

病菌的基本流行病学及其对各种常规抗菌药物的敏感性,科学合理地指导临床用药。常规医疗活动中严格执行多重耐药防控规范,对关键感染科室做到重点管理,严格实施病房消毒隔离措施,最终做到有效控制多重耐药菌的传播。

参考文献

- [1] 陈雪华. 控制多耐药细菌医院内感染任重道远[J]. 中国实用内科杂志, 2012, 25(4): 318-320.
- [2] Hwang S, Moon M, Kim S, et al. Neuroprotective effect of ghrelin is associated with decreased expression of prostate apoptosis response-4[J]. *Endocr J*, 2009, 56(4): 609-617.
- [3] 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.
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second informational supplement. CLSI document M100-S22[S]. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
- [5] 汪复, 朱德妹, 胡付品, 等. 2008 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2009, 9(5): 321-329.
- [6] 林宇岚, 杨滨, 陈守涛, 等. 2008~2012 年福建省 5 907 株
• 临床研究 •

鲍曼不动杆菌临床分布及耐药性分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2014, 30(4): 383-386.

- [7] 肖永红, 沈萍, 魏泽庆, 等. Mohnarin 2011 年度全国细菌耐药监测[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(22): 4946-4952.
- [8] 杨自副, 陆琼慧, 朱晓燕. 某院 2010 年细菌耐药性监测结果[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(22): 2824-2826.
- [9] 虞洪斌. 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌感染分布监测与对策[J]. 浙江医学, 2013, 22(9): 801-802.
- [10] 徐一鸣, 王蓓, 蒋晓飞. 2008~2012 年鲍曼不动杆菌临床感染分布及耐药特征分析[J]. 检验医学, 2014, 29(3): 245-248.
- [11] 李国钦. 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌研究进展[J]. 中国感染控制杂志, 2008, 7(2): 140-143.
- [12] Montero A, Ariza J, Corbella X, et al. Efficacy of colistin versus beta-lactams, aminoglycosides, and rifampin as monotherapy in a mouse model of pneumonia caused by multiresistant *Acinetobacter baumannii* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(6): 1946-1952.

(收稿日期: 2016-02-20 修回日期: 2016-05-12)

实时荧光定量聚合酶链反应联合检测 6 种性病病原微生物的研究

王晓东, 王 然, 李凤焱, 向 鑫

(中国人民解放军第二五四医院检验科, 天津 300142)

摘要:目的 探讨实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)同时检测多种性病病原体的可行性和临床意义。方法 采用 FQ-PCR 方法对 716 例患者生殖道标本的淋球菌(NGH)、沙眼衣原体(CT)、解脲支原体(UU)、梅毒螺旋体(TP)、人乳头瘤病毒(HPV)6/11 型及 16/18 型等 6 种微生物或亚型进行定量检测,并与定性聚合酶链反应(PCR)进行比较。结果 2 种 PCR 方法对 6 种病原体检测的总符合率分别为 94.83%、96.16%、95.29%、100%、94.37%、94.12%。阳性率差异分别为 1.29%、1.45%、2.18%、0.7.04%、0.98%, HPV6/11-DNA FQ-PCR 法阳性率高于 PCR($P < 0.01$),其他 5 项指标检测结果比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。阳性标本定量平均拷贝数对数分别为(6.71±3.36)、(5.56±2.48)、(6.83±3.17)、(4.89±3.52)、(5.75±3.13)、(4.95±2.68)。结论 FQ-PCR 操作简便、快速、高效,并能准确定量,对性病的诊断、发展和预后监测、疗效评价、指导用药具有重要的临床意义。

关键词:聚合酶链式反应, 荧光定量; 奈瑟氏球菌, 淋病; 衣原体, 沙眼; 支原体, 解脲; 梅毒螺旋体; 乳头瘤病毒

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.20.051

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)20-2919-03

实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)检测通常扩增不同目的 DNA 片段,设计不同的特异引物及温度参数,在同一扩增参数条件下,同时检测多种病原微生物^[1]。有关调查显示,性传播疾病发病率在我国正逐年上升^[2],人群结构以中青年为主,与受教育的文化程度呈负相关,为性传播疾病得到及时、有效的治疗,以及加强流行病防控,因此选择快速、敏感、特异、高效的检测手段非常重要。

1 资料与方法

1.1 一般资料 716 例标本来自 2010 年 5 月至 2015 年 5 月该院泌尿外科、妇科、皮肤性病门诊的泌尿生殖系统感染及有高危性接触史患者,男 332 例,年龄 16~59 岁,平均 32 岁;女 353 例,年龄 15~51 岁,平均 27 岁。

1.2 仪器与试剂 DA-7600 基因扩增仪及荧光定量 PCR 试剂,分别购自达安基因和华美生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 模板制备 女性宫颈及阴道分泌物拭子或男性尿道拭子的无菌试管中,加入 1.5 mL 生理盐水并旋涡混匀器,充分震荡,将混悬液倒入无菌 EP 管,10 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,沉淀加 50 μ L DNA 提取液,混匀后置金属热浴,100 $^{\circ}$ C 10 min,10 000 r/min 离心 5 min,分别取 5 μ L 模板 DNA 置入相对应的 6 种目的 DNA 荧光定量扩增管。

1.3.2 FQ-PCR 扩增参数 包含引物、荧光探针、底物 dNTP、Taq 聚合酶、离子 buffer 和模板的反应体系 50 μ L, 94 $^{\circ}$ C 预变性 120 s,然后 94 $^{\circ}$ C 20 s,55 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,35

个循环,72 ℃ 延伸过程读取荧光,扩增结束导入标准曲线,定量超过 100 copy/mL 为阳性。

1.3.3 PCR 扩增参数 包含引物、底物 dNTP、Taq 聚合酶、离子 buffer 的 40 μL PCR 扩增体系内加入 5 μL 模板 DNA,预变性 98 ℃ 180 s,加入 2 U Taq 酶,94 ℃ 30 s,54 ℃ 45 s,72 ℃ 60 s,35 个循环,72 ℃ 5 min。取扩增产物 10 μL 进行 1.5% 琼脂糖电泳,溴化乙锭做指示剂,5~6 V/cm 电泳 2 h,凝胶置 254 nm 波长紫外透照仪下参照,Marker 比对荧光条带位置。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析,计量资料应用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料以例数和百分率表示,组间比较使用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 FQ-PCR 检测结果 716 例标本申请 6、5、4、3、2、1 项性病病原体 DNA 检测,分别为 43、62、207、365、369、286 例。见表 1。

表 1 FQ-PCR 检测 6 种性病病原体 DNA 结果

检测项目	n	FQ-PCR 阳性率 [n/n(%)]	lg $\bar{x} \pm s$ (copy/μL)
NGH	415	68/415(16.39)	6.69 ± 3.36
CT	562	87/562(15.48)	3.86 ± 1.78
UU	837	302/837(36.08)	6.83 ± 3.17
TP	324	31/324(9.57)	4.89 ± 2.42
HPV6/11	721	163/721(22.61)	5.29 ± 1.88
HPV16/18	656	83/656(12.65)	4.63 ± 2.57

表 2 FQ-PCR 与 PCR 检测结果的比较[n/n(%)]

检测项目	FQ-PCR 阳性率	定性 PCR 阳性率	P
NGH	18/78(23.08)	17/78(21.79)	>0.05
CT	13/69(18.84)	12/69(17.39)	>0.05
UU	40/92(43.48)	38/92(41.30)	>0.05
TP	6/56(10.71)	6/56(10.71)	>0.05
HPV6/11	24/71((33.80)	21/71(29.58)	<0.05
HPV16/18	14/51(27.45)	13/51(25.49)	>0.05

2.2 2 种检测方法的结果比较 性病病原体 DNA 检出率依次为解脲支原体(UU)、6/11 型人乳头瘤病毒(HPV)、淋球菌(NGH)、沙眼衣原体(CT)、HPV16/18 型、梅毒螺旋体(TP),与有关报道接近^[3-6]。阳性率和定量拷贝值最高为 UU,54 例标本定量超过 10⁸ copy/μL,阳性定量水平最低为 CT,平均低于 10⁴ copy/μL,最高上限未超过 10⁶ copy/μL。在进行荧光定量检测的同时,从 DNA 模板分别随机抽取对应 78、69、92、56、71、51 份 DNA 模板,分别进行 NGH、CT、UU、TP、HPV6/11、HPV16/18 PCR 扩增,总符合率 94.83%,阳性率差异 1.29%;CT-DNA 总符合率 96.16%,阳性率差异 1.45%;UU-DNA 总符合率 95.29%,阳性率差异 2.18%;TP-DNA 总符合率 100%;HPV6/11-DNA 总符合率 95.77%,阳性率差异 4.22%;HPV16/18-DNA 总符合率 94.12%,阳性率差异

0.98%。2 种方法检测 HPV6/11-DNA 阳性率比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),其他比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

3 讨 论

性传播疾病的病原微生物种类较多,常见的细菌感染主要是 NGH,可引起泌尿生殖系统的急性炎性或化脓性感染^[7]。本研究结果表明,感染率最高的病原微生物是 UU,支原体无细胞壁,不能维持固定的形态而呈现多形性,不易细胞培养。感染泌尿生殖道的衣原体主要种类是 CT,它是严格的活细胞内寄生的微生物,具有独特的发育周期。UU 和 CT 引起的泌尿生殖道感染症状类似,是主要的非淋菌性尿道炎,依靠 FQ-PCR 准确诊断病原微生物,选择敏感药物有针对性地进行有效治疗。TP 近年来在我国增长迅速,显性和隐性梅毒患者均可可是传染源,且潜伏 TP 居多,已成为报告病例数较多的性病之一。HPV 是一种属于乳多空病毒科的乳头瘤空泡病毒 A 属,能引起人体皮肤、黏膜的鳞状上皮增殖。最多见的是低危 6/11 型及高危 16/18 型,高危型 HPV 持续感染也已被证明是导致宫颈癌的主要危险因素^[8-10]。近年来性传播疾病发病率越来越高,发病年龄却逐年降低。防治性病更应教导青少年尊崇传统的道德伦理观念,加强青春期正确性教育和性病预防知识,培养良好的卫生习惯,从根本上减少性传播疾病的发生。

FQ-PCR 反应体系中有 2 条普通的特异性引物,1 条荧光标记探针,这条探针的 5' 端和 3' 端分别标记供体荧光报告基团和受体荧光淬灭基团,探针完整时,供体报告基团发射的荧光能量传递给相近的受体荧光染料并被吸收,进而激发出另一波长并能同时淬灭供体基团发射的荧光;TaqDNA 聚合酶不仅有延伸 DNA 的引物活性,还有 5'~3' 外切核酸酶活性,扩增循环过程中,Taq 酶的外切酶活性将探针酶切降解,使报告和淬灭 2 个荧光基团分离,荧光信号得到释放,自动监测系统可接收到发射荧光,扩增目的 DNA 链越多,荧光分子释放越多,实现荧光信号的累积与 PCR 产物的形成完全同步。由于 PCR 扩增指数时期,模板 CT 值和该模板的起始拷贝数存在线性关系,所以成为定量依据。多种病原微生物在同一反应条件下同时进行扩增检测,显著提高效率,在保障敏感性和特异性的前提下,不仅检测出感染病原微生物的种类,而且提示局部病原微生物的感染量级水平,对病情发展和预后能够进行有针对性的治疗及监测。

参考文献

[1] 苏学飞,左中越,程钢,等. 荧光定量 PCR 检测性病病原体的临床价值[J]. 实用医学杂志,2001,17(6):561-562.
 [2] 龚向东,叶顺章,张君炎,等. 1991~2001 年我国性病流行病学分析[J]. 中华皮肤科杂志,2002,35(3):178-182.
 [3] Gupta V, Dhawan B, Khanna N, et al. Detection and bio-var discrimination of Ureaplasma urealyticum in Indian patients with genital tract infections[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2008, 60(1):95-97.
 [4] 周文明,赵建龙,杨森,等. DNA 芯片检测泌尿生殖道病原体及耐药的研究[J]. 中华皮肤科杂志,2005,38(2):108-111.

