

# 液体培养法、固液结合培养法和 PCR 法 在支原体检测中的应用

林茂锐, 周旋, 李明友, 王婷, 吴德海, 曹东林

广东省第二人民医院检验科, 广东 广州 510317

**摘要:** **目的** 比较液体培养法、固液结合培养法和实时荧光定量 PCR 在支原体检测中的诊断价值。**方法** 回顾性调查分析 2016 年 12 月至 2017 年 4 月支原体感染的总体情况,应用液体培养法和固液结合培养法同时对 83 例疑似泌尿生殖系统感染患者进行支原体检测。应用固液结合培养法和实时荧光定量 PCR 同时对 43 例疑似泌尿生殖系统感染患者进行支原体的检测。统计本院该时段固液培养法阳性标本药敏检测状况。**结果** 培养法对比的 83 例患者中,两者检测均为阳性 15 例,均为阴性 48 例,固液结合培养法判定为阴性而液体培养法判定为阳性 18 例,此 18 例中 14 例固液结合培养法液体培养阳性,而固体培养为阴性。两方法的差异有统计学意义( $\chi^2 = 20.976, P < 0.01$ ),固液结合培养法的准确性高于单独的液体培养法。固液结合培养法和实时荧光定量 PCR 对比检测中,最终判定两者均为阳性 21 例,两者均为阴性 18 例,PCR 阳性而培养阴性 4 例。两方法的差异有明显统计学差异( $\chi^2 = 29.553, P < 0.01$ )。**结论** 以上三种方法在不同条件时均可用来检测支原体,固液结合培养法准确率高于单独液体培养法,但敏感性较低,适用于确诊阳性者疗效的观察及需要进行药物敏感性检测的患者;实时荧光定量 PCR 敏感性高,但特异性低,适用于病原微生物含量不高的标本。

**关键词:** 支原体; 液体培养法; 固液结合培养法; 荧光定量 PCR

**中图分类号:** R 375 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2018)02-0248-04

## Application and comparison of liquid culture, solid-liquid combined culture and PCR in the detection of Mycoplasma

LIN Mao-ru, ZHOU Xuan, LI Ming-you, WANG Ting, WU De-hai, CAO Dong-lin

Laboratory of Guangdong Second Provincial General Hospital, Guangzhou, Guangdong 510317, China

Corresponding author: CAO Dong-lin, E-mail: linmaoyuert@163.com

**Abstract:** **Objective** To investigate and compare the diagnostic value of liquid culture, solid-liquid combined culture and real-time quantitative PCR (qRT-PCR) in the detection of Mycoplasma. **Methods** The general situation of mycoplasma infection in Guangdong Second Provincial General Hospital from December 2016 to April 2017 was retrospective investigated. The liquid culture and solid-liquid combined culture were used to detected Mycoplasma in 83 patients who were suspected genitourinary system infection at the same time. And the solid-liquid combined culture and qRT-PCR were used to detected Mycoplasma in 43 patients who were suspected genitourinary system infection at the same time. The drug sensitivity test results of positive samples with the solid culture in the same period were statistically analyzed. **Results** In the 83 patients, there were 15 cases who were positive in both detections and 48 cases who were negative in both detections, and there were 18 cases who were positive in liquid culture but negative in solid-liquid combined culture, and there were 14 cases who were positive in solid-liquid combined culture but negative in solid culture. There was significant difference between two methods( $\chi^2 = 20.976, P < 0.01$ ), and the accuracy of solid-liquid combined culture was higher than that of the single liquid culture. In the comparison of solid-liquid combined culture and qRT-PCR, there were 21 cases who were positive in both detections and 18 cases who were negative in both detections, and there were 4 cases who were positive in PCR but negative in solid-liquid combined culture. There was significant difference between the two methods( $\chi^2 = 29.553, P < 0.01$ ). **Conclusions** All three methods above could be used to detect Mycoplasma in different conditions. Compared to the single liquid culture, the solid-liquid combined culture has a higher accuracy but a lower sensitivity, which could be

used in the observation of the curative effect of positive patients and drug sensitivity test. The qRT-PCR has a higher sensitivity but a lower specificity, which is suitable for specimens with low pathogenic microbial content.

**Key words:** Mycoplasma; Liquid culture; Solid-liquid combined culture; Real-time quantitative PCR

支原体是人类泌尿生殖道的常见病原体,主要寄生在生殖道和泌尿道中<sup>[1]</sup>,女性感染支原体后可导致炎症,使宫颈黏液分泌增加,阻碍精子的进入,引起女性受孕失败;男性感染支原体后可破坏生精细胞,使精子的浓度和形态异常,影响精子活动能力和代谢,导致不孕不育<sup>[2]</sup>。目前,在美国、英国等发达国家已经逐步推行 25 岁以上有性生活者常规进行支原体、衣原体感染的筛查<sup>[3]</sup>,而在我国各地区也逐步普及备孕女性和孕产妇常规检测该病原体,这对临床检测支原体的敏感性及准确性是极大的挑战。本研究对 2016 年 12 月以来就诊于本院疑似泌尿生殖系统感染患者,对比应用单纯液体培养法、固液结合培养法、核酸实时荧光定量 PCR 法进行解脲支原体(UU)和人型支原体(MH)的检测,对这 3 种检测方法的临床诊断价值进行分析比对,报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2016 年 12 月至 2017 年 4 月门诊及住院的疑似泌尿生殖道感染患者,其中进行培养检测的共 1 411 例,进行核酸实时荧光定量 PCR 检测 567 例,同时进行两种检测的共 43 例。随机选取该时间内门诊就诊者 83 例留取双份标本用于不同厂家对比检测。

**1.2 样本采集** 男性用尿道专用无菌棉拭子采集尿道分泌物样本,采集样本前 2 h 禁尿,将无菌棉拭子伸入男性尿道口 2 cm 处转动并停留约 30 s,置无菌管内及时送检;女性采集则先用无菌阴道拭子擦除宫颈口周围的黏液后,用 1 根新的无菌阴道拭子插入宫颈口内约 1~2 cm,转动并停留 30 s 后,置无菌管内及时送检;新生儿留取中段尿于无菌容器内及时送检。

**1.3 试剂** 众爱生河北生物科技有限公司生产的 UU 和 MH 选择分离培养、鉴定、药物敏感性试剂盒。众爱生河北生物科技有限公司 UU 和 MH 的选择分离培养固体培养基。梅里埃生物公司生产的 UU 和 MH 选择分离培养、鉴定、药物敏感性试剂盒。实时荧光定量 PCR 试剂盒由泰普生物工程有限公司提供。

**1.4 方法** (1) 固体培养基接种:拭子顶端轻轻地在固体培养基表面按照曲线方式进行划种,在固体培养基旁边放入二氧化碳发生片一起培养。(2) 液体

培养基接种:将刚刚划种固体培养基的拭子插入对应的液体培养基中,充分搅拌涮洗 20 s,按照说明书接种到微孔鉴定与药敏板,再滴加液状石蜡油。随固体培养基同时放入 CO<sub>2</sub> 培养箱进行培养,培养温度(36±1)℃。(3) 实时荧光定量 PCR 于分子实验室严格按照说明书进行操作。

**1.5 结果判读** (1) 液体培养法:培养 24 h 及 48 h 后分别观察 UU 和 MH 结果,其中清晰透明黄色为阴性;清晰透明红色为阳性;混浊红色可能为污染。对阳性者记录统计对应药敏结果。(2) 固体培养法:培养 48 h 后,采用 10×10 倍显微镜观察琼脂表面的生长情况,若无理想菌落生长,则再放 24 h 后观察结果。其中 100~300 μm 大小油煎蛋样菌落为人型支原体菌落生长;10~50 μm 大小棕黑色海胆样菌落为解脲支原体菌落生长。

**1.6 统计学方法** 患者信息及实验记录输入 Excel 表保存备用,采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,计数资料采用  $\chi^2$  检验及 Fisher 确切概率法。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 液体与固体培养法诊断支原体感染情况** 如表 1 所见,在统计时间段内采用河北众爱生液体与固体相结合方法诊断单独感染 UU 的患者为 336 例(23.8%),为主要类型病例,单独感染 MH 为 17 例(1.2%),两种病原体同时感染为 80 例(5.7%),检测两者均为阴性 978 例。在统计的各个年龄段中女性患者感染比例均高于男性,且 20~50 岁男性、女性均占最大比例。固液结合法在固体琼脂培养基上显微镜观察 UU 和 MH 见图 1,对应的药敏检测结果观察孔见图 2。

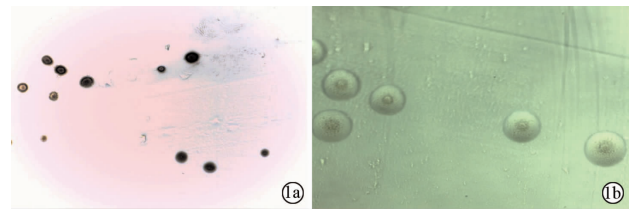
**2.2 两种液体培养法检测支原体的比较** 随机选取 83 例患者,同时采集两份标本,使用众爱生液体加固体培养法及梅里埃的液体培养法检测 UU 和 MH。两者检测最终均定为阳性 15 例,均判定为阴性 48 例,众爱生判定为阴性而梅里埃判定为阳性 18 例,此 18 例中 14 例众爱生液体培养阳性,而固体培养为阴性。两种方法比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 2。

**2.3 众爱生固体加液体培养法及 PCR 法检测支原体比较** 回顾性调查 43 例患者,同时采取两份标本,

用众爱生培养法及 PCR 法进行 UU 检测,最终判定两者均为阳性者 21 例,两者均为阴性 18 例,PCR 阳性而培养阴性 4 例。两种方法比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 3。

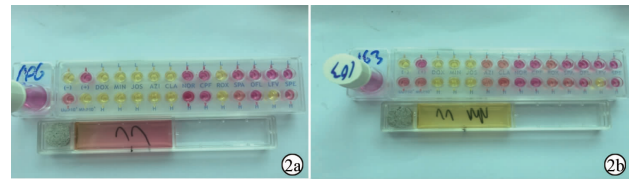
#### 2.4 众爱生液体加固体培养法阳性病例药敏情况

采用众爱生液体加固体培养法时统计的药敏结果见表 4,UU 对强力霉素、美满霉素高度敏感,对喹诺酮类抗生素敏感性低,如环丙沙星、氧氟沙星、左氧氟沙星等,对大环内酯类抗生素如阿奇霉素、克拉霉素、交沙霉素敏感度尚可。单纯只有 MH 生长者对强力霉素、美满霉素和交沙霉素几乎 100% 敏感,对阿奇霉素、罗红霉素、克拉霉素 100% 耐药,对大部分的喹诺酮类抗生素也基本耐药。



注:1a:海胆样 UU;1b:油煎蛋样 MH。

图 1 固体琼脂培养基显微镜下观察支原体(10×10)



注:2a:Uu 阳性标本;2b:UU、MH 同时阳性标本。

图 2 固液结合培养法肉眼观察药敏情况

表 1 液体与固体培养法诊断支原体感染情况 (例)

支原体类型	年龄						合计
	≤20 岁		20~50 岁		≥50 岁		
	男	女	男	女	男	女	
UU(-)MH(-)	2	25	168	752	8	23	978
UU(+ )MH(-)	0	9	36	273	3	15	336
UU(-)MH(+)	0	2	2	10	1	2	17
UU(+ )MH(+)	1	1	7	66	1	4	80
合计	3	37	213	1101	13	44	1411

表 2 众爱生液体加固体培养法及梅里埃的液体培养法检测支原体的比较 (例)

众爱生 (qc + ac)	梅里埃(qc)		合计	$\chi^2$ 值	P 值
	阳性(+)	阴性(-)			
qc + /ac +	15	2	17	20.976	0.000
qc - /ac -	4	48	52		
qc + /ac -	14	0	14		
合计	33	50	83		

注:qc 为液体培养,ac 为固体培养。

表 3 众爱生培养法及 PCR 法检测支原体比较 (例)

检测结果	PCR		合计	$\chi^2$ 值	P 值
	(+)	(-)			
培养(+)	21	0	21	29.553	0.000
培养(-)	4	18	22		
合计	25	18	43		

表 4 众爱生液体加固体培养法阳性病例药敏情况 (%)

抗生素	UU(n=336)			MH(n=17)			UU+MH(n=80)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
罗红霉素	68.5	16.4	15.1	0	0	100.0	5.0	11.3	83.7
强力霉素	97.3	2.1	0.6	100.0	0	0	97.5	1.2	1.2
美满霉素	97.3	2.1	0.6	100.0	0	0	97.5	1.2	1.2
交沙霉素	85.7	14.3	0	100.0	0	0	95.0	3.7	1.2
阿奇霉素	75.0	15.5	9.5	0	0	100.0	2.5	18.7	78.7
环丙沙星	3.0	17.3	79.8	0	0	100.0	1.2	10.0	88.7
司帕沙星	19.9	40.2	39.9	11.8	52.9	35.3	17.5	46.2	36.2
壮观霉素	4.8	8.3	86.9	0	0	100.0	6.2	2.5	91.2
克拉霉素	78.9	9.2	11.9	0	0	100.0	0	3.7	83.7
氧氟沙星	3.6	20.8	75.6	0	0	100.0	3.7	6.2	90.0
左氧氟沙星	17.6	56.5	25.9	0	29.4	70.6	8.7	47.5	43.7
诺氟沙星	1.2	8.3	90.5	0	0	100.0	1.2	2.5	96.2

注:S 为敏感;I 为中敏,R 为耐药。

### 3 讨论

支原体是一类没有细胞壁的原核细胞型微生物,主要通过性接触传播引起泌尿生殖道感染,目前已发现 UU、MH、生殖支原体(MG)、发酵支原体(MF)均可引起生殖系统炎症<sup>[1]</sup>。目前临床主要检测 UU 和 MH,对 MG 和 MF 的相关检测少有研究报道。Rusz 和 Lanjouw 等<sup>[4-5]</sup>统计发现约 40%~90% 的妊娠妇女可发现 UU 和 MH 的感染,且 UU 和 MH 的垂直传播率可达 35%~65%,它们可以通过产妇的阴道分娩、感染羊水等方式定植于新生儿体内,引起新生儿感染。UU 和 MH 感染男性的概率与其个人的性生活史直接相关,有多个性伴侣的男性其支原体定居率明显增高<sup>[6-7]</sup>。本研究中 20~50 岁年龄段支原体的感染比例明显高于其他年龄段,这与该年龄段群体活跃的性生活密切相关。而各个年龄段女性支原体感染率高于男性,可能是由于女性泌尿生殖器官的生理结构和内环境及酸碱度更适合支原体生长,而男女之间的生理差异和泌尿生殖道血液循环的不同可造成治疗效果的差异,另外,女性感染支原体后早期大多症状不明显,易被忽略,造成就医延迟,这也导致统计中女性感染支原体比例相对男性较高<sup>[8]</sup>。

面对二胎的开放和现代生活方式的转变,支原体检测已作为临床常规检测项目<sup>[4]</sup>,本研究对目前应用较多的液体培养法、固体培养法和 PCR 法进行比较。单纯的液体培养法由于操作简便,且能同时进行支原体药敏试验,因此于基层大部分医院普及;固体

培养法结合显微镜观察能够直观的判定支原体是否生长,是判定支原体感染阳性的“金标准”;PCR 核酸检测技术能快速、准确、灵敏地检测出支原体的核酸,在技术条件符合的医院迅速开展。本次采用固体和液体培养两种方法检测的 83 例样本中,共有 18 例最终诊断出差异,而其中 14 例为固体加液体培养时,固体培养阴性,而液体培养颜色已经变红,被判断为假阳性。目前商品化的支原体液体培养基大多基于 UU 在生长过程中分解尿素及 MH 在生长过程中分解精氨酸这个原理来设计的,即在 UU 和 MH 肉汤培养基中加入尿素和精氨酸,同时加入酚红指示剂。尿素或精氨酸被利用分解时产氨,肉汤颜色变红,初步提示肉汤中可能含有 UU 或 MH<sup>[9]</sup>。然而,液体培养基中加入的抑制其他微生物生长的抑制剂不能抑制所有微生物,当出现复杂感染时,如某些能够分解尿素或精氨酸的葡萄球菌和肠杆菌在肉汤中生长也会导致支原体培养液变红,从而出现了液体培养法的假阳性。固体培养法虽然被认为是支原体诊断的金标准,但接种的手法问题容易使得滴度较低的支原体无法在固体培养基上生长而出现漏检造成假阴性,这两方面的原因均有可能拉大固体培养和液体培养阳性率的差距,因此采用固体与液体相结合的方法,即液体变红后再次接种固体培养基的联合检测方法被认为极大的优化了支原体的检测<sup>[10]</sup>。对于 43 例固体加液体的培养法与 PCR 方法的对比中,39 例检测结果一致,另有 4 例 PCR 阳性而培养阴性,这与 PCR 检测法的敏感性相对于培养法更高有极大关系,同时在治疗过程中失去活力的支原体能够被 PCR 法检测到而无法培养出来也是其中的一个重要原因。因此,笔者认为采用 PCR 法进行初筛后,采用培养法观察后期治疗疗效能够帮助临床更加准确的判断病情。

液体培养法的一个重要优势即可以方便快捷的进行支原体的药敏检测,本研究统计了阳性样本的药敏状况。433 例阳性样本中,UU 对强力霉素、美满霉素高度敏感,对大环内酯类抗生素如阿奇霉素、克拉霉素、交沙霉素等敏感度一般,对喹诺酮类抗生素敏感性较低。单纯只有 MH 生长时,对强力霉素、美满霉素和交沙霉素几乎 100% 敏感,对阿奇霉素、罗红霉素、克拉霉素 100% 耐药,对大部分的喹诺酮类抗生素也基本耐药,这些药敏结果与其他几项研究大致类似<sup>[8,11-12]</sup>。由于支原体特殊的缺乏细胞壁的结构,其对传统的针对细胞壁产生作用的  $\beta$  内酰胺类抗生素如青霉素类和头孢菌类天然耐药,因此临床常采用大环内酯类、四环素类、喹诺酮类进行治疗,这

些药物大多作用机制是干扰蛋白质的合成。但由于目前国内抗菌药物极度不合理的使用,导致支原体对这些药物的耐药性日渐严重,治疗支原体感染有效抗生素种类日趋受限,因此临床医师要依据药敏实验结果合理选择用药才能提高治疗效果的同时避免耐药菌株的产生。

综上所述,积极综合开展支原体 PCR 检测技术与培养技术,提高支原体的初步筛查率的同时,采用培养法进行药敏和确证,跟踪治疗观察,对支原体引起的非淋菌性尿道炎的早期诊断和促进康复具有重要意义。临床中一旦诊断出支原体感染,必须及时根据药敏对其予以有效治疗,以避免各种并发症或者是慢性带菌者的出现,防止支原体导致的不孕不育。

### 参考文献

- [1] 曹玉璞. 支原体与支原体病[M]. 北京:人民卫生出版社,2000.
- [2] McGowan CL, Popov VL, Pyles RB. Intracellular Mycoplasma genitalium infection of human vaginal and cervical epithelial cells elicits distinct patterns of inflammatory cytokine secretion and provides a possible survival niche against macrophage-mediated killing [J]. BMC Microbiol, 2009, 9: 139.
- [3] 方爱姿, 钟亮尹, 曾淑珍, 等. 肺炎支原体抗体检测结果及流行病学分析[J]. 实用医学杂志, 2012, 28(15): 2611-2613.
- [4] Rusz A, Pilatz A, Wagenlehner F, et al. Influence of urogenital infections and inflammation on semen quality and male fertility [J]. World J Urol, 2012, 30(1): 23-30.
- [5] Lanjouw E, Ouburg S, de Vries HJ, et al. 2015 European guideline on the management of Chlamydia trachomatis infections [J]. Int J STD & AIDS, 2016, 27(5): 333.
- [6] 丁进亚, 杨斌, 黄前川, 等. 荧光定量 PCR 检测解脲脲原体不同生物群的临床应用[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(4): 462-463.
- [7] 崔英丽, 蔡知天, 李楷滨, 等. 解脲支原体在不孕不育及不良妊娠结局的作用[J]. 中国妇幼保健, 2012, 27(6): 944-946.
- [8] 尹奇焕. 271 例疑似生殖道支原体感染患者的病原体检测及药敏分析[J]. 山东医药, 2013, 53(43): 69-71.
- [9] 杨颖, 罗永慧, 江莎莎, 等. 泌尿生殖道支原体液体培养法与固体培养法结果比较的研究[J]. 江西医学检验, 2007, 25(6): 571-572.
- [10] 吴磊, 周运恒, 陈向明, 等. 泌尿生殖道支原体感染的优化检测方案研究[J]. 检验医学, 2015, 30(12): 1214-1218.
- [11] 庄殿英. 汕头地区泌尿生殖道感染解脲脲支原体和人支原体检测情况及耐药性分析[J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(4): 625-627.
- [12] 龙彩云, 凌彩铃, 区旭春. 3558 例患者泌尿生殖道衣原体支原体检测及耐药性分析[J]. 实用医学杂志, 2015, 31(23): 3921-3922.