

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.35.009

## 阴道分泌物念珠菌感染检测方法对比分析\*

刘小琦,杜琼,刘祥琴

(四川省人民医院检验科,成都 610072)

**[摘要]** **目的** 分析常规镜检、荧光 PCR 核酸扩增法和真菌显色培养法在阴道分泌物真菌检测结果的相关性。**方法** 选取 2014—2016 年于该院就诊的疑似阴道炎患者,收集镜检阴道分泌物真菌阳性和阴性标本各 500 例,用荧光 PCR 核酸扩增法鉴定念珠菌类型,并将 100 份荧光 PCR 核酸扩增法检测结果阳性标本进行真菌微生物培养,验证分型结果的正确率。**结果** 荧光 PCR 核酸扩增法和常规镜检一致性检验 Kappa 值为 0.632,二者一致性差。500 例患者阴道分泌物常规镜检阳性标本,荧光 PCR 核酸扩增法测得白色念珠菌感染 382 例(76.4%),光滑假丝酵母菌感染 73 例(14.6%),热带假丝酵母菌感染 10 例(2.0%),白色念珠菌合并光滑假丝酵母菌感染 3 例(0.6%),其他真菌感染 32 例(6.4%)。500 例患者阴道分泌物常规镜检阴性标本,荧光 PCR 核酸扩增法鉴定阳性共 152 例,其中白色念珠菌 130 例,光滑假丝酵母菌 16 例,热带假丝酵母菌 6 例。荧光 PCR 核酸扩增法与 CHROMAgar 快速显色法检测结果比较,差异无统计学意义( $\chi^2=0.131, P=0.936$ )。**结论** 对于有临床表现而镜检阴性的患者,建议行荧光 PCR 核酸扩增快速分型鉴定或真菌培养鉴定。

**[关键词]** 阴道分泌物;阴道炎;荧光 PCR;念珠菌,白色;念珠菌,光滑;念珠菌,热带

**[中图分类号]** R446.5;R711.3

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2017)35-4927-03

## Comparative analysis on candida infection detection methods of vaginal secretion\*

Liu Xiaoqi, Du Qiong, Liu Xiangqin

(Department of Clinical Laboratory, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610072, China)

**[Abstract]** **Objective** To analyze the correlation among 3 kinds of detection methods of routine microscopic examination, fluorescence PCR nucleic acid amplification and fungal color culture in the fungal detection of vaginal secretion. **Methods** The patients with suspected vaginitis treated in this hospital during 2014—2016 were selected. Each 500 cases of negative and positive vaginal secretion samples by microscopic examination were collected. The candida types were identified by using the fluorescence PCR nucleic acid amplification, then 100 samples with the positive results of fluorescence PCR nucleic acid amplification for detecting fungal were performed the fungal microbial culture to verify the accuracy rate of typing results. **Results** The Kappa value of consistency test between fluorescence PCR nucleic acid amplification and routine microscopic examination was 0.632, the consistency between them was poor. Among 500 positive samples of vaginal secretion detected by routine microscopic examination, 382 cases (76.4%) of *Candida albicans* infection were detected by fluorescence PCR nucleic acid amplification, 73 cases (14.6%) were *Candida glabrata* infection, 10 cases (2.0%) were *Candida tropicalis* infection, 3 cases (0.6%) were *Candida albicans* combined *Candida glabrata* infection and 32 cases (6.4%) were other fungal infection. Among 500 negative samples by conventional microscopic examination, 152 positive cases were identified by fluorescence PCR nucleic acid amplification, including 130 cases of *Candida albicans*, 16 cases of *Candida glabrata* and 6 cases of *Candida tropicalis*. There was no statistical significant difference in positive rate between the fluorescence PCR nucleic acid amplification and CHROMAgar rapid color method ( $\chi^2=0.131, P=0.936$ ). **Conclusion** For the patients with clinical manifestations and negative microscopic examination results, it is recommended to conduct fluorescence PCR nucleic acid amplification rapid type identification or fungal culture identification.

**[Key words]** vaginal secretions; vaginitis; fluorescence PCR; *Candida albicans*; *Candida glabrata*; *Candida tropicalis*

阴道炎是由念珠菌、阴道细菌、阴道滴虫等不同病原体引起的一种常见妇科疾病,由念珠菌引起的阴道炎占 20%~45%,细菌引起的阴道炎占 30%~50%,阴道滴虫感染占 10%~30%,混合感染占 15%~20%<sup>[1-2]</sup>。约 75% 的女性一生中至少经历过一次念珠菌性阴道炎发作<sup>[3]</sup>。近年来,由于广谱抗菌药物、肾上腺皮质激素、免疫抑制剂等的大量使用,其发病率在世界各地呈明显上升趋势<sup>[4-5]</sup>。目前,念珠菌检查主要通过取阴道分泌物涂片镜检而得。但有时患者临床症状与镜检结果不符,误导临床医生的判断。而阴道分泌物真菌培养鉴定结果至少需要 5~7 d 才能出具完整的培养报告,不能为门诊

患者提供及时准确的诊断,不能满足治疗需求。因此,急需将分子扩增技术应用于检测和鉴定真菌性阴道炎。荧光 PCR 核酸扩增法作为一项先进的分子生物学检测方法,已广泛应用于微生物的快速检验中<sup>[6-7]</sup>。为此,本研究收集 1 000 份门诊常规镜检阴道分泌物进行荧光 PCR 核酸扩增分型检测和 CHROMAgar 念珠菌显色培养基分型,并将三者的结果进行比较分析,以探讨不同方法检验阴道念珠菌感染的效果差异,指导临床选择合理、快速、准确、有效的检查方法。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2014—2016 年于本院就诊的疑似阴道

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81271047);四川省科技厅科研基金(2016JY0082);四川省卫生和计划生育委员会科研基金(17PJ504)。作者简介:刘小琦(1976—),副主任技师/副研究员,硕士,主要从事疾病分子诊断研究。

炎患者,其中阴道分泌物常规镜检真菌阳性者(找到典型芽孢和假菌丝者,或白细胞较多可疑者)500例,常规镜检真菌阴性者(白细胞较多,细菌阴性)500例。阴道分泌物标本由本院妇产科医生按标准程序采集,放入含2 mL生理盐水的采样管密封后,立即送检。

**1.2 仪器与试剂** (1)主要仪器:5417R型高速低温离心机(德国Eppendorf公司),恒温金属浴(德国Eppendorf公司),7500荧光定量PCR仪(美国ABI公司)。(2)试剂:白色念珠菌、光滑假丝酵母菌、热带假丝酵母菌核酸检测试剂盒,均购自泰普生物科学(中国)有限公司;CHROMAger念珠菌显色培养基购自宝杰罗生物科技公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 荧光PCR核酸扩增法** 按照实验室标准操作规程提取阴道分泌物DNA,并分别吸取5  $\mu$ L提取液加入白色念珠菌、光滑假丝酵母菌、热带假丝酵母菌核酸特异性Taqman探针PCR反应液管中,经美国ABI公司7500荧光定量PCR仪扩增后分析数据。

**1.3.2 常规镜检法** 按照《全国临床检验操作规程(第4版)》的规范要求,将阴道分泌物涂抹于滴有生理盐水的载玻片上,再滴加5%氢氧化钠(NaOH)两滴,观察有无真菌孢子和(或)假菌丝,若观察到则判为阳性结果。

**1.3.3 CHROMAger念珠菌显色培养基培养鉴定** 取100份荧光PCR核酸检测阳性的标本接种于沙保罗培养基培养24~48 h后,挑单个菌落,接种于CHROMAger念珠菌显色培养基上,对菌落的大小、形态、颜色及边缘情况不同的菌落进行分别转种,于35  $^{\circ}$ C培养24~48 h,根据颜色变化进行结果判定:绿色或翠绿色为白假丝酵母菌;蓝灰色或铁蓝色为热带假丝酵母菌;粉红色干燥菌落为克柔假丝酵母菌;白色为光滑念珠菌或其他酵母菌。

**1.4 统计学处理** 采用SPSS13.0统计软件进行数据分析,计数资料以例数表示,分析采用McNemar配对 $\chi^2$ 检验和Kappa一致性检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 常规镜检法与荧光PCR核酸扩增法对阴道分泌物真菌检测结果的相关性** 58例常规镜检阴性而荧光PCR核酸法检测为阳性;11例常规镜检阳性而荧光PCR核酸扩增法检测为阴性。经配对 $\chi^2$ 检验,两种方法比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );一致性检验结果显示,Kappa值为0.632,在0.40~0.75之间,两种方法一致性差,见表1。

表1 荧光PCR核酸扩增法和常规镜检结果(n)

荧光PCR核酸扩增法	常规镜检法		合计
	阳性	阴性	
阳性	468	152	620
阴性	32	348	380
合计	500	500	1 000

**2.2 荧光PCR核酸扩增法真菌鉴定结果** 在500例患者常规镜检阳性标本中,通过荧光PCR核酸扩增法检测出引起真菌性阴道炎的真菌,其中白色念珠菌382例(76.4%),光滑假丝酵母菌73例(14.6%),热带假丝酵母菌10例(2.0%),白色念珠菌合并光滑假丝酵母菌3例(0.6%),其他真菌32例(6.4%)。常规镜检阴性500例,荧光PCR核酸扩增法鉴定阳性共152例,其中白色念珠菌130例(85.5%),光滑假丝酵母

菌16例(10.5%),热带假丝酵母菌6例(3.9%);可见真菌性阴道炎主要致病菌为白色念珠菌。

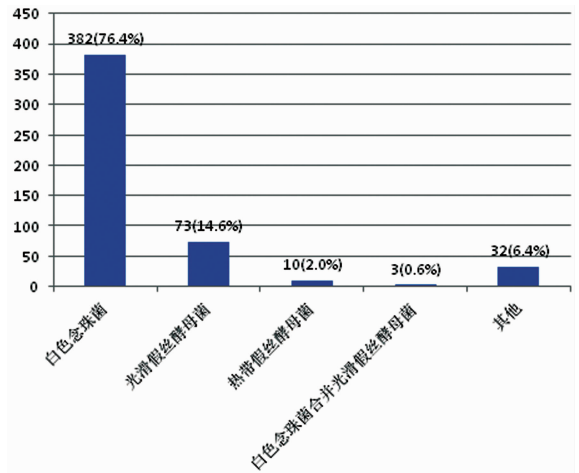


图1 500份常规镜检阳性标本经荧光PCR核酸扩增法鉴定真菌谱

**2.3 荧光PCR核酸扩增法与CHROMAger快速显色法检测结果比较** 100份标本经荧光PCR核酸扩增法测出1份为光滑念珠菌感染,2份为热带念珠菌感染,而CHROMAger快速显色法未鉴定出,经 $\chi^2$ 检验,两种方法检验结果比较差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.131, P = 0.936$ ),见表2。

表2 荧光PCR核酸扩增法和CHROMAger快速显色法鉴定结果

检测方法	白色念珠菌	光滑念珠菌	热带念珠菌	合计
荧光PCR核酸扩增法	72	21	7	100
CHROMAger快速显色法	72	19	6	97

## 3 讨论

念珠菌是人体正常菌群之一,约10%健康无症状妇女的阴道分泌物可培养出此菌。目前,念珠菌属感染已成为引起阴道感染的第二大病因,发病仅次于细菌性阴道炎<sup>[8]</sup>。据统计,主诉阴道分泌物增多的非妊娠妇女中约10%阴道中检出该菌,孕妇中约1/3阴道中检出该菌<sup>[9]</sup>。典型的阴道分泌物呈白色黏稠厚豆渣样,涂片在显微镜下易观察到孢子和假菌丝,结合临床表现,不难诊断。但有些病例临床症状与镜检不符,本研究有152例涂片检查阴性标本,经荧光PCR核酸扩增法检测后,鉴定为阳性结果,说明常规镜检会导致约1/3的真菌性阴道炎患者漏检,故对于有临床症状而镜检未查见真菌的患者,有必要通过PCR核酸扩增或经过真菌培养进行诊断。

近年来,由于环境污染、过度的非处方抗真菌药物的应用、不规范治疗,特别是耐药菌株的出现,导致念珠菌阴道炎的致病菌谱发生了较大的变化。这些念珠菌使用传统方法鉴别比较困难且耗时,因此有必要将念珠菌阴道炎的念珠菌菌种进行快速有效的区分。本研究发现,白色念珠菌是引起念珠菌性阴道炎的主要菌种(占76.4%),光滑念珠菌次之(占14.6%),这与Martens等<sup>[10]</sup>报道的数据相似。目前念珠菌阴道炎诊断的检测方法主要还是显微镜镜检结合微生物真菌培养,CHROMAger真菌培养显色法可用于念珠菌的分离和鉴定,但只对白色念珠菌和热带念珠菌的特异性和敏感性较高,且检查过程较为费时<sup>[11-12]</sup>。本研究采用荧光PCR核酸扩增法检测念珠菌DNA,与CHROMAger显色培养基法对照,两种方法检

测结果差异无统计学意义( $P>0.05$ ),表明荧光 PCR 核酸扩增法的准确性高。而 PCR 核酸扩增法直接将阴道炎分泌物提取不进行菌落培养,节省培养时间 1~2 d,并且可一次鉴定出常见的致病念珠菌菌种,从而有利于缩短诊断周期,并能准确地诊断念珠菌阴道炎。这对于减轻患者痛苦,提高治疗效果起到十分重要的作用。

本研究中有 32 份标本镜检阳性而荧光 PCR 核酸扩增法检测为阴性,经标本来源及检测方法分析,可能是由于该 32 份镜检阳性标本所感染的真菌并非本研究 PCR 法检测的 3 种真菌,而使得镜检和 PCR 核酸扩增检测结果不一致,因此,两种方法结果可以互为补充。

在 500 例患者常规镜检阳性标本中通过荧光 PCR 核酸扩增法检测,有 3 例为白色念珠菌和光滑念珠菌混合感染,分析原因可能为:(1)荧光 PCR 核酸扩增法灵敏度高,不能区分标本中的活菌与死菌,当真菌死亡后有可能残留一些 DNA,也能被检测出来,但不一定说明被检者感染了念珠菌,导致假阳性结果的出现;(2)反应体系中存在外源 DNA 片段,也可能导致假阳性结果;(3)患者的确为两种念珠菌混合感染。念珠菌本是人体正常菌群之一,但其与阴道内其他正常菌株相互制约的平衡被打破,可能导致阴道念珠菌病的发生<sup>[13]</sup>。故应结合患者的具体病史、临床症状和体征进行分析,必要时重新采样。

从以上念珠菌检测方法的方法学上分析,3 种方法各有利弊。盐水涂片法操作简单、方便快捷,由于阴道分泌物标本细胞干扰成分较多,涂片镜检法不易观察到芽生孢子和假菌丝,易造成漏检和误检,但是适合大规模早期检查。显色培养法阳性率和准确度最高,不同酵母菌菌落呈现不同的颜色及形态,而且能做鉴定和药敏试验,指导临床针对性用药,尤其对顽固性复发的念珠菌感染更为有用。但是,其缺点是操作繁琐,耗时长,需要 2~4 d,不利于早期诊断和治疗,且费用较贵。若实验室洁净度不达标,或培养箱 CO<sub>2</sub> 浓度、温度不达标,则结果容易产生误差。但对于迁延不愈的耐药性念珠菌阴道炎患者却有着重要意义。因此可根据需要采用不同的检测手段。若将常规镜检、真菌培养方法和 PCR 技术相结合使用,那么对阴道念珠菌病的检测将会更加有效,有利于解决临床诊断滞后于治疗的问题。

综上所述,白色念珠菌仍然是念珠菌性阴道炎患者最常见致病菌。3 种检测方法各有利弊,荧光 PCR 核酸扩增法能快速准确检测和鉴定出临床最常见的致病念珠菌。但在门诊检验和筛查中,真菌涂片镜检操作简单、快速,有利于早期诊断,仍为首选,但漏检率高。显色培养法阳性检出率高且能进行药敏试验。检验师应结合患者的临床症状和体征,协助医师综合分析检验报告,做出早期诊断和鉴别诊断,促使真菌性阴道炎患者早日康复。

## 参考文献

[1] Hainer BL, Gibson MV. Vaginitis[J]. Am Fam Physician,

2011,83(7):807-815.

[2] Quan M. Vaginitis: diagnosis and management[J]. Postgrad Med, 2010, 122(6): 117-127.

[3] Nwokolo NC, Boag FC. Chronic vaginal candidiasis. Management in the postmenopausal patient[J]. Drugs Aging, 2000, 16(5): 335-339.

[4] Koehler P, Cornely OA. Contemporary strategies in the prevention and management of fungal infections[J]. Infect Dis Clin North Am, 2016, 30(1): 265-275.

[5] Erdogan A, Rao SS. Small intestinal fungal overgrowth [J]. Curr Gastroenterol Rep, 2015, 17(4): 16.

[6] Mendling W. Vaginal microbiota[J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 902: 83-93.

[7] Demkin VV, Koshechkin SI, Slesarev A. A novel real-time PCR assay for highly specific detection and quantification of vaginal lactobacilli [J]. Mol Cell Probes, 2017, 32: 33-39.

[8] Seider K, Brunke S, Schild L, et al. The facultative intracellular pathogen *Candida glabrata* subverts macrophage cytokine production and phagolysosome maturation[J]. J Immunol, 2011, 187(6): 3072-3086.

[9] Abdelaziz ZA, Ibrahim ME, Bilal NE, et al. Vaginal infections among pregnant women at Omdurman Maternity Hospital in Khartoum, Sudan [J]. J Infect Dev Ctries, 2014, 8(4): 490-497.

[10] Martens MG, Hoffman P, El-Zaatari M. Fungal species changes in the female genital tract[J]. J Low Genit Tract Dis, 2004, 8(1): 21-24.

[11] Payne MS, Cullinane M, Garland SM, et al. Detection of *Candida* spp. in the vagina of a cohort of nulliparous pregnant women by culture and molecular methods; Is there an association between maternal vaginal and infant oral colonisation? [J]. Aust N Z J Obstet Gynaecol, 2016, 56(2): 179-184.

[12] Weissenbacher T, Witkin SS, Ledger WJ, et al. Relationship between clinical diagnosis of recurrent vulvovaginal candidiasis and detection of *Candida* species by culture and polymerase chain reaction[J]. Arch Gynecol Obstet, 2009, 279(2): 125-129.

[13] Darvishi M, Jahdi F, Hamzegardeshi Z, et al. The Comparison of vaginal cream of mixing yogurt, honey and clotrimazole on symptoms of vaginal candidiasis[J]. Glob J Health Sci, 2015, 7(6): 108-116.

(收稿日期:2017-06-15 修回日期:2017-09-15)

(上接第 4926 页)

[8] Waidely E, Al-Yuobi AR, Bashammakh AS, et al. Serum protein biomarkers relevant to hepatocellular carcinoma and their detection[J]. Analyst, 2016, 141(1): 36-44.

[9] Liu T, Yao M, Liu S, et al. Serum golgi protein 73 is not a suitable diagnostic marker for hepatocellular carcinoma [J]. Oncotarget, 2017, 8(10): 16498-16506.

[10] Dai M, Chen X, Liu X, et al. Diagnostic value of the combination of golgi protein 73 and Alpha-Fetoprotein in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis [J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0140067.

(收稿日期:2017-07-11 修回日期:2017-09-15)