

· 论 著 ·

徐州地区妊娠晚期妇女感染 B 群链球菌的筛检情况及药物敏感性分析

王 静^{1,2}, 刘 杰², 王淑贞², 马 萍^{1△}

(1. 徐州医学院医学技术学院, 江苏徐州 221000; 2. 徐州医学院

附属徐州市妇幼保健院检验科, 江苏徐州 221000)

摘 要:目的 对比荧光定量聚合酶链反应(PCR)技术和细菌培养法在徐州地区妊娠晚期妇女 B 群链球菌(GBS)定植筛查中的应用,并了解 GBS 的耐药情况。**方法** 采集本地区妊娠晚期妇女的阴道拭子和肛门拭子,同时进行荧光 PCR 检测和细菌培养法检测,比较分析两种方法的各项性能指标。对细菌培养法阳性者做药敏试验。**结果** 484 例标本中,荧光 PCR 技术检测 GBS 阳性 53 例,阳性率 11.0%,灵敏度为 100.0%;细菌培养法检测 GBS 阳性 31 例,阳性率 6.4%,灵敏度 59.6%。两组之间阳性率和灵敏度比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。药敏结果显示青霉素、头孢曲松、万古霉素的敏感率是 100.0%;红霉素、克林霉素、左氧氟沙星的耐药率为 71.0%、64.5%和 58.1%。**结论** 徐州地区妊娠晚期妇女 GBS 的定植率不低,PCR 是一种更为快速的具有较高特异性和敏感度的方法。临床应积极开展 GBS 的常规检测。本地区 GBS 对红霉素和克林霉素耐药率较高,临床应重视抗菌药物的合理应用,避免更多 GBS 耐药株的出现。

关键词:妊娠晚期; B 群链球菌; 荧光 PCR 技术; 耐药性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.20.017

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)20-2963-03

Screening for group B Streptococcal infection in late pregnant women in Xuzhou area and its drug sensitivity analysis

Wang Jing^{1,2}, Liu Jie², Wang Shuzhen², Ma Ping^{1△}

(1. School of Medical Technology, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221000, China; 2. Department of

Clinical Laboratory, Xuzhou City Maternal and Child Health Hospital,

Affiliated to Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221000, China)

Abstract: **Objective** To compare the colonization rates of group B streptococcus (GBS) detected by using fluorescent PCR and bacterial culture in late pregnant women in Xuzhou area and analyze the drug resistance of GBS. **Methods** The fluorescence PCR assay and bacterial culture assay for GBS were both performed for the late-pregnant women's vaginal swabs and anal swabs samples which were collected in this area. The diagnostic efficiency were compared between the two methods. Then the drug sensitivity test were performed for stains isolated for the bacteria culture. **Results** Among the 484 specimens, 53 cases were positive detected by using fluorescent PCR, and the positive rate was 11.0%, the sensitivity was 100.0%. 31 cases were detected positive by using bacterial culture, and the positive rate was 6.4%, the sensitivity was 59.6%. There were statistically significant differences between the positive rate and the sensitivity of the two groups ($P<0.05$). The drug sensitivity test showed that the sensitive rates were 100.0% to penicillin, ceftriaxone, vancomycin. The resistance rates to erythromycin, clindamycin, levofloxacin were 71.0%, 64.5% and 58.1%, respectively. **Conclusion** The screening rate of GBS in late pregnant women is not low in Xuzhou area. PCR is a more rapid, specific and sensitive method. Routine detection of GBS should be carried out by using the method of fluorescent PCR. Resistance rate of GBS to erythromycin and clindamycin were high in Xuzhou area. More attention should be paid to the rational use of antibiotics to prevent drug-resistant producing in strains of GBS.

Key words: late pregnancy; group B streptococcus; fluorescence PCR technology; resistance

B 群链球菌(GBS)是一种溶血的革兰阳性球菌,可正常寄生在人类的下消化道和生殖道,但当孕妇免疫力低下时,可以引起孕妇生殖道感染,导致泌尿系统感染、羊膜绒毛膜炎、产褥感染和早产等,还可通过垂直传播引起新生儿患败血症、脑膜炎或肺炎等感染^[1-2],是围产期感染的主要致病菌之一^[3-4]。因此,积极筛检妊娠晚期妇女 GBS 的定植率,对减少围产期母婴感染起着重要的作用。本研究同时采用荧光定量聚合酶链反应(PCR)技术和细菌培养法检测妊娠晚期妇女的 GBS 定植率,探讨了荧光 PCR 技术对检测 GBS 的意义并分析了本地区 GBS 药敏试验的结果,旨在为临床合理选用抗菌药物提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 9 月至 2015 年 6 月在徐州市妇幼保健院门诊就诊和住院的妊娠晚期健康妇女 484 例,孕妇年龄 22~39 岁,平均(29.6±2.1)岁,孕周 35 周至足月,平均孕

周(37.1±1.3)周。所有孕妇取样前一周均未使用任何抗菌药物并知情同意。

1.2 仪器与试剂 ATB 1525 Expression 细菌鉴定仪为法国梅里埃产品, HF 151UV CO₂ 培养箱为力康生物产品, ABI7500 荧光定量 PCR 仪为美国 ABI 产品。哥伦比亚血平板、血 MH 琼脂平板和 GBS 显色培养基购自郑州安图生物工程股份有限公司, B 族链球菌核酸检测试剂盒购自泰普生物科学技术有限公司,药敏纸片是康泰生物产品。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 根据 2002 年疾病预防控制中心推荐的取材方法^[5],先擦去外阴分泌物,将两根无菌棉拭子同时插入阴道下 1/3 段旋转一周采集阴道分泌物标本,再将两根无菌棉拭子同时插入肛门括约肌 2~3 cm 轻轻旋转采集肛门分泌物标本。将阴道拭子和直肠拭子 1 份用于普通细菌培养,另 1 份用

于荧光 PCR 检测。

1.3.2 细菌培养及鉴定 1 份阴道直肠拭子接种在哥伦比亚血平板上放 5%CO₂ 培养箱 35℃培养 18~24 h,挑取呈 β 溶血的灰白色可疑菌落,进行涂片后革兰染色为革兰阳性球菌、触酶试验阴性、CAMP 试验阳性、GBS 显色培养为粉红色和 ATB rapid ID 32 Strep 链球菌鉴定卡鉴定细菌为 GBS。

1.3.3 药敏试验 细菌培养的阳性菌株采用 K-B 纸片扩散法进行药敏试验,详细操作严格按照《全国临床检验操作规程》^[1]进行:取 0.5 麦氏单位 GBS 菌液均匀涂布在血 MH 平板,贴上红霉素、克林霉素、氨苄西林、青霉素、万古霉素、头孢曲松和左氧氟沙星药敏纸片,其中红霉素和克林霉素药敏纸片距离在 12 mm(D 试验),放入 5%CO₂ 培养箱 35℃培养 24 h,测量抑菌圈按美国临床实验室标准化委员会标准(NCCLS)标准判读结果。标准菌株肺炎链球菌 ATCC49619 同时进行。

1.3.4 荧光 PCR 检测 另一份阴道直肠拭子加入 1 mL 清洗液,充分振荡摇匀,挤干棉拭子弃之,吸取全部标本悬浮液加入 EP 管中,13 000 r/min 离心 5 min,弃上清;再加入 1 mL 清洗液振荡摇匀,13 000 r/min 离心 5 min,弃上清;沉淀中加入 50 μL 缓冲液重悬,再加入提取固形物高速振荡 5 min,瞬离后放入 95℃干浴锅 2 min,立刻冰浴 2~5 min,13 000 r/min 离心 1 min 备用。阴性对照和阳性对照同时进行。取 5 μL 备用标本上清液和阴性、阳性对照加入 PCR 反应管,盖紧管盖 6 000 r/min 离心 2 min,进行 PCR 扩增检测。对细菌培养法和 PCR 法检测结果不一致的样本,用设计好的针对编码 CAMP 蛋白的序列片段的第 2 对引物,对 PCR 产物二次扩增后测序,来验证荧光 PCR 结果的正确与否。

1.4 统计学处理 采用 SPASS16.0 软件对两种方法检测 GBS 结果进行统计学处理,计数资料进行 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。对药敏结果用 WHONET 5.6 软件经行处理。

2 结 果

2.1 细菌培养法和荧光 PCR 法检测妊娠晚期妇女 GBS 定植率 484 例孕妇中细菌培养出 GBS 31 例,阳性率 6.4%;PCR 法检出 GBS 53 例,阳性率 11.0%,两种方法阳性率比较差异有统计学意义($P<0.05$)。其中两种方法同时为阳性结果的有 31 例,同时阴性结果的为 431 例。细菌培养结果为阴性而 PCR 法为阳性的有 22 例,细菌培养结果为阳性而 PCR 法为阴性的为 0 例。

2.2 对两种方法检测结果不一致的标本用测序法进行验证 将细菌培养结果为阴性而 PCR 法为阳性的 22 例标本经扩增测序后为 GBS 序列的有 21 例,1 例阴性。两种方法灵敏度比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 两种方法检测 GBS 的性能比较(%)

检测方法	灵敏度	特异度	阳性预测值	阴性预测值	准确度
细菌培养法	59.6	100.0	100.0	95.4	95.7
荧光 PCR 法	100.0	99.8	98.1	100.0	99.8

表 2 31 株 GBS 对 7 种抗菌药物的敏感性结果[% (n/n)]

抗菌药物	敏感	中介	耐药
红霉素	22.6(7/31)	6.5(2/31)	71.0(22/31)
克林霉素	32.3(10/31)	3.2(1/31)	64.5(20/31)
氨苄西林	93.5(29/31)	6.5(2/31)	0.0(0/31)
万古霉素	100.0(31/31)	0.0(0/31)	0.0(0/31)
青霉素	100.0(31/31)	0.0(0/31)	0.0(0/31)
头孢曲松	100.0(31/31)	0.0(0/31)	0.0(0/31)
左氧氟沙星	38.7(12/31)	3.2(1/31)	58.1(18/31)

2.3 药敏试验 31 株 GBS 对青霉素、万古霉素和头孢曲松均敏感,未出现耐药现象,而对红霉素、克林霉素和左氧氟沙星的耐药严重,见表 2,而且红霉素和克林霉素的药敏试验结果高度一致,其中对红霉素、克林霉素同时耐药有 19 株,红霉素诱导克林霉素耐药(D 试验阳性)的有 1 株,红霉素耐药而克林霉素敏感或中介的有 2 株。

3 结 论

GBS 自被发现可引起人类许多疾病以来,在围产期及产科感染呈逐年增多的趋势,得到世界范围关注。GBS 在 20 世纪 90 年代就已经被列为围产期感染的首要病原菌之一^[6]。GBS 是条件致病菌,健康人群可正常携带,但当孕产妇免疫力低下时,GBS 可上行感染或通过生殖道垂直传播给新生儿,给围产期妇女及围产儿带来非常严重的感染性疾病。因此,对妊娠晚期妇女进行 GBS 的筛查,可有效降低围产期的感染。在美国,已开展 GBS 常规筛查培养,对孕 35~37 周的约 90%孕妇筛查,新生儿 GBS 感染率明显下降^[2]。但在中国,GBS 筛查尚不作为常规检查,主要原因是缺乏大样本流行病学资料,而且如果孕妇 GBS 定植率很低(<5%),则常规检查价值不大。本研究中徐州地区妊娠晚期妇女 GBS 定植的阳性率为 11.0%(53/484),蔡晓沂等^[7]筛查北京地区孕妇带菌率为 17.58%,吴海军等^[8]检测深圳地区围产期孕妇 GBS 感染阳性率为 19.01%,何国才等^[9]研究了桂林地区孕妇 GBS 检出率为 7.5%,还有其他地区报道如江西地区为 8.76%^[10],东莞地区为 12.1%^[11]。各地区的报道差异很大,主要受检测方法、采集时间、种族、地区差异等因素影响。基于各地区小样本孕妇 GBS 带菌率的调查结果基本上大于 5%,以及 GBS 对围产期孕妇及新生儿的不良影响等原因,对有条件的医院开展常规筛查 GBS 项目很有必要。

GBS 定植筛查阳性率和检测方法有直接的关系。作为金标准的细菌培养方法能够得到纯培养进行药敏试验和 GBS 血清型分型,但耗时较长需要 24~48 h,并且检出率易受到培养基、温度、杂菌竞争生长和及时送检等因素影响,造成一定的假阴性结果;免疫学方法检测 GBS 需要高滴度的抗血清和高纯度的抗原,当孕妇体内 GBS 特异性抗体浓度小于 2 mg/mL 时,就不易检出^[12]。分子生物学中的 PCR 技术是具有较高的敏感度和特异性的快速检测方法,仅需 2~4 h,并且可检测到死的 GBS^[10]。本研究中普通细菌培养法筛查妊娠晚期妇女 GBS 阳性率为 6.4%,灵敏度为 59.6%,特异度为 100.0%,而 PCR 技术检测 GBS 的阳性率为 11.0%,灵敏度为 100.0%,特异度为 99.8%,两者之间的阳性率和灵敏度具有统计学差异($P<0.05$)。结果显示 PCR 技术检测 GBS 的准确性、灵敏度和阳性率均高于普通细菌培养法,并且非常快速。能及时准确地发出报告指导医生合理干预 GBS 对孕妇及围产儿的危害,特别对即将分娩未进行 GBS 检测及发生胎膜早破、发热,曾感染过 GBS 等有危险因素又需要及时预防性使用抗菌药物治疗的孕妇,是非常理想的筛查方法。

药敏结果显示,GBS 对青霉素、头孢曲松、万古霉素的敏感性较好,青霉素是预防用药的最佳选择,与美国临床标准化实验室(CLSI)推荐用于治疗化脓性链球菌或 GBS 的青霉素和其他 β-内酰胺类抗菌药物相符^[13]。如果对青霉素类药物轻度过敏,可以考虑头孢曲松等三代、四代头孢菌素类药物;对青霉素和头孢菌素类药物重度过敏,可根据药敏结果选择作为防治 GBS 的二线药物红霉素和克林霉素,因其在全世界范围内较长期广泛应用,导致耐药株的出现和扩散。(下转第 2966 页)

结果间比较,差异无统计学意义($F=1.08,P>0.05$),见表 1。HLA-B27 检测结果与抗体剂量、反应时间关系图显示三条直线几乎平行,表示抗体剂量、反应时间无交互作用,见图 1。

表 1 不同抗体剂量组 HLA-B27 检测结果(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	HLA-B27 检测结果		
	5 min	10 min	15 min
5 μ L 组	84.16 \pm 1.21	94.81 \pm 1.33	94.10 \pm 1.26
10 μ L 组	85.40 \pm 1.27*	96.76 \pm 1.31*#	95.36 \pm 1.45*#

*: $P<0.05$,与 5 μ L 抗体反应组比较;#: $P<0.05$,与抗体反应 5 min 比较。

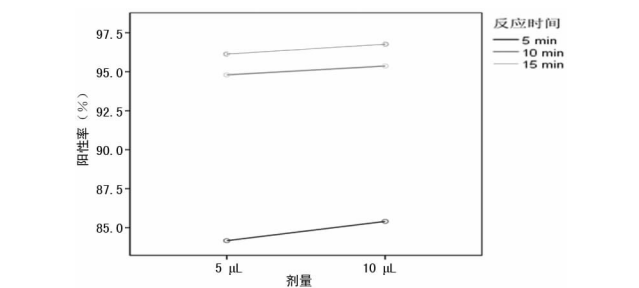


图 1 HLA-B27 检测结果与抗体剂量、反应时间关系图

3 讨 论

AS 是脊柱及附属组织的自身免疫性疾病,AS 减少致残率的关键在于早期发现、早期诊治、早期指导患者生活起居及功能锻炼,从发病到明确诊断往往需要经过 4~10 年^[3]。AS 最初起病隐匿,患者脊柱或周围关节疼痛往往与其他原因引起的脊柱或关节疼痛症状相似,而初发患者在 X 线上又没有骶

髂关节炎的明确表现,因此在临床上不易确诊,仅以 X 射线所见为依据,可能对一些早期病例的诊断不可靠。如果患者根据临床资料诊断 AS 的概率为 50%,在检出 HLA-B27 时则可提高至 93%,因而,结合患者症状与临床上的其他诊断进行 HLA-B27 检测具有十分重要的意义^[4]。流式细胞仪是检测 HLA-B27 最有效的方法,其利用荧光标记的抗 HLA-B27 的单克隆抗体和淋巴细胞表面的 HLA-B27 抗原结合,使结合后的淋巴细胞具有一定的荧光强度,这种荧光强度可由流式细胞仪测得的通道值来反映,以其值的高低判断 HLA-B27 阴、阳性,该方法操作简单,结果准确,尤其适用于大规模样本检测^[5]。HLA-B27 抗体价格昂贵,为高效合理使用抗体,本实验根据抗体剂量不同分为两组,分别避光静置 5、10、15 min,溶血后上机检测 HLA-B27 水平,结果显示抗体剂量 10 μ L 反应 10 min 为最佳实验方案,能够有效节省抗体并提高工作效率。

参考文献

[1] 孙翠华,孟凡杰,王玉芳,等.强直性脊柱炎与 HLA-B27 相关性的研究进展[J].医学综述,2007,13(4):281-283.
[2] 胡晓舟,苑腾,王小林,等.流式细胞术与定量 PCR 法检测 HLA-B27 的比对[J].中国实验诊断学,2009,13(6):745-746.
[3] 黎勤云,李志强.强直性脊柱炎相关 HLA-B27 的研究进展[J].中国输血杂志,2012,25(11):1138-1140.
[4] Liu Y,Li J,Chen B,et al.Familial aggregation of ankylosing spondylitis in Southern China[J].J Rheumatol,2001,28(3):550-553.
[5] 金明威,陈哲,陈颖.流式细胞术检测 HLA-B27 及其临床意义[J].中国优生与遗传杂志,2011,19(5):35.

(收稿日期:2015-07-02)

(上接第 2964 页)

本次研究结果显示红霉素和克林霉素的耐药率高达 71.0%和 64.5%,并且结果高度一致,这与国内一些报道基本一致^[11,14],作为经验用药已不适用。另外左氧氟沙星的耐药率为 58.1%,比其他地区报道都高^[7-12]。这可能与本地区左氧氟沙星的大量使用有关。耐药菌株的出现与抗菌药物的广泛使用密切相关,较高的耐药率令人担忧,因此需要临床紧密结合药敏结果预防和治疗 GBS 的感染,从而减少耐药株的发生和扩散。

综上所述,徐州地区妊娠晚期妇女的 GBS 定植率在健康人群的正常范围内,应重视妊娠晚期妇女和新生儿的 GBS 感染,加强对孕 35~37 周孕妇开展 GBS 常规 PCR 方法检查,减少 GBS 感染的发生。并常规监测 GBS 耐药性的变化从而指导临床合理用药,提高妊娠晚期妇女和新生儿的生活质量,保障母婴安全。

参考文献

[1] 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.
[2] Cagno CK,Pettit JM,Weiss BD.Prevention of perinatal group B streptococcal disease: updated CDC guideline[J].Am Fam Physician,2012,86(1):59-65.
[3] Schrag S,Gorwitz R,Fultz-Butts K,et al.Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC[J].MMWR Recomm Rep,2002,51(11):1-22.
[4] Michael W,蒋佩茹,曹云,等.围生期新生儿 B 族链球菌感染[J].中国循证儿科杂志,2011,06(4):241-244.

[5] 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(10):1-36.
[6] Academy of American Pediatrics. Committee on infectious diseases and committee on fetus and newborn, revised guidelinds for prevention of early-onset group B Streptococcal (GBS) infection[J].Pediatrics,1997,99(3):489-496.
[7] 蔡晓沂,钟镐镐,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.
[8] 吴海军,吕磊,宋柳安,等.B 群链球菌在孕妇及新生儿中的带菌调查及耐药性研究[J].重庆医科大学学报,2013,38(10):1234-1236.
[9] 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.
[10] 黄永建,陈波,张勇,等.孕晚期妇女 B 族链球菌 PCR 检测结果分析[J].江西医药,2013,48(7):581-584.
[11] 张丽华,张丽,李超强,等.孕妇围产期 B 群链球菌检出率和耐药性分析[J].中国医药,2010,5(3):261-262.
[12] 许基平,王频佳.B 群链球菌快速检测方法研究进展[J].检验医学与临床,2011,8(19):2380-2381.
[13] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S23 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S].Wayne,PA,USA:CLSI,2013.
[14] 张红军,刘华,韩彩虹.围产期孕妇 B 群链球菌感染情况及对妊娠结局的影响研究[J].中国计划生育和妇产科,2015,4(4):50-52.

(收稿日期:2015-05-11)