

DOI:10.13350/j.cjpb.250206

• 论著 •

沙眼衣原体、淋球菌、解脲脲原体核酸快速检测方法的建立^{*}

李雨欣¹, 周华誉¹, 张瑜², 高静², 蔡亦梅², 逯素梅³, 任鲁风², 马鲁豫^{1**}

(1. 山东第一医科大学, 山东济南 271016; 2. 北京中科生仪科技有限公司; 3. 山东第一医科大学第一附属医院 (山东省千佛山医院) 检验医学科)

【摘要】 **目的** 建立一种基于微流控芯片平台的可同时鉴别沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*, CT)、淋球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*, NG)、解脲脲原体 (*Ureaplasma urealyticum*, UU) 的现场化全自动检测方法。 **方法** 选取 CT 的隐蔽性质粒、NG 的 *porA* 基因和 UU 的 16S rRNA 中的保守序列作为检测靶标, 设计特异性引物和 TaqMan 探针; 分别制备 CT、NG、UU 三种病原体的阳性克隆菌株进行灵敏度初步测试。开发基于全自动检测设备的一体化微流控芯片, 实现“样本进-结果出”的核酸提取纯化及实时荧光 PCR 全过程。使用经过数字 PCR 定量的 CT、NG、UU 三种病原体的液体室内质控品对全自动检测方法的灵敏度、特异性和重复性进行评价。用建立的全自动检测方法已与上市的多重实时荧光 PCR 法检测试剂盒同时检测 160 例临床样本, 评价其一致性。 **结果** 阳性克隆菌株经琼脂糖凝胶电泳和测序鉴定, 构建正确。建立的全自动检测方法检测 CT、NG 和 UU 的检出限均可达到 1×10^2 copies/test, 检测范围 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^7$ copies/test; 该方法特异性好, 不受单纯疱疹病毒 I 型/II 型、腺病毒、肠道病毒 71 型、肺炎衣原体、肺炎支原体以及人免疫缺陷病毒 I 型的干扰; 该方法重复性好, 变异系数均 $< 5\%$ 。160 例临床样本的对比研究中, 全自动检测方法对 CT、NG 和 UU 的检出率分别为 15.6%、10.6% 和 35.6%, 与对比试剂盒检测结果比较, 无明显差异 ($P > 0.05$); 全自动检测方法对比试剂盒检测 CT、NG 和 UU 结果的阳性符合率分别为 96.2%、94.4% 和 93.4%, 阴性符合率均为 100%, 总符合率分别为 99.4%、99.4% 和 97.5%。 **结论** 建立的现场化全自动检测方法具有良好的灵敏度、特异性和重复性, 该方法自动化程度高, 检测时间短, 操作简便、快速, 不受实验室场地限制, 适合于 CT、NG、UU 的临床快速诊断。

【关键词】 沙眼衣原体; 淋球菌; 解脲脲原体; 微流控芯片; 现场化核酸检测

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2025)02-0158-06

[*Journal of Pathogen Biology*. 2025 Feb.; 20(02):158-163,170.]

Establishment of a rapid nucleic acid detection methods for *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Ureaplasma urealyticum*

LI Yuxin¹, ZHOU Huayu¹, ZHANG Yu², GAO Jing², CAI Yimei², LU Sumei³, REN Lufeng², MA Luyu¹ (1. Shandong First Medical University, Jinan 271016, China; 2. Integrated Bio Systems Co., Ltd. 3. The First Affiliated Hospital of Shandong First Medical University (Shandong Provincial Qianfoshan Hospital) Department of Laboratory Medicine)***

【Abstract】 **Objective** To establish an on-site automated detection method based on a microfluidic chip platform for the simultaneous identification of *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), and *Ureaplasma urealyticum* (UU). **Methods** The conserved sequences of the cryptic plasmid of CT, the *porA* gene of NG and the 16S rRNA of UU were selected as the detection targets, and specific primers and TaqMan probes were designed. Positive cloned strains of CT, NG and UU were prepared for preliminary sensitivity testing. Developed an integrated microfluidic chip based on automatic detection equipment was developed to realize the whole process of nucleic acid extraction and purification and real-time fluorescence PCR of "sample in and result out". The sensitivity, specificity, and reproducibility of the automated detection method were evaluated using liquid in-house controls for CT, NG, and UU pathogens quantified by digital PCR. The established automatic detection method and the marketed multiplex real-time PCR detection kit were used to detect 160 clinical samples at the same time to evaluate their consistency. **Results** The positive cloned strains were identified by agarose gel electrophoresis and DNA sequencing and constructed correctly. The detection limits of CT, NG and UU of

* **【基金项目】** 国家重点研发计划项目 (No. 2021YFC2401000)。

** **【通讯作者】** 马鲁豫, E-mail: maluyu@sina.com

【作者简介】 李雨欣 (1999-), 女, 河南人, 硕士研究生, 主要从事分子生物学核酸快速检测研究。E-mail: liyuxin@163.com

the established fully automated assay can reach 1×10^2 copies/test, and the detection range is $1 \times 10^2 - 1 \times 10^7$ copies/test. The method has excellent specificity and is not interfered with Herpes simplex virus type I/II, adenovirus, Enterovirus type 71, *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* and Human immunodeficiency virus type I. The method has good reproducibility, and the coefficient of variation is $<5\%$. In the comparative study of 160 clinical samples, the detection rates of CT, NG and UU by the automated detection method were 15.6%, 10.6% and 35.6%, respectively. There was no significant difference between the automatic detection method and the comparison kit ($P > 0.05$). The positive coincidence rates of CT, NG and UU were 96.2%, 94.4% and 93.4% respectively, and the negative coincidence rates were 100%. Hence, the total coincidence rates were 99.4%, 99.4% and 97.5% for CT, NG and UU respectively. **Conclusion** The established on-site automated detection method has excellent sensitivity, specificity and repeatability. This approach has obvious advantages including high degree of automation, short detection time, simple and fast operation, and is not limited by laboratory, which is suitable for clinical rapid diagnosis of CT, NG and UU.

【Keywords】 *Chlamydia trachomatis* (CT); *Neisseria gonorrhoeae* (NG); *Ureaplasma urealyticum* (UU); microfluidic chip; on-site nucleic acid detection

据世界卫生组织统计,全球每年有超过 9 000 万人感染沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*, CT) 和 1.06 亿人感染淋病奈瑟菌 (*Neisseria gonorrhoeae*, NG)^[1]。解脲支原体 (*Ureaplasma urealyticum*, UU) 在非淋病性尿道炎 (Non-gonococcal urethritis, NGU) 中是仅次于 CT 的重要病原体^[2]。CT 是一种专性细胞内病原体,分为 3 个生物型,即小鼠生物型、沙眼生物型和性病淋巴肉芽肿生物型,其中沙眼生物型 D-K 血清型和性病淋巴肉芽肿生物型是引起泌尿生殖道疾病的主要病原体。NG 为严格的人体寄生菌,常存在于急性尿道炎与阴道炎的脓性分泌物的白细胞中,无分型^[3]。UU 在人类泌尿生殖系统中属于常见的机会性致病菌,包含两个生物群共 14 个血清型,生物 I 群包括 1、3、6、14 共 4 个血清型即微小脲原体 (*Ureaplasma parvum*, UP),生物 II 群包括 2、5、9 以及 7-13 共 10 个血清型即解脲脲原体 (*Ureaplasma urealyticum*, UU)^[4]。其中,UP 是泌尿生殖道的正常定植菌群,致病机理尚未证实^[5]。CT、NG 和 UU 感染可导致男性尿道炎、前列腺炎和女性宫颈炎、不孕不育等疾病,有研究表明这三种病原体感染与女性流产、早产和宫颈癌密切相关,对人类健康造成极大的危害^[6-7]。

在我国,常见 CT、NG 和 UU 混合感染,且往往表现为无症状感染,易延误病情或误诊误治^[8]。因此,建立一种针对 CT、NG 和 UU 的快速准确的鉴定方法是非常必要的。目前对于 CT、NG 和 UU 的早期筛查和检测方法有三种:培养法、免疫学方法和实时荧光定量 PCR 法。但培养法灵敏度低,检测步骤繁琐;免疫学方法敏感性和特异性均较低^[9-10];实时荧光 PCR 法 (real-time PCR) 灵敏度和特异性高,适用于多种临床样本类型,但需要较高的成本、专业实验室条件和操作人员能力^[11]。以上方法均难以满足基层医疗机构对这类感染的检测和诊断需求。

本研究利用全自动检测设备及其配套的一体化微流控芯片,将核酸提取纯化和实时荧光 PCR 的流程整合,实现“样本进-结果出”的全自动化检测,建立了一种同时对 CT、NG 和 UU 实现现场化全自动核酸快速检测的方法。

材料与方法

1 材料

1.1 菌株、DNA 及样本 CT、NG、UU 阳性克隆菌株由北京中科生仪科技有限公司提供;CT、NG、UU 以及单纯疱疹病毒 I 型、II 型、肺炎衣原体、肺炎支原体、腺病毒脱氧核糖核酸液体室内质控品以及肠道病毒 71 型核糖核酸室内质控品均购自广州邦德盛生物科技有限公司;人免疫缺陷病毒 I 型核糖核酸标准物质购自康彻思坦生物科技有限公司;粘蛋白购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;临床样本由山东第一医科大学第一附属医院 (山东省千佛山医院) 提供。

1.2 主要试剂 枯草芽孢杆菌菌株 SCK6 及枯草芽孢杆菌整合质粒 pDG1730 均购自北京宝赛生物科技有限公司;质粒提取试剂盒 Gene-JET Plasmid Miniprep Kit 为美国 Thermo Scientific 公司产品;PCR 产物纯化试剂盒 Min-Elute PCR Purification kit 和核酸提取和纯化试剂盒 QIA-amp DNA Mini kit 以及凝胶回收试剂盒 QIA quick Gel Extraction Kit 均为德国 Qiagen 公司产品;Air-Dryable™ Direct DNA qPCR Stool 为美国 Meridian 公司产品。对比试剂盒 CT、NG、UU 核酸检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) 为湖南圣湘生物科技有限公司产品。

1.3 主要仪器 手持式核酸快检一体机 (P1000F) 及配套微流控检测芯片由北京中科生仪科技有限公司研发。对比平台为美国赛默飞的 ABi7500 实时荧光定量 PCR 系统。

2 方法

2.1 引物和探针的设计与合成 登录 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 查找 UU 14 个血清型的 16S rRNA 基因序列 (NR_041710.1, NC_011374.1, NC_010503.1), 使用 Jalview 软件进行比对后找到保守的序列片段, 使用 Primer Express 3.0 软件对该保守序列设计 UU 的特异性引物及 TaqMan 探针。CT 和 NG 特异的引物探针选取于文献中的序列, 分别定位在 CT 的隐蔽性质粒和 NG 的 *porA* 基因上, 并在 CT-F 和 NG-F 的序列上进行了优化。以上三组引物探针均在 NCBI 上进行了 BLAST 特异性比对。内部过程质控品 (internal process control, IPC) 为非天然序列。三种病原体和 IPC 的引物探针序列见表 1。引物和探针均由百力格生物科技(上海)股份有限公司合成。

表 1 CT、NG、UU 和 IPC 引物及探针序列
Table 1 Sequences of primers and probes for CT, NG, UU and IPC

引物及探针 Primer and probe	序列(5'→3') Sequence	扩增片段大小 (bp) Amplification size	来源 Derive from
CT-F	CAATGGATTACCTATAACTGTAGACTC		
CT-R	ACGGATCTAAGCTTGTCAATTGA	129	[12]
CT-P	CY5-TTGATACGACGCCGCAAAAGCTCT-BHQ3		
NG-F	CAGCATTCAATTTGTTCGAG		
NG-R	GAACTGGTTTCATCTGATTACTTTCCA	89	[13]
NG-P	HEX-CGCCTATACGCCTGCTACTTTTCACGC-SQ1		
UU-F	ATCCGGATTTACTGGGGC		
UU-R	ACGCATTTTACCGCTCCAC	148	
UU-P	FAM-AACCCGCTGCGCTCGTTT-MGB		
IPC-F	AGTTGCAGTGTAACCGTCATGTA		
IPC-R	TCGACGAGACTCTGCTGTAA	100	
IPC-P	CY5.5-CAGTAATCTGCGTCGCACGTGTGCA-BHQ3		

2.2 阳性克隆菌株的制备 选取大小为 500 bp 的 CT 隐蔽性质粒、400 bp 的 NG *porA* 和 400 bp 的 UU 16S rRNA 作为检测靶序列, 使用全基因合成方法合成相应序列, 以其为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 50 μ L; Taq PCR Master Mix 12.5 μ L, 浓度为 100 μ mol/ μ L 的上下游引物各 0.2 μ L, DNA 模板 1 μ L, 用 DEPC 水补足体积至 50 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 回收 PCR 产物, 纯化后连接到载体 pDG1730 质粒, 连接产物转化感受态枯草芽孢杆菌; 挑取阳性克隆菌, 将其涂布在 100 μ g/mL 壮观霉素抗性平板上, 37 $^{\circ}$ C 倒置过夜培养; 挑取单克隆菌进行 PCR 扩增, 取产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 并由北京擎科科技股份有限公司进行测序。鉴定正确的阳性克隆菌株通过显微镜计数法进行计数, 并计算拷贝数。

2.3 现场化全自动检测设备及配套微流控芯片的制

备 图 1 为手持式核酸快检一体机 (P1000F) 及其配套微流控芯片的示意图, 微流控芯片构造包括试剂仓、管路层和密封层, 其中试剂仓由样本仓、缓冲液仓以及洗涤仓构成, 管路层由核酸提取纯化区、扩增区、废液区以及各功能区间的连接管路构成, 密封层紧贴管路层中管路流道的表面, 通过密封层封闭管路流道。整个芯片可形成一体化密闭系统, 通过双泵配合驱动方式实现液路控制, 即每个液路控制步骤由 2 个芯片内柱塞泵抽吸动作配合完成, 无透气孔连通外界, 避免样本或气溶胶泄漏污染等风险。PCR 扩增试剂以及 CT、NG、UU 和 IPC 的引物探针通过风干技术预包埋在管路层的扩增区, IPC 靶标的假病毒冻干球置于管路层样品管出口处, 从样本纯化开始参与检测全过程。该检测系统可自动化进行核酸提取纯化、实时荧光 PCR 扩增以及结果判读全部过程。将 200 μ L 拭子洗脱液样本加入微流控芯片的样本仓中, 在 P1000F 设备上运行 35 分钟即可直接读取检测结果和荧光扩增曲线。



图 1 P1000F 及配套微流控芯片示意图
Fig. 1 Schematic diagram of P1000F and supporting microfluidic chips

2.4 检测范围及灵敏度实验 将 CT、NG 和 UU 阳性克隆菌株等比混合后作梯度稀释, 直接加入微流控芯片中进行检测, 测试检测范围和灵敏度。使用经数字 PCR 定量的阳性脱氧核糖核酸液体室内质控品在最低检测限浓度下进行灵敏度的验证。

2.5 特异性实验 通过全自动检测方法分别对单纯疱疹病毒 I 型、II 型、腺病毒、肠道病毒 71 型、肺炎衣原体、肺炎支原体、以及人免疫缺陷病毒 I 型的阳性质控品进行测试, 分析检测方法的特异性。使用粘蛋白和血液测试干扰反应。

2.6 重复性实验 以阴性样本、灵敏度检出限样本 (1×10^2 copies/test)、略高于灵敏度的弱阳性样本 (3×10^2 copies/test) 以及中等阳性样本 (5×10^3 copies/test) 四种浓度的 CT、NG 和 UU 的混合阳性质控品分别加入微流控芯片中进行检测, 重复 6 次, 分析检测结果的重复性, 并计算各浓度检测靶标 Ct 值的变异系数 (CV)。

2.7 临床样本测试 用所建立的全自动检测方法

已上市多重检测试剂盒同时检测 160 例临床样本,评价所建立的全自动检测方法已与上市多重检测试剂盒的一致性,以验证本研究建立的全自动检测方法的临床可行性。

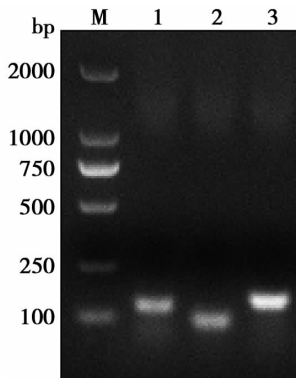
3 数据统计

使用软件 SPSS 26.0 对实际样本测试结果进行统计学分析,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 阳性克隆菌株的制备和鉴定

将 CT、NG 和 UU 感受态枯草芽孢杆菌摇瓶培养后,进行 PCR 扩增,取产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果显示 CT、NG 及 UU 的扩增产物分别可见 129 bp、89 bp 和 148 bp 的特异条带,大小与预期一致(图 2)。同时对重组阳性克隆菌进行测序,测序结果与 NCBI 上收录的 CT、NG 及 UU 相应序列完全一致,证明构建正确。通过显微镜计数对阳性克隆菌株进行计数,计算得 CT、NG 和 UU 浓度约为 1×10^{10} copies/mL。



M DNA 标志物(DL2000) 1 CT PCR 扩增产物(129 bp) 2 NG PCR 扩增产物(89 bp) 3 UU PCR 扩增产物(148 bp)

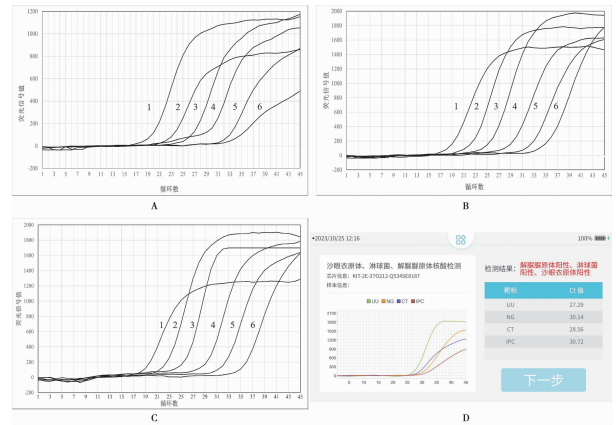
图 2 CT、NG 和 UU PCR 扩增产物鉴定电泳图

M 2000bp DNA marker 1 CT PCR amplification product (129 bp) 2 NG PCR amplification product (89 bp) 3 UU PCR amplification product (148 bp)

Fig. 2 Electropherograms of CT, NG, and UU PCR amplification product identification

2 全自动检测方法的检测范围

分别将 CT、NG 和 UU 的阳性克隆菌株等比例混合,10 倍梯度稀释为 5×10^2 copies/mL、 5×10^3 copies/mL、 5×10^4 copies/mL、 5×10^5 copies/mL、 5×10^6 copies/mL 和 5×10^7 copies/mL,取 200 μ L 加入微流控芯片中进行检测;检测结果如图 3A-3C 所示,全自动检测方法可同时检测 CT、NG 和 UU 三种病原体,且每种病原体的检测范围均可达 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^7$ copies/test,灵敏度检出限均可达 1×10^2 copies/test。



注:横坐标为扩增循环数,纵坐标为荧光值;曲线 1-6 投入的样本浓度依次为 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^2$ copies/test。A、B、C 依次为 CT、NG 和 UU 全自动检测方法检测范围测试结果的原始数据, D 为全自动检测方法的结果示意图。

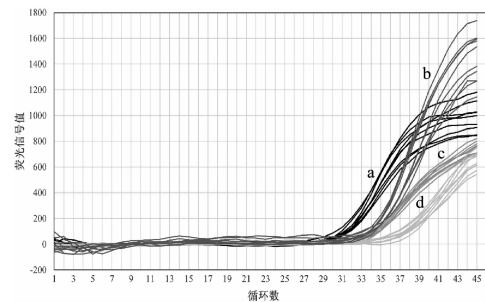
图 3 CT、NG 和 UU 全自动检测方法检测范围

Note: The abscissa is the cycles number, the ordinate is the fluorescence value. The sample concentrations of curves 1-6 were $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^2$ copies/test. A, B, C are the raw data of the test results of the detection range of the CT, NG and UU automatic detection method, D is the schematic diagram of the results of the automatic detection method.

Fig. 3 The detection range of the automated detection method for CT, NG, and UU

3 全自动检测方法的灵敏度

将经数字 PCR 定量的 CT、NG 和 UU 的阳性脱氧核糖核酸液体室内质控品等比例混合后稀释到 1×10^2 copies/test,用全自动检测方法重复测试十次,三种病原体和 IPC 均能稳定扩增(图 4)。



注:横坐标为扩增循环数,纵坐标为荧光值。a、b、c、d 依次为 IPC、UU、CT 和 NG 阳性质控品的扩增曲线原始数据。

图 4 CT、NG 和 UU 全自动检测方法灵敏度

Note: The abscissa is the cycles number, the ordinate is the fluorescence value. a, b, c and d are the raw amplification curves of IPC, UU, CT, and NG positive control.

Fig. 4 Sensitivity of the automated detection method for CT, NG, and UU

4 全自动检测方法的特异性

用全自动检测方法分别检测 1×10^4 copies/test 的单纯疱疹病毒 I 型、II 型、腺病毒、肠道病毒 71 型、肺炎衣原体、肺炎支原体,以及人免疫缺陷病毒 I 型的阳性质控品,结果见表 2。扩增结果均为阴性,说明无交叉反应。投入占总样本量 5% (v/v) 的粘蛋白和血

液,全自动检测方法检测 CT、NG、UU 在粘蛋白和血液这两种干扰物质存在下可以稳定扩增。

表 2 CT、NG 和 UU 全自动检测方法特异性结果
Table 2 Method-specific results for CT, NG, and UU automated detection method

检测病原体 Pathogens	Ct 值 Cycle threshold			
	CT	NG	UU	IPC
单纯疱疹病毒 I 型	阴性	阴性	阴性	31.22
单纯疱疹病毒 II 型	阴性	阴性	阴性	31.05
腺病毒	阴性	阴性	阴性	31.68
肠道病毒 71 型	阴性	阴性	阴性	31.28
肺炎衣原体	阴性	阴性	阴性	30.63
肺炎支原体	阴性	阴性	阴性	30.40
人免疫缺陷病毒 I 型	阴性	阴性	阴性	29.89
粘蛋白	31.53	34.90	30.45	31.53
血液	31.72	34.07	31.11	31.72

表 2 CT、NG 和 UU 全自动检测方法特异性结果
Table 2 Method-specific results for CT, NG, and UU automated detection method

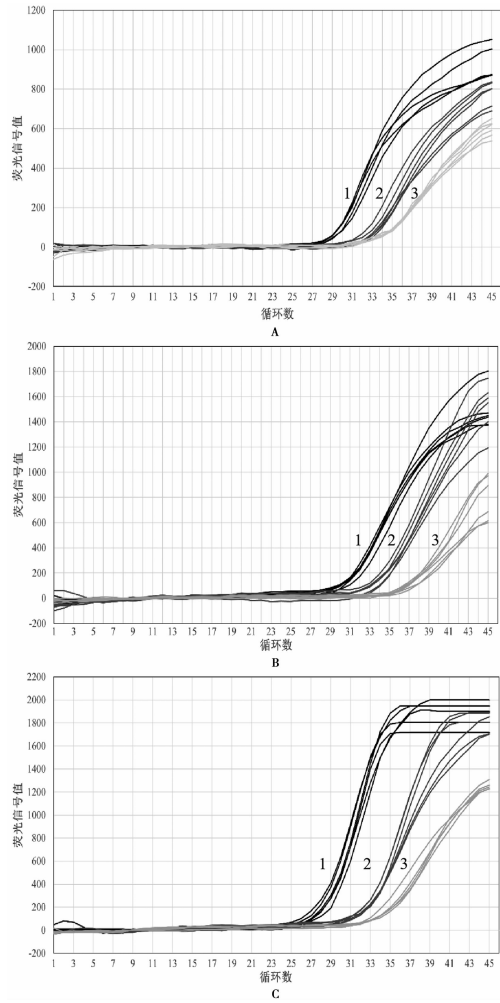
检测病原体 Pathogens	Ct 值 Cycle threshold			
	CT	NG	UU	IPC
单纯疱疹病毒 I 型	阴性	阴性	阴性	31.22
单纯疱疹病毒 II 型	阴性	阴性	阴性	31.05
腺病毒	阴性	阴性	阴性	31.68
肠道病毒 71 型	阴性	阴性	阴性	31.28
肺炎衣原体	阴性	阴性	阴性	30.63
肺炎支原体	阴性	阴性	阴性	30.40
人免疫缺陷病毒 I 型	阴性	阴性	阴性	29.89
粘蛋白	31.53	34.90	30.45	31.53
血液	31.72	34.07	31.11	31.72

5 全自动检测方法的重复性

将 CT、NG、UU 混合阳性质控品 $0, 1 \times 10^2, 3 \times 10^2, 5 \times 10^3$ copies/test 四种浓度加入微流控芯片中进行检测,独立重复 6 次,如图 6 所示,三靶标均重复性良好。计算低、中、高浓度检测结果的变异系数,CT 靶标三个浓度的变异系数分别为 1.286%、1.425%、1.543%;NG 靶标三个浓度的变异系数分别为 2.097%、1.101%、0.862%;UU 靶标三个浓度的变异系数分别为 0.885%、1.177%、2.528%。

6 全自动检测方法实际样本测试

测试结果显示,160 例临床样本中,全自动检测方法对 CT、NG 和 UU 的阳性检出率分别为 15.6%、10.6% 和 35.6%;双重感染患者的检出率为 10.6%,其中 CT+NG 为 1.3%,CT+UU 为 8%,NG+UU 为 1.3%;未检测到三重感染的患者(表 3)。全自动检测方法对 CT、NG 和 UU 的阳性检出率与对比试剂盒相比,差异无统计学意义(χ^2 值分别为 0.023、0.032、0.215;P 均 > 0.05);其中阳性符合率分别为 96.2%、94.4% 和 93.4%;阴性符合率均为 100%;总符合率分别为 99.4%、99.4% 和 97.5%(表 4)。



注:横坐标为扩增循环数,纵坐标为荧光值;曲线 1、2、3 依次为投入的样本浓度为 $1 \times 10^2, 3 \times 10^2, 5 \times 10^3$ copies/test A、B、C 依次为 CT、NG 和 UU 的全自动检测方法检测结果的原始数据。

图 5 CT、NG 和 UU 全自动检测方法重复性

Note: The abscissa is the cycles number, the ordinate is the fluorescence value. Curves 1, 2, and 3 showed that the input sample concentrations were $1 \times 10^2, 3 \times 10^2$ and 5×10^3 copies/test, respectively. A, B, C are the raw data of the detection results of the fully automated detection method of CT, NG and UU.

Fig. 5 Repeatability of the automated detection method for CT, NG, and UU

表 3 160 份临床样本的检测结果
Table 3 Detection results of 160 clinical samples

方法 Method	总数 Total	CT		NG		UU		双重感染	
		阳性 Positive	阳性率 (%) Rate	阳性 Positive	阳性率 (%) Rate	阳性 Positive	阳性率 (%) Rate	阳性 Positive	阳性率 (%) Rate
全自动 检测方法	160	25	15.6	17	10.6	57	35.6	17	10.6
对比实时 荧光方法	160	26	16.3	18	11.2	61	38.1	20	12.5

讨论

CT、NG 和 UU 是性传播感染中最常见的几种病原体,可导致泌尿生殖道相关疾病,有研究表明这三种病原体感染与艾滋病和宫颈癌密切相关^[6-7]。CT、NG

和 UU 感染的临床症状没有明显差异,经常出现共同感染,且往往表现为无症状感染,易延误病情或传播疾病^[8]。因此,临床上往往对这三种病原体同步进行检测。

表 4 全自动检测方法 with 对比实时荧光方法检测 160 例临床样本的对比结果。

Table 4 Comparison results of the automatic detection method and the compare real-time fluorescence method for the detection of 160 clinical samples.

病原体 Pathogens	全自动 检测方法 Automated detection method	对比实时荧光 PCR Compare real-time PCR		阳性符合率 (%)	阴性符合率 (%)	总符合率 (%)
		阳性 Positive	阴性 Negative	Positive concordance rate	Negative concordance rate	Total coincidence rate
		阳性 Positive	阴性 Negative			
CT	阳性	25	0	96.2	100	99.4
	阴性	1	134			
NG	阳性	17	0	94.4	100	99.4
	阴性	1	142			
UU	阳性	57	0	93.4	100	97.5
	阴性	4	99			

目前,临床上作为金标准的培养法灵敏度低,检测步骤繁琐;免疫学方法敏感性和特异性均较低^[9-10];相对的,实时荧光 PCR 具有高灵敏、高特异的优点,适用于多种临床样本类型,目前被美国食品和药物管理局 (U. S. Food and Drug Administration, FDA) 推荐作为 CT、NG 和 UU 的检测方法。但实时荧光 PCR 法成本高、需配备专业的分子实验室和操作人员,且操作流程长,从样本收集、核酸提取纯化、配置 PCR 反应试剂到上机检测和结果判读,至少需要 2~4 h^[11-12],不能满足医院急诊、社区医院及乡镇诊所等场景现场快速检测的需求^[14]。

目前已有针对 CT、NG 和 UU 的现场化快速检测方法,如基于抗原检测的免疫学方法,但其敏感性较低^[15];一种基于环介导等温扩增技术的检测方法,可在 1 小时内同时检测 CT 和 NG,但该方法需要手动进行核酸提取,不能完全实现现场化快速检测^[16]。另一种检测方法基于微流控芯片技术,已经获得 FDA 批准上市^[17],可检测拭子和尿液等多种样本类型,与基于实验室开展的实时荧光 PCR 相比,从样本投入到获得结果之前无需手动操作^[18-19],但只能同时检测 CT 和 NG 两种病原体。

在本研究中,我们建立了基于微流控芯片的一体化全自动核酸快速检测方法,可在 35 分钟内同时检测 CT、NG 和 UU。微流控芯片上集成磁珠法核酸提取纯化技术和金标准 PCR 扩增技术,可自动化完成核酸提取纯化、PCR 扩增和结果判读。微流控芯片上预置全部反应试剂,包括纯化试剂、磁珠、风干 PCR 试剂等。全自动检测系统具有超声、泵阀、磁吸等模块,可全自动化完成样本裂解、核酸吸附、杂质洗涤和目的核

酸洗脱等步骤,无需人工操作,实现了样本进、结果出的快速核酸检测。芯片为全封闭式设计,加样后检测过程在全封闭状态下完成,极大的避免污染和生物安全的风险。此外,该全自动核酸快速检测方法基于手持式核酸快检一体机,设备重量仅 1 kg,内置电池,便于携带,摆脱了核酸检测受环境制约的缺陷,这些均为现场快速检测的开展提供了更大的可行性。

本研究结果显示,该方法可同时检测 CT、NG 和 UU 且检出限可达到 1×10^2 copies/test,检测范围可达 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^7$ copies/test,特异性和重复性良好。本研究检测的 160 例临床样本中,全自动检测方法对 CT、NG 和 UU 的检出率分别为 15.6%、10.6% 和 35.6%;与多重实时荧光 PCR 检测结果比较,无明显差异 ($P > 0.05$);阳性符合率分别为 96.2%、94.4% 和 93.4%,阴性符合率均为 100%,总符合率分别为 99.4%、99.4% 和 97.5%。综上所述,本研究初步建立了一种可同时检测 CT、NG 和 UU 的一体化全自动核酸快速检测方法,兼具实时荧光 PCR 高特异性和高灵敏性的优点,以及准确、快速、简便等可用于现场快速检测的特点,为 CT、NG 和 UU 的早期快速检测提供了一种新方法。

【参考文献】

- [1] Rowley J, Hoorn SV, Korenromp E, et al. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: Global prevalence and incidence estimates, 2016[J]. Bull World Health Organ, 2019, 97(8):548-562.
- [2] Beeton ML, Payne MS, et al. The Role of *Ureaplasma* spp. in the development of nongonococcal urethritis and infertility among men[J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(4):1110-1128.
- [3] Moncada J, Shayeveich C, Philip SS, et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in rectal and oropharyngeal swabs and urine specimens from men who have sex with men with Abbott's m 2000 Real Time[J]. Sex Transm Dis, 2015, 42(11):650-651.
- [4] Yoshida T, Deguchi TS, Kubota Y, et al. Quantitative detection of *Ureaplasma parvum* (biovar 1) and *Ureaplasma urealyticum* (biovar 2) in urine specimens from men with and without urethritis by real-time polymerase chain reaction[J]. Sex Transm Dis, 2007, 34(6):416-419.
- [5] Francesco MAD, Negrini R, Pinsi G, et al. Detection of *Ureaplasma biovars* and polymerase chain reaction-based subtyping of *Ureaplasma parvum* in women with or without symptoms of genital infections[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009, 28(6):641-646.
- [6] 魏蓓宇, 周翔. 女性生殖道支原体和衣原体感染与 HPV 感染的相关性分析[J]. 中国实用乡村医生杂志, 2024, 31(1):42-46.
- [7] 张睿, 周艳丽, 窦亚玲, 等. 人乳头瘤病毒和解脲脲原体、沙眼衣原体、淋病奈瑟菌的感染现状分析[J]. 中国医学科学院学报, 2018, 40(6):817-821.

(下转 170 页)

- clinical trial [J]. Clin Oral Investig, 2022, 26(2): 2197-2205.
- [9] Cabalen MB, Molina GF, Bono A, et al. Nonrestorative caries treatment: A systematic review update [J]. Int Dent J, 2022, 72(6): 746-764.
- [10] Wang JX, Liu SS, Han SY, et al. High-throughput sequencing reveals soil bacterial community structure and their interactions with environmental factors of the grassland fairy ring [J]. Environ Microbiol Rep, 2022, 14(4): 479-493.
- [11] 孙雁斐, 卢洁, 杨加震, 等. 基于微生物组新颖指数构建龋病菌群诊断模型[J]. 华西口腔医学杂志, 2023, 41(2): 208-217.
- [12] Jang H, Patoine A, Wu TT, et al. Oral microflora and pregnancy: a systematic review and meta-analysis [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 16870.
- [13] Baker JL, Mark Welch JL, Kauffman KM, et al. The oral microbiome: diversity, biogeography and human health [J]. Nat Rev Microbiol, 2024, 22(2): 89-104.
- [14] Rolling T, Zhai B, Frame J, et al. Customization of a DADA2-based pipeline for fungal internal transcribed spacer 1 (ITS1) amplicon data sets [J]. JCI Insight, 2022, 7(1): e151663.
- [15] Rai SN, Qian C, Pan J, et al. Microbiome data analysis with applications to pre-clinical studies using QIIME2: Statistical considerations [J]. Genes Dis, 2021, 8(2): 215-223.
- [16] Ijoma GN, Nkuna R, Mutungwazi A, et al. Applying PICRUSt and 16S rRNA functional characterisation to predicting co-digestion strategies of various animal manures for biogas production [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 19913.
- [17] 龚静, 王荣. 绵阳地区 136 例 3~5 岁儿童口腔微生物菌群结构及其对患龋的影响[J]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2024, 18(2): 100-107.
- [18] Kruse AB, Schlueter N, Kortmann VK, et al. Long-term use of oral hygiene products containing stannous and fluoride ions: effect on viable salivary bacteria [J]. Antibiotics (Basel), 2021, 10(5): 481.
- [19] Yang Z, Cai T, Li Y, et al. Effects of topical fluoride application on oral microbiota in young children with severe dental caries [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2023, 13(1): 1104343.
- [20] Naka S, Wato K, Misaki T, et al. *Streptococcus mutans* induces IgA nephropathy-like glomerulonephritis in rats with severe dental caries [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 5784.
- [21] Lin Y, Chen J, Zhou X, et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation by strategies targeting the metabolism of exopolysaccharides [J]. Crit Rev Microbiol, 2021, 47(5): 667-677.
- [19] 林秀燕. 学龄前儿童龋活性及其唾液微生物相关性的研究[D]. 河北: 河北医科大学, 2023.
- [24] 杨子靓, 王悦, 贾博莎, 等. 口腔真菌感染病原菌分布特征及危险因素研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2024, 19(2): 226-229.
- [25] 吕晓慧, 王琨, 张凌琳. 白色念珠菌与龋病相关性的研究进展[J]. 中华口腔医学杂志, 2021, 56(5): 491-496.
- LV Xiaohui, WANG Kun, ZHANG Linglin. Research progress on the correlation between *Candida albicans* and dental caries [J]. Chin J Stomatol, 2021, 56(5): 491-496. (in Chinese)
- [26] Fakhruddin KS, Egusa H, Ngo HC, et al. Silver diamine fluoride (SDF) used in childhood caries management has potent antifungal activity against oral *Candida* species [J]. BMC Microbiol, 2020, 20(1): 95.
- 【收稿日期】 2024-09-26 【修回日期】 2024-12-10
-
- (上接 163 页)
- [8] 曲沛, 郭杰, 李韦杰, 等. 4387 例性病门诊患者沙眼衣原体、淋球菌、解脲脲原体感染情况分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2019, 26(12): 1994-1996, 2002.
- [9] 马娜, 张小斌, 刘春桃, 等. 生殖道沙眼衣原体和淋球菌感染流行状况与防治[J]. 皮肤病与性病, 2021, 43(5): 623-625.
- [10] 王千秋, 刘全忠, 徐金华, 等. 梅毒、淋病和生殖道沙眼衣原体感染诊疗指南(2020年)[J]. 中华皮肤科杂志, 2020, 53(3): 168-179.
- [11] Wilson JD, Wallace HE, Loftus-Keeling M, et al. Swab-yourself trial with economic monitoring and testing for infections collectively (SYSTEMATIC): Part 2. A diagnostic accuracy and cost-effectiveness study comparing rectal, pharyngeal, and urogenital samples analyzed individually, versus as a pooled specimen, for the diagnosis of gonorrhoea and chlamydia. [J]. Clin Infect Dis, 2021, 73(9): 3183-3193.
- [12] Ma C, Du J, He W, et al. Rapid and accurate diagnosis of *Chlamydia trachomatis* in the urogenital tract by a dual-gene multiplex qPCR method [J]. J Med Microbiol, 2019, 68(12): 1732-1739.
- [13] Eboigbodin, Kevin E. Simultaneous detection of chlamydia trachomatis and neisseria gonorrhoeae using Real-Time Multiplex qPCR assay [J]. Methods Mol Biol. 2019, 2042(4): 27-32.
- [14] Del Romero J, Moreno Guillen S, Rodriguez-Artalejo FJ, et al. Sexually transmitted infections in Spain: Current status [J]. Rev Esp Quimioter. 2023, 36(5): 444-465.
- [15] Kelly H, Coltart CEM, Pant Pai N, et al. Systematic reviews of point-of-care tests for the diagnosis of urogenital *Chlamydia trachomatis* infections [J]. Sex Transm Infect, 2017, 93(4): 22-30.
- [16] 王雪亮, 刘芬, 蒋玲丽, 等. 环介导等温扩增技术快速检测沙眼衣原体 [J]. 检验医学, 2017, 32(9): 809-812.
- [17] Adamson PC, Pandori MW, Doernberg SB, et al. Analytical evaluation of the Abbott RealTime CT/NG assay for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in rectal and pharyngeal swabs [J]. J Mol Diagn, 2020, 22(6): 811-816.
- [18] Land KJ, Boeras DI, Chen XS, et al. REASSURED diagnostics to inform disease control strategies, strengthen health systems and improve patient outcomes [J]. Nat Microbiol, 2019, 4(1): 46-54.
- [19] Pol BVD, Taylor SN, Mena L, et al. Evaluation of the performance of a point-of-care test for chlamydia and gonorrhoea [J]. JAMA Netw Open, 2020, 3(5): 204819-204819.
- 【收稿日期】 2024-09-30 【修回日期】 2024-12-06