

• 临床检验研究论著 •

伤寒、副伤寒分型诊断蛋白质芯片法的建立和应用

彭杰雄¹, 林连成², 邓兆享¹, 林文浩¹, 裴春丽²

(1. 武警广东边防总队医院检验科, 广东深圳 518029; 2. 广东省深圳市赛尔生物技术有限公司 518000)

摘要:目的 探讨应用蛋白质芯片技术诊断伤寒、副伤寒的可行性。方法 利用蛋白质芯片方法, 将伤寒抗原(To、Th)和副伤寒抗原(Ta、Tb、Tc)及伤寒 Vi 荚膜多糖抗原集成到已经活化处理的玻璃芯片上, 使其保持蛋白质活性和立体结构不变。对 86 例经血培养确认的已知标本和 100 例健康体检标本进行检测, 并与肥达氏反应作比较。结果 蛋白质芯片法检测结果与血培养结果符合率高, 灵敏度为 97.6%, 特异度为 98.0%, 而肥达氏反应灵敏度为 60.4%, 特异度 98.0%, 两方法之间差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 蛋白质芯片法具有高通量、可并行检测伤寒、副伤寒多种抗体的优势, 为伤寒、副伤寒的诊断提供了有效手段。

关键词: 伤寒; 副伤寒; 蛋白质阵列分析; 肥达氏反应

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.12.013

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)12-1438-02

Development and application of protein microarray technology for serodiagnosis of Salmonella typhi and paratyphi

Peng Jiexiong¹, Lin Liancheng², Deng Zhaoxiang¹, Lin Wenhao¹, Pei Chunli²

(1. Department of Laboratory Medicine, Guangdong Provincial Frontier Defense Corps Hospital of Armed Police Force, Shenzhen, Guangdong 518029, China; 2. Shenzhen Sciarray Biotech Co., Ltd, Shenzhen, Guangdong 518000, China)

Abstract: Objective To evaluate a new protein microarray method for the diagnosis of typhoid and paratyphoid fever. Methods Salmonella typhi antigens To and Th, Salmonella paratyphi antigens Ta, Tb and Tc, and Vi capsular polysaccharide of Salmonella typhi were spotted on glass slides, which were modified with specific active groups. A total of 86 cases of known samples, confirmed by blood culture, and 100 cases of samples from healthy subjects were detected by constructed method, and the detection results were compared with those of Widal test. Results There was a high consistence between protein microarray and blood culture. The sensitivity and specificity of protein microarray were respectively 97.6% and 98.0%, higher than 60.4% and 98.0% of Widal test ($P < 0.01$). Conclusion The protein microarray technology might with more advantages than Widal test and blood culture, and it be with much potentials to apply in clinical diagnosis.

Key words: typhoid; paratyphoid; protein array analysis; Widal test

伤寒、副伤寒是由伤寒沙门氏杆菌和副伤寒沙门氏菌甲、乙、丙型引起的急性消化道传染病, 在肠道感染中占有重要地位^[1]。几乎所有的沙门氏菌都会污染食物引发该病, 其是人畜共患的肠道疾病^[2], 其传染性强、病程长、易复发、并发症多、疾病负担较重, 是中国目前最主要的传染病之一^[3]。传统的伤寒、副伤寒的实验诊断方法是基于 Widal 于 1896 年建立的肥达氏反应凝集试验, 已经应用了一百多年^[4], 由于其灵敏度和特异度均不高, 且费时、烦琐, 已经不能适应临床的快速诊断要求。近年来, 不同的诊断伤寒、副伤寒沙门氏菌感染的方法相继被研究和建立, 如间接血凝试验^[5]、间接免疫荧光法^[3, 6]、ELISA^[7-8]、PCR^[9-11]及脉冲场凝胶电泳方法(PFGE)^[12], 都不同程度地提高了诊断的灵敏度和特异度。但上述试验相对比较费时, 对伤寒、副伤寒的型别鉴定仍然需要做不同的试验来进行区分。蛋白质芯片技术的发展为大面积、高通量并行检测提供了有效的手段^[13-14], 笔者将蛋白质芯片技术应用于伤寒副、伤寒的实验室诊断上, 旨在为伤寒、副伤寒的诊断提供一种方便、快捷、准确、可靠的分型诊断技术, 通过一次检验便能确定患者感染伤寒、副伤寒的型别, 并以传统的伤寒诊断金标准血培养方法为标准^[15], 与肥达氏反应进行了比较, 探讨了用蛋白质芯片技术代替传统的肥达氏反应和血培养的可能性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 共收集经血培养确诊的伤寒、副伤寒沙门氏

菌感染血清标本 86 例, 健康体检血清标本 100 例(由深圳市武警医院检验科及深圳市南山医院中心实验室收集提供), 低温冻存。其中伤寒 30 例, 甲型副伤寒 51 例, 乙型副伤寒 5 例。

1.2 仪器与试剂 蛋白质芯片基片(由深圳市赛尔生物技术有限公司赛芯生物技术研究提供)为玻璃基片经活化处理后带有能与蛋白质氨基结合的活化醛基, 批号: 20100622。伤寒抗原(To、Th)、副伤寒抗原(Ta、Tb、Tc)、Vi 荚膜多糖抗原、伤寒诊断血清试剂由卫生部兰州生物制品研究所提供, 属伤寒菌苗生产用纯化抗原。生物芯片点样仪 Personal Arrayer 16 为北京博奥生物技术公司产品, 蛋白质芯片阅读仪及分析软件为深圳市赛尔生物技术有限公司与中科院光电所联合研制产品。其他试剂, 如抗人 IgM μ 链单克隆抗体-HRP 标记物购自 Sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 血液标本采集及处理 标本均为 2~4 周内采集的标本。采集静脉血自然沉降后离心 30 min, 收集上清分装于 1 mL 离心管低温(-70 ℃)冻存。

1.3.2 芯片矩阵设计 在芯片的方格内采用 4×5 的点阵设计, 在芯片的固定位置分别用机械臂点样伤寒抗原(To、Th)及副伤寒抗原(Ta、Tb、Tc)、Vi 荚膜多糖抗原, 每个抗原采用双位点设计, 并设计质控对照点和阴性对照(四位点设计)。

1.3.3 芯片法检测 在芯片上加入待测标本(预先按 1:20

比例稀释)200 μL,37 ℃ 孵育 30 min,洗涤并甩干;加入示踪物 2 滴(抗人 IgM-HRP),37 ℃ 孵育 30 min,洗涤并甩干;加入显色剂 2 滴,37 ℃ 孵育 10 min;甩干后用蒸馏水滴终止反应;在蛋白芯片阅读仪上进行结果分析,亦可用肉眼观察结果(颜色反应)。

1.3.4 肥达氏试验检测 按照文献报道及参照试剂说明书进行操作^[16]。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 分析软件,采用卡方检测, $P<0.05$ 为差异有统计学意义,并用 99% 的可信区间范围来评估。

2 结 果

2.1 血培养阳性标本 IgM 抗体检测结果 用 86 例血培养标本作为金标准,分别用蛋白质芯片法和肥达氏反应法来检测 IgM 抗体,其阳性率分别为 97.6% (84/86)、60.4% (52/86),差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.2 健康体检血清标本 IgM 抗体检测结果 对 100 例健康体检血清标本(血培养测定为阴性)分别用蛋白质芯片法和肥达氏反应法进行特异性试验,特异度均为 98.0%,结果见表 1。

表 1 两种方法检测健康体检标本 IgM 抗体的特异度			
方法	阳性例数(<i>n</i>)	阴性例数(<i>n</i>)	阳性率(%)
蛋白质芯片法	2	98	2.0
肥达氏反应法	2	98	2.0

2.3 两种检测方法的总检出率和总符合率 蛋白质芯片法的特异度为 98.0%,灵敏度为 97.6%,对所有标本的总符合率表面上看是 100.0%。但其中有 2 例阳性标本属于健康体检人群,为假阳性,另 2 例标本属于血培养阳性标本,而未检测出来。肥达氏反应法的灵敏度为 60.4%,特异度为 98.0%,见表 2。

表 2 两种方法的检测结果比较(<i>n</i>)			
方法	阳性例数	阴性例数	合计
蛋白质芯片法	86	100	186
肥达氏反应法	54	132	186

3 讨 论

蛋白质芯片法的特异度为 98.0%,灵敏度为 97.6%,对所有标本的总符合率表面上看是 100.0%。但其中有 2 例阳性标本属于健康体检人群,属于假阳性,另 2 例标本属于血培养阳性标本,但未检测出来。肥达氏反应法的灵敏度为 60.4%,远远低于蛋白质芯片法,特异度与蛋白质芯片法相同。

按照点样矩阵的设计,伤寒、甲型副伤寒及乙型副伤寒都有明显的点阵显示,其中有 1 例标本显示了 Th 抗原位点和 Vi 荚膜多糖抗原位点同时出现显色的情况,另一例出现了 Th 抗原位点、Tc 抗原位点和 Vi 荚膜多糖抗原位点三者同时显色,这都可能与伤寒沙门氏菌携带有关。

伤寒、副伤寒沙门氏菌感染的检测主要用肥达氏反应和血培养^[4],肥达氏反应虽然是临床上比较经典的诊断方法,但其灵敏度较低,且需时 18~24 h,难以满足临床上的需要。血培养对 1~2 周内的标本灵敏度可达 80%~90%,但对用过抗生素的患者及标本采集不当者,实际检测中灵敏度仅为 50%~

70%,且需要 3~7 d 的时间^[16]。免疫荧光法和 ELISA 法虽然在检测的灵敏度方面有很大的提高^[7-11],但一次试验只能检测一种抗原或抗体指标,对于伤寒、副伤寒的型别需要多次试验才能确定。

本研究将伤寒抗原(To、Th)、副伤寒抗原(Ta、Tb、Tc)及 Vi 伤寒荚膜多糖抗原利用蛋白质芯片法进行同时检测。方法的灵敏度为 97.6%,特异度可达 98.0%,与血培养的结果符合率高。Vi 荚膜多糖抗原检测可筛选出带菌者。由于 Vi 荚膜多糖抗原存在于伤寒、副伤寒丙型沙门氏菌的菌体表层,其抗体出现在 3~4 周左右^[17-18],本研究中有 1 例标本出现 Th 抗原、Tc 抗原和 Vi 荚膜多糖抗原位点同时阳性的结果,因本试验无丙型副伤寒标本,故有可能为伤寒沙门氏菌携带者。因此,抗 Vi 荚膜多糖抗体的检测对伤寒传染源的识别有一定意义,只是时间要把握在感染 3~4 周后。本试验对健康体检人群出现了 2 例非特异阳性反应,与肥达氏反应结果相同,其原因可能是两种方法的抗原来源相似,也可能像文献^[17]报道的一样,伤寒、副伤寒抗原与其他沙门氏菌有 90% 的同源性,其他原因的发热、类风湿因子(RF)增高、患者的免疫状况等也可能对试验造成非特异干扰。总之,蛋白质芯片法具有速度快(需时 90 min)、高通量并行检测的优点。一次试验可以得知六种抗原对应的抗体的血清状况,可以在短时间内对疾病的型别作出鉴定,以便于得出流行病方面的资料,为伤寒、副伤寒的临床诊断提供了又一快速而先进的检测手段,具有较好的应用潜力,值得临床推广使用。

参考文献

[1] Girard MP, Steele D, Chaignat CL, et al. A review of vaccine research and development: human enteric infections[J]. Vaccine, 2006, 24(15):2732-2750.

[2] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 3 版. 北京:中国农业出版社,2003.

[3] 陈富超,曹明燕,李明强. 间接免疫荧光法(IFL)检测抗伤寒副伤寒沙门氏菌 IgM 抗体[J]. 遵义医学院学报,2007, 30(2):123-125.

[4] Olopoenia L, King A. Widal agglutination test-100 years later; still plagued by contro versy[J]. Postgrad Med J, 2000, 76(892):80-84.

[5] 李纯德. 伤寒副伤寒间接血凝检测方法的建立[J]. 中国医学实验杂志,2003,4(2):96-97.

[6] 贾樱,余芳,陈富超,等. 免疫荧光法检测抗伤寒副伤寒沙门菌 IgM 类抗体方法学研究[J]. 江西医学检验,2003,21(3):168-174.

[7] Chart H, Cheasty T, de Pinna E, et al. Serodiagnosis of Salmonella enterica serovar Typhi and S. enterica serovars Paratyphi A, B and C human infections[J]. J Med Microbiol, 2007, 56(Pt 9):1161-1166.

[8] 黄艳艳,曹三杰,文心田. Dot-ELISA 法检测仔猪副伤寒血清抗体方法的研究[J]. 中国预防兽医学报,2005,27(1):62-66.

[9] Malorny B, Hoofar J, Bunge C, et al. Multicenter validation of the analytical accuracy of Salmonella PCR: towards the international standard[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(1):2960-2961.

[10] 邵碧英,陈彬,汤敏英,等. 沙门氏菌 DNA 提取及 PCR 反应条件[J]. 食品科学,2007,28(7):331-334.

[11] 张嵘,黎加昌,张书梅,等. GyrB 基因和 16S rRNA 基因序列序列分析在沙门菌属细菌鉴别中的临床应用评价[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2007,27(4):368-369. (下转第 1441 页)

2.2 67 例 AMI 患者 CK-MB、cTnT 分别检测,CK-MB 与 cTnT 联合检测及 4 项指标联合检测阳性率分别为 58.2%、68.7%、77.6%、91.1%。

3 讨论

cTnT 作为心肌细胞所特有的一种调钙蛋白,具有高度的心肌特异性,与骨骼肌仅有 1%~2% 的交叉反应。健康人的血清中 cTnT 含量很低,当心肌细胞损伤时,cTnT 迅速释放入血,约在胸痛后 3.5 h 左右出现升高,50% 以上患者血清浓度超过正常上限,高达健康人 14~37 倍。虽然 cTnT 在血中半衰期较短,仅 2 h,但由于其在细胞内分布且含量丰富,并由坏死的结构蛋白不断释放,使其在血中异常时间可持续 6 d 甚至数周,其被美国和欧洲心脏协会一致评价为确诊 AMI 的高特异性和高敏感性的血清学标志物^[1-3]。本研究表明,在 AMI 发作 3 h 内,cTnT 检测结果都明显高于健康人,在 67 例 AMI 患者中 cTnT 的阳性率为 68.76%。CK-MB 非心肌所特有,在健康人骨骼肌中也有少量存在,曾有研究认为 CK-MB 是诊断 AMI 的“金标准”^[4-6]。但随着研究的不断深入,酶学指标越来越暴露出它的不足,因此一些新的实验室指标开始用于心血管疾病的诊断。

FIB 是由肝脏合成的一种血浆糖蛋白,属于急性时相蛋白,在凝血酶作用下转变为纤维蛋白单体,继而交联为纤维蛋白,是血栓的主要成分并会参与凝血的过程^[7]。因此有研究者认为 FIB 不仅可以反映血栓状态,而且高水平 FIB 也可以作为预测冠脉病变的一个独立危险因素^[8-9]。本研究也表明在患者发生 AMI 时,血浆中 FIB 浓度增高与文献报道一致。

DD 由交联纤维蛋白在纤溶酶作用下形成。其既能反映体内凝血酶的活动,又能反映纤溶酶的活性,可作为继发性纤溶活性增强的标志,特别是在血栓溶解和形成同时存在的活化血栓存在时具有重要意义。有研究表明,DD 还能够刺激单核细胞释放白细胞介素-6(IL-6)等一些炎症因子^[10-12],本研究表明血浆 DD 可能是比其他炎症标记物更强的心血管事件风险的预测因子。

本研究表明,传统的诊断指标都是采取检测 cTnT 和 CK-MB,cTnT 的敏感性高于 CK-MB,CK-MB、cTnT、FIB、DD 联合检测敏感性高于 CK-MB 与 cTnT 联合检测,提示多指标联合检测可提高该疾病的检出率,并在临床治疗上具有重要的指导意义。

参考文献

- [1] 程丽娟. 急性心肌梗死的早期诊断生化标志物[J]. 心血管病学进展, 2006, 27(1): 67-69.
- [2] Alepet JS, Thygesen K, Antman E, et al. Myocardial infarction re-defined: a consensus document of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the re-definition of myocardial infarction[J]. J Am Coll Cardiol, 2000, 36(3): 959-969.
- [3] Christenson RH. National academy of clinical biochemistry laboratory medicine practice guidelines: biomarkers of acute coronary syndromes and heart failure[M]. Washington DC: AACC Press, 2007.
- [4] 张志成, 宋阳. cTnT、MYO 和 CK-MB 对 AMI 的诊断价值[J]. 重庆医学, 2004, 10(8): 325-326.
- [5] 赵芳, 赵缙. CK、AS 和 cTnT 对急性心肌梗死诊断的比较[J]. 现代检验医学杂志, 2004, 19(5): 54-55.
- [6] 刘琼, 赵水平, 洪绍彩. 心型脂肪酸结合蛋白(H-FABP)、cTnI 与 CK-MB 在诊断早期 AMI 中的比较[J]. 实用预防医学, 2006, 13(3): 555-557.
- [7] Di Napoli M, Singh P. Is plasma fibrinogen useful in evaluating ischemic stroke patients[J]. 2009, 40(5): 1549-1550.
- [8] Danesh J, Whincup P, Walker M, et al. D-dimer and coronary heart disease: prospective study and meta-analysis[J]. Circulation, 2001, 103(19): 2323-2327.
- [9] Danesh J, Lewington S, Thompson SG, et al. Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular disease and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis [J]. JAMA, 2005, 294(14): 1799-1809.
- [10] 陈燕, 常志文. 冠心病患者血中白细胞介素-6 和白细胞介素-10 浓度的变化[J]. 新医学, 2004, 35(7): 413-414.
- [11] Rosenson RS, Tangney CC, Schaefer EJ. Comparative study of HMG-CoA reductase inhibitors on fibrinogen[J]. Atherosclerosis, 2001, 155(2): 463-466.
- [12] Ottani F, Galvani M. Prognostic role of hemostatic markers in acute coronary syndromes patients[J]. Clin Chim Acta, 2001, 311(1): 33-39.

(收稿日期: 2011-12-30)

(上接第 1439 页)

- [12] 徐景野, 许国章, 金春光, 等. 伤寒和甲型副伤寒沙门菌 PFGE 分型方法研究与应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(8): 1738-1740.
- [13] 陈忠斌. 生物芯片技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 3-25.
- [14] 刘菊林, 易小兵. 蛋白芯片技术及其在临床检测中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(9): 876-878.
- [15] Krogh K, Hermansen NO, Wathne KO. Typhoid and paratyphoid fever in children[J]. Tidsskr Nor Laegeforen, 2005, 125(12):

1640-1642.

- [16] 彭文伟. 传染病学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 95-96.
- [17] 张力, 阚颀. 伤寒与甲型副伤寒实验室诊断方法研究进展[J]. 疾病监测, 2009, 24(4): 293-297.
- [18] 余荣华, 许红梅. 伤寒的实验室诊断进展[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(11): 1093-1095.

(收稿日期: 2011-12-11)