

相关。

参考文献

[1] TOUSOULIS D, PAPAGEORGIOU N, ANDROULAKIS E, et al. Diabetes mellitus-associated vascular impairment: novel circulating biomarkers and therapeutic approaches [J]. J Am Coll Cardiol, 2013, 62(8): 667-676.

[2] 吴景程, 李晓华, 彭永德. 2 型糖尿病患者血清胆红素水平与糖尿病肾病的关系 [J]. 上海交通大学学报(医学版), 2013, 33(6): 813-817.

[3] 张翠婕, 崔盛. 血清胆红素、同性半胱氨酸水平与老年冠心病患者颈动脉粥样硬化斑块的相关性分析 [J]. 临床荟萃, 2016, 31(11): 1202-1205.

[4] XU Y, WANG L, HE J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults [J]. JAMA, 2013, 310(9): 948-959.

[5] HU Z J, REN L P, WANG C, et al. Associations between apolipoprotein CIII concentrations and microalbuminuria in type 2 diabetes [J]. Exp Ther Med, 2014, 8(3): 951-956.

[6] HIRANO T. Abnormal lipoprotein metabolism in diabetic nephropathy [J]. Clin Exp Nephrol, 2014, 18(2): 206-209.

[7] 孙晓莉. 以大量蛋白尿为主要表现的 Ig A 肾病的临床与病理 [J]. 医学新知, 2017, 27(2): 173.

[8] 程一春, 葛树旺, 骆冉, 等. Ig A 肾病预后及危险因素分析 [J]. 内科急危重症杂志, 2017, 23(4): 272-274.

[9] 赵春梅, 袁宏伟. IgA 肾病组织病理学特点与临床预后关系研究 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2015, 29(6): 589-590.

[10] 柏琳, 于海涛, 国春玲, 等. 慢性肾病患者血清总胆红素水平临床变化意义及分析 [J]. 中国现代药物应用, 2017, 11(4): 68-69.

[11] 谢则金, 王厚照, 张福军. 血清胆红素、尿酸、低密度脂蛋白与冠心病的关系 [J]. 临床军医杂志, 2015, 43(2): 119-120.

[12] 李芬娥, 康熙雄. 糖尿病微血管病变患者血清 CysC、RBP 及尿 NAG 的变化与糖尿病肾病发展的关系 [J]. 标记免疫分析与临床, 2015, 22(6): 522-524.

[13] 章春艳. 肾病病患者血浆 D 二聚体及抗凝血酶检测的临床价值 [J]. 血栓与止血学, 2015, 21(5): 314-315.

[14] 李明浩, 崔时珍, 玄日, 等. 肾动态显像法与双血浆法在糖尿病肾病患者肾小球滤过率测定中的价值比较 [J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(7): 1774-1776.

[15] 文艳琼, 朱柏珍, 黄爱群, 等. 血管内皮生长因子联合内皮抑素在 2 型糖尿病肾病患者诊断中的价值分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(12): 1630-1632.

[16] 韦翔, 葛平, 陶慧, 等. 2 型糖尿病肾病患者血 D-二聚体及胆红素水平的变化及意义 [J]. 临床输血与检验, 2015, 17(6): 492-495.

(收稿日期: 2018-05-16 修回日期: 2018-07-28)

• 短篇论著 •

## 环介导等温扩增快速检测生殖支原体的应用研究

朱小平<sup>1</sup>, 陈霞<sup>1</sup>, 王芳<sup>1</sup>, 凌玲<sup>2</sup>, 董兰梅<sup>1△</sup>

(1. 江苏省苏北人民医院临床医学检测中心, 江苏扬州 225000; 2. 江苏省扬州市妇幼保健院检验科, 江苏扬州 225000)

**摘要:**目的 建立环介导等温扩增(LAMP)快速检测生殖支原体(Mg)的方法并探讨该方法在临床诊断中的应用价值。方法 培养生殖支原体, 提取病原体 DNA, 设计 Mg pdhD 基因 LAMP 引物, 优化并建立 LAMP 检测 Mg 的方法。分析 LAMP 法检测 Mg DNA 的灵敏度, 并与 PCR 法进行对比。分析 LAMP 法检测 Mg DNA 的特异性。结果 LAMP 法可在 1 h 内实现 Mg DNA 的可视化检测, 检测限为 10 fg, 灵敏度高于 PCR 法(0.1 pg)。LAMP 法检测 20 例经确诊的 Mg 感染临床样本, 结果均为阳性, 对淋病奈瑟菌、沙眼衣原体及大肠埃希菌的检测结果均为阴性。结论 LAMP 检测 Mg 快速、简便、灵敏度高且特异性强, 检测不需任何设备, 借助荧光笔肉眼直接判读, 有望成为社区及基层医院广泛开展的新方法。

**关键词:**支原体属; 泌尿生殖系统; DNA; 基因扩增; 环介导等温扩增

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.23.034

中图分类号: R446.5

文章编号: 1673-4130(2018)23-2977-04

文献标识码: B

生殖支原体(Mg)是寄居在人类泌尿生殖道的一种病原体, 可引起男、女性非淋菌性尿道炎<sup>[1]</sup>。研究显示, Mg 可引起 20%~35% 的男性非淋性尿道

炎<sup>[2]</sup>, 也可导致女性子宫颈炎<sup>[3]</sup>、盆腔炎<sup>[4]</sup>和子宫内膜异位症<sup>[5]</sup>等疾病。检测 Mg 有助于临床对上述疾病的诊断和治疗。目前, 培养法是诊断 Mg 感染的

△ 通信作者, E-mail: Yhan@yzu.edu.cn

本文引用格式: 朱小平, 陈霞, 王芳, 等. 环介导等温扩增快速检测生殖支原体的应用研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(23): 2977-2980.

“金标准”，然而此法耗时且 Mg 培养成功率极低。免疫学检测方法可用于检测临床样本中 Mg 抗原，由于支原体种属间易出现交叉反应以及对抗原、抗体纯度要求较高，因此，该方法在实际应用上受到一定限制。PCR 技术检测 Mg 具有灵敏度高，特异性好的特点，已成为临床快速诊断的重要手段。但 PCR 技术需依赖特定设备和仪器，需要专门的人员进行操作，无法在基层的实验室广泛开展。因此，目前急需建立操作简单、快速、灵敏度高、特异性强且适用于基层单位广泛开展的 Mg 检测方法。环介导等温扩增(LAMP)是一种不同于常规 PCR 的体外核酸基因扩增新技术。LAMP 主要利用两对或三对特异性引物和具有链置换活性的 Bst DNA 聚合酶，在恒温条件下连续快速扩增。此技术可以在 1 h 内扩增出  $10^9 \sim 10^{10}$  倍靶序列拷贝，具有更高的灵敏度、特异性和扩增效率<sup>[6]</sup>。目前，LAMP 已应用于肿瘤基因检测<sup>[7]</sup>、结核

分枝杆菌<sup>[8]</sup>及病毒<sup>[9]</sup>的快速检测。本研究拟建立 LAMP 快速检测 Mg 的方法并探讨此法在临床应用中的价值。

### 1 材料与方 法

**1.1 材料** Mg 标准 G37 菌株(NCTC 10195)由首都儿科研究所转赠，在支原体琼脂培养基(胰蛋白胨)上培养(青岛海博生物技术有限公司，HB7025-3)，2~3 周后显微镜检测。

**1.2 仪器与试剂** Loopamp DNA 扩增试剂盒和 LAMP 法荧光检测试剂盒购自北京蓝谱生物科技有限公司(SLP221)。LAMP 实时浊度基因检测仪 LA-500(日本荣研化学公司)。

### 1.3 方 法

**1.3.1 引物设计** 采用 Primer Explorer Version 5 软件，根据 Mg pdhD 基因设计 LAMP 引物，委托上海生工生物工程有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 Mg pdhD LAMP 引物 DNA 序列

引物名称	序列 (5'~3')
F3	ACA ACA CAA CTT ACA CCA CTA
B3	TGG TCA CTT CAC TCC CTA A
FIP	GTG CTT TTT CAA ACC CTG GTA AAG TAC AAC ATT ATT GTT GCA ACC G
BIP	CAT TGA CTC AAC CCA AGC TTT GGA CTC AAC CCC AAT CAC AC

**1.3.2 DNA 提取** 采用棉拭子将已培养的 Mg 转移到 1.5 mL 离心管(1 mL 去离子水)中，4 ℃，30 000×g 离心 15 min，弃上清液，根据 AllPrep<sup>®</sup> DNA Mini Kit 试剂盒(美国天根公司-Qiagen 51304)说明书进行 DNA 提取。

**1.3.3 LAMP 反应** 使用去离子双蒸水溶解引物至如下工作浓度：F3(5 μmol/L)，B3(5 μmol/L)，FIP(40 μmol/L)，BIP(40 μmol/L)。反应体系 25.0 μL：2×反应缓冲液(RM)，12.5 μL；F3、B3、FIP、BIP 各 1.0 μL；Bst DNA 聚合酶 1.0 μL；钙黄绿素 1.0 μL，去离子水 4.5 μL，DNA 2.0 μL。使用浊度基因检测仪 LA-500 进行实时检测(63 ℃，1 h)。在紫外荧光笔照射下，根据反应试管是否有可视化绿色荧光判断阳性结果。

**1.3.4 LAMP 产物琼脂糖凝胶电泳** 取 5.0 μL LAMP 产物与 2.0 μL Loading 缓冲液混合，加入电泳胶加样孔。依次加完所有 LAMP 产物后，接着在新的加样孔内加入标记物，盖上电泳槽上盖，电压调至恒压 110 V。30 min 后即可上凝胶电泳成像仪，观察电泳结果。

**1.3.5 PCR** Mg 16S RNA 检测的引物序列为<sup>[10]</sup>：前引物，F2：5'-TTT CTG AAC TAT TTA TGG ACA ACA G-3'；后引物，B2：5'-AGC CTG TAG TTT TAC TTA CTC TC-3'。使用 PRISM 9700 基因扩增仪，降落 PCR 进行条件优化：94 ℃预变性 2

min；10 次循环：94 ℃ 15 s，94 ℃~62 ℃ 30 s(每一次循环降低 1 ℃)。进一步 PCR 反应，30 循环：92 ℃ 15 s，62 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s。

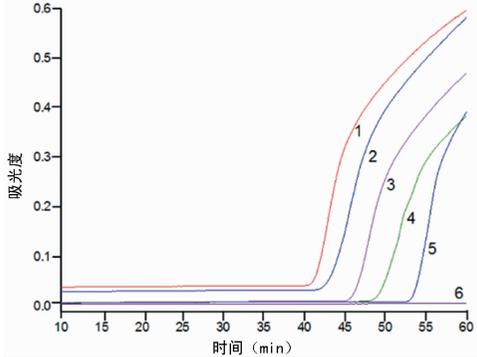
**1.3.6 LAMP 灵敏度分析** Mg 基因组 DNA 稀释到 20 ng/μL，NanoDrop 1000 微量紫外可见分光光度计(美国 Thermo Scientific)，配置 1.0 ng、0.1 ng、10.0 pg、0.1 pg、10.0 fg 和 1.0 fg 的 Mg DNA 为标准品(采用去离子水分别稀释 20 ng/μL Mg 基因组 DNA 后，制备成系列标准品)。分别采用 LAMP 和 PCR 法检测上述标准品，以评估 LAMP 法的灵敏度。

**1.3.7 特异性分析** 采用 AllPrep<sup>®</sup> DNA Mini Kit 试剂盒提取淋病奈瑟菌(NG)、沙眼衣原体(CT)及大肠埃希菌(E. coli)、肺炎支原体、解脲支原体的 DNA。20 例经临床确诊为 Mg(PCR 法检测)的男性尿道分泌物拭子 DNA。每份 DNA 样本稀释到 20 ng/μL，取 2.0 μL 进行 LAMP 反应。

## 2 结 果

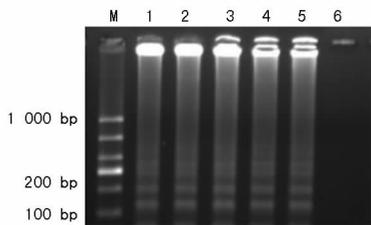
**2.1 LAMP 检测 Mg 的灵敏度分析** 以系列稀释的 Mg DNA 标准品为检测模板进行 LAMP 反应，实时浊度仪检测结果见图 1，1~6 分别为 1.0 ng、0.1 ng、10.0 pg、0.1 pg、10.0 fg 和 1.0 fg Mg DNA LAMP 反应结果。图中 LAMP 反应产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 2。结果显示，LAMP 法检测 Mg DNA 的检出限为 10.0 fg。采用 PCR 法检测 Mg DNA 标准品，检出限为 0.1 pg，见图 3。

**2.2 LAMP 检测 Mg 的特异性分析** LAMP 法检测肺炎支原体、解脲支原体结果为阴性。20 例 Mg 感染的男性尿道分泌物拭子样本结果均为阳性,感染部位相同的 NG、CT 及 E. coli DNA 的 LAMP 反应均为阴性。图 4A 为 Mg、NG、CT 及 E. coli DNA 的 LAMP 反应结果,图 4B 分别为上述病原体 DNA LAMP 产物的琼脂糖凝胶电泳结果。



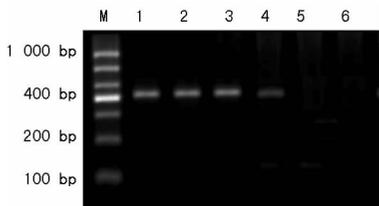
注:1 代表 1.0 ng;2 代表 0.1 ng;3 代表 10.0 pg;4 代表 0.1 pg;5 代表 10.0 fg;6 代表 1.0 fg

图 1 LAMP 检测 Mg 的灵敏度分析(实时浊度仪法)



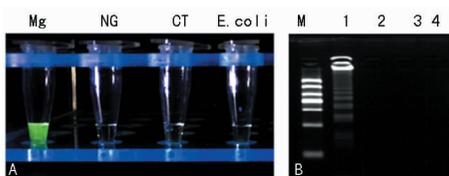
注:1 代表 1.0 ng;2 代表 0.1 ng;3 代表 10.0 pg;4 代表 0.1 pg;5 代表 10.0 fg;6 代表 1.0 fg;M 代表 1 000 bp 标记物

图 2 琼脂糖凝胶电泳分析 Mg DNA LAMP 产物



注:1 代表 1.0 ng;2 代表 0.1 ng;3 代表 10.0 pg;4 代表 0.1 pg;5 代表 10.0 fg;6 代表 1.0 fg;M 代表 1 000 bp 标记物

图 3 琼脂糖凝胶电泳分析 Mg DNA PCR 产物



注:A 代表 Mg、NG、CT 及 E. coli DNA 的 LAMP 检测结果;B 代表琼脂糖凝胶电泳检测 Mg(1)、NG(2)、CT(3)及 E. coli(4)DNA-LAMP 产物

图 4 LAMP 可视化检测

### 3 讨论

LAMP 是一种新型的体外核酸扩增技术,其反应全过程是等温扩增,对反应仪器的要求较低,该技术

依赖于一种具有链置换特性的 DNA 聚合酶<sup>[11]</sup>,在恒温条件下快速实现基因扩增。此技术与传统的 PCR 相比较具有更高的灵敏度和扩增效率,相关研究表明,LAMP 比 PCR 更能耐受体系中大多数抑制物的干扰<sup>[12-13]</sup>。本研究建立 LAMP 检测 Mg 的方法快速、方便,且不需要特殊检测设备,可检测到 10.0 fg 的 Mg DNA,检测灵敏度高于传统的 PCR 技术(0.1 pg)。本研究采用所建立的方法检测了 20 例经确诊的 Mg 感染的临床样本,结果均为 Mg DNA LAMP 反应阳性,对 NG、CT 及 E. coli 的检测结果均为阴性,提示此方法具有高特异性。本实验中检测标本仅为 20 例,在后续实验中,会增加标本量,进一步探讨其灵敏度和特异性。

LAMP 产物检测方法包括琼脂糖电泳检测、焦磷酸镁浊度检测、荧光定量检测和荧光目测等。LAMP 产物琼脂糖电泳检测结果为连续梯状电泳条带,但由于需要开盖检测,容易造成污染。荧光定量检测存在较为繁琐且仪器设备要求高、成本高的特点。焦磷酸镁浊度检测虽相对简便,但仍需实时浊度仪检测,限制了此方法的广泛使用<sup>[15]</sup>。荧光目测法是目前最简便、快速的方法,特别适用于现场检测。本研究选择钙黄绿素作为荧光指示剂,反应前加入 LAMP 反应体系,一步反应后无需开盖,可直接肉眼准确判断反应结果。目前,LAMP 技术的研究重点是如何筛选特异性高的扩增引物,以及扩增产物检测的简便性、实时监控、准确性和反应速度<sup>[14]</sup>。

### 4 结论

LAMP 法快速、直观、便捷,敏感度和特异性均较高,与传统方法相比,具有明显优势,经济适用、高效快速,无需特殊仪器,有望成为社区及基层医院广泛开展 Mg 检测的新方法。

### 参考文献

- [1] ANAGRIUS C, LORÉ B, JENSEN J S. Mycoplasma genitalium: prevalence, clinical significance, and transmission [J]. Sex Transm Infect, 2005, 81(6): 458-462.
- [2] BISTA B R, ISHWAD C, WADOWSKY R M, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of BK virus [J]. J Clin Microbiol 2007, 45(5): 1581-1587.
- [3] CAZANAVE C, MANHART LE, BEBEAR C. Mycoplasma genitalium, an emerging sexually transmitted pathogen [J]. Med Mal Infect, 2012, 42(9): 381-92.
- [4] CHENNA R, SUGAWARA H, KOIKE T, et al. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs [J]. Nucleic Acids Res 2003, 31(13): 3497-3500.
- [5] COHEN C R, MANHART L E, BUKUSI E A, et al. Association between Mycoplasma genitalium and acute endometritis [J]. Lancet, 2002, 359(9308): 765-766.
- [6] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al.

- Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): E63.
- [7] IKEDA S, TAKABE K, INAGAKI M, et al. Detection of gene point mutation in paraffin sections using in situ loop-mediated isothermal amplification [J]. *Pathol Int*, 2007, 57(9): 594-599.
- [8] SEYRIG G, STEDTFELD R D, TOURLOUSSE D M, et al. Selection of fluorescent DNA dyes for real-time LAMP with portable and simple optics [J]. *J Microbiol Methods*, 2015, 119: 223-227.
- [9] VENKATESAN G, BHANUPRAKASH V, BALAMURUGAN V. Development and comparative evaluation of loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for simple visual detection of or virus in sheep and goats [J]. *Mol Cell Probes*, 2015, 29(3): 193-195.
- [10] JENSEN J S, BORRE M B, DOHN B. Detection of *Mycoplasma genitalium* by PCR amplification of the 16S rRNA gene [J]. *J Clin Microbiol* 2003, 41(1): 261-266.
- [11] 胡宗悦, 须周恒, 卢亦愚. 环介导等温扩增技术的常见问题分析与研究进展 [J]. *病毒学报*, 2016, 32(5): 659-664.
- [12] KANEKO H, KAWANA T, FUKUSHIMA E, et al. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances [J]. *J Biochem Biophys Methods*, 2007, 70(3): 499-501.
- [13] FRANCOIS P, TANGOMO M, HIBBS J, et al. Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2011, 62(1): 41-48.
- [14] 林茂锐, 杨华文, 曹东林. 环介导等温扩增技术在病原微生物检测中的应用进展 [J]. *中华灾害救援医学*, 2016, 4(10): 587-590.
- [15] 黄国珍, 陈伟布, 邱桂清. 环介导等温扩增法在常见性病病原体检测中的应用效果分析 [J]. *中国性科学*, 2016, 25(11): 65-68.

(收稿日期: 2018-05-03 修回日期: 2018-08-18)

• 短篇论著 •

## Th22 细胞免疫与慢性荨麻疹病情程度的关系研究

牛青青<sup>1</sup>, 季拓<sup>2</sup>, 季广厚<sup>1</sup>, 董海新<sup>3</sup>, 金呈强<sup>3</sup>, 李桂寅<sup>2</sup>

(1. 山东省泗水县人民医院, 山东济宁 273200; 2. 山东省泗水县中医院, 山东济宁 273200;

3. 济宁医学院附属医院检验科, 山东济宁 272029)

**摘要:**目的 分析慢性荨麻疹与辅助性 T 细胞 22(Th22)细胞免疫之间的相关性。方法 选取山东省泗水县人民医院检验科 2014 年 8 月至 2017 年 4 月收治的 82 例慢性荨麻疹患者作为观察组, 82 例体检健康者作为对照组。参照荨麻疹活动度评分(UAS)将慢性荨麻疹患者进一步分为轻度患者(总评分 $\leq 4$ 分)与重度患者(总评分 $> 4$ 分)。检测两组研究对象血清  $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )、白细胞介素(IL)-6、IL-22 水平并进行比较, 同时比较轻度患者与重度患者血清 IFN- $\gamma$ 、IL-6、IL-22 水平。分析血清 IFN- $\gamma$ 、IL-6、IL-22 水平与慢性荨麻疹的相关性。结果 观察组患者血清 IFN- $\gamma$ 、IL-6、IL-22 水平[(2.42 $\pm$ 0.49)、(2.30 $\pm$ 0.62)、(116.24 $\pm$ 22.55)pg/L]均显著高于对照组[(1.65 $\pm$ 0.35)、(1.81 $\pm$ 0.54)、(93.35 $\pm$ 20.10)pg/L], 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ), 重度患者血清 IFN- $\gamma$ 、IL-6、IL-22 水平[(2.61 $\pm$ 0.53)、(2.44 $\pm$ 0.67)、(121.07 $\pm$ 19.88)pg/L]均显著高于轻度患者[(2.22 $\pm$ 0.47)、(1.96 $\pm$ 0.59)、(111.03 $\pm$ 15.89)pg/L], 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。血清 IFN- $\gamma$ 、IL-6、IL-22 水平均与慢性荨麻疹呈明显正相关( $r$  依次为 0.719、0.579、0.633,  $P < 0.001$ )。结论 慢性荨麻疹患者血清 IFN- $\gamma$ 、IL-6、IL-22 水平均明显偏高, 且病情越严重, 血清 IFN- $\gamma$ 、IL-6、IL-22 水平越高, 与慢性荨麻疹的发病存在明显相关性。

**关键词:** 荨麻疹; Th22 细胞; 免疫, 细胞; T 淋巴细胞亚群; 干扰素 II 型; 白细胞介素类**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.23.035**中图分类号:** R446.1; R758.24**文章编号:** 1673-4130(2018)23-2980-03**文献标识码:** B

慢性荨麻疹为皮肤科常见病, 表现为长期反复发作的风团、水肿性红斑伴瘙痒等, 该病病情迁延, 且伴随剧烈痒感, 对患者工作和生活造成较大影响。已有多项研究显示, 慢性荨麻疹的发生与免疫有较大关联<sup>[1-3]</sup>, 有关慢性荨麻疹与免疫指标相关性的研究也较多。辅助性 T 细胞 22(Th22)为近年所发现的新 CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群, 有研究证实, Th22 细胞可产生白细胞介素(IL)-22 参与皮肤的自稳调节, 在皮肤防御

中发挥重要作用, 参与银屑病、白癜风、慢性荨麻疹等皮肤病的病理过程<sup>[4]</sup>。但目前有关 Th22 细胞免疫与慢性荨麻疹的相关性研究还较为缺乏。本研究以 82 例慢性荨麻疹患者为研究对象, 分析 Th22 细胞免疫与慢性荨麻疹的相关性, 现报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择山东省泗水县人民医院 2014 年 8 月至 2017 年 4 月收治的 82 例慢性荨麻疹患者纳