

• 首都医科大学医学检验优秀论文 •

2 种显色培养法与 PCR 法检测 B 族链球菌的效能比较

杜海燕, 钟欣[#], 谭延国[△], 张岩, 杜金龙, 唐春燕, 刘淑梅

(首都医科大学附属复兴医院检验科, 北京 100038)

摘要:目的 比较 2 种显色培养法和 PCR 法检测 B 族链球菌(GBS)的效能。方法 系列稀释 GBS 国际标准菌株(ATCC 12386), 评估各种方法能够检测出 GBS 的最低菌落数, 对 20 株质谱法鉴定的 GBS 临床分离株的检出能力, 以及抗模拟肠道菌群干扰的能力。结果 2 种显色培养法均可检出最低达 15 CFU 的菌量, 而 PCR 法则最低可检出 1.5×10^4 CFU 的菌量; 当加样量为 1.5×10^4 CFU 时, 2 种显色培养法均可检出全部的 20 株临床 GBS 分离株(100.0%), 而 PCR 法仅检出 11 株(55.0%), 差异有统计学意义($P < 0.05$), 且 PCR 法检出 GBS 临床分离株能力随着加入菌量的增加而增加。加入 1.5×10^2 CFU 模拟肠道菌群后, 显色培养法仅在加入 15 CFU 的 GBS 时, 模拟肠道菌会偶尔导致显色时间被延迟, 而 PCR 法则在该加入菌量时均呈阴性反应。结论 显色培养法检测 GBS 具有较高的效能, 相对于 PCR 法具有一定的优势。

关键词: B 族链球菌; 显色培养法; PCR

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.19.003

中图法分类号: R446.5

文章编号: 1673-4130(2020)19-2312-04

文献标识码: A

Comparison of the efficacy of two chromogenic culture methods and PCR in detecting Group B Streptococcus

DU Haiyan, ZHONG Xin[#], TAN Yanguo[△], ZHANG Yan, DU Jinlong, TANG Chunyan, LIU Shumei

(Department of Clinical Laboratory, Fuxing Hospital Affiliated to
Capital Medical University, Beijing 100038, China)

Abstract: **Objective** To compare the efficacy of two chromogenic culture methods and PCR in detecting Group B Streptococcus (GBS). **Methods** Serial diluted GBS international standard strains (ATCC 12386) were used to evaluate the ability of the methods in detecting the minimum colony number of GBS, and the resist interference of simulated intestinal flora, which were separated from clinical specimen and identified by mass spectrometry. **Results** The minimum detectable amount of GBS of both chromogenic methods was 15 CFU, while it was 1.5×10^4 CFU by PCR. All the 20 GBS strains (100.0%) could be detected by the two chromogenic culture methods, while only 11 (55.0%) could be detected by PCR, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The ability of PCR to detect GBS clinical isolates increased with the increase of the amount of bacteria added. After the addition of 1.5×10^2 CFU to simulate intestinal flora, the chromogenic time of the simulated intestinal bacteria would be delayed accidentally when 15 CFU GBS was added in the chromogenic culture method, while the PCR showed negative reaction when the amount of bacteria was added. **Conclusion** Compared with PCR, the detection of GBS by chromogenic culture method has a higher efficiency, and has certain advantages.

Key words: Group B Streptococcus; chromogenic culture methods; PCR

B 族链球菌(GBS), 也称无乳链球菌, 以其细胞壁多糖类 C 物质属于 Lancefield 抗原结构分类中的 B 群而得名^[1]。GBS 为寄生于人类下消化道或泌尿生殖道的条件致病菌, 在围生期常导致孕产妇生殖道感染、严重的新生儿感染甚至死亡, 因此围生期妇女需

要产前常规筛查 GBS, 以保证母婴的健康, 且此建议已被写入相关学科的指南和专家共识。目前, 常用筛查 GBS 的方法有传统微生物学培养法、显色培养法和分子生物学方法等, 但只有对这些检测方法的效能有了深入的认知, 方可做出正确地选择, 以便更有效

作者简介: 杜海燕, 女, 主管技师, 主要从事临床微生物检验研究。

[#] 共同第一作者: 钟欣, 女, 本科在读, 主要从事临床检验研究。

[△] 通信作者, E-mail: tanyanguo61@126.com。

本文引用格式: 杜海燕, 钟欣, 谭延国, 等. 2 种显色培养法与 PCR 法检测 B 族链球菌的效能比较[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(19): 2312-2315.

地筛查出 GBS 感染者。本文使用 GBS 标准菌株和临床分离株,对 2 种显色培养法及 PCR 法检测 GBS 的效能进行了评估,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株及试剂

1.1.1 GBS 菌株 GBS 国际标准菌株(ATCC 12386)及从临床患者分离并经质谱仪鉴定的 20 株 GBS 测试菌株。

1.1.2 干扰试验菌株 白色念珠菌(ATCC 24433)、大肠埃希菌(ATCC 25922)、粪肠球菌(ATCC 29212)共 3 株。

1.1.3 GBS 显色增菌培养基 凯必利 GBS 显色培养基(杭州创新生物技术有限公司, A 试剂)、贝索 GBS 显色培养基(珠海贝索生物技术有限公司, B 试剂),按说明书要求,以培养 18~24 h 出现橘红色的颜色变化为阳性。

1.1.4 PCR 法 GBS 检测系统 中山大学达安基因股份有限公司的 GBS 核酸检测试剂盒和扩增仪(DA-7600),结果判读以循环阈值(Ct)<38 为阳性,Ct≥38 为阴性。增菌后的 GBS 使用哥伦比亚培养基(英国

OXOID)进行分离培养。

1.2 方法 主要评估各种方法能够检测出 GBS 的最低菌落数(即检测下限)、对 20 株临床 GBS 分离株的检出能力、抗模拟肠道菌干扰的能力等。

1.2.1 各种方法能够检测出 GBS 的最低菌落数 (1)以系列稀释的 GBS 标准菌株评估。首先,将标准菌株转种到哥伦比亚培养基,于 35 ℃ 培养 18~24 h。挑取菌落配成 0.5 麦氏浊度菌液(1.5×10^8 CFU/mL)。用无菌生理盐水 10 倍系列稀释为 8 个浓度,见表 1。(2)稀释后的各浓度菌悬液分别按表 1 中的吸取量接种到哥伦比亚培养平板(每个浓度菌液平行接种 3 个平板),置 35 ℃ 培养 18~24 h 计数菌落,以验证加入的菌落数是否符合预期。(3)分别取上述各浓度的菌液 0.01 mL,接种在 A、B 显色培养基,于 35 ℃ 分别培养 6、12、18、24、30 h,于每个时间点观察培养基的颜色变化并记录,每个浓度重复 3 次;同步使用 PCR 方法,测定上述各浓度菌液。(4)于每个观察时间点从两种显色培养基中吸取 0.01 mL 菌液接种于哥伦比亚培养平板,观察是否出现 GBS 的典型菌落。

表 1 标准菌株稀释表

编号	生理盐水(mL)	菌悬液(mL)	稀释倍数	细菌浓度(CFU/mL)	吸取量(mL)	加入菌落数(CFU)
1	—	—	1	1.5×10^8	0.01	1.5×10^6
2	0.9	0.1	10	1.5×10^7	0.01	1.5×10^5
3	0.9	0.1	1×10^2	1.5×10^6	0.01	1.5×10^4
4	0.9	0.1	1×10^3	1.5×10^5	0.01	1.5×10^3
5	0.9	0.1	1×10^4	1.5×10^4	0.01	1.5×10^2
6	0.9	0.1	1×10^5	1.5×10^3	0.01	15
7	0.9	0.1	1×10^6	1.5×10^2	0.10	15
8	0.9	0.1	1×10^7	15	1.00	15

注:—表示未做处理。

1.2.2 各种方法对 20 株临床 GBS 分离株的检出能力 将 20 株 GBS 临床分离株分别配置成 1.5×10^6 CFU/mL 的菌悬液。每个菌株分别加入 0.01 mL(实际加入菌落数为 1.5×10^4 CFU)上述菌悬液于 A、B(A 试剂、B 试剂)2 种显色培养基,35 ℃ 培养 18~24 h 观察颜色变化。同时使用 PCR 法测定上述菌悬液,并观察 3 种方法的检出情况。显色法培养 18~24 h,观察颜色变化后,再吸取 0.01 mL,接种于哥伦比亚平板,用以确认有无 GBS 生长。

1.2.3 各种方法检测 GBS 的抗干扰能力 使用模拟的肠道菌悬液,观察是否能够干扰几种方法对 GBS 的检测。分别取白色念珠菌(ATCC 24433)、大肠埃希菌(ATCC 25922)、粪肠球菌(ATCC 29212)标准菌

株,按菌量为 1:1:1 的比例,配置成 1.5×10^3 CFU/mL 模拟肠道菌悬液。取 1.5×10^3 CFU/mL 的上述菌液 0.1 mL,分别加入 A、B 2 种显色培养管中培养(分别已接种有 1.5×10^3 CFU、 1.5×10^2 CFU 和 15 CFU 的 GBS 标准菌株)。置 35 ℃ 培养,并分别于 6、12、18、24、30 h 观察颜色变化和记录结果。本实验重复测定 3 次。

1.3 统计学处理 应用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,计数资料以率表示,采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 几种方法能够检测出 GBS 的最低菌落数 2.1.1 预期加入的菌落数验证 6 号菌液预期加入菌落数为 15 CFU,实际加入菌落数为 50 CFU 左右,

而 7 号和 8 号菌液与预期菌落数接近。见表 2。

2.1.2 几种方法检出 GBS 的最低菌落数 (1)A 试剂显色培养法:8 个浓度的标准菌液分别接种到 8 个增菌培养管中,培养 18 h,第 1 次试验 1~8 号均为阳性;重复第 2 次培养 18 h 时,1~6 号均为阳性,7~8 号培养 30 h 时,仍为阴性;重复第 3 次培养 18 h 时,1~6 号均为阳性,7~8 号为弱阳性,培养 24 h 和 30 h 时,7~8 号均转为阳性。(2)B 试剂显色培养法:第 1 次试验培养 18 h 时,1~7 号均为阳性,8 号培养 30 h 时,仍为阴性;第 2 次培养 18 h 时,1~8 号菌液均为阳性;第 3 次培养 18 h 时,1~8 号均为阳性。随后对 7~8 号标准菌液加做了补充试验,每个浓度 A、B 两种增菌培养试剂均分别做 10 管,结果 7、8 号标准菌液的 10 个测试管培养 18 h 时,均判定为阳性。故可得出 A、B 两种显色培养基可检出 GBS 的最低加入菌量为 15 CFU。(3)PCR 法检测 3 次重复试验显示,1~3 号标准菌液均为阳性;4 号标准菌液仅 1 次 Ct 值超出 cut-off 值(Ct 值=38.11>38),判定为阴性,5~8 号标准菌液均无扩增信号。故可得出 PCR 法可检出 GBS 的最低加入菌量为 1.5×10^4 CFU。见表 3。

表 2 系列稀释的标准菌株菌悬液菌落计数验证试验				
编号	预期加入菌落数 (CFU/mL)	菌落计数(CFU)		
		第 1 次	第 2 次	第 3 次
1	1.5×10^6	>100	>100	>100
2	1.5×10^5	>100	>100	>100
3	1.5×10^4	>100	>100	>100
4	1.5×10^3	>100	>100	>100
5	1.5×10^2	86	92	97
6	15	59	53	48
7	15	24	22	19
8	15	20	18	17

表 3 PCR 法能够检出 GBS 的最低菌量			
编号	第 1 次试验(Ct 值)	第 2 次试验(Ct 值)	第 3 次试验(Ct 值)
1	29.22	30.89	32.35
2	31.56	32.49	34.07
3	34.06	36.91	36.60
4	—	38.11	—
5	—	—	—
6	—	—	—
7	—	—	—
8	—	—	—

注:Ct<38 为阳性,Ct≥38 为阴性;—表示无扩增信号。

2.2 各种方法对 20 株临床 GBS 分离株的检出能力 20 株临床 GBS 分离株在加入 3 种检测试剂时,

加入菌落数为 1.5×10^4 CFU 时,A、B 两种显色培养基所接种的 20 株菌均为阳性;PCR 法仅有 11 株菌为阳性,另 3 株虽小于 cut-off 值,但仍有扩增信号。经 χ^2 检验,两种显色法的检出率均明显高于 PCR 法,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 4。

表 4 显色培养法和 PCR 法对 20 株临床 GBS 分离株检出能力比较(加入菌量为 1.5×10^4 CFU 时)				
方法	总菌株数 (n)	阳性菌株数 (n)	阴性菌株数 (n)	检出率 (%)
A、B 显色培养法	20	20	0	100.0 ^a
PCR 法	20	11	9	55.0

注:与 PCR 法比较, $\chi^2=11.6$,^a $P<0.05$ 。

2.3 模拟肠道菌对 3 种方法的干扰 A、B 试剂(分别加入 1.5×10^3 、 1.5×10^2 、15 CFU 的 GBS 菌液),在分别加入 1.5×10^2 CFU 模拟肠道菌后所重复的 3 次试验中,2 种试剂仅加入 15 CFU 的 GBS 时出现 1 次显色被延迟至 24~30 h,而未加干扰菌时,该浓度均在增菌培养 18 h 后出现清晰的显色反应。而 2 种试剂其余各浓度均于培养 18 h 显色明显,而仅加入模拟菌液的对照组则均呈阴性反应。由于上述 GBS 加入菌液浓度过低,使用 PCR 法检测时均为阴性反应。

3 讨 论

GBS 多定植于健康成年人的下消化道和泌尿生殖道,人群定植率为 15%~30%。当免疫力低下或缺陷时,易发生 GBS 感染^[2-3]。对于围生期孕妇来说,GBS 的危害远高于非妊娠女性。孕妇一经感染,除可引起孕妇胎膜早破、早产和产后产褥感染外,还会导致新生儿发生肺炎、败血症、脑膜炎、神经系统后遗症,甚至死亡^[4-5]。此外,GBS 具有较强的绒毛膜穿透力,可感染胎盘绒毛膜,从而进一步感染新生儿^[6-9]。因此,选择可靠的 GBS 检测方法,尽可能地发现携带 GBS 的孕妇具有重要意义。

本研究使用的两种 GBS 增菌显色培养法,经过 18~24 h 的增菌培养,均可检出最低达 15 CFU 的加入量,具有较高的灵敏度。该方法利用的是 GBS 具有产生橙色(橘红色)类胡萝卜素的独有特性,液体培养基相对于固体培养基,微生物接种的成活率和繁殖效率均较高,培养基从白色到橙色的变化表示 GBS 的存在,菌落数量培养基中还加入了促进 GBS 快速生长和抑制其他杂菌生长的物质,这也是这种方法能够测出较少菌落数量和较短培养时间的关键所在。PCR 法可以通过检测标本中 GBS 特定基因,从而判断 GBS 的存在,理论上具有较高的灵敏度和准确度及报告时间快等,但本研究显示其最低只能检测出 1.5×10^4 CFU 的加入量。这可能与不同厂商的生产工艺有关,故无论使用任何一种方法,投入使用前均

需进行必要的性能验证。

GBS 增菌显色培养法对 20 株临床分离株的检出能力较为稳定,受所加入菌落数影响较小;显色培养 12 h 时,各种 GBS 加入量的培养基便陆续出现轻微的颜色变化,在 18 h 后均能出现稳定颜色反应,而 PCR 法则随着加入 GBS 菌落数的降低,检出能力降低很明显,这会明显影响临床孕产妇 GBS 的检出率,但对处于未知 GBS 定植状态且没有其他危险因素的是月孕妇,可能更适用 PCR 法^[10-13]。

本研究结果还显示,仅加入 15 CFU 的 GBS 时,模拟肠道菌会偶尔导致显色时间被延迟的现象,故建议在 18~24 h 未出现显色反应的标本,可适当增加判读时间至 30 h。

4 结 论

综上所述,显色培养法能够检测出更少菌落数的 GBS,有助于提高孕妇产前 GBS 的检出率,由于其操作简便、结果易于判读,值得推广应用。

参考文献

[1] 李相会,孙玲,孙健,等.无乳链球菌检测的影响因素及方法学改进[J].临床输血与检验,2017,19(6):609-611.

[2] 刘家玲.无乳链球菌的研究进展[J].贵州医药,2018,42(10):1180-1184.

[3] 林雅茵,林新祝.围产期 B 族链球菌感染血清型研究进展[J].中华围产医学杂志,2018,21(12):836-839.

[4] STEIN R A. Group B streptococci in pregnancy: new perspectives for old challenges[J]. Int J Clin Pract, 2019, 73(5): e13340.

[5] 曾白华,尹维,吕禄平,等.围生期 B 族链球菌感染临床意

义及检测方法研究进展[J].医学综述,2017,23(9):1839-1843.

[6] 刘沃满,唐玉芬,李祝坤.妊娠晚期孕妇 B 族链球菌实时荧光定量 PCR 检测结果分析[J].中国当代医药,2019,26(30):138-140.

[7] 王超,赵扬玉.规范临床用药,改善母婴结局:美国《预防新生儿早发型 B 族链球菌病:ACOG 委员会共识》解读[J].协和医学杂志,2020,11(4):402-407.

[8] 周锦龙,唐文燕.孕晚期阴道 B 族链球菌定植对母婴预后的影响[J].江西医药,2019,54(11):1412-1413.

[9] 薛志华,张英芝.新生儿 B 族溶血链球菌败血症临床特征分析[J].当代医学,2019,25(22):42-44.

[10] VERANI J R, MCGEE L, SCHRAG S J, et al. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: revised guidelines from CDC, 2010[J]. MMWR Recomm Rep, 2010, 59(RR-10):1-36.

[11] CHOU L, GRIFFIN M J, FRAITES T, et al. Phenotypic and genotypic heterogeneity among *Streptococcus iniae* isolates recovered from cultured and wild fish in North America, Central America and the Caribbean islands[J]. J Aquat Anim Health, 2014, 26(4):263-271.

[12] KEIRSTEAD N D, BRAKE J W, GRIFFIN M J, et al. Fatal septicemia caused by the zoonotic bacterium *Streptococcus iniae* during an outbreak in Caribbean reef fish[J]. Vet Pathol, 2014, 51(5):1035-1041.

[13] DELANNOY C M, CRUMLISH M, FONTAINE M C, et al. Human *Streptococcus agalactiae* strains in aquatic mammals and fish[J]. BMC Microbiol, 2013, 13:41.

(收稿日期:2020-03-03 修回日期:2020-07-03)

(上接第 2311 页)

[9] 张晓慧,张娜.脑梗死患者血浆纤维蛋白原水平升高对病情、预后及复发的影响[J].山东医药,2018,58(29):58-60.

[10] 范文锋,黄韶荣,罗维.急性脑梗死患者血清中 Lp(a)、CRP、D-二聚体及纤维蛋白原水平变化的临床意义[J].中国医药科学,2018,8(19):134-137.

[11] KOFOED S. Fibrinogen predicts ischaemic stroke and advanced atherosclerosis but not echolucent, rupture-prone carotid plaques: The Copenhagen City Heart Study[J]. Eur Heart J, 2003, 24(6):567-576.

[12] 赵士娇,韩雪,高燕军.血浆骨桥蛋白、纤维蛋白原水平与急性脑梗死患者神经功能缺损程度及预后相关性的前瞻性研究[J].实用心脑血管病杂志,2018,26(8):32-36.

[13] SWAROWSKA M, POLCZAK A, PERA J, et al. Hyperfibrinogenemia predicts long-term risk of death after ischemic stroke[J]. J Thromb Thrombolysis, 2014, 38(4): 517-521.

[14] 马行,朱晓临.高血糖对脑梗死患者预后影响的研究进展[J].临床内科杂志,2017,34(10):714-715.

[15] SHI S H, JI X M. Normobaric oxygen treatment in acute ischemic stroke: a clinical perspective[J]. Med Gas Res, 2016, 6(3):147-153.

[16] 石冬梅,谭兰.急性脑梗死早期患者血糖水平对预后的影响[J].山东医药,2014,54(23):45-46.

[17] SALWA E T, KEITH W M. Thrombolysis and thrombectomy for acute ischaemic stroke[J]. Clin Med (Lond), 2017, 17(2):161-165.

[18] LIU B, LI Q. A highly similar mathematical model for cerebral blood flow velocity in geriatric patients with suspected cerebrovascular disease[J]. Sci Rep, 2015, 5:15771.

[19] CHEN R, OVBIAGELE B. Diabetes and stroke: epidemiology, pathophysiology, pharmaceuticals and outcomes[J]. Am J Med Sci, 2016, 351(4):380-386.

(收稿日期:2020-03-08 修回日期:2020-07-03)