

孕晚期阴道及肛周拭子不同方法检测 B族链球菌和真菌的效果评价及耐药分析*

武爱荣 (西安高新医院检验科, 西安 710075)

摘要:目的 探讨不同方法检测孕晚期孕妇生殖道 B 族链球菌(GBS)和真菌的效果评价,并对分离培养出的 GBS 进行耐药性分析,为临床提供有效的预防和治疗依据。方法 选择 2013 年 1 月~2017 年 12 月西安高新医院产科门诊孕晚期孕妇 22 938 例,采集孕 35~37 周孕妇阴道拭子和肛周拭子标本,按照随机分组原则,采用血琼脂培养法、显色培养法及聚合酶链反应(PCR)3 种方法进行 GBS 检测,同时用前两种培养法进行真菌检测,并对分离出的 368 株 GBS 进行药敏试验。结果 22 938 例孕妇中,6 782 例采用血琼脂培养,检出 GBS 105 例(阳性率 1.5%),检出真菌 665 例(阳性率 9.8%);5 957 例采用显色培养法,检出 GBS 263 例(阳性率 4.4%),检出真菌 72 例(阳性率 1.2%);10 199 例采用 PCR 法,检出 281 例阳性(阳性率 2.8%)。分离出 368 株 GBS 经定量药敏实验,其对氨苄西林、青霉素、头孢吡肟、头孢噻肟、头孢曲松、利奈唑胺和万古霉素的敏感率均为 100%;对红霉素、克林霉素和左氧氟沙星的敏感率分别为 17.9%、25.4%和 66.7%。三种筛查 GBS 的方法比较,差异均有统计学意义($\chi^2=94.05, P<0.05$),显色培养法的阳性率最高。两种培养方法对真菌的检测比较,差异有统计学意义($\chi^2=429.99, P<0.05$),血琼脂培养法检出率较高。结论 显色培养法筛查 GBS 有望成为孕晚期孕妇检测 GBS 感染的一种首选方法,而血琼脂培养法则有利于对孕妇阴道真菌的检出,建议两种方法联合使用,以提高对 GBS 和真菌的检出率,减少因 GBS 和真菌引起的胎膜早破和新生儿感染。

关键词: B 族链球菌;真菌;妊娠晚期;检测方法;耐药分析

中图分类号:R378.12;R379;R446.5 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2018)03-108-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2018.03.027

Effect Evaluation and Drug Resistance Analysis of B *Streptococcus* and *Fungus* in Swab of Vaginal and Perianal Detected with Different Methods in Late Pregnancy

WU Ai-rong (Department of Clinical Laboratories, Xi'an Gaoxin Hospital, Xi'an 710075, China)

Abstract: Objective To explore the different methods to detect pregnant women late in pregnancy vaginal group B *Streptococcus* (GBS) and fungi effect evaluation, and drug resistance analysis was carried out on the separation of cultivate of GBS, provide a basis for effective prevention and treatment in clinical. **Methods** Chose 22 938 cases of pregnant women late in pregnancy, in maternity clinic of Xi'an Gaoxin Hospital from January 2013 and December 2013. Gathering pregnant women vaginal swabs and crissum swab specimens at 35 to 37 weeks, and in accordance with the principle of random grouping, the blood AGAR culture method, chromogenic culture method and polymerase chain reaction (PCR) were used to detect the GBS. At the same time, fungi was detected with the first two kinds of culture method, and 368 GBS isolated were tested for drug sensitivity. **Results** Among the 22 938 samples of pregnant women, 6 782 were cultured with blood agar, which detected GBS 105 (1.5% of the positive rate) and 665 cases (9.8% of the positive rate). Among the 5 957 cases, the color culture method was adopted, and GBS 263 cases were detected (with a positive rate of 4.4%), and 72 cases of fungus were detected (positive rate 1.2%). PCR was used to detect 281 positive cases (2.8% of positive rate). The sensitivity of 368 strains of GBS to ampicillin, penicillin, cefepime, cefotaxime, ceftriaxone, lynazolamide and vancomycin were detected by quantitative drug sensitivity test. The sensitivity of erythromycin, clindamycin and levofloxacin was 17.9%, 25.4% and 66.7% respectively. There were statistically significant differences in the three methods of screening GBS ($\chi^2=94.05, P<0.05$). The positive rate of the color culture method was the highest, and there were statistically significant differences between the two cultures in the detection of fungi ($\chi^2=429.99, P<0.05$). The detection rate of blood agar culture was higher. **Conclusion** Chromogenic culture method screening the GBS is expected to become pregnant women late in pregnancy test a preferred method of GBS infection, and blood AGAR culture law, conducive to the detection of pregnant women vaginal fungal suggest two methods used in combination, in order to improve the detection rate of GBS and fungi, reduce premature rupture of membranes caused by GBS and fungi and neonatal infections.

Keywords: group B *Streptococcus*; fungi; in late pregnancy; detection method; analysis of drug resistance

B 族链球菌(group B *streptococcus*, GBS)亦称 无乳链球菌,是一种 β 溶血的革兰阳性链球菌,

* 作者简介:武爱荣(1976—),女,学士,主管检验师,主要从事病原微生物感染诊断工作。

GBS是人类泌尿生殖道和胃肠道的定植菌,一般孕妇的定植率为10%~30%^[1],且定植率随年龄、人种、地域的不同而不同,据报道,我国孕妇定植率为5%~15%^[2]。GBS可引起围产期孕妇严重感染,导致胎膜早破、早产、新生儿的宫腔感染和败血症等,严重时危及生命。而真菌作为围产期孕妇的另一种条件致病菌,也会导致胎膜早破和早产等不良妊娠结局。所以,检测孕晚期孕妇生殖道GBS和真菌的定植状况,采取有效的预防和治疗措施是非常有必要的。本文采用血琼脂培养法、显色培养法及PCR法三种方法,分别进行GBS和真菌筛查,并对GBS药物敏感性进行分析,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选择我院2013年1月~2017年12月产科门诊就诊孕妇22 938例,孕龄35~37周,孕妇年龄21~40岁,平均年龄27.6岁,由接诊医生按规范采集孕妇阴道和肛周拭子,患者或家属立即送检。

1.2 仪器和试剂

1.2.1 GBS培养鉴定:VITEK2 Compact细菌鉴定仪、GP鉴定卡、哥伦比亚血琼脂培养基、B族链球菌筛查培养基均为梅里埃公司产品。

1.2.2 GBS的药敏定量试验:应用梅里埃VITEK2 Compact鉴定仪、GP67药敏卡,质控菌株:无乳链球菌ATCC12386和金黄色葡萄球菌ATCC25923,均购自中国卫生部临床检验中心。

1.2.3 PCR检测:试剂选用泰普生物有限公司生产的GBS核酸检测试剂盒,GBS核酸检测阴、阳性对照品,均由试剂盒厂家提供;仪器为上海宏石SLAN-48P荧光定量PCR扩增仪。

1.2.4 真菌筛查:哥伦比亚血琼脂培养基、B族链球菌筛查培养基及念珠菌显色培养基均为梅里埃公司产品。

1.3 方法

1.3.1 标本采集:对孕35~37周的孕妇,参照2002年CDC推荐的方法,进行规范取材。准备两根无菌女性拭子,拿一根棉拭子放入阴道内1/3处,采取阴道分泌物,取材时不需要使用阴道窥器;另一根棉拭子插入肛门至肛门括约肌上2~3 cm处,取直肠分泌物。

1.3.2 GBS筛查方法

1.3.2.1 血琼脂培养法:将采集的拭子立即送到实验室,接种于哥伦比亚血琼脂培养基,放于35℃ 5 ml/dl CO₂培养箱孵育18~36 h,挑取β溶血灰白小菌落,经革兰氏染色镜检为阳性球菌,触酶试验(一),分纯并做CAMP试验:即将待测菌株与金黄色葡萄球菌标准菌株(ATCC25923),在羊血培

养基上成90°角垂直划线,放于37℃培养箱孵育过夜,如果在金黄色葡萄球菌的β溶血素与CAMP因子扩散区域出现三角形增强β溶血区,则该试验为阳性;待次日CAMP试验(+),用VITEK2 Compact进行鉴定及药敏试验。

1.3.2.2 显色培养法:将采集的拭子尽快运送到实验室,直接接种于显色培养基,放于37℃培养箱孵育18~36 h,挑取红色菌落,做CAMP试验,并分纯培养;待次日CAMP试验(+),用VITEK2 Compact系统进行鉴定和药敏试验。

1.3.2.3 荧光PCR法:将采集的阴、肛拭子作为一组标本,严格按照GBS核酸检测试剂盒说明书要求进行检测和结果判定。

1.3.3 真菌筛查:将血琼脂培养基上灰白卫星样小菌落或灰白小菌落、B族链球菌筛查培养基上呈浅绿色小菌落或灰白小菌落,进行涂片和革兰氏染色,当镜检为真菌孢子时,再接种于念珠菌显色培养基,参照其产品说明书,判断显色结果。

1.4 统计学分析 采用SPSS17.0统计学软件,进行数据分析,计数资料采用阳性率表示,组间差异比较采用多个样本率的 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三种方法检测GBS的结果比较 见表1。显色培养法筛查GBS阳性率明显高于PCR法和血琼脂培养法,该显色方法检出的263株呈红色菌落,CAMP筛查试验阳性261株,阳性率为99.2%(261/263),263株经VITEK2 Compact鉴定仪进行菌种鉴定,全部为GBS。三种方法检测GBS比较差异有统计学意义($\chi^2=94.05, P<0.05$)。虽然某些链球菌在该显色培养基上也呈现与GBS相同的颜色,但在本研究中还未遇到。

表1 血琼脂培养法、显色培养法和PCR法检测结果比较

方 法	总例数	阳性例数	阴性例数	阳性率(%)
血琼脂培养法	6 782	105	6 677	1.5
PCR法	10 199	281	9 918	2.8
显色培养法	5 957	263	5 694	4.4
合 计	22 938	649	22 289	8.7

2.2 两种培养方法检测真菌的结果比较 22 938例孕妇标本中,6 782例采用血琼脂培养,检出真菌665例(阳性率9.8%);5 957例采用显色培养基直接培养,检出真菌72例(阳性率1.2%),两种培养方法对真菌的检出率比较,差异有统计学意义($\chi^2=429.99, P<0.05$)。

2.3 培养法分离出的368例GBS的耐药性分析

对培养法分离出的 368 例 GBS 进行药物敏感的 MIC 值检测,结果见表 2。

表 2 培养分离出的 368 例 GBS 的耐药性分析 ($n=368$)

抗生素	敏感率		中介率		耐药率	
	MIC	%	MIC	%	MIC	%
青霉素	≤ 0.12	100	-	0	-	0
氨苄西林	≤ 0.25	100	-	0	-	0
红霉素	≤ 0.25	17.96	0.5	8.98	≥ 1	73.06
克林霉素	≤ 0.25	23.08	0.5	2.31	≥ 1	74.62
左氧氟沙星	≤ 2	33.33	4	5.26	≥ 8	61.40
头孢吡肟	≤ 0.5	100	-	0	-	0
头孢曲松	≤ 0.5	100	-	0	-	0
头孢噻肟	≤ 0.5	100	-	0	-	0
利奈唑胺	≤ 2	100	-	0	-	0
万古霉素	≤ 1	100	-	0	-	0

3 讨论

3.1 自 20 世纪 70 年代以来,有报道称 GBS 是侵入性新生儿感染的致病菌,而导致侵入性新生儿感染最重要的危险因素是产妇泌尿生殖道或胃肠道定植的 GBS。1996 年,美国疾病预防控制中心发布了用于预防新生儿 GBS 感染的推荐方案,随后,分别在 2002 年与 2010 年进行了修订。这些指南的实施,大幅度减少了早发型新生儿 GBS 感染^[1]。但由于很多医院在筛查方法上并没有按照美国推荐的方法统一执行,而且 GBS 定植率随人种、地域、年龄不同而不同,检出率差异很大。国内有报道妊娠妇女 GBS 带菌率为 3.5%~32.4%^[3],如厦门地区的 14.43%^[4],山东地区的 32.2%^[5],北京地区的 7.3%^[6],本研究结果显示西安地区妊娠妇女 GBS 带菌率较低(4.4%),其中血琼脂培养法和 PCR 法的阳性率分别为 1.5%和 2.8%,明显低于显色培养基法(4.4%),这可能与取材、工作人员对该菌的认识、实验操作等有关。虽然 PCR 法用时短,但对实验室条件要求高、成本高、不易普及,也无法给临床提供药敏结果。而显色培养基是一种含有 3 种显色底物和抗生素的选择性培养基,标本直接接种,GBS 经 18~24 h 呈典型红色菌落,即可分纯鉴定,该方法检出率高、无需增菌、方便操作,培养出的 GBS 经分纯后可进行药敏试验,对实验室条件要求不高,有微生物实验室的医院均能开展。因此,显色培养基有望成为妊娠晚期孕妇常规筛查 GBS 定植的一种准确快速的方法。

3.2 健康妇女泌尿生殖道定植多种微生物,与宿主之间保持微生态平衡。而妊娠期妇女受激素水平的影响,阴道黏膜充血和通透性增加,容易发生感染,有研究表明感染是被公认的重要发病原

因^[7]。假丝酵母菌为阴道内条件致病菌,能够穿透绒毛膜并侵犯胎儿,导致胎膜早破和早产。杨淑华等^[8]报道 131 例胎膜早破患者中,真菌占生殖道分泌物致病菌的 51.1%。虽然国内张利侠等^[9]报道真菌对引起胎膜早破并没有统计学意义的结论,这可能与所选人群有关,毕竟引起胎膜早破并不仅仅是这一种感染因素导致的。杨生宇等^[10]报道孕晚期筛查真菌对预防胎膜早破、新生儿感染等不良妊娠结局具有非常重要的意义。本研究选用的两种培养法对真菌有一定的检出优势,尤其是血琼脂培养阳性率为 9.8%,低于李馨等^[11]报道的 15.74%。通过本次研究,虽然显色培养基对真菌检出率较低,但如果将两种方法联合使用,同时提高实验室人员对真菌的重视和认识,在提高真菌检出率的同时,可将 GBS 一并检出,做到早发现、早治疗。

3.3 参照美国疾病预防控制中心(CDC)推荐,把青霉素 G 和氨苄青霉素作为妊娠晚期 GBS 的预防性用药,对青霉素过敏的孕妇,可使用红霉素或克林霉素^[12]。本研究结果发现,检测 368 株 GBS,对青霉素、氨苄西林、头孢曲松、头孢噻肟、头孢吡肟、利奈唑胺和万古霉素的敏感率均为 100%;对红霉素、克林霉素和左氧氟沙星的敏感率分别为 17.9%、25.4%和 66.7%。与国内相关的研究敏感率一致^[5,13]。随着细菌耐药性的改变,尤其是 GBS 对红霉素类和克林霉素类药物耐药性的不断升高,临床在治疗 GBS 感染的患者时,应根据药敏结果选择用药。有研究表明^[14],妊娠晚期给予抗生素治疗,不仅可有效减少胎膜早破、早产和新生儿败血症等,还可以提高阴道分娩率,降低剖腹产比例。我院自 2013 年至今,有一例新生儿是由 GBS 引起血流感染,但经查询该患儿是从外院转来的,其母亲在我院无产检记录,说明检测孕妇 GBS 感染状况,及时采取治疗措施,对预防胎膜早破、新生儿感染等不良妊娠结局有重要的临床价值。

参考文献:

- [1] 王 辉,马筱玲,钱 渊,等.临床微生物学手册:链球菌属[M]. 11 版. 北京:中华医学电子音像出版社, 2017:470-480.
Wang H, Ma XL, Qian Y, et al. Clinical microbiology manual: *Streptococcus*[M]. 11th Ed. Beijing: Chinese Medical Electronic Audio and Video Publishing House, 2017:470-480.
- [2] Wang P, Tong JJ, Ma XH, et al. Serotypes, antibiotic susceptibilities, and multi-locus sequence type profiles of *Streptococcus agalactiae* isolates circulating in Beijing, China[J]. PLoS One, 2015, 10(3):e0120035.
- [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.
- Shi CY, Qu SH, Yang L, et al. Detection of maternal colonization of group B *Streptococcus* in late pregnancy by real-time polymerase chain reaction and its effect on perinatal outcome [J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2010, 45(1): 12-16.
- [4] 林新祝, 吴健宁, 张雪芹, 等. 晚孕期阴道 B 族链球菌定植与新生儿感染的关系[J]. 中华围产医学杂志, 2016, 19(7): 491-496.
- Lin XZ, Wu JN, Zhang XQ, et al. Relationship between group B *Streptococcus* colonization in late pregnancies and neonatal infection [J]. Chinese Journal of Perinatal Medicine, 2016, 19(7): 491-496.
- [5] 吴红光, 杨文东. 围产期孕妇生殖道 B 族链球菌感染与耐药性分析[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(1): 104-107.
- Wu HG, Yang WD. Group B *Streptococcus* infection in vaginal tract of perinatal pregnant women and drug resistance analysis [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(1): 104-107.
- [6] 王茜, 马良坤, 宋英娜, 等. 妊娠晚期 B 族链球菌感染的筛查方法及妊娠结局分析[J]. 中华医学杂志, 2016, 96(15): 1188-1191.
- Wang Q, Ma LK, Song YN, et al. Rapid group B *Streptococcus* screening methods in late pregnancy and the maternal neonatal outcomes [J]. Natl Med J China, 2016, 96(15): 1188-1191.
- [7] 李小侠, 解娟, 詹颀, 等. 围产期胎膜早破与生殖道病原菌感染的分析[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(4): 90-92.
- Li XX, Xie J, Zhan J, et al. Analysis of perinatal premature rupture of membranes and reproductive tract pathogen infection [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(4): 90-92.
- [8] 杨淑华, 刘颖, 王建红, 等. 需氧菌与假丝酵母菌感染对胎膜早破母婴结局影响的研究[J]. 中国全科医学, 2014, 17(7): 803-806.
- Yang SH, Liu Y, Wang JH, et al. The correlation between aerobic bacteria and candida infection and the poor pregnancy outcome of premature rupture of membranes [J]. Chinese General Medicine, 2014, 17(7): 803-806.
- [9] 张利侠, 吴桂清, 秦利, 等. 围产期发生胎膜早破的多因素分析[J]. 现代检验医学杂志, 2013, 28(6): 142-143, 146-147.
- Zhang LX, Wu GQ, Qing L, et al. Analysis multiple factors to perinatal premature rupture of membranes occurred [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2013, 28(6): 142-143, 146-147.
- [10] 杨生宙, 李祥顺, 陈秀莲, 等. 临产孕妇念珠菌感染及不良妊娠结局调查[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(2): 146-148.
- Yang SZ, Li XS, Chen XL, et al. Investigation analysis of monilia infection and adverse pregnancy outcome of pregnant women in labor [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(2): 146-148.
- [11] 李馨, 江元, 范琦慧. 早产胎膜早破患者阴道分泌物培养结果分析[J]. 浙江预防医学, 2014, 26(1): 92-94.
- Li X, Jiang Y, Fan QH. Analysis of the results of vaginal secretion culture in premature rupture of premature membranes [J]. Zhejiang Preventive Medicine, 2014, 26(1): 92-94.
- [12] 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(RR-10): 36.
- [13] 李亚梅, 张利侠, 秦利, 等. 围产期孕妇 B 族链球菌的感染和耐药性检测及对妊娠结局的影响[J]. 现代检验医学杂志, 2013, 28(1): 87-89.
- Li YM, Zhang LX, Qi L, et al. Detection of group B *Streptococcus* and analysis of drug resistance in perinatal pregnant women and the influence of the pregnancy outcome [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2013, 28(1): 87-89.
- [14] 刘园利, 李萌, 肖文平. 妊娠晚期阴道 B 族溶血性链球菌检测及治疗临床观察分析[J]. 现代诊断与治疗, 2017, 28(10): 1843-1845.
- Liu YL, Li M, Xiao WP. Clinical observation and analysis on the detection and treatment of hemolytic streptococci in the late pregnancy of the vagina [J]. Modern Diagnosis and Treatment, 2017, 28(10): 1843-1845.

收稿日期: 2018-03-27

修回日期: 2018-05-10

(上接 107 页) Clinical Chemistry, 1992, 38(11): 2256-2260.

- [7] Sandberg S, Fraser CG, Horvath AR, et al. Defining analytical performance specifications: consensus statement from the 1st strategic conference of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine [J]. Clinical Chemistry & Laboratory Medicine, 2015, 53(6): 833-835.
- [8] Ricos C, Alvarez V, Cava F, et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress [J]. Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation, 1999, 59(7): 491-500.
- [9] Carobene A, Strollo M, Jonker N, et al. Sample collec-

tions from healthy volunteers for biological variation estimates' update: a new project undertaken by the working group on biological variation established by the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine [J]. Clinical Chemistry & Laboratory Medicine, 2016, 54(10): 1599-1608.

- [10] Bartlett WA, Braga F, Carobene A, et al. A checklist for critical appraisal of studies of biological variation [J]. Clinical Chemistry & Laboratory Medicine, 2015, 53(6): 879-885.

收稿日期: 2018-03-01

修回日期: 2018-03-19