

• 临床研究 •

应用实时荧光定量 PCR 技术探讨 B 群链球菌与胎膜早破的关系*

杨坤祥, 王芬芳, 钟泽艳

(惠州市第一妇幼保健院检验科, 广东惠州 516003)

摘要:目的 探讨应用荧光定量聚合酶链反应(PCR)技术检测 B 群链球菌与胎膜早破之间的关系。方法 将 300 例发生胎膜早破的孕妇设为研究组, 300 例未发生胎膜早破的孕妇设为对照组, 采集孕妇宫颈分泌物, 用实时荧光定量 PCR 法和细菌培养法检测 B 群链球菌。结果 对照组宫颈分泌物检测 B 群链球菌阳性率为 7.00%(21/300); 研究组宫颈分泌物检测 B 群链球菌阳性率为 20.00%(60/300)。实时荧光定量 PCR 法检测 B 群链球菌阳性率为 13.50%(81/600); 显色细菌培养法检测 B 群链球菌阳性率为 10.00%(60/600); 传统细菌培养法检测 B 群链球菌阳性率 6.67%(40/600)。结论 围生期孕妇生殖道 B 群链球菌感染与胎膜早破的关系密切, 应加强孕晚期 B 群链球菌的筛查, 降低发生胎膜早破的风险。实时荧光定量 PCR 技术检测 B 群链球菌的阳性率明显高于细菌培养法, 且用时短, 准确度高。尽早检出 B 群链球菌感染有可能降低或预防胎膜早破的发生。

关键词:聚合酶链反应; B 群链球菌; 胎膜早破

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.10.035

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)10-1387-02

B 群链球菌(GBS)学名为无乳链球菌, 能引起牛乳房炎, 严重危害畜牧业。现发现该菌也能感染人类, 尤其是新生儿, 可引起败血症、脑膜炎、肺炎等, 病死率极高, 并可产生神经系统后遗症, 被医学界重视。GBS 正常寄居于下呼吸道、泌尿生殖道和直肠, 带菌率达 30%, 健康人的鼻咽部也可分离到 GBS。新生儿感染跟母体带菌有密切关系, 分娩时胎儿可经带菌产道而被感染, 也可由医护人员呼吸道所带病菌传播引起^[1]。国内文献报道, 围生期孕妇 GBS 感染率为 3.4%~19.01%, 新生儿感染率 1.40%~9.95%^[2-5]。感染率的不同可能与国家地区、种族基因、年龄、教育程度、培养技术及培养频率不同有关。本研究对 300 例未发生胎膜早破的孕妇(对照组)和 300 例发生胎膜早破的孕妇(研究组)采取 3 种筛查方式, 研究 GBS 与胎膜早破之间的关系, 旨在尽早筛查出围产期孕妇的 GBS 感染情况, 以期降低胎膜早破的发生率。现将具体过程及结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 2015 年 1~8 月到本院住院分娩的 600 例孕妇设定为研究对象, 将发生胎膜早破的 300 例孕妇设为研究组, 未发生胎膜早破的产妇 300 例设为对照组。全部孕妇在自愿并完全了解检测目的与研究目的的前提下参与本次研究。

1.2 仪器和试剂 美国 ABI7500 实时荧光定量 PCR 扩增仪; 上海力申公司 HF90/hf240 CO₂ 培养箱; 法国生物梅里埃 VITEK2-compact 分析仪; GBS 核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)、阴阳性对照均由福建泰普生物科学有效公司提供; 哥伦比亚血琼脂平板由江门凯林有限公司提供; GBS 显色平板由郑州安图生物有限公司提供; 马尿酸钠生化微量管由杭州天河微生物试剂公司提供; 采用金黄色葡萄球菌(ATCC29523)作为质控标准菌种, 来自卫生部临检中心。

1.3 诊断标准 胎膜早破的定义参照全国高等医学院校教材《妇产科学》中有关诊断定义^[6]。孕妇符合下列之一即可诊断为胎膜早破: (1) 孕妇自觉有大量液体自阴道流出; (2) 酸碱试纸测定阴道分泌物 pH>7; (3) 阴道液涂片烘干后镜检可见羊齿状结晶; (4) 阴道液沉渣涂片镜检可见毳毛。

1.4 方法

1.4.1 标本采集 按照 GBS 核酸检测试剂盒标本采集要求,

孕妇取膀胱截石位, 常规消毒外阴, 灭菌窥阴器扩开阴道暴露宫颈, 用棉球擦去宫颈口黏液, 分别将 3 支无菌长棉签分别插入宫颈口内 1.5~2.0 cm, 转动 1 圈停留 30 s 后, 取宫颈分泌物置无菌试管中立即送检。将其中一支按以上方法采集的宫颈分泌物标本按临床微生物学检验常规方法(以下称为“传统培养法”)接种于哥伦比亚血平板进行培养; 另一只宫颈分泌物标本接种于 B 群链球菌显色平板(以下简称“显色培养法”)进行培养, 两个平板都置于 35℃, 5% CO₂ 培养箱, 孵育 24 h 后观察血平板上的菌落形态及 β 溶血现象和显色平板的显色情况, 发现可疑菌落后进行触酶试验、CAMP 试验和马尿酸钠水解试验, 最后用 VITEK2-compact 分析仪确证鉴定。

1.4.2 实时荧光定量 PCR 反应检测 将其中一支宫颈分泌物标本按试剂盒要求提取分泌物中细菌的 DNA(以下简称“荧光 PCR 法”), 上清液用于 PCR 扩增, 在 ABI7500 PCR 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。

1.5 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计学软件包进行数据的统计分析, 3 种检验方法检测结果分别按配对设计下两组频数分布的 χ^2 检验进行比对, 对照组和研究组 GBS 阳性发生率按完全随即设计下两组频数分布的 χ^2 检验进行比对。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 种检验方法检测 GBS 阳性率比较 对照组和研究组共 600 例产妇中, 荧光 PCR 法 GBS 阳性数 81 例, 筛查阳性率为 13.50%; 显色培养法 GBS 阳性数 60 例, 筛查阳性率为 10.00%; 传统培养法 GBS 阳性数 40 例, 筛查阳性率为 6.67%。3 种检验方法检测结果两两之间 GBS 阳性率比较采用 Fisher 精确检验, 检验水准校正为 0.017 ($\alpha = 0.05/3 = 0.017$)。可以认为 3 种方法检验出 GBS 的阳性概率不相等, 且荧光 PCR 法检测 GBS 筛查阳性率高于显色培养法和传统培养法, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.017$)。见表 1。

2.2 对照组和研究组的 B 群链球菌检测结果 由于荧光 PCR 法的检测阳性率和准确率都比显色培养法和传统培养法要高, 所以选用荧光 PCR 法的检测结果作为参考标准。对照

* 基金项目: 惠州市科技计划项目(20150806)。

组 300 例产妇中,GBS 检出 21 株,阳性率为 7.00%;研究组 300 例产妇中,GBS 检出 60 株,阳性率为 20.00%。故发生胎膜早破的产妇的 GBS 阳性率高于未发生胎膜早破的产妇,且差异具有统计学意义($\chi^2=27.708, P=0.000$)。

表 1 3 种 GBS 检验方法结果比较[n(%)]

方法	GBS 阳性	GBS 阴性	χ^2	P
荧光 PCR 法	81(13.50)	519(86.50)		
显色培养法	60(10.00)	540(90.00)	15.491	0.000
传统培养法	40(6.67)	560(93.33)		

3 讨 论

本研究结果显示,荧光 PCR 法检测 GBS 的筛查阳性率(13.50%)高于细菌培养法(10.00%和 6.67%),检测结果高于王丽等^[7]报道的 9.40%和 5.80%。3 种方法在 GBS 阳性检出率上差异有统计学意义($P<0.017$),且荧光 PCR 法的阳性检出率高于细菌培养法。另一方面,荧光 PCR 法用时短,平均 7 h 可以完成检测,而细菌培养法要平均 48 h 才能完成检测,可为尽早诊断提供依据,争取宝贵的治疗时间。

研究结果显示,胎膜早破组宫颈分泌物 GBS 阳性检出率为 20.00%,未发生胎膜早破组宫颈分泌物 GBS 阳性检出率为 7.00%,本研究结果低于李小梅等^[8]报道的 29.59%和 11.93%,也低于李晓英等^[9]报道的 29.3%和 11.7%,可能跟地区差异、试验方法、采样水平等有关。本研究中,发生胎膜早破的产妇的 GBS 阳性检出率高于未发生胎膜早破的产妇,且差异具有统计学意义($P<0.05$),说明 GBS 在生殖道内过量繁殖是围产期孕妇发生胎膜早破的诱因之一,GBS 与胎膜早破的关系十分密切,完整的胎膜对病原体的入侵具有屏障作用,若胎膜受到感染,往往会导致胎膜早破。在感染的众多病原体中,由于 GBS 对绒毛膜的吸附和穿透能力最强,所以危害也最大。寄居在宫颈、阴道、直肠和尿道等处的 GBS 可上行至胎膜,从而使胎膜感染,并可以通过炎性细胞的吞噬作用和细菌产生的蛋白水解酶的直接入侵,使胎膜局部张力降低,从而导致胎膜早破^[10-12]。

• 临床研究 •

近年来,世界各地学者对 GBS 进行大量研究,多数学者认为 GBS 与围生期感染有关,在孕晚期对所有孕妇进行筛查非常必要。实时荧光定量 PCR 技术具有灵敏度高、准确性好、用时短等特点,适合在医院进行 GBS 的筛查,特别是对于已发生胎膜早破的孕妇,应尽早完成检测,及时进行预防性治疗。

参考文献

- [1] 李凡,徐志凯. 医学微生物学[M]. 8 版. 北京:人民卫生出版社, 2013.
- [2] 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.
- [3] 时春艳,曲首辉,杨磊,等. 妊娠晚期孕妇 B 族链球菌带菌状况的检测及带菌对妊娠结局的影响[J]. 中华妇产科杂志, 2010, 45(1): 12-16.
- [4] 应群华,严文卫,丁金龙. 围产期生殖道菌群检测和 B 群链球菌筛查[J]. 中国微生态学杂志, 2006, 18(6): 491-492.
- [5] 马延敏,吴连方,黄醒华,等. 孕妇 B 组溶血性链球菌带菌与母婴预后的探讨[J]. 北京医学, 2005, 27(9): 516-518.
- [6] 乐杰. 妇产科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社, 2008: 137.
- [7] 王丽,叶巍,马杰. 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[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(16): 2220-2221.
- [8] 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.
- [9] 李晓英,段纯. 生殖道 B 群链球菌感染与胎膜早破的关系及预防[J]. 现代护理, 2005, 11(12): 944-945.
- [10] 朱敏,范建霞,程利南. 围产期 B 族链球菌感染的研究进展[J]. 中华妇产科杂志, 2005, 40(2): 137-141.
- [11] 段涛. B 族溶血性链球菌感染与妊娠[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2003, 19(12): 705-706.
- [12] 苏良香,裴美兰,张建平,等. B 族溶血性链球菌感染与胎膜早破及早产的关系[J]. 检验医学, 2007, 22(6): 728-729.

(收稿日期:2016-01-09)

Sysmex CS5100 与 Sysmex CA7000 血凝仪测定结果的可比性分析

贾晶媛,郑善奎,郝晓柯[△]

(第四军医大学附属西京医院检验科,陕西西安 710032)

摘要:目的 验证 Sysmex CS5100 和 Sysmex CA7000 两台全自动血凝仪检测结果的一致性和可靠性。方法 利用血凝仪配套的校准品 Standard Human Plasma 对 Sysmex CS5100 和 Sysmex CA7000 进行校准。校准合格后,随机选取 20 例临床患者标本对凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血酶原时间(APTT)、纤维蛋白原(FIB)、凝血酶时间(TT)、D-二聚体(DD)5 个参数进行两次平行试验并将两组数据的平均值进行对比。所选标本的测定值要尽量覆盖各个项目仪器检测的线性范围,把通过卫生部临床检验中心室内质评测定的 Sysmex CA7000 作为参考仪器, Sysmex CS5100 作为对比仪器,计算出两者的检测结果偏差,对其进行对比分析。结果 两台仪器在校准后,对选定标本所测得的各项检测结果经对比所得偏差均在允许范围内。结论 实验室检测系统的定期校准和对比,有利于检测结果的质量控制,可以确保同一检验项目在不同应用程序和设备间的检验结果的一致性和可靠性,从而更好地为临床提供优质的服务。

关键词:血凝仪; 测定结果; 可比性分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.10.036

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)10-1388-03

随着医学技术和检验医学的快速发展,凝血项目的各项检测指标被广泛应用于临床诊断和治疗,检测结果的准确性显得

[△] 通讯作者, E-mail: haoxkg@fmmu.edu.cn.