

荧光定量 PCR 检测女性生殖道解脲脲原体原体的应用评价

黄 会¹, 赵香依², 吴多荣¹, 姚 敏¹

(1. 中南大学湘雅医学院附属海口医院检验科, 海南 海口 570208;

2. 乐东县人民医院检验科, 海南 乐东 572500)

【摘要】 目的 了解荧光定量 PCR 检测解脲脲原体(Uu)敏感性、特异性及其临床应用价值。方法 收集海口市人民医院 2013 年 3~5 月妇产科门诊泌尿生殖道感染患者生殖道标本共 154 例, 同时进行荧光定量 PCR 和液-固体培养法检测 Uu, 以液-固体培养法作为金标准, 对荧光定量 PCR 诊断试验进行方法学评价。结果 154 例标本中, 液-固体培养法即金标准检测阳性 64 例, 荧光定量 PCR 检测阳性 69 例, 两者同时阳性 63 例, 同时阴性 84 例, 荧光定量 PCR 检测 Uu 敏感性是 98.44% (63/64), 特异性是 93.33% (84/90), 假阳性率是 6.67% (6/84), 假阴性率是 1.56% (1/64), 阳性预测值是 91.30% (63/69), 阴性预测值是 98.82% (84/85), 总符合率是 95.45% (147/154)。χ² 检验显示, 两种方法检测结果差异无统计学意义(P>0.05), 计算 Kappa>0.75, 表明两种方法检测结果的一致性程度较好。结论 荧光定量 PCR 方法具有灵敏度高、特异好、检测快速的优点, 且与培养法一致性也较高, 具有一定的临床应用价值。

【关键词】 荧光定量 PCR; 解脲脲原体; 应用

【中图分类号】 R711.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2015)18-2720-03

Application of fluorescence quantitative PCR for detection of Ureaplasma urealyticum in female genital tract.
HUANG Hui¹, ZHAO Xiang-yi², WU Duo-rong¹, YAO Ming¹. 1. Department of Clinical Laboratory, Haikou Hospital Affiliated to Xiangya School of Medicine, Central South University, Haikou 570208, Hainan, CHINA; 2. Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Ledong County, Ledong 572500, Hainan, CHINA

【Abstract】 Objective To evaluate the sensitivity, specificity, and application of fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR) for detection of Ureaplasma urealyticum (Uu) in female genital tract. **Methods** A total of 154 specimens of patients with genital tract infections were detected by FQ-PCR and liquid-solid culture at the same time. All specimens were collected in Haikou People's Hospital from March 2013 to May 2013. **Results** In the 154 specimens, 64 and 69 samples were revealed as positive according to the golden standard method and FQ-PCR method respectively, with 63 samples positive and 84 negative for both the golden standard method and FQ-PCR method. For FQ-PCR, the sensitivity rate was 98.44% (63/64), and the specificity rate was 93.33% (84/90), with the false positive rate of 6.67% (6/84), the false negative rate of 1.56% (1/64), positive predictive value of 91.30% (63/69), negative predictive value of 98.82% (84/85), and the total coincidence rate of 95.45% (147/154). χ² test results showed that there was no

通讯作者: 黄 会。E-mail: 19599948@qq.com

[13] Shi W, Li K, Ji Y, et al. Development and evaluation of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of enterovirus 71 [J]. BMC Infect Dis, 2011, 11: 197-204.

[14] Xia JF, Yan XF, Yu H, et al. Simple and rapid detection of human enterovirus 71 by reverse-transcription and loop-mediated isothermal amplification: cryopreservation affected the detection ability [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 71: 244-251.

[15] Enomoto Y, Yoshikawa T, Ihira M, et al. Rapid diagnosis of herpes simplex virus infection by a loop-mediated isothermal amplification method [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43: 951-955.

[16] Ihira M, Akimoto S, Miyake F, et al. Direct detection of human herpesvirus 6 DNA in serum by the loop-mediated isothermal amplification method [J]. J Clin Virol, 2007, 39: 22-26.

[17] Ihira M, Sugiyama H, Enomoto Y, et al. Direct detection of human herpesvirus 6 DNA in serum by variant specific loop-mediated isothermal amplification in hematopoietic stem cell transplant recipients [J]. J Virol Methods, 2010, 167: 103-106.

[18] Ruwaida ASA, Lafferty RM, Schlegel HG. Removal of RNA by heat treatment [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1976, 2: 73.

(收稿日期: 2015-01-06)

statistical significant difference between the results of the two methods ($P>0.05$), and the consistency was good (Kappa >0.75). **Conclusion** FQ-PCR has the advantages of high sensitivity, good specificity, rapid detection, and high consistency with culture, and thus has certain clinical application value.

【Key words】 Fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR); *Ureaplasma urealyticum*; Application

解脲脲原体(Uu)是1954年Shepard首先从非淋球菌性尿道炎患者的尿道分泌物中分离获得,是人类泌尿生殖道最常见的寄生菌之一,在特定的环境下可以治病,主要引起生殖道和泌尿道炎症,临床上女性表现为尿道炎、阴道炎、输卵管炎、子宫内膜炎、不孕、异位妊娠等^[1-2]。近年来Uu引起的泌尿生殖道感染有增多趋势,相关的耐药性报道不断增加^[3-6],因此检测方法逐渐引起人们的重视。液-固体培养法灵敏度高、特异性高,准确性好,被公认为检测的“金标准”^[7],但检测时限长,检验要求高,操作步骤繁琐,故不被临床广泛应用,多数应用于科研。荧光定量PCR是近几年发展起来的分子生物学技术,因其灵敏度好,检测时间短而越来越受到青睐。本研究以液-固体培养作为检测的金标准,考察荧光定量PCR的敏感性及其特异性,探讨荧光定量PCR的应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 本试验标本来源于海口市人民医院2013年3~5月154例泌尿生殖道感染的妇产科门诊患者。由门诊医生采集女性生殖道标本,采集后的标本立即送检,荧光定量PCR检测的送往PCR室,培养检测的送往微生物室进行培养。

1.1.2 荧光定量PCR试剂、仪器 荧光定量PCR试剂盒为中山大学达安基因股份有限公司,仪器采用Line gene荧光定量PCR仪,试剂均在有效期内使用,严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.1.3 培养基 10B肉汤和A8琼脂平板由法国生物梅里埃公司生产。

1.2 方法

1.2.1 液-固体培养法 将标本分别接种于10B肉汤和A8琼脂平板。肉汤培养温度35℃,大气环境,琼脂平板置于5%CO₂的环境。接种后的肉汤每天两次观察颜色改变,1~4 d出现由黄变红产碱改变时,检查原种的琼脂平板是否有菌落生长,如果没有,迅速转接种变色的肉汤至琼脂平板,每天检查原种和转种的琼脂平板,A8琼脂平板在接种后1~3 d出现的圆形棕色菌落,直径在10~100 μm,判断为解脲脲原体^[8]。

1.2.2 荧光定量PCR方法 将送检标本插入装

有1.5 ml灭菌生理盐水的离心管中,充分震荡混匀,挤干,12 000 rpm离心5 min;去上清,沉淀加灭菌生理盐水1 ml混匀,12 000 r/min离心5 min;去上清,沉淀加入50 μl DNA提取液充分混匀,100℃恒温处理10 min;12 000 r/min离心5 min,备用;阴性质控品、阳性质控品管各加入等量DNA提取液充分混匀,100℃恒温处理10 min,离心备用。取PCR反应管若干,分别加入处理后的标本(阴性、阳性质控品)上清液2 μl,8 000 r/min离心数秒,放入仪器样品槽,待分析结果。阳性结果:增长曲线呈S型曲线;阴性结果:如果增长曲线不呈S型曲线则实验结果判为样品的DNA含量 $<5.0 \times 10^2$ 基因拷贝。

1.3 统计学方法 以培养法为金标准,应用SPSS 20.0软件进行配对设计的McNemer χ^2 检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义,计算Kappa值,评价两种方法一致性程度。

2 结果

2.1 荧光定量PCR与液-固培养法检测结果比较 荧光定量PCR与培养法同时检测154例标本,其中荧光定量PCR检出Uu阳性69例,阴性85例;培养法检出阳性64例,阴性90例;两者同时阳性63例,同时阴性84例,有6例经培养法检出阴性而PCR检出阳性,有1例经培养法检出阳性而PCR检出阴性。两种方法检测结果经 χ^2 检验,差异无统计学意义($P>0.05$)。计算Kappa=0.907 >0.75 ,表明两种方法检测结果的一致性较好。

2.2 荧光定量PCR检测Uu的诊断试验评价结果 敏感性(Sen)=63/(63+1)×100%=98.44%;特异性(Spe)=84/(84+6)×100%=93.33%;假阳性率(FPR)=6/(6+84)×100%=6.67%;假阴性率(FNR)=1/(1+63)×100%=1.56%;阳性预测值PV+=63/(63+6)×100%=91.30%;阴性预测值PV-=84/(84+1)×100%=98.82%;总符合率=(63+84)/(63+6+1+84)×100%=95.45%。

3 讨论

荧光定量PCR技术是近年来兴起的检测技术,该方法操作相对简单,时间较短,能够对支原体进行定量,逐渐被大型综合性医院广为应用^[9-11],但其检测效果尚需进一步的临床评价。本研究以液-固体培养法为标准对荧光定量PCR诊断试验进行评价。PCR

与培养检测阳性分别 69 例和 64 例,同时阳性 63 例,同时阴性 84 例,其中有 6 例经培养法检出阴性而 PCR 检出阳性,有 1 例经培养法检出阳性而 PCR 检出阴性,经 χ^2 检验, $P>0.05$,表明荧光定量 PCR 与培养法检测结果之间差异无统计学意义,与周才丽等^[12]和王玉珍等^[13]的报道一致。对于评价两种方法的一致性, $Kappa=0.907>0.75$,说明两种检测方法检测结果一致性较好。荧光定量 PCR 敏感性为 98.44%,特异性为 93.33%,说明其敏感性高,特异性好。总符合率为 95.45%,总符合率又称为总的正确率,总正确率越大,说明其灵敏度和特异度之和越高,假阳性与假阴性之和越小。阳性预测值为 91.30%,阴性预测值为 98.82%,假阳性率既误诊率 6.67%,可能原因:一是 PCR 扩增引物特异性不强,扩增出无关的相似核苷酸序列;二是标本污染了目标 DNA 序列;三是 6 例假阳性患者可能是经治疗后培养显示已转阴性,而 PCR 方法能检测出死的病原菌。假阴性率既漏诊率为 1.56%,可能原因:一是标本中含有 DNA 扩增的抑制剂;二是裂解液中蛋白酶 K 浓度低;三是标本处理或模板制备过程导致模板丢失。

临床诊断 Uu 多数采用液体培养基结合药敏试验判断结果,这种方法易出现假阳性,且存在较为严重的污染问题^[14],确切的诊断需要接种于固体培养基并见到 UU 菌落,该方法是公认检测 Uu 的“金标准”。试验中经液体培养变红色的 86 例,转种固体培养后仅有 82 例出现 Uu 菌落,这提示我们培养物颜色的改变也不一定都是支原体,可能是其他微生物如变形杆菌、肠杆菌、克雷伯氏菌和酵母菌等污染所致假阳性结果,在平时的工作应注意标本污染导致的假阳。

综上所述,荧光定量 PCR 具有灵敏度高、特异性好、检测快速的优点,同时避免了传统 PCR 需后处理

的问题,减少了污染,且与液-固体培养法一致性较好,能对临床快速诊断 Uu 提供很大帮助,在临床工作中具有一定的应用价值。

参考文献

- [1] 吕时铭. 检验与临床诊断妇产科学分册[M]. 北京: 人民军医出版社, 2007: 17-20.
- [2] 张帝开, 杨冬梓. 性传播疾病病原体与女性生殖道感染[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2005, 21(3): 140-142.
- [3] Takahashi S, Takeyama K, Kunishima Y, et al. Analysis of clinical manifestations of male patients with urethritis [J]. Infect Chemother, 2006, 12: 283-286.
- [4] 王 薇, 肖敬川, 黄 会, 等. 非淋球菌性尿道炎患者支原体和衣原体感染及耐药性分析[J]. 海南医学, 2011, 22(23): 36-37.
- [5] 范和发, 卢家恺, 林明珠, 等. 三亚地区 230 例解脲支原体和人型支原体的培养与药敏分析[J]. 海南医学, 2013, 24(10): 1531-1532.
- [6] 郑文爱, 闫薇臣, 王芳乾, 等. 772 例支原体患者衣原体检测及支原体感染药敏结果分析[J]. 海南医学, 2014, 25(2): 216-217.
- [7] Misteil. T Protein dynamics implications for nuclear architecture and gene expression [J]. Science, 2001, 291: 843-847.
- [8] 倪安平. 支原体与衣原体的实验室诊断[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(9): 1076-1080.
- [9] 高正琴, 邢 进. TaqMan MGB 探针法实时荧光定量 PCR 快速检测支原体的研究[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(9): 1170-1175.
- [10] 刘 璐, 季育华, 赵 缜, 等. parC 检测在解脲支原体基因分型中的临床应用[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2011, 30(9): 843-845.
- [11] 张华黎, 王 威. 荧光定量 PCR 动态检测女性生殖道 UU 及其临床意义[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2007, 23(2): 165-166.
- [12] 周才丽, 胡燕玲. 荧光定量 PCR 法与培养法在检测解脲支原体中的比较[J]. 现代诊断与治疗, 2011, 22(2): 107-108.
- [13] 王玉珍, 卢 伟. 培养法及 PCR 法用于解脲支原体检测结果的分析[J]. 现代保健杂志, 2006, 3(8): 108-109.
- [14] 陈春英, 杨舒盈, 朱根海. 女性生殖道感染治疗前后解脲支原体荧光定量 PCR 检测的假阳性分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2007, 15(3): 32-33.

(收稿日期: 2015-01-28)