

• 检验技术与方法 •

实时荧光 PCR 技术和细菌培养法检测妊娠晚期孕妇定植 B 群链球菌临床分析

王 丽, 叶 巍, 马 杰[△]

(湖北省新华医院检验科, 湖北武汉 430015)

摘要:目的 探讨应用实时荧光 PCR 技术和细菌培养法检测妊娠晚期孕妇定植 B 群链球菌(GBS)的敏感性。方法 采集孕妇生殖道-直肠分泌物拭子 2 份,一份标本用普通细菌培养法、另一份用实时荧光 PCR 技术检测生殖道 GBS。比较两种方法的准确性、快速性。308 例孕妇根据实时荧光 PCR 检测分为 GBS 阳性组与 GBS 阴性组,通过对比分析 GBS 与发生胎膜早破的关系。结果 将 308 例孕妇进行生殖道 GBS 检测,用普通细菌培养法进行培养有 18 例阳性,阳性率 5.8%(18/308),实时荧光 PCR 检测有 29 例阳性,阳性率 9.4%(29/308)。在 PCR 检测 GBS 阳性组中,发生胎膜早破 9 例,发生率为 31%。在 PCR 检测 GBS 阴性组中,发生胎膜早破 33 例,发生率为 11.83%。结论 该次调查结果显示实时荧光 PCR 技术的阳性检出率明显高于细菌培养法,应用该法检测技术为 GBS 的快速诊断以及更加准确有效地进行抗菌药物预防提供了依据。

关键词: B 群链球菌; 聚合酶链反应; 细菌培养

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.16.043

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)16-2220-02

Clinical analysis of real-time fluorescent PCR technique and bacterial culture for detecting colonization of group B Streptococcus in late pregnant women

Wang Li, Ye Wei, Ma Jie[△]

(Department of Clinical Laboratory, Xinghua Hospital, Wuhan, Hubei 430015, China)

Abstract: **Objective** To investigate the sensitivity of the real-time fluorescence PCR technique and the bacterial culture for detecting the colonization of group B Streptococcus(GBS) in late pregnant women. **Methods** 2 specimens were collected from pregnant women genital tract-rectal secretions swabs, one specimen for conducting the bacterial culture and another for conducting the real-time PCR technique to detect genital GBS. The accuracy and rapidness were compared between the two methods. 308 cases of pregnant women were divided into the GBS positive group and the GBS negative group according to the detection results of the real time real-time fluorescence PCR technique. The relation between the occurrence of premature rupture of membranes with GBS was investigated by the comparative analysis. **Results** Among 308 pregnant women with GBS detection, 18 cases were positive by the ordinary bacterial culture with the positive rate of 5.8%(18/308), while 28 cases were positive by the real-time fluorescent PCR with the positive rate of 9.4%(29/308). In the GBS positive group detected by PCR, the premature rupture of membranes occurred in 9 cases with the positive rate of 31%, while in the GBS negative group detected by PCR, which occurred in 33 cases with the positive rate of 11.83%. **Conclusion** This survey shows that the positive detection rate of the real-time fluorescent PCR technique is significantly higher than that of the bacterial culture method, the application of this detection technique for detecting GBS provides the basis for rapidly diagnosing GBS and conducting the prophylactic use of antibacterial drugs more accurately and more effectively.

Key words: group B streptococcus; polymerase chain reaction; germiculture

B 群链球菌(GBS)是一种革兰阳性链球菌,寄居于阴道和直肠,在世界范围内是围生期孕妇严重感染性疾病的主要致病菌之一^[1-4],可引起孕妇胎膜早破和羊膜腔感染及孕晚期流产、早产等^[5],有报道称围生儿细菌感染 16%~61%都是 GBS 感染^[6],因此发生新生儿肺炎、脑膜炎、败血症等病死率极高^[7-8],而且新生儿感染的主要途径是母体垂直传播。许多研究表明,针对性地使用抗菌药物可以有效预防孕妇胎膜早破及新生儿 GBS 感染。本次对 308 例妊娠晚期孕妇采取了两种方式的检测,通过聚合酶链反应(PCR)尽早筛查出 GBS 感染情况,降低胎膜早破的发生率。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采自本院 2012 年 10 月 1 日至 2013 年 6 月 30 日门诊和住院待产孕妇的生殖道-直肠分泌物标本 308 例,

孕妇年龄在 21~40 岁,孕周在 35~37 周。308 例孕妇按照实时荧光 PCR 反应检测分为 GBS 阳性组和 GBS 阴性组。孕妇分娩后对比两组发生胎膜早破的发生率。

1.2 仪器与试剂 广州达安基因股份有限公司 DA7600 荧光定量 PCR 扩增仪;GBS 核酸检测(荧光 PCR 法)试剂盒由福建泰普生物科学有限公司提供。美国 Thermo Scientific Forma 3111 水套 CO₂ 培养箱;API 鉴定系统系法国梅里埃产品,杭州天河微生物试剂公司生产的生化微量管。GBS 核酸检测阴、阳性对照均由试剂盒厂家提供。采用金黄色葡萄球菌 ATCC25923 作为质控标准菌株,来自卫生部临床检验中心。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 按照 GBS 核酸检测试剂盒标本采集要求采集,同时取 2 份,1 份做细菌培养,1 份做 PCR 检测。将采集

好的分泌物拭子放回无菌试管(远距离的送检标本用运送培养基)中,密闭立即送检。具体操作如下:先擦去生殖道内过多的分泌物,将无菌涤纶拭子放置于生殖道低位 1/3 处,沿生殖道壁轻轻旋转取得分泌物标本,在肛门括约肌以上约 2~5 cm 处,沿肠壁轻轻旋转取得直肠样本。

1.3.2 细菌培养 按照全国临床检验操作规程中的临床微生物学检验常规方法进行。把取得的分泌物标本立即接种在羊血琼脂平板上,分区划线,置于 35℃,5%~10% CO₂ 培养箱,孵育 24 h 后,观察羊血琼脂平板上的菌落形态及 β 溶血现象,发现可疑致病菌后进行涂片染色镜检、细菌鉴定。鉴定试验包括触酶试验、溶血试验、杆菌肽试验、CAMP 试验、马尿酸钠水解试验、七叶苷试验、6.5% NaCl 肉汤试验和胆汁溶解试验^[9]等,必要时用 API 鉴定系统鉴定。

1.3.3 实时荧光 PCR 反应检测 用以上标本采集的方法取得分泌物标本后,按试剂盒要求提取分泌物中细菌的 DNA,上清液用于 PCR 扩增,在 DA7600PCR 扩增仪上按下列循环参数进行扩增反应:stage 1 37℃ 2 min,stage 2 94℃ 2 min,stage 3 94℃ 15 s,55℃ 45 s 共 40 个循环,在 stage 3 55℃ 45 s 末端收集荧光,反应体积 50 μL。

1.4 统计学处理 使用 SPSS18.0 统计学处理软件进行相关数据运算,两种方法检测结果对比及两组胎膜早破发生率对比均采取 χ² 检验。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两种方法检测结果比较 生殖道分泌物细菌培养 GBS 阳性 18 例,阳性率为 5.8%(18/308),生殖道分泌物实时荧光 PCR 反应检测 GBS 阳性 29 例,阳性率为 9.4%(29/308),两者比较差异有统计学意义(P<0.01)。

2.2 胎膜早破发生情况实时荧光 PCR 反应检测 GBS 阳性组 29 例中发生胎膜早破 9 例,发生率为 31%。实时荧光 PCR 反应检测 GBS 阴性组 279 例中发生胎膜早破 33 例,发生率为 11.83%。两组胎膜早破发生率比较,差异有统计学意义(P<0.01)。

3 讨 论

本次调查结果显示实时荧光 PCR 技术检测 GBS 的阳性检出率为 9.4%,明显高于细菌培养法阳性检出率为 5.8%,本院 GBS 培养结果低于国内的报道^[9-10],原因分析可能是由于阴道分泌物中含有较多的正常菌群,在普通培养基中,该类细菌繁殖较快。当 GBS 水平较少时,则生长受到抑制,造成 GBS 漏检,结果培养阴性。另一方面导致检出率减低的还有人为的因素及技术操作水平差异以及培养基种类的限制。2002 年美国疾病预防控制中心(CDC)推荐使用含有庆大霉素和茶啉酮酸,或多黏菌素和茶啉酮酸的培养基作为 GBS 分离选择性培养基。选择性培养基能够有效抑制杂菌生长,GBS 生长不受影响,但是含有庆大霉素和茶啉酮酸,或多黏菌素和茶啉酮酸的培养基价格贵,且不易获得。因此普通细菌培养法仍是目前国内大多数医院首选的检测方法^[11]。另外细菌培养时间长,而实时荧光 PCR 具有检测时间短,灵敏度高,可以不受以上因素的影响。本结果还显示 PCR 检测 GBS 阳性组的孕妇胎膜早破发生率(31%)明显高于 PCR 检测 GBS 阴性组(11.83%),胎膜早破是由各种因素相互作用造成的,病原微生物感染是首要原

因。GBS 是引起胎膜早破是最重要的病原菌之一且严重威胁母婴安全。近年来西方国家对 GBS 进行了大量研究,多数学者认为 GBS 与围生期感染有关,在孕中,晚期对所有孕妇进行筛查非常必要^[12],防止胎膜早破等一系列不良妊娠结局的发生。对于已发生胎膜早破的孕妇,应尽早进行 GBS 检测,及时进行预防性治疗。GBS 还可以通过母体垂直传播传染至新生儿,导致新生儿肺炎、脑膜炎、败血症等新生儿感染性疾病。带有脑膜炎和败血病的晚发性感染通常是在出生以后几周甚至几个月发生^[10]。因此 GBS 也是新生儿感染性疾病的主要感染源病菌之一。本调查中还发现 1 例新生儿 GBS 感染的败血症,该孕妇孕 37 周时检测 GBS 时,普通细菌培养为阴性,实时荧光 PCR 检测阳性。因此应用该法检测技术为 GBS 的快速诊断以及更加准确有效地进行抗菌药物预防提供了依据,大大降低了孕妇胎膜早破、羊膜腔感染、孕晚期流产以及新生儿败血症、脑膜炎、肺炎的发生。

参考文献

- [1] Phares CR, Lynfield R, Farley MM, et al. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005[J]. JAMA, 2008, 299(17): 2056-2065.
- [2] Madzivhandila M, Adrian PV, Cutland CL, et al. Distribution of pilus islands of group B streptococcus associated with maternal colonization and invasive disease in South Africa[J]. J Med Microbiol, 2013, 62(2): 249-253.
- [3] Edmond KM, Kortsalioudaki C, Scott S, et al. Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: systemic review and meta-analysis[J]. Lancet, 2012, 379(9815): 547.
- [4] Lin FY, Weisman LE, Troendle J, et al. Prematurity is the major risk factor for late-onset group B streptococcus disease[J]. Infect Dis, 2003, 188(2): 267-271.
- [5] 江凌晓,黎春,姜长宏,等.应用实时荧光 PCR 技术快速检测 B 群链球菌[J]. 广东医学, 2011, 32(5): 575-576.
- [6] 汤洁,马向薇,张宁. 孕妇生殖道 B 族链球菌及其他病原微生物感染情况调查[J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(10): 942-943.
- [7] Jordan JA, Hall G, Davis T. Multicenter study evaluating performance of the smart group B streptococcus (GBS) assay using an enrichment protocol for detecting GBS colonization in patients in the antepartum period[J]. JCM, 2010, 48(9): 3193-3197.
- [8] 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]. 现代检验医学杂志, 2013, 15(34): 2006-2007.
- [9] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 764-769.
- [10] 李小梅,李瑾,袁敏智. 用聚合酶链反应技术探讨 B 群链球菌与胎膜早破的关系[J]. 河北医学, 2011, 17(3): 300-302.
- [11] 马元,洪云,张国英. B 群链球菌感染与胎膜早破[J]. 江苏医药, 2010, 36(9): 1078-1080.
- [12] Berg BR, Houseman JL, Garrasi MA, et al. Culture-based method with performance comparable to that of PCR-based methods for detection of group B streptococcus in screening samples from pregnant women[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(4): 1253-1255.

(收稿日期: 2014-03-13)