维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2003)02 - 0181 - 02

解脲脲原体的检测及耐药性分析

胥 飚,曹 何,余显书

(重庆医科大学临床学院检验科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨用聚合酶链反应 - 微孔板杂交法(PCR - MPH)对解脲脲原体(UU)感染的检测,并分析药敏情况。方法:将取自 496 例泌尿生殖道感染患者的标本利用法国生物梅里埃公司的 Mycoplasma IST 培养基进行培养检测及药敏试验,对其中 212 例标本同时进行 PCR - MPH 法检测。结果:PCR - MPH 法阳性检出率为 90/212 (42.5%),培养法为 78/212 (36.8%);二者符合率为 90.6%;PCR - MPH 法的特异性与灵敏度分别 88.1%、94.9%。496 例标本培养结果,女性阳性率 101/226(44.7%),男性 64/270(23.7%),二者有显著性差异($\chi^2 = 24.41$, $P < 0.01$);药敏结果显示:敏感率原始霉素 99.4%、强力霉素 91.5%、交沙霉素 89.7%、四环素 80.0%、红霉素 49.7%、氧氟沙星 25.5%。结论:PCR - MPH 作为一种快速、灵敏、特异的新方法,可在临床实验室诊断中推广应用;女性患者 UU 的检出率较男性高,应引起重视;合理使用抗生素,对治疗 UU 感染十分重要。

【关键词】解脲脲原体;聚合酶链反应;抗药性,微生物

【中国图书分类法分类号】R446.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2002 - 06 - 02

Detection of ureaplasma urealyticum with two methods and anti - UU susceptibility test

XU Biao, et al

(*Depatrtment of Laboratory, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate the detection of ureaplasma urealyticum(UU) with PCR - microplate hybridization (PCR - MPH) and culture, and analyze drug resistant activities. *Methods*: 496 samples were cultured and drug resistant activities analyzed by Bio - Merieux Mycoplasma - IST, and 212 samples of them were determined by PCR - MPH. *Results*: The positive rates of PCR - MPH and culture were determined to be 90/212(42.5%) and 78/212(36.8%), respectively. The specificity and sensitivity of PCR - MPH were 88.1% and 99.4%, respectively. The positive rates of females and males with culture were 101/226(44.7%) and 64/270(23.7%), respectively. There was significant difference between them($\chi^2 = 24.41$, $P < 0.01$). The susceptibility rates of PRI, DOX, JOS, TET, ERY and OFL were 99.4%, 91.5%, 89.7%, 80.0%, 49.7% and 25.5%, respectively. *Conclusion*: PCR - MPH is rapid, sensitive, specific, and is of value in clinical diagnosis and therapy. Higher positive rate of the infected females should be paid attention to. It is very important to select antibiotics correctly for infections of the patients according to results of UU susceptibility tests.

【Key words】Ureaplasma urealyticum; Polymerase chain reaction; Drug resistance, microbial

解脲脲原体(ureaplasma urealyticum, UU)由 Shepard 于 1954 年从尿道炎患者分泌物中分离获得,它不仅是引起非淋菌性尿道炎的主要病原体之一,还可引起男性不育、尿路结石、孕妇及新生儿感染[1]。目前实验室较常用的血清学诊断方法不能作为现症感染的依据,为了解 UU 的感染及耐药情况,以指导临床治疗,我们利用聚合酶链反应 - 微孔板探针杂交技术(PCR - MPH)与培养法对医院泌尿科及妇科门诊患者的泌尿生殖道感染标本进行了 UU 检测。

1 材料与方法

1.1 对象

2000 年 1 月至 2002 年 3 月,226 例女性患者标本取自我院妇科门诊,270 例男性患者标本取自我院泌尿科门诊。患者诉有尿急、尿频,尿道浆液分泌物或阴道分泌物增多,下腹部不适等症状,标本行革兰氏染色无阴性双球菌发现。

1.2 引物及寡核苷酸探针

作者介绍:胥 飚(1969 -),男,主管技师,主要研究方向:临床实验诊断学。

维普资讯 http://www.cqvip.com

参照文献[2]选用 16SrRNA 基因的特异性序列设计,上游引物 UU－P_1:5'－CGAACGAAGCCTTTTAG－3'(66～82);下游引物 UU－P_2:5'－CCTATCTTAGCGTTTCTTCCC－3'(442～462),5'端用生物素进行标记;探针 UU－A:5'－AAGTCAATGACGCGTAGCTG－3'(269～288),3'端标记地高辛。由北京大学生命中心合成。

1.3 主要试剂及仪器

碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体(anti－DIG－AP)购自宝灵曼公司,Taq DNA 聚合酶、dNTPs 为 Promega 公司产品,链酶包被的酶标板由北京肝病研究所仝文斌老师提供。支原体培养试剂盒(Mycoplasma IST)为法国生物梅里埃公司产品。DNA 扩增仪为 PE 公司产品,酶标仪为 Bio－Rad 公司产品。

1.4 标本采集

女性用棉拭子宫颈分泌物,男性取前列腺液或尿道分泌物,均混悬于少许无菌生理盐水中,分成 2 份:1 份于－20℃保存,用于 PCR－MPH 检测;1 份立即用于培养及药敏分析。496 例标本均做了培养法及耐药性检测,其中 212 例用 PCR－MPH 法进行了对比检测。

1.5 PCR 扩增

参照文献[3]进行。扩增片段为 397bp。

1.6 微孔板杂交法检测 PCR 产物

取 PCR 产物 1∶10 稀释后以 100μl/孔加入链酶包被的酶标板孔中,37℃ 1h后用洗液(10mmol/L Tris－HCl pH 7.5,0.05%吐温－20)洗板,加入 150mmol/L 的 NaOH 溶液 100μl,室温 15min,洗板;加入含地高辛标记的探针 10pmol/孔的杂交液(配制方法见文献[4])100μl/孔进行杂交反应,37℃ 45min;洗板后加入 1∶2000 稀释的 Anti－DIG－AP 100μl/孔,37℃ 45min;充分洗板后加入底物(对硝基苯磷酸脂)100μl/孔,37℃ 避光显色,2mol/L NaOH 50μl 终止反应,405nm 波长比色。

1.7 支原体培养及药敏试验

按试剂盒操作说明进行。35℃ 24～48min 观察颜色变化,判断结果。

2 结 果

2.1 212 例标本同时进行 PCR－MPH 与培养法检测的结果比较,见表 1

表 1 PCR－MPH 与培养法检测的结果比较

PCR－MPH	培养法		合 计
	阳性例数	阴性例数	
阳性例数	74	16	90
阴性例数	4	118	122
合 计	78	134	212

PCR－MPH 检测阳性率:90/212×100%=42.5%

培养法检测阳性率:78/212×100%=36.8%

若仍以培养法作为目前解脲脲原体检测的金标准,PCR－MPH 检测的特异性为:118/134×100%=88.1%,灵敏度为:74/78×100%=94.9%,两种方法检测结果的符合率:(74+118)/212×100%=90.6%。

2.2 不同性别患者利用培养法检测 UU 的结果,并用四格表专用公式作 χ^2 检验

女性患者感染 UU 的比例显著高于男性,见表 2。

表 2 不同性别患者利用培养法的检测结果

性别	例数	阳性例数(%)	χ^2	P
女性	226	101(44.7)	24.41	<0.01
男性	270	64(33.7)		
合计	496	165(33.3)		

2.3 耐药性分析

对 165 例 UU 培养为阳性的标本进行药敏分析,结果为:敏感率原始霉素 99.4%、强力霉素 91.5%、交沙霉素 89.7%、四环素 80.0%、红霉素 49.7%、氧氟沙星 25.5%。显示解脲脲原体对临床上常用于治疗泌尿生殖道感染的红霉素、氧氟沙星有很高的抗药性。

3 讨 论

解脲脲原体作为人类泌尿生殖道常见且公认有致病作用的支原体,正日益受到重视。我们利用 PCR－MPH 法与培养法同时对 212 例临床标本进行了检测比较,结果显示二者的符合率较好(90.6%);前者用时少,5h 即能报告(培养需 24～48h),标本采集时的无菌要求不高,且由于结合了 PCR 的高灵敏性、杂交的特异性及酶标仪比色的客观性,因此较培养法与 PCR 琼脂糖电泳分析的灵敏度与特异性均有提高[2,3],降低了漏检率和误诊率。对其中 4 例培养阳性,而 PCR－MPH 检测为阴性的标本,考虑可能:①人型支原体感染 1 例,对培养结果造成假阳性干扰;②标本中存在较高浓度的对 PCR 扩增有影响的抑制物。另外对其中 16 例 PCR－MPH 阳性,培养为阴性的标本,我们分析原因可能是:①PCR－MPH 的敏感性高于培养法(前者检出限为 10－100CFU/ml,后者为 10000CFU/ml);②标本运送与保存过程影响了 UU 的活性,致使培养

(下转第 186 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

检查,要使其显示动脉瘤出血或出血的原因及动脉瘤的部位也尚有难度,如本组2 例动脉瘤分别为 1.2cm×1cm 及 1.1cm×0.8cm 大小,均位于后交通动脉外,曾作 CT 和 MRA 检查均未发现动脉瘤。

动脉瘤 DSA 检查技术与治疗的关系　DSA 未应用于临床之前脑血管造影常受颅骨的重迭干扰,许多细微病变,尤其血供不甚丰富者也难以显示。动脉瘤 DSA 检查可以避免骨骼的重迭干扰,使之显示更清晰[6]。特别是当今提倡早期甚至超早期治疗动脉瘤,其方法主要采用介入栓塞和外科瘤颈夹闭术[4,6],要求清楚的显示动脉瘤体,瘤颈以及与周围血管的关系,这对动脉瘤的检查手段或检查摄片技术提出了更高的要求。如本组位于颅内,前、后交通动脉,大脑前、中动脉及大脑后动脉的 52 例小动脉瘤,其直径与周围相邻血管相似,或有的葫芦形,椭圆形及滴水状动脉瘤常受周围扭曲的血管重迭干扰,常规正、侧位 DSA 摄片难以分清瘤体、颈与周围血管的关系,采取斜位,特别是旋转 DSA 技术可清楚显示之。

临床症状与颅内动脉瘤的发生部位、形态及出血量有直接的关系;CT 表现与 SAH 量的多少有关,而与颅内动脉瘤的发生部位、形态无明显相关性。但是,DSA 不仅能显示动脉瘤的位置、大小、轮廓及动脉瘤出血的征像,而且还能清晰、直观的显示动脉瘤与周围血管的关系,再密切结合 CT 及临床表现,对其诊断和治疗将能提供可靠的证据。

参　考　文　献

[1] Rinne J, Hernesniemi J, Niskanen M, et al. Analysis of 561 patients with 690 middle cerebral artery aneurysms; anatomic and clinical features as correlated to management outcome[J]. Neurosurgery, 1996;38:2 - 11.

[2] 黄祥龙. 颅内动脉瘤的介入治疗[C]. 上海国际医学专题报告会, 1999;22.

[3] 范卫君, 黄祥龙, 王　嵩, 等. 颅内巨大动脉瘤的 DSA 表现及临床分析[J]. 中国医学计算机成像杂志, 1998;4:13 - 15.

[4] 邹英华, 蒋学祥, 彭　勃, 等. DSA 对颈动脉体瘤的诊断评价[J]. 实用放射学杂志, 1990;6:190 - 191.

[5] 胡　宁, 邓丽洁. 蛛网膜下腔出血的 DSA 和 CT 结果研究[J]. 中国临床医学影像杂志, 1999;10(1):26 - 28.

[6] Strother CM. In vitro study of haemodynamics in a giant saccular aneurysm model: infleuence of flow dynamics in the parent vessel and effects of coil embolisation[J]. Neuroradiology, 1995;37:157 - 161.

(上接第 182 页)

无法检出,这也可能就是我们计算出 PCR - MPH 的特异性偏低的原因。

在通过培养法对 496 例患者进行 UU 检测后发现:女性患者标本阳性率(44.7%)明显高于男性(23.7%)($P<0.01$),可能因为:①UU 更易侵犯女性生殖道;②女性患者所取的标本量普遍较男性的多;③部分女性症状不明显,未引起重视,未用过或很少用抗生素治疗,从而提高了培养的阳性率。同时,药敏结果显示,UU 对抗生素的敏感性与文献报道相似[5,6],临床上常用的氧氟沙星与红霉素已有很高的耐药性,并常检出多种抗生素同时耐药的毒株;由于强力霉素与原始霉素的副作用较大,因此交沙霉素对于目前治疗 UU 感染不失为一种较有效的抗生素,但 UU 的耐药性检测仍应引起临床的高度重视。

参　考　文　献

[1] Yoon BH, Chang JW, Romero R. Isolation of ureaplasma urealyticum from the amniotic cavity and adverse outcome in preterm labor[J]. Obstet Gynecol, 1998;92:77 - 82.

[2] 多田晃司, 出口隆, 米田尚生, 等. Polymerase chain reaction 法による Ureaplasma urealyticum　检出の基础的检讨[J]. 感染症学杂志, 1992;66(12):1621 - 1627.

[3] 胥　飚, 邢　艳, 张玉洪, 等. 应用聚合酶链反应技术检测解脲脲原体[J]. 重庆医科大学学报, 1996;21(2):138 - 139.

[4] 林万明. 核酸探针杂交实验技术[M]. 北京:中国科学技术出版社, 1991;191 - 194.

[5] Clegg A, Passey M, Yoannes M, et al. High rates of genital mycoplasma infection in the highlands of Papua New Guinea determined both by culture and by a commercial detection kit[J]. J Clin Microbiol, 1997;35(1):197 - 200.

[6] 楮云卓, 年　华, 贾桂英, 等. 解脲脲原体药敏结果分析[J]. 中华检验医学杂志, 2000;23(1):43.