

• 检验技术与方法 •

荧光定量 PCR 检测解脲脲原体不同生物群的临床应用

丁进亚¹, 杨 斌², 黄前川¹, 徐 娟¹, 徐鸣皋¹

(广州军区武汉总医院: 1. 检验科; 2. 皮肤科, 武汉 430070)

摘要:目的 探讨解脲脲原体(Uu)的感染状态及生物分群。方法 采用荧光定量 PCR 技术对皮肤科和泌尿外科患者 157 例尿道/宫颈分泌物进行 Uu 分群; 分析 Uu 不同生物群与不同性别患者泌尿生殖道感染的临床症状和体征的相关性。结果 157 例标本中 96 例 Uu 呈阳性, 其中生物 1 群 57 例(阳性率 59.38%), 生物 2 群 39 例(阳性率 40.62%), 男性患者临床症状和体征的阳性率与 Uu 分群无关($P > 0.05$), 而女性生物 1 群感染者的临床症状和体征阳性率高于生物 2 群($P < 0.05$)。结论 我院患者 Uu 以生物 1 群为主, 生物 1 群可能是女性 Uu 感染的主要病原体, Uu 对男性致病性与分群无关。

关键词:聚合酶链反应; 解脲脲原体; 生物群

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.04.038

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)04-0462-02

解脲脲原体(Uu)是从非淋球菌尿道炎(NGU)患者的尿道分泌物中分离获得的一类没有细胞壁的原核生物, 根据其分解尿素的特性而命名。Uu 包括 2 个生物群, 14 个血清型, 其中生物 1 群或 Parvo 含 1、3、6、14 共 4 个血清型, 其他 10 个血清型归属于生物 2 群或 T960^[1]。它是较常见的泌尿生殖道寄生菌, 当临床检查到 Uu, 并不能确定是携带状态还是感染状态, 这给诊断与治疗带来困难, 是临床中亟待解决的问题^[2]。Uu 的致病性与患者年龄、性别、机体免疫力及病原体的毒力耐药性、数量等多种因素相关, 目前国内外学者关于 Uu 不同生物群的致病性强弱仍有分歧。因此, 将 Uu 进行分群研究和定量检测对 Uu 引起泌尿生殖道感染的诊断治疗具有一定临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 157 例标本采集于我院门诊皮肤科及泌尿科 2 周内未行药物治疗的初诊患者, 标本为男性尿道分泌物和女性尿道/宫颈分泌物, 其中男 87 例, 女 70 例, 年龄(32.5 ± 11.7)岁。应用 SPSS11.0 统计软件进行统计分析, 组间阳性率比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 示差异有统计学意义。

1.2 方法 每例标本经生理盐水洗涤、离心、加热裂解、DNA 提取等, 处理后同时做 Uu 和 Uu 生物 1 群检测。

1.2.1 Uu 检测 Uu 核酸扩增荧光定量试剂盒由中山医科大学达安基因公司提供, 其引物为 Uu 通用引物, 阳性结果提示感染或携带 Uu, 覆盖 Uu 14 个标准血清型, 不对 Uu 进行分型/群。反应条件为: 93 °C 2 min; 93 °C 45 s, 55 °C 60 s, 10 个循环; 93 °C 30 s, 55 °C 45 s, 30 个循环。根据标准曲线判定结果, 检测结果线性范围为(5.0 × 10² ~ 1.0 × 10⁸) copy/mL。

1.2.2 Up 检测 Uu 生物 1 群(Ureaplasma Parvum Up)荧光定量 PCR 检测试剂盒由武汉百泰基因公司提供, 适用于检测生殖泌尿道分泌物中 Uu 生物 1 群的 4 个血清型, 循环条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 45 s 5 个循环; 94 °C 30 s, 58 °C 45 s, 35 个循环。根据标准曲线判定结果, 检测结果线性范围为(5.0 × 10¹ ~ 1.0 × 10⁷) copy/mL。

1.2.3 Uu 生物群判断 结合上述两种定量检测结果, 对检出的 Uu 进行分群, 结果判断方法见表 1。

2 结 果

2.1 不同性别患者的 Uu 生物群分布 157 例标本中 96 例 Uu 呈阳性, 其中 Uu 生物 1 群 57 例(阳性率 59.38%), 20 例为男性(阳性率 35.08%), 37 例为女性(阳性率 64.91%); Uu 生物 2 群 39 例(阳性率 40.62%), 22 例为男性(阳性率

56.40%), 17 例为女性(阳性率 43.60%); 结果显示: 男性以生物 2 群为主(52.38%), 女性以 1 群为主(68.52%), 未见混合基因群感染。

2.2 Uu 与性别和临床症状的相关性 不同性别患者的临床症状阳性例数与其检出的 Uu 生物群之间的关系, 见表 2。Uu 生物 1 群、2 群感染所导致的男性临床症状和体征阳性率比较差异无统计学意义($\chi^2 = 0.77, P > 0.05$); Uu 生物 1 群所致女性临床症状和体征阳性率高于生物 2 群($\chi^2 = 4.81, P < 0.05$)。

表 1 解脲脲原体生物群判断

生物群	Uu、Up 检测结果
Uu 生物 1 群	Uu 阳性 = Up 阳性
Uu 生物 2 群	Uu 阳性且 Up 阴性
混合群感染	Uu 阳性 > Up 阳性

*: Uu 阳性为 Uu 的定量检测值; Up 阳性为 Uu 生物 1 群的定量检测值; 二者的阳性的临界值均为 1 × 10² copy/mL。

表 2 Uu 生物群与性别和临床症状阳性比较 [% (n/n)]

生物群	临床阳性症状和体征		合计
	男性	女性	
1 群	55.00(11/20)	78.38(29/37)	70.18(40/57)
2 群	68.18(15/22)	52.94(9/17)	61.54(24/39)

3 讨 论

Uu 是引起泌尿生殖道感染的主要病原体之一, 目前的报道病例数已跃居常见性传播疾病之首, 但是相当一部分 Uu 培养阳性的人群并没有临床症状和体征, 无需治疗。有文献报道: Uu 不同生物群(血清型)的致病性不同, 其在不同性别患者中的检出率也存在差异^[2-3]。本实验采用通用引物荧光定量 PCR 先检测出 Uu 阳性标本(覆盖 14 个血清型), 然后对阳性标本进行 Uu 生物 1 群(Up)荧光定量 PCR 检测, 确认是否为 1 群, 再根据定量检测结果对 Uu 进行分群(见表 1), 结果表明: 我院门诊皮肤科及泌尿科初诊患者中 Uu 生物 1 群为阳性率 59.38%, 生物 2 群阳性率 40.62%, 男性患者生物 1 群与 2 群近似, 女性以生物 1 群为主, 占 68.52%, 与卢荣标^[4]的报道相一致, 而目前国内对 Uu 各群分布率的报道存在较大差异^[5-6]。其原因可能与 Uu 地理分布、标本取材、检测方法等因

素相关。关于 Uu 的致病性目前尚无统一观点,钟山等^[7]认为不同生物群(基因群)的 Uu 与 NGU 和宫颈炎无关,曹玉璞和叶元康^[8]则认为 Uu 生物 2 群为男性泌尿道感染的潜在病原体,Uu 生物 1 群较 2 群对男性生育力的破坏强^[8-9],而徐小平等^[10]研究发现女性 Uu 感染与寄居均以 Uu 生物 1 群为主,Uu 生物 2 群与妇女 NGU 发病率具有显著相关^[10-11]。Uu 可一过性存在(或寄生)在人体泌尿生殖道而无临床症状,临床检查到 Uu 并不能判断是携带状态还是感染状态,因此患者的临床症状和体征对本病的诊断及是否需要治疗有重要指导作用。本实验中男性患者的标本中 Uu 生物 1 群、2 群的检出率与患者的临床症状和体征的阳性率无统计学差异($\chi^2=0.77, P>0.05$);而女性患者生物 1 群的检出率以及临床症状和体征的阳性率显著高于生物 2 群($\chi^2=4.81, P<0.05$),结果提示:Uu 生物 1 群、2 群对男性致病性无差异,而生物 1 群则是女性 Uu 感染中的优势菌群。

Uu 分群有助于临床明确诊断,同时还可以用于指导临床用药,国内外均有学者报道,不同 Uu 生物群对药物的敏感性不同,Uu 生物 1 群对治疗 Uu 的一线药物如大环内酯类的耐药率比 Uu 生物 2 群高^[4,12]。因此,开展临床 Uu 生物群的检测,区别对待 Uu 不同生物群感染的治疗,对合理地处理患者、减少临床不合理使用抗菌药物、避免耐药菌株产生与播散等具有重要意义。下一步我们将扩大样本量,采用 PCR 技术对不同 Uu 生物群进行分型,并结合 Uu 培养鉴定、体外药敏试验及临床治疗效果,进一步深入研究 Uu 生物群与泌尿生殖道感染的相关性。

参考文献

[1] Kong F, James G, Ma Z, et al. Phylogenetic analysis of Ureaplasma urealyticum support for the establishment of a new species, Ureaplasma parvum[J]. Int J Syst Bacteriol, 1999, 49(4): 1879-1889.

• 检验技术与方法 •

实时荧光核酸恒温扩增技术检测尿液中淋球菌的分析

高志华, 金 印, 陈 峰

(广东省东莞市南方医科大学广济医院检验科 523690)

摘要:目的 评价实时荧光核酸恒温扩增技术(SAT)检测淋球菌(NG)的特异性和敏感性。方法 对 218 例疑似患者生殖道拭子行 SAT, PCR 和 NG 培养检测, 同时对对应的 218 份尿液标本行 SAT 检测。结果 SAT 平行检测同一来源的拭子标本和尿液标本, 检测结果完全一致。与 NG 培养法相比, SAT 对尿液/拭子标本的检测灵敏度为 100.00%, 特异性为 99.27%; 与 PCR 法相比, SAT 对尿液/拭子标本的检测灵敏度为 100.00%, 特异性为 97.08%。SAT 法对拭子标本和尿液标本检测结果的符合率为 100.00%, 经卡方检验, 差异无显著性($\chi^2=0, P>0.05$)。结论 SAT 技术检测拭子及尿液中的 NG 具有很高的灵敏度和特异性, 与 NG 培养相比耗时短, 与 PCR 相比其可用于判愈, 防止过度治疗。为 NG 的实验室诊断提供新的检测方法。

关键词:尿分析; 实时荧光核酸恒温扩增技术; 聚合酶链反应

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.04.039

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)04-0463-02

实时核酸恒温扩增检测技术(simultaneous amplification and testing, SAT)是建立在 RNA 恒温扩增和实时荧光检测技术基础上的第二代核酸检测技术^[1]。其基本原理是同一温度下, 首先通过 M-MLV 逆转录酶产生靶核核酸(RNA)的 1 个双链 DNA 拷贝, 然后利用 T7 RNA 多聚酶从该 DNA 拷贝上产生多个(100~1 000 个)RNA 拷贝; 每个 RNA 拷贝再从逆转录开始进入下一个扩增循环; 同时, 带有荧光标记的探针和

[2] 任翊, 刘朝晖, 朱学骏. 妇科门诊人群宫颈解脲支原体检出情况及分群分型[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2002, 16(3): 155-157, 166.

[3] 袁红梅, 柯建良, 钟山, 等. 性病门诊患者解脲支原体分离株的分子分群及血清分型[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 29(9): 845-847.

[4] 卢荣标, 陆春, 马寒, 等. 不同生物群解脲支原体对红霉素耐药基因的分布差异[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2010, 24(8): 699-701.

[5] 张帝开, 李秀云, 覃春容, 等. 健康妇女下生殖道解脲支原体及其分群分型研究[J]. 中国微生态杂志, 2007, 19(3): 288-292.

[6] 蒋娟, 曹宁校, 王荷英, 等. 解脲支原体不同基因群与男性非淋菌性尿道炎相关性的研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2006, 39(5): 298-280.

[7] 钟山, 黄澍杰, 柯建良, 等. 解脲支原体基因群与非淋菌性尿道(宫颈)炎相关性研究[J]. 岭南皮肤性病科杂志, 2006, 13(2): 333-335.

[8] 曹玉璞, 叶元康. 支原体与支原体病[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 131.

[9] Zeighami H, Peerayeh SN, Yazdi RS, et al. Prevalence of Ureaplasma urealyticum and Ureaplasma parvum in semen of infertile and healthy men[J]. Int J STD AIDS, 2009, 20(2): 387-390.

[10] 徐小平, 李卓成, 艾辉, 等. 解脲支原体分群分型在妇女非淋菌性尿道炎诊断中的应用[J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17(21): 2647-2650.

[11] De Francesco MA, Negrini R, Pinsi G, et al. Detection of Ureaplasma biovars and polymerase chain reaction-based sub-typing of Ureaplasma parvum in women with or without symptoms of genital infections[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009, 28(6): 641-646.

[12] 马寒, 陆春, 朱国兴, 等. 解脲支原体生物群与体外抗菌药物敏感性关系的初步研究[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2008, 22(3): 415-417.

(收稿日期: 2011-10-15)

这些 RNA 拷贝特异结合, 产生荧光。该荧光信号可由荧光检测仪器实时捕获, 实时反映扩增循环情况。该技术具有高灵敏度、高特异性、低污染、反应稳定等优点。该技术作为新一代的核酸扩增检测技术能够广泛地应用到病原体检测、血液病毒筛查和环境微生物检测等领域。本文以尿液作为样本, 用 SAT 法、PCR 法及淋球菌培养法进行检测, 以评价 SAT 检测技术在淋球菌诊断中的应用价值。