

11份解脲支原体样本的分群、分型研究

刘红芬¹, 张红琴¹, 屈三甫^{2,3*}

¹武汉市皮肤病防治医院, 湖北 武汉

²武汉大学中国典型培养物保藏中心, 湖北 武汉

³武汉大学病毒学国家重点实验室, 湖北 武汉

Email: *Spqu@whu.edu.cn

收稿日期: 2021年7月23日; 录用日期: 2021年8月15日; 发布日期: 2021年8月26日

摘要

本研究对从医院临床分离并寄存于中国典型培养物保藏中心(CCTCC)的11份解脲支原体样本进行分群鉴定, 结果表明其中9份样品为生物二群, 2份样品为生物一群, 对这两份生物一群的样本进行进一步血清型分析, 结果表明一份为血清型1型样品, 一份为血清型14样品, 本鉴定结果为分离的解脲支原体样品的进一步研究和应用奠定了基础。

关键词

解脲支原体, 生物群, 血清型

Study on Biovar and Serotype of 11 Samples of *Ureaplasma urealyticum*

Hongfen Liu¹, Hongqin Zhang¹, Sanfu Qu^{2,3*}

¹Wuhan Institute of Dermatology and Venereology, Wuhan Hubei

²China Center for Type Culture Collection, Wuhan University, Wuhan Hubei

³State Key Laboratory of Virology, Wuhan University, Wuhan Hubei

Email: *Spqu@whu.edu.cn

Received: Jul. 23rd, 2021; accepted: Aug. 15th, 2021; published: Aug. 26th, 2021

Abstract

In this study, 11 samples of *Ureaplasma urealyticum* isolated clinically from the hospital and deposited in the China Center for Type Culture Collection (CCTCC) were grouped and identified. The

*通讯作者。

文章引用: 刘红芬, 张红琴, 屈三甫. 11份解脲支原体样本的分群、分型研究[J]. 微生物前沿, 2021, 10(3): 131-136.

DOI: 10.12677/amb.2021.103016

results showed that there were 9 samples of the Urealyticum biovar and 2 samples of the Parvum biovar. Further serotype analysis of samples from the biological group showed that one sample was serotype 1 and the other sample was serotype 14. This identification result laid the foundation for the further research and application of isolated *Ureaplasma urealyticum* samples.

Keywords

Ureaplasma urealyticum, Biovar, Serotype

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

与人类疾病相关的脲支原体属可划分为 2 个种, 14 个基因型[1] [2], 在人体分离到的主要是细小脲支原体和解脲脲支原体。解脲脲支原体(*Ureaplasma urealyticum*, UU)是属于柔膜体纲支原体目一种的原核微生物, 缺乏细胞壁, 体积处在细菌和病毒之间[3]。解脲脲支原体在形态上呈高度多形性, 在含低浓度琼脂的固体培养基上培养可出现典型的“荷包蛋样”菌落。其细胞膜上的糖脂与膜蛋白结合, 构成解脲脲支原体的主要抗原成分, 该抗原在人体可引起体液免疫。目前, 解脲脲支原体是可在无生命培养基中生长、繁殖的最小微生物, 它既可以独立存在, 也可以寄生。目前有研究认为解脲脲支原体与不孕有关, 解脲脲支原体引起不孕的途径有多种, 如影响排卵、精子质量、受精卵着床等。

解脲脲支原体是女性宫颈寄居最常见的微生物之一, 具有一定的致病性。按照不同的生物表型和基因特征可以将解脲脲支原体划分为生物一群和生物二群两种生物亚群[4], 生物一群即 Parvo 生物群, 包括 1、3、6、14 四种血清型, 生物二群即 T960 生物群, 包括 2、4、5、7~13 十种血清型[5]。有研究显示, 解脲脲支原体在无临床症状的女性中的检出以生物一群为主[6], 而在患有阴道炎的女性中, 生物二群的检出率为 43%, 显著高于其在无阴道炎的女性中的检出率, 后者为 5% [7]。但也有研究认为生物一群中血清型 1、3 型的致病性强于其他血清型。

2. 材料与方

2.1. 样品材料

本实验中所用的解脲脲支原体样本均来源于中国典型培养物保藏中心。

2.2. 实验器材和设备

PCR 仪, 德国 Biometra 公司; 小型旋转混合仪, 上海新芝; 生物安全柜, ESCO 公司; 倒置荧光显微镜, 宁波舜宇仪器。

2.3. UU 基因组提取

取 200 μ L 解脲脲支原体样本, 100 $^{\circ}$ C 加热 10 min, 冷却后 12000 rpm 离心 3 min, 收集上清。

2.4. PCR 引物

解脲脲支原体 Mba 抗原基因含 1200 多个碱基, N 端 1/3 是保守区, C 端 2/3 是可变区。N 端在同一生

物群各血清型和同一血清型各变异株中长度一致，而 C 端的大小可变。根据此特征设计引物，根据片段大小鉴定样品的生物群及血清型。生物分群特异性引物 UMS-125F、UMS-226R，该 PCR 产物:生物一群 404 bp，生物二群 448 bp；生物一群血清型特异性引物如下：血清型 1 引物：UMS1F、UMS1/6R，扩增产物 399 bp；血清型 3 引物：UMS3F、UMS3/14R，扩增产物 397 bp；血清型 6 引物：UMS6A、UMS1/6R，扩增产物 369 bp；血清型 14 引物：UMS14F、UMS3/14R，扩增产物 400 bp。引物序列信息如表 1 所示：

Table 1. PCR primer sequences used in this study

表 1. 本研究中所用 PCR 引物序列

引物	序列(5'→3')	扩增片段
UMS-125F	GTATTTGCAATCTTTATATGTTTTTCG	404 bp/448 bp
UMS-226R	CAGCTGATGTAAGTGCAGCATTAAATTC	
UMS1F	TAAGTGTAGAAATTATGTAAGATTGC	399 bp
UMS1/6R	CCAAATGACCTTTTGTAAGTAGAT	
UMS3F	ACTGTAGAAATTATGTAAGATTACC	397 bp
UMS3/14R	CTAAATGACCTTTTCAAGTGTAC	
UMS6A	CTTAGTGTTCATATTTTTACTAG	369 bp
UMS1/6R	CCAAATGACCTTTTGTAAGTAGAT	
UMS14	ATTACTGTAGAAATTATGTAAGATTAA	400 bp
UMS3/14R	CTAAATGACCTTTTCAAGTGTAC	

2.5. PCR 反应条件

将每份样品的 DNA 先经 UMS-125F、UMS-226R 这对引物扩增，若样品为生物一群，则再分别用 UMS1F、UMS1/6R；UMS3F、UMS3/14R；UMS6A、UMS1/6R；UMS14、UMS3/14R 这四对引物扩增，PCR 程序为 95℃ 5 min→55℃ 30 s→72℃ 1 min，共计 32 轮循环扩增。50 μL 的 PCR 工作体系：Taq 聚合酶 25 μL、5'→3'引物 2 μL、3'→5'引物 2 μL、样品 DNA 2 μL。

2.6. 琼脂糖凝胶电泳

将 2 g 琼脂糖粉末和 100 mL 的 1×TAE 缓冲液置于锥形瓶，将锥形瓶置于微波炉内加热 3~5 min，随后取出冷却 2 min，用枪头吸取 2.5 μL Gel-Red 染料加至琼脂糖溶液中，轻微摇晃混匀。将梳子插进制胶板，将混匀的琼脂糖溶液倒入，室温静置 30 min，待溶液冷却凝固。充分凝固后将梳子轻轻垂直拔出，将制胶板置入电泳槽中，在电泳槽中加入 1×TAE 缓冲液直至没过凝胶表面 2 cm。取 5 μL PCR 产物，加 1 μL 的 6×loading 试剂，用移液枪轻轻吹打混匀，小心加入点样孔。打开电源开关，调节电压，可看到溴酚蓝条带移动位置，待其移动到适当位置时关闭电源，将制胶板从电泳槽取出。打开紫外灯和凝胶成像系统，将制胶板放置于台面，轻轻移去制胶板，观察并记录跑胶情况。

3. 结果

3.1. 生物群引物鉴定结果

如图 1 所示，将样品 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 的 DNA 用生物分群特异性引物 UMS-125F、UMS-226R 进行 PCR 扩增，所得 PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳，结果表明，样品 1、11 为生物一群，

样品 2~10 为生物二群。

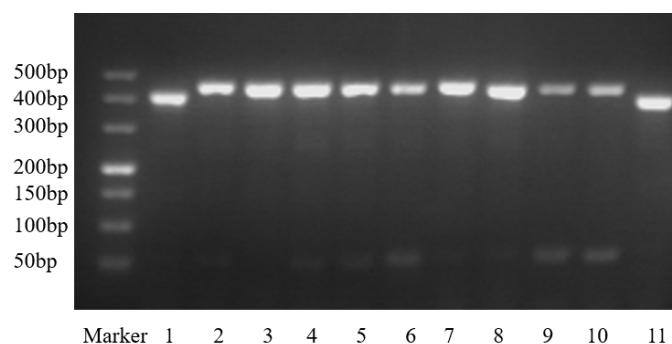
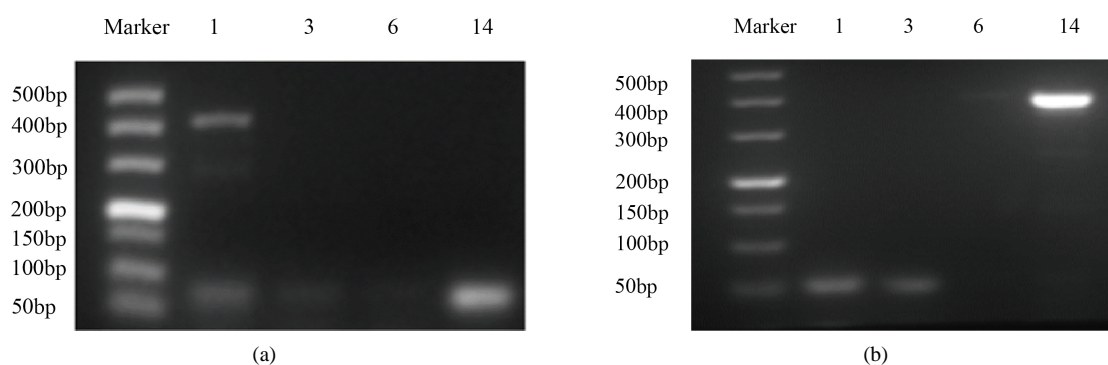


Figure 1. Biota identification of UU samples

图 1. UU 样品的生物群鉴定

3.2. 生物一群引物鉴定结果

如图 2 所示, 将样品 1、11 的 DNA 分别经生物一群的 1、3、6、14 血清型特异性引物 PCR 扩增, 所得 PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 结果表明, 样品 1 为血清型 1 型, 样品 11 为血清型 14 型。



(a) 将样品 1 的 DNA 分别经生物一群的 1、3、6、14 血清型特异性引物 PCR 扩增, 所得 PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳经 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测; (b) 将样品 1 的 DNA 分别经生物一群的 1、3、6、14 血清型特异性引物 PCR 扩增, 所得 PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳经 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测

Figure 2. Serotype identification of UU samples 1 and 14

图 2. UU 样品 1、14 的血清型鉴定

4. 讨论

解脲支原体是人类泌尿生殖道中一类常见的共生微生物, 在无临床症状表现的性成熟女性生殖道中也能检出。1954 年 Shepard 首次从非淋菌性尿道炎患者的尿道中分离得到解脲支原体[8]。近年来, 解脲支原体的检出率逐渐上升, 作为一种条件致病菌, 当机体的免疫能力和内环境改变时, 定植于黏膜表面促进释放出蛋白水解酶、过氧化物、各种磷脂酶等多种毒性代谢产物, 可以导致机体损伤和炎症反应的发生[9]。如其分解尿素产生的过氧化氢, 能够提高生殖道的 pH 值, 导致女性生殖道内的正常的弱酸性环境被破坏, 增加了宿主被其他病原微生物感染的风险。

有大量文献报道, 解脲支原体是非淋病性泌尿生殖系统炎症的主要病原体, 与女性的多种疾病有关, 解脲支原体感染能够引起输卵管积水、粘连, 致使输卵管阻塞进而导致女性输卵管性不孕, 解脲支原体还能引起非淋病性尿道炎、非特异性尿道炎、绒毛膜羊膜炎、生殖道感染、胎膜早破、早产儿呼吸窘迫

综合症以及其他疾病等[10]。虽然大多数解脲支原体感染是无症状的,但是这些感染会增加流产、早产和死产等不良妊娠结果的风险。

近年来对男性不育的关注增高,有研究发现解脲支原体的感染会增加男性不育的风险,解脲支原体致使男性不育的途径有多种,例如其可干扰精子的发生、影响精子的活力等。有研究者发现解脲支原体在不育男性精液中的检出率位 48%,明显高于其在可生育男性精液中的检出率,后者为 25%,这表明解脲支原体的感染可能威胁了男性的生殖健康。Wang 等研究者发现,解脲支原体的感染与精液 pH 值的降低、精液密度降低密切相关[11]; Moretti 等研究者发现解脲支原体的感染可致使不育男性的精子质量降低[12]。

解脲支原体包括 2 个生物亚群,对解脲支原体进行分群分型的依据主要是其表面抗原即 MBA (多带抗原) [13]。MBA 也是机体识别解脲支原体不同生物群及血清型的主要外膜抗原,在不同生物群和血清型种 MBA 的长度不同,因此不同生物群、血清型的解脲支原体表现的致病力有所差别。

影响解脲支原体致病性的因素有许多种。有研究结果显示它的致病性与生物亚群密切相关,如血清型 1、3、4、8 可引起女性生殖道炎症,血清型 4 与早产、流产、胎膜早破等关系密切,血清型 3、4 是引起不孕症的原因之一;生物二群的解脲支原体与男性不育的关系更为密切,有研究显示,被生物二群的 UU 感染后,精子的总活力明显降低,这可能与解脲支原体可诱导机体产生精子抗体,导致精子凝集,阻抑了精子的运动,且在电镜下观察,解脲支原体分别附着在精子的头尾部位,致使精子头部出现折角及尾部卷尾,精子膜破损,增加畸形精子的占比[14]。生物二群的解脲支原体还能降低精子的浓度,这可能与谷草转氨酶有关[15]。也有研究表明,解脲支原体作为一种条件致病菌,当其浓度达到一定值时会导致人体免疫系统的失衡。有研究者在小鼠中接种不同浓度的血清型 3 型的解脲支原体,发现 UU3 在宫颈管的阳性检出率随接种浓度的增高而增高;除此之外,还有多种因素会影响解脲支原体的致病性,如宿主的性伴数、菌群失调、宿主免疫力等,如解脲支原体在尚无性生活史的女性生殖道和宫颈中的检出率明显低于其在性生活频率高的女性生殖道和宫颈中的检出率,且性乱行为可增加解脲支原体的传播,并使其感染复杂化。

检测解脲支原体的方法有多种,实验室最常用的方法是分离培养法,将其在液体培养基中扩增,再接种于琼脂糖固体培养基上培养,用低倍镜显微镜观察,可观察到有微小的“油煎蛋”样菌落,但是这种方法容易出现假阴性,且不能分群、分型。随着分子生物学的发展,PCR 检测逐渐成为新的检测主流方法,且根据编码 MBA 的核酸序列设计不同血清型引物对其进行分群、分型检测,具有特异性高、耗时短的优点。血清学检测也是一种实验室常用的检测解脲支原体的方法,常用的血清型检测方法主要为间接免疫荧光染色检查法、酶联免疫吸附试验,具有很高的灵敏度和特异性。

目前针对解脲支原体感染的治疗方案仍以抗生素为主,临床上较常应用的药物主要有四环素类、大环内酯类及喹诺酮类,其中以四环素类药物为首选[16]。本实验中对分离株进行分群分型,可对后续的药敏研究奠定基础。

参考文献

- [1] Glass, J.I., Lefkowitz, E.J., Glass, J.S., Heiner, C.R., Chen, E.Y. and Cassell, G.H. (2000) The Complete Sequence of the Mucosal Pathogen *Ureaplasma urealyticum*. *Nature*, **407**, 757-762. <https://doi.org/10.1038/35037619>
- [2] Lin, J.S.L. and Kass, E.H. (1980) Fourteen Serotypes of *Ureaplasma urealyticum* (T-Mycoplasmas) Demonstrated by the Complement-Dependent Mycoplasmacidal Test. *Infection*, **8**, 152-155. <https://doi.org/10.1007/BF01639122>
- [3] 张岱. 支原体与妇产科感染性疾病[J]. 国际妇产科学杂志, 2011, 38(6): 494-499.
- [4] Razin, S. and Yogev, D. (1986) Genetic Relatedness among *Ureaplasma urealyticum* Serotypes (Serovars). *Pediatric Infectious Disease Journal*, **5**, S300-S304.

- [5] Kong, F.R., James, G., Ma, Z.F., *et al.* (1999) Phylogenetic Analysis of *Ureaplasma urealyticum*—Support for the Establishment of a New Species, *Ureaplasma parvum*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **49**, Article No. 1879. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-4-1879>
- [6] Ren, Y. and Zhu, X. (2003) Investigation on Biovars and Genotypes of *Ureaplasma urealyticum* in the Cervix in a Chinese Gynecologic Check-up Population and Sex Workers. *Acta Dermato-Venereologica*, **83**, 175-178. <https://doi.org/10.1080/00015550310007157>
- [7] Povlsen, K., Thorsen, P. and Lind, I. (2001) Relationship of *Ureaplasma urealyticum* Biovars to the Presence or Absence of Bacterial Vaginosis in Pregnant Women and to the Time of Delivery. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **20**, 65-67. <https://doi.org/10.1007/PL00011237>
- [8] Shepard, M.C. (1954) The Recovery of Pleuropneumonia-Like Organisms from Negro Men with and without Nongonococcal Urethritis. *American Journal of Syphilis Gonorrhea & Venereal Diseases*, **38**, 113-124.
- [9] 游燕, 王梦花, 戴琼燕. 生殖道支原体属及衣原体属感染与不孕的相关性[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(22): 5620-5621+5626.
- [10] Kasper, D.C., Mechtler, T.P., Reischer, G.H., Witt, A., Langgartner, M., Pollak, A., *et al.* (2010) The Bacterial Load of *Ureaplasma parvum* in Amniotic Fluid Is Correlated with an Increased Intrauterine Inflammatory Response. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **67**, 117-121. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.12.023>
- [11] Wang, Y., Liang, C.L., Wu, J.Q., Xu, C., Qin, S.-X. and Gao, E.-S. (2010) Do *Ureaplasma urealyticum* Infections in the Genital Tract Affect Semen Quality? *Asian Journal of Andrology*, **8**, 562-568. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2006.00190.x>
- [12] Moretti, E., Capitani, S., Figura, N., Pammolli, A., Federico, M.G., Giannerini, V. and Collodel, G. (2009) The Presence of Bacteria Species in Semen and Sperm Quality. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **26**, Article No. 47. <https://doi.org/10.1007/s10815-008-9283-5>
- [13] Shimizu, T., Kida, Y. and Kuwano, K. (2008) *Ureaplasma parvum* Lipoproteins, Including MB Antigen, Activate NF- κ B through TLR1, TLR2 and TLR6. *Microbiology*, **154**, 1318-1325. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/016212-0>
- [14] 陆珍凤, 周晓军, 石群立, 姜少军, 印洪林. 电镜显示解脲支原体感染后在精子的部位[J]. 电子显微学报, 2005, 24(4): 437.
- [15] Mortimer, D., Johnson, A.V. and Long-Simpson, L.K. (1988) Glutamic-Oxaloacetic Transaminase Isozymes in Human Seminal Plasma and Sperm Extracts. *International Journal of Fertility*, **33**, 291-295.
- [16] 肖珊, 吴献青. 解脲支原体感染的研究进展[J]. 中国医药指南, 2012, 10(20): 75-78.