

实时荧光核酸恒温扩增技术和实时荧光定量聚合酶链反应检测解脲脲原体的效果比较

陈娟 王庭强 张诗颜 黄咏 张袁露

作者单位: 355200 福建福鼎, 福建中医药大学附属福鼎医院检验科

通信作者: 陈娟, Email: 87544562@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2020.04.002

【摘要】 **目的** 比较实时荧光核酸恒温扩增技术(SAT)和实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)在解脲脲原体(UU)检测中的效果,以选择更为准确和快速的临床检验方法。**方法** 选择2018年1月—2020年1月在福建中医药大学附属福鼎医院就诊的89例临床疑似UU感染患者作为研究对象,同时使用SAT和qRT-PCR检测所有患者尿液和分泌物样本。比较两种方法的阳性检出率、敏感度、特异度、准确度。**结果** SAT的阳性检出率明显高于qRT-PCR〔69.7%(62/89)比51.7%(46/89), $P < 0.05$ 〕;SAT和qRT-PCR检测的敏感度分别为100.0%、78.0%,特异度分别为90.0%、100.0%,准确度分别为96.6%、85.4%,阳性预测值分别为95.2%、100.0%;阴性预测值分别为100.0%、69.8%。**结论** SAT对疑似UU感染的标本检测阳性率较高,有助于快速、准确筛查,值得临床推广。

【关键词】 实时荧光核酸恒温扩增技术; 解脲脲原体; 实时荧光定量聚合酶链反应

Comparison of simultaneous amplification and testing and quantitative real-time polymerase chain reaction in detection of *Ureaplasma urealyticum*

Chen Juan, Wang Tingqiang, Zhang Shiyan, Huang Yong, Zhang Yuanlu. Clinical Laboratory, Fuding Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuding 355200, Fujian, China

Corresponding author: Chen Juan, Email: 87544562@qq.com

【Abstract】 **Objective** To compare the diagnostic value of simultaneous amplification and testing (SAT) and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) in detection of *Ureaplasma urealyticum* (UU), and select the more accurate and rapid method for clinical testing. **Methods** The 89 clinically suspected UU patients admitted in Fuding Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine during January 2018 to January 2020 were selected as research objects and SAT and qRT-PCR were used to detect urine and secretion samples of all patients. The positive rate, sensitivity, specificity and accuracy of two methods were compared. **Results** The positive rate by SAT was significantly higher than that by qRT-PCR [69.7% (62/89) vs. 51.7% (46/89), $P < 0.05$]. The sensitivity of SAT and qRT-PCR was 100.0% and 78.0%, the specificity was 90.0% and 100.0%, the accuracy was 96.6% and 85.4%, the positive predictive values were 95.2% and 100.0%, and the negative predictive values were 100.0% and 69.8%, respectively. **Conclusions** The positive rate of suspected UU detection by SAT is higher. It is accurate, specific and has high clinical practicability.

【Key words】 Simultaneous amplification and testing; *Ureaplasma urealyticum*; Quantitative real-time polymerase chain reaction

支原体是生物界最小的一种原核微生物,可生长、繁殖于无生命培养基,解脲脲原体(*Ureaplasma urealyticum*, UU)、生殖道支原体等均属于支原体,主要分离于泌尿生殖道,会造成泌尿生殖道疾病,可引发30%~40%的男性非淋菌性、非衣原体尿道炎^[1]。在性传播疾病中,UU感染较为常见,近年来发生率日益升高。在UU检测中,实时荧光定量聚合酶

链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)是近年来应用最广泛的技术之一,但由于采集样本是分泌物拭子,采样过程中易产生损伤,而无损伤采集的样本进行qRT-PCR敏感度不高,且存在一定假阳性概率,因此临床上有必要寻找一种高敏感度、高特异度,同时可降低假阴性概率且适用于检测病原微生物含量较低标本的方法^[2]。

本研究统计分析了 2018 年 1 月—2020 年 1 月就诊于我院的 89 例疑似 UU 感染患者的临床资料,旨在评估实时荧光核酸恒温扩增技术(simultaneous amplification and testing, SAT)和 qRT-PCR 对 UU 的检测效果,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象及一般资料 选择 2018 年 1 月—2020 年 1 月本院收治的 89 例疑似 UU 感染患者,其中男性 30 例(占 33.7%),女性 59 例(占 66.3%);年龄 19~58 岁,平均(38.5±6.4)岁。

1.2 试剂与仪器 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司), SAT 试剂盒购自上海仁度生物科技有限公司, qRT-PCR 试剂盒购自广州达安基因股份有限公司。

1.3 检测方法

1.3.1 尿液样本采集 取患者清晨首次尿液,或长时间(至少 1 h)不排尿后的首段尿标本 2 mL。采集的样本在 2~30 °C 条件下于 24 h 内送至实验室加入样本保存液,制备成待测样本(RNA 在菌体死亡后很容易发生降解,标本须在 24 h 内加入保存液)。

1.3.2 分泌物拭子采集 男性患者采集分泌物时用棉拭子在尿道内停留 15 s,取出时均匀旋转 3 周;女性患者采集阴道内分泌物或宫颈口内 2 cm 处分泌物。将采集的棉拭子置于无菌试管中立即送检。

1.3.3 样本保存 标本采集后 24 h 内将尿液与样本保存液 1:1 混合(2 mL 尿液加入样本保存管至红色刻度线附近),所取分泌物拭子加入 1 mL 生理盐水。加入保存液后的待测样本在 2~8 °C 下保存不应超过 7 d, -20 °C 下保存不超过 3 个月, -70 °C 下可长期保存,避免反复冻融。

1.3.4 操作步骤 对所有患者尿液标本进行 SAT 检测,并对比同一患者分泌物标本的 qRT-PCR 结果,差异样本进行第三方鉴定。① SAT:洗脱拭子样本,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 1~2 d。混匀 400 μL 尿液或分泌物(加有保存液)+100 μL 核酸提取液,在 60 °C 下恒温、室温分别放置 5 min、10 min,在磁珠分离器上静置 5 min,加入洗涤液洗涤 2 次。置于半自动核酸提取仪上提取 RNA,然后吸取含磁珠的 30 μL 扩增检测液,放置于 8 连管中,加入 42 °C 预热的 SAT 酶液,在 42 °C 下进行 40 min 实时恒温扩增。② qRT-PCR:加入 1 mL 生理盐水样本振荡数秒,将液体转移至 1.5 mL 离心管中,以 12 000 r/min(离心半径 11 cm)离心 10 min,弃去上清,加入 50 μL 核酸提取液,

100 °C 金属浴中煮沸 10 min,以 1 000 r/min(离心半径 11 cm)离心 5 min,取 5 μL 上清液进行 qRT-PCR。

1.4 结果判读 ① SAT:依据阈值线与样本曲线交点的横坐标读数(dt), dt≤35 为阳性(UU 携带者), dt≤界值参考品 dt 值表明样本中 UU≥104 cfu/mL,需进行临床干预;35<dt<40 建议重新检测, dt<40 为阳性,无数值或 dt=40 为阴性^[3]。② qRT-PCR:根据阳性参考对照曲线,每个反应管内荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数(Ct 值)无数值为阴性, Ct 值<30.0 为阳性^[4]。

1.5 统计学方法 使用 SPSS 21.0 统计软件分析数据,符合正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 *t* 检验;计数资料以例或率表示,采用 χ^2 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SAT 和 qRT-PCR 检测 UU 阳性率比较 89 例疑似 UU 感染的临床标本中,使用尿液标本的 SAT 阳性检出率明显高于拭子标本的 qRT-PCR 阳性检出率(*P*<0.05)。见表 1。

表 1 SAT 和 qRT-PCR 检测 UU 的阳性情况比较

检测方法	例数(例)	阳性(例)	阴性(例)	阳性率(%)
SAT	89	62	27	69.7
qRT-PCR	89	46	43	51.7
χ^2 值				6.025 7
<i>P</i> 值				0.014 1

注: SAT 为实时荧光核酸恒温扩增技术, qRT-PCR 为实时荧光定量聚合酶链反应, UU 为解脲脲原体

2.2 SAT 和 qRT-PCR 对 UU 的诊断效能 89 例疑似 UU 感染的临床标本中,临床诊断阳性 59 例,阴性 30 例, SAT 法检测阳性 62 例,阴性 27 例; qRT-PCR 检测阳性 46 例,阴性 43 例。以临床诊断作为“金标准”, SAT 检测的敏感度为 100.0%(59/59),特异度为 90.0%(27/30),准确度为 96.6%(86/89),阳性预测值为 95.2%(59/62),阴性预测值为 100.0%(27/27); qRT-PCR 检测的敏感度为 78.0%(46/59),特异度为 100.0%(30/30),准确度为 85.4%(76/89),阳性预测值为 100.0%(46/46),阴性预测值为 69.8%(30/43)。SAT 检测的敏感度、特异度、准确度、阴性预测值均明显高于 qRT-PCR(均 *P*<0.05),阳性预测值和特异度均低于 qRT-PCR(均 *P*<0.05)。见表 2~3。

3 讨论

生殖道支原体感染与男性前列腺炎、女性宫颈炎等密切相关^[5]。在 UU 检测中, qRT-PCR 是临床通常采用的方法, qRT-PCR 的检测原理是在原有

表 2 SAT 和 qRT-PCR 检测 UU 的效果与临床诊断比较

SAT	例数 (例)	临床诊断(例)		qRT-PCR	例数 (例)	临床诊断(例)	
		阳性	阴性			阳性	阴性
阳性	62	59	3	阳性	46	36	10
阴性	27	0	27	阴性	43	3	40
合计	89	59	30	合计	89	39	50

注: SAT 为实时荧光核酸恒温扩增技术, qRT-PCR 为实时荧光定量聚合酶链反应, UU 为解脲脲原体

表 3 SAT 和 qRT-PCR 对 UU 的诊断效能比较

检测方法	敏感度 (%)	特异度 (%)	准确度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)
SAT	100.0	90.0	96.6	95.2	100.0
qRT-PCR	78.0	100.0	85.4	100.0	69.8

注: SAT 为实时荧光核酸恒温扩增技术, qRT-PCR 为实时荧光定量聚合酶链反应, UU 为解脲脲原体

PCR 的基础上增加了一条荧光探针,在扩增时荧光探针与病原体的一条 DNA 链结合,当引物延伸时,外切酶切断荧光探针中的荧光基团,此时荧光基团发光,通过拍照设备获得图像,检测荧光强度,从而反映病原体的产物量^[6]。在对 UU 进行检测的过程中, qRT-PCR 只能采用拭子样本,取样过程具有侵入性,给患者造成一定痛苦。但由于 qRT-PCR 操作简便、较为经济,同时能够降低产物污染,因此现阶段在临床实验室检测中较为常用^[7]。SAT 是指靶标 RNA 在反转录酶作用下反转录合成一条包含 T7 启动子的双链 DNA, T7 RNA 聚合酶以这条双链 DNA 为模板进行转录,每个 RNA 可以扩增出 100~1 000 个拷贝的 RNA。合成所得的 RNA 与分子信标结合,发出荧光,可以被荧光检测仪检测到^[8]。与此同时,新合成的 RNA 继续在反转录酶和 T7 RNA 聚合酶的作用下循环反转录和转录的过程,如此往复,以达到高效扩增的目的^[9]。SAT 的检测样本可以为泌尿生殖道分泌物,也可以为尿液,而尿液取样具有非侵入性,可以让受检者自行取材,一方面能减少医生工作量,另一方面还能避免拭子取样给患者造成的痛苦,易为患者所接受。

有研究显示,在 UU 检测中, SAT 具有较高的准确性,能有效满足快速、简便的实验要求,且 SAT 的检测样本可以为尿液,因此临床应用价值较高^[10]。本研究结果表明,实验方案共验证 89 例疑似 UU 感染临床标本,其中 SAT 法(尿液标本)共检出 62 例阳性,阳性率为 69.7%; qRT-PCR (拭子标本)共检出 46 例阳性标本,阳性率为 51.7%。SAT 法阳性率高于 qRT-PCR,且 qRT-PCR 检出阳性的标本 SAT 均检出阳性。SAT 法检测的敏感度、准确度、阴性预

测值均高于 qRT-PCR,阳性预测值低于 qRT-PCR,与上述研究结果^[10]一致,表明 SAT 法在 UU 检测中具有较高的阳性率、敏感度、准确度和阴性预测值,同时还具有检测速度快、取样方便的优点。SAT 属于一种新型 RNA 检测技术,有机结合了实时荧光检测与 RNA 恒温扩增技术,运用磁珠法特异性提取尿液样本中的 UU RNA,不需要高温加热和高速离心,具有较高的提取效率。同时, RNA 在常规环境中易降解,交叉污染较少,能有效解决污染引发的假阳性问题,也能为监测临床疗效提供有利条件。此外, SAT 采用水相洗涤,可特异性捕获靶标,具有较少的反应抑制物,能有效降低假阴性概率和提高检测灵敏度^[11]。

综上所述,采用 SAT 检测 UU 较 qRT-PCR 效果更好,值得在临床推广。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- 包杰,陈丹.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[J].实验与检验医学,2017,35(5):673-676. DOI: 10.3969/j.issn.1674-1129.2017.05.012.
- 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.
- 王利军.三种检测技术在不孕不育症患者解脲脲原体检测中的应用比较[J].实验与检验医学,2017,35(2):239-240. DOI: 10.3969/j.issn.1674-1129.2017.02.032.
- 方伟祯,蔡振华,张银霞,等.SAT技术在沙眼衣原体和解脲脲原体检测中的应用[J].中华检验医学杂志,2018,41(5):380-384. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2018.05.011.
- 王鹏,秦淑红,邵艳,等.泌尿生殖道支原体感染状况及药敏结果分析[J].实用检验医师杂志,2015,7(2):100-103. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2015.02.009.
- 陈小波,朱庆文,徐爱萍,等.实时荧光核酸恒温扩增技术在解脲脲原体检测中的应用[J].国际检验医学杂志,2016,37(23):3348-3350. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.23.045.
- 石瑛,王云凤,路璐,等.实时荧光核酸恒温扩增技术在解脲脲原体检测中的临床应用价值[J].检验医学,2017,32(11):1043-1045. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8640.2017.011.023.
- 王碧伟,李赛,苏晓红,等.南京地区性病门诊就诊者生殖支原体感染情况分析[J].中华男科学杂志,2018,24(12):1073-1077. DOI: 10.13263/j.cnki.nja.2018.12.004.
- 程松,李媛媛,郭宾,等.RNA实时荧光核酸恒温扩增检测技术检测解脲脲原体的Meta分析[J].中国微生态学杂志,2019,31(2):157-163. DOI: 10.13381/j.cnki.cjm.201902008.
- Kawai Y, Nakura Y, Wakimoto T, et al. In vitro activity of five quinolones and analysis of the quinolone resistance-determining regions of gyrA, gyrB, parC, and parE in *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* clinical isolates from perinatal patients in Japan [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(4): 2358-2364. DOI: 10.1128/AAC.04262-14.
- Ruan Z, Yang T, Shi X, et al. Clonality and distribution of clinical *Ureaplasma* isolates recovered from male patients and infertile couples in China [J]. PLoS One, 2017, 12(8): e0183947. DOI: 10.1371/journal.pone.0183947.

(收稿日期: 2020-07-13)
(本文编辑: 邵文)