

体外培养法与 RNA 等温扩增法对脲原体检测能力比较*

刘亚丽¹, 叶莎^{2#}, 张文娟³, 王洁⁴, 刘畅¹, 陈雨¹, 甘勇¹, 李军⁵, 窦亚玲^{1△}, 徐英春¹

(1. 中国医学科学院北京协和医院检验科, 北京 100730; 2. 巴州人民医院检验科, 新疆库尔勒 841000;

3. 保定市传染病医院检验科, 河北保定 071000; 4. 河北省人民医院检验科, 河北石家庄 050000;

5. 中国医学科学院北京协和医院皮肤科, 北京 100730)

摘要:目的 比较体外培养法与 RNA 等温扩增法对脲原体的检测能力。方法 2016 年 1—8 月共收集了 103 份就诊于北京协和医院门诊患者的首次尿标本。标本平均分成 3 份, 分别用于脲原体的检测。第 1 份采用 RNA 等温扩增法, 第 2 份采用体外培养法, 第 3 份采用体外培养联合测序法。其中, 体外培养联合测序法将作为参考方法, 横向评估体外培养法和 RNA 恒温扩增法对脲原体的检测能力。结果 基于体外培养联合测序法, 共有 24 例标本 (23.30%) 检测出了脲原体。其中, 14 例 (17.50%) 来自于男性, 10 例 (43.47%) 来自于女性, 差异有统计学意义 ($P=0.022$); 40~<50 岁脲原体检出率最高 (5/12, 41.67%)。与参考方法相比, 体外培养法的灵敏度和特异度分别为 75.00% (18/24) 和 100.00% (79/79); RNA 等温扩增法的灵敏度和特异度分别为 95.83% (23/24) 和 96.20% (76/79), 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。在 24 份检测出脲原体阳性标本中, 17 例 (70.83%) 为微小脲原体, 7 例 (29.17%) 为解脲脲原体, 未检查到微小脲原体和解脲脲原体共同存在的情况。18 例培养阳性标本进行了体外药敏测定, 其中环丙沙星和氧氟沙星的体外敏感性最差。结论 与培养联合测序法相比, 体外培养法和 RNA 等温扩增法均表现出了较好的灵敏度和特异度, 但从临床应用角度来讲, 二者联合使用可能会对脲原体感染的诊断和治疗提供更全面的指导。

关键词:脲原体; 体外培养法; RNA 等温扩增法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.06.009

中图法分类号: R446.5

文章编号: 1673-4130(2019)06-0674-04

文献标识码: A

Comparison of in vitro culture and RNA isothermal amplification for Ureaplasma detection*

LIU Yali¹, YE Sha^{2#}, ZHANG Wenjuan³, WANG Jie⁴, LIU Chang¹, CHEN Yu¹,GAN Yong¹, LI Jun⁵, DOU Yaling^{1△}, XU Yingchun¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Bazhou People's Hospital, Korla, Xinjiang 841000, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Infectious Diseases Hospital of Baoding, Baoding, Hebei 071000, China; 4. Department of Clinical Laboratory, Hebei General Hospital, Shijiazhuang, Hebei 050000, China; 5. Department of Dermatological, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China)

Abstract: **Objective** To compare the detection of Ureaplasma determined by in vitro culture and RNA isothermal amplification. **Methods** From January to August 2016, a total of 103 urine specimens were collected from outpatients of Peking Union Medical College Hospital. The specimens were divided into three parts for the detection of Ureaplasma. The first part was determined by RNA isothermal amplification assay, the second part was tested by in vitro culture, and the third part was detected by in vitro culture and sequencing. In vitro culture combined with sequencing will be used as a reference method to evaluate the detection ability of Ureaplasma tested by in vitro culture and RNA thermostatic amplification. **Results** Ureaplasma was detected in 24 specimens (23.30%) based on in vitro culture and sequencing. Among them, 14 specimens (17.50%) were male and 10 specimens (43.47%) were female, the difference was statistically significant ($P=0.022$). From

* 基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程重大协同创新项目 (2016-I2M-1-014)。

共同第一作者。 作者简介: 刘亚丽, 女, 助理研究员, 主要从事临床重要致病菌的流行病学及耐药机制研究。叶莎, 女, 主管技师, 主要从事临床重要致病菌的流行病学研究。 △ 通信作者, E-mail: douyaling@163.com。

本文引用格式: 刘亚丽, 叶莎, 张文娟, 等. 体外培养法与 RNA 等温扩增法对脲原体检测能力比较分析[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40 (6): 674-677.

the age group, the highest Ureaplasma detection rate was found in 40—<50 age group (5/12, 41.67%). Compared with the reference method, the sensitivity and specificity of in vitro culture were 75% (18/24) and 100.00% (79/79), and the sensitivity and specificity of RNA isothermal amplification were 95.83% (23/24) and 96.20% (76/79), respectively, the difference was not statistically significant ($P>0.05$). Of the 24 samples with positive ureaplasma detected, 17 cases (70.83%) were ureaplasma parvum, and 7 cases (29.17%) were ureaplasma urealyticum, and no co-existence of ureaplasma parvum and ureaplasma urealyticum was detected. 18 cases of positive specimens were also tested in drug susceptibility testing, of which ciprofloxacin and ofloxacin showed the lowest activity. **Conclusion** Compared with in vitro culture combined with sequencing, in vitro culture and RNA isothermal amplification showed better sensitivity and specificity, but from the point of view of clinical application, the combination of the two assays can provide more comprehensive guidance for the clinical diagnosis and treatment.

Key words: Ureaplasma; in vitro culture; isothermal RNA amplification assay

脲原体为黏膜相关病原体,主要存在于人体呼吸道及泌尿生殖道黏膜。当机体免疫力低下或接受侵袭性操作时,脲原体可进入血液引起感染甚至播散至其他器官。脲原体可通过直接接触进行传播,尤其在青春期中活跃健康人群下生殖道中可被分离到。从目前数据来看,脲原体可引起男性非衣原体、非淋球菌性尿道炎、急性附睾-睾丸炎、感染性结石,输卵管型不孕症、子宫内膜炎,还可引起极低体重儿的下呼吸道感染、先天性肺炎、菌血症等^[1-6]。此外,近期的研究数据还显示,由于脲原体会降低精液中精子浓度和影响精子活力而导致男性不育^[7-10]。目前,针对脲原体的检测方法有多种,包括显微镜检查、抗原检测、血清学试验、体外培养法、分子生物学检测等。其中,体外培养法和分子生物学检测在临床微生物实验室中开展较多,且对临床指导价值较大。通过体外培养的方法,24~48 h 就可检出脲原体,且可进行半定量和体外药敏。一般认为,当男性尿道脲原体数量 $>10^4$ CFU/mL 时,具有临床意义^[11-13]。分子生物学方法在对脲原体进行快速检测的同时,部分方法还可将微小脲原体和解脲脲原体进行很好区分^[14]。虽然,两种检测方法在国内多家实验室均有开展,但目前还没有关于二者横向对比的研究。本研究将培养联合测序法作为参考方法,横向评估体外培养法和 RNA 恒温扩增法对脲原体的检测能力,从而为临床诊断和治疗提供更有利的指导。现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 1—8 月就诊于北京协和医院皮肤性病科、妇产科、泌尿外科等多个临床科室,且送检标本为首次尿的患者,共计 103 例。

1.2 方法

1.2.1 采集标本 无论男女患者,仅留取清晨首次尿,或长时间(至少 2 h)不排尿后的前段尿 0.5 mL。

1.2.2 检测方法 送检后将标本平均分成 3 份,第 1 份采用 RNA 等温扩增法检测脲原体,第 2 份采用体

外培养法进行检测,第 3 份采用体外培养联合测序法进行检测,即培养结束后无论阳性阴性均要提取肉汤中核酸,进行普通 PCR 扩增和 Sanger 法测序。第 3 份测序的目的:(1)区分微小脲原体和解脲脲原体;(2)排除细菌污染可能。

1.2.3 观察指标 将体外培养联合测序法作为参考方法, RNA 恒温扩增法和单纯体外培养法作为待评估方法,分别评估两种待评估方法对脲原体检出的灵敏度和特异性。

1.2.4 体外培养 采用法国生物梅里埃 Mycoplasma IST 2 试剂盒进行脲原体的检测,具体操作步骤严格按照厂家说明书完成。药敏折点:四环素 $S\leq 4.00\ \mu\text{g/mL}$ $R\geq 8.00\ \mu\text{g/mL}$;多西环素 $S\leq 4.00\ \mu\text{g/mL}$ $R\geq 8.00\ \mu\text{g/mL}$;克拉霉素 $S\leq 1.00\ \mu\text{g/mL}$ $R\geq 4.00\ \mu\text{g/mL}$;阿奇霉素 $S\leq 0.12\ \mu\text{g/mL}$ $R\geq 4.00\ \mu\text{g/mL}$;红霉素 $S\leq 1.00\ \mu\text{g/mL}$ $R\geq 4.00\ \mu\text{g/mL}$;交沙霉素 $S\leq 2.00\ \mu\text{g/mL}$ $R\geq 8.00\ \mu\text{g/mL}$;环丙沙星 $S\leq 1.00\ \mu\text{g/mL}$ $R\geq 2.00\ \mu\text{g/mL}$;氧氟沙星 $S\leq 1.00\ \mu\text{g/mL}$ $R\geq 4.00\ \mu\text{g/mL}$;原始霉素 $S\leq 2.00\ \mu\text{g/mL}$ 。其中 S 代表敏感, R 代表耐药。

1.2.5 RNA 等温扩增法 脲原体核酸检测采用 RNA 等温扩增法(上海仁度生物科技有限公司),以 16S rRNA 作为靶基因。原理:带有 T7 启动子的引物与靶标 RNA 结合,开始逆转录合成 cDNA;在莫洛尼鼠白血病病毒逆转录酶 (M-MLV RT) RNase H 活性作用下,靶标 RNA 链降解,形成单链 cDNA;之后反向引物与 cDNA 结合,在 M-MLV RT 聚合酶活性作用下,产生靶标核酸 (RNA) 的一个双链 DNA 拷贝,且该双链带有 T7 启动子。在 T7 RNA 聚合酶作用下,一条 DNA 双链上产生多个 (100~1 000 个) RNA 拷贝;每一个 RNA 拷贝再从反转录开始进入下一个扩增循环。采用 Roche Light Cyclers 480 (美国) 主机扩增及 Roche Light Cyclers 480 Software release 1.5.0 SP4 进行数据分析。

1.2.6 普通 PCR 扩增与 Sanger 测序 从体外培养阳性和阴性的肉汤中提取核酸(德国 QIAamp MinElute Virus Spin Kit_DNA 提取试剂盒),针对其脲酶基因进行普通 PCR 扩增。针对脲原体采用通用引物-脲酶基因(GenBank 登录号 AF085724 和 AF085732),前引物:5'-CGA AAT TGT GAT GAA CGA AGG-3';后引物:5'-GGT GAT AGC GTT AGA TTA GGA G-3',418 bp^[15]。PCR 反应体系为 30 μL,采用高保真 PCR SuperMix I(北京天根生物科技有限公司),反应条件为 94 ℃ 4 min,94 ℃ 1 min,54 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,35 个循环,72 ℃ 10 min。扩增产物采用 Sanger 测序法测定其序列,引物与 PCR 扩增引物相同。测序结果分别与 GenBank AF085724 和 AF085732 进行比对,仅当序列比对一致率在>99% 时才被认为准确鉴定到种。

1.3 统计学处理 采用 SPSS24.0 进行统计学分析,3 种不同方法对脲原体进行检测,其检出率行 Pearson's χ^2 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 患者信息 该研究共收集了 103 份非重复尿标本,分别来自 103 例患者,其中男性 80 例(77.7%),女性 23 例(22.3%),男女构成比差异有统计学意义($P<0.05$)。103 例患者中,30~<40 岁 49 例(47.57%),患者人数最多;其余年龄段患者人数依次为 20~<30 岁 28 例(27.18%)、40~<50 岁 12 例(11.65%)、0~<20 岁 6 例(5.83%)、50~<60 岁 5 例(4.85%)、≥60 岁 3 例(2.91%)。

2.2 不同检测方法测定脲原体结果比较 基于体外培养联合测序的方法,共有 24 例标本(23.30%)检测出了脲原体,其中 14 例(17.50%)分离自男性,10 例(43.47%)分离自女性,差异有统计学意义($P=0.022$)。从年龄段来看,40~<50 岁脲原体检出率最高[41.67%(5/12)];其余年龄段检出率依次是 20~<30 岁 39.29%(11/28);30~<40 岁 16.33%(8/49);0~<20 岁 0%(0/6)、50~<60 岁 0%(0/5)和 ≥60 岁 0%(0/3)。如将体外培养联合测序法作为参考方法,横向评估体外培养法和 RNA 等温扩增法的灵敏度和特异度,其结果为体外培养法灵敏度和特异度分别为 75.00%(18/24)和 100.00%(79/79);RNA 等温扩增法的灵敏度和特异度分别为 95.83%(23/24)和 96.20%(76/79),差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。在体外培养法与 RNA 等温扩增法结果不一致的 8 例标本中,全部属于 RNA 等温扩增法阳性,体外培养法弱阳性或阴性,经培养联合测序验证后,有 5 例(62.5%)证实存在脲原体。

2.3 菌种鉴定 利用 PCR 联合测序的方法,对 24 份脲原体检出阳性标本进行了菌种鉴定。其中 17 例

(70.83%)为微小脲原体,7 例(29.17%)为解脲脲原体,未检查到二者共同存在的情况。

2.4 体外药敏 18 例培养阳性的标本进行了体外药敏测定,其中多西环素、交沙霉素、四环素、原始霉素敏感率 100.00%,克拉霉素、红霉素和阿奇霉素的敏感率>80.00%,环丙沙星和氧氟沙星的体外敏感率分别为 11.11%和 22.22%,见表 2。

表 1 不同检测方法测定脲原体结果比较

培养联合测序	体外培养	RNA 等温扩增法	合计(n)
+	+	+	18
+	±*	+	5
+	±*	-	1
-	±*	+	1
-	-	+	2
-	-	-	76

注:±表示脲原体数量小于 10⁴ CFU/mL 为阴性

表 2 18 例培养阳性脲原体体外药敏试验结果分析(%)

抗菌药物	耐药	中介	敏感
多西环素	0.00	0.00	100.00
交沙霉素	0.00	0.00	100.00
氧氟沙星	61.11	16.67	22.22
红霉素	5.56	11.11	83.33
四环素	0.00	0.00	100.00
环丙沙星	77.78	11.11	11.11
阿奇霉素	5.56	5.56	88.89
克拉霉素	5.56	0.00	94.44
原始霉素	0.00	0.00	100.00

3 讨 论

为避免标本对结果的影响,该研究仅采集清晨尿标本,混匀后平均分成 3 份,分别用 3 种不同的方法进行检测。此外,为更好地评估体外培养法和 RNA 等温扩增法的检测性能,该研究采用体外培养联合测序的方法作为参考方法。因为仅通过颜色判断培养阳性或阴性是不够准确的,所以该研究从培养液中提取核酸联合 PCR 扩增和测序的方法验证脲原体的真实性。

当横向评估体外培养法和 RNA 等温扩增法时,虽然二者灵敏度和特异度差异无统计学意义($P>0.05$),但从方法原理来讲,RNA 等温扩增法的灵敏度相对较高,体外培养法的特异度稍高。体外培养法有 6 例培养阴性但参考方法阳性,部分由于培养法通过定量检测可以排除定植,而核酸检测则不能以此区分定植和感染。在分析 RNA 等温扩增法时,发现有 1 例属于参考方法阳性、体外培养法培养液红色而

RNA 等温扩增法阴性的标本。研究者推测标本中可能存在干扰 PCR 反应的物质,但具体原因仍不清楚。另外,还有 3 例属于 RNA 等温扩增法阳性而参考方法阴性的情况。这 3 例均为男性患者,由于门诊患者信息资料不全,且相关检查不够完善,已无法查证患者是否有典型的感染症状,抑或是无症状携带。

此外,该研究还对脲原体的菌种进行了进一步的鉴定。目前,脲原体分为解脲脲原体和微小脲原体两种,其中以微小脲原体较常见^[12],与本研究结果完全相符。有研究表明,解脲脲原体和微小脲原体可同时存在^[6,12],但该研究未发现此种情况。另外,体外药敏结果显示,喹诺酮类药物的耐药率非常高。目前研究证明,GyrA、GyrB、ParC、ParE 序列的改变是导致脲原体对喹诺酮类药物耐药的主要原因,尤其是 ParC 的 S83L 突变最为常见^[16-19]。由于机制研究不是本课题的研究重点,所以会在后续研究中进行深入探讨。

4 结 论

与体外培养联合测序法相比,体外培养法和 RNA 等温扩增法均表现出了较好的灵敏度和特异性。但从临床应用角度来讲,二者联合使用可能会对脲原体感染的诊断和治疗提供更全面的指导。

参考文献

- [1] TAYLOR R D. Infections due to species of *Mycoplasma* and *Ureaplasma*: an update[J]. Clin Infect Dis, 1996, 23(4): 671-682.
- [2] JALIL N, DOBLE A, GILCHRIST C, et al. Infection of the epididymis by *Ureaplasma urealyticum*[J]. Genitourin Med, 1988, 64(6): 367-368.
- [3] GRENABO L, HEDELIN H, PETTERSSON S. Urinary infection stones caused by *Ureaplasma urealyticum*: a review[J]. Scand J Infect Dis Suppl, 1988, 53(1): 46-49.
- [4] BACZYNSKA A, SVENSTRUP H F, FEDDER J, et al. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycoplasma hominis* antibodies in infertile women serum samples[J]. Hum Rep, 2005, 20(5): 1277-1285.
- [5] CHAIM W, HOROWITZ S, DAVID J B, et al. *Ureaplasma urealyticum* in the development of postpartum endometritis[J]. Eur J Obstet Gynecol Rep Biol, 2003, 109(2): 145-148.
- [6] WAITES K B, KATZ B, SCHELONKA R L. *Mycoplasmas* and *ureaplasmas* as neonatal pathogens[J]. Clin Microbiol Rev, 2005, 18(4): 757-789.
- [7] HUANG C, LONG X Y, JING S, et al. *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infections and semen quality in 19, 098 infertile men in China[J]. World J Urol, 2016, 34(7): 1039-1044.
- [8] ZHANG L, ZHANG K P, LIANG C Z. *Ureaplasma urea-*

- lyticum* in male genital tract: a hidden risk factor for male infertility[J]. Andrologia, 2016, 48(10): 1077-1079.
- [9] LIU J J, WANG Q X, JI X F, et al. Prevalence of *ureaplasma urealyticum*, *mycoplasma hominis*, *chlamydia trachomatis* infections, and semen quality in infertile and fertile men in China[J]. Urology, 2014, 83(4): 795-799.
- [10] LEE J S, KIM K T, LEE H S, et al. Concordance of *ureaplasma urealyticum* and *mycoplasma hominis* in infertile couples: impact on semen parameters[J]. Urology, 2013, 81(6): 1219-1224.
- [11] ZENG X Y, XIN N, TONG X N, et al. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in Xi'an, China[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2016, 35(12): 1941-1947.
- [12] FERNANDEZ J, KARAU M J, CUNNINGHAM S A, et al. Antimicrobial susceptibility and clonality of clinical *ureaplasma* isolates in the United States[J]. Anti Agents Chem, 2016, 60(8): 4793-4798.
- [13] LEE M Y, KIM M H, LEE W I, et al. Prevalence and antibiotic susceptibility of *mycoplasma hominis* and *ureaplasma urealyticum* in pregnant women[J]. Yonsei Med J, 2016, 57(5): 1271-1275.
- [14] XIAO L, GLASS J I, PARALANOV V, et al. Detection and characterization of human *ureaplasma* species and serovars by Real-Time PCR[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(8): 2715-2723.
- [15] 王辉, 郑义, 王玮蓁, 等. 孕妇尿中微小脲原体和脲原体的分种和分型[J]. 同济医科大学学报, 2001, 30(6): 580-582.
- [16] PICCINELLI G, GARGIULO F, BISCARO V A, et al. Analysis of mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* serovars resistant to fluoroquinolones[J]. Infect Gene Evol, 2017, 47(1): 64-67.
- [17] SONG J, QIAO Y, KONG Y, et al. Frequent topoisomerase IV mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Ureaplasma* species[J]. J Med Microbiol, 2015, 64(11): 1315-1320.
- [18] KAMIYA Y, SHIMADA Y, ITO S, et al. Analysis of the quinolone-resistance determining region of the *gyrA* gene and the analogous region of the *parC* gene in *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* detected in first-void urine of men with non-gonococcal urethritis[J]. J Anti Chem, 2013, 68(2): 480-482.
- [19] SCHNEIDER S C, TINGUELY R, DROZ S, et al. Antibiotic susceptibility and sequence type distribution of *ureaplasma* species isolated from genital samples in Switzerland[J]. Anti Agents Chem, 2015, 59(10): 6026-6031.