

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20170132

数字出版日期: 2018-09-19; 数字出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1355.N.20180919.1614.004.html>

胶体金免疫层析方法检测肺炎链球菌细胞壁多糖抗原

吕辰¹, 杨蒙雅¹, 隋秀文², 王浩猛², 孟欣¹, 朱涛^{1,2}

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457;

2. 康希诺生物股份公司, 天津市呼吸道细菌重组及结合疫苗企业重点实验室, 天津 300457)

摘要: 建立一种简易快速、特异性高的胶体金免疫层析法(GICA)用于检测肺炎链球菌细胞壁多糖抗原(C-Ps)。根据双抗体夹心原理,将C-Ps单克隆抗体标记于胶体金颗粒,建立检测方法。实验结果表明该试纸条操作简便,肉眼于15 min内即可判定结果。试纸条对肺炎链球菌具有高度特异性,与百日咳鲍特菌、脑膜炎奈瑟氏菌等其他重要呼吸道致病菌无交叉反应。室温保存12个月,其检测结果无明显变化。与现行检测方法相比较,该研究制备的试纸条具有操作简便、检测快速、检出限低、特异性强、稳定性好等优点,其灵敏度和特异性分别为70%和100%。而且与国外同类产品(美国BinaxNOW[®]产品)相比,灵敏度具有较高的一致性,而且特异性可达到100%,性价比更高,为肺炎链球菌感染疾病的临床检测与早期诊断提供了一个新的手段。

关键词: 肺炎链球菌; 免疫层析试纸条; 单克隆抗体

中图分类号: R974

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2018)06-0016-04

Gold Immunochromatography Assay for *Streptococcus pneumoniae* C-polysaccharide

LÜ Chen¹, YANG Mengya¹, SUI Xiuwen², WANG Haomeng², MENG Xin¹, ZHU Tao^{1,2}

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. CanSino Biologics Inc., Tianjin Enterprise Key Laboratory of Respiratory Bacterial Recombination and Conjugated Vaccine, Tianjin 300457, China)

Abstract: A simple, rapid and specific gold immunochromatography assay (GICA) was developed for the detection of *Streptococcus pneumoniae* C-polysaccharide (C-Ps). Based on the double-antibody sandwich principle, monoclonal antibody against C-Ps labeled with colloidal gold was used as the detection reagent. Our data demonstrated that the strip could be easily operated and the results could be rapidly judged within 15 min by naked eyes. The assay is highly specific to *Streptococcus pneumoniae* and showed no cross-reaction to *Bordetella pertussis*, *Neisseria meningitidis* and other important respiratory pathogens. There was no significant change in sensitivity and specificity when the GICA kit was stored at room temperature for 12 months. Compared with the current detection methods, the new method has the advantages of simple operation, rapid detection, low detection limit, high specificity, and good stability. The strip had a sensitivity of 70% and a specificity of 100%. The performance of the strip was highly comparable with similar products in sensitivity and specificity such as BinaxNOW[®], which was developed by a US company. In conclusion, the GICA-based kit described in this paper could potentially be used for clinical detection and early diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infection.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*; immunochromatographic strip; monoclonal antibody

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)是社区获得性肺炎、脑膜炎、中耳炎和败血症等的主要病因

之一,在流感病患者中,常继发肺炎链球菌感染^[1]。在急性呼吸系统感染中肺炎链球菌造成的死亡率大

收稿日期: 2017-05-17; 修回日期: 2017-09-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21502139); 天津科技大学实验室创新基金资助项目(1604A306)

作者简介: 吕辰(1988—),男,辽宁丹东人,硕士研究生;通信作者: 孟欣,助理研究员, mengxin@tust.edu.cn

约有 30%, 显著高于病毒造成的死亡率^[2]。

目前,用于检测肺炎链球菌的方法很多,包括细菌培养法、酶联免疫法(ELISA)和核酸扩增技术(PCR)等^[3-6],其中细菌培养法仍是目前检测肺炎链球菌感染的“金标准”,但传统的肺炎链球菌培养方法灵敏度太低,耗时较长,至少需要 2 d 以上,血培养阳性率仅 10% 左右^[7];PCR 技术虽然可以对肺炎链球菌准确检测,但是操作复杂,需要特殊引物、实验仪器设备和专业人员,不能适应快速检测的要求。

免疫层析技术以胶体金作为示踪标志物,基于抗原抗体反应原理具有检测速度快、灵敏度高、特异性强、操作简便等特点,已经在临床检验、动植物免疫、食品安全等各领域得到广泛应用^[8-9]。

细胞壁多糖抗原(C-polysaccharide, C-Ps)是细菌细胞壁的组成成分,为肺炎链球菌各血清型所共有。针对细胞壁多糖抗原制备的单克隆抗体,具有特异性强、灵敏度高、交叉反应小的优势^[10]。本试纸条通过检测尿液中的细胞壁多糖抗原,达到对肺炎链球菌性感染快速诊断的目的,是一种简便快速的诊断方法。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株:肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、肺炎克雷白菌(*Klebsiella pneumoniae*)、百日咳鲍特菌(*Bordetella pertussis*)、脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)、白色念珠菌(*Monilia albican*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、血链球菌(*Streptococcus sanguis*),康希诺生物股份公司保藏。

尿样:含有 10 ng/mL C-Ps 的健康人群尿样的阳性尿样 40 份,健康人群阴性尿样 40 份。

试剂:弗氏不完全佐剂、PEG 8000, Sigma 公司;1640 培养基、胎牛血清(FBS), Gibco 公司;氯金酸($\text{AuCl}_3 \cdot \text{HCl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、柠檬酸三钠($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、三羟甲基氨基甲烷($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$), 国药集团;牛血清白蛋白 GHB034, 杭州毕肯莱博生物科技有限公司;酶标羊抗小鼠、羊抗小鼠 IgG, 北京博奥龙免疫技术有限公司;肺炎链球菌细胞壁多糖标准品, 美国 SSI 公司;对照试纸条为美国 BinaxNOW[®]产品, 美国英维利斯公司。

耗材:CN140 硝酸纤维素膜, 赛多丽丝公司;GF-15

金标垫、GF-60 样品垫、AP270 吸水纸、PVC 底板、卡壳、铝箔袋, 杭州毕肯莱博生物科技有限公司。

仪器:MK3 酶标仪、311 型 CO₂ 培养箱、加热磁力搅拌器, Thermo 公司;HM3030 划膜喷金仪、ZQ2002 斩切机, 上海金标生物科技有限公司;鼓风干燥箱, 北京中科国仪科技有限公司。

1.2 抗体的制备

分泌抗 C-Ps 单克隆抗体的细胞株 5B3B9 由本实验室保存。按照参考文献[11]中的方法并作改进。复苏细胞至对数期注射至经弗氏不完全佐剂致敏 1 周后的小鼠体内。收集腹水, 离心取上清液, 进行亲和纯化。

1.3 胶体金及金标抗体的制备

按照参考文献[12]取 0.01% 的氯金酸溶液 100 mL 在加热磁力搅拌器上加热至沸腾, 加入 1% 柠檬酸三钠水溶液 1.2 mL, 继续煮沸 15 min, 此时关闭加热功能继续搅拌, 不再沸腾时停止搅拌。平衡至室温, 恢复体积至 100 mL。取胶体金 100 mL, 用 0.2 mol/L K₂CO₃ 溶液调节至 pH = 8.5, 将 2 mg 抗 C-Ps 单克隆抗体 5B3B9 加入胶体金溶液中, 混匀后室温静置 1 h, 加入 10% BSA 至质量分数为 1%, 再加入 10% PEG 8000 至质量分数为 0.2%, 混匀后室温静置 1 h。7 000 r/min 离心 45 min, 小心吸取上清液, 用胶体金复溶液重悬沉淀至原标记体积的 1/10。

1.4 金标快速检测试纸条的组装

试纸条由吸水纸、硝酸纤维素样品垫和 PVC 底板组成。将抗 C-Ps 单克隆抗体 5B3B9 用 10 mmol/L PB 稀释成 1 mg/mL, 用划膜仪以 1 μL/cm 的上样量滑膜于硝酸纤维素膜的检测线(T 线)上, 将羊抗鼠 IgG 用同样方法稀释成 1 mg/mL, 同样上样量滑膜于硝酸纤维素膜的质控线(C 线)上。37 °C 温箱中干燥 1 h 后取出。最后将样品垫、金标结合垫、NC 膜和吸水纸依次粘贴到 PVC 底板上, 用斩切机切成 4 mm 宽的试纸条, 装入检测卡中, 加干燥剂密封于室温避光保存。

1.5 检测及结果判定方法

将检测试纸条水平放置, 取 100 μL 尿样滴加于加样孔, 第 15 min 时判定结果, 15 min 后无效。结果判断方法如图 1 所示。



图 1 肺炎链球菌抗原检测试纸条结果判定
Fig. 1 Result interpretation of *Streptococcus pneumoniae* antigen immunochromatographic strip

检测试纸条纤维素膜上出现 2 条红色线为肺炎链球菌阳性; 仅出 1 条红色线(近吸水纸端)为阴性. 如果质控线无显色条带, 则视为试纸条失效.

1.6 试纸条特异性实验

培养人体呼吸道、肠道等常见细菌至 $10^6 \sim 10^9 \text{ mL}^{-1}$, 将其裂解液作为待测样品, 用同批次的试纸条按照检测及结果判定方法检测试纸条, 分别对待测样品进行检测, 并检测其重复性.

1.7 试纸条最低检测限度实验

将 C-Ps 以生理盐水分别稀释至 500、200、100、50、20、5、1、0 ng/mL 制成待测样品, 用同批次的试纸条按照检测及结果判定方法检测试纸条, 对待测样品进行检测, 并检测其重复性.

1.8 试纸条稳定性实验

将试纸条密封存放于室温和 37°C , 每隔 1 周取出, 检测其阳性符合率、阴性符合率、特异性及灵敏度的变化.

1.9 不同试纸条的比较

选取美国 BinaxNOW[®] 肺炎链球菌抗原检测试纸条进行对照检测. 分别按照检测及结果判定方法对阳性样品及阴性样品进行检测, 比对灵敏度及特异性.

2 结果与分析

2.1 抗 C-Ps 单克隆抗体评价

应用免疫双扩散法对抗 C-Ps 单克隆抗体进行评价. 加入 $20 \mu\text{L}$ 质量浓度为 $100 \mu\text{g/mL}$ 的 C-Ps 标准品于中间孔中; 分别加入 $20 \mu\text{L}$ 质量浓度为 100、50、25、12.5、6.25 $\mu\text{g/mL}$ 抗 C-Ps 单克隆抗体于 1—5 号孔中; 加入 $20 \mu\text{L}$ 生理盐水于 6 号孔中, 作为阴性对照. 结果如图 2 所示, 抗体效价不低于 $6.25 \mu\text{g/mL}$.

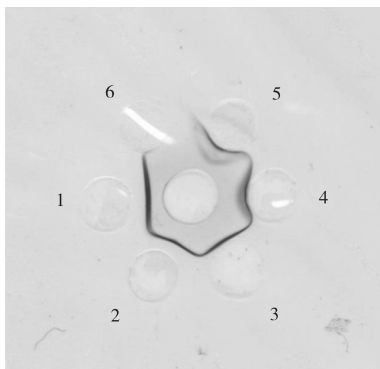


图 2 抗 C-Ps 单克隆抗体免疫双扩实验结果

Fig. 2 Results of double immunodiffusion test for C-Ps Mab

2.2 胶体金的质量鉴定

透射电镜下, 制备的胶体金呈现球形, 较均一、分散性较好(图 3). 紫外-可见分光光度计扫描表征结果如图 4 所示, 其最高吸收峰在 531 nm 处, 峰型较窄, 与报道的 40 nm 胶体金的等离子共振吸收峰一致.

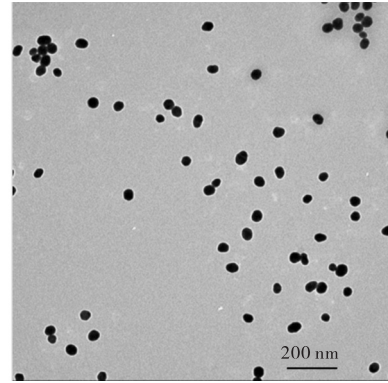


图 3 胶体金溶液的透射电镜表征

Fig. 3 TEM characterization of colloidal gold solution

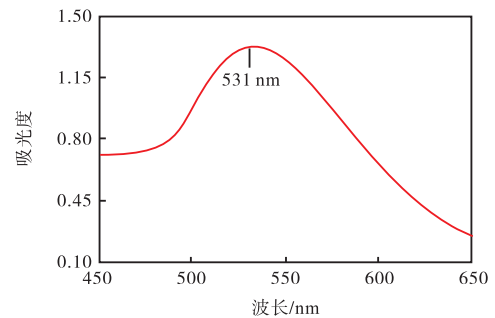
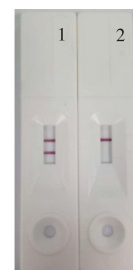


图 4 胶体金紫外-可见光谱图

Fig. 4 UV-visible absorption spectra of the colloidal gold

2.3 试纸条检测结果

用试纸条分别检测阳性参考品、阴性参考品, 其检测结果阳性明显清晰, 阴性无假阳, 阴阳性均能在 15 min 内显现, 且检测结果可重复, 如图 5 所示.



1. 阳性参考品; 2. 阴性参考品

图 5 试纸条检测结果

Fig. 5 Test results of the strip

2.4 试纸条特异性实验

将肺炎链球菌、肺炎克雷白菌、百日咳鲍特菌、

脑膜炎奈瑟氏菌、流感嗜血杆菌、大肠埃希氏菌、白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、血链球菌等菌株分别培养至 $10^6 \sim 10^9 \text{ mL}^{-1}$, 将菌体裂解后用制备的试纸条分别进行检测, 同时设立阴性对照, 结果见表 1. 仅有肺炎链球菌呈现阳性反应, 而对其他菌和阴性对照皆呈阴性, 且结果可重复.

表 1 肺炎链球菌检测试纸条的特异性测定结果

Tab. 1 Cross-reactivity test of *Streptococcus pneumoniae* immunochromatographic strip

菌株	菌体浓度/ mL^{-1}	测试结果
肺炎链球菌	5.00×10^7	+
肺炎克雷白菌	7.37×10^7	-
百日咳鲍特菌	2.00×10^7	-
A 群脑膜炎奈瑟氏菌	9.50×10^6	-
C 群脑膜炎奈瑟氏菌	8.89×10^7	-
W ₁₃₅ 脑膜炎奈瑟氏菌	3.16×10^6	-
Y 群脑膜炎奈瑟氏菌	2.81×10^7	-
流感嗜血杆菌	1.58×10^8	-
大肠埃希氏菌	5.10×10^8	-
金黄色葡萄球菌	8.70×10^6	-
血链球菌	9.77×10^6	-
副流感病毒		-
阴道毛滴虫		-
生理盐水(阴性参考品)		-

注: + 表示测试结果阳性; - 表示测试结果阴性.

2.5 试纸条最低检测限度实验

用生理盐水将 C-Ps 分别稀释至 500、200、100、50、20、5、1、0 ng/mL, 分别用标记为 1—8 号试纸条进行检测, 结果如图 6 所示. 质量浓度为 1 ng/mL 样品结果仍呈阳性且 0 ng/mL 结果为阴性, 结果可重复.



图 6 肺炎链球菌检测试纸条灵敏度测试

Fig. 6 Sensitivity test of *Streptococcus pneumoniae* immunochromatographic strip

2.6 试纸条稳定性实验

试纸条于 37°C 条件下保存 21 d, 检测其阴阳性符合率、灵敏度和特异性, 结果符合标准; 室温条件下保持 12 个月的试纸条, 检测上述指标结果符合标准.

2.7 自制试纸条与国外同类产品的比较

用自制试纸条和 BinaxNOW[®] 试纸条对肺炎链球

菌 C-Ps 阳性参考品和阴性参考品同时检验的结果是一致的.

配制肺炎链球菌 C-Ps 阳性尿样 40 份(50%), 阴性样本 40 份(50%), 分别使用自制试纸条和 BinaxNOW[®] 试纸条进行灵敏度检测, 结果见表 2.

表 2 自制试纸条与 BinaxNOW[®] 试纸条灵敏度检测结果的比较

Tab. 2 Comparison between the newly developed immunochromatographic strip and BinaxNOW[®]

自制试纸		BinaxNOW [®]		Pa/%	Pe/%	Kappa/%
+	-	+	-			
28	52	40	40	85.0	50.0	70.0

由表 2 可知: 自制胶体金免疫试纸条检测阳性 28 份(35.0%), 阴性 52 份(65.0%); BinaxNOW[®] 试纸条检测阳性 40 份(50%), 阴性 40 份(50%). 自制胶体金试纸条灵敏度 70.0%, 特异性 100%, 阳性预测值 100%, 阴性预测值 76.9%. BinaxNOW[®] 试纸条灵敏度 100%, 特异性 100%. 自制胶体金试纸条与 BinaxNOW[®] 试纸条检测结果一致率 Pa 值为 85.0%, 在检测结果无关联的假定下, 期望一致率 Pe 值为 50.0%, Kappa 值为 70.0%.

3 结论

本文以胶体金为示踪物, 采用肺炎链球菌细胞壁多糖单抗, 成功研制了肺炎链球菌免疫层析试纸条. 试纸条最低检测限达到 1 ng/mL, 与百日咳鲍特菌、脑膜炎奈瑟氏菌、流感嗜血杆菌、大肠埃希氏菌、白色念珠菌、金黄色葡萄球菌等无交叉反应; 试纸条 37°C 保存 21 d, 或置于室温 12 个月, 阴阳性符合率、特异性和灵敏度无变化, 具有良好的稳定性; 阳性结果对于快速诊断疾病, 避免不必要的使用抗菌药物等都有极大的帮助. 但是, 抗原检测结果受很多因素的限制, 包括灵敏度和特异性. 本实验自制的胶体金试纸条灵敏度为 70.0%, 特异性为 100%, 与国外报道的胶体金试纸条灵敏度基本处于 52% ~ 88%^[13-14] 的结果基本一致. 该方法阳性预测值为 100%, 阴性预测值为 76.9%, 因此当该试剂盒检测为阳性时, 基本可以确定为肺炎链球菌感染, 而检测为阴性时则需要进一步确认.

与现有检测方法相比, 本研究研制的试纸条具有简便、快速、准确的特点, 兼有较特异性强、稳定性好、成本低的优点, 可以在 15 min 内凭借肉眼判定结

(下转第 34 页)