

· 实验研究 ·

# 实时荧光核酸恒温扩增技术和液体培养法在不孕不育人群解脲脲原体检测中的应用比较

包杰 陈丹

(河南省人口和计划生育科学技术研究院,河南 郑州 450002)

**摘要:**目的 比较实时荧光核酸恒温扩增技术(SAT)和液体培养法在解脲脲原体(UU)检测中的诊断价值,以选择更为准确、快速、实用的临床检测方法。方法 采集本院就诊的不孕不育对象 200 例的分泌物 2 份拭子样本,分别用于液体培养法和 SAT 法检测。结果 液体培养法阳性率为 60%,SAT 法阳性率为 47%,培养法阳性率高于 SAT 法,女性 UU 阳性率显著高于男性,26 例结果不一致中有 11 例培养阴性 SAT 阳性,15 例培养阳性而 SAT 阴性,SAT 法的敏感性(100%)和特异性(93.5%)均高于培养法。结论 解脲脲原体在不孕不育人群中感染率较高,加强就诊对象 UU 的筛查、诊治和预防,确保优生优育。SAT 技术简便、快速、精准,具有较高的临床实用性,是适合实验室诊断的检测方法。

**关键词:** 不孕不育;解脲脲原体;实时荧光核酸恒温扩增技术;液体培养法

中图分类号:R375+.3,R446.5,R698+.2,R711.6 文献标识码:A 文章编号:1674-1129(2017)05-0673-04

DOI:10.3969/j.issn.1674-1129.2017.05.012

**Comparison of Simultaneous Amplification and Testing and Liquid Culture in the Detection of Ureaplasma Urealyticum among Infertility crowd** BAO Jie, CHEN Dan. Henan Province Research Institute for Population and Family Planning, Zhengzhou 450002, China.

**Abstract: Objective** To evaluate the diagnostic value of real-time fluorescence nucleic acid thermostatic expansion technology (SAT) and liquid culture method in the detection of Ureaplasma Urealyticum (UU), and select a more accurate, rapid and practical clinical testing method. **Methods** Swab and secretion were collected from 200 sterile patients in our hospital. Swab and secretion were tested by SAT and liquid culture method respectively. **Results** The positive rate of liquid culture was 60%, while the positive rate of SAT method was 47%. The positive rate of culture was higher than the SAT method. Female UU positive rate is significantly higher than male. The results of 26 patients were inconsistent between SAT and liquid culture method. 11 cases were negative tested by liquid culture method but positive by SAT, and 15 cases were positive tested by liquid culture method but negative by SAT. The sensitivity (100%) and specificity (93.5%) of SAT method were higher than culture method. **Conclusion** The infection rate of urea mycoplasma is higher in the population of infertile people. Thus we should strengthen screening, diagnosis and prevention of UU, and ensure eugenics. The SAT is a simple, fast and precise technique for detection of UU, and has high clinical practicality, which is suitable for clinical laboratory diagnosis.

**Key words:** Infertility; Ureaplasma urealyticum; Simultaneous amplification and testing; Liquid culture

解脲脲原体(UU)感染可引起泌尿生殖道疾病,是常见的性传播疾病,在30%~40%的不孕不育人群中非淋菌性尿道炎是由解脲脲原体感染所致。近年来UU感染率迅速上升趋势更加明显,且在女性中的感染率更高,对人体生殖系统的健康造成了极大危害,已经成为严重的公共卫生问题。目前临床检测UU的方法多为液体培养法,它是通

过UU分解不同底物改变其pH,使液体培养基发生颜色变化来判断,但能分解尿素的细菌均可导致培养基颜色的变化,故单纯靠颜色变化来判断是否有UU感染会存在假阳性,且灵敏度低、用时长,因此,寻找准确、快速、实用的检测方法有着重要的意义<sup>[1]</sup>。实时荧光核酸恒温扩增技术(SAT)作为新一代的核酸扩增检测技术现已被广泛应用到病原体检测领域,该技术具有高灵敏性、高特异性、低污染、反应稳定等优点<sup>[2]</sup>。本研究随机选取了本院前来就诊的200例不孕不育对象,采集男性尿道分泌物和女性阴道分泌物,同时应用液体培养法和实时荧光核酸恒温扩增技术(SAT)进行UU

基金项目 河南省属科研院所基本科研业务费专项资金项目(编号:JBKY2017003)

作者简介:包杰,女,1974年生,主管检验技师,学士学位,从事工作 临床检验。E-mail 905293917@qq.com

通信作者:陈丹,男,检验师,学士/本科,从事工作 临床检验。

的检测,对这 2 种方法的诊断价值在临床上的应用进行比较,现将结果报告如下。

## 1 资料与方法

1.1 样本来源 2017 年 3-5 月来自本院门诊妇科、男科、生殖科或中医科就诊的不孕不育患者 200 例,年龄 20~45 岁,其中男性 68 例、女性 132 例。要求所有人员在标本采集的前 7~10d,禁止采用抗菌药物。所有人员在身体方面没有明显差异,无统计学意义( $P>0.05$ )。

1.2 样本采集 用特制无菌棉拭子伸入女性宫颈口或男性尿道口约 1~2cm,旋转 1 周,停留 10s 后取出,第一个棉拭子立即加入 1ml 液体培养基中接种培养,第二个棉拭子放入 1ml 生理盐水中浸泡,洗脱后取出,取 0.5ml 洗涤液加 0.5ml 尿样保存液(SAT 试剂盒提供)混合作 UU-SAT 待测样本,用 EP 管保存于 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

## 1.3 试剂与方法

1.3.1 试剂 液体培养鉴定药敏试剂盒(UU+MH)生产厂商是郑州安图绿科生物有限公司,SAT 法恒温扩增检测试剂盒(UU-RNA)由上海仁度生物科技有限公司提供,TL 988 PCR 仪由西安天隆科技有限公司提供。

1.3.2 方法 严格按照试剂盒的说明进行操作检测,SAT 预留标本从冰箱取出平衡至室温后,按试剂盒说明书进行 UU-SAT 检测。

## 1.4 样本检测

1.4.1 培养鉴定将分泌物拭子洗脱入培养基后,置 $37^{\circ}\text{C}$ 培养箱中 24~48h,结果判断严格按说明书进行。

1.4.2 SAT 检测按照试剂盒说明书操作,设置阴、阳性对照。取 400 $\mu\text{l}$  加有尿样保存液的预留样本和 100 $\mu\text{l}$  核酸提取液混匀, $60^{\circ}\text{C}$ 恒温 5min,室温放置

10min,置磁珠分离器上静置 5min,加入洗涤液洗涤 2 次;加 40 $\mu\text{l}$  反应液提取 RNA,吸取 30 $\mu\text{l}$  含磁珠的扩增检测液至 8 连管中 $60^{\circ}\text{C}$ 恒温 10min、 $42^{\circ}\text{C}$ 恒温 5min,加入预热的 SAT 酶液 10 $\mu\text{l}$ , $42^{\circ}\text{C}$ 实时恒温扩增 40min<sup>[3]</sup>。

1.5 结果判断 (1)液体培养法于 24h 或 48h 观察结果,解脲脲原体(UU)阳性时生成的碱性物质会与培养基中的尿素发生反应,分解精氨酸,导致 PH 值上升,若培养液由黄色变成红色,透明无混浊,则为阳性。(2)SAT 法检测结果根据实时荧光信号的出现时间和强度,结合阴、阳性对照和界值参考品对检验结果进行判定。dt $\leq 35$  的样本为阳性;dt 为 40 或无数值的样本为阴性; $35<dt<40$  的样本建议重新检测,结果 dt $<40$  的样本为阳性(dt 为阈值线与样本曲线交点的横坐标读数,与 PCR 结果的 Ct 值类似)<sup>[5]</sup>。(3)以 2 种以上(包括 2 种)检测方法的结果均阳性为真阳性,结果均阴性为真阴性。灵敏度=真阳性例数/(真阳性+假阴性)例数 $\times 100\%$ 。特异度=真阴性例数/(真阴性+假阳性)例数 $\times 100\%$ 。

1.6 统计学分析 UU 培养法和 SAT 法检测结果采用 SPSS 13.0 统计学软件中的配对  $\chi^2$  检验进行统计学分析,结果以率表示, $P<0.05$  表示差异有统计学意义<sup>[4]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 UU 培养和 SAT 检测结果阳性率比较

2.1.1 200 例受检者中 UU 培养法阳性率为 60%,UU-SAT 法阳性率为 47%,其中女性 UU 培养与 UU-SAT 阳性率分别为 66.7%、54.5%,男性 UU 培养与 UU-SAT 阳性率分别为 47.1%、32.4%,培养法阳性率均高于 SAT 法,女性 UU 阳性率显著高于男性( $P<0.01$ )。2 种方法的检测结果见表 1。

表 1 2 种方法检测解脲脲原体阳性率统计表[n(%)]

性别	n	UU 液体培养法			UU-SAT 法		
		阳性	阴性	阳性率(%)	阳性	阴性	阳性率(%)
男	68	32	36	47.1	22	46	32.4
女	132	88	44	66.7	72	40	54.5
合计	200	120	80	60.0	94	86	47.0

2.2 敏感性和特异性比较 200 例受检者用 2 种方法检测 UU 时有 26 例结果不一致,其中 11 例培养阴性 SAT 阳性,15 例培养阳性而 SAT 阴性。通过感染者真阴性、真阳性的比较得出培养法的敏感性和特异性分别为 91.4%、83.3%,SAT 法的敏感性和特异性分别为 100%、93.5%,SAT 法的敏感性和

特异性均高于培养法,两者差异有统计学意义( $P<0.05$ )。2 种方法的敏感性和特异性见表 2。

## 3 讨论

支原体是存在于人类泌尿生殖系统中的病原微生物,侵犯泌尿生殖道黏膜上皮,可引起非淋菌性尿道炎,生殖器慢性炎症,导致男女不孕不育。

表 2 2 种方法检测解脲脲原体的结果比较

方法	阳性	阴性	真阳	真阴	敏感性	特异性
培养法	120	80	106	70	91.4%	83.3%
UU-SAT	94	86	88	86	100%	93.5%

据报道支原体感染增加男性不育风险 5 倍多<sup>[6]</sup>,其感染影响精子活力,减低精子数量,干扰精卵结合,并可引起男性慢性前列腺炎、附睾炎等。女性感染未经治疗可引起盆腔炎和宫颈炎,并使输卵管黏膜上皮细胞受到损害,引起其炎症反应而导致阻塞或障碍,由支原体感染引起的输卵管性不孕症占 22%。孕妇感染会造成母婴垂直传播与感染,引起婴儿结膜炎、肺炎等新生儿感染,有部分研究表明支原体感染可能与习惯性流产、胚胎停育等生育异常相关。UU 感染者大多数为隐匿性感染,常无症状或症状不明显,因此易忽略就常被漏诊,为发现无症状的患者,临床多建议不孕不育患者进行常规 UU 筛查。传统的 UU 检测方法有涂片、培养、免疫学等,都存在检出率低、周期较长、特异性差等缺点,给诊断和治疗带来困难,因此,建立高敏感、高特异、快速便捷的实验室诊断方法控制该疾病的传播,对临床诊断和经验治疗有重要意义<sup>[7]</sup>。本研究采用液体培养法和 SAT 技术对本院就诊的不孕不育对象的分泌物样本进行 UU 检测,分析不孕不育与支原体感染的相关性,并为其检测治疗提供合理的方法学和依据<sup>[8]</sup>。

临床实验室多采用液体培养法检测 UU,其依据培养基颜色变化来判断有无 UU 的生长,主观性强,易造成假阳性或假阴性结果,且培养常需 24~48h,但由于液体培养法操作简单、经济方便,可同时进行药敏试验,帮助临床指导用药,是目前包括基层在内的大部分医院最常用的检测方法。SAT 法是一种新型 RNA 检测技术,近年在国内病原体诊断领域发展快速<sup>[9]</sup>,临床上常应用于检测 CT、U-U、NG、MG 等,该技术将核酸恒温扩增和实时荧光检测相结合,无须高速离心、高温加热,特异性提取尿液或拭子样本中的病原体 RNA;RNA 在环境中极不稳定,容易降解,交叉污染少,可有效降低核酸扩增检测引起的假阳性问题,有助于临床疗效监测;SAT 采用磁珠法对特异性靶标进行捕获扩增检测,水相洗涤,最大限度去除杂质,有效减少假阴性,尤其是当患者正处于感染初期,病原体 DNA 量较少,RNA 量相对较多时 SAT 技术更能显示出其高敏感性<sup>[10]</sup>。SAT 法检测的是病原体 16sr

RNA,只有活菌中才有完整的 RNA 片段,因此相当于检测活的病原体,此法既增加了液体培养法的灵敏度,又增加 DNA 检测方法的特异性<sup>[11]</sup>,避免了机体残留病原体 DNA 片段的影响,阳性可提示病原体处于活性状态,对诊断有重要意义。患者经治疗后病菌死亡、临床症状消失,RNA 在死亡的病原体中降解快速,有利于临床用药后的疗效观察及判愈,避免造成过度治疗,增加患者心理和经济负担。这也说明用 SAT 检测技术进行用药疗效判定有一定价值,SAT 检测阴转提示已治愈,并为治愈后的复检以及临床用药提供了参考方案<sup>[12]</sup>。有研究表明,UU-SAT 在尿液和拭子检测中的结果无差异,首段尿标本与拭子的敏感性相当,说明 SAT 法可以使用泌尿生殖道分泌物或尿液作检测样本,由于部分无症状患者对生殖道检查取样的排斥,做非侵入性的尿液样本检测更易于采集接受,避免拭子取样的尴尬和痛苦,提高了患者取样的依从性,减少了医生的工作量,简化了收集流程,具有较大的临床应用价值<sup>[13]</sup>。

研究结果表明,200 份标本中培养法与 UU-SAT 阳性率分别为 60%、47%,SAT 法与国内文献结果报道的不孕不育患者的 UU 阳性率更相近,SAT 法低于培养法阳性率 13%,该方法检测的假阳性率明显低于培养法。其中 26 例培养和 SAT 检测结果不一致,出现 11 例 SAT 检测阳性而液体培养阴性的可能原因有:培养过程中分泌物中存在某些微生物抑制了 UU 的生长繁殖,或在进化过程中 UU 发生突变,不分解尿素,没有使培养基颜色改变;受检者正处于感染初期,病原体 DNA 量少而 RNA 量多,SAT 技术能检测到病原体 RNA 的存在等。出现 15 例 SAT 检测阴性而液体培养阳性的可能因素:拭子样本中含有一些亦能分解尿素的细菌或真菌,菌量超过培养基抗生素抑制能力而导致液体培养变红,出现假阳性;SAT 样本中的 UU 含量较低、存在扩增抑制物或样本保存不当造成 RNA 降解等。目前的观点认为,UU 阳性只提示泌尿生殖道 UU 的存在,不能作为泌尿生殖道感染确诊的依据,当病原菌达到一定的量( $\geq 10^4$ CFU/ml)或出现临床症状才需给予临床治疗<sup>[14]</sup>。

本研究结果显示,UU 在不孕不育患者感染中增加趋势明显,且女性的阳性率明显高于男性,说明支原体对女性生殖道感染的影响严重,孕前应积极预防和治疗 UU 的感染,从而提高 UU 感染所

致不孕症的治愈率。通过了解不孕不育人群中支原体的感染情况发现,在 UU 感染者中无症状患者占 50%,提示多加防范检测对象的漏诊,为避免未及时检测与就诊延误病情导致继发感染或影响胚胎及胎儿发育等隐患,建议拟生育的夫妇虽无症状,也应做相关检测,对于阳性患者,及早治疗,确保优生优育<sup>[15]</sup>。本研究通过 SAT 法与液体培养法检测 UU 的结果比较,应用 SAT 法可以帮助辨别培养造成的假阳性,对无症状患者和已治疗但未完全清除的患者,标本中含量不高的病原微生物, SAT 法可以更好的检测出,避免漏检<sup>[16]</sup>。

总之, SAT 技术在临床应用中,既具备采样方便、耗时短、低污染的实验要求<sup>[17]</sup>,又有敏感性高,特异性好,反应稳定,结果准确可靠等优点,还可用于用药后的疗效和判愈,帮助及时调整药物,减少耐药菌产生的机会,辅助进行临床判愈评估<sup>[18]</sup>,并为支原体的实验室诊断提供新的采样方式和检测方法,该技术更具有临床实用性,优于目前其他检测方法,是一种值得推广的检测方法。

#### 参考文献

- [1] 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.
- [2] 曾成龙, 冯婷, 闫丹, 等. 液体培养法、PCR 法和 SAT 法在解脲支原体检测中的应用比较[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2016, 32(7): 397-398.
- [3] 张颖, 赵琼珍, 李彦奇, 等. 不孕不育人群生殖支原体感染情况研究及疗效评估[J]. 新疆医学, 2015, 45(12): 1771-1773.

- [4] 陈婷婷, 钱煦岱, 包文婷, 等. SAT 技术检测解脲脲原体和沙眼衣原体核酸在泌尿生殖道感染中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(14): 2357-2359.
- [5] 顾伟鸣, 杨阳, 吴磊, 等. 实时荧光核酸恒温扩增技术检测泌尿生殖道沙眼衣原体感染[J]. 临床检验杂志, 2010, 28(4): 271-272.
- [6] 杨华君, 惠亚, 施尚鹏, 等. 解脲脲原体和沙眼衣原体感染对男性不育影响的 Meta 分析[J]. 中国男科学杂志, 2015, 29(5): 36-42.
- [7] 周璐, 蔡筠, 谢建生. 实时荧光核酸恒温扩增技术在不孕育龄妇女病原体检测中的应用研究[J]. 医药前沿, 2013, 3(21): 55-56.
- [8] 高玉芳, 赵联营, 穆丽萍. 不孕症患者生殖道支原体培养及耐药性分析[J]. 现代检验医学杂志, 2013, 28(5): 135-137.
- [9] 修文琼, 郑奎城, 吴冰珊, 等. 实时荧光 PCR 方法快速检测 KI 多瘤病毒[J]. 实验与检验医学, 2016, 34(1): 11-14.
- [10] 郑雅萍, 袁青, 陈伟, 等. 不同核酸检测方法检测非淋球菌性尿道炎病原体[J]. 浙江预防医学, 2015, 27(5): 535-537.
- [11] 孔小祥, 仲崇明. 实时荧光定量 PCR 检测 HBV-DNA 测量不确定度的评定[J]. 实验与检验医学, 2016, 34(4): 425-427.
- [12] 苏静秋, 张绍武, 张艳君. 不孕妇女沙眼衣原体和解脲支原体感染检测分析[J]. 中国误诊学杂志, 2011, 11(22): 5334-5335.
- [13] 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): 107-110.
- [14] 张艳, 李苏利. 解脲支原体检测方法研究现状[J]. 临床军医杂志, 2014, 42(9): 961-963.
- [15] 林永恩. 女性泌尿生殖道支原体、解脲支原体感染与不孕的相关性分析[J]. 现代中西医结合杂志, 2010, 19(22): 2822-2823.
- [16] 贾艳艳, 张永良. 荧光定量 PCR 对解脲脲原体和沙眼衣原体的检测分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(8): 1075-1076.
- [17] 高志华, 金印, 陈峰. 实时荧光核酸恒温扩增技术检测尿液中淋球菌的分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(4): 463-464.
- [18] 贺望娇. 522 例患者沙眼衣原体、解脲脲原体和淋球菌感染情况分析[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(7): 826-827.

(收稿日期 2017-06-22; 修回日期 2017-08-26)

#### (上接第 672 页)

- [4] 林杰, 陈爱平, 杨劲松, 等. 检测致泻大肠杆菌的多重 PCR 方法的建立与应用[J]. 预防医学论坛, 2012, 18(12): 881-884.
- [5] 赵爱兰, 熊衍文, 白雪梅, 等. 鉴定五类致泻性大肠埃希菌和志贺菌的多重 PCR 方法[J]. 疾病监测, 2011, 26(1): 65-67.
- [6] 李迎慧, 邱亚群, 洗慧霞, 等. 深圳市腹泻人群致泻性大肠埃希菌流行及病原特征研究[J]. 中华流行病学杂志, 2016, 37(1): 115-118.
- [7] 孔海深. 致泻性大肠埃希菌的分子分型和流行病学研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2011: 4.
- [8] 张菊玲, 崔恩博. 致泻大肠埃希菌的分布及耐药性研究[J]. 传染病信息, 2012, 25(3): 180-182.
- [9] 杨劲松, 李玉燕, 廖慧, 等. 2010-2012 年福建省致泻性大肠杆菌监测结果分析[J]. 预防医学论坛, 2014, 3(20): 162-165.
- [10] Bisi-Johnson MA, Obi CL, Vasaikar SD, et al. Molecular basis of virulence in clinical isolates of Escherichia coli and Salmonella species from a tertiary hospital in the Eastern Cape, South Africa[J]. Gut Pathog, 2011, 3(1): 9-10.

- [11] Ochoa TJ, Mercado EH, Durand D, et al. Frequency and pathotypes of diarrheagenic Escherichia coli in peruvian children with and without diarrhea[J]. Rev Peru Med Exp Salud Public, 2011, 28(1): 13-20.
- [12] 王金良. 新型肠出血性大肠埃希菌感染的检验诊断与防治[J]. 实验与检验医学, 2011, 29(4): 337-338.
- [13] 陈爱平. 一种新的致病菌: 非典型性肠致病性大肠杆菌[J]. 海峡预防医学杂志, 2011, 17(6): 20-23.
- [14] 邓艳华. 食品和公共场所从业人员致泻性大肠埃希菌携带情况分析[J]. 实验与检验医学, 2015, 33(2): 161-162.
- [15] 郑恩惠, 李曲文, 林杰, 等. 146 株致泻性大肠埃希菌多重 PCR 结果分析[J]. 预防医学论坛, 2017, 23(3): 174-175.
- [16] 韦小瑜, 游旅, 田克诚, 等. 贵阳地区 2013 年腹泻病例中致泻性大肠杆菌的病原监测分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(9): 881-882.

(收稿日期 2017-03-02; 修回日期 2017-08-04)