

• 论 著 •

东莞地区泌尿生殖道支原体联合培养及药物敏感性的探讨

潘俊均, 雷亚利, 徐名烤, 刘引霞
(东莞市康华医院检验科, 广东东莞 523000)

摘要:目的 通过固体和液体联合培养的方法, 提高试验准确性, 更好地反映药物敏感性。方法 把待检标本同时在固体培养基上和液体药敏检测培养基上接种后, 统计支原体的检出率并对药敏结果进行分析。结果 1 570 例支原体培养中阳性 590 例, 占 37.6%; 其中, 解脲支原体(Uu)482 例, 人型支原体(Mh)25 例, Uu 与 Mh 混合感染 83 例, 药敏方面 3 种类型的支原体感染均对交沙霉素、米诺环素、强力霉素敏感性较高, 而对大环内酯类和喹诺酮类抗菌药物出现比较明显的耐药。结论 东莞地区泌尿生殖系感染主要以 Uu 为主, 其次是 Uu 和 Mh 引起的混合感染, 单独 Mh 感染较少, 而且三者对抗菌药物的敏感性存在一定的差异。

关键词: 解脲支原体; 人型支原体; 泌尿生殖道; 耐药性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.11.033

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)11-1557-03

Analysis of joint culture and drug sensitivity of genitourinary tract mycoplasma in Dongguan

Pan Junjun, Lei Yali, Xu Mingkai, Liu Yinxia

(Department of Clinical Laboratory, Kanghua Hospital of Dongguan, Guangdong 523000, China)

Abstract: **Objective** To improve the experimental accuracy and present the sensitivity to drugs through the solid culture method combined the liquid susceptibility test. **Methods** The inspected samples were did mycoplasma solid and liquid culture test at the same time. Mycoplasma detection rate and drug susceptibility results were analyzed. **Results** There were 590 samples with positive results in 1 570 cases for mycoplasma cultures, accounting for 37.6%, 482 samples with Ureaplasma urealyticum (Uu) positive, 25 samples with Mycoplasma hominis (Mh) positive, 83 samples with both Uu and Mh positive. The antimicrobial susceptibility test (AST) results showed the three groups were all highly sensitive to josamycin, minocycline and doxycycline, and had obvious drug-resistance to macrolides antibiotics and 4-quinolones. **Conclusion** The genitourinary infections in Dongguan were mainly caused by Uu, followed by mixed infection with UU and Mh, and few caused by Mh. The sensitivities to antibiotics were different for the three types of mycoplasma infection.

Key words: ureaplasma urealyticum; mycoplasma hominis; genitourinary tract; drug resistance

解脲支原体(Uu)和人型支原体(Mh)是人类泌尿生殖道感染中常见的两种病原体, 是引起人类非淋菌性尿道炎或宫颈炎最为常见的病原体, 导致各类炎症和不孕不育等人类泌尿系感染。目前, 国内医院实验室对这两种支原体的培养常采用两种方法。液体培养法, 通过 Uu、Mh 分解不同底物改变液体培养基 pH, 使培养基颜色变化, 间接判断其生长并同时进行药敏试验。而固体培养法能在低倍镜下直接观察到支原体属特有的典型菌落, 是诊断支原体属感染的可靠依据。通过固体和液体联合培养的方法, 可以增加试验的特异度和灵敏度^[1], 更好地反映对药物的敏感性。由于目前抗菌药物的滥用和患者对泌尿系支原体感染的认识不足导致其发病率呈上升趋势, 支原体的耐药也成为困扰临床医生的重要问题。本研究对 2013 年 1~12 月来东莞康华医院就诊的 1 570 例泌尿系感染患者支原体培养及药敏试验结果进行了回顾性分析, 以了解东莞地区支原体感染发布状况和耐药情况, 现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2013 年度广东省东莞康华医院在皮肤性病科、妇产科和泌尿科门诊就诊的疑似泌尿生殖系统支原体感染患者 1 570 例, 且所有受试者取材前 1 周内均未使用任何抗菌药物。1 570 例患者中男 260 例, 年龄 20~66 岁, 平均(34.78±7.8)岁, 女 1 310 例, 年龄 17~65 岁, 平均(30.12±9.5)岁。

1.2 标本采集 支原体对细胞表面有很强的亲和力, 应尽可能收集到更多的细胞, 宫颈分泌物采集时, 先用无菌拭子拭去宫颈分泌物, 另采用无菌涤纶拭子插入宫颈口内 2~4 cm 处, 旋转 5~10 s, 尽量采集柱状上皮细胞标本置于无菌管内立即送检。男性采集精液, 置于无菌瓶内, 取标本后立即送检, 室温保存不超过 2 h, 2~8 ℃ 保存不超过 5 h。

1.3 仪器与试剂 普通的光学显微镜购自日本 Olympus 公司, 隔水式恒温培养箱购自上海恒科公司。固体培养基及二氧化碳(CO₂)发生片购自河北微拉公司。液体培养与药敏检测试剂购自珠海迪尔公司, 其中含有环丙沙星、氧氟沙星、阿奇霉素、红霉素、交沙霉素、克拉霉素、左氧氟沙星、强力霉素、四环素、米诺环素、罗红霉素、司帕沙星共 12 种抗菌药物, 均在有效期内使用。

1.4 方法 标本接种严格按照标准操作规程进行^[2], 每例患者同时接种液体培养基和固体培养基。液体培养设空白和对照孔, 35~37 ℃、5%~10% CO₂ 的孵箱中进行培养, 固体培养 48 h 后观察结果; 液体培养分别于 24 h 观察 Uu, 4 h 观察 Mh 的培养及药敏结果。所有标本的采集、运送、分离培养、储存处理及鉴定与药敏试验使用的全部物品, 均严格按照国家卫生行业相关法律法规和标准操作规程进行生物安全操作。

1.5 结果判断 液体培养法: 培养基不变色为阴性; 培养基由橙黄色变红色且清亮为初步“阳性”, 用“+”表示, 提示可能有

支原体生长;Uu 计数结果在 24 h 判读,不超过 28 h;Mh 结果在 48 h 判读;培养基变红或呈现红色混浊,而相对应的固体培养尚未能观察到相应的菌落时,可以适当延长固体培养 12~24 h 后再观察结果,若仍然未能观察到相应的菌落则不能报阳性,提示支原体未生长或存在杂菌污染。固体培养法:接种后 48 h 在显微镜下观察出现的圆形棕色菌落,直径 15~40 μm ,判断为 Uu 生长;出现油煎蛋样菌落,直径 100~150 μm ,判断为 Mh 生长,并记录相应的药敏情况。在低浓度、高浓度中均阴性为敏感(S),在低浓度、高浓度中均阳性为耐药(R),在低浓度中阳性,高浓度中阴性为中介(I)。

1.6 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计学软件进行数据处理及统计学分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 培养结果 1 570 例支原体培养中阴性 980 例,占 62.4%,其中污染标本 84 例,占 5.35%;阳性 590 例,占 37.6%。在 590 例阳性标本中,男 50 例,女 540 例,男女比例为 1.0 : 10.8;其中女性感染率明显高于男性,单独 Uu 感染明显高于单独 Mh 感染率,比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

2.2 药敏结果 482 例 Uu 感染的药敏结果显示,Uu 对交沙

霉素、米诺环素、强力霉素最为敏感,敏感性分别是 99.2%、98.8%和 98.6%;其他依次是四环素、罗红霉素、克拉霉素、阿奇霉素;而对罗红霉素、氧氟沙星、左旋氧氟沙星、司帕沙星等均出现比较明显的耐药。25 例 Mh 感染的药敏结果显示 Mh 对强力霉素、交沙霉素、米若环素最为敏感,敏感性均为 96.0%;但是对四环素、阿奇霉素、罗红霉素、氧氟沙星、左旋氧氟沙星、司帕沙星等耐药,83 例 Uu 与 Mh 混合感染的药敏结果显示,Uu 与 Mh 混合感染患者对交沙霉素、强力霉素、米诺环素最为敏感,敏感性分别是 97.6%、96.4%和 92.8%;对克拉霉素、红霉素、阿奇霉素、罗红霉素、左旋氧氟沙星、氧氟沙星、司帕沙星等呈现明显的耐药。见表 2。

表 1 1 570 例患者支原体培养检查结果[n(%)]					
性别	<i>n</i>	Uu+	Uu+与 Mh+	Mh+	合计
男	260	39(15.0)	10(3.8)	1(0.4)	50(19.2)
女	1 310	443(33.8)	73(5.6)	24(1.8)	540(41.2)*
合计	1 570	482(30.7)	83(5.3)	25(1.6) Δ	590(37.6)

* : $P<0.05$,与男性感染率比较; Δ : $P<0.05$,与单独 Uu 感染率比较。

表 2 Uu 与 Mh 对 12 种抗菌药物的耐药率 (%)

抗菌药物	Uu(<i>n</i> =482)			Mh(<i>n</i> =25)			Uu 与 Mh(<i>n</i> =83)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
四环素	95.4	3.1	1.5	88.0	4.0	8.0	88.0	9.6	2.4
左氧氟沙星	20.7	12.2	67.1	0.0	48.0	52.0	9.6	50.6	39.8
红霉素	72.2	11.8	16.0	8.0	4.0	88.0	3.6	92.8	3.6
交沙霉素	99.2	0.6	0.2	96.0	4.0	0.0	97.6	2.4	0.0
强力霉素	98.6	0.8	0.6	96.0	4.0	0.0	96.4	3.6	0.0
环丙沙星	1.9	81.1	17.0	0.0	0.0	100.0	1.2	89.2	9.6
氧氟沙星	21.4	8.9	69.7	0.0	52.0	48.0	13.3	86.7	0.0
米诺环素	98.8	0.6	0.6	96.0	4.0	0.0	92.8	6.0	1.2
罗红霉素	94.2	4.6	1.2	12.0	88.0	0.0	6.0	94.0	0.0
阿奇霉素	94.9	4.9	0.2	16.0	84.0	0.0	6.0	94.0	0.0
克拉霉素	94.7	4.9	0.4	8.0	92.0	0.0	6.0	94.0	0.0
司帕沙星	23.2	18.3	58.5	0.0	68.0	32.0	13.3	30.1	56.6

3 讨 论

固体培养法与液体培养法特异度和灵敏度存在着差异。液体培养法是生化反应,特异度较低,不是支原体所特有,部分细菌和真菌分解精氨酸或尿素都会导致液体培养发生颜色改变,容易导致本身细菌污染误诊成支原体感染。而固体培养法通过支原体的形态观察,具有很高的特异度。因此支原体固体和液体的联合培养可以提高支原体的特异度和灵敏度,可以更好地保证结果的可靠性。

本研究结果显示泌尿生殖道支原体感染有性别与种类差异,与相关报道一致^[3]。其中泌尿生殖道支原体感染率为 37.6%,其中女 41.2%,男 19.2%,男女总感染率相比,男女比例为 1.0 : 10.8,女性感染率比吴清坛等^[4]的报道略高,这或许跟女性生殖道结构有关,容易感染支原体,还可能和东莞地区广泛存在的女性工作者群有关,该人群属于易感人群或传播人群。提示应该关注该类人群的宣教和防护工作。同时本研究结果显示感染种类也有一定的差别,Uu 感染明显高于 Mh

感染,差异有统计学意义($P<0.05$)。

药敏方面,本研究表明单独 Uu 感染对交沙霉素、米诺环素、强力霉素敏感性高,均大于 98.6%,另外对四环素、阿齐霉素等敏感性也比较好,而对喹诺酮类药物,如左氧氟沙星、氧氟沙星、司巴沙星等敏感性低均小于 23.2%,出现比较明显的耐药情况;而单纯 Mh 感染和 Uu 与 Mh 混合感染均对交沙霉素、米诺环素、强力霉素敏感性高,而对大环内酯类和喹诺酮类抗菌药物有明显耐药,应引起高度的关注。支原体对大环内酯类药物,如红霉素、阿齐霉素、克拉霉素和罗红霉素等高敏感度较低,除了支原体对阻碍其蛋白质合成的抗菌药物敏感外,最主要的原因可能是与 Uu23 SrRNA 位点突变有关^[5]。3 组支原体对喹诺酮类药物,如左氧氟沙星、氧氟沙星、司巴沙星等敏感性低,主要考虑与喹诺酮类药物的滥用及支原体喹诺酮类药物耐药决定区 QRDR 基因突变有关^[6]。同时本研究中药敏试验表明随着抗菌药物的广泛应用,Uu 和 Mh 的耐药菌株也日渐增多,并出现了支原体属多药耐药现象,支(下转第 1560 页)

和 96.55%(56 例),LHBs 与 HBV-DNA 阳性率差异无统计意义($\chi^2=0.342,P>0.05$)。在 HBeAg 阴性组中,LHBs 与 HBV-DNA 阳性率分别为 66.96%(75 例)和 51.79%(58 例),LHBs 与 HBV-DNA 阳性率差异有统计学意义($\chi^2=5.349,P<0.05$)。

2.2 LHBs 水平与 HBV-DNA 水平、HBsAg 浓度相关性
170 例乙型肝炎患者血清标本中,114 例为 HBV-DNA 阳性。按照 HBV-DNA 拷贝数 10 倍的差异对该 114 例标本进行等级分组,并统计分析。LHBs 水平[用吸光度(OD)值表示]与 HBV-DNA 拷贝数($r=0.979,P<0.05$)及 HBsAg 浓度($r=0.923,P<0.05$)呈正相关,见表 1。

表 1 LHBs 水平与 HBV-DNA 水平、HBsAg 浓度相关性($n=114$)

HBV-DNA 拷贝数(对数值)	<i>n</i>	LHBs OD 值	HBsAg(IU/mL)
2	14	0.267	548.22
3	16	0.481	895.43
4	29	0.584	1 045.41
5	35	0.856	2 682.73
6	11	0.903	5 167.32
7	9	1.301	11 663.68

3 讨 论

HBsAg 由一个单独的开放读码框(ORF)组成,依靠 3 个不同的启动位点和同一终止位点,表达 3 种不同的外膜蛋白。其中 LHBs 具有双重跨膜拓扑结构,N 端胞质 pre-s 结构域可以在翻译后留在病毒颗粒内,或者跨过细胞膜或病毒包膜。LHBs 在病毒包膜内可以和病毒核衣壳结合,还可以激活多个启动子元件,同时介导 HBsAg 亚病毒颗粒的细胞质滞留^[3];在病毒包膜表面则参于病毒受体的结合。本研究采用针对 Pre-s 结构域立体构象表位的特异性抗体来检测 LHBs,结果显示 LHBs 阳性率与 HBV-DNA 有一定的平行关系,114 例 HBV-DNA 阳性的血清中,LHBs 水平与 HBV-DNA 拷贝数及 HBsAg 浓度存在良好的正相关,表明 LHBs 是反映 HBV 感染者体骨病毒复制情况的可靠指标。但 HBeAg 阴性模式乙型肝炎患者血清中,LHBs 阳性率高于 HBV-DNA,分析原因可能与 HBV 基因前 C 区或 CP 区发生变异有关,HBV-DNA 检测方法学与灵敏度缺陷等使 HBV-DNA 阴性结果不能真实反映肝组织内 HBV 复制情况,尤其是血清中 HBV-DNA 低水平

时,肝内仍可维持一定水平。再者,目前抗病毒药物只能抑制 cccDNA 再复制,不能抑制已经形成的病毒表达蛋白,有研究表明 LHBs 转阴较 HBV-DNA 晚大约 5 个月^[4],LHBs 对 HBV 有反式激活作用,可以导致患者病情反复^[5]。HBV 感染肝细胞后合成的大蛋白数远超病毒合成所需的量,在缺少病毒核衣壳的条件下,生成空的亚病毒颗粒,亚病毒颗粒在肝细胞内积累使肝细胞毛玻璃化,或因直接毒性作用而导致细胞凋亡,说明 LHBs 检测可弥补 HBV-DNA 在评估抗病毒疗效及判定治疗终点的不足^[6]。由于干扰素、抗核苷类药物作用、长期治疗、前 C 和 CP 区启动子变异等原因,HBeAg 阴性的慢性乙型肝炎流行率不断升高^[7]。临床已经不能仅以 HBeAg 或 HBV-DNA 转阴作为终止抗病毒治疗的观察指标,结合 LH-Bs、HBV-DNA、HBsAg 定量,可以给临床对乙型肝炎患者尤其是血清低水平 HBV-DNA 患者监测体内病毒复制、疾病进程、抗病毒疗效及预后判断提供指导。但 HBV-DNA、HBsAg 定量要求严格的实验室条件,特殊的设备,成本居高不下,难以在基层单位大面积推广,而 LHBs 的检测设备要求低,操作简单,易于推广。

参考文献

[1] Liang TJ. Hepatitis B; the virus and disease[J]. Hepatology, 2009,49(5):13-21.

[2] 黄前川,曹军皓,闫有功,等. 前 S1 蛋白在 HBeAg 阴性乙型肝炎患者中的临床价值[J]. 中国实验诊断学,2009,13(5):670-671.

[3] Bruss V, Vieluf K. Functions of the internal pre-S domain of the large surface protein in hepatitis B virus particle morphogenesis[J]. J Virol,1995,69(11):6652-6657.

[4] 陈晓明,杨美芳,薛寒,等. HBV 大蛋白和 DNA 在抗病毒治疗中的变化[J]. 中华传染病杂志,2007,25(7):405-407.

[5] 张欣欣,Locarnini SA. HBsAg 定量检测在慢性乙型肝炎抗病毒治疗监测中的意义[J]. 中华检验医学杂志,2010,33(1):82-83.

[6] Gervain J. Significance of the changes in HBV DNA and HBsAg levels during the treatment of chronic hepatitis B[J]. Orv Hetil, 2011,152(22):866-868.

[7] 金霆. 乙型肝炎患者 HBV 表面大蛋白水平的检测及临床意义[J]. 检验医学与临床,2008,5(24):1479-1480.

(收稿日期:2015-02-25)

(上接第 1558 页)

原体属一旦出现耐药就有可能多药耐药菌株,应引起重视,临床需要更合理有效地选择、使用抗菌药物;交沙霉素,多西环素和米诺环素可作为临床治疗支原体属感染的首选药物。

因此在临床工作中,应提高支原体正确检出率和药敏结果的可靠性,指导临床方面更合理、有效使用抗菌药物,以减少耐药菌株的产生,确保医疗安全。

参考文献

[1] 伍启康,黄淑萱,雷兰芳,等. A7 固体和液体培养检测泌尿生殖道支原体的效果评价[J]. 中国皮肤性病学杂志,2008,22(11):694-695.

[2] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006:886.

[3] 张久富. 泌尿生殖道支原体、衣原体感染状况及药敏分析[J]. 当

代医学,2010,16(7):140-141.

[4] 吴清坛,蒲荣. 固体与液体培养法在鉴别支原体感染的差异性研究[J]. 中国医药导报,2011,8(6):69-71.

[5] 孟冬娅,马晓博,何莉,等. 解脲脲原体 23 SrRNA 位点突变与大环内酯类药物耐药的关系[J]. 中华检验医学杂志,2008,31(6):653-654.

[6] Bebear CM,Renaudin H,Charron A,et al. In vitro activity of trovafloxacin compared to those of five antimicrobials against mycoplasmas including Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum fluoroquinolone-resistant isolates that have been genetically characterized[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000,44(9):2557-2560.

(收稿日期:2015-01-18)