

三种方法筛查解脲脲原体的效果比较

王长海¹, 马红英² (商丘医学高等专科学校: 1. 医学技术系/病原生物学研究中心; 2. 医学技术系/临床检验教研室, 河南商丘 476100)

【摘要】 目的 比较三种方法检测疑似非淋菌性尿道炎患者分泌物中解脲脲原体的临床效果。**方法** 对商丘医学高等专科学校附属医院皮肤性病科、妇科 298 例门诊患者尿道或宫颈分泌物标本用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)法、液体培养法、液体培养联合免疫斑点试验(IDT)三种方法检测解脲脲原体, 并对结果进行分析。**结果** 三种方法检测结果比较, 差异有统计学意义($P<0.05$)。液体培养法简便、快速但有一定假阳性率, 液体培养联合 IDT 检测与 RT-PCR 法比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 液体培养联合 IDT 法简便实用, 适合基层医院实验室推广使用。

【关键词】 解脲脲原体; 实时荧光定量聚合酶链反应; 培养; 免疫斑点试验
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.02.050 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)02-0267-01

解脲脲原体感染在性传播疾病中的发病率日渐上升, 已成为备受关注的公共卫生问题之一^[1-2]。解脲脲原体多寄生在男性尿道, 可引起男性前列腺炎或附睾炎, 寄生在女性阴道可引起阴道炎、流产或早产等^[3]。目前临床检测方法有固体培养法、液体培养法、实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)、免疫斑点试验(IDT)等方法。固体培养法准确、操作复杂、耗时长, 可作为金标准^[4]; 液体培养法因标本中存在可分解尿素的其他细菌和真菌导致假阳性^[5]; RT-PCR 准确、灵敏但需要严格规范的实验条件和昂贵的实验仪器, 质量控制要求较高, 作为常规诊断方法受到一定限制^[6]; IDT 可直接检测标本中解脲脲原体抗原提取物, 但如标本中解脲脲原体水平低可致假阴性而漏诊。本文将液体培养法与 IDT 相结合用于解脲脲原体的临床检测, 并与上述检测方法比较, 判断其临床应用效果, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 所有研究对象为 2014 年 3 月至 2015 年 2 月于商丘医学高等专科学校附属医院皮肤性病科、妇科就诊的拟诊为非淋菌性尿道炎或宫颈炎的初诊患者, 共 298 例, 其中男 112 例, 女 186 例, 年龄 16~55 岁, 病程 1~3 周。患者均有轻微的尿频、尿急、尿道刺痒感, 多数男性患者有尿道口稀薄分泌物, 女性患者有外阴瘙痒及分泌物异常等临床表现。

1.2 仪器与试剂 罗氏 Light-Cycle 480 RT-PCR 仪, 解脲脲原体 RT-PCR 试剂盒(广州达安公司), PPLO 培养基(上海博华生物科技有限公司), 免疫金斑斑点试剂盒(上海金标生物科技有限公司生产), 固体培养基由法国梅里埃中国有限公司提供的 A7 固体支原体培养基。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 男性患者由临床医师采用消毒棉拭子采集尿道内约 2 cm 处分泌物两份, 女性患者由临床医师先清洁阴道表面再用棉拭子插入宫颈约 2 cm 处缓慢旋转棉拭子 1 周后停留 10 s 左右后取出, 标本采集后均置无菌试管中立即送检。

1.3.2 检测方法 (1)RT-PCR 检测: 标本管中加入无菌生理盐水 1 mL, 震荡摇匀, 挤干棉拭子, 吸取全部液体置离心管中, 15 000 r/min 离心 10 min, 留取沉淀物加入 100 μ L 的 DNA 提取液, 100 $^{\circ}$ C 加热 10 min, 取上清 2 μ L 作为 PCR 检测模板, 进行检测。上述所有操作方法均严格按照操作规程和试剂盒说明书进行。(2)液体培养法: 培养基中含有蛋白质、马血清、生长因子、底物(尿素)及酚红指示剂, 当有解脲脲原体生长时, 底物被分解产氨, 使 pH 值升高, 酚红变色, 培养液由橙黄色变为红色为阳性, 表明检出解脲脲原体。(3)IDT: 在反应板孔中加

入试剂 A 2 滴, 待液体充分吸入, 再用吸管加待检标本(上述液体培养法中阳性培养物)150 μ L 约 4 滴于反应板孔中, 待充分吸入; 去除蓝色过滤盖; 加试剂 A 1~2 滴于反应板孔中待充分吸入, 加试剂 B 3 滴于反应板孔中, 待液体吸入后观察结果。反应板中央出现红色圆斑为阳性, 只出现红色横线为阴性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析, 计数资料以率表示, 组间比较采用 χ^2 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

三种方法检测结果比较, 差异有统计学意义($P<0.05$)。液体培养联合 IDT 法与 RT-PCR 法阳性率接近, 分别为 45.6%(136/298)和 47.3%(141/298), 差异无统计学意义($P>0.05$), 显示较好的相关性。见表 1。RT-PCR 法的 141 例阳性标本, 经液体培养均阳性, 显示液体培养有较高的灵敏性; RT-PCR 法的 157 例阴性标本经液体培养有 28 例阳性, 显示单纯液体培养法判断结果假阳性率高达 17.8%(28/157)。

表 1 三种方法检测解脲脲原体阳性结果比较[n(%)]

方法	n	男	女	合计
RT-PCR 法	298	51(45.5)	90(48.3)	141(47.3)
液体培养法	298	62(55.3)	107(57.5)	169(56.7)
液体培养联合 IDT 法	298	50(44.6)	86(46.2)	136(45.6)

3 讨论

固体培养是公认的检测解脲脲原体的金标准, 其依据是解脲脲原体在固体培养基上 24 h 内形成典型油煎蛋样菌落, 菌落非常微小需借助低倍镜观察, 诊断解脲脲原体准确性非常好^[7], 但固体培养对实验环境和操作人员要求较高, 实验周期较长, 在一定程度上限制了其临床应用^[8]。RT-PCR 技术融合了光谱技术、DNA 杂交的高特异性和 PCR 的高敏感性等特点, 对 PCR 反应过程中的荧光信号的变化进行直接探测, 从而得到定量的结果。其省去了 PCR 的后续处理, 操作封闭, 有效地根除了交叉污染的可能性, 得到 CT 值和原始模板数量完全呈线性相关, 从而准确定量。有资料表明 RT-PCR 与固体培养法相关性好, 可作为评价其他方法的参考方法^[9-10], 但需要严格规范的实验条件和昂贵的实验仪器, 质量控制要求较高, 适合大型医院, 尚不能广泛应用。

液体培养法是检测解脲脲原体的经典微生物学方法, 操作简便, 对实验条件要求不高, 费用低廉。解脲(下转第 275 页)

- tophagy regulation[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22(2): 132-139.
- [22] Di Bartolomeo S, Corazzari M, Nazio F, et al. The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy[J]. *J Cell Biol*, 2010, 191(1): 155-168.
- [23] Gammoh N, Florey O, Overholtzer M, et al. Interaction between FIP200 and ATG16L1 distinguishes ULK1 complex-dependent and independent autophagy [J]. *Nat StrucMol Biol*, 2013, 20(2): 144-149.
- [24] Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, et al. Role of AMPK mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks[J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(1): 2-11.
- [25] Isaka Y, Suzuki C, Abe T, et al. Bcl-2 protects tubular epithelial cells from ischemia/reperfusion injury by dual mechanisms[J]. *Transplant Proc*, 2009, 41(1): 52-54.
- [26] Chang NC, Nguyen M, Germain M, et al. Antagonism of Beclin 1-dependent autophagy by Bcl-2 at the endoplasmic reticulum requires NAF-1[J]. *EMBO J*, 2010, 29(3): 606-618.
- [27] Shen HM, Codogno P. Autophagic cell death: loch ness monster or endangered species? [J]. *Autophagy*, 2011, 7(5): 457-465.
- [28] Liu S, Hartleben B, Kretz O, et al. Autophagy plays a critical role in kidney tubule maintenance, aging and ischemia-reperfusion injury [J]. *Autophagy*, 2012, 8(5): 826-837.
- [29] Yang C, Kaushal V, Shah SV, et al. Autophagy is associated with apoptosis in cisplatin injury to renal tubular epithelial cells[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 294(4): 777-787.
- [30] Hsiao HW, Tsai KL, Wang LF, et al. The decline of autophagy contributes to proximal tubular dysfunction during sepsis[J]. *Shock*, 2012, 37(3): 289-296.
- [31] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease[J]. *Cell*, 2008, 132(1): 27-42.
- [32] Kroemer G, Marino G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response[J]. *Mol Cell*, 2010, 40(2): 280-293.
- [33] Wu HH, Hsiao TY, Chien CT, et al. Ischemic conditioning by short periods of reperfusion attenuates renal ischemia/reperfusion induced apoptosis and autophagy in the rat[J]. *J Biomed Sci*, 2009, 16(1): 19.
- [34] Suzuki C, Isaka Y, Takabatake Y, et al. Participation of autophagy in renal ischemia/reperfusion injury[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 368(1): 100-106.
- [35] Inoue K, Kuwana H, Shimamura Y, et al. Cisplatin-induced macroautophagy occurs prior to apoptosis in proximal tubules in vivo[J]. *Clin Exp Nephrol*, 2010, 14(2): 112-122.

(收稿日期: 2015-07-30 修回日期: 2015-09-25)

(上接第 267 页)

脲原体含有脲酶, 将标本接种于含尿素和酚红指示剂的液体培养基中, 24~48 h 后如有解脲脲原体生长, 因其脲酶分解尿素产生氨, 使培养基 pH 值升高, 培养液由黄色变为粉红色或桃红色, 虽然培养基中加入了青霉素、醋酸铊等抗菌药物破坏细菌的细胞壁防止杂菌生长, 但不能抑制革兰阴性菌增殖, 并且当前微生物对抗菌药物的抗药性越来越强, 很有可能造成假阳性结果^[1]。与 RT-PCR 相比, 本研究显示液体培养法的假阳性率达 17.8%, 与胡宏波等^[8]报道一致。

IDT 为应用斑点反应板上的固相解脲脲原体抗体特异性与标本中的解脲脲原体抗原(Ag)结合形成复合物, 然后滴加胶体金标记的 IgG 抗体再与复合物结合, 加洗涤液洗涤后, 阳性者即在膜中央形成肉眼可见的红色圆斑(胶体金聚集)。具有操作简便、快捷及操作人员不需技术培训, 无需特殊仪器设备, 结果判断直观, 试剂稳定、便于保存等优点, 其缺点为敏感性低, 如标本中解脲脲原体水平低, 可致假阴性而漏诊。本文将其与液体培养法相结合, 对培养阳性(培养基变红)的标本加做 IDT 检测, 虽增加检测成本但结果显示与 RT-PCR 法差异无统计学意义($P>0.05$), 兼具液体培养法和 IDT 的优点并克服各自不足, 操作简便、条件要求低, 尤其适合基层医院或专科医院推广使用。

参考文献

- [1] 朱海勇. 455 例泌尿生殖道感染者支原体检测与药敏分析[J]. *现代医院*, 2010, 10(12): 15-16.
- [2] Taylor-Robinson D. Nongonococcal urethritis and antibiotic-resistant mycoplasma genitalium infection[J]. *Clin*

Infect Dis, 2008, 47(12): 1554-1555.

- [3] 刘辉, 赵玉玲. 微生物学检验技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2012: 170.
- [4] 周良佳, 连大帅, 许锴, 等. 现有液体培养法检测解脲脲原体效果的评价[J]. *中国人兽共患病学报*, 2015, 31(1): 16-20.
- [5] 李林海, 陈丽丹, 刘文婷, 等. 实时荧光核酸恒温扩增技术和液体培养法检测解脲脲原体的比较[J]. *生物技术通讯*, 2013, 24(2): 251-253.
- [6] 陈永国, 朱威. 泌尿生殖道解脲脲原体检测方法比较及抗菌药物耐药性分析[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2011, 5(15): 4502-4504.
- [7] 何蓉, 甘建玲. 免疫荧光法检测解脲支原体的方法建立及临床效果观察[J]. *现代诊断与治疗*, 2014, 25(10): 2282-2283.
- [8] 胡宏波, 冯金, 李晓明. 男性生殖道解脲脲原体检测方法比较[J]. *广西中医学院学报*, 2009, 12(1): 27-29.
- [9] 李玲群. 解脲脲原体的病原学检测方法分析比较[J]. *中国卫生产业*, 2013, 15(13): 174-176.
- [10] 王建华, 王卫国, 钱亚东, 等. 初培养结合 PCR 检测精液解脲脲原体感染的临床应用[J]. *实验与检验医学*, 2012, 30(4): 361-363.
- [11] 王紫燕, 张永乐, 周强. 生殖道解脲支原体检测方法的比较及应用[J]. *大家健康*, 2014, 8(19): 166-167.

(收稿日期: 2015-03-02 修回日期: 2015-09-10)