

- 析[J]. 中华医学杂志, 2020, 46(7): 538-540.
- [5] KIRANANTAWAT N, PETRANOVIC M, MCDERMOTT S, et al. Feasibility and accuracy of CT-guided percutaneous needle biopsy of cavitary pulmonary lesions[J]. Diagn Interv Radiol, 2019, 25(6): 435-441.
- [6] 王亚洲, 窦允龙, 王道清, 等. CT 引导下肺亚厘米小结节穿刺活检的临床研究[J]. 医学影像学杂志, 2019, 29(10): 1725-1726.
- [7] LEE S M, PARK C M, LEE K H, et al. C-arm cone-beam CT-guided percutaneous transthoracic needle biopsy of lung nodules: clinical experience in 1108 patients[J]. Radiology, 2014, 271(1): 291-300.
- [8] CHEN C H, HUANG W M, LIANG S H, et al. Does biopsy needle traversing through central portion of lesion increase the risk of hemoptysis during percutaneous transthoracic needle biopsy? [J]. Jpn J Radiol, 2018, 36(3): 231-237.
- [9] JI Z, WANG G, CHEN B, et al. Clinical application of pl-
- nar puncture template-assisted computed tomography-guided percutaneous biopsy for small pulmonary nodules [J]. J Cancer Res Ther, 2018, 14(7): 1632-1637.
- [10] 赵祥玲, 张妍蓓. 经皮肺穿刺活检术在肺占位性病变中的应用[J]. 重庆医学, 2018, 47(29): 3770-3772.
- [11] HUANG M D, WENG H H, HSU S L, et al. Accuracy and complications of CT-guided pulmonary core biopsy in small nodules: a single-center experience[J]. Cancer Imaging, 2019, 19(1): 51.
- [12] 王冲, 刘洋, 杨磊, 等. CT 引导下术前经皮肺穿刺注射吡啶菁绿定位肺内小结节和磨玻璃结节有效性和安全性分析[J]. 中华医学杂志, 2020, 100(7): 538-540.
- [13] 王斌, 伍安, 范晔, 等. CT 引导下经皮肺穿刺活检对肺部恶性肿瘤的诊断价值[J]. 中华医学杂志, 2013, 93(38): 3023-3026.
- (收稿日期: 2020-09-23 修回日期: 2021-01-23)
- 临床探讨 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2021.10.040

实时荧光定量 PCR 在 B 族链球菌产前检查中的可行性分析

宦宇, 蔡徐山[△], 齐结华, 张春利, 乐江漫

上海市嘉定区妇幼保健院检验科, 上海 201821

摘要:目的 探讨实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)在 B 族链球菌产前检查中的可行性。方法 收集 2019 年 7 月至 2020 年 2 月到该院进行产前检查、孕周 34~37 周的孕晚期孕妇共 2 012 例的阴道-肛周分泌物标本进行普通细菌培养和实时荧光定量 PCR 检测, 比较两种方法对 B 族链球菌的检出率, 分析药敏试验结果、采样部位和 B 族链球菌菌液浓度对实时荧光定量 PCR 检出率的影响。结果 实时荧光定量 PCR 检出率为 9.5%, 普通细菌培养检出率为 3.6%, 两种方法阳性检出率比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 采样部位对 B 族链球菌的检出影响明显, 阴道-肛周双部位采样可明显提高 B 族链球菌的检出率, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 对实时荧光定量 PCR 检出阳性孕妇使用青霉素治疗, 对青霉素过敏者, 可采用头孢噻肟治疗, 对青霉素和头孢噻肟均过敏者建议补充普通细菌培养法及药敏试验, 采用个性化药物治疗。结论 实时荧光定量 PCR 可提高 B 族链球菌的检出率, 该方法用在 B 族链球菌产前检查中具有可行性。

关键词: B 族链球菌; 细菌培养; 实时荧光定量聚合酶链反应; 产前筛查

中图分类号: R446.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2021)10-1482-03

B 族链球菌(GBS)也被称为无乳链球菌, 是一种革兰阳性链球菌。孕产妇、新生儿等为高危易感人群, 孕妇出现 GBS 感染往往会使胎儿发生宫内窘迫、早产等, 造成不良的妊娠结局并引发侵袭性疾病。GBS 主要通过羊水或经产道分娩传播给新生儿, 引起新生儿感染, 导致新生儿发病甚至死亡^[1]。目前, 临床上多采用普通细菌培养法对孕妇生殖道 GBS 进行检测, 普通细菌培养是 GBS 检测的金标准, 但具有耗时长、灵敏度低、影响因素多等缺点; 优点在于可以进行药敏试验, 临床可以根据药敏试验结果采用个性化药物治疗。基于此, 本研究旨在探讨实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)在孕晚期 GBS 感染检测中的应用

价值, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2019 年 7 月至 2020 年 2 月到本院产前检查, 孕周为 34~37 周, 年龄 17~44 岁的孕晚期孕妇共 2 012 例的阴道-肛周分泌物标本进行普通细菌培养及实时荧光定量 PCR 检测。仅取阴道分泌物或仅取肛周分泌物的孕妇未纳入统计。

1.2 标本采集 由医生取材, 用无菌拭子在孕妇阴道下 1/3 处旋转取分泌物; 另一根拭子在肛周旋转取分泌物。2 份标本均需带有上皮细胞。室温保存, 2 h 内送检。

1.3 材料与仪器 上海科玛嘉微生物技术有限公司

[△] 通信作者, E-mail: cai139149@126.com。

的哥伦比亚血琼脂平板;法国生物梅里埃公司的 ATB 全自动细菌分析仪;北京博尔诚公司的 B 族链球菌核酸检测试剂盒;美国赛默飞公司的 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪。

1.4 分析方法

1.4.1 普通细菌培养及药敏试验 1 241 例标本采用普通细菌培养检测,将标本接种于哥伦比亚血琼脂平板,5% CO₂ 培养箱内培养 18~24 h 后,观察菌落形态,挑取可疑菌落在血平板上进行纯培养,然后涂片、革兰染色并镜检。革兰阳性链球菌且触酶试验阴性的做 CAMP 试验,同时用生物梅里埃公司 ATB 全自动细菌分析仪鉴定细菌,CAMP 试验和仪器鉴定均符合者判定为 GBS。对普通细菌培养检出阳性者用生物梅里埃公司的链球菌药敏板条进行 GBS 药敏试验,操作步骤严格参照厂家说明书执行。

1.4.2 实时荧光定量 PCR 828 例采用实时荧光定量 PCR 检测,DNA 的提取方法和扩增条件及分析方法严格参照博尔诚公司 GBS 核酸检测试剂盒说明书操作。其中有 57 例用上述两种方法同时检测。阴道或肛周分泌物之一检测出 GBS 即判定为 GBS 感染。

1.4.3 不同菌液浓度对实时荧光定量 PCR 检测的判定 取普通细菌培养 GBS 阳性 0.5 麦氏单位菌落(约为 1.5 × 10⁸ cfu/mL),10 倍梯度稀释,直到 10³ cfu/mL,取 10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³ cfu/mL 5 种浓度梯度,同批次进行检测,每种浓度梯度 4 个重复,Ct 值 ≤ 38,且有明显 S 型扩增曲线即判为阳性。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析处理。计数资料以例数或百分率表示,采用 χ^2 检验进行比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种检测方法结果比较 1 241 例普通细菌培养检测标本中阳性 45 例,检出率为 3.6%,828 例实时荧光定量 PCR 检测标本中阳性 79 例,检出率为 9.5%,两种方法阳性检出率比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 30.841, P < 0.05$)。既用普通细菌培养又用实时荧光定量 PCR 检测的 57 例标本中,3 例实时荧光定量 PCR 阳性,而这 3 例中,有 1 例普通细菌培养阴性,即普通细菌培养只检出 2 例阳性。

2.2 药敏试验 对普通细菌培养检出阳性的 45 例标本进行药敏试验,结果显示,GBS 对青霉素、万古霉素、头孢噻肟、利奈唑胺均 100%敏感,对喹奴普汀/达福普汀、氯霉素、左氧氟沙星、克林霉素、红霉素、四环素的敏感率依次降低。见表 1。

2.3 采样部位对实时荧光定量 PCR 检测结果的影响 对实时荧光定量 PCR 检出阳性的 79 例标本进行分析发现,有 26 例阴道-肛周分泌物均检出 GBS,剩余 53 例仅检出一种分泌物阳性的孕妇中,12 例为阴道分泌物阳性,41 例为肛周分泌物阳性。也就是说阴道分泌物阳性检出率为 4.6%(38/828),占总阳性

人数的 48.1%(38/79);肛周分泌物阳性检出率为 8.1%(67/828),占总阳性人数的 87.3%(69/79);肛周分泌物阳性检出率明显高于阴道分泌物,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而阴道和肛周分泌物联合检测的阳性检出率为 9.5%(79/828),占总阳性人数的 100.0%(79/79)。可见阴道和肛周分泌物同时采样可大大提高 GBS 的检出率,阴道、肛周及阴道和肛周检出率之间比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 15.647, P < 0.05$)。

表 1 45 株 GBS 的药敏试验结果(%)

抗菌药物	敏感	中介	耐药
青霉素	100.0	0.0	0.0
万古霉素	100.0	0.0	0.0
头孢噻肟	100.0	0.0	0.0
利奈唑胺	100.0	0.0	0.0
喹奴普汀/达福普汀	82.3	1.6	16.1
氯霉素	80.6	0.0	19.4
左氧氟沙星	62.9	0.0	37.1
克林霉素	54.8	0.0	45.2
红霉素	27.4	3.2	69.4
四环素	19.4	0.0	80.6

2.4 GBS 浓度对实时荧光定量 PCR 检测的影响 对 0.5 麦氏单位 GBS 菌落梯度稀释后检测发现,除 10³ cfu/mL 菌液的实时荧光定量 PCR 检测结果的 Ct 值 > 38 外,其他浓度的 Ct 值均小于 38,见图 1。也就是说,实时荧光定量 PCR 检测 GBS 的 Ct 值随菌液浓度降低而升高,可以检测到菌液浓度最低是 10⁴ cfu/mL。

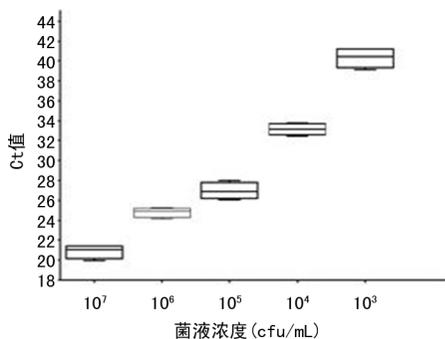


图 1 不同浓度菌悬液 PCR 检测的 Ct 值比较

3 讨论

GBS 是条件致病菌,可正常寄居于人体的消化道与泌尿生殖道内。2010 年版美国疾控中心《围产期 GBS 疾病预防指南》规定:在妊娠第 35~37 周取孕妇直肠阴道分泌物进行 GBS 检测,并对阳性和高危孕妇采用分娩期预防性抗菌药物进行干预。而在我国,中华医学会起草的 2011 版、2018 版《孕前和孕期保健指南》规定:均将 GBS 收纳为备查项目。

本科室前期采用普通细菌培养检测发现,GBS 是

本院检出的仅次于粪肠球菌的第2大革兰阳性致病菌^[2]。世界各地妊娠期妇女GBS检出率不尽相同,澳大利亚检出率约为12.0%^[3];西班牙当地妊娠期妇女为10.5%,而移民到西班牙的外国妊娠期妇女的检出率为18.9%^[4];国内文献报道,南京地区的检出率为3.65%^[5],北京地区为8.0%^[6],成都地区为7.6%^[7],广西地区为10.7%^[8],贵州地区为12.6%^[9]。本研究采用实时荧光定量PCR检测GBS的检出率为9.5%,这种差异可能与种族、饮食生活习惯、地区及检测手段有关。

普通细菌培养是检测GBS的金标准,其成本低,易开展,因此是国内外大多数医院采用的首选检测方法,但普通细菌培养的缺点是培养周期长,灵敏度略低,且易受比如标本的及时转运接种、阴道或肛门周围杂菌、检测人员的经验等外界条件的影响,导致出现假阴性和假阳性结果。本研究发现,普通细菌培养GBS的检出率为3.6%,而实时荧光定量PCR的检出率为9.5%,后者检出率明显高于前者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。实时荧光定量PCR是对GBS的特定DNA序列进行扩增检测,其优点是操作简便,灵敏度和特异度高,受外界条件影响小,检测时间短,且可以全程观测扩增过程;缺点是不能进行药敏试验指导临床个性化用药。本研究药敏试验结果显示,GBS对青霉素、万古霉素、头孢噻肟、利奈唑胺100%敏感,与大部分研究结果一致^[10-13]。实时荧光定量PCR尽管有不能进行药敏试验的弊端,但因GBS对青霉素和头孢噻肟100%敏感,故可对实时荧光定量PCR检出阳性的孕妇使用青霉素治疗,对青霉素过敏者,可用头孢噻肟治疗,对青霉素和头孢噻肟均过敏者建议补充普通细菌培养及药敏试验,给予个性化药物治疗。

GBS寄居在人体多个部位,本研究发现,仅阴道分泌物标本GBS阳性检出率为4.6%,仅肛周分泌物标本的阳性检出率为8.1%,而阴道-肛周分泌物标本联合检测的检出率为9.5%。这一结果提示,针对GBS的检测,建议送检阴道-肛周双部位分泌物以提高检出率。

常规拭子标本送检,从采样、送检到上机,这个过程可能要经过1~2d,有时为了能集中检测,标本等待上机的时间可能会更长。这些过程中由于细菌的死亡降解,GBS-DNA必然会损失,造成检测假阴性发生。本研究对菌液浓度稀释后的检测结果提示,当菌液浓度为 10^3 cfu/mL时,检测结果为阴性,根据菌液浓度和检测结果的趋势规律,有理由判断:当菌液浓度低于 10^3 cfu/mL时,检测结果均为阴性。张静华等^[14]研究发现,增菌培养可以提高GBS的检出率。所以,引入增菌步骤是下一步研究的方向。

杨春年等^[15]通过6种GBS检测方法的经济学分析发现,从成本-效果分析的角度看,实时荧光定量

PCR的性价比最高。

综上所述,采用实时荧光定量PCR检测可以提高GBS的阳性检出率,缩短检测时间,该方法在GBS产前检查中具有可行性,但应注意多部位采样并保证有足够的采集量,以减少假阴性发生。

参考文献

- [1] 刘泽滨,陆学东,林立鹏,等.无乳链球菌的研究现状及进展[J].检验医学与临床,2016,13(14):2057-2058.
- [2] 宦宇,蔡徐山,王东江,等.3 132例临产妇女宫颈分泌物细菌培养及药敏结果分析[J].国际检验医学杂志,2016,37(20):2838-2840.
- [3] FURFARO L L, CHANG B J, KAHLER C M, et al. Genomic characterisation of perinatal Western Australian *Streptococcus agalactiae* isolates[J]. PLoS One, 2019, 14(10):e0223256.
- [4] ÁLVAREZ-SANTÁS E M, JAQUETI-AROCA J, GARCÍA-ARATA I, et al. Colonization rates by streptococcus agalactiae in spanish and foreign pregnant women in the fuenlabrada university hospital[J]. Rev Esp Quimioter, 2018, 31(3):274-277.
- [5] 杨林东,包芳,吴元赓,等.晚期妊娠孕妇B群链球菌定植状况及妊娠结局分析[J].浙江大学学报(医学版),2020,49(3):389-396.
- [6] 郭琦,杨启文,胡静,等.孕晚期阴道B族链球菌定植的两种筛查方法比较[J].协和医学杂志,2018,9(3):242-245.
- [7] 普筱敏,张力,旷凌寒,等.成都地区妊娠晚期B群链球菌定植情况调查及围产结局分析[J].现代妇产科进展,2018,27(1):33-36.
- [8] 王艳皎,玉丽丽,孔琳,等.早产胎膜早破患者宫颈-阴道分泌物B族链球菌联合胎儿纤维连接蛋白检测的价值[J].国际检验医学杂志,2018,39(16):2055-2057.
- [9] DAI W, ZHANG Y, XU Y et al. The effect of group B streptococcus on maternal and infants' prognosis in Guizhou, China[J]. Biosci Rep, 2019, 39(12):1575.
- [10] 徐丽娟,方立秀,李素娟,等.兰州市妊娠晚期妇女B族链球菌携带情况调查及药敏性分析[J].检验医学与临床,2019,16(15):2188-2189.
- [11] 邢薇,符爱贞,史春,等.孕妇围产期B族链球菌感染与妊娠结局的关系[J].中华医院感染学杂志,2019,29(11):1704-1707.
- [12] 侯雅萍,俞菁,樊程.上海长宁地区孕晚期B族链球菌感染及耐药情况分析[J].检验医学与临床,2018,15(14):2132-2133.
- [13] 宋海燕,郑旭,由晓颜,等.青岛孕晚期妇女B族链球菌定植、药敏及血清型分析[J].中国实验诊断学,2019,23(11):1937-1939.
- [14] 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.
- [15] 杨春年,王梦鹤,明德松.6种B族链球菌检测方法的经济学分析[J].检验医学与临床,2020,17(4):452-455.