

# B 群链球菌快速检测方法研究进展

许基平<sup>1</sup>综述,王频佳<sup>2</sup>审校(1. 成都医学院医学检验本科 2006 级输血班 610083; 2. 成都医学院检验医学院 610083)

【关键词】 B 群链球菌; 检测; 综述

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.19.042 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)19-2380-02

B 群链球菌(group B streptococcus, GBS)又名无乳链球菌,是围生期女性泌尿生殖道感染和新生儿期重症肺炎、败血症和脑膜炎的常见病原菌。新生儿的 GBS 感染临床进展迅速,具有发病迅速、病死率高的特点,是新生儿的主要死亡原因,已引起世界范围内广大学者的深切关注。细菌培养是检测 GBS 的标准方法,但此菌营养要求较高,培养鉴定耗时较长(至少 2 d)且阳性率较低。如何在感染早期快速、准确、灵敏地检测 B 群链球菌成为研究的热点,本文重点概述微生物学、免疫学、分子生物学等检验方法的最新研究进展。

## 1 微生物学检验方法

尽管 GBS 培养通常比较耗时,但却可由此获得纯培养物进行药敏试验和进一步分型,故 GBS 的快速筛查培养仍然是 GBS 快速检测方法研究的重点,而这类方法的核心通常都是利用 GBS 较为特异的生物学性状,如产生溶血素和色素等重要特征。

**1.1 混合血琼脂培养基** GBS 可产生一种特别的蛋白(被称为 CAMP 因子),能与细胞膜反应导致红细胞发生溶血,金黄色葡萄球菌 β 毒素(即神经磷脂酶)能增强 CAMP 因子的溶血程度。Hansen 和 Sorensen<sup>[1]</sup>研究发现,在加入纯化金黄色葡萄球菌 β 毒素的马血、羊血混合血琼脂平板上,GBS 菌落周围会产生较宽的不完全溶血带(半径约 5~8 mm 的 CAMP 溶血带)和较窄的完全溶血带(半径约 2~3 mm 的 β 溶血带)组成的混合溶血带。这种培养基优点在于其灵敏度与选择性肉汤相近,高达 90%以上,初代培养仅需 18 h 就可完成,几乎不需次代培养,初代培养物可直接用于药敏试验、DNA 分析或是血清分型,同时还可对标本中的 GBS 细菌含量进行半定量检测,是快速检验 GBS 的较理想方法。但缺点也很明显,该培养基成分较复杂,尚无成品培养基上市,制备工作相对费时费力,有效保存时间较短,而不典型的菌落仍需进行进一步鉴定,这些都限制了它在临床检验中的广泛应用。

**1.2 Granada 培养基** GBS 在含血清和淀粉的培养基中可产生橘红色类胡萝卜素色素,可使菌落或培养基产生特异性的颜色改变。Granada 培养基是一种商业化的选择性琼脂培养基,在这种培养基上,GBS 菌落会产生肉眼可见的橙红色或红色改变,从而可直接特异性检测 GBS。这种培养基的特异性可达 100%,但却极不稳定,灵敏度可在 40%~98.2%。Fraile 和 Granger<sup>[2]</sup>研究发现,将 Granada 培养基中 2%的可溶性淀粉和 5%的血清调整为 1%的未改性米淀粉和 1%的马血清可增强培养基的稳定性,延长培养基保存期。使用该培养基检测 GBS 只需 24 h,且无需特殊培养条件和次代培养,平板上的菌落可进行药敏和血清分型,也可用于对标本中细菌含量的半定量评估,是一种灵敏、快速的 GBS 检测方法。但目前国内尚无成品培养基供应,且该方法无法检测不溶血的 GBS 菌株。

**1.3 胡萝卜素肉汤** 胡萝卜素肉汤则是由 Granada 培养基改良而来,溶血性 GBS 菌株产生的酶能分解肉汤里的底物,使培养基发生特异性的橙红色、红色或砖红色颜色变化。Church 和 Baxter<sup>[3]</sup>研究发现,与 LIM 培养基相比,该培养基的灵敏

度、特异性、阳性预测值、阴性预测值分别为 92.0%、100%、100%和 98.3%,诊断效能高达 98.6%。只要胡萝卜肉汤发生了肉眼可见的颜色改变即可报告为阳性,最快 6 h 即可完成检测,大大提高了检测效率,降低了劳动量和检测成本。但该培养基的阳性培养物通常不能直接用于药敏试验而需要次代培养,阴性培养物则更需要次代培养于血平板以排除不溶血的 GBS 菌株。

## 2 免疫学检验方法

近年国外已有商品试剂盒运用乳胶微粒凝集试验吸附、协同凝集试验、对流免疫电泳试验及酶联免疫试验等检测血清中的 GBS 特异性抗原。GBS 全身感染时抗原检测阳性率可达 50%~80%,甚至 100%。而孕妇血清中 GBS 特异性抗体的检测则更有意义,因为一般认为孕妇体内 GBS 特异性抗体大于或等于 2 mg/mL 时,所娩出的新生儿可免受 GBS 感染。但这类方法需要高滴度的抗血清或高纯度的抗原,价格较为昂贵且操作不便,临床利用度不高。

**2.1 胶乳凝集法** 乳胶凝集法使用吸附了抗 GBS 荚膜多糖抗体的胶乳混悬液检测 GBS 荚膜多糖抗原。黄越芳和王澈<sup>[4]</sup>研究发现,该法的灵敏度、特异度、阴性预测值分别为 88.9%、98.1%、99%;而 Rallu 和 Barriga<sup>[5]</sup>将标本用选择性肉汤增菌后,检测的灵敏度为 57.3%,特异度为 99.5%。此法灵敏度高于传统方法,简单实用且成本相对较低,更适用于社区医院快速检测 GBS。

**2.2 免疫层析法** 免疫层析法是利用针对 GBS 的特异性单克隆抗体-标记物(染料或胶体金等)和固相化多克隆抗体来检测标本中的 GBS,具有较高的敏感度和特异性。以试剂 CHECK-1-SREP B 为例,当标本流经反应区时,标记单克隆抗体和 GBS 抗原特异结合,形成抗原抗体复合物,这种复合物被固相的多克隆抗体捕获并产生一条粉红色色带。若无 GBS 抗原,就不会有色带出现。免疫层析法是一种快速定性且步骤简单的检测方法,可以检测患者阴道分泌物是否有 GBS 抗原。

## 3 分子生物学检验方法

**3.1 斑点印迹法** Mavyenyngwa 等<sup>[6]</sup>用热十二烷基硫酸盐溶液裂解 GBS 后,裂解物经聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移到 PVDF 膜上,继而与抗-R3 单克隆抗体反应,再与耦联过氧化物酶的抗 IgM 抗体反应后,与底物显色后可产生清楚的有色斑点。此法特异性较好,但操作繁琐,对实验设备和技术人员要求较高。

**3.2 全细胞荧光原位杂交法** Montague 和 Cleary<sup>[7]</sup>在研究中使用 FITC 标记缩氨酸探针检测 LIM 肉汤培养物中的 GBS,方法的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值分别为 97.4%、98.3%、96.1%和 98.9%。姚明媚和李艳<sup>[8]</sup>、王沛和余红<sup>[9]</sup>则用荧光素 Cy3 标记的针对 GBS 16S rRNA 的种特异性寡核苷酸探针,与经溶菌酶破壁后固定于玻片上的 GBS 在 50 °C 下杂交 2 h,50 °C 洗涤 10 min,干燥后置荧光显微镜下观察。该方法操作简单、耗时短,约 3 h 即可完成。特异性好,探针仅与 GBS 发生反应,与其他常见临床病原菌均不反应,阴性

预测值达 98.5% (培养法为 93.3%)。敏感度高达 93.0% (培养法为 66.2%)，最低检出限可达 1 000~10 000 cfu/mL，可同时检测活菌和死菌，值得临床广泛推广。

### 3.3 PCR 技术

**3.3.1 常规 PCR 技术** Rallu 和 Barriga<sup>[5]</sup> 使用实时荧光定量 PCR 技术检测 GBS，以编码 C5a 肽酶的 *scpB* 基因为靶基因时灵敏度为 99.6%，特异度为 100%，以编码 CAMP 因子的 *cfb* 基因为靶基因时灵敏度为 75.3%，特异度为 100%。Bergseng 等<sup>[10]</sup> 以编码 Sip 表面免疫蛋白的 *sip* 基因为靶基因，灵敏度为 97%，特异度为 99%。Jordan 等<sup>[11]</sup> 以 16S rDNA PCR 技术检测 GBS，特异性为 97.5%，阴性预测值为 99.2%。Parham 等<sup>[12]</sup> 以 *cfb* 基因为靶基因设计了不同长度的寡核苷酸探针包被到磁性微珠上，用以捕获标本中的 GBS 基因组 DNA，被捕获的 GBS 基因组 DNA 洗脱下来后通过定量 PCR 检测，也可用非扩增性技术检测，此法可快速纯化和浓集特异性的 GBS 基因片段，从而可快速高效的检测 GBS。与传统 GBS 检测方法相比，PCR 技术是目前最准确、最精确的，但其对人员设备要求较高，从而限制了其应用。

**3.3.2 多重 PCR 技术** Poyart 和 Tazi<sup>[13]</sup> 以荚膜多糖 *cps* 基因为靶基因建立了 GBS 多重 PCR 检测技术，可以检测常见已知的多种 GBS 荚膜多糖，显著降低了 NT 株的检出率，适用于大规模的 GBS 流行病学研究。Zeng 和 Kang<sup>[14]</sup>、Zhao 等<sup>[15]</sup> 的研究中采用多重 PCR-反向线点杂交技术 (multiplex PCR-based reverse line blot hybridization assay, mPCR/RLB)，以一个种特异性基因 (*cfb*)，九个血清特异性基因 (血清型 I a 到 VIII)，7 个表面蛋白抗原基因共 17 个基因为靶基因，设计了 33 种引物和 34 种探针，以同时检测 GBS 的分子血清型和表面蛋白基因。该方法可避免血清学检测中的交叉反应，还可鉴定无法检测的 GBS 血清型，与血清学检测相比此法更加灵敏和特异，与一般 PCR 和多重 PCR 相比，效率更高更简便，更适合于大规模的 GBS 分子流行病学研究。

**3.4 DNA 芯片** Wen 和 Wang<sup>[16]</sup> 以 *cpsH* 基因为基础，将标记的寡核苷酸探针固定于 DNA 芯片上，与多重 PCR 扩增后的目的基因杂交，再以激光扫描仪检测芯片信号以确定荚膜多糖类型，可检测 GBS 的 9 种不同血清型，此方法不仅特异而且重复性好，与多重 PCR 联用可同时检测荚膜多糖和表面蛋白抗原，有利于 GBS 的流行病学和发病机理研究以及研制血清特异性疫苗。

## 4 前景及问题

从近几年 GBS 检测的研究情况看，检测技术研究方向逐渐从传统的微生物学技术转向到免疫学、分子生物学技术。适用于大规模流行病学调查的检测技术不断出现，敏感性、准确性、特异性不断提高，检测效率也相对提高。但多数方法尚处于研究初期，未经临床广泛使用验证，同时，部分方法成本高，操作复杂，对技术和设备要求很高，临床推广困难。作者认为，GBS 检测技术的发展应向简便、快捷、经济的筛查试剂和高通量、高准确性的确诊分型试剂方向分别发展，以满足临床快速过筛和大规模流行病学研究的需要。

## 参考文献

[1] Hansen SM, Sorensen UB. Method for quantitative detection and presumptive identification of group B streptococci on primary plating [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41 (4): 1399-1403.  
 [2] Fraile MR, Granger JR. Use of unmodified starches and partial removal of serum to improve granada medium sta-

bility [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43 (4): 1989-1991.  
 [3] Church DL, Baxter H. Evaluation of strep B carrot broth versus lim broth for detection of group B streptococcus colonization status of near-term pregnant women [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46 (8): 2780-2782.  
 [4] 黄越芳, 王清文. 乳胶凝集试验快速诊断新生儿 B 群链球菌败血症 [J]. 新医学, 2002, 33 (1): 16-18.  
 [5] Rallu F, Barriga P. Sensitivities of antigen detection and PCR assays greatly increased compared to that of the standard culture method for screening for group B streptococcus carriage in pregnant women [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44 (3): 725-728.  
 [6] Mavengwa RT, Maeland JA, Moyo SR. Distinctive features of surface-anchored proteins of streptococcus agalactiae strains from Zimbabwe revealed by PCR and dot blotting [J]. Clin Vaccine Immunol, 2008, 15 (9): 1420-1424.  
 [7] Montague NS, Cleary TJ. Detection of group B streptococci in lim broth by use of group B streptococcus peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization and selective and nonselective agars [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46 (10): 3470-3472.  
 [8] 姚明媚, 李艳. 荧光原位杂交法快速检测 B 群链球菌 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2006, 14 (2): 15-16.  
 [9] 王沛, 余红. 荧光原位杂交法用于孕妇生殖道 B 群链球菌的快速筛查 [J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23 (5): 522.  
 [10] Bergseng H, Bergseng L, Rygg M, et al. Real-time PCR targeting the *sip* gene for detection of group B streptococcus colonization in pregnant women at delivery [J]. J Med Microbiol, 2007, 56 (2): 223-228.  
 [11] Jordan JA, Durso MB, Butchko AR, et al. Evaluating the near-term infant for early onset sepsis progress and challenges to consider with 16S rDNA polymerase chain reaction testing [J]. J Mol Diagn, 2006, 8 (3): 357-363.  
 [12] Parham NJ, Picard FJ, Peytavi R, et al. Specific Magnetic bead-based capture of genomic DNA from clinical samples: Application to the detection of group B Streptococci in Vaginal/Anal Swabs [J]. Clin Chem, 2007, 53 (9): 1570-1576.  
 [13] Poyart C, Tazi A. Multiplex PCR assay for rapid and accurate capsular typing of group B Streptococci [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45 (6): 1985-1988.  
 [14] Zeng XY, Kong FR. Evaluation of a multiplex PCR-based reverse line blot-Hybridization assay for identification of serotype and surface protein antigens of Streptococcus glaciatae [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44 (10): 3822-3825.  
 [15] Zhao ZT, Kong FR, Gilbert GL. Reverse line blot assay for direct identification of seven streptococcus glaciatae major surface protein antigen genes [J]. Clin Vaccine Immunol, 2006, 13 (1): 145-149.  
 [16] Wen LY, Wang Q. Use of a serotype-specific DNA microarray for identification of group B Streptococcus (Streptococcus agalactiae) [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44 (4): 1447-1452.