

• 检验技术与方法 •

淋病奈瑟球菌四种检测法对比及应用

马希祥¹, 马 力²

(山东省滨州市人民医院:1. 检验科;2. 烧伤整形美容科, 山东滨州 256600)

摘要:目的 比较 4 种淋病奈瑟球菌检测方法的阳性检出情况, 为临床的初筛和诊断提供依据。方法 收集泌尿科患者尿液和妇科患者的宫颈分泌物及尿液, 采集的标本中, 已知泌尿系统淋病奈瑟球菌感染 35 例, 疑诊淋病奈瑟球菌感染 35 例。分别采用培养法、直接涂片法、快速抗原检测法及聚合酶链反应(PCR)法检测标本中淋病奈瑟球菌。结果 已知淋病奈瑟球菌感染患者采用培养法和直接涂片法检测均无淋病奈瑟球菌假阳性出现, 快速抗原检测法的假阳性率为 5.71%(2/35), PCR 法的假阳性率为 2.86%(1/35)。培养法、PCR 法、直接涂片法及快速抗原检测法的变异系数分别为 0.98%、1.03%、1.45% 及 2.06%, 敏感度分别为 68.81%、88.74%、86.28% 及 84.35%, 培养法的变异系数及敏感度分别与其余 3 种方法比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。培养法的特异性最好(100%), 直接涂片法和 PCR 法次之(97.6%), 快速抗原检测法最低, 为 94.2%。疑诊淋病奈瑟球菌感染患者采用培养法检测淋病奈瑟球菌的阳性率与快速抗原检测法、PCR 法比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 淋病奈瑟球菌快速抗原检测法和涂片法可作为诊断淋病患者的筛查方法, 培养法可用于需要进行微生物敏感性试验的患者, PCR 检测法可作为慢性淋病检测的首选方法。

关键词:奈瑟球菌, 淋病; 聚合酶链反应; 培养; 涂片; 抗原检测

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.09.031

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)09-1129-02

淋病在中国性传播疾病中的发病率位居第 2, 主要为淋病奈瑟球菌引起的泌尿生殖系统疾病, 全球每年新增病例超过 6 000 万^[1]。由淋病奈瑟球菌感染引起的附睾炎、盆腔炎等给患者心理和身体健康造成极大危害, 有研究证实淋病可促进人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)的传播。本研究旨在比较 4 种常见的淋病奈瑟球菌检测方法, 为临床应用提供参考。

1 资料与方法

1.1 标本来源 收集 2012 年 1 月至 2012 年 9 月本院泌尿科患者尿液和妇科患者的宫颈分泌物及尿液, 采集的标本中, 已知泌尿系统淋病奈瑟球菌感染 35 例, 疑诊淋病奈瑟球菌感染 35 例。

1.2 主要试剂 淋病奈瑟球菌选择性培养基(T-M)购自天津市金章科技发展有限公司, 氧化酶试剂、APINH 生化鉴定试纸条为法国生物梅里埃公司产品, 快速革兰染色液购自珠海贝索生物技术有限公司, 淋病奈瑟球菌抗原检测试剂盒购自郑州安图绿科生物工程有限公司, 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)试剂盒购自上海科华生物工程股份有限公司。

1.3 检测方法 (1)培养法。用无菌棉签采集男性患者尿道内 2~4 cm 处分泌物, 女性患者宫颈口内侧 0.5~1.0 cm 处分泌物黏液, 立即接种于淋病奈瑟球菌选择性培养基(T-M), 置 35 ℃, 5%CO₂ 培养箱中培养 48 h。圆形、凸起、湿润、半透明或灰白为淋病奈瑟球菌特征, 氧化酶试验阳性和革兰染色阴性的双球菌判定为淋病奈瑟球菌阳性。(2)直接涂片法。取采集的分泌物立即涂片, 待自然干燥后行革兰染色, 在显微镜油镜下观察 20 个视野。涂片染成红色或粉红色, 形态为肾形对称或半圆形对称排列者, 为淋病奈瑟球菌阳性; 而单个或成团位于细胞内或细胞外者, 为革兰阴性双球菌。(3)快速抗原检测法。严格按照淋病奈瑟球菌抗原检测试剂盒说明书操作。当加入快速检测液时, 若产生的气泡绕试管壁成环形, 则为淋病奈瑟球菌阳性。(4)PCR 法。按说明书操作, 通过凝胶电泳观察色带判定结果。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析, 计数资料用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 已知泌尿系统淋病奈瑟球菌感染患者的检测结果 对已知泌尿系统淋病奈瑟球菌感染者的分泌物及尿液进行检测, 以考察不同检测方法的假阳性率、变异系数、灵敏度和特异性。培养法和直接涂片法检测均无淋病奈瑟球菌假阳性出现, 快速抗原检测法的假阳性率为 5.71%(2/35), PCR 法的假阳性率为 2.86%(1/35)。培养法、PCR 法、直接涂片法及快速抗原检测法的变异系数分别为 0.98%、1.03%、1.45% 及 2.06%, 灵敏度分别为 68.81%、88.74%、86.28% 及 84.35%, 培养法的变异系数及敏感度分别与其余 3 种方法比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。培养法的特异性最好(100%), 直接涂片法和 PCR 法次之(97.6%), 快速抗原检测法最低, 为 94.2%。

2.2 疑诊淋病奈瑟球菌感染患者的检测结果 培养法、PCR 法、直接涂片法及快速抗原检测法对疑诊淋病奈瑟球菌感染患者的阳性检出情况见表 1。培养法检测的阳性率与快速抗原检测法、PCR 法比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 培养法与涂片法比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 4 种淋病奈瑟球菌检测方法对疑诊淋病奈瑟球菌感染患者阳性检出情况的比较[n(%)]

性别	n	培养法	直接涂片法	快速抗原检测法	PCR 法
男	24	21(87.5)	21(87.5)	22(91.7) ^a	21(87.5)
女	11	6(54.5)	6(54.5)	8(72.7) ^a	7(63.6) ^a
合计	35	27(77.1)	27(77.1)	30(85.7) ^a	28(80.0) ^a

^a: $P < 0.05$, 与培养法比较。

3 讨 论

科学取样对检测结果具有决定性作用。男性淋菌性尿道炎发病期患者的尿道口通常脓液较多, 在尿道口或较浅尿道取样均可检出阳性; 但对于病程较长的患者, 尿道分泌物可能少或无分泌物, 使淋病奈瑟球菌数量较少, 容易漏检, 从而造成这类患者的阳性检出率低。脓细胞内、外的淋病奈瑟球菌仅是整个淋病病程中炎症反应最严重时期的阶段性表现, 故取尿道柱状上皮部位的黏膜细胞进行培养可提高淋病奈瑟球菌的检出

率^[2]。培养法虽为诊断淋病的常规方法和金标准^[3-4],但操作繁琐耗时,且敏感性较低,不适于快速筛查和早期诊断,适于症状较轻或无症状的患者。直接涂片法使用简单、快速、价廉,可辨识度高,适合基层医院采用。本研究中,男性标本的检出率高于女性标本,在其他地区也存在类似现象的报道^[5],这可能是由于男性患者在急性淋菌性尿道炎时脓性分泌物多,症状明显而就诊。慢性淋病患者实验室检查的敏感性较低,易受与淋病奈瑟球菌形态相似的不动杆菌、莫拉菌等干扰,造成假阳性^[6],故女性患者易出现假阳性^[7]。快速抗原检测法是利用细菌酶反应产生气泡以鉴别是否感染淋病奈瑟球菌,该方法便于肉眼观察,操作时间较培养法短,可作为临床大批量体检标本的初筛。PCR 法是灵敏度高、特异性强的分子生物学检测新技术,对操作环境和人员技术要求高^[8]。在极微量病原体存在时也能检出,可用于抗菌药物使用后的检测,广泛用于尿液等低菌液标本的检测。若直接涂片法提示淋病奈瑟球菌阴性,可考虑采用 PCR 检测,以发挥其独特优势。对于慢性淋病患者,PCR 检测法特异性强、灵敏度高、阳性率高,可作为慢性淋病检测的首选方法。尿液淋病奈瑟球菌快速抗原检测法和涂片法可作为诊断淋病患者的筛查方法,对于需要做微生物敏感性试验的患者建议采用培养法。临床疑诊淋病奈瑟球菌感染时,应根据实际情况选择适合的检测方法,以提高诊断效率,把握

• 检验技术与方法 •

最佳治疗时机。

参考文献

- [1] 王建兰,祝永佳,祝慧华.2007年-2010年淋球菌的检测及结果分析[J].中国卫生检验杂志,2011,21(10):2534-2535.
- [2] 王国江.关于对王文根同道疑问的答复[J].中国皮肤性病学杂志,2008,22(1):72-73.
- [3] 安邦邦,孙兆林,凌晓午,等.4种方法检测男性尿道分泌物淋菌结果比较分析[J].中华医院感染学杂志,2008,18(11):1645-1647.
- [4] Zohar Y,Muñoz-Cueto JA,Elizur A,et al.Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish[J].Gen Comp Endocrinol,2010,165(3):438-455.
- [5] 毛源,王晶.江苏地区男性与女性 NG、CT 及 UU 感染情况比较[J].国际检验医学杂志,2012,33(19):2350-2351.
- [6] 干迪郁,朱立军,任利珍.淋病奈瑟菌三种检测方法的评价[J].放射免疫学杂志,2012,25(2):107.
- [7] 胡耀华,胡四海.淋病奈瑟菌检测技术研究进展[J].中国热带医学,2009,9(11):2194-2196.
- [8] 孙爱华,范兴丽,孙琦.淋病、梅毒和尖锐湿疣三联金标试纸条的制备及其应用[J].中国卫生检验杂志,2008,18(7):1274-1276.

(收稿日期:2012-12-11)

荧光聚合酶链反应检测在耐甲氧西林金黄色葡萄球菌检测中的应用

瞿伟华¹,陈碧英²,郎立中²

(1. 上海市监狱总医院检验科,上海 201318;2. 上海市第七人民医院检验科,上海 200137)

摘要:目的 探讨荧光聚合酶链反应(PCR)检测在耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)检测中的应用。方法 收集上海市监狱总医院肺部感染患者的痰液标本,共 3 768 份,分别进行 PCR、纸片扩散抗菌试验、琼脂稀释法检测。结果 采用一般细菌培养分离鉴定与荧光 PCR 检测均检出 103 例金黄色葡萄球菌,阳性率 2.7%。采用纸片扩散抗菌试验检测,检出 57 株 MRSA 阳性;采用琼脂稀释法检测,检出 58 株 MRSA 阳性。采用荧光 PCR 检测,有 58 株 *Meca* 基因扩增呈阳性。结论 荧光 PCR 检测具有快速、简易、稳定、敏感性强、特异性高的特点,可用于 MRSA 的快速鉴定。

关键词:葡萄球菌,金黄色; 甲氧西林抗药性; 聚合酶链反应; 纸片扩散抗菌试验; 琼脂稀释法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.09.032

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)09-1130-03

随着上海市逐渐步入老年社会,上海市监狱收押人员也呈现出老龄化的趋势,根据上海市监狱总医院微生物实验室近年来的统计,临床痰液细菌的一般培养标本量逐年增加,且致病菌的检出率也不断上升。临床对微生物检验报告的及时、准确性要求不断提高。笔者针对这一情况进行了探索,认为荧光聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)具有快速、简易、稳定的特点,对快速鉴定耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA)具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料 收集 2010 年 9 月至 2012 年 5 月于上海市监狱总医院因肺部感染住院的患者痰液标本,共 3 768 份,同时进行一般细菌培养与荧光 PCR 检测。

1.2 主要仪器与试剂 主要仪器为罗氏 LightCycler 480 II 实时荧光定量 PCR 系统。主要试剂为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药基因检测试剂盒(上海之江生物科技股份有限公司)、苯唑西林(上海源叶生物科技有限公司)、药敏纸片(英国 Oxoid 公司)。质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC25923,由上海市临床检验中心提供。

1.3 纸片扩散抗菌试验 将菌液调至 0.5 MCF(麦氏浊度单位),均匀涂抹于 4 mm 的 Mueller-Hinton 琼脂平板上,采用头孢西丁药敏纸片(30 μ g/片)检测金黄色葡萄球菌,35 °C 孵育 24 h,将头孢西丁对金黄色葡萄球菌抑菌圈直径小于 21 mm 判定为 MRSA,≥22 mm 为对甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌。

1.4 琼脂稀释法 即最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)法。用含 20 g/L NaCl 的 Mueller-Hinton 琼脂将苯唑西林倍比稀释为 12 个不同浓度并浇注平板。苯唑西林终浓度为 0.13~256.00 μ g/mL。再将菌液调至 0.5 MCF,点种于含药平板,35 °C 孵育 24 h。抑菌圈直径不超过 10 mm 为阳性菌株。

1.5 荧光 PCR (1)核酸裂解:直接在痰液标本中加入其体积 4 倍的 4%NaOH,室温放置 30 min,取 0.5 mL 稀释痰液在离心管中离心 2 min(离心半径 8 cm,12 000 r/min),弃上清液;再加入 0.5 mL 4%NaOH,离心 5 min(离心半径 8 cm,12 000 r/min),弃上清液;加入 1 mL 生理盐水,离心 5 min(离心半径 8 cm,12 000 r/min),弃上清液;在沉淀中加入 50 μ L