

RNA 恒温扩增技术在非淋球菌性尿道炎病原体检测中的临床评估

戴显宁, 童郁, 许锴, 陈娟娟, 叶丹丹
温州市人民医院检验科, 浙江 温州 325000

摘要: 目的 探讨不同核酸检测方法在非淋球菌性尿道炎病原体检测中的临床价值。方法 对 173 例疑似非淋球菌性尿道炎感染患者尿液以及尿道分泌物样本运用 RNA 恒温扩增技术(RNA-SAT)和实时荧光定量 PCR 技术(FQ-PCR)分别进行解脲支原体(Uu)和沙眼衣原体(Ct)检测,并对结果统计分析。结果 2 种方法检测,尿道分泌物样本的 Uu 阳性率均高于尿液样本,差异有统计学意义($\chi^2 = 4.011, P < 0.05$),而 Ct 阳性率经 χ^2 检验比较差异无统计学意义($\chi^2 = 0.25, P > 0.05$)。Uu-尿液检测的敏感度(100.0%)高于 Uu-尿道拭子(88.0%),差异有统计学意义($\chi^2 = 9.049, P < 0.01$)。Ct-尿液和 Ct-尿道拭子,二者敏感度差异无统计学意义($\chi^2 = 0.642, P > 0.05$)。结论 RNA-SAT 法既具备了 FQ-PCR 的高敏感度和特异度,又能很好地判断预后效果,同时可采用尿液作为待检样本,具有取样方便、耗时短、污染小及结果准确等优点,可用于临床实验室检测与疗效监测。

关键词: 非淋球菌性尿道炎; 支原体; 核酸扩增技术; 感染

中图分类号: R759 文献标识码: A 文章编号: 1004-8685(2017)22-3242-03

Clinical evaluation of RNA isothermal amplification in the detection of non-gonococcal urethritis pathogens

DAI Xian-ning, TONG Yu, XU Kai, CHEN Juan-juan, YE Dan-dan

Clinical Laboratory, Wenzhou People's Hospital, Wenzhou, Zhejiang 325000, China

Abstract: **Objective** To compare the application of the different nucleic acid test methods in the detection of non-gonococcal urethritis. **Methods** A total of 173 patients with suspected non-gonococcal urethritis were treated with RNA simultaneous amplification and testing(RNA-SAT) and real-time fluorescence quantitative PCR(FQ-PCR), and the test results were conducted for statistical analysis. **Results** With the 2 detection methods, the positive rate of Uu of urethral discharge samples was higher than urine samples, and the difference was statistically significant($\chi^2 = 4.011, P < 0.05$). However, there is no statistical significance on the test differences of Ct positive rate by χ^2 test($\chi^2 = 0.25, P > 0.05$). The sensitivity of Uu-urine test(100%) was higher than Uu-urethral swab(88.0%), and the differences were statistically significant($\chi^2 = 9.049, P < 0.01$). The sensitivity difference between Ct-urine and Ct-Urethral swab was not statistically significant($\chi^2 = 0.642, P > 0.05$). **Conclusion** RNA-SAT method not only has the high sensitivity and specificity of FQ-PCR, but also can judge the prognosis effect well, at the same time, urine can be used as the sample to be tested. It has the advantages of convenient sampling, short time, little pollution and accurate result and other advantages, so it can be used for the clinical laboratory testing and efficacy monitoring.

Key Words: Non gonococcal urethritis; Mycoplasma; Nucleic acid amplification techniques; Infection

非淋球菌性尿道炎(NGU)是最常见的性传播疾病之一,由淋球菌以外的其他病原体,主要是解脲支原体(Uu)和沙眼衣原体(Ct)所引起的尿道炎,近年来发病率呈逐年上升趋势。男性 NGU 感染可导致不育、尿道狭窄以及各种泌尿系统慢性炎症等疾病,严重者可有播散性感染^[1-3]。女性可引起宫颈炎、子宫内膜炎、输卵管炎、女性不孕、宫外孕等疾病^[4-6]。本研究对 173 例疑似非淋球菌性尿道炎患者尿液、尿道分泌物以及宫颈分泌物样本分别运用实时荧光定量 PCR 法(FQ-PCR)以及 RNA 恒温扩增检测技术(RNA-SAT)对 Uu 和 Ct 检测,并对结果进行统计分析,探讨不同方法应用价值,为临床诊治提供快速特异的病原学检测方法。

作者简介:戴显宁(1986-),男,硕士,主管技师,主要从事分子生物学方面的研究工作。

1 对象与方法

1.1 对象 选取 2016 年 9 月-2017 年 3 月温州市人民医院泌尿科住院尿道炎患者 173 例,其中男性 55 例,女性 118 例,年龄为 18 岁~60 岁。分别采集男性尿道分泌物样本及尿液样本,女性宫颈分泌物样本及尿液样本。纳入标准:①所选患者排除淋球菌感染;②入选男性患者均出现不同程度尿痛或尿道刺激等症状;女性患者有阴道瘙痒灼热或白带增多等症状;③首次筛查均为初诊,排除 1 周内已使用相关药物进行治疗的患者。

1.2 仪器与试剂 7500 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。RNA-SAT 法试剂盒(批号:20161101);FQ-PCR 法试剂盒(批号:20160903)。

1.3 方法

1.3.1 样本采集 尿液样本采集:长时间(至少 1 h)不排尿

后的首段尿 0.5 ml 加至尿液保存液 (RNA - SAT 试剂盒提供) 用于 RNA - SAT 检测。尿道/宫颈拭子样本采集: 用特制无菌棉拭子伸入男性尿道口或女性宫颈口 1 cm ~ 2 cm, 旋转一周, 停留 10 s 后取出拭子, 将带有分泌物的拭子加 1.5 ml 生理盐水振荡洗涤, 混匀后, 吸取 0.5 ml 洗涤液至装有样本保存液的样本保存管中混匀, 用于 RNA - SAT 检测, 剩余 1 ml 洗液用于 FQ - PCR 检测。

1.3.2 检测方法 尿液和尿道/宫颈拭子样本同时采用 RNA - SAT 法和 FQ - PCR 法进行 Uu 和 Ct 检测, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件对数据进行分析。计数资料以例 (%) 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

2.1 Uu 和 Ct 阳性率比较 RNA - SAT 检测方法: Uu - 尿液阳性率为 40.5% (70/173), Uu - 尿道/宫颈拭子阳性率 41.0% (71/173); Ct - 尿液阳性率为 12.1% (21/173), Ct - 尿道/宫颈拭子阳性率为 12.7% (22/173)。FQ - PCR 法检测: Uu - 尿液阳性率为 26.6% (46/173), Uu - 尿道/宫颈拭子阳性率为 43.4% (75/173); Ct - 尿液阳性率为 9.2% (16/173), Ct - 尿道/宫颈拭子阳性率 12.1% (21/173) (表 1)。2 种方法不同样本类型 Uu 阳性率比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.011, P < 0.05$), 而 Ct 阳性率差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.25, P > 0.05$)

(表 1)。

表 1 Uu 和 Ct 采用 RNA - SAT 法和 FQ - PCR 法检测结果(例)

支原体	检测项目	FQ - PCR		合计
		阳性	阴性	
Uu - SAT	尿液	阳性	46	70
		阴性	0	103
	尿道/宫颈拭子	阳性	66	71
		阴性	9	102
Ct - SAT	尿液	阳性	15	21
		阴性	1	151
	尿道/宫颈拭子	阳性	18	22
		阴性	3	148

2.2 男、女患者 Uu 和 Ct 阳性率比较 173 例收集样本中, 男性 55 例, 女性 118 例。男性尿液样本 RNA - SAT 法检测 Uu 阳性率 (23.6%) 高于 FQ - PCR 法 (9.1%), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.251, P < 0.05$); 女性尿液样本 RNA - SAT 法检测 Ct 阳性率 (48.3%) 高于 FQ - PCR 法 (34.7%), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.467, P < 0.05$)。其余差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 2)。

表 2 男、女患者 Uu 和 Ct 阳性率比较 [例 (%)]

性别	样本	Uu		χ^2 值	P 值	Ct		χ^2 值	P 值
		RNA - SAT 法	FQ - PCR 法			RNA - SAT 法	FQ - PCR 法		
男	尿液	13 (23.6)	5 (9.1)	4.251	<0.05	4 (7.3)	2 (3.6)	0.176	>0.05
	尿道/宫颈拭子	12 (21.8)	15 (27.3)	0.442	>0.05	4 (7.3)	5 (9.1)	0.121	>0.05
女	尿液	57 (48.3)	41 (34.7)	4.467	<0.05	17 (14.4)	12 (10.2)	0.983	>0.05
	尿道/宫颈拭子	59 (50.0)	60 (50.8)	0.017	>0.05	18 (15.3)	16 (13.6)	0.137	>0.05

2.3 Uu 和 Ct 的敏感度和特异度比较 以 FQ - PCR 法作为参考方法, 比较 RNA - SAT 法在 Uu 和 Ct 检测中的敏感度、特异度、阳性预测值及阴性预测值。Uu - 尿液检测的敏感度为 100.0%, 高于 Uu - 尿道/宫颈拭子 (88.0%) 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 9.049, P < 0.01$)。Ct - 尿液和 Ct - 尿道/宫颈拭子经 χ^2 检验, 二者敏感度差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.642, P > 0.05$) (表 3)。

义 ($\chi^2 = 9.049, P < 0.01$)。Ct - 尿液和 Ct - 尿道/宫颈拭子经 χ^2 检验, 二者敏感度差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.642, P > 0.05$) (表 3)。

表 3 Uu 和 Ct 采用 RNA - SAT 法检测相关参数指标 (%)

RNA - SAT 法	敏感度	特异度	阳性预测值	阴性预测值
Uu 尿液	100.0 (46/46)	81.1 (103/127)	65.7 (46/70)	100.0 (103/103)
	尿道/宫颈拭子	88.0 (66/75)	94.9 (93/98)	92.9 (66/71)
Ct 尿液	93.8 (15/16)	96.2 (151/157)	71.4 (15/21)	99.3 (151/152)
	尿道/宫颈拭子	85.7 (18/21)	97.4 (148/152)	81.8 (18/22)

3 讨论

支原体和衣原体是一种介于细菌和病毒之间, 常引起泌尿生殖道感染的病原体, 且有较高的传播率和无症状态^[7-8], 因此, 建立一种高灵敏、快速的实验室筛查方法对 NGU 病原体感染的诊治及预后都有着重要的临床意义。

本研究结果显示, 对 173 例患者尿液及分泌物样本平行检测 2 种方法不同样本类型 Uu 阳性率差异有统计学意义, 而 Ct 阳性率差异无统计学意义。此外, 男性尿液样本 RNA - SAT 法 Uu 阳性率高于 FQ - PCR 法; 女性尿液样本 RNA - SAT 法的 Ct 阳性率高于 FQ - PCR 法。结果显示, FQ - PCR 法中尿 (下转第 3252 页)

研究, 2009, 7(6): 37-39.

[6] 胡志刚, 唐建英, 周颖. 肺炎支原体 - DNA 检测方法比较及临床意义[J]. 放射免疫学杂志, 2008, 5(10): 66-67.

[7] 袁艺, 伏瑾, 曹玲, 等. 肺炎支原体荧光定量聚合酶链反应检测在儿童肺炎支原体肺炎中的诊断意义[J]. 实用儿科临床杂志, 2009, 24(10): 760-762.

[8] Fend R, Geddes R, Lesellier S. Use of an electronic nose to diagnose Mycobacterium bovis infection in badgers and cattle[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(4): 1745-1751.

[9] 袁凯, 鄢素琪, 汤建桥, 等. 20523 例肺炎支原体感染患者血清学检测分析[J]. 华中科技大学学报, 2013, 42(4): 493-494.

[10] 张代民, 俞万泉, 许会彬, 等. 1824 例小儿 MP 抗体检测报告[J]. 实用医药杂志, 2006, 23(9): 1097-1099.

[11] 张国英, 徐卫平, 夏雪红. 2008-2009 年南京地区儿童肺炎支原体感染情况分析[J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(10): 940-941.

[12] 崔振泽, 陈海霞, 黄燕. 儿童社区获得性肺炎住院患儿 366 例肺炎支原体感染状况的观察[J]. 中国医药, 2010, 5(1): 71-72.

[13] 项红霞, 郁志伟, 谢娟娟, 等. 无锡地区 2008-2009 年儿童肺炎支原体感染流行病学研究[J]. 现代预防医学, 2013, 40(13): 2438-2439.

[14] 崔娟, 王佳, 姚慧生, 等. 2006-2010 年儿童肺炎支原体感染流行病学分析[J]. 中国实用儿科杂志, 2013, 28(6): 446-448.

[15] 李春仙, 陈浩, 奕利娟. 宁波地区儿童肺炎支原体感染的流行病学分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(10): 2305-2306.

[16] 曾四清. 全球气候变化对传染病流行的影响[J]. 国外医学: 医学地理分册, 2002, 23(1): 35-38.

[17] Kashyap B, Kumar S, Sethi GR, et al. Comparison of PCR, culture & serological tests for the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* in community-acquired lower respiratory tract infections in children[J]. Indian J Med Res, 2008, 128(2): 134-139.

[18] 李金明. 实时荧光定量 PCR 技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2008: 363-368.

收稿日期: 2017-05-05

(上接第 3243 页)

液样本病原体阳性率均低于拭子样本组, 与国内相关文献报道较一致^[9]。原因可能一方面是由于 FQ-PCR 法采用传统的煮沸裂解法提取核酸, 效率较低, 再加上尿液本身就有较多的 PCR 抑制物, 导致 FQ-PCR 法对尿液不敏感, 影响核酸扩增。另一方面 RNA-SAT 法采用磁珠法提取核酸, 反应体系加入了竞争性内标, 从而增加检测的敏感度^[10-11], 因此又进一步减少了假阴性可能。而不管尿液标本, 还是尿道/宫颈拭子标本, RNA-SAT 法与 FQ-PCR 法尿道/宫颈拭子标本的病原体阳性率均相当, 提示了 RNA-SAT 法既可以将泌尿生殖道分泌物作为待测样本, 同时也具备了以尿液样本进行检测的条件。且尿液作为一种非侵入式取样, 避免拭子取样的尴尬和痛苦, 尤其对于男性患者, 其优势更加明显^[12-13]。在男性患者排斥或尿道拭子取材有困难时, 可根据实际情况考虑留取尿液标本进行检查。但每次排尿的前 10 ml ~ 30 ml 尿液, 与上次排尿间隔至少 2 h, 这样才能保证检测结果准确可靠^[14]。

以 FQ-PCR 法作为参考方法, 比较 RNA-SAT 法在 Uu 和 Ct 的敏感度和特异度, Uu-尿液检测的敏感度高于 Uu-尿道/宫颈拭子。尿液和 Ct-尿道/宫颈拭子二者敏感度差异无统计学意义。因此, 在针对 NGU 初诊或未经治疗的患者中, RNA-SAT 法和 FQ-PCR 法都有较高的敏感度和特异度, 均可作为判断病原体感染的指标。但在患者治疗后, FQ-PCR 法检出的结果不能区别活菌或死菌, 不适合用作判断治愈的标准, 而 RNA-SAT 法由于 RNA 在死亡的病原体中降解快速能排除死菌残留的 DNA 对检测结果的影响^[15], 有利于临床治疗后的疗效观察及愈判。

综上所述, RNA-SAT 法是实验室筛查 NGU 新的方法, 既具备了 FQ-PCR 的高敏感度和特异度, 又能很好地判断预后效果, 同时可采用尿液作为待检样本, 具有取样方便、耗时短、污染小、结果准确等优点, 可用于临床实验室 NGU 病原体检测以及疗效监测。

参考文献

[1] 陈怡. 非淋菌性尿道炎患者衣原体、支原体检测与药敏分析[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2010, 26(6): 450-451.

[2] 王芳梅. 非淋菌性尿道炎患者支原体属感染及药敏分析

[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(12): 2637-2638.

[3] Leli C, Mencacci A, Bombaci JC, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in a population of Italian and immigrant outpatients[J]. Infez Med, 2012, 20(2): 82-87.

[4] 张一沙, 吴颖, 张怡, 等. 667 例非淋菌性尿道炎患者支原体感染率检测与耐药性分析[J]. 医学研究杂志, 2012, 41(2): 162-164.

[5] 王鹏, 王群兴, 向希映, 等. 解脲支原体耐药性分析及生物分群研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(20): 4871-4873.

[6] 张雯雁, 叶杨芹, 沈李花, 等. 6573 例非淋菌性尿道炎患者支原体感染及药敏情况分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(8): 949-951.

[7] 黄明珠, 黄江兵. 女性生殖道沙眼衣原体感染的检测方法对比[J]. 临床医学, 2009, 15(3): 70-71.

[8] 张永乐, 章松平, 马兰, 等. 荧光定量 PCR 对生殖道沙眼衣原体及解脲支原体检测结果分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(10): 1311-1313.

[9] 李林海, 何宇玲, 石玉玲. 实时荧光定量 PCR 检测泌尿生殖道患者尿液解脲支原体[J]. 热带医学杂志, 2012, 12(1): 57-59.

[10] Cui Z, Wang Y, Fang L, et al. Novel realtime simultaneous amplification and testing method to accurately and rapidly detect *Mycobacterium tuberculosis* complex[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(3): 646-650.

[11] 张睿, 叶阿里, 孔令君, 等. 临床患者三种性传播疾病分子生物学检测分析[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(3): 107-108.

[12] 孟晓, 梁志东. 3440 例男性不同标本沙眼衣原体 FQ-PCR 测定[J]. 实用医技杂志, 2007, 14(19): 2599-2600.

[13] 朱国良. 5471 例 NGU 患者泌尿生殖道衣原体支原体检测及耐药性研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(5): 890-892.

[14] 霍虹, 王清涛, 李金明. 沙眼衣原体聚合酶链反应检测研究进展[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(11): 1038-1040.

[15] 王彦彬, 诸靖宇, 李瑞鹏, 等. 实时荧光核酸恒温扩增技术在泌尿生殖道解脲支原体感染中的应用[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(23): 5322-5324.

收稿日期: 2017-05-17