

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.10.012

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200115.1326.016.html\(2020-01-16\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200115.1326.016.html(2020-01-16))应用重组酶聚合酶扩增检测法快速分群解脲支原体的探讨^{*}王 猛,刘晔华,张坚磊,江 雁,刘 萍,穆 红[△]

(天津市第一中心医院检验科 300192)

[摘要] **目的** 探讨应用重组酶聚合酶扩增(RPA)技术对解脲支原体(UU)快速分群的检测方法,并与PCR-反向点杂交法进行比较,建立 UU 快速分群的床旁检测(POCT)方法。**方法** 采用 UU 标准菌株、收集的临床标本及阴性质控菌株,经引物设计和菌株、临床标本 DNA 提取,对 UU 标准菌株、收集临床标本及阴性质控菌株进行 RPA 法、PCR-反向点杂交法分群检测,通过两种方法的结果比较,评价 RPA 法检测 UU 快速分群试验的可行性。**结果** RPA 法成功将 UU 标准菌株分群;113 例临床标本中检测发现 39 例 UU 感染,其中 12 例 UU 为生物 I 群,27 例为生物 II 群;阴性质控菌株未扩增;以上 UU 标准菌株、临床标本、阴性质控菌株经过 PCR-反向点杂交法分群,结果与 RPA 法一致,成功建立 UU RPA 分群法。**结论** RPA 法与 PCR-反向点杂交法对 UU 进行分群结果一致,应用 RPA 法可以简捷、快速、高效、灵敏地完成 UU 的分群,获得致病型 UU 的诊断结果。

[关键词] 重组酶聚合酶扩增;解脲支原体;快速分群**[中图分类号]** R735.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2020)10-1602-05Rapid clustering detection method of ureaplasma urealyticum by recombinant polymerase amplification detection^{*}WANG Meng, LIU Yehua, ZHANG Jianlei, JIANG Yan, LIU Ping, MU Hong[△]

(Department of Clinical Laboratory, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the method of fast clustering detection method of ureaplasma urealyticum(UU) by recombinase polymerase amplification(RPA) and compare it with PCR reverse dot hybridization, to establish a method of rapid clustering of UU by bedside detection (POCT). **Methods** The standard strains of UU, the clinical samples and the negative control strains were collected. Then the primers were designed, and the DNA extraction from the above strains and clinical samples were obtained for subsequent analysis. All of these 3 kinds of samples were collected and clustered by RPA method and PCR-reverse dot hybridization. The results were compared to evaluate the feasibility of RPA method for detecting UU fast clustering experiment. **Results** The standard strain of UU was successfully clustered by RPA method. Among the 113 clinical samples, 39 cases of UU infection were detected, among which 12 cases were biological I and 27 cases were biological II. The negative strain was not amplified. The results of these strains by PCR-reverse dot hybridization were consistent with RPA method. UU RPA clustering method was established successfully. **Conclusion** The results of RPA and PCR-reverse dot hybridization for UU are consistent. Using RPA method can be a simple, rapid, efficient and sensitive to UU clustering and obtain the diagnostic results of pathogenic UU.

[Key words] recombinant polymerase amplification; Ureaplasma urealyticum; rapid detecting

解脲支原体(ureaplasma urealyticum, UU)也称解脲原体,是人类泌尿生殖道常见的条件致病病原体^[1-3]。其分为 14 个血清型,根据分子生物学特征分

成两群:生物 I 群(ureaplasma parvum, Up)和生物 II 群(ureaplasma urealyticum, Uu)。生物 I 群包括 1、3、6、14 共 4 个基因组较小的血清型(0.75~0.76

^{*} 基金项目:天津市临床重点学科(实验诊断学)建设项目资助课题(津卫科教 2018-320);天津市第一中心医院春风基金项目(院 CF201817,院 CF201802)。 作者简介:王猛(1986—),主管技师,硕士,主要从事病原微生物学研究。 [△] 通信作者, E-mail: wangmeng860116@sina.com。

Mb);生物 II 群包括其余 10 个基因组较大的血清型(0.88~1.2 Mb)^[4]。有研究表明,在正常人群中以生物 I 群 U_p 感染为主,但在盆腔炎、异位妊娠、流产等患者中生物 II 群的检出率显著高于对照组,提示生物 II 群与人类生殖道疾病的关系更为密切^[5]。因此,《全国临床检验操作规程(第 3 版)》要求,为明确 UU 是否为致病病原体,对 UU 进行分群是判断感染与携带的关键,在相关疾病的诊断中尤为重要。重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)是最近开发的一种恒温核酸扩增技术,其利用 T4 噬菌体的重组酶介导核酸引物特异识别相应的 DNA 位点,进而启动聚合酶扩增反应^[6-7]。其主要特点体现在:(1)简捷快速,无须昂贵的仪器设备和特殊的实验条件,在 25 °C 室温条件下,通过 20 min 可对样品进行扩增检测;(2)高灵敏度和特异度,由于该扩增引物设计异常严格,其灵敏度、特异度比传统 PCR 更高;(3)高效分型,可以针对病原体的每一种血清型/基因型设计特异引物,两步即可完成检测与分群分型。本研究拟利用 RPA 技术,针对 UU 基因组的保守序列设计特异引物,快速完成样品中 UU 的分群,并建立 UU 的床旁检测(POCT),以期用简捷、快速、高效、灵敏的实验方法获得致病型 UU 的诊断结果,从而实现疾病早发现、早治疗,减轻患者病痛和负担,同时也为其他病原体的临床检测提供可靠的参考方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 UU 标准菌株

UU 标准菌株 2 株,分别是 UU 生物 II 群 ATCC33699(血清 10 型),购自上海宝录生物科技有限公司;UU 生物 I 群国际标准株 ATCC27815(血清 3 型已知为 I 群)取自天津医科大学医学检验学院微生物教研室。

1.1.2 临床标本拭子

疑似 UU 感染临床标本拭子 113 份,收集于天津市第一中心医院妇产科和泌尿外科患者。经医院伦理委员会批准,征得患者同意,使用拭子(天津金章公司)采集疑似感染患者生殖道的分泌物。

1.1.3 阴性质控菌株

RPA 反应体系阴性质控菌株的选择,鉴于 UU 主要针对人体泌尿生殖道致病,因此选取泌尿生殖道常见病原体的类型,共选取 139 株非 UU 细菌及真菌作为验证 RPA 法特异性的阴性质控菌株,包括本实验室保存的标准菌株(来源于原卫生部质控中心)和临床分离菌株(来源于天津市第一中心医院检验科微生物室保留分离的其他标本的菌种库)。

1.1.4 主要仪器和试剂

PCR 扩增仪 7500(美国 ABI 公司)、电泳仪 DY-

CP-31BN(北京六一电泳仪厂)、紫外凝胶成像仪 Gel-DocXR(美国 BioRAD Alpha 公司);支原体液体培养分离鉴别试剂盒(珠海市银科医学股份有限公司)、细菌及真菌 DNA 提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 UU 的液体培养

UU 的液体培养使用支原体液体培养分离鉴别试剂盒进行,操作如下:将试剂恢复室温、编号后按照支原体培养基与菌液 9:1 的比例至培养瓶培养(拭子于培养瓶内碾磨混匀),将培养瓶至 35 °C 培养箱培养 24~48 h,观察结果。判断生长结果:培养基由橙黄色变成红色,且清亮为 UU 生长;培养基不变色则为非 UU。

1.2.2 提取 UU 标准菌株、临床标本、阴性对照菌株 DNA

1.2.2.1 提取 UU 标准菌株 ATCC33699 和 ATCC27815 的基因组 DNA

取 1.5 mL 无菌 EP 管分别加入 1 mL UU 液体培养物,12 000 r/min 离心 5 min,去上清液,沉淀中加入 50 μL DNA 提取液充分混匀,100 °C 恒温处理 10 min,12 000 r/min 离心 5 min 取上清液为 DNA。

1.2.2.2 提取 UU 临床样品基因组 DNA

取 1.5 mL 无菌 EP 管分别加入 1 mL 无菌生理盐水,将标本拭子棉签伸入盐水,充分振荡混匀 1 min,挤干棉拭子,DNA 提取见 1.2.2.1。

1.2.2.3 提取阴性对照菌株 DNA

取 1.5 mL 无菌 EP 管分别加入 1 mL 无菌生理盐水,挑取经复苏培养的对照菌株菌落 1~2 个,均匀混合成菌液,应用细菌、真菌 DNA 提取试剂盒提取 DNA 备用。

1.2.3 UU PCR-反向点杂交法分群实验

1.2.3.1 PCR 扩增

取试剂盒预制 PCR 主反应液的 UU-PCR 反应管,分别加入 1.2.2 中提取的 UU 标准菌株、临床标本、阴性对照菌株的 DNA 溶液各 5 μL,经 6 000 r/min 离心 30 s 后将各反应管放入 PCR 仪进行扩增,扩增条件:93 °C 预变性 5 min;93 °C 45 s,54 °C 45 s,72 °C 45 s,循环 40 次;72 °C 延伸 7 min。

1.2.3.2 杂交反应

按照 UU 基因分型试剂盒说明书配置好所需杂交液的工作浓度,通过杂交-洗膜-结合-显色-照相等一系列步骤,对 1.2.3.1 中的扩增结果进行分群检测。

1.2.4 UU 的 RPA 法分群检测实验

1.2.4.1 设计引物

参考 TwistDX 公司说明(<http://www.twistdx.co.uk/>),设计的 RPA 法引物见表 1。

表 1 RPA 法扩增 Up 和 Uu 分群的引物

分群	目的片段	引物序列 (5'-3')	产物长度(bp)
Up	Up063	UpF:CTTCATTGCGGTGTTT GTGAACTCTTCAATC	156
		UpR:TTATTGATCAAACCTGATATCGCAATTATAGATATT	
Uu	UuR10_0680	UuF:CAAAAACACCTTGACGATATCTAACAAATCC	150
		UuR:CACTAATAATGTTGGAGCTTTAAAAGATGAT	

1.2.4.2 RPA 扩增

将 1.2.2 中提取的 UU 标准菌株、临床标本、阴性对照菌株 DNA 分别加入扩增反应体系中进行扩增,扩增反应体系:TwistDX Mix 29.5 μ L,10 μ mol/L primer F、R 2.5 μ L,DNA 模板 2 μ L,ddH₂O 补足至 50 μ L;扩增条件为 25 $^{\circ}$ C 反应 20 min。

1.2.4.3 扩增结果验证

将扩增产物通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,观察结果,并选取 UU 标准菌株扩增产物进行测序,测序结果经 NCBI blast 数据库比对验证。

1.3 统计学处理

统计比较 PCR-反向点杂交法和 RPA 法检测 UU 标准菌株、临床标本和阴性质控菌株的分群结果。

2 结果

2.1 UU 的液体培养结果

在接种培养的 24~48 h,通过实验观察与记录,发现 UU 标准菌株 ATCC33699 和 ATCC27815 培养基由橙黄色变成红色,结合阴性对照的培养管未发生颜色变化,判断待测的 UU 标准菌株阳性培养结果,见图 1。



A: 阴性结果;B: 阳性结果。

图 1 UU-MH 支原体分离鉴别管液体培养 48 h 后结果

2.2 UU PCR-反向点杂交法分群实验结果

通过应用 PCR-反向点杂交法对 UU 标准菌株、临床标本进行基因分型检测,与已知 ATCC27815 属于生物 I 群,ATCC33699 属于生物 II 群的结果一致,113 例临床标本中 39 例检测出 UU,其中 12 例 UU 为生物 I 型,27 例为生物 II 型,见图 2。

2.3 UU 的 RPA 法检测分群实验结果

UU 分群的扩增产物中生物 I 群为 156 bp,生物 II 群为 150 bp,标准菌株、临床标本相应的扩增产物

见图 3、4;阴性对照菌株(159 株)均未见扩增,且与 UU 常规 PCR-反向点杂交法结果一致,见表 2。标准菌株 ATCC27815 和 ATCC33699 的测序结果和相应菌株的全基因组进行 blast 比对,结果相符。

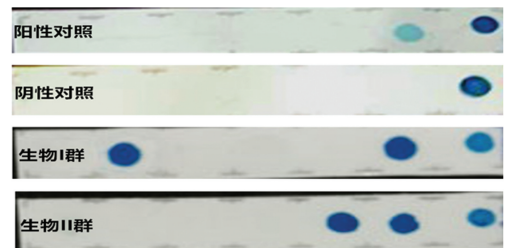
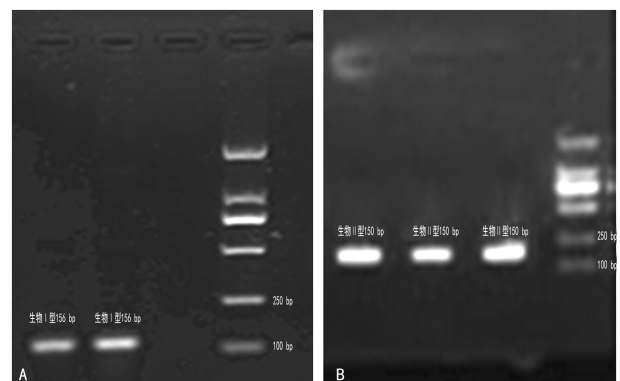


图 2 常规 PCR-反向点杂交法对 UU 标准菌株进行分群检测结果



A: 生物 I 群 Up;B: 生物 II 群 Uu。

图 3 RPA 法检测 UU 分群生物 I 群、生物 II 群扩增产物电泳图

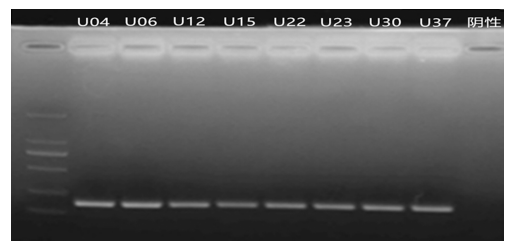


图 4 RPA 法检测临床标本中 UU 生物 I 型扩增产物电泳图

表 2 PCR-反向点杂交法和 RPA 法检测 UU 分群结果比较

样本类型	PCR-反向点杂交法	RPA 法
标准菌株 ATCC27815	I 群	I 群
标准菌株 ATCC33699	II 群	II 群
临床菌株(39 株)	I 群 12 株,II 群 27 株	I 群 12 株,II 群 27 株

3 讨 论

UU 作为泌尿生殖道正常菌群的一部分,所占比例为 40%~80%^[8],其寄居在泌尿生殖道表面,当机体免疫力降低或受侵袭性操作的情况下才会渗透至黏膜;UU 经常分离于非淋球菌性尿道炎(NGU)、前列腺炎、泌尿结石、妇科疾病、不孕等情况下,因此其被认为是机会性致病体^[9-13]。来自印度的 DEV 等^[14]研究表明,非淋菌性尿道炎患者的 UU 感染率分别为 11.0%和 16.1%,而在细菌性阴道炎(BV)患者中分离出 UU 的比例为 62.0%~97.0%。DHAWAN 等^[15]的研究发现,25.8%生殖道感染患者可检出 UU,表明细菌感染常伴有 UU 的侵袭。KOKKAYIL 等^[16]的调查显示,UU 在 HIV 感染患者中的感染率为 6.0%,而在健康志愿者中的比例为 2.0%,因而提出 UU 尿路感染可能增加感染和传播艾滋病病毒(HIV)的易感性假设。UU 在生殖道的寄居也被认为是导致不孕的原因。SLEHA 等^[17]的研究表明,有 39.6%的不孕妇女可在泌尿生殖道检出 UU;陈幽等^[18]对低出生体质量新生儿研究发现,UU 感染组患儿肺发育不良率显著高于非感染组,推论 UU 感染与不良妊娠有关。上述研究已证实 UU 与多种疾病相关,而 UU 的生物群类别则与其致病性有关。HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ 等^[19]研究证实,相比于生物 I 群,女性体内乳酸杆菌的减少与 UU 生物 II 群的关联更加密切;该研究数据显示,生物 II 群与 58.18%的泌尿生殖道感染有关,与之相比,生物 I 群只是泌尿生殖道的寄居菌。《全国临床检验操作规程(第 3 版)》建议:UU 属致病性较弱的条件致病病原体,进一步分群是判断感染与定植的关键。因此,通过大量文献的学习,确定了在实际工作中检测 UU 生物分群的临床参考价值。

常规检测 UU 的方法都存在各自相应的缺点,例如培养 UU 生长困难、血清学检测特异性差、PCR 杂交实验条件要求高等。RPA 法是最近开发的一种恒温核酸扩增技术,能克服上述其他方法存在的不足,是一种理想的 POCT 方法,并已在多种临床病原体上完成检测,如沙眼衣原体、B 族链球菌、结核杆菌、弗朗西斯土拉热杆菌、淋病奈瑟菌、肠炎沙门菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、恶性疟原虫、HIV-1、黄热病毒、口蹄疫病毒、裂谷热病毒等^[20-25]。而使用 RPA 法检测 UU 分群则少有文献报道。因此本研究应用 RPA 法将 UU 检测到生物群水平,实现了简单、易行、准确的目的。

本研究利用 RPA 技术,针对 UU 基因组的保守序列设计特异引物,初步建立了应用 RPA 法对 UU 进行分群的反应体系,并实现了临床标本中 UU 的 POCT 即时检测方法;为了证实实验结果的准确性,

采用商品化的 PCR-反向点杂交法对 UU 进行分群作为对照实验,对 UU 标准菌株、临床菌株及阴性菌株进行了分群检测,结果证明 RPA 法与常规方法鉴别结果一致,达到预期的结果。当然本试验也存在不足:(1)RPA 法敏感度和特异度还需大量临床标本的验证;(2)RPA 法的操作还需优化,力求更加简便、快捷,达到真正意义上的 POCT 目的;(3)需要完善 RPA 法检测 UU 的质控设计等,因此这就还需要继续对本试验进行优化及完善。

参考文献

- [1] TAYLOR-ROBINSON D. Mollicutes in vaginal microbiology: *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma genitalium* [J]. *Res Microbiol*, 2017, 168(9/10):875-881.
- [2] GLASER K, SILWEDEL C, FEHRHOLZ M, et al. *Ureaplasma* species differentially modulate pro- and anti-inflammatory cytokine responses in newborn and adult human monocytes pushing the state toward pro-inflammation [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7:484.
- [3] KLETZEL H H, ROTEM R, BARG M, et al. *Ureaplasma urealyticum*: the role as a pathogen in women's health, a systematic review [J]. *Curr Infect Dis Rep*, 2018, 20(9):33.
- [4] ZHANG J, KONG Y, RUAN Z, et al. Correlation between *Ureaplasma* subgroup 2 and genitourinary tract disease outcomes revealed by an expanded multilocus sequence typing (eMLST) scheme [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8):e104347.
- [5] 黄珺, 张钧, 宋铁军, 等. 解脲支原体各血清型在女性子宫颈的分布及致病性分析 [J]. *中华医学杂志*, 2014, 94(2):100-103.
- [6] HUY N T, HANG L T, BOAMAH D, et al. Development of a single-tube loop-mediated isothermal amplification assay for detection of four pathogens of bacterial meningitis [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2012, 337(1):25-30.
- [7] LAU H Y, BOTELLA J R. Advanced DNA-Based Point-of-Care diagnostic methods for plant diseases detection [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8:2016.
- [8] DONDERS G G, RUBAN K, BELLEN G, et al. *Mycoplasma/ureaplasma* infection in pregnancy: to screen or not to screen [J]. *J Perinat*

- Med, 2017, 45(5): 505-515.
- [9] MOI H, REINTON N, RANDJELOVIC I, et al. Urethral inflammatory response to ureaplasma is significantly lower than to Mycoplasma genitalium and Chlamydia trachomatis [J]. Int J STD AIDS, 2017, 28(8): 773-780.
- [10] SOLOMON M, HENKEL R. Semen culture and the assessment of genitourinary tract infections [J]. Indian J Urol, 2017, 33(3): 188-193.
- [11] SHAFI H, SHAHANDEH Z, HEIDARI B, et al. Bacteriological study and structural composition of staghorn stones removed by the anastrophic nephrolithotomic procedure [J]. Saudi J Kidney Dis Transpl, 2013, 24(2): 418-423.
- [12] 黄水慧, 牛战琴. 解脲支原体及人型支原体对宫颈炎致病性的相关性分析 [J]. 中国生育健康杂志, 2017, 28(6): 567-570.
- [13] 文晓君. 男性不育患者解脲支原体感染及药敏分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(10): 1424-1425.
- [14] DEV T, TANEJA N, JUYAL D, et al. Upper genital tract infection due to Ureaplasma urealyticum: etiological or syndromic management? [J]. Indian J Dermatol Venereol Leprol, 2017, 83(4): 489-491.
- [15] DHAWAN B, GUPTA V, KHANNA N, et al. Evaluation of the diagnostic efficacy of PCR for Ureaplasma urealyticum infection in Indian adults with symptoms of genital discharge [J]. Jpn J Infect Dis, 2006, 59(1): 57-58.
- [16] KOKKAYIL P, DHAWAN B. Ureaplasma: current perspectives [J]. Indian J Med Microbiol, 2015, 33(2): 205-214.
- [17] SLEHA R, BOSTÍKOVÁ V, HAMPL R, et al. Prevalence of mycoplasma hominis and ureaplasma urealyticum in women undergoing an initial infertility evaluation [J]. Epidemiol Mikrobiol Imunol, 2016, 65(4): 232-237.
- [18] 陈幽, 马丽亚, 黄艳, 等. 呼吸窘迫综合征极低出生体重儿解脲支原体感染与支气管肺发育不良的关系 [J]. 中国当代儿科杂志, 2014, 16(5): 469-472.
- [19] HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ C, ROMERO-GONZÁLEZ R, ALBANI-CAMPANARIO M, et al. Vaginal microbiota of healthy pregnant Mexican women is constituted by four Lactobacillus species and several vaginosis-associated bacteria [J]. Infect Dis Obstet Gynecol, 2011: 851485.
- [20] LI J, MACDONALD J, VON STETTEN F. Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification [J]. Analyst, 2018, 144(1): 31-67.
- [21] DAHER R K, STEWART G, BOISSINOT M, et al. Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications [J]. Clin Chem, 2016, 62(7): 947-958.
- [22] 高威芳, 朱鹏, 黄海龙. 重组酶聚合酶扩增技术: 一种新的核酸扩增策略 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2016, 32(6): 627-634.
- [23] 刘冬虹, 王德莲, 郭燕华, 等. 重组酶聚合酶扩增技术的研究进展 [J]. 检验检疫学刊, 2016, 26(5): 65-68.
- [24] 郑文斌, 吴耀东, 马剑钢, 等. 重组酶聚合酶扩增技术及其在寄生虫检测中的应用 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2015, 33(5): 382-386.
- [25] LILLIS L, SIVERSON J, LEE A, et al. Factors influencing recombinase polymerase amplification (RPA) assay outcomes at point of care [J]. Mol Cell Probes, 2016, 30(2): 74-78.

(收稿日期: 2019-08-04 修回日期: 2019-12-25)