

PCR-导流杂交检验法和液体培养法在阴道分泌物解脲支原体检测中的应用研究

林观寿*, 袁桂转, 苏炳森

(中山火炬开发区人民医院, 中山 528437)

摘要:目的 探究聚合酶链式反应(PCR)-导流杂交检验法和液体培养法在阴道分泌物解脲支原体(Uu)检测中的应用价值。**方法** 选取2022年6月—2023年12月于我院就诊的疑似生殖道Uu感染的100例患者为研究对象,均进行阴道分泌物病原体检测,检测方法为PCR-导流杂交检验法、液体培养法及固体培养法,分析不同方法的检测价值。**结果** 以固体培养法结果为金标准,PCR-导流杂交检验法对Uu的阳性检出率为100.00%(56/56),高于液体培养法的85.71%(48/56),差异有统计学意义($\chi^2=5.333, P=0.039$);且PCR-导流杂交检验法对Uu的检出与固体培养法一致性较高($\kappa=0.756$),液体培养法对Uu的检出与固体培养法一致性中等($\kappa=0.602$)。PCR-导流杂交检验法对Uu的检测灵敏度为89.29%,准确率为88.00%,阴性预测值为86.36%,均高于液体培养法对检测Uu的灵敏度(75.00%)、准确率(80.00%)及阴性预测值(73.08%),差异均有统计学意义($P < 0.05$)。PCR-导流杂交检验法检测Uu所需时间明显少于液体培养法($P < 0.05$)。**结论** 在阴道分泌物Uu检测中应用PCR-导流杂交检验法的阳性检出率、一致性、检测灵敏度、准确率及阴性预测值均高于液体培养法,且检测所需时间更短,值得推荐。

关键词: 解脲支原体; 阴道分泌物; 聚合酶链式反应-导流杂交检验法; 液体培养法; 准确率

0 引言

支原体是现阶段发现的最小最简单原核生物,其中解脲支原体(*Ureaplasma urealyticum*, Uu)是引起生殖道感染的最常见条件致病菌之一,但因感染者症状常隐匿,若治疗不及时可导致宫颈炎、子宫内膜炎、自发性流产等严重后果,故快速准确地检出病原体针对性给予抗感染治疗以改善患者预后十分重要^[1]。目前,用于检测Uu的实验室方法较多,其中液体培养法和基于聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术的病原体核酸检测法应用较多^[2],但二者均存在一定局限性,如前者假阳性较高、耗时长、可重复性差等,而常规PCR技术因其高敏感性同样有较高假阳性。因为固体培养法可以确定具体的菌落形态,在特定培养基与生长条件下,可以单独确保解脲支原体的生长,减少其他维生素的干扰,保证检测的高度特异性。同时,该方法经过多年的研究与应用,可靠性与重复性等较高。并且,可以对解脲支原体进行确定,有效分离与进一步开展生化鉴定,可以为流行病学研究、耐药性分析等提供依据,另外,该检测方法的结果可以在不同试验室保持一致的结果。因此,使得固体培养法成为评估其他方法准确性的金标

准。为此,本研究旨在探究PCR-导流杂交检验法和液体培养法在阴道分泌物Uu检测中的应用价值,其中虽然液体培养法在应用时,具备较高的灵敏度和快速的检测结果,但是容易受到其他微生物的污染,诱发假阳性问题,还会因为解脲支原体浓度较低,出现假阴性。而且缺少特异性鉴定,并且操作复杂和成本较高。所以,在本研究开展的过程中,要先对液体培养法进行优化,借助优化培养基配方,联合应用分子生物学技术和自动化系统等措施,提高诊断的准确性和有效性,以此保证两种检测方法的对比结果,以期为生殖道感染筛查最佳方法的选择提供参考,具体报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2022年6月—2023年12月于我院就诊的疑似生殖道Uu感染的100例患者为研究对象,年龄25~50岁,平均(37.34±6.18)岁。纳入标准:①有明显的临床指征,如浆液状白带增多,可伴有宫颈充血水肿、外阴瘙痒、排尿困难、尿痛、尿急等症状;②年龄>18岁;③签署知情同意书。排除标准:①检查前3d内接受过药物治疗,包括应用抗生素、避孕药膏和

基金项目:中山市医学科研项目(编号:2022J268)

*通信作者:林观寿,主管检验技师,研究方向为临床微生物检验。E-mail: longhong509379@163.com

阴道药物冲洗等; ②检查前 3 d 内接受过醋酸和碘试验; ③检查前进行性生活时间 < 48 h 及经期女性; ④伴有已确诊的艾滋病、淋病、梅毒等性传播疾病; ⑤不配合阴道分泌物标本采集。

1.2 方法

1.2.1 标本采集

用 3 支灭菌棉拭子取阴道后穹窿处的分泌物后分别放入标有患者编号的取样管中。

1.2.2 液体培养法检测

将其中 1 个标本棉拭子充分洗脱于支原体液体培养基中, 丢弃棉拭子, 设置空白对照孔 (测试板 A1 孔, 100 μ L 不含标本的培养液), 取 100 μ L 含标本的混合液加入测试板各孔中 (A1 孔除外), 每孔中再加一滴石蜡油隔绝空气, 编号标明时间后放入恒温箱中培养孵育, 温度设定为 (36 \pm 1) $^{\circ}$ C, 并于 24~48 h 观察各孔培养液颜色及透明度变化情况。结果判读: 各孔培养液颜色由黄色转清晰透明红色, 判为 Uu 阳性; 培养液呈黄色或橙黄色, 判为 Uu 阴性; 培养液呈浑浊红色, 则标本有污染; 空白对照孔培养液呈澄清黄色提示本次实验有效, 空白对照孔若为阳性则本次试验无效。支原体培养液试剂盒购自珠海丽珠试剂股份有限公司。

1.2.3 PCR- 导流杂交检验法检测

将其中一个标本棉拭子放入 1.5 mL EP 管中, 加入 1 mL 生理盐水浸润 10 min, 充分洗涤, 丢弃棉拭子, 将所得样本振荡混匀, 取 500 μ L 液体转移至新的 EP 管中, 离心 (12000 r/min, 5 min), 弃上清液, 加入混匀的 DNA 提取液 (50 μ L) 和碱性裂解液 (50 μ L), 重悬沉淀, 水浴 10 min (85 $^{\circ}$ C), 离心 (12000 r/min, 5 min), 取上清液即为标本 DNA。各标本 DNA 取 5 μ L 进行 PCR 反应, 设置扩增条件 95 $^{\circ}$ C 9 min, 95 $^{\circ}$ C (30 s) \rightarrow 55 $^{\circ}$ C (30 s) \rightarrow 72 $^{\circ}$ C (60 s) \rightarrow 40 个循环, 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 反应期间完成导流杂交准备, 如将检测试剂平衡至室温、预热杂交液至 45 $^{\circ}$ C、加热洗脱液至 45 $^{\circ}$ C 溶解等, 待反应结束后将 PCR 产物取出, 先进行变性操作 (95 $^{\circ}$ C, 5~10 min), 再用冰水冷却 2 min 以上, 然后取 0.8 mL 杂交液 (已预热至 45 $^{\circ}$ C) 加入杂交孔内, 于孔内加入变性后的 PCR 产物, 充分混匀, 将混合液加到塑料薄膜上, 盖上盖板孵育 (20 min) 后开泵进行导流杂交, 结束后

予以 0.8 mL 洗脱液 (已预热至 45 $^{\circ}$ C) 冲洗膜 3~4 次, 每次间隔 5 s。冲洗结束后将杂交仪的温度设定为 25 $^{\circ}$ C, 在降温过程中使用封阻液 (0.5 mL) 对膜进行封闭 1~2 次, 待温度降至 25 $^{\circ}$ C 时加入酶标液 (0.5 mL) 孵育 5 min, 结束后将温度设定为 36 $^{\circ}$ C, 并再次对膜进行彻底冲洗后加入显色液 (0.5 mL) 显色 6 min, 之后用杂交液 (0.8 mL) 洗膜 3 次, 蒸馏水 (2 mL) 漂洗 1 次, 最后将杂交膜用镊子夹出置于吸水纸上分析显色结果。结果判读: 薄膜对应样品孔无信号为阴性, 蓝紫色圆点为阳性。

1.2.4 固体培养法

将其中一个标本棉拭子按照曲线方式划种, 接种在固体培养基上, 培养 48 小时, 借助奥林巴斯 CX21 光学显微镜对琼脂表面菌落的生长情况进行观察。结果判读: 10~50 μ m 大小、黑色海胆样的菌落属于 Uu 菌落。

1.3 统计学方法

数据应用 SPSS22.0 软件进行统计分析, 计数资料以 (n , %) 形式表示, 行卡方检验; 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 形式表示, 行 t 检验; 一致性分析采用 κ 检验, 分为一致性极低 (κ 值为 0.00~0.20)、一致性一般 (κ 值为 0.21~0.40)、一致性中等 (κ 值为 0.41~0.60)、一致性较高 (κ 值为 0.61~0.80)、几乎完全一致 (κ 值为 0.81~1.00)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 PCR- 导流杂交检验法和液体培养法检测 Uu 的结果分析

以固体培养法结果为金标准, PCR- 导流杂交检验法对 Uu 的阳性检出率为 100.00% (56/56), 高于液体培养法的 85.71% (48/56), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 5.333$, $P = 0.039$); 且 PCR- 导流杂交检验法对 Uu 的检出与固体培养法一致性较高 ($\kappa = 0.756$), 液体培养法对 Uu 的检出与固体培养法一致性中等 ($\kappa = 0.602$)。见表 1。

2.2 PCR- 导流杂交检验法和液体培养法对 Uu 的检测效能比较

PCR- 导流杂交检验法对 Uu 的检测灵敏度为 89.29%, 准确率为 88.00%, 阴性预测值为 86.36%, 均高于液体培养法对检测 Uu 的灵敏度 (75.00%)、准确率 (80.00%) 及阴性预测值 (73.08%), 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), PCR- 导流杂交检验法在 Uu 的检测中更具优势。见表 2。

表 1 PCR- 导流杂交检验法和液体培养法检测 Uu 的结果分析

金标准	PCR- 导流杂交检验法			液体培养法		
	阳性	阴性	合计	阳性	阴性	合计
固体培养法						
阳性	50	6	56	42	14	56
阴性	6	38	44	6	38	44
合计	56	46	100	48	52	100

表 2 PCR- 导流杂交检验法和液体培养法对 Uu 的检测效能比较 [% (n/N)]

检测方法	灵敏度	特异度	准确率	阳性预测值	阴性预测值
PCR- 导流杂交检验法	89.29 (50/56)	86.36 (38/44)	88.00 (88/100)	89.29 (50/56)	86.36 (38/44)
液体培养法	75.00 (42/56)	86.36 (38/44)	80.00 (80/100)	87.50 (42/48)	73.08 (38/52)
χ^2 值	9.000	0.333	3.402	0.086	3.551
P 值	0.004	1.000	0.043	0.776	0.033

2.3 PCR- 导流杂交检验法和液体培养法检测 Uu 所需时间比较

PCR- 导流杂交检验法检测 Uu 所需时间明显短于液体培养法 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 PCR- 导流杂交检验法和液体培养法检测 Uu 所需时间比较 ($\bar{x} \pm s$)

检测方法	例数	检测 Uu 所需时间(h)
PCR- 导流杂交检验法	100	5.62±1.05
液体培养法	100	14.48±2.29
<i>t</i> 值	—	35.169
<i>P</i> 值	—	< 0.001

3 讨论与结论

生殖道感染的具体机制至今并未完全明确, 而受不洁性生活、过度阴道操作、滥用抗生素等因素影响, Uu 的感染率和耐药率均越来越高, 对人类健康造成严重威胁, 故需及时接受正规治疗^[3]。

液体培养法为 Uu 检测的传统方法, 具有敏感、操作简便、可同时进行药敏试验检测等特点, 其基本原理是 Uu 的代谢产物可改变培养基的酸碱度促使其颜色发生变化, 但女性阴道分泌物自带的部分细菌亦可能改变培养基酸碱度, 故引起培养基颜色变化的反应并不是 Uu 所特有^[4]。诸多研究显示, PCR- 导流杂交检验法凭借准确率高、耗时短、质控可靠等优势逐渐成为病原体检测比较理想的方法^[5-6]。本研究结果发现, 相较于液体培养法, PCR- 导流杂交检验法的阳性检出率、一致性、检测灵敏度、准确率及阴性预测值均更高, 检测所需时间更短, 表明在阴道分泌物 Uu 检测中应用 PCR- 导流杂交检验法的价值更高, 与秦泽鸿^[5]、肖玲等^[7]研究结论一致。据文献报道, Uu 主要有两种类型, 其中 UuParvo 型又包含 1、3、6、14 四个亚型, 常见于临床无症状携带者, UuT960 型包含其余 10 个亚型, 有一定的致病性, 由于 UU 各亚型之间形态相似, 故在感染早期部分患者可能无法通过液体培养法判断病原体的存在^[8-9]。PCR- 导流杂交检验法则在 UU 的检测中具有独特优势, 首先 PCR 能对病原体的核酸分子进行精确定量, 故可根据 Uu 的主要外膜抗原基因设计引物对其进行精确分型, 利于提高阳性检出率, 且自动化程度高、污染途径少, 保证了结果的准确性^[10-11]。其次在导流杂交上, 通过观察尼龙膜上不同标本的显色情况对结果直接进行判读定性, 避免了常规 PCR 后冗长的电泳, 缩短检测所需时间^[12]。但 PCR- 导流杂交检验法无法分析病原体的药物敏感性, 且对实验条件和仪器有严格要求, 尚无法完全替代液体培养法。

在阴道分泌物 Uu 检测中应用 PCR- 导流杂交检验法的阳性检出率、一致性、检测灵敏度、准确率及阴性预测值均高于液体培养法, 且检测所需时间更短, 可以尽早治疗和减少并发症的出现。而液体培养法在应用的过程中, 虽然操作复杂且耗时长, 但是依然提供了相应的补充信息。本研究开展的意义是

在于证明了 PCR- 导流杂交检验法的可靠性和高效性, 可以促使临床诊断的优势得以提升, 确保患者可以接受对症治疗, 控制患者的病情, 恢复患者的身体健康。在未来的研究过程中, 希望对两种诊断方式联合应用的方案实施进一步优化, 发挥不同诊断方法的优点, 并且寻找更加优质的自动化、高质量的检测方法, 进一步推动解脲支原体检测向着标准化、普及化的方向发展, 最终实现提高医疗服务治疗与公共卫生水平, 维护国民的身体健康。

参考文献

- [1] 苏芳, 江梦华, 李玲. 不孕症女性患者的生殖道解脲支原体感染情况及其与性功能障碍、阴道微生态及卵巢颗粒细胞 MAPK 信号通路的关系 [J]. 广西医学, 2024, 46(04): 514-518.
- [2] 廖春洁, 叶美萍, 顾昕, 等. PCR 荧光探针法、乳胶法及培养法检测生殖道分泌物中沙眼衣原体、淋球菌和解脲支原体的优劣分析 [J]. 中国男科学杂志, 2021, 35(03): 22-26.
- [3] 张军, 王夕文, 刘汉文, 等. 女性外阴尖锐湿疣患者宫颈 HPV 与解脲支原体、沙眼衣原体、淋球菌合并感染情况分析 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2022, 14(10): 1788-1791.
- [4] 林丽英, 马芙蓉, 郭旭光, 等. 解脲支原体和人型支原体的液体培养法和固体培养法比较及耐药性分析 [J]. 检验医学与临床, 2021, 18(19): 2791-2794.
- [5] 秦泽鸿, 方炳雄, 陈汉强, 等. 导流杂交法检测性传播疾病病原体核酸的临床应用价值分析 [J]. 现代诊断与治疗, 2022, 33(04): 544-547.
- [6] 潘美靖. PCR 导流杂交技术检测普宁地区女性感染 HPV 病毒状况及亚型分布 [J]. 临床医学, 2020, 40(10): 45-47.
- [7] 肖玲, 刘晨, 蔡逸轩, 等. PCR 结合导流杂交法和细胞培养法在生殖道解脲支原体和人型支原体检测中的临床应用比较 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2022, 38(10): 1029-1032.
- [8] 冯媛媛, 付春云, 李颖丰, 等. 广西 200 例 HPV 阳性女患者中解脲支原体、沙眼衣原体的感染情况分析 [J]. 中国妇幼卫生杂志, 2022, 13(02): 52-56.
- [9] 王东芳, 王书平, 张春梅. 两种检测方法对产后发热患者的生殖道沙眼衣原体和解脲支原体检测的诊断学研究 [J]. 宁夏医学杂志, 2023, 45(11): 1019-1022.
- [10] 徐闰红, 李卉, 秦亚运, 等. 湖北省育龄人群地中海贫血基因变异类型及分布特征 [J]. 中华地方病学杂志, 2023, 42(04): 280-285.
- [11] FATHIZADEH Z, GHASEMI TEHRANI H, KAZEMI M, et al. Rapid detection and simultaneous identification of the Mycoplasma and Ureaplasma species by real-time PCR and melt curve analysis among fertile and infertile females [J]. Iran J Basic Med Sci, 2023, 26(06): 628-634.
- [12] 张蕾, 陈锐, 王颖, 等. 不同方法检测女性生殖道病原微生物感染的比较研究 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2020, 36(10): 1001-1006.