

3 种方法检测围产期孕妇阴道分泌物 B 群链球菌的效果分析

陶娅琳 毛德超 王宁 王星花 马丽娟 雷志辉 代娇

作者单位: 655000 云南曲靖, 曲靖市第二人民医院医学检验科(陶娅琳、毛德超、王宁、王星花、马丽娟、雷志辉)

655000 云南曲靖, 曲靖市医学高等专科学校(代娇)

通信作者: 陶娅琳, Email: taozi3166520@126.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2020.02.012

【摘要】 目的 分析一般细菌培养法、B 群链球菌(GBS)显色培养法和实时荧光聚合酶链反应(PCR)在围产期孕妇 GBS 检测中的应用效果。**方法** 收集 2019 年 1—8 月自愿就诊于曲靖市第二人民医院妇产科的围产期孕妇送检的 1 088 份阴道分泌物标本,同时采用一般细菌培养法、GBS 显色培养法和实时荧光 PCR 检测 GBS,比较 3 种方法的阳性率和检测时长;以一般细菌培养法为参考标准,计算其余两种方法的敏感度、特异度和准确度。**结果** 1 088 份围产期孕妇阴道分泌物标本中,一般细菌培养法检出阳性 55 份,阳性率为 5.06%;GBS 显色法检出阳性 62 份,阳性率为 5.70%;实时荧光 PCR 检出阳性 78 份,阳性率为 7.17%。实时荧光 PCR 阳性率明显高于一般细菌培养法[7.17% (78/1 088) 比 5.06% (55/1 088)],差异有统计学意义($P < 0.05$),其余方法比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。以一般细菌培养法为参考标准,GBS 显色培养法的敏感度、特异度、准确度分别为 100%、99.3%、99.4%,实时荧光 PCR 分别为 96.4%、97.6%、97.5%,差异无统计学意义($P > 0.05$)。一般细菌培养法和 GBS 显色培养法所需时长为 24~36 h,实时荧光 PCR 耗时 4~6 h。**结论** 实时荧光 PCR 筛查 GBS 阳性率最高且耗时短,适合于为临床提供准确、快速的诊断依据,GBS 显色培养法适合于基层医院进行 GBS 的常规筛查和防治。

【关键词】 围产期孕妇; B 群链球菌; 一般细菌培养法; B 群链球菌显色培养法; 实时荧光聚合酶链反应; 应用效果

Effect analysis of three methods for detection of group B streptococcus in vaginal secretion of perinatal pregnant women

Tao Yalin, Mao Dechao, Wang Ning, Wang Xinghua, Ma Lijuan, Lei Zhihui, Dai Jiao. Department of Medical Laboratory, Qujing Second People's Hospital, Qujing 655000, Yunnan, China (Tao YL, Mao DC, Wang N, Wang XH, Ma LJ, Lei ZH); Qujing Medical College, Qujing 655000, Yunnan, China (Dai J)

Corresponding author: Tao Yalin, Email: taozi3166520@126.com

【Abstract】 Objective To analyze the application effects of general bacterial culture method, group B streptococcus (GBS) chromogenic culture method and real-time fluorescent polymerase chain reaction (PCR) on detection of GBS in vaginal secretion of perinatal pregnant women. **Methods** The 1 088 vaginal secretion specimens sent by perinatal pregnant women who voluntarily consulted in the obstetrics and gynecology department of Qujing Second People's Hospital from January to August, 2019 for the purpose of methodology evaluation were collected. The general bacterial culture method, GBS chromogenic culture method and real-time fluorescent PCR were used to detect GBS, and the positive rates and detection time of three methods were compared. Taking the general bacterial culture method as reference standard, the sensitivity, specificity and accuracy of the other two methods were calculated. **Results** Among the 1 088 specimens of vaginal secretion of perinatal pregnant women, 55 cases were positive by general bacterial culture method, the positive rate was 5.06%, 62 cases were positive by GBS colorimetric method, the positive rate was 5.70%, and 78 cases were positive by real-time fluorescent PCR, the positive rate was 7.17%. The positive rate by real-time fluorescent PCR was significantly higher than that by general bacterial culture method [7.17% (78/1 088) vs. 5.06% (55/1 088)], with significant difference ($P < 0.05$), and the rest had no significant difference ($P > 0.05$); Using the general bacterial culture method as a reference standard, the

sensitivity, specificity, and accuracy of the GBS chromogenic culture method were 100%, 99.3%, and 99.4%, and those of the real-time fluorescent PCR were 96.4%, 97.6%, and 97.5%, respectively, without significant difference ($P > 0.05$). The time required by general bacterial culture method and GBS chromogenic culture method was 24–36 h, while the time required by real-time fluorescent PCR was 4–6 h. **Conclusions** The real-time fluorescent PCR has the highest positive rate and takes a short time to screen GBS, which is suitable for providing accurate and rapid diagnostic evidence for clinical use. The GBS colorimetric culture method is suitable for the routine screening and prevention of GBS in primary hospitals.

【Key words】 Perinatal pregnant women; Group B streptococcus; General bacterial culture method; Group B streptococcus chromogenic method; Real-time fluorescent polymerase chain reaction; Application effect

B 群链球菌 (group B streptococcus, GBS) 俗称无乳链球菌, 属于兼性厌氧革兰阳性 (G^+) 球菌, 是 β 溶血性链球菌属最重要的条件致病菌之一, 正常情况下广泛定植于阴道和直肠部位。从 1938 年 Fry 首次报道 GBS 可引起人类感染导致死亡, 该菌就被证实为人类的致病菌^[1]。随后的研究显示, GBS 属于条件致病菌, 当机体抵抗力降低或微生态平衡遭到破坏时可发生机会性感染^[2-3], 如在健康妇女阴道内存在多种正常微生物菌落, GBS 不作为致病菌处理。但对于妊娠中晚期孕妇, 由于内分泌的变化, 雌激素和孕激素水平升高, 使得局部细胞免疫功能下降, 同时阴道内糖原增加, 为 GBS 提供了良好的生长环境, 可引起围产期孕产妇感染导致胎膜早破、绒毛膜羊膜炎、胎儿窘迫、早产、产后出血、产褥感染等, 导致不良妊娠结局^[4-5]。并且, GBS 具有一定的母婴垂直感染风险, 若新生儿垂直感染该菌可增加其围产期死亡风险^[6]。因此, 准确而快速地为临床诊断提供围产期孕产妇的 GBS 感染情况并采取预防措施极其重要, 对于减少 GBS 感染引起的不良妊娠结局意义重大^[7]。本研究采用不同方法对围产期孕产妇 GBS 带菌率进行筛查, 比较不同方法的优缺点, 旨在为曲靖地区提供较合适的检测方法。

1 资料与方法

1.1 标本来源 收集 2019 年 1—8 月自愿就诊于本院妇产科的围产期孕妇 (孕 35~37 周) 送检的 1 088 份标本。

1.2 仪器与试剂 梅里埃 VITEK2-Compact 型自动细菌鉴定仪, 美国 ABI7300 聚合酶链反应 (PCR) 扩增仪, 二氧化碳 (CO_2) 培养箱, 梅里埃配套 G^+ 球菌鉴定卡 (GP), 5% 绵羊血琼脂平板 (郑州安图生物工程股份有限公司提供), GBS 显色培养基, GBS 核酸提取试剂盒 (天津达安集团股份有限公司提供)。

1.3 质量控制 (质控) 菌株 金黄色葡萄球菌 (ATCC25923)、大肠埃希菌 (ATCC25922)、铅黄肠球

菌 (ATCC700327)、无乳链球菌 (ATCC12386)。

1.4 检测方法

1.4.1 标本收集 本研究送检的标本均由产科接诊医生采集, 以无菌棉签轻轻旋转采集就诊孕妇阴道下 1/3 处分泌物, 同时采集 2 份, 立即送检。本院检验科接收标本后 30 min 内进行细菌培养接种, 另一份标本加入生理盐水于 $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存, 以备 PCR 检测。

1.4.2 GBS 检测

1.4.2.1 一般细菌培养法 将标本均匀涂抹于血琼脂平板, 采用分期划线法接种标本后, 平板于 $35\sim 37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5%~10% CO_2 培养箱中培养过夜, 次日观察筛选 β 溶血、革兰氏染色为阳性的链球菌进行分纯培养, 同时挑取单个菌落进行 GBS 鉴定试验 (CAMP 试验) 和杆菌肽试验, 孵育 18~24 h 后选取 CAMP 试验阳性 (出现箭头状 β 溶血现象)、杆菌肽阴性的分纯菌株, 配制 0.5 麦氏单位菌悬液, 插入鉴定卡置入 VITEK2-Compact 自动细菌鉴定仪进一步鉴定, 以金黄色葡萄球菌 (ATCC25923)、大肠埃希菌 (ATCC25922)、铅黄肠球菌 (ATCC700327)、无乳链球菌 (ATCC12386) 作为标准菌株同时进行实验, 次日记录结果。

1.4.2.2 GBS 显色培养法 接种方法同一般细菌培养法, 平板于 $35\sim 37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5%~10% CO_2 培养箱中培养 8~24 h, 观察培养平板上的菌落显色情况, 挑取红色菌落分纯, 次日进行上机鉴定 (同一般细菌培养法), 记录结果。

1.4.2.3 实时荧光 PCR 对试剂盒阳性质控品 (浓度为 1×10^6 拷贝 /mL) 进行倍比稀释, 制备浓度为 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 拷贝 /mL 的 4 个标准品, 按照试剂盒说明书进行 DNA 提取、扩增及结果判读, 将标准菌株金黄色葡萄球菌 (ATCC25923)、大肠埃希菌 (ATCC25922)、无乳链球菌 (ATCC12386) 阴阳性质控与标本同时提取, 试验结束后记录结果。

1.5 伦理学 本研究符合医学伦理学标准,经本院伦理批准(审批号:20191020),所有对患者进行的检测均获得过患者或家属的知情同意。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行分析,计数资料以例或百分比表示,采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 种方法筛查 GBS 感染的结果比较 1 088 份围产期孕妇阴道分泌物标本中,一般细菌培养法检出 GBS 阳性 55 份(阳性率 5.06%), GBS 显色培养法检出 GBS 阳性 62 份(阳性率 5.70%),实时荧光 PCR 检出 GBS 阳性 78 份(阳性率为 7.17%)。实时荧光 PCR 阳性率明显高于一般细菌培养法,差异有统计学意义($\chi^2 = 4.24, P = 0.036$),其余方法比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。见表 1。

表 1 3 种方法筛查围产期孕妇 GBS 感染阳性率比较

检测方法	标本数 (份)	阳性 (份)	阴性 (份)	阳性率 (%)
一般细菌培养法	1 088	55	1 033	5.06
GBS 显色培养法	1 088	62	1 026	5.70
实时荧光 PCR	1 088	78	1 010	7.17 ^a

注: GBS 为 B 群链球菌, PCR 为聚合酶链反应;与一般细菌培养法比较,^a $P < 0.05$

2.2 3 种检测方法评价 以一般细菌培养法作为参考标准^[8],分别计算其余两种方法的敏感度、特异度和准确度, GBS 显色培养法分别为 100.0%、99.3%、99.4%,实时荧光 PCR 分别为 96.4%、97.6%、97.5%,两种方法比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 GBS 显色法和实时荧光 PCR 评价指标

检测方法	标本数 (份)	一般细菌培养法		敏感度 (%)	特异度 (%)	准确度 (%)
		阳性 (份)	阴性 (份)			
GBS 显色培养法				100.0	99.4	99.4
阳性	62	55	7			
阴性	1 026	0	1 026			
合计	1 088	55	1 033			
实时荧光 PCR				96.4	97.6	97.5
阳性	78	53	25			
阴性	1 010	2	1 008			
合计	1 088	55	1 033			

注: GBS 为 B 群链球菌, PCR 为聚合酶链反应

2.3 3 种方法检测时长比较 一般细菌培养法和 GBS 显色培养法所需时长为 24 ~ 36 h,耗时较长;实时荧光 PCR 检测法需要 4 ~ 6 h,耗时较短。

3 讨论

目前, GBS 是国际公认的导致严重围产期感染的重要致病菌,据报道, GBS 在西方国家的围产期感染中居首位^[9-10],感染率在 5% ~ 35% 不等^[11]。孕产妇 GBS 感染可诱发产褥感染、宫内感染、泌尿系统感染等多种疾病,影响产妇产后恢复,同时约 40% ~ 70% GBS 感染的产妇在分娩过程中会通过垂直传播感染新生儿,引起新生儿菌血症、新生儿肺炎、新生儿脑膜炎等严重感染。近年来, GBS 感染引起广泛重视,随着对疾病研究的不断深入,发现母体检测 GBS 为阳性者,新生儿发生感染的机会较低,仅为 1% ~ 3%,一旦发生感染,病死率约为 5%^[12]。西方国家对 GBS 非常重视,美国疾病预防控制中心在 2010 年已修订了对于围产期 GBS 的筛查、防治指南^[13],有效减少了围产期 GBS 感染的发生以及产生的危害。

我国对 GBS 感染的研究起步较晚^[14],有部分学者研究显示,北京地区孕妇的 GBS 带菌率为 17.6%^[15],桂林地区孕妇检出率为 7.5%^[16],长沙地区孕妇感染率为 11.25%^[17],上海地区为 3.7%^[18],南京地区为 4.2%^[19]等,本研究检测出的 GBS 感染率为 5.06%(一般细菌培养法),提示 GBS 感染存在地区差异,可能还受人群、年龄、教育程度、检测技术等因素的影响。因此,还需加强对围产期孕产妇 GBS 的筛查,从而尽早给予干预治疗,以免造成不良的妊娠结局。目前,我国约 90% 的围产期孕妇在产检时已接受了 GBS 感染的筛查,但仍然有部分农村地区的孕产妇因知识不足、意识性不强、经济条件落后等原因未接受 GBS 的常规筛查。为进一步提高人口出生质量,应该将 GBS 的筛查技术全覆盖至基层医疗单位。

对于 GBS 的检测,不同地区、不同医院采用的检测技术不同。本研究主要采用标准方法即一般细菌培养法,但其在开展的 3 种方法中检出阳性率最低, GBS 培养对营养要求高,菌株在血平板上生长易受多种污染菌的干扰和抑制。采用 GBS 显色培养法阳性率较一般细菌培养法有提高,显色培养基选择为鉴别培养基,可使溶血性的 GBS 菌株产生类胡萝卜色素(此法不能检出不具有溶血性的 GBS 菌株),在培养基上出现橘红色、砖红色或紫红色的颜色变化。GBS 显色培养法与一般细菌培养法相比,敏感度、特异度和准确度分别为 100.0%、99.4%、99.4%,该方法操作简单,仅需根据培养基颜色变化

判读结果,成本较低,适合作为孕妇 GBS 阳性率筛查和辅助诊疗的常规方法进行推广。实时荧光 PCR 检测技术是将 DNA 样本在体外扩增获得较多的特定 DNA 片段,利用荧光标记探针检测样本中 GBS 特定基因,其优点在于可检测到少数不溶血菌株和死亡的菌株,检出阳性率明显高于一般细菌培养法,敏感度、特异度和准确度分别为 96.4%、97.6%、97.5%,与文献报道^[20-21]基本一致,且仅耗时 4~6 h,大大缩短了检测时限,但该方法对人员操作技术要求较高,试剂和仪器成本昂贵,且检出的阳性菌株不能直接用于药敏试验,对于有治疗需求的患者可能导致治疗时间延长。因此,该方法更适用于为临床提供准确、快速的诊断依据,对于经济不发达地区可能增加患者的经济负担。

综上所述,一般细菌培养法和实时荧光 PCR 各有优缺点,本研究显示,PCR 检测法的阳性率高于另外两种方法,符合从传统微生物学技术过渡至分子生物学的发展趋势,但该技术尚处于发展初期阶段,其对成本、技术、人员、设备等的要求较高,临床推广有一定的困难^[22],还未能普及至基层医院,而 GBS 显色培养法阳性率与实时荧光 PCR 阳性率无显著差异,敏感度和准确度均较高,虽检测时限稍长,但能同时为阳性标本提供抗菌药物使用依据,且成本较低,较适合基层医院用于进行 GBS 的常规筛查和防治,但我们认为 GBS 检测技术的发展应向经济、简便、快捷、高通量、高准确性的方向转变,以满足临床快速筛查的需要,对此临床可根据感染患者的具体情况和接受程度选择合适的检测方法。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- Heath PT. Status of vaccine research and development of vaccines for GBS [J]. *Vaccine*, 2016, 34 (26): 2876-2879. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.12.072.
- 陈东科,孙长贵,魏莲花,等.实用临床微生物学检验与图谱[M].人民卫生出版社,2011:207
- Lukic A, Napoli A, Santino I, et al. Cervicovaginal bacteria and fungi in pregnant diabetic and non-diabetic women: a multicenter observational cohort study [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21 (10): 2303-2315.
- 郑东霞,李水凤.妊娠期糖尿病孕妇血糖水平对妊娠结局影响研究[J].实用预防医学,2016,23(4):469-471. DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2016.04.027.
- 谭莹,刘跃.200例孕产妇阴道细菌感染对妊娠结局的影响[J].实用检验医师杂志,2015,7(1):25-27. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2015.01.11.
- 何苑苑,赵江红,余艳萍.妊娠晚期 B 族链球菌阳性孕妇血清 IL-6、降钙素原水平变化及意义 [J]. *山东医药*, 2015, (48): 82-83. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2015.48.031.
- 张丽华,杨维青,张丽,等.广东东莞地区 2009-2014 年围产期孕妇 B 群链球菌的分离与耐药性分析 [J]. *中国感染与化疗杂志*, 2015, 15 (6): 575-578. DOI: 1009-7708(2015)06-0575-04.
- 雷蜜,倪维.不同方法检测 B 群链球菌效果评价 [J]. *检验医学与临床*, 2016, 13 (20): 2847-2849. DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.20.002.
- 陈翠英.孕妇生殖道 B 族链球菌感染与胎膜早破的关系及对母婴预后的影响 [J]. *深圳中西医结合杂志*, 2016, 26 (9): 106-107. DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2016.09.053.
- Barcaite E, Bartusevicius A, Tameliene R, et al. Prevalence of maternal group B streptococcal colonisation in European countries [J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2008, 87 (3): 260-271. DOI: 10.1080/00016340801908759.
- Kwatra G, Cunnington MC, Merrall E, et al. Prevalence of maternal colonisation with group B streptococcus: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16 (9): 1076-1084. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)30055-X.
- 陆少颜,徐烨,陈泳言,等.江门市围产期妇女 B 族链球菌的分布及耐药情况 [J]. *中国妇幼保健*, 2016, 31 (7): 1383-1385. DOI: 10.7620/zgfybj.j.issn.1001-4411.2016.07.13.
- Verani JR, McGee L, Schrag SJ, et al. Prevention of perinatal group B streptococcal disease—revised guidelines from CDC, 2010 [J]. *MMWR Recomm Rep*, 2010, 59 (RR-10): 1-36.
- 李亚梅,张利侠,秦利,等.围产期孕妇 B 族链球菌的感染和耐药性检测及对妊娠结局的影响 [J]. *现代检验医学杂志*, 2013, 28 (1): 87-89. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7414.2013.01.028.
- 蔡晓沂,钟锦镐,王秀艳,等.快速、准确的 B 族链球菌检测—即时荧光探针核酸扩增技术的应用 [J]. *现代预防医学*, 2013, 40 (13): 2533-2535, 2546.
- 何国才,白清,李高,等.桂林地区孕晚期孕妇 B 族链球菌检测及药敏分析 [J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34 (15): 2006-2007. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.15.040.
- 齐志强,彭露,李鹏,等.孕妇 B 族链球菌的检测及其临床价值 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2016, 23 (12): 1393-1394, 1423. DOI: 10.11748/bjmy.issn.1006-1703.2016.12.009.
- 陈慧慧,范建霞,陆庭嫣,等.孕妇 B 族溶血性链球菌感染对母婴的影响 [J]. *上海医学*, 2009, 32 (2): 128-130.
- 季修庆,陆根生,胡平,等.荧光定量 PCR 检测南京地区孕晚期妇女生殖道 B 族链球菌的带菌情况 [J]. *检验医学*, 2014, 29 (6): 628-630. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8640.2014.06.012.
- 仇英,应春妹.B 族链球菌检测在围产期孕妇感染诊断中的意义 [J]. *中华检验医学杂志*, 2016, 39 (6): 410-412. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2016.06.004.
- Håkansson S, Källén K, Bullarbo M, et al. Real-time PCR—assay in the delivery suite for determination of group B streptococcal colonization in a setting with risk-based antibiotic prophylaxis [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2014, 27 (4): 328-332. DOI: 10.3109/14767058.2013.818128.
- 张静华,袁应华,成洁,等.妊娠末期 B 族链球菌检测方法的评估 [J]. *检验医学*, 2016, 31 (11): 974-977. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8640.2016.11.011.

(收稿日期:2020-02-04)

(本文编辑:张耘菲 邵文)