

B 群链球菌免疫层析法的建立及其临床应用*

申 旺¹, 潘秀华², 周剑青², 张晓丽², 余志华², 汤永平^{2△} (1. 广东省江门市五邑中医院检验科 529000; 2. 广州市微米生物科技有限公司 510663)

【摘要】目的 建立一种 B 群链球菌(GBS)的胶体金免疫层析检测方法, 并进行临床应用评价。**方法** 收集 202 例阴道分泌物标本, 采用细菌分离培养法作为金标准对标本的 GBS 进行检测, 同时采用以双抗体夹心法为基础研制出 B 群链球菌胶体金免疫层析试纸条检测作为对照, 分析其灵敏度、特异度, 计算 Kappa 值分析两种方法的一致性。**结果** 免疫层析法检测 GBS 的敏感度为 97.50%, 特异度为 97.54%; 与细菌分离培养法的总符合率为 97.52%, Kappa 值为 0.948。**结论** 免疫层析法检测 GBS 具有较高的敏感度和特异度, 且简便准确, 对 GBS 的筛查和快速诊断具有重要的临床应用价值。

【关键词】 B 群链球菌; 胶体金免疫层析; 培养

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.08.002 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)08-1012-04

Establishment of immunochromatographic assay of group B streptococcus and its clinical application* SHEN Wang¹, PAN Xiu-hua², ZHOU Jian-qing², ZHANG Xiao-li², YU Zhi-hua², TANG Yong-ping^{2△} (1. Department of Clinical Laboratory, Wuyi Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jiangmen, Guangdong 529000, China; 2. Guangzhou Weimi Bio-Tech Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong 510663, China)

【Abstract】Objective To establish a colloidal gold-based immunochromatographic assay of group B streptococcus (GBS) and to conduct its clinical application evaluation. **Methods** Totally 202 vaginal secretion samples were collected. GBS of samples was detected by the bacterial isolation culture method as the gold standard, meanwhile the GBS colloidal gold strip developed based on the double-antibody sandwich method was used as control. Its sensitivity and specificity were analyzed. The Kappa value was calculated and the consistence of these two methods was analyzed. **Results** The sensitivity and specificity of the immunochromatography method were 95.60% and 98.78% respectively, the total coincidence rate with the bacterial isolation method was 97.66%, Kappa was 0.949. **Conclusion** The immunochromatography method has higher sensitivity and higher specificity for detecting GBS, is simple and accurate, which has an important clinical application value for the screening and rapid diagnosis of GBS.

【Key words】 group B streptococcus; colloidal gold immune chromatography; culture

B 群链球菌(GBS)亦称无乳链球菌, 属于 β 溶血的革兰阳性链球菌。研究表明, GBS 是围产期严重感染性疾病的主要致病菌之一, 可导致母婴不良后果, 在围产医学中占有不可忽视的地位^[1]。孕产妇生殖道感染 GBS, 可导致泌尿系统感染、胎膜早破、早产、死胎、产褥感染、菌血症等^[2]。新生儿感染 GBS 常表现为肺炎、败血症和脑膜炎, 是导致新生儿死亡的主要原因, 已引起了各级临床医疗机构的重视^[3]。目前常用的检测方法有细菌分离培养法、核酸探针检测、荧光原位杂交法、脉冲式凝胶电泳法、革兰氏染色法等, 但这些检测方法需要专业的仪器设备与技术人员, 成本高, 检测时间长, 限制了其临床应用^[4]。因此, 本研究研制了一种快速诊断 GBS 的新方法——胶体金免疫层析法, 经验证该方法与细菌分离培养法有良好的一致性, 且操作简便、快速、灵敏、直观, 适合在临床推广应用。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 在多家医院共收集到 202 例孕妇阴道分泌物标本, 平均年龄(26.2±5.8)岁, 平均孕周(36.4±2.4)周。所有孕妇无阴道出血; 采样前 1 周内均为接受抗菌药物治疗; 采样前 24 h 内未接受阴道清洗、消毒液、药膏等处理。所有分

物标本已通过 GBS 细菌分离培养法(金标准)鉴定其阴阳性。

1.2 仪器与试剂 H1850R 高速冷冻离心机(湖南长沙湘仪离心机仪器有限公司)、C6M 切条机(韩感中国)、HDM-2000 调温恒温电热套(常州国华电器有限公司)、HM3030 三维平面点膜喷仪(上海金标生物科技有限公司)、GZX-9140MBE 电热鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)、U3010 紫外可见光谱仪(日本 HITACHI 公司)、Tecna12 透射电子显微镜(荷兰 FEI)。抗 GBS 单克隆抗体购于 biospecific; 液体生化防腐剂 ProClin 300、枸橼酸钠、氯金酸购于 Sigma; 硝酸纤维素膜(NC 膜)、玻璃纤维素垫、吸水垫、聚氯乙烯板(PVC 板)、胶体金聚酯结合垫、抽提管、羊抗鼠 IgG 等购于上海杰一生物技术有限公司; 菌种购自美国菌种保藏中心(ATCC)。

1.3 胶体金免疫层析试纸条的研制

1.3.1 胶体金颗粒的制备与鉴定 量取 200 mL 纯化水加入烧瓶中, 在磁力搅拌器作用下加热至约 90~95℃, 加入 1% 的氯金酸溶液 2 mL, 继续加热搅拌至沸腾。充分沸腾 10 s 后, 迅速加入现配的 1% 枸橼酸钠溶液 4 mL, 加速搅拌沸腾反应 5 min, 液体由透明变成黑色, 再变成紫红色透明, 冷却至室温待用。制备完毕, 通过透射电镜与紫外扫描光谱仪进行表征

* 基金项目: 广州市科技计划项目(201501010052)。

作者简介: 申旺, 男, 主管检验技师, 本科, 主要从事生化与免疫研究。△ 通讯作者, E-mail: 346853531@qq.com。

分析。

1.3.2 胶体金最佳抗体标记量的确定 将制备的胶体金溶液,以 0.1 mol/L 碳酸钾调 pH 值至 8.0。将 0.1 mL 系列浓度(0、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12、0.14、0.16 mg/mL)的抗 GBS 单克隆抗体加入到 1 mL 的胶体金溶液中,另设对照管。10 min 后加入 0.1 mL 10% 的氯化钠溶液(NaCl),混匀后室温静置 2 h,以最接近对照管胶体金颜色的浓度为准,在此基础上再加 20% 的量即为最佳抗体标记量。

1.3.3 胶体金标记抗体的制备 取 100 mL 制备的胶体金溶液,加入 1.2 mg 抗 GBS 单克隆抗体,室温轻轻搅拌 30 min,静置 1 h。在磁力搅拌下,逐滴加入 1 mL 10% 牛血清清蛋白溶液(BSA),搅拌 20 min。12 000 r/min 离心 20 min,弃上清液。加入 2 mL 含 1% BSA、5% 蔗糖、0.01% ProClin300 pH 8.5 的 Tris-HCl 溶液使沉淀重悬,4 °C 保存备用。

1.3.4 样品垫的预处理 制备 2% BSA、0.5% 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、2.5% 蔗糖、0.5% 吐温(Tween)、0.2% 酸性酪蛋白、0.01% ProClin300 的磷酸盐缓冲液(PBS 0.01 mol/L),将样品垫浸泡其中,30~37 °C 烘干 16 h 后加入干燥剂热合封口,备用。

1.3.5 金标抗体工作浓度的确定 将金标抗体重悬液作系列稀释(1:2、1:4、1:6、1:8、1:10、1:15),用三维平面点膜喷金仪以喷金量 0.8 μL/mm,喷嘴移动速度为 80 mm/s,均匀喷于聚酯纤维素膜上,30~37 °C 烘干 16 h 后加入干燥剂热合封口。用它们分别检测阳性和阴性标本,再根据检测带显色深度、NC 膜背景、灵敏度、显色时间等指标确定最佳金标抗体工作浓度。

1.3.6 检测线、质控线的包被浓度的确定 将抗 GBS 单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 稀释成系列浓度(0.5、0.8、1.2、1.5、2.0、2.5 mg/mL),采用上海金标喷金划膜仪划线,设定检测线和质控线的间距为 0.5 cm,检测线与 NC 膜下缘的距离为 0.7 cm,划线速度为 100 mm/s,喷液量为 0.1 μL/mm。30~37 °C 烘干 16 h 后加入干燥剂热合封口,备用。根据上述指标确定最佳抗体包被浓度。

1.3.7 试纸条的组装 以 PVC 板作背衬,分别将玻璃纤维素制成的样品吸收垫、胶体金结合垫、包被有测试带(T 带)和质控带(C 带)的 NC 膜和吸水垫按图 1 所示装配,将装备好的纸板切成 4 mm 宽的纸条,装入卡壳即为胶体金免疫层析试纸条成品。

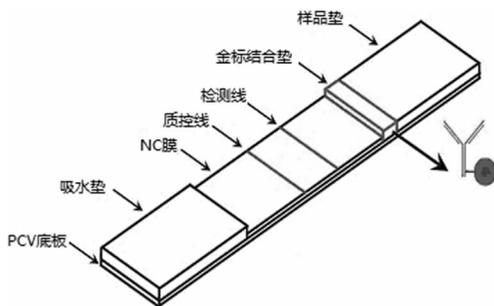


图 1 胶体金免疫层析试纸条结构

1.3.8 试纸条最低检出限的确定 将从 ATCC 购买的 B 群链球菌标准菌株复苏后增菌培养,各取 100 μL 浓度分别为 0、10⁵、10⁶、10⁷、10⁸、10⁹ CFU/mL 的菌液加入至 900 μL 抽提液中(抽提后的菌液浓度为 0、10⁴、10⁵、10⁶、10⁷、10⁸ CFU/mL),混匀,反应 5 min,滴加 2~3 滴抽提液于试剂条样品垫中,等待 5~10 min 观察结果确定试纸条最低检出限。

1.3.9 试纸条交叉反应 将从 ATCC 购买的 B 群链球菌、D 群链球菌、大肠杆菌、A 群链球菌、粪肠杆菌与金黄色葡萄球菌复苏后增菌培养。用麦比比浊法将细菌浓度用 PBS 稀释调至 10⁹ CFU/mL,分别取 100 μL 菌液加入至 900 μL 抽提液中(抽提后的菌液浓度为 10⁸ CFU/mL),混匀,反应 5 min,滴加 2~3 滴抽提液于试剂条样品垫中,等待 5~10 min 观察结果,对试纸条的特异性进行检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计学软件分析,以细菌分离培养的结果为标准,免疫层析法检测结果为对照,绘制四格表,计算免疫层析法检测 GBS 的敏感度、特异度、总符合率和 Kappa 值。

2 结果

2.1 胶体金免疫层析试纸条的研制

2.1.1 胶体金的制备与鉴定 从图 2 可知制备的胶体金颗粒的在 530 nm 处出现最大特征吸收峰,且峰宽较窄,峰形光滑,这表明制得的胶体金颗粒大小均匀。从扫描电镜图显示,胶体金颗粒平均粒径约 25 nm(图 3)。

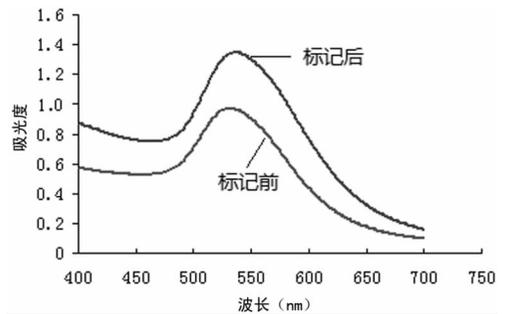


图 2 紫外线扫描光谱

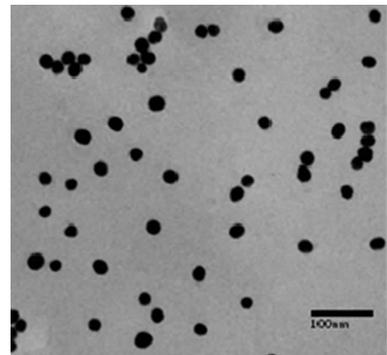


图 3 透射电镜扫描图

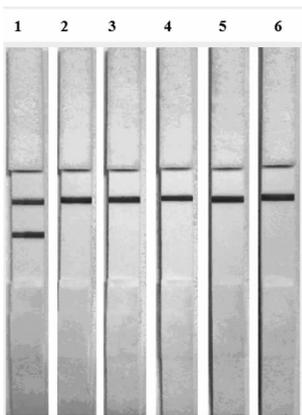
2.1.2 胶体金和抗体偶联前后光谱分析 从图 2 可知,偶联抗体后的胶体金溶液其紫外光谱最大吸收峰发生了红移现象,在 535 nm 处出现最大特征吸收峰,这说明胶体金颗粒已成功标记到抗体上。

2.1.3 胶体金最佳抗体标记量的确定 由实验可知,当抗 GBS 单克隆抗体浓度 ≥ 0.1 mg/mL 时胶体金颜色最为接近对照管颜色。考虑到用量成本,在抗体浓度 0.1 mg/mL 的基础上再加 20% 的量即为胶体金的最佳抗体标记量。

2.1.4 金标抗体工作浓度的确定 当稀释倍数为 1:6 时,NC 膜背景消失,检测线与质控线较深,且灵敏度较高,显色时间短。因此金标抗体溶液最佳稀释倍数为 1:6。

2.1.5 检测线、质控线的包被浓度的确定 当检测线包被抗体浓度为 1.2 mg/mL 时,检测线显色适中,灵敏度高,显色时间短;当质控线包被浓度 ≥ 0.8 mg/mL 时,其色带清晰可见。因此,检测线、质控线抗体包被浓度分别为 1.2、0.8 mg/mL。

2.2 试纸条交叉反应 用试纸条检测浓度为 10^8 CFU/mL 的菌液, B 群链球菌呈阳性, 对 D 群链球菌、大肠杆菌、A 群链球菌、粪肠杆菌与金黄色葡萄球菌无交叉反应, 由此表明试纸条特异性良好(图 4)。



注:1~6 分别表示 B 群链球菌、D 群链球菌、大肠杆菌、A 群链球菌、粪肠杆菌、金黄色葡萄球菌。

图 4 胶体金试剂条交叉反应



注:1~6 分别表示 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 CFU/mL 以及 PBS。

图 5 胶体金试剂条灵敏度测试

2.3 试纸条最低检出限的确定 在最优工艺条件下制备 GBS 免疫层析试纸条, 并对其灵敏度进行性能评价。对灭活的 GBS 菌液作系列浓度检测, 结果表明当抽提液菌液浓度 $\geq 10^5$ CFU/mL 时结果为阳性, 因此试纸条的灵敏度为 10^5 CFU/mL(图 5)。

2.4 临床标本检测 用试纸条检测 202 例临床标本, 以细菌分离培养法结果为对照, 利用 SPSS19.0 统计学软件进行分析。试剂条的灵敏度为 97.50%, 特异度为 97.54%, 总符合率为 97.52%, Kappa 值为 0.948。实验表明, 免疫层析法和细菌分离培养法具有较好的一致性。

表 1 临床实验结果对比(n)

试验	细菌分离培养法		合计
	阳性	阴性	
微生物试剂	阳性	78	81
	阴性	2	119
合计	80	122	202

3 讨 论

GBS 是一种寄生于人体下消化道及泌尿生殖道的革兰阳

性菌, 健康人群带菌率可达 15%~35%^[5]。1938 年, Fry 报道了 3 例死于 GBS 引起的产后子宫内膜炎的病例, 由此证实 GBS 为人类致病菌^[6]。20 世纪 70 年代以来, GBS 所致的女性生殖道感染, 尤其在围产期感染呈上升趋势, 与围产期严重感染性疾病密切相关^[7-9]。GBS 与孕妇胎膜早破相关: GBS 对绒毛膜的吸附及穿透力很强, 可引发绒毛膜羊膜炎, 导致胎膜早破。GBS 与早产相关: GBS 感染可引起磷脂酶 A、前列腺素及一些细胞因子的释放, 从而刺激子宫收缩, 导致早产; GBS 引发的胎膜早破也是早产原因之一。GBS 与产褥感染相关: 研究表明, GBS 阳性产妇, 其产后子宫内膜炎、盆腔炎乃至败血症的发病率均高于 GBS 阴性产妇^[9]。GBS 与死胎相关: GBS 与埃希菌和解脲支原体并列为三大导致死胎的病原微生物^[10]。GBS 还可以通过产时垂直传播和产后水平传播感染新生儿, 主要临床表现为肺炎和败血症^[10-11]。因此, 对于孕产妇、新生儿 GBS 的检测十分重要。

目前, 传统的细菌分离培养法是检测 GBS 的金标准^[12], 也是国内大多数医院的首选方法, 但细菌培养时间较长, 阳性率也易受多种因素的影响。随着技术的发展, 实时荧光聚合酶链反应(PCR)、荧光原位杂交法(FISH)逐渐在一些大型医院中应用于 GBS 检测, 不仅提高了敏感度和特异度, 也大大缩短了检测时间, 但由于这两种方法对仪器设备和工作人员要求均较高, 标本也一般需要大批量处理, 且操作繁琐, 成本昂贵, 不适合在中小医院中推广, 限制了其临床应用^[13]。凝胶电泳法由于 GBS 血清型的多样性, 其限制性核酸内切酶电泳图也存在差异, 故会造成一些血清亚型 GBS 的漏检^[14]。革兰氏染色法虽价格低廉, 诊断迅速, 但其敏感度和特异度均较低^[15]。本研究制备的免疫层析法 GBS 快速检测试剂通过与细菌分离法比较, 其敏感度和特异度分别达到 97.50% 和 97.52%, 表明该法具有高敏感性与高特异度。

GBS 的特异性多糖抗原位于细胞壁内, 若要和抗体发生特异性结合, 首先须将细胞壁裂解^[16]。因此, 本实验尝试碱裂解、十二烷基硫酸钠(SDS)裂解、溶菌酶裂解以及亚硝酸钠和乙酸裂解 GBS 细胞壁, 发现碱裂解和 SDS 裂解的效率较低且阳性较弱, 溶菌酶裂解和亚硝酸钠、乙酸裂解的效率相当, 考虑到溶菌酶在常温保存期较短, 故选择了 2 mmol/L 亚硝酸钠和 1 mmol/L 的乙酸作为裂解液, 从而保证了抗原的浓度和活性。

本实验显示研制的免疫层析法和细菌分离培养法对 GBS 检测的总符合率为 97.52%, Kappa 值为 0.948(Kappa 值越大, 表示一致性越好, 一般认为 Kappa ≥ 0.75 时, 说明一致性较好), 表明本法结果准确可靠, 可用于 GBS 的筛查和诊断。本法同时还具有操作简单、检测快速等优点, 患者从取材到诊断最快只需 10 min, 大大缩短了检测时间, 为临床及时诊断和治疗节约了宝贵时间。

综上所述, 本研究建立的 GBS 胶体金免疫层析检测方法具有操作简便、检测快速、结果准确等优点, 为围产期孕妇生殖道 GBS 感染早期筛查和辅助诊断提供了一种科学有效的检测方法, 对保护孕妇健康、预防新生儿 GBS 感染具有重要临床应用价值。

参考文献

[1] Bergeron MG, Ke D, Menard C, et al. Repaid detection of group B streptococci in pregnancy woman at delivery[J]. N Engl J Med, 2000, 343(1): 175-179.
 [2] 时春燕, 赵扬玉, 范玲, 等. 实时聚合酶链反应技术检测妊

妊娠晚期孕妇 B 族溶血性链球菌的多中心研究[J]. 中华围产医学杂志, 2014, 17(6): 361-364.

[3] Park KH, Kim KH, Kang JH, et al. Current status and clinical presentations of invasive neonatal Group B streptococcal infections in Korea[J]. *Pediatr Int*, 2011, 53(2): 236-239.

[4] 许基平. B 群链球菌快速检测方法研究进展[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(19): 2380-2381.

[5] Park JS, Cho DH, Yang JH, 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.

[6] Melin P. Neonatal group B streptococcal disease: from pathogenesis to preventive strategies[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2011, 17(9): 1294-1303.

[7] 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.

[8] 严育忠, 华静, 范惠清, 等. 围产期 B 族链球菌感染的研究进展[J]. 中华围产医学杂志, 2011, 14(12): 758-763.

[9] Hidehito M, Juri K, Masato H, et al. Immunochromatographic detection of the Group B Streptococcus antigen from enrichment cultures [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2013, 20(9): 1381-1387.

[10] 赵静, 熊涛, 唐军, 等. 早发型和晚发型新生儿脓毒症的临床特点[J]. 实用儿科临床杂志, 2012, 27(10): 736-738.

[11] 罗俊, 马丽亚, 徐芬. 新生儿晚发型 B 族链球菌败血症临床特征及预后分析[J]. 临床儿科杂志, 2013, 31(9): 805-808.

[12] Lanari M, Cavrini F, Sambri V, et al. Comparison of different methods for detection of Group B Streptococcus vaginal intrapartum colonization [J]. *Early Hum Dev*, 2009, 85(10): 1213-1235.

[13] 季修庆, 陆根生, 胡平, 等. 荧光定量 PCR 检测南京地区孕晚期妇女生殖道 B 族链球菌的带菌情况[J]. 检验医学, 2014, 29(6): 628-630.

[14] Honest H, Sharma S, Khan KS, et al. Rapid tests for group B streptococcus colonization in laboring woman: a systematic review [J]. *Pediatrics*, 2006, 117(4): 1055-1066.

[15] Benson KD, Luchansky JB, Elliott JA, et al. Pulsed-field fingerprinting of vaginal group B streptococcus in pregnancy[J]. *Obstet Gynecol*, 2002, 100(3): 545-551.

[16] 张立, 臧嘉. 快速检测 B 群链球菌试剂盒的初步应用[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(3): 453-453.

(收稿日期: 2015-09-21 修回日期: 2015-11-25)

(上接第 1011 页)

的状态(图 2)。结合前期研究与本次氨基酸的定量实验结果, 提示苯丙氨酸可能为 DILI 早期诊断及治疗效果评价的潜在生物标志物。

参考文献

[1] 陶蓓蓓, 李鹏飞, 张绪得, 等. 液相色谱-串联质谱在全谱氨基酸检测中的应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2012, 4(1): 59-61.

[2] Huo T, Chen X, Lu X, et al. An effective assessment of valproate sodium-induced hepatotoxicity with UPLC-MS and 1H NMR-based metabolomics approach[J]. *J Chromatogr B*, 2014, 969: 109-116.

[3] Kumar BS, Chung BC, Kwon O, et al. Discovery of common urinary biomarkers for hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride, acetaminophen and methotrexate by mass spectrometry-based metabolomics[J]. *J Appl Toxicol*, 2012, 32(7): 505-520.

[4] Au JS, Navarro VJ, Rossi S. Review article: drug-induced liver injury-its pathophysiology and evolving diagnostic tools[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2011, 34(1): 11-20.

[5] Hayashi PH, Fontana RJ. Clinical features, diagnosis, and natural history of drug-induced liver injury[J]. *Semin Liver Dis*, 2014, 34(2): 134-144.

[6] 许建明. 急性药物性肝损伤诊治建议(草案)[J]. 中华消化杂志, 2007, 27(11): 765-767.

[7] 禹铮, 贾继东. 药物性肝损害的危险因素, 诊断规范及停药标准[J]. 临床肝胆病杂志, 2013, 29(9): 674-677.

[8] 李鹏飞, 王燕, 陶蓓蓓, 等. 稳定同位素 iTRAQ 标记/高效液相色谱-串联质谱法同时定量分析人体中 42 种氨基酸及典型病例[J]. 分析化学, 2012, 40(5): 762-767.

[9] 秦环龙. 肝功能不全时氨基酸代谢变化与支链氨基酸的治疗作用[J]. 肠外与肠内营养, 2004, 11(4): 249-252.

[10] Holecek M. Three targets of branched-chain amino acid supplementation in the treatment of liver disease[J]. *Nutrition*, 2010, 26(5): 482-490.

[11] Shi ZQ, Chang TM. Amino acid disturbances in experimental hepatic coma rats[J]. *Int J Artif Organs*, 1984, 7(4): 197-202.

[12] Holecek M, Skalská H, Mráz J. Plasma amino acid levels after carbon tetrachloride induced acute liver damage. A dose-response and time-response study in rats[J]. *Amino Acids*, 1999, 16(1): 1-11.

[13] Record CO, Buxton B, Chase RA, et al. Plasma and brain amino acids in fulminant hepatic failure and their relationship to hepatic encephalopathy[J]. *Euro J Clin Invest*, 1976, 6(1): 387-394.

[14] Rosen HM, Yoshimura N, Hodgman JM, et al. Plasma amino acid patterns in hepatic encephalopathy of differing etiology[J]. *Gastroenterology*, 1977, 72(3): 483-487.

[15] 安卓玲, 史忱, 赵瑞, 等. 基于超高效液相色谱-质谱的药物性肝损伤患者血清代谢组学研究[J]. 分析化学, 2015, 43(9): 1408-1414.

(收稿日期: 2015-10-25 修回日期: 2015-12-25)