

[6] 刘玲,蒋玮莹,许世艳,等. 广东地区地中海贫血致病基因的基因型及 β 珠蛋白基因多态性研究[J], 中华血液学杂志, 2013, 34 (7):598-600.

[7] 曾劲伟,区丽群,洁甜,等. β 地贫 CD41-42 突杂合子复合缺失型 α 地贫双重杂合子的基因检测与血液学分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2004, 12(1):22-25.

[8] 张永良,汪伟山,周玉球,等. α -地中海贫血基因型和红细胞参数的关系研究[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(5):421-424.

[9] 孙曼娜,熊符,张新华,等. 血红蛋白 Constant Spring 的表型与基因分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2010, 27(5):482-483.

(收稿日期:2014-03-02)

• 经验交流 •

梅州地区不孕不育患者支原体检测分析

谢桂芬

(梅州市计划生育服务中心, 广东梅州 514021)

摘要:目的 分析女性不孕患者白带支原体和男性不育患者精液支原体的感染及耐药性,及支原体培养的假阳性情况。方法 对 310 例女性不孕患者白带和 122 例男性不育患者精液进行支原体培养与药敏试验,对白带和精液直接涂片革兰染色后进行真菌镜检,并对解脲支原体阳性标本进行核酸检测。结果 432 例检测标本检出支原体 225 例,感染率 52.08%;白带标本支原体感染率为 66.13%,其中解脲支原体(UU)感染 162 例(52.26%),人型支原体(MH)感染 12 例(3.87%),合并感染 31 例(10.00%);精液标本支原体感染率为 16.39%,其中解脲支原体感染 14 例(13.93%)、人型支原体感染 2 例(1.64%)、合并感染 4 例(3.28%),女性患者支原体感染率与男性患者相比,二者感染率差异有统计学意义($P<0.05$);单纯 UU 感染对抗菌药物敏感率较高的是交沙霉素、阿齐霉素、克拉霉素、美满霉素和强力霉素;单纯 MH 感染对交沙霉素、强力霉素全部敏感;Uu+Mh 合并感染对强力霉素、美满霉素较为敏感;女性支原体感染阳性者的白带合并阴道念珠菌感染占 16.58%,男性中未见合并感染;211 例 UU 阳性标本进行解脲支原体核酸检测,阳性率为 92.89%。结论 支原体感染以 UU 感染为主,UU 与 MH 的耐药性不同,生殖道支原体感染的治疗可首选美满霉素或强力霉素,念珠菌感染有可能导致支原体培养的假阳性。

关键词:支原体; 抗药性;微生物; 念珠菌; 假阳性
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.13.058 **文献标识码:**B **文章编号:**1673-4130(2014)13-1793-03

生殖道支原体以解脲支原体(*ureaplasma urealyticum*, UU)和人型支原体(*mycoplasma hominis*, MH)为主,是引起人类非淋菌性尿道炎、宫颈炎、前列腺炎、不孕不育等疾病的主要病原菌^[1-3]。在支原体检测中,单凭肉汤培养液颜色变化判断有无支原体生长,容易受真菌干扰造成假阳性^[4]。本实验室通过对临床女性不孕患者白带和男性不育症患者精液支原体的感染及耐药性分析,并探讨支原体检测的假阳性情况,为临床正确诊断和治疗不孕不育患者支原体感染提供有益参考。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 432 例标本取自 2011 年 6 月至 2013 年 6 月梅州市计划生育服务中心门诊患者,其中女性不孕患者白带标本 310 例,男性不育患者精液标本 122 例,年龄 24~48 岁。

1.2 标本采集 女性:使用一次性无菌采样拭子取样(两管),在取样前用棉球将宫颈口外区域的黏液抹去,将取样拭子插入宫颈管内通过鳞柱状上皮交界处,旋转拭子 15~20 s 取出,不要碰到阴道壁及宫颈外。男性:精液标本采集前须禁欲,通过手淫法采集精液标本,置于无菌杯内送检。所有患者在采集标本前均未用过抗菌药物或停用抗菌药物 1 周以上。

1.3 主要试剂与仪器 支原体培养及药敏培养基(珠海丽珠试剂公司);药敏试验用的抗菌药物为美满霉素(MIN)、强力霉素(DOX)、司巴沙星(SPA)、罗红霉素(ROX)、阿齐霉素(AZI)、交沙霉素(JOS)、克拉霉素(CLA)、氧氟沙星(OXY)和左氧氟沙星(LEV);革兰染色液,根据全国临床检验操作规程^[5]自行配制;一次性使用无菌采样拭子(浙江拱北医用塑料厂);解脲支原体核酸检测试剂盒(中山大学达安基因股份有限公司);生物培养箱(广东省医疗器械厂);OLYMPUS CHK 显微镜(日本 OLYMPUS 公司);7500 荧光 PCR 仪(美国 ABI

公司)。

1.4 支原体培养及药敏试验 取出培养板条及培养液,用吸枪于空白孔加入培养液 100 μ L,在每孔(空白除外)加入含标本的培养液 100 μ L。在每孔加入矿物油 2 滴。加盖放入培养箱,35~37 $^{\circ}$ C 培养 24~48 h,24 h 和 48 h 分别观察结果。结果判读解释:同时设置阴阳性对照,培养基由黄色变为红色者为阳性;相应的药敏孔由黄色变为红色提示耐药,变为橙色提示中介,仍为黄色提示敏感。

1.5 涂片染色镜检 白带和精液涂片直接进行革兰染色后镜检查找念珠菌。

1.6 解脲支原体核酸检测 用裂解法进行 DNA 提取,向反应管中加入 PCR 反应液 40 μ L、Taq 酶 3 μ L 和 DNA 2 μ L。将 PCR 反应管放入荧光 PCR 仪内,进行核酸扩增 PCR 循环条件设置:93 $^{\circ}$ C,2 min;93 $^{\circ}$ C,45 s;55 $^{\circ}$ C,1 min,10 个循环;93 $^{\circ}$ C,30 s;55 $^{\circ}$ C,45 s;30 个循环(55 $^{\circ}$ C 时收集荧光)。荧光设定:报告基团设定 FAM,淬灭基团设定 TAMRA。

1.7 统计学处理 药敏数据分析采用 WHONET 5.4 软件和应用 SPSS 19.0 软件,用 χ^2 检验进行显著性分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 支原体检出的构成及分布 共 432 例检测标本,检出支原体 225 例,感染率为 52.08%,其中解脲支原体(UU)感染 176 例,人型支原体(MH)感染 14 例,Uu+Mh 合并感染 35 例。男女患者支原体感染情况见表 1。从表 1 可以看出,女性患者支原体感染率为 66.13%(205/310),男性患者支原体感染率为 16.39%(20/122),经完全随机 χ^2 检测,显示二者检出率差异有统计学意义($P<0.05$)。单纯 UU 感染、单纯 MH 感染和 Uu+Mh 混合感染三者的感染率相比,也有明显的差异,

主要以 UU 感染为主。

2.2 支原体阳性标本的药敏结果 单纯 UU 感染对抗菌药物敏感率较高的是交沙霉素、阿齐霉素、克拉霉素、美满霉素和强力霉素,而对氧氟沙星的敏感性最低;单纯 MH 感染对美满霉素和强力霉素全部敏感,对克拉霉素、阿齐霉素和罗红霉素有较高的耐药性;Uu+MH 合并感染对强力霉素、美满霉素较为敏感,对克拉霉素和阿齐霉素耐药率高达 80% 以上。药敏分

析见表 2。

表 1 男女患者支原体感染情况[n(%)]				
性别	n	UU 感染	MH 感染	Uu+Mh 感染
女性	310	162(52.26)	12(3.87)	31(10.00)
男性	122	14(13.93)	2(1.64)	4(3.28)
合计	432	176(40.74)	14(3.24)	35(8.10)

表 2 支原体对 9 种抗菌药物的敏感性分析(%)

抗菌药物	UU(n=176)			Uu+MH(n=35)			MH(n=14)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
左氧氟沙星	42.61	48.86	8.53	25.71	45.71	28.58	50.00	28.57	21.43
氧氟沙星	31.82	50.59	17.59	22.86	37.14	40.00	50.00	21.43	28.57
司巴沙星	51.70	36.93	11.37	37.14	31.43	31.43	50.00	28.57	21.43
罗红霉素	48.86	42.61	8.53	60.00	8.57	31.43	7.14	7.14	85.71
交沙霉素	91.48	7.39	1.13	88.57	2.86	8.57	92.86	0.00	7.14
强力霉素	89.77	3.18	7.05	94.29	0.00	5.71	100.00	0.00	0.00
克拉霉素	91.48	4.55	3.97	17.14	2.86	80.00	7.14	0.00	92.86
阿齐霉素	83.52	9.66	6.82	11.43	2.86	85.97	7.14	0.00	92.86
美满霉素	92.61	0.57	6.82	95.14	0.00	2.86	100.0	0.0	0.0

S:表示敏感,I:表示中介,R:表示耐药。

2.3 支原体感染阳性标本涂片结果分析 女性患者支原体感染中,合并阴道念珠菌感染有 34 例,占 16.58%,男性患者支原体感染中,未见合并念珠菌感染的情况。

2.4 解脲支原体核酸检测结果 211 例 UU 阳性标本进行解脲支原体核酸检测,有 196 例为阳性,若以核酸检测结果为标准,解脲支原体培养的真阳性为 92.89%,假阳性标本中合并念珠菌感染的有 3 例,见表 3。

表 3 解脲支原体核酸检测情况(n)

项目	n	UU 阳性	UU 阳性+念珠菌
真阳性	196	165	31
假阳性	15	12	3
合计	211	177	34

3 讨 论

支原体具有黏附细胞的特性,并可释放毒性产物,破坏细胞吸收营养,是非淋菌性泌尿生殖道炎症的重要病原体之一。对女性来说,Uu 可以引起子宫内膜炎、子宫颈炎、急性输卵管炎等盆腔炎症性疾病,而这些疾病都可造成机械性损伤导致不孕。研究表明^[6],输卵管性不孕症患者生殖道支原体感染率高达 89.99%。对男性来说,可引起前列腺炎、附睾炎等男性泌尿生殖道的多种疾病,从而导致精液的各项参数发生改变^[7],而且支原体能黏附精子,阻碍精子运动,干扰精子与卵子发生的结合导致男性不育。

在本文分析中,432 例检测标本检出支原体阳性 225 例,感染率 52.08%,与本地区几年前的报道^[8]相比,感染率大大提高(19.33%)。其中 UU 感染 176 例,MH 感染 14 例,合并感染 35 例。女性患者支原体感染率为 66.13%(205/310),男性患者支原体感染率为 16.39%(20/122),经完全随机 χ^2 检

测,显示二者检出率差异有统计学意义($P<0.05$)。女性支原体感染率较男性高,可能与其生理解剖特征有关,支原体更容易在女性泌尿生殖道定居。男女患者支原体感染率与广州张丽梅等^[9]报道相近,但男性患者支原体感染率低于深圳吕宁等^[10]的报道,这可能与检测方法不同、人群构成不同及地区间的差异造成支原体的阳性率存在一定差异有关。

目前临床治疗支原体感染常用四环素类、喹诺酮类、大环内酯类这 3 类干扰蛋白质合成的药物。本文药敏试验结果显示,单纯 UU 感染对抗菌药物敏感率较高的是交沙霉素、阿齐霉素、克拉霉素、美满和强力霉素,而对氧氟沙星的敏感性最低;单纯 MH 感染对美满霉素霉素和强力霉素全部敏感,对克拉霉素、阿齐霉素和罗红霉素有较高的耐药性;UU+Mh 合并感染对强力霉素、美满霉素较为敏感,对克拉霉素和阿齐霉素耐药率高达 80% 以上。因此,生殖道支原体感染的治疗可首选美满霉素或强力霉素。

本文资料显示,女性患者支原体感染中,合并阴道念珠菌感染占 16.58%,而男性患者未见合并念珠菌感染。念珠菌性阴道炎患者中均存在有 UU 或 Mh 的合并感染情况,且易致患者的病情迁延不愈或反复复发^[11]。211 例 UU 阳性标本进行解脲支原体核酸检测,阳性率为 92.89%,假阳性标本中合并念珠菌感染的有 3 例。可见合并念珠菌有可能导致假阳性出现,虽然念珠菌不能分解脲素或精氨酸,但也会影响支原体肉汤培养液颜色变化的判断^[12],且会干扰药敏试验结果的准确性。因此,在条件允许的情况下可加做解脲支原体核酸检测,以便给患者和临床医生提供更准确的检测结果,从而合理用药。

参考文献

[1] 彭慧兰,曹来英,魏敏. 孕妇与不孕症妇女解尿支原体、沙眼衣原体的研究[J]. 第四军医大学学报,2005,26(1):64-66.

- [2] 陈东科,孙长贵.实用临床微生物学检验与图谱[M].北京:人民卫生出版社,2011:554-555.
- [3] 周庭银.临床微生物学诊断与图解[M].2版.上海:上海科学技术出版社,2007:289-293.
- [4] 刘长德,张艳,于成源,等.支原体培养假阳性结果原因分析[J].中华检验医学杂志,2006,29(3):214-216.
- [5] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国 I 临床检验操作规程[M].3版.南京:东南大学出版社,2006:725-726.
- [6] 周芸,许学岚,王春平,等.327 例输卵管性不孕患者生殖道衣原体、支原体检测及药物敏感分析[J].中华实验和临床病毒学杂志,2011,25(3):201-204.
- [7] 马春杰,唐立新,蒋敏,等.供精者解脲支原体感染与精液参数的相关性研究[J].广东医学,2006,27(1):59-61.
- [8] 邓忠莉.梅州地区不孕不育症 355 例临床分析[J].南方医科大学学报,2006,26(5):714-716.
- [9] 张丽梅,徐韞健,廖伟娇,等.泌尿生殖道支原体耐药性分析及其合并细菌、念珠菌感染情况[J].广州医药,2009,40(1):28-31.
- [10] 吕宁,陈建波,肖颜玉,等.5724 例泌尿生殖道感染的支原体感染状况及药物敏感结果分析[J].重庆医学,2013,42(22):2649-2651.
- [11] 钟培丽,宋慧娟,李练红.复发性外阴阴道真菌感染合并支原体感染的研究[J].临床和实验医学杂志,2010,9(17):1877-1880.
- [12] 汪丽,吕婉飞,张媛媛,等.2007~2008 年医院常见病原菌的耐药性监测[J].中华医院感染学杂志,2009,19(23):3244-3246.

(收稿日期:2014-02-15)

• 经验交流 •

导流杂交基因芯片技术检测人乳头状瘤病毒基因分型的结果分析

黄德秋,廖燕飞,陈 燕,钟雪兵
(肇庆市中医院检验科,广东肇庆 526020)

摘 要:目的 了解本地区女性人乳头状瘤病毒(HPV)感染年龄及基因亚型的分布特点。方法 采用快速导流杂交基因芯片技术(Hybrimax),对 530 例门诊及住院患者宫颈口及宫颈脱落上皮细胞进行 21 种 HPV 感染基因亚型的检测。结果 HPV 总感染率为 30.9%,其中高危型感染率为 72.5%,低危型感染率为 27.5%;在年龄分布中,<30 岁组感染率较高,占检测数的 48%,高危型占 36%;在 164 例阳性者中,一重感染率为 71.9%,二重及以上感染率为 28.1%($P<0.05$);在 21 种分型中高危型以 52(14.1%)、58(11.2%)、16(10.6%)、18(8.2%)和 39(8.2%)为主,低危型以 6(14.1%)为主。结论 快速导流杂交法 HPV 基因分型检测,为女性宫颈疾病流行病学及防治提供重要的线索,了解 HPV 感染及本地区 HPV 亚型的分布情况,对本地区常见、多见的亚型提供疫苗防治的理论基础,为有效防治宫颈上皮内瘤样病变,降低宫颈癌的发病率,具有积极意义。

关键词:人乳头状瘤病毒; 导流杂交基因芯片技术; 基因分型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.13.059

文献标识码:B

文章编号:1673-4130(2014)13-1795-03

自从上世纪 70 年代首次发现人乳头状瘤病毒(HPV)感染是宫颈癌发生的一个重要的原因以来,宫颈癌与 HPV 感染的相关研究不断深入;现已明确 HPV 的持续感染是宫颈癌发生的必要条件,从宫颈上皮不典型增生到浸润癌是一个持续发生、发展的过程,大约需要 10 年时间。并且 HPV 属于乳多空病毒科的乳头状瘤空泡病毒 A 属,它是一个无包膜小型双链环状 DNA 病毒,呈二十面体对称球形,直径 45~55 nm,具有强烈嗜上皮性、高度组织和宿主特异性,DNA 序列分析发现 HPV 至少有 200 多个基因型,迄今已确定基因组全序列的 HPV 基因型有 85 种,其中 42 种与人类疾病有关^[1],根据不同型号,依次分为低危型和高危型,低危型主要引起尖锐湿疣等疣症,高危型是诱发宫颈癌的重要致病因素。因此,对 HPV 进行准确的基因分型,明确患者感染 HPV 的高低危型别,对 HPV 感染的治疗、宫颈癌的预防、流行状况的调查及基因疫苗的研制均有重要的临床意义^[2]。

作者采用快速导流杂交基因芯片法,对门诊及住院患者 HPV 21 种基因分型进行检测及分析,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2013 年 3 月至 2013 年 12 月期间在本院妇科住院及门诊就诊,怀疑 HPV 感染的女性共计 530 例,年龄 16~60 岁,平均(36.5±5.2)岁。

1.2 仪器与试剂 DA-7600 型核酸扩增检测仪,HybriMax-

MHH2 型核酸分子快速杂交仪,阿尔泰 BHC-1100 II A2 超净工作台,干热器、离心管、扩增管、离心机、移液器、旋涡振荡器等。HPV 基因分型检测杂交试剂盒(由广东潮州凯普生物化学有限公司提供)。

1.3 样本处理 在妇科医师指导下采用扩阴器暴露宫颈口,将宫颈口的分泌物擦去,然后用凯普公司配套专用宫颈刷伸入宫颈口处,轻轻搓动宫颈刷使其顺时针转 3 至 5 圈,慢慢抽出宫颈刷,将其放入装有细胞保存液的样本管中;在管口处将多余的刷柄折断,将刷头留在样本管中,立即送检或置冰箱(4℃)中保存,并在 2 周内检测。

1.4 方法

1.4.1 原理 快速导流低密度基因芯片杂交技术是将其基因扩增(PCR)技术、导流杂交技术与基因芯片技术集合在一起,结合了 PCR 技术的高灵敏、导流杂交技术的高特异性以及基因芯片的高通量性;该技术可将未标记的特异性核苷酸探针分别固定在尼龙膜上形成斑点,再与经 PCR 扩增的标记样品 DNA 序列杂交,可一次性检测 21 种 HPV 病毒感染并精确分型^[3],这些型别包含 15 种高危型(16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66 和 68)及 6 种低危型(6、11、42、43、44 和 81)。

1.4.2 DNA 的提取 取 500 μL 临床样本,14 000 r/min 离心 1 min,去上清液。加入 400 μL 溶液 I,混匀后沸水中煮 15