭延国^{1△}

(首都医科大学附属复兴医院: 1. 检验科; 2. 妇产科, 北京 100038)

摘 要:目的 探讨湿片镜检、革兰染色镜检、阴道炎干化学五联检、阴道炎抗原三联检、核酸杂交和真菌培养等方法对阴道分泌物标本中外阴阴道假丝酵母菌(即念珠菌)的检出效果。方法 同时使用上述方法检测 211 例阴道分泌物标本, 并以真菌培养法为金标准对数据进行统计分析。结果 湿片镜检、革兰染色镜检、阴道炎干化学五联检、阴道炎抗原三联检及核酸杂交法检测外阴阴道假丝酵母菌(即念珠菌)的灵敏度分别为 43.48%、58.70%、63.04%、34.78% 和 71.74%, 特异度分别为 98.79%、98.18%、79.39%、96.36% 和 98.79%, 诊断符合率分别为 86.73%、89.57%、75.83%、82.94% 和 92.89%; 5 种方法分别与真菌培养法比较, Kappa 值(一致性检验)分别为 0.521、0.650、0.374、0.384 和 0.772; 相对于真菌培养法, 曲线下面积(AUC)分别为 0.711、0.784、0.712、0.656 和 0.853, 核酸杂交法 AUC 值最大, 阴道炎抗原三联检 AUC 值最小; 5 种方法总符合率为 60.66%。结论 5 种方法中, 核酸杂交法对念珠菌的检出效果最佳, 革兰染色镜检法和湿片镜检法次之, 阴道炎干化学五联检、阴道炎抗原三联检效果很不理想, 不建议单独使用; 5 种方法间总体符合率非常低, 不建议不同实验室和不同方法间进行比较。

关键词:念珠菌病, 外阴阴道; 酵母菌属; 内窥镜检查; 染色与标记; 核酸杂交

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.23.006

中图法分类号: R446.5

文章编号: 1673-4130(2018)23-2869-04

文献标识码: A

Performance evaluation of different methods for the detection of *Candida vulvovaginalis*

DONG Yihong¹, ZHANG Meng¹, WANG Lifang², CHE Dong Li¹, WANG Xue¹,
GAO Xuan¹, WANG Yingchen¹, LI Ge¹, LIU Qing¹, LI Pei¹, ZHANG Yan^{1△}, TAN Yanguo^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Fuxing
Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100038, China)

Abstract: Objective To explore the performance of different methods including wet-film microscopy, Gram staining microscopy, dry-chemistry based five joint tests, vaginitis pathogenic antigen based triplet tests, nucleic acid hybridization based method and fungal culture, for the detection of *Candida* in patients with *Candida vulvovaginalis* (*Candida*). **Methods** 211 vaginal secretions specimens were tested simultaneously for the existence of *Candida* with the methods menthioned above. Their performance was evaluated by comparing with fungal culture method, which serves as the golden standard. **Results** The sensitivity of the five methods (wet-film microscopy, Gram staining microscopy, dry-chemistry based five joint tests, vaginitis pathogenic antigen based triplet tests, nucleic acid hybridization based method and fungal culture), was 43.48%, 58.70%, 63.04%, 34.78% and 71.74%, respectively, their specificity was 98.79%, 98.18%, 79.39%, 96.36% and 98.79%, respectively, and their diagnostic conformity rates were 86.73%, 89.57%, 75.83%, 82.94%, and 92.89%, respectively. In comparison with fungal culture method, the Kappa values (consistency test) were 0.521, 0.650, 0.374, 0.384 and 0.772, respectively, the area under the curve (AUC) was 0.711, 0.784, 0.712, 0.656 and 0.853, respectively, and the total conformity rate of all of the five methods was 60.66%. **Conclusion**

For the detection of *Candida*, the performance of nucleic acid hybridization based method is the best among 5 methods evaluated, followed by Gram staining microscopy and wet-film microscopy, but the performance of dry-chemical quintuple examination of vaginitis and triple detection of vaginitis antigen were very poor, which are not recommended to be used alone. Since the overall conformity rate among the five methods is very low, it

作者简介:董一红,女,主管技师,主要从事临床检验基础学研究。* 共同第一作者:王丽芳,女,主治医师,主要从事妇产科临床常见疾病的研究。△ 通信作者, E-mail: tanyanguo61@126.com。

本文引用格式:董一红,王丽芳,张梦,等. 不同方法对外阴阴道假丝酵母菌病的检出效果[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(23): 2869-2872.

is meaningless to compare results obtained by different methods across different laboratories.

Key words: candidiasis, vulvovaginal; saccharomyces; endoscopy; staining and labeling; clinical enzyme tests; nucleic acid hybridization

女性生殖道感染是妇科常见疾病,具有发病率高、复发率高、流行范围广的特点^[1]。其中外阴阴道假丝酵母菌病(VVC)是临床较常见的由假丝酵母菌(亦称念珠菌)引起的阴道炎症^[2]。随着广谱抗菌药物的不恰当使用和免疫低下患者的不断增加,VVC的发病率逐年上升^[3]。调查显示,大约有75%的女性一生中至少患该病一次,有45%左右的女性可患该病两次或以上^[4]。VVC的主要临床表现为外阴瘙痒,有较多的白色豆渣样白带,给患者的日常生活及工作带来极大的困扰,故需要尽早诊断及治疗。VVC的诊断仅仅依靠患者的症状和体征是不够的,还有赖于阴道分泌物的检测^[5]。目前临床常用的检测方法有:显微镜镜检法(包括湿片法和革兰染色法)、干化学酶法、乳胶免疫层析法、核酸杂交法(探针法)、真菌培养法等。各种方法对VVC检出效果的评估虽均有报道,但鲜见使用同一批样本对上述方法进行平行比对的研究报道。本文以真菌培养为金标准^[6],使用上述方法同时测定211例阴道分泌物标本,以评估各种方法对VVC的检出效果。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 标本来源 以2018年1—5月于本院妇科门诊就诊患者为研究对象,选取阴道分泌物有不同程度异常、异味或阴道瘙痒等症状的患者共211例,年龄18~75岁,平均(37.64±10.74)岁,排除月经期、妊娠期及近期阴道用药史的患者,同时所有患者在检查前48 h内无性生活。

1.1.2 标本采集 分别使用阴道炎干化学五联检测试剂盒、阴道炎抗原三联检测试剂盒及核酸杂交法检测试剂盒提供的专用无菌拭子,由妇科医生借助窥器,于患者阴道后穹隆处采集阴道分泌物,将采样拭子分别放到各自的标本采集管中并立即送检。

1.2 检测仪器与方法

1.2.1 湿片镜检法 将阴道分泌物加少量生理盐水制备成湿片,显微镜下观察。镜下见真菌孢子和(或)菌丝,提示VVC。

1.2.2 阴道炎干化学五联检试剂盒 购自郑州安图绿科生物工程有限公司,为基于干化学酶法,可同时检测过氧化氢、白细胞酯酶、唾液酸苷酶、脯氨酸氨基肽酶和乙酰氨基葡萄糖苷酶、pH值等6项指标。实验操作严格按试剂盒说明书进行。如乙酰氨基葡萄糖苷酶显黄色(阳性,第5孔),同时pH≤4.6,则提示该患者为VVC。

1.2.3 阴道炎抗原三联检试剂盒 购自北京泰格科

信生物科技有限公司,为基于乳胶免疫层析法的抗原联合检测试剂盒,可同时分别测定白色念珠菌、阴道毛滴虫和阴道加德纳菌抗原。实验严格按说明书操作。结果判定:当白色念珠菌孔检测线和质控线同时出现时,表明样本中含白色念珠菌抗原,为阳性;仅质控线出现条带,样本中不含有白色念珠菌抗原或含量低于可检测范围,为阴性。

1.2.4 核酸杂交法 采用BD公司Affirm VPⅢ核酸杂交法试剂盒,可同时检测念珠菌(包括白色念珠菌、光滑念珠菌、乳酒念珠菌、克柔念珠菌、近平滑念珠菌和热带念珠菌等菌种)、阴道毛滴虫和阴道加德纳菌。严格按说明书进行实验操作。阳性为目标微生物微球(Candida)显蓝色,提示样本中存在念珠菌属。

1.2.5 真菌涂片革兰染色法、培养法

1.2.5.1 革兰染色法 标本直接涂片自然晾干,迅速通过火焰2~3次固定,常规革兰染色后油镜镜检。镜下见真菌孢子和(或)菌丝提示患者为VVC。

1.2.5.2 真菌培养法 将标本接种于沙氏培养基,放于(27±1)℃恒温培养箱中培养并观察生长情况,挑选可疑菌落涂片进行革兰染色,证实为念珠菌后,再转种柯玛嘉念珠菌显色培养基进行菌种鉴别(必要时采用微生物鉴定仪),并以此方法作为诊断VVC的金标准方法。上述所有操作严格按照《全国临床检验操作规程》(第4版)^[7]执行。

1.3 统计学处理 应用SPSS20.0统计软件进行数据分析,5种方法与金标准方法的一致性比较采用Kappa检验,判断标准:Kappa≥0.75为一致性较好,0.75>Kappa≥0.4为一致性一般,Kappa<0.4一致性差;5种方法与金标准的差异性采用配对 χ^2 检验,检验水准为 $P\leq 0.05$ 。各种方法诊断效能分别使用受试者工作特征曲线(ROC曲线)进行评估,曲线下面积(AUC)在0.50~0.70表示诊断价值较低、>0.70~0.90表示诊断价值中等、>0.90表示诊断价值较高。

2 结果

2.1 VVC的流行情况 在211例患者中,如以真菌培养法为金标准,则VVC检出率为21.80%(46/211)。经进一步鉴定显示,白色假丝酵母菌占78.26%(36/46),光滑假丝酵母菌占17.39%(8/46),近平滑假丝酵母菌占2.17%(1/46),热带假丝酵母菌占2.17%(1/46),VVC以白色假丝酵母菌为主。如以革兰染色涂片镜检、核酸杂交法和培养法任意一种方法检出假丝酵母菌为准,则VVC在妇科门诊患者

中的流行率为 24.17%(51/211)。

2.2 与真菌培养法相比,5 种方法的检测效果及检测一致性分析 使用配对 χ^2 检验,5 种方法检出 VVC 的能力均显著低于真菌培养法($P<0.05$)。经 Kappa 一致性检验发现,几种方法中,核酸杂交法与真菌培养法具有最高一致性(Kappa=0.772),干化学五联检、抗原三联检与真菌培养法的一致性均较差(Kappa=0.374、0.384)。见表 1、2。

2.3 以真菌培养法为金标准,5 种方法诊断 VVC 的性能评估 核酸杂交法具有较高的灵敏度与特异度、阳性预测值与阴性预测值,与真菌培养法诊断符合率最高;抗原三联检的灵敏度与阴性预测值最差,干化学五联检与真菌培养法的诊断符合率最低;湿片镜检法与染色镜检法灵敏度较低,但特异度相对较高。见

表 2 湿片镜检法、革兰染色法及核酸杂交法与真菌培养法检出效果比较及 Kappa 一致性分析

真菌培养法	湿片镜检法			革兰染色法			核酸杂交法		
	+	—	合计	+	—	合计	+	—	合计
+	20	26	46	27	19	46	33	13	46
—	2	163	165	3	162	165	2	163	165
合计	22	189	211	30	181	211	35	176	211
P (配对 χ^2)	0.000			0.000			0.000		
χ^2	68.800			95.400			129.300		
P (一致性)	0.000			0.001			0.007		
Kappa 值	0.521			0.650			0.772		

注: + 表示阳性, — 表示阴性

表 3 5 种方法诊断 VVC 的性能评估结果

指标	湿片镜检法	干化学五联检法	抗原三联检法	核酸杂交法	革兰染色法
敏感度(%)	43.48	63.04	34.78	71.74	58.70
特异度(%)	98.79	79.39	96.36	98.79	98.18
阳性预测值(%)	90.91	46.03	72.73	94.29	90.00
阴性预测值(%)	86.24	88.51	84.13	92.61	89.50
假阳性率(%)	1.21	20.61	3.64	1.21	1.82
假阴性率(%)	56.52	36.96	65.21	28.26	41.30
阳性似然比(PLR)	35.93	3.06	9.55	59.29	32.25
阴性似然比(NLR)	0.57	0.47	0.68	0.29	0.42
诊断符合率(%)	86.73	75.83	82.94	92.89	89.57
曲线下面积(AUC)	0.711	0.712	0.656	0.853	0.784

2.4 5 种方法诊断 VVC 的 ROC 曲线分析 应用 5 种检测方法的灵敏度与特异度做 ROC 曲线,并计算曲线下面积(AUC),结果显示,核酸杂交法 AUC 值最大,抗原三联检法 AUC 值最小。见图 1。

2.5 5 种方法的总符合率 在 211 例入选标本中,所有检测方法都呈阳性的共 6 例(2.84%),都呈阴性的

表 3。

表 1 抗原三联检、干化学五联检与真菌培养法检出效果比较及 Kappa 一致性分析

真菌培养法	抗原三联检			干化学五联检		
	+	—	合计	+	—	合计
+	16	30	46	29	17	46
—	6	159	165	34	131	165
合计	22	189	211	63	148	211
P (配对 χ^2)	0.000			0.000		
χ^2	37.400			30.900		
P (一致性)	0.000			0.024		
Kappa 值	0.384			0.374		

注: + 表示阳性, — 表示阴性

共 122 例(57.82%),总体符合率为 60.66%(128/211)。

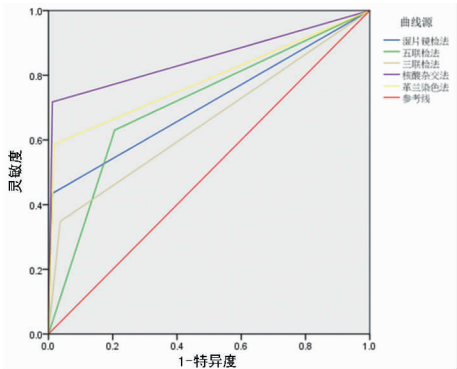


图 1 5 种方法诊断 VVC 的 ROC 曲线图

3 讨论

VVC 是妇科常见的阴道炎症之一,表现为外阴奇痒,可伴有外阴烧灼感、尿急、尿痛和性交痛,严重时坐卧不宁、痛苦异常。而且该病极易复发,影响妇女的身心健康[8]。故灵敏、准确的实验室检测方法,有助于 VVC 的及早诊断及合理治疗。

目前我国有多种基于不同原理的常规方法用于对各种阴道病的诊断和鉴别诊断[9]。由于真菌培养

有较高的灵敏度和特异度,可鉴定到种,并可进一步做药敏试验,虽然因为费时费力很少作为实验室的常规方法,但仍是诊断真菌感染的“金标准”^[10]。本研究以真菌培养法为金标准,对上述 5 种方法(其中酶法、免疫法及核酸杂交法采用成熟的商品试剂盒)对 VVC 的检测性能进行了系统评估。

在本院妇科就诊的人群中,VVC 的流行率为 24.17%(51/211),其中以白色假丝酵母菌为主,占 78.26%(36/46),这与文献报道一致^[11]。几种检测方法中以核酸杂交法灵敏度最高(71.74%),特异度最好(98.79%),阳性预测值为 94.29%,诊断符合率为 92.89%,与文献报道接近^[12]。核酸杂交法使用针对白假丝酵母菌、光滑假丝酵母菌、乳酒假丝酵母菌、克柔假丝酵母菌、近平滑假丝酵母菌和热带假丝酵母菌等菌种的探针,覆盖菌谱较广,且核酸杂交法特异度高,故检出率高。

本研究结果显示,湿片镜检法、革兰染色法的灵敏度明显低于文献报道^[13-15],这从另一个侧面反映出该法可能受制片、阅片等人为因素影响更大;干化学五联检、抗原三联检与真菌培养法的一致性较差($Kappa=0.374$, $Kappa=0.384$),检出率偏低,可能与干化学五联检中乙酰氨基葡萄糖苷酶在使用干化学酶法测定时受类似物的干扰较多,样本中菌体数目较少,导致酶量或酶活力不足以催化底物显色,以及试剂盒只能检测白假丝酵母菌和热带假丝酵母菌,从而影响了检出率^[15];抗原三联检法(免疫学法)只包被了针对白假丝酵母菌的抗体,故无法检出其他种类的真菌。

另外,本研究还显示,有 2 例湿片镜检法阳性、而真菌培养为阴性的样本,其中 1 例核酸杂交法为阳性,另外 1 例革兰染色为阳性,说明这 2 例湿片法结果的判读无误,培养法漏检可能与接种时取材量有关。另外,在革兰染色直接镜检法阳性、而真菌培养为阴性的 3 例样本中,有 1 例湿片镜检法为阳性,另外 2 例核酸杂交法为阳性。说明几种方法在对 VVC 的检测方面具有一定的互补性。

4 结 论

湿片镜检法和革兰染色法操作简便、成本低廉,但极易受操作者技术水平的影响,漏检率高;真菌培养法虽然准确性高,但操作复杂、周期长,无法作为常规检测方法;干化学五联检法和抗原三联检法虽然为近年来出现的新方法,但方法学仍不成熟,检测效果亟待提高;核酸杂交法则为培养法之外最好的选择,

但仍存在操作复杂、检测周期长、检测费用高等缺点。由于方法之间总体符合率非常低,不建议不同实验室、不同方法学之间进行比较。实验室应根据自己的实际情况选择合适的检测方法,推荐联合检测以提高检出率。

参考文献

- [1] DOERFLINGER S Y, THROOP A L, HERBST-KRALOVETZ M M. Bacteria in the vaginal microbiome alter the innate immune response and barrier properties of the human vaginal epithelia in a Species-Specific manner[J]. J Infect Dis, 2014, 209(12): 1989-1999.
- [2] 张丽娟. 妊娠期外阴阴道假丝酵母菌病的研究进展[J]. 中国计划生育学杂志, 2014, 22(8): 566-569.
- [3] MADHAVAN P, JAMAL F, CHONG J, et al. Identification of local clinical candida isolates using CHROM agar candida TM as a primary identification method for various candida species[J]. Trop Biomed, 2011, 28(2): 269-274.
- [4] 王英, 余平, 贝宁, 等. 孕妇阴道假丝酵母菌携带特征及其药敏检测[J]. 现代预防医学, 2015, 42(23): 4276-4279.
- [5] 沈莉. 妇女阴道分泌物检查结果的分析探讨[J]. 云南医药, 2016, 37(5): 564-565.
- [6] 马建伟, 袁应华, 范列英, 等. 胶体金法联合涂片镜检法在诊断外阴阴道假丝酵母菌病中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(1): 25.
- [7] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 196-197.
- [8] 罗兰兰, 李卫, 陈娟. 复发性外阴阴道假丝酵母菌病诊治研究进展[J]. 现代医学, 2017, 45(12): 1844-1847.
- [9] 刘志贤, 李剑鸿. 外阴阴道念珠菌检测方法的研究进展[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(16): 2039-2042.
- [10] THOMAS P A. Current perspectives on ophthalmic mycoses[J]. Clin Microbiol Rev, 2003, 16(4): 730-797.
- [11] 鄢雯影. VVC 相关阴道微生态研究进展[J/CD]. 实用妇科内分泌杂志(电子版), 2017, 4(19): 11-13.
- [12] 刘贝贝. 阴道炎 Affirm VPⅢ检测方法与传统方法检测效果的比较分析[D]. 昆明医科大学, 2014.
- [13] 温德胜. 对比分析不同检验方法对外阴阴道假丝酵母菌病的检验效果[J]. 中国医药指南, 2013, 11(27): 356-357.
- [14] 秦泽鸿, 巴艳红. 阴道炎五联检测与传统方法的联合应用[J]. 吉林医学, 2012, 33(6): 1142.
- [15] 郑阳, 陈良. 阴道炎五联检试剂盒检测 245 例白带样本的结果分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(18): 2660-2662.