

论著 · 临床研究

孕晚期妇女无乳链球菌携带监测及其与阴道微环境关系研究^{*}

唐群力, 肖林林, 魏取好, 肖 虎[△], 赵卫卫, 冯 景
(上海交通大学附属第六人民医院南院检验科, 上海 201499)

摘 要:目的 探讨利用荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)检测无乳链球菌的方法在孕晚期妇女无乳链球菌带菌状况早期筛检监测中的应用价值,并研究无乳链球菌感染对孕晚期妇女阴道微环境的影响。
方法 回顾分析该院 2017 年 1 月至 2018 年 1 月送检的 5 855 例孕晚期妇女阴道分泌物及直肠分泌物样本经 RT-qPCR 检测无乳链球菌情况。另选取同期 100 例孕晚期阴道非带菌妇女为阴性组,100 例健康体检女性为对照组。分析 3 组阴道微环境相关指标(乳酸杆菌含量、菌群多样性、清洁度)检测结果。
结果 2017 年 1 月至 2018 年 1 月到该院就诊的孕晚期妇女无乳链球菌总携带率为 9.6%,其中阴道携带率为 2.4%、直肠携带率为 7.2%,无乳链球菌阳性组乳酸杆菌(Ⅱ~Ⅲ级)、菌群多样性(Ⅱ~Ⅲ级)、清洁度(Ⅰ度)、微环境失调概率分别为 30.1%、36.4%、25.9%、76.2%,阴性组为 58.0%、55.0%、61.0%、63.0%,对照组为 87.0%、91.0%、83.0%、24.0%。其中无乳链球菌阳性组、阴性组各指标与对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);阴性组各指标与对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。
结论 该院孕晚期妇女无乳链球菌携带率处于文献报道的正常范围内,利用 RT-qPCR 检测无乳链球菌可以有效筛查和监测。携带无乳链球菌可能会增加孕晚期妇女阴道感染发生的风险。

关键词:无乳链球菌; 阴道微环境; 孕晚期妇女; 乳酸杆菌
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.02.007 **中图法分类号:**R446.5
文章编号:1673-4130(2019)02-0153-04 **文献标识码:**A

Study on monitoring of Streptococcus agalactiae in third trimester women and its relationship with vaginal microenvironment^{*}

TANG Qunli, XIAO Linlin, WEI Quhao, XIAO Hu[△], ZHAO Weiwei, FENG Jing
(Department of Clinical Laboratory, Affiliated Sixth People's Hospital South Campus, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201499, China)

Abstract: Objective To investigate the value of real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) in the detection of Streptococcus agalactiae in early screening of Streptococcus agalactiae in pregnant women in the third trimester, and to study the effect of Streptococcus agalactiae infection on them.
Methods A retrospective analysis of 5 855 pregnant women with vaginal discharge and rectal secretions from January 2017 to January 2018 in our hospital were performed to detect Streptococcus agalactiae by RT-qPCR. Meanwhile, 100 vaginal non-vaginosis women in the third trimester were selected as the negative group and 100 healthy women as the control group. The vaginal micro-environment-related indexes (Lactobacilli content, flora diversity and cleanliness) of three groups were analyzed.
Results The total carrier rate of Streptococcus agalactiae of the third trimester from January 2017 to January 2018 in our hospital was 9.6%, of which vaginal carriage rate was 2.4%, rectum carriage rate was 7.2%, Streptococcus agalactiae positive group (Grade Ⅱ—Ⅲ), rates of population diversity (Grade Ⅱ—Ⅲ) cleanliness (Ⅰ degree) and microenvironment imbalance were 30.1%, 36.4%, 25.9% and 76.2% respectively, while those in the negative group were 58.0%, 55.0%, 61.0% and 63.0% and those in the control group were 87.0%, 91.0%, 83.0%, 24.0%. The positive rate of Streptococcus agalactiae in each group was significantly higher than that in the control group ($P<0.05$). The differences of all the indexes between the negative group and the control group were also statistically significant ($P<0.05$).
Conclusion The carrying rate of Streptococcus agalactiae in third trimester pregnancy in our

^{*} **基金项目:**国家自然科学基金资助项目(81572034);上海市卫生和计划生育委员会青年基金资助项目(20164Y0156)。
作者简介:唐群力,男,主管技师,主要从事微生物学检测研究。 [△] **通信作者,**E-mail:18621963468@163.com。
本文引用格式:唐群力,肖林林,魏取好,等.孕晚期妇女无乳链球菌携带监测及其与阴道微环境关系研究[J].国际检验医学杂志,2019,40(2):153-155.

hospital was within the normal range reported in the literature. The detection of *Streptococcus agalactiae* by RT-qPCR could be effectively screened and monitored. Carrying *Streptococcus agalactiae* might increase the risk of vaginal infection in third trimester women.

Key words: *Streptococcus agalactiae*; vaginal microenvironment; third trimester women; *Lactobacillus*

无乳链球菌(或称 B 族链球菌)是一种可以在胃肠道和泌尿生殖道中定植的条件致病菌,常定植于人类直肠和生殖道中,属 β 溶血的革兰阳性链球菌。无乳链球菌通常和怀孕期间与产后期间的医疗间期相关易感因素关系密切,当机体免疫力低下、广泛使用抗菌药物等时,容易引起机会性感染^[1-2]。无乳链球菌与新生儿的致命疾病如败血症、肺炎和脑膜炎有关,被认为是新生儿疾病发展的最重要风险之一,无乳链球菌在孕妇中的定植率根据社会经济、文化和人口状况及用于检测的方法而有所不同^[3]。本研究采用荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)检测孕晚期妇女无乳链球菌带菌状况,采用半定量法检测其阴道分泌物乳酸杆菌水平,并结合数据分析相互之间的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2017 年 1 月至 2018 年 1 月在本院妇产科门诊和住院病房就诊的孕晚期妇女(34~37 周)共 5 855 例作为研究对象,并选取 100 例健康体检女性为对照组,每位研究对象由妇产科医生同时采集阴道分泌物(一支拭子样本)及直肠分泌物(一支拭子样本)送检,无乳链球菌携带组、阴性组、对照组的乳酸杆菌检测样本使用白带常规涂片后进行瑞姬染色。阴性质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC25923,阳性质控菌株为无乳链球菌 ATCC13813。采集过程严格按照样本采集手册执行,取样对象知情同意。

1.2 仪器与试剂 RT-qPCR 仪购自瑞士罗氏诊断推出的 Roche lightcycle 480 II,无乳链球菌核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)购自泰普生物科学(中国)有限公司,瑞氏-姬母萨染色液购自珠海贝索生物技术有限公司。试剂盒采用 PCR 及荧光标记探针,检测临床样本中无乳链球菌特定基因(CAMP),从而判断无乳链球菌的存在。据文献报道,对于无乳链球菌的临床样本检测中,RT-qPCR 法与细菌培养法、测序法(金标准)的符合率达 95% 以上^[4]。

1.3 方法

1.3.1 无乳链球菌检测 在样本拭子管内加入 1 mL 清洗液(10×浓缩清洗液与灭菌纯化水按 1:9 进行稀释),用震荡混匀器高速震荡 2 min,将其制成样本混悬液。吸取全部样本混悬液至 1.5 mL 离心管内,13 000 r/min 离心 5 min 后弃去上清,加入 1 mL 清洗液震荡混匀重悬,13 000 r/min 离心 5 min 后弃去上清(视样本浑浊情况可重复本步骤),加入 50 μ L

清洗液重悬。然后向每只样本管中加入 1 管等量提取固形物,用震荡混匀器高速震荡 5 min,连同阴性对照、阳性对照质控样本同样提取流程提取基因组模板后,瞬时离心,每管分别加入 10 μ L 内参照,95 $^{\circ}$ C 干浴 2 min,冰浴 5 min 后 13 000 r/min 离心 1 min,各取 5 μ L 上清作为模板加入至配好的 PCR 扩增体系中进行扩增。扩增程序:37 $^{\circ}$ C 2 min,94 $^{\circ}$ C 2 min,94 $^{\circ}$ C 20 s,55 $^{\circ}$ C 45 s,共 40 个循环。扩增完毕,调整基线和阈值,确认阴阳性对照及质控在有效范围内后判读结果,阴性样本 FAM Cp 值=40 或“Undet”,阳性样本 FAM Cp 值 $\leq$ 33 且曲线呈明显对数增长。

1.3.2 阴道微环境指标检测^[5] 将送检的阴道分泌物制作出分泌物涂片,高倍镜下观察判读清洁度并记录结果,待干燥后用瑞氏-姬母萨染色液染色、晾干,于显微镜下油镜下观察乳酸杆菌水平及阴道菌落多样性。依据 2010 年廖秦平^[6]提出的阴道微生态评价标准,阴道乳酸杆菌菌群密集度及阴道菌群多样性均可分为 4 个等级。其中,阴道乳酸杆菌菌群密集度的 4 级分级情况为:Ⅰ级(+),油镜下观察每个视野平均细菌数量为 1~9,换算成具体数值为 $10^5 \sim 10^6$ /mL;Ⅱ级(++):油镜下观察每个视野平均细菌数量为 10~99,换算成具体数值为 $10^7 \sim 10^8$ /mL;Ⅲ级(+++):油镜下观察每个视野平均细菌数量超过 100,换算成具体数值为 $10^9 \sim 10^{10}$ /mL;Ⅳ级(++++) :油镜下观察每个视野细菌聚集成团,或密集黏膜上皮细胞,换算成具体数值为 10^{10} /mL 以上。阴道菌群多样性 4 级分级情况为:Ⅰ级(+),油镜下观察每个视野平均能辨别 1~3 种细菌;Ⅱ级(++),油镜下观察每个视野平均能辨别 4~6 种细菌;Ⅲ级(+++),油镜下观察每个视野平均能辨别 7~10 种细菌;Ⅳ级(++++) ,油镜下观察每个视野平均能辨别 11 种及以上细菌。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件进行数据分析。计数资料以率表示,不同分组间采用两组样本率的 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 孕晚期妇女无乳链球菌携带情况 5 855 例门诊和住院病房就诊的孕晚期妇女(孕 34~37 周)中共检出无乳链球菌携带者 563 例(563/5885,9.6%),其中阴道分泌物检出 143 例(143/5 885,2.4%),直肠分泌物检出 426 例(426/5 885,7.2%),二者同时检出阳性有 106 例(106/5 885,1.8%),占总阳性人群的 18.8%。对照组中检出阳性 4 例,阳性率为 4.0%。

2.2 3 组研究对象阴道清洁度、乳酸杆菌水平及阴道菌群多样性情况 无乳链球菌阳性组乳酸杆菌(Ⅱ~Ⅲ级)、菌群多样性(Ⅱ~Ⅲ级)、清洁度(Ⅰ度)、微环境失调的概率见表 1。其中无乳链球菌阳性组、阴性

组各指标与对照组相比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);阴性组各指标与对照组相比,差异亦均有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 3 组研究对象阴道微环境相关指标的比较[n(%)]

组别	n	乳酸杆菌(Ⅱ~Ⅲ级)	菌群多样性(Ⅱ~Ⅲ级)	清洁度(Ⅰ度)	微环境失调
阳性组	143	43(30.1)*#	52(36.4)*#	37(25.9)*#	109(76.2)*#
阴性组	100	58(58.0)*	55(55.0)*	61(61.0)*	63(63.0)*
对照组	100	87(87.0)	91(91.0)	83(83.0)	24(24.0)

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与阴性组比较,# $P<0.05$

3 讨 论

目前研究报道普遍认为,无乳链球菌是孕晚期妇女发生严重感染性疾病的主要致病菌之一,可以造成孕妇及婴儿不良后果^[7-8]。女性阴道通常被认为是一个复杂的微生态体系,乳酸杆菌含量、菌群多样性、清洁度等因素对维持微环境的平衡和预防感染的发生起到了非常重要的作用^[7,9-10]。因此,对孕晚期妇女进行无乳链球菌筛查,同时调查阴道微环境相关指标,结合分析后可采取积极有效的预防和治疗措施,降低孕晚期妇女感染率。

微生物细菌培养鉴定是鉴别及诊断无乳链球菌感染的“金标准”,但其周期长、操作繁琐、检出率低等明显的缺点不能很好地满足临床准确、快速鉴定的诉求,同时烦琐的操作一定程度了造成了检验人力资源的浪费。RT-qPCR 法检测无乳链球菌具有快速、操作简便、灵敏度高等特点,可以较好地解决以上问题,目前广泛应用于无乳链球菌的检测^[10]。阴道微环境有一套较为完善的临床评价体系,当阴道菌群密度为Ⅱ~Ⅲ级、多样性为Ⅱ~Ⅲ级、清洁度为Ⅰ度、乳酸杆菌正常、阴道酸碱度为小于 4.5 时,定义为阴道微环境正常。当任何一项异常,均可诊断为微环境失调^[11]。

本研究对孕晚期妇女采用 RT-qPCR 法检测无乳链球菌携带情况,并检测记录微环境相关的各项指标结果。结果显示,本院孕晚期妇女无乳链球菌携带率为 9.6%,与国内报道的汉中^[12]、北京^[13]、重庆^[14]地区的携带率持平,低于韩国的 13.0%^[10],处于欧洲国家 6.5%~36.0%和美国 2.0%~29.0%^[15]范围的中下游水平。本研究显示,孕晚期无乳链球菌阳性组阴道微环境失调率高于阴性组和对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),该结果进一步证实了育龄妇女无乳链球菌感染高发可能与生殖道微环境改变有关的猜测。

4 结 论

本院孕晚期妇女的无乳链球菌携带率处于已有文献报道的正常范围内,无乳链球菌感染的孕晚期妇女阴道微环境表现为失调,阴道微生态平衡遭到破

坏,增加了罹患生殖道感染的风险,在临床上应该引起足够的重视,应该加强无乳链球菌的检测和监控,以便采取预防措施,提高孕期生活质量,避免带来严重后果。同时,无乳链球菌检测的影响因素众多,样本异质性问题尤甚,分析前其过程应该加强监控。

参考文献

[1] 陈小平,王惠姣,俞北伟,等. B 族链球菌产前筛查在母婴感染防控中的应用[J]. 检验医学,2016,31(4):266-269.

[2] 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.

[3] 沈定树,周雪艳. 无乳链球菌的研究进展[J]. 中国微生态学杂志,2008,20(5):518-519.

[4] 张丽华,郭主声,杨维青,等. 2013—2014 年围产期孕妇携带 B 族链球菌的血清型与耐药分析[J]. 中国感染与化疗杂志,2017,17(5):527-531.

[5] JEFFERY H E,MOSES L M. Eight-year outcome of universal screening and intrapartum antibiotics for maternal group B streptococcal carriers[J]. Pediatrics,1998,101(1):E2.

[6] 廖秦平. 女性阴道微生态及阴道微生态评价[J]. 实用妇产科杂志,2010,26(2):81-83.

[7] DUMAS A M,GIRARD R,VINCENT-BOULETREAU A,et al. Does intrapartum antibiotic prophylaxis decrease the incidence of maternal group B streptococcal infections? [J]. J Hosp Infect,2004,58(1):85-86.

[8] LE DOARE K,HEATH P T. An overview of global GBS epidemiology[J]. Vaccine,2013,31 Suppl 4:S7-12.

[9] DI RENZO G C,MELIN P,BERARDI A,et al. Intrapartum GBS screening and antibiotic prophylaxis;a European consensus conference[J]. J Matern Fetal Neonatal Med,2015,28(7):766-782.

[10] PARK J S,CHO D H,YANG J H,et al. Usefulness of a rapid real-time PCR assay in prenatal screening for group B streptococcus colonization[J]. Ann Lab Med,2013,33(1):39-44.

[11] 罗亚辉,江赛. HPV 感染对宫颈炎患者阴道微生态的影响[J]. 中国性科学,2017,26(11):46-49.

[12] 王彦春,何三军. 汉中地区孕妇生殖道 B 族链球菌定植和防御素水平的相关性研究[J]. 现代检验医学杂志,2013,28(5):87-88.

(下转第 161 页)

- [11] HO C S, NOOR S M, NAGOOR N H. MiR-378 and MiR-1827 regulate tumor invasion, migration and angiogenesis in human lung adenocarcinoma by targeting RBX1 and CRKL, respectively[J]. J Cancer, 2018, 9(2): 331-345.
- [12] WU Y, ZHANG J, HONG Y, et al. Effects of kanglaite injection on serum miRNA-21 in patients with advanced lung cancer[J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 2901-2906.
- [13] XU J, XIAO X, YANG D. In vitro methods for analyzing miRNA roles in cancer cell proliferation, invasion, and metastasis[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1733: 159-171.
- [14] MOTAWI T K, RIZK S M, IBRAHIM T M, et al. Circulating microRNAs, miR-92a, miR-100 and miR-143, as non-invasive biomarkers for bladder cancer diagnosis[J]. Cell Biochem Funct, 2016, 34(3): 142-148.
- [15] 朱利群, 王纯, 陈菊香. 血清 miRNA-200b 在非小细胞肺癌中的表达及其临床意义[J]. 实用癌症杂志, 2017, 32(7): 1059-1061.
- [16] SUN Y L, HAWKINS P G, BI N, et al. Serum microRNA signature predicts response to high-dose radiation therapy in locally advanced non-small cell lung cancer[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2018, 100(1): 107-114.
- [17] HALVORSEN A R, BJAANAES M, LEBLANC M, et al. A unique set of 6 circulating microRNAs for early detection of non-small cell lung cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(24): 37250-37259.
- [18] CASTILLO-LARA R A, SORIA-RUIZ M, MARTINEZ-CARRERA O. American college of chest physicians/society of critical care medicine consensus conference; definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis[J]. Crit Care Med, 1992, 20(6): 864-874.
- [19] DETTERBECK F C, BOFFA D J, TANOUE L T. The new lung cancer staging system[J]. Chest, 2009, 136(1): 260-271.
- [20] ZHU W, ZHOU K, ZHA Y, et al. Diagnostic value of serum miR-182, miR-183, miR-210, and miR-126 levels in patients with early-stage non-small cell lung cancer[J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0153046.
- [21] GRIMOLIZZI F, MONACO F, LEONI F, et al. Exosomal miR-126 as a circulating biomarker in non-small-cell lung cancer regulating cancer progression[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 15277.
- [22] MATHE Y G, FOGEL P, MARTIN L S, et al. 60P circulating miR-31 as a predictive marker of EGFR TKI treatment efficacy in squamous cell lung cancer(SCC): a sub-analysis of the LUX-Lung 8 trial[J]. J Thorac Oncol, 2018, 13(4): 31-32.
- [23] YANG Y, CHEN K, ZHOU Y, et al. Application of serum microRNA-9-5p, 21-5p, and 223-3p combined with tumor markers in the diagnosis of non-small-cell lung cancer in Yunnan in southwestern China[J]. Onco Targets Ther, 2018, 11: 587-597.
- [24] ARAB A, KARIMPOOR M, IRANI S, et al. Potential circulating miRNA signature for early detection of NSCLC[J]. Cancer Genet, 2017(216/217): 150-158.
- [25] ZHOU X, WEN W, SHAN X, et al. A six-microRNA panel in plasma was identified as a potential biomarker for lung adenocarcinoma diagnosis[J]. Oncotarget, 2017, 8(4): 6513-6525.
- [26] HALVORSEN A R, BJAANAES M, LEBLANC M, et al. A unique set of 6 circulating microRNAs for early detection of non-small cell lung cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(24): 37250-37259.
- [27] ZAPOROZHCHENKO I A, MOROZKIN E S, SKVORT SOVA T E, et al. Plasma miR-19b and miR-183 as potential biomarkers of lung cancer[J]. PLoS One, 2016, 11(10): e0165261.
- [28] RAMALINGAM S S, YANG J C, LEE C K, et al. Osimertinib as first-line treatment of EGFR mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2018, 36(9): 841-849.
- [29] MASAOUTIS C, MIHAILIDOU C, TSOUROUFLIS G, et al. Exosomes in lung cancer diagnosis and treatment. From the translating research into future clinical practice[J]. Biochimie, 2018, 151: 27-36.
- [30] LUO H, GE H, CUI Y, et al. Systemic inflammation biomarkers predict survival in patients of early stage non-small cell lung cancer treated with stereotactic ablative radiotherapy: a single center experience[J]. J Cancer, 2018, 9(1): 182-188.
- [31] GARCÍA-GIMÉNEZ J L, RUBIO-BELMAR P A, PEIRÓ-CHOVA L, et al. Circulating miRNAs as diagnostic biomarkers for adolescent idiopathic scoliosis[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 2646.
- [32] LOPEZ-SANTILLAN M, LARRABEITI-ETXEBARRIA A, ARZUAGA-MENDEZ J, et al. Circulating miRNAs as biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: a systematic review[J]. Oncotarget, 2018, 9(32): 22850-22861.

(收稿日期: 2018-07-20 修回日期: 2018-09-10)

(上接第 155 页)

- [13] 马延敏, 吴连方, 黄醒华, 等. 孕妇 B 族溶血性链球菌带菌与母婴预后的关系[J]. 中华妇产科杂志, 2000, 35(1): 31-34.
- [14] 何建维, 张燕, 陈敏, 等. 重庆地区不同育龄围产期女性 B 族溶血性链球菌的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(19): 2784-2786.

- [15] 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.

(收稿日期: 2018-06-10 修回日期: 2018-09-21)