

# 实时荧光核酸恒温扩增检测技术在泌尿生殖道淋病中的应用

王彦彬 李瑞鹏 钟春燕 诸靖宇 徐智慧

**【摘要】** 目的 探讨实时荧光核酸恒温扩增检测技术(SAT)检测泌尿生殖道淋病的灵敏度、特异度以及监测疗效的实用性。方法 回顾性分析 12 816 例因怀疑泌尿道淋球菌感染需行淋球菌检测受试者临床资料,其中淋球菌培养检测 6 323 例,基于 SAT 开发的淋球菌核酸检测试剂盒(NG-SAT)检测 7 107 例,比较 2 种检测方法的阳性率,再以淋球菌培养法为金标准,计算同时行以上 2 种检测的 614 例患者 NG-SAT 检测尿液样本的灵敏度和特异度,对 2 种检测结果有差别的标本,进行荧光定量 DNA 杂交及聚合酶链反应法(FQ-PCR)复测与分析,对检测结果阳性的患者进行头孢曲松治疗,待症状消失后 3d 再次行以上 2 种检测。结果 NG-SAT 检测尿液标本的灵敏度为 100.0%,特异度为 98.2%。2 种检测结果有差别的标本 7 份,均为 SAT 检测阳性、淋球菌培养阴性, FQ-PCR 复测结果显示 6 份阳性、1 份阴性。179 例患者经头孢曲松治疗后,NG-SAT 检测阳性 15 例,淋球菌培养阳性 7 例。结论 NG-SAT 检测尿液中淋球菌简便、准确,且能准确判断预后,值得临床推广应用。

**【关键词】** 淋病 实时荧光核酸恒温扩增检测技术 淋球菌培养 尿液

Detection of urinary Neisseria Gonorrhoea infection with simultaneous amplification and testing technique WANG Yanbin, LI Ruipeng, ZHONG Chunyan. Department of Urology, Hangzhou Third People's Hospital Hangzhou 310009, China

**【Abstract】** Objective To evaluate the application of real-time simultaneous amplification and testing (SAT) technique in detection of urinary Neisseria Gonorrhoea (NG) infection. Methods Total 12 816 patients with suspected urogenital tract infection were tested in our hospital between February 2012 and November 2015, of whom 6 323 were tested by bacterial culture and 7 107 were tested by NG-SAT, and 614 were test by both methods. Swab and urine samples were collected for tests, the swab was tested by liquid culture, while urine samples by SAT. Samples with inconsistent results of two tests were retested by PCR. Results The positive rates of liquid culture and SAT were 35.9% and 37.7%, respectively. The specificity and sensitivity of SAT were 100.0% and 98.2%. In 7 patients with positive SAT and negative culture results, PCR showed 6 of them were positive. Conclusion Detection of NG with SAT technique has high sensitivity and specificity, which provides a new diagnostic method for urinary NG infection.

**【Key words】** Neisseria gonorrhoea SAT Culture Urine

我国性传播疾病监测结果表明,淋病发病率在 30/10 万左右<sup>[1]</sup>,其发病率高、社会危害性大,感染后若不及时治疗,可伴发多种合并症。早期诊断与治疗是控制淋病传播的关键。目前国内仍以淋球菌培养法为主,虽然其准确度高,但采样困难、培养时间长。近年来,新的淋球菌检测方法不断涌现<sup>[2-3]</sup>,其中实时荧光核酸恒温扩增技术(SAT)是 2011 年上海仁度公司在 RNA 恒温扩增

技术(TMA)基础上开发的新一代核酸检测技术,可同时检测尿液和拭子,是一种非侵入性检测方法,目前国内已用于临床结核杆菌、解脲脲原体、淋球菌等的检测<sup>[4]</sup>。本研究以传统淋球菌培养法为金标准,分析基于 SAT 开发的淋球菌核酸检测试剂盒(NG-SAT)检测泌尿生殖道淋病的灵敏度、特异度以及监测疗效的实用性,为 NG-SAT 检测的临床推广提供依据。

## 1 对象和方法

1.1 对象 收集 2012 年 2 月至 2015 年 11 月在杭州市第三人民医院就诊、因怀疑泌尿道淋球菌感染而行淋球菌检测的 1 2816 例受试者临床资料,年龄 14~71 (33.65±7.33)岁;出现症状时间(7.67±1.29)d, 6 323 例

基金项目 杭州市医学重点专科专病项目(20150733Q30) 杭州市卫生计生科技计划项目(2015A20)

作者单位 310009 杭州市第三人民医院泌尿外科(王彦彬、李瑞鹏、诸靖宇) 检验科(钟春燕) 浙江省人民医院泌尿外科(徐智慧)

通信作者:诸靖宇 E-mail: zjyurology@163.com

进行了淋球菌培养,7 107 例进行了 NG-SAT 检测,614 例 2 种方法同时检测[男 369 例(临床诊断为尿道炎),女 245 例(临床诊断为尿道炎或宫颈炎)]。

## 1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂 淋球菌分离培养基购自珠海银科医学工程公司。SAT 引物由上海仁度生物工程股份有限公司合成, RNA 探针由上海吉玛制药技术有限公司合成, Lightcycler 480 荧光定量 PCR 仪购自 Roche 公司。ABI 7500 荧光定量 PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司, PCR 试剂盒购自上海复兴长征医学科学有限公司提供。

1.2.2 标本采集 所有临床检验标本均采集于杭州市第三人民医院门诊。(1)培养法标本:用无菌棉签采集男性患者尿道内 2~4cm 分泌物(尿道拭子),采集女性患者宫颈口内侧 0.5~1cm 分泌物黏液(宫颈拭子),立即接种于淋球菌选择性培养基(T-M),置于 35℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48h。圆形、凸起、湿润、半透明或灰白为淋球菌特征,氧化酶试验阳性和革兰染色阴性的双球菌判定为淋球菌阳性。(2)SAT 法标本:标本采集前 2h 内不排尿,采集首段尿样约 1ml,并与 1ml 尿样保存液(试剂盒提供)混匀获得尿液样本,冻存于 -70℃ 待检。

1.2.3 SAT 检测 按照试剂盒说明书要求进行操作,400μl 加有尿样保存液的尿液样本与 100μl 核酸提取液混匀,60℃ 恒温 5min,室温放置 10min,依次转移到半自动核酸提取仪上进行提取,核酸 RNA 提取完成后,吸取 30μl 扩增检测液(含磁珠)至微量反应管,预热后加酶,在同一温度下(42℃)以 RNA 为起始模板,通过 M-MLV 反转录酶产生一个双链 DNA 拷贝,利用 T7-RNA 多聚酶从该 DNA 拷贝上产生 100~1 000 个 RNA 拷贝;每个 RNA 拷贝再从反转录开始进入下一个扩增循环带,转至 Light Cycler 480 荧光定量 PCR 仪中启动反应程序。反应程序:荧光标记选择羧基荧光素 42℃ 1min,共 40 个循环,每分钟收集 1 次荧光信号,共检测 40 次。

1.2.4 荧光定量 DNA 杂交及聚合酶链反应法(FQ-PCR)检测 使用 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪,对 NG-SAT 检测结果与淋球菌培养结果有差别的标本、留存的拭子样本进行 FQ-PCR 复测,按照 PCR 试剂盒说明书进行操作。

1.2.5 治疗方法及疗效监测 对 614 例同时行 NG-SAT 检测和淋球菌培养且至少 1 种检测结果阳性的患者进行头孢曲松静脉滴注抗感染治疗,剂量 2g,疗程 3~6d,停药标准为症状消失且尿常规 WBC 转阴,待症状消失后 3d 再行 NG-SAT 检测与淋球菌培养,采样及检测方法同上。

1.3 统计学处理 应用 SPSS19.0 统计软件,计数资料用率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验和 Fisher 确切概率法;计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用  $t$  检验。以淋球菌培养法为金标准,计算 SAT 检测尿液样本、拭子样本的灵敏度和特异度;对 2 种检测结果有差别的样本,根据 Real-time RT-PCR 复测结果作进一步分析。

## 2 结果

2.1 2 种方法检测结果 NG-SAT 检测阳性率为 37.7% (2 679/7 107),高于淋球菌培养阳性率 35.9% (2 270/6 323),差异有统计学意义( $\chi^2=4.631, P<0.05$ )。

2.2 NG-SAT 检测灵敏度和特异度 同时行淋球菌培养和 NG-SAT 检测 614 例,以淋球菌培养法为金标准,NG-SAT 检测灵敏度为 100.0%,特异度为 98.2%,假阴性率为 0.0%,假阳性率为 1.8%,阳性预测值为 96.9%,阴性预测值 100.0%,Kappa 值为 0.975,见表 1。以上 2 种检测结果有差别的标本有 7 份,均为 NG-SAT 检测阳性、淋球菌培养阴性;FQ-PCR 复测结果显示 6 份阳性,1 份阴性。

表 1 614 例同时行淋球菌培养和 NG-SAT 检测的结果(例)

淋球菌培养	NG-SAT		合计
	阳性	阴性	
阳性	220	0	220
阴性	7	387	394
合计	227	387	614

2.3 疗效监测结果 对 227 例患者进行头孢曲松抗感染治疗,其中 179 例症状完全消失后 3d 门诊复查,NG-SAT 检测阳性 15 例(8.38%),淋球菌培养阳性 7 例(3.91%),两者差异无统计学意义( $P=0.122$ ),见表 2。

表 2 随访 179 例同时行淋球菌培养和 NG-SAT 检测的结果(例)

淋球菌培养	NG-SAT		合计
	阳性	阴性	
阳性	7	0	7
阴性	8	164	172
合计	15	164	179

## 3 讨论

淋病是我国重点监测与报疫的 8 种性传播疾病之一<sup>[1]</sup>。男性淋病可伴有前尿道、后尿道、精囊、附睾等部位炎症,严重者淋球菌可侵入血液而引起败血症;女性淋病可合并上生殖系统感染,如淋菌性盆腔炎、子宫内膜炎、输卵管炎、输卵管卵巢囊肿、盆腔脓肿、腹膜炎等<sup>[5]</sup>。

淋病早期检测对病情控制十分重要<sup>[6]</sup>。目前淋球菌检测主要采集泌尿生殖道分泌物为标本,会给患者带来取样痛苦,降低其检测意愿;此外,在敏感度和特异度亦存在不足<sup>[3]</sup>。男性淋菌性尿道炎患者发病期尿道口脓液通常较多,在尿道口或较浅尿道取样均可检出阳性;而病程较长者,尿道分泌物可能较少或没有,易造成漏检,因此病程较长者往往淋球菌阳性检出率偏低<sup>[7]</sup>。NG-SAT 是一种可同时检测泌尿生殖道分泌物和尿液标本的非侵入性检查方法,本研究采集受试者的尿液标本进行检测,不仅减轻了患者痛苦,也减少了临床医生的工作量。本研究结果显示 NG-SAT 检测尿液标本的淋球菌阳性检出率明显高于传统淋球菌培养泌尿生殖道分泌物。以淋球菌培养法为金标准,NG-SAT 检测灵敏度为 100.0%,特异度为 98.2%,假阴性率为 0.0%,假阳性率为 1.8%,阳性预测值为 96.9%,阴性预测值 100.0% kappa 值为 0.975。在疗效监测方面,淋球菌培养法易受到临床使用抗生素的影响,可能无法在标本培养出细菌,从而出现假阴性结果,影响临床医生对淋球菌治疗效果的判断;而 NG-SAT 检测不受临床用药干扰,能准确反映出淋球菌患者的治疗效果。本研究经门诊头孢曲松抗感染治疗后复检,有 8 例患者淋球菌培养阴性而 NG-SAT 检测结果阳性。

目前,非培养法越来越多应用于淋球菌感染的诊断。TMA 是其中一种,其灵敏度高于淋球菌培养法,目前商业化的淋球菌核酸扩增试剂盒已成为诊断淋球菌感染的重要补充。WHO、欧美国家疾控部门均推荐分子诊断法作为首选方法,美国和澳大利亚各级医疗机构检测淋球菌的方法均以 TMA 为主,其具有扩增效率高的特点,即 1h 内可将目的基因扩增百万倍以上)和特异度高<sup>[8-9]</sup>。近来研究表明 TMA 检测淋球菌的灵敏度高于 RT-PCR 和 bDNA<sup>[10]</sup>。SAT 是在 TMA 基础上,以 RNA 为起始模板,通过 M-MLV 反转录酶产生 1 个双链 DNA 拷贝,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 拷贝再从反转录开始进入下一个扩增循环带,有荧光标记的探针与这些 RNA 拷贝特异性结合而产生荧光。该荧光信号可由荧光 PCR 仪实时捕获,直观反映扩增产物的产生,避免了国外 TMA 扩增后杂交显色检测的繁琐<sup>[11]</sup>。FQ-PCR 作为一种核酸检测方法,其敏感度、特异度均较高<sup>[12]</sup>,但其检测靶标为淋球菌 DNA,而 DNA 在环境中较为稳定,需 2~3 周才能彻底分解,因此 FQ-PCR 不能够区分病原体是死菌还是活菌,难以即时判断淋球菌治疗效果<sup>[13]</sup>。而 NG-SAT 只检测病原菌体 RNA,只有活菌才有完

整的 RNA 片段,故能排除患者治疗后病灶处残留 DNA 对检测结果的影响,RNA 可在死亡的病原体中快速降解,有利于临床用药后的疗效监测,国内已有将 SAT 应用于结核分支杆菌的治疗与预后判断的研究<sup>[14]</sup>。此外,RNA 在环境中极不稳定、易降解,大大降低了交叉污染引起假阳性的问题,污染概率小。本研究 NG-SAT 检测结果阳性而淋球菌培养法阴性的 7 例患者,FQ-PCR 复测结果显示 6 例阳性,进一步证实 NG-SAT 检测假阳性率较低。

综上所述,NG-SAT 是实验室淋球菌诊断的一种新型检测手段,其检测尿液标本淋球菌的灵敏度和特异度均较高,具有采样方便、耗时短、污染小、结果准确等优点,可用于临床检测与疗效监测。

#### 4 参考文献

- [1] 胡跃华,李镒冲,刘世炜,等. 中国 20 年间淋球菌、性传播衣原体、梅毒螺旋体的发病情况及其疾病负担[J]. 疾病监测, 2015, 30(11):904-910.
- [2] 李新善,胡燕玲,罗明. 荧光 PCR 技术与直接涂片法对淋球菌检测的临床应用分析[J]. 实验与检验医学, 2014,32(2):187-188.
- [3] Nuñez-Forero L, Moyano L, Muller E A, et al. P2.020 diagnostic accuracy of rapid tests for C. Trachomatis, N. Gonorrhoea and syphilis at the point of care in women with symptoms of lower genital tract infection[J]. Sexually Transmitted Infections, 2013, 89 (Suppl 1):A93-A94.
- [4] Cui Z, Wang Y, Fang L, et al. Novel real-time simultaneous amplification and testing method to accurately and rapidly detect mycobacterium tuberculosis complex[J]. Journal of clinical microbiology, 2012, 50(3):646-650.
- [5] Workowski K A. Centers for disease control and prevention sexually transmitted diseases treatment guidelines[J]. Clinical Infectious Diseases, 2015,61(Suppl 8):S759-S762.
- [6] 王涛. 生殖道感染淋病的现状和规范治疗分析[J]. 中国医药指南, 2016,14(2):120-120.
- [7] 马萍,聂庆东,殷敏. 3 种方法检测淋病奈瑟菌的比较分析及意义[J]. 中国医药科学, 2012, 2(9):126-126.
- [8] Thorley N, Radcliffe K. The performance and clinical utility of cervical microscopy for the diagnosis of gonorrhoea in women in the era of the naat[J]. International journal of STD & AIDS, 2015, 26(9): 656-660.
- [9] Smith D W, Tapsall J W, Lum G. Guidelines for the use and interpretation of nucleic acid detection tests for neisseria gonorrhoeae in australia: A position paper on behalf of the public health laboratory network[J]. 2005, 29(4):358-365.
- [10] MacDonald N, Mailman T, Desai S. Gonococcal infections in newborns and in adolescents[J]. Advances in Experimental Medicine & Biology, 2008, 609(2):108-130.

(下转第 1503 页)

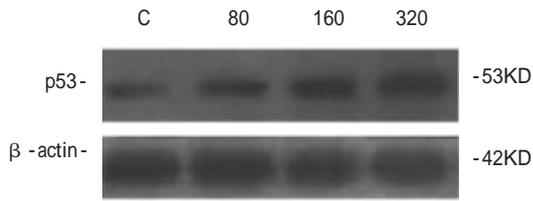


图 3 Ad-ING4 对人胃癌 AGS 细胞 p53 蛋白表达的影响

### 3 讨论

ING4 是一种新发现的抑癌基因,它位于染色体 12p13.31,包含了 8 个外显子和 7 个内含子,有 13 000 个碱基对,编码 248 个氨基酸。近年来有学者研究用 Ad-ING4 感染多种肿瘤细胞,作用 24~72h 后可出现大量肿瘤细胞凋亡<sup>[4]</sup>。但目前有关外源性 ING4 对胃癌细胞的作用研究较少。为此,本研究用 Ad-ING4(80、160、320ng/ml)干预人胃癌 AGS 细胞 48h,显示凋亡率均明显高于对照组,并呈浓度依赖性。这与其他学者报道的 Ad-ING4 能明显诱导膀胱癌 T24 细胞、非小细胞性肺癌细胞凋亡的结果类似。

研究表明,ING4 基因通过 p53 基因依赖性途径可抑制肿瘤细胞的增殖,促进细胞凋亡<sup>[5]</sup>。一般认为其作用机制包括以下 3 个方面:一是 ING4 基因和组蛋白乙酰转移酶复合物 p300 结合诱导 p53 基因 Lys-382 的乙酰化,从而调节 p53 基因功能<sup>[6]</sup>;二是通过甲基化 p53 基因,抑制 Mdn12 介导的 p53 基因,降解 p53 基因,并提高其下游基因在转录及转录后水平的表达<sup>[7]</sup>;三是 ING4 基因与 p53 基因结合可提高其在 Lys382 位点的甲基化及转录活性<sup>[8]</sup>。另有学者研究认为超过 60% 的肿瘤发生,可能与 p53 基因的突变或缺失有关,其中约 50% 肺癌存在 p53 基因的突变<sup>[9]</sup>。为此,本研究探讨在胃癌细胞中是否也存在 ING4 依赖性 p53 基因的改变,研究结果发现,在 Ad-ING4 处理前,AGS 细胞中 p53 基因表达相对较少,经不同浓度的 Ad-ING4 处理后,p53 mRNA 转录及蛋白表达上调,而且随着药物浓

度加大其转录及蛋白表达加强,提示人胃癌发生中 p53 基因的失活程度可能与胃癌细胞中 ING4 含量呈负相关。Ad-ING4 诱导人胃癌 AGS 细胞凋亡与 p53 基因有关,且呈浓度相关性,这为临床今后利用 ING4 作为靶基因治疗胃癌提供了理论依据。但随 Ad-ING4 浓度增高,p53 基因启动子区转录活性增强的具体机制仍需进一步研究。

### 4 参考文献

- [1] Li S, Fan T, Liu H, et al. Tumor suppressor ING4 overexpression contributes to proliferation and invasion inhibition in gastric carcinoma by suppressing the NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(10): 5723-5732.
- [2] Huang JY, Cui SY, Chen YT, et al. MicroRNA-650 was a prognostic factor in human lung adenocarcinoma and confers the docetaxel chemoresistance of lung adenocarcinoma cells via regulating bcl-2/bax expression [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8):e72615.
- [3] Ling C, Xie Y, Zhao D, et al. Enhanced radiosensitivity of non-small-cell lung cancer (NSCLC) by adenovirus-mediated ING4 gene therapy [J]. *Cancer Gene Ther*, 2012, 19(10):697-706.
- [4] Unoki M, Kumamoto K, Takenoshita S, et al. Reviewing the current classification of inhibitor of growth family proteins [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(7):1173-1179.
- [5] Moreno A, Palacios A, Orgaz J L, et al. Functional impact of cancer-associated mutations in the tumor suppressor protein ING4 [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(11): 1932-1938.
- [6] Shiseki M, Nagashima M, Pedeux R M, et al. p29ING4 and p28ING5 bind to p53 and p300, and enhance p53 activity [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(10):2373-2378.
- [7] Russell M, Berardi P, Gong W, et al. Growth-ING, age-ING and die-ING: ING proteins link cancer, senescence and apoptosis [J]. *Exp cell Res*, 2006, 312(7):951-961.
- [8] Zhang X, Wang K S, Wang Z Q, et al. Nuclear localization signal of ING4 plays a key role in its binding to p53 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 331(4):1032-1038.
- [9] 刘同阳,郭海强,朱美妍,等.突变型 p53 与其合成致死基因的研究进展 [J]. *遗传*, 2015, 37(4): 321-326.

(收稿日期 2016-03-03)

(本文编辑 陈丽)

(上接第 1500 页)

- [11] Chernesky MA, Jang D E. Aptima<sup>®</sup> transcription-mediated amplification assays for chlamydia trachomatis and neisseria gonorrhoeae [J]. *Expert review of molecular diagnostics*, 2006, 6(4): 519-525.
- [12] Aguilera-Arreola M G, Gonzalez-Cardel A M, Tenorio A M, et al. Highly specific and efficient primers for in-house multiplex PCR detection of chlamydia trachomatis, neisseria gonorrhoeae, mycoplasma hominis and ureaplasma urealyticum [J]. *BMC re-*

search notes, 2014, 7(1):433-435.

- [13] Tabrizi S N, Chen S, Tapsall J, et al. Evaluation of opa-based real-time PCR for detection of neisseria gonorrhoeae [J]. *Sexually transmitted diseases*, 2005, 32(3):199-202.
- [14] 程松,李园园,陆俊梅,等. RNA 恒温扩增实时检测技术对结核分枝杆菌利福平耐药性的研究 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2014, 37(5): 328-331.

(收稿日期 2016-04-14)

(本文编辑 陈丹)