

张晗涵, 朱金鲁, 吴宗福. 无乳链球菌检测技术研究进展 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (6): 128-134.

ZHANG H H, ZHU J L, WU Z F. Advances in research on techniques for detection of *Streptococcus agalactiae* [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (6): 128-134.

无乳链球菌检测技术研究进展

张晗涵, 朱金鲁, 吴宗福*

(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 是一种重要的人兽共患病病原, 不仅能引发新生儿的脑膜炎、败血症等疾病, 还能感染孕妇、老年人及免疫功能不全者, 对公众健康构成严重威胁。此外, 该菌是罗非鱼链球菌病和奶牛乳房炎的重要致病菌, 给水产养殖业和养牛业带来了重大的经济损失。因此, 建立快速、敏感、准确的无乳链球菌检测方法对该类疫病的防控具有重要意义。目前, 国内外已开发出多种方法检测不同群体中的无乳链球菌。本文总结了近年来的无乳链球菌检测技术研究进展, 涵盖了微生物学、分子生物学、免疫学等传统检测技术, 同时也介绍了基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS)、生物传感器等新型检测方法, 并对各种技术的优缺点进行了分析, 旨在为无乳链球菌感染的诊断和防控工作提供重要参考。

关键词: 无乳链球菌; 检测技术; MALDI-TOF MS; 生物传感器

中图分类号: S852.6 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)06-0128-07

Advances in research on techniques for detection of *Streptococcus agalactiae*

ZHANG Hanhan, ZHU Jinlu, WU Zongfu*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: *Streptococcus agalactiae*, an essential zoonotic pathogen, poses a severe threat to public health by causing diseases such as meningitis and sepsis in newborns, and it also infects pregnant women, the elderly, and individuals with compromised immune systems. Furthermore, this bacterium is a primary causative agent of streptococcosis in tilapia and mastitis in dairy cows, leading to significant economic losses in the aquaculture and cattle-breeding industries. Therefore, the establishment of rapid, sensitive, and accurate methods for detection of *S. agalactiae* is of paramount importance for disease prevention and control. Currently, diverse methodologies have been developed globally to detect *S. agalactiae* in various populations. This article summarizes recent advancements in studies on *S. agalactiae* detection technologies, encompassing traditional methods such as microbiology, molecular biology, and immunology. In addition, we introduce novel detection approaches like matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and biosensors, and analyze the strengths and limitations of each technique. Our aim is to provide a valuable reference for the diagnosis and prevention of *S. agalactiae* infections.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*; detection techniques; MALDI-TOF MS; biosensor

无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 又称 B 簇链球菌 (group B *Streptococcus*, GBS), 是兼性厌氧的革兰阳性菌, 常以球形或卵圆形存在, 呈链状排列, 直径小于 2 μm 。无乳链球菌作为一种重要的人兽共患病病原, 能定殖于孕妇生殖道, 继而引起新生儿脑膜炎、败血症、肺炎等疾病, 也可使孕妇、老年人及免疫功能不全者发病甚至死亡^[1]。研究表明, 当前

全球新生儿无乳链球菌感染总发病率为 0.53/1000, 其中非洲地区最高, 美国、欧洲次之^[2]。水产养殖业中, 无乳链球菌是罗非鱼链球菌病的重要病原, 可致脑膜炎等, 具有高的致死率; 2008 年后, 由无乳链球菌感染引起的中国地区罗非鱼链球菌病达 90% 以上^[3]; 畜牧业中, 无乳链球菌是引起奶牛乳房炎的重要致病菌, 常定殖于牛皮肤、乳头表面及乳头管等部位, 给奶牛养殖业带来巨大的损失^[4]。快速、敏感、准确的无乳链球菌检测方法是该类疫病防控的关键。

目前的无乳链球菌检测方法主要有微生物学、分子生物学、免疫学等成熟的传统检测技术, 还衍生出了基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-

收稿日期: 2024-08-30; 修回日期: 2025-04-24

基金项目: 龙岩学院动物源性人兽共患病防控福建省高校工程研究中心开放课题 (2021ZW001)

第一作者: 张晗涵, 女, 本科生

* 通信作者: 吴宗福, 教授, 研究方向为兽医微生物学, E-mail:

wuzongfu@njau.edu.cn。

TOF MS)、生物传感器等新型检测技术。传统的微生物分离培养鉴定作为无乳链球菌检测的金标准,普遍应用于养殖生产行业。PCR 技术作为无乳链球菌辅助诊断的强有力依据,具有高度灵敏、准确的优势,特别是巢式 PCR 法、实时荧光定量 PCR 法、液滴数字 PCR 等新型 PCR 技术拓宽了其在实际临床疾病诊断中的应用。酶联免疫吸附技术 (ELISA)、胶体金免疫层析技术、乳胶凝集试验等免疫学方法主要用于无乳链球菌病样品的快速诊断。MALDI-TOF MS、生物传感器新型检测技术的发展,具有良好的替代潜力。本文对无乳链球菌检测技术进行综述,并分析总结各种技术优缺点,从而为该病类的诊断和防控提供重要参考。

1 传统微生物学检测方法

以分离鉴定牛源无乳链球菌为例,传统微生物学检测方法包括对乳样 18~24 h 增菌、划线接种于血琼脂平板上过夜分离培养、挑取可疑单菌落纯化、挑选代表性单菌落涂片染色、镜检初步判定、根据《伯杰细菌鉴定手册》进行生化鉴定及血清分型等基本步骤。此外,无乳链球菌 *cfb* 基因编码的 CAMP 因子(协同溶血素因子)可以促进金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) ATCC25923 分泌的 β -溶血素溶解红细胞的活性,在血平板上 2 菌接种的邻近区域可以观察到明显的溶血增强现象,故也常用 CAMP 协同溶血试验,用于初筛无乳链球菌^[5-7]。

传统的分离鉴定方法具有检测成本低等优点,但是仅可用于初筛,且操作繁琐、耗时长、不利于现场快速诊断,此外对操作人员素质、实验室设备环境无菌化要求高。法国梅里埃公司将传统的生化鉴定试剂制成微型化鉴定试剂盒,基于统计学原理、结合现代计算机技术构建了 API 鉴定系统^[8]。杜琳等^[9]基于此细菌鉴定系统,采用 API 20STREP 试剂盒对乳样中的无乳链球菌进行了分离鉴定。随后又出现了 VITEK、Biolog 和 Sherlock MIS 系统等全自动的微生物鉴定系统,显著提高了鉴定的效率^[8]。

2 分子生物学检测方法

近年来,随着分子生物学技术高速发展,分子生物学检测方法逐渐成为微生物诊断技术新的研究热点并得到广泛的应用。

2.1 16S rRNA 基因序列鉴定

16S rRNA 基因编码细菌核糖体小亚基 rRNA, 包含 10 个保守区域和 9 个高变区域 (图 1, V1-V9)。保守区序列在所有细菌中基本相似、变异率低遗传稳定;高变区序列具有属或种的特异性,且变异程度与细菌的亲缘关系密切相关。对 16S rRNA 基因的高变区或全长测序,可用于不同细菌的检测和鉴定^[10]。第三代测序技术能够提供完整的 16S rRNA 基因序列,有助于更深入的细菌分类和鉴定、构建更精确的细菌系统发育树,但全长测序的工作量大、成本高、较为复杂^[10]。无乳链球菌常用的 16S rRNA 测序通用引物为 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492R: 5'-TACCTTGTTACGACTT-3'^[11], 该引物可以扩增出包含多个高变区的 16S rRNA 基因片段,将得到的测序结果与 GenBank 数据库中基因序列进行比对,以判断细菌种类,通常同源性 > 98.65% 代表同一物种^[12]。此外,还可针对 16S rRNA 特异性区域 V3-V4、V4-V5 设计引物,特异性、准确性较高^[13]。例如,刘凯等^[14]设计了无乳链球菌 16S rRNA 的特异性引物 F: 5'-AGGAAACCTGCCATTTGCG-3'; R: 5'-CAATCTATTTCTAGATCGTGG-3', 但其引物设计要求较高,且受数据库更新影响较大。尹金花等^[11]通过 Genbank 数据库中已知的无乳链球菌 16S rRNA 序列设计 PCR 扩增引物,对新疆某牧场 62 份奶样分离出的 12 株无乳链球菌进行检测,其测序结果经 BLAST 分析比对,结果显示该 12 株分离菌株与 NCBI 数据库中已录入的无乳链球菌相应序列具有高度相似性 (>99.0%),证实与传统微生物鉴定法的结果一致。与传统微生物检测方法相比,16S rRNA 基因序列鉴定技术灵敏度高、准确性好、特异性强。但是,由于该方法基于纯种菌株的序列,使其在细菌的分离、纯化上耗时费力,且需要专业的人员分析序列。

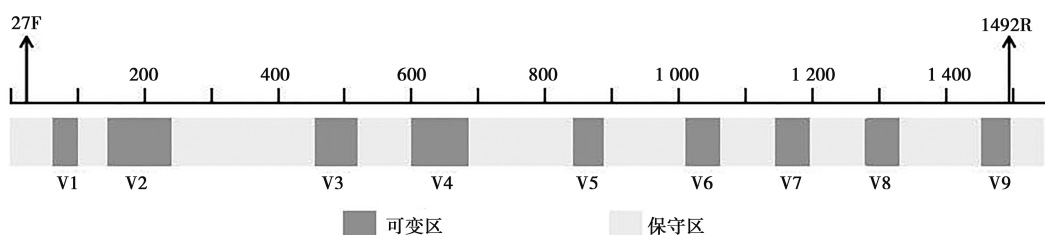


图 1 16S rRNA 基因结构与通用引物示意

2.2 PCR 检测方法

PCR 广泛应用于无乳链球菌的检测,且随着分子生物学技术的不断发展,衍生出多种 PCR 方法,如普通 PCR、套式 PCR、多重 PCR、实时荧光定量 PCR (qPCR)、液滴式数字 PCR (ddPCR) 及可视化 PCR 检测法等。

2.2.1 普通 PCR

国内外学者对于无乳链球菌的检测常用表面免疫原性蛋白 (*sip*) 基因和补体因子 B (*cfb*) 基因作为无乳链球菌种特异性基因。*sip* 基因编码无乳链球菌表面免疫原性蛋白,在不同血清型菌株中高度保守,故可以作为检测的靶基因,其编码蛋白也常作为无乳链球菌疫苗开发的候选蛋白^[15];但由于其高度保守性,在区分无乳链球菌与其他链球菌属细菌时易产生误差,还需要其他方法确认。*cfb* 基因编码具有溶血活性的蛋白,参与侵袭宿主细胞,为无乳链球菌所特有,可作为快速鉴别无乳链球菌的分子标记^[16]。基于 *cfb* 基因的检测方法灵敏度、特异性均较高,能够检测到极低丰度的模板 DNA;但在区分无乳链球菌的不同血清型上有一定局限性^[17]。阚威等^[18]以 *cfb* 基因序列设计引物,对宁夏奶牛场 89 份隐形乳房炎奶样中分离到的 12 株无乳链球菌疑似菌株进行鉴定,扩增出的基因序列与 NCBI 上已知的无乳链球菌相应序列具有高度一致性 (>99.0%),各菌株间 *cfb* 基因序列也高度一致 (100.0%),从而鉴定为无乳链球菌。与传统检测方法相比,普通 PCR 具有快速便捷的优点,具有较高的特异性和敏感度。

2.2.2 套式 PCR

套式 PCR 是对普通 PCR 的改良,通过设计两对引物,第二对引物扩增位点于第一对引物大片段中,经过两次扩增对微量片段有放大效应。贾玉萍等^[19]利用链球菌属 16S rRNA 的保守序列设计了 A1、A2 两对特异性引物,建立了一种快速准确的套式 PCR 来检测 50 份临床型和隐性型乳房炎乳样中的无乳链球菌,与传统鉴定方法得出的结果完全一致,且经过扩增培养后,检测的灵敏度可达到 1 CFU/mL,高于细菌培养法。邵辰等^[20]基于无乳链球菌的 *cfb* 基因设计了 PcfbA、PcfbS 两对引物,首次建立了罗非鱼源无乳链球菌套式 PCR 检测方法,以菌液为模板,灵敏度可达 8.7×10^0 CFU/mL;其以罗非鱼血液为模板,最低浓度可达到 8.7×10^4 CFU/mL,而普通 PCR 法针对血样在该浓度下无法检测出阳性,体现套式 PCR 的高灵敏度。

套式 PCR 较传统培养法省时省力,由于 PCR 两次扩增的放大效果增加了检测结果的特异性与灵敏度。但同时,反应体系受到污染的可能性也增大,对

引物的设计难度也较普通 PCR 大。

2.2.3 多重 PCR

多重 PCR 也是基于普通 PCR 优化后的 PCR 系统,即两对及以上的引物可以在同一 PCR 反应体系中扩增多个目标序列,填补了普通 PCR 无法检测多种病原菌的缺陷。Albuquerque 等^[21]分别以纤维蛋白原结合蛋白 A 基因 (*fbxA*)、类胡萝卜素合成酶 A 基因 (*crtA*)、自溶素 A 基因 (*lytA*)、外膜蛋白 P6 基因 (*p6*)、16S rRNA 为靶序列设计了 5 对引物,建立了一种多重 PCR 技术来同时诊断引起细菌性脑膜炎最常见的四种病原菌:无乳链球菌、肺炎链球菌、脑膜炎奈瑟氏菌、流感嗜血杆菌。对 447 份临床脑脊液样本进行检测,其 DNA 检测限度 (LOD) 为 1 pg/ μ L。Furfaro 等^[22]基于 *cps I a*、*cps I b*、*cps III* 核酸序列设计了 3 对引物,开发了一种检测无乳链球菌的同时确定其血清型 I a、I b 和 III 的多重 PCR 方法,在对 512 份孕妇阴道样中分离出的 112 份 GBS 阳性样进行检测,其 DNA 检测限可达到 2.8×10^{-4} ng/ μ L。国内学者将多重 PCR 技术广泛应用于奶牛乳房炎病原菌的测定。夏颖等^[23]建立了以无乳链球菌热核酸酶基因 (*nuc*)、延伸因子 Tu 基因 (*ef-tu*) 和溶血素基因 (*eta*) 基因保守序列为引物的多重 PCR 检测方法,鉴定出了河北地区奶牛乳房炎 150 份乳样中金黄色葡萄球菌、无乳链球菌和绿脓杆菌 3 种病原菌,其中无乳链球菌的检出率与传统分离培养得到的结果有 91.3% 的符合率, DNA 检出限为 10^{-3} mg/L。叶方钰等^[24]通过 *sig* 基因、迁移相关基因 (*mig*)、纤溶酶原激活剂基因 (*pauA*) 设计了特异性引物,并以 16S rRNA 为内参,建立了同时诊断无乳链球菌、停乳链球菌和乳房链球菌的三重 PCR,该多重 PCR 检测方法具有较好的特异性和灵敏性,对同时快速检测牛奶中无乳链球菌、停乳链球菌及乳房链球菌具有重要意义。

与普通 PCR 相比,多重 PCR 的检测范围广,在显著提高检测效率的基础上也有益于降低成本,更具实用意义。但是,由于处在同一反应体系中,引物的竞争作用、体系内的条件作用 (退火温度、Taq 酶浓度等) 会使得其相较于使用相同引物对的普通 PCR 灵敏度低 10~100 倍^[8]。除此以外,多重 PCR 与普通 PCR 都无法实现定量分析。

2.2.4 qPCR

qPCR 技术是利用荧光染料或者荧光探针,实时监测整个 PCR 扩增进程中的荧光信号,建立标准曲线实现对待测基因的定量分析^[25]。相较染料法,荧光探针的灵敏度和特异性更高,且可结合多重 PCR 技术,故在分子生物学检测中应用较多。Breeding

等^[26]以荚膜基因簇为靶基因,建立了一种基于TaqMan探针的新型qPCR来检测68例无乳链球菌分离株的不同分型,其结果与乳胶凝集试验100%一致,且DNA检测灵敏度可达到50 pg/ μ L。郑添予等^[27]建立了针对乳房链球菌、无乳链球菌及停乳链球菌的三重qPCR法,用于快速检测吉林养殖场720份奶样中引起奶牛乳房炎链球菌属的细菌,其中无乳链球菌DNA的最低检出限为 1.2×10^{-5} ng/ μ L。

qPCR与上述几种PCR相比实现了从定性到定量的飞跃,其结果可视化、数字化,便于不同研究团队数据比较。但是,该方法无法检测到低拷贝数的目标DNA分子,不能在单分子水平对样品进行准确的定量分析,且成本昂贵,对仪器设备的条件要求高,在临床或基层使用推广较困难。

2.2.5 ddPCR

ddPCR是继实时荧光定量PCR后发展的一种核酸绝对定量分析技术,在精准医疗、微生物检测和食品安全领域应用广泛。其中,ddPCR技术在临床检测中使用较多,其基本原理是将PCR反应液分散成大量微小液滴,以这些小液滴为反应单位,进行PCR扩增,泊松分布原理分析扩增后液滴荧光信号来计算靶基因的拷贝数^[28]。曾一凡等^[29]设计了靶向*cpsE*、*sip*基因的特异性引物,建立ddPCR方法检测无乳链球菌,检测DNA最低限度至5 pg/ μ L,比qPCR的检测限0.5 ng/ μ L更为精确、灵敏。

相较于qPCR方法需要分析标准曲线计算目标DNA数量,ddPCR提供了每个样品靶标DNA的绝对计数,更为方便简易。此外,由于ddPCR具有较高的准确性、稳定性、特异性和可重复性,高度适用于低浓度核酸扩增、稀有基因检测、拷贝数变异分析、核酸绝对定量,克服了qPCR法的局限性。但是,其仪器试剂费用较高,限制了其在基础实验室或医疗环境的普及。

2.2.6 可视化PCR

以PCR检测法为基础,辅助可视化技术,研制出适用于临床快速诊断的商品化试剂盒。如有研究人员将PCR与胶体金免疫层析技术相结合研发了PCR核酸免疫层析试纸条。如陈诗胜^[30]建立了一种针对奶牛乳房炎四种病原菌的PCR核酸免疫层析试纸条,其中无乳链球菌的核酸免疫层析试纸条检测的最低浓度为 2×10^3 CFU/mL,比同来源样本凝胶电泳法测得的最低限高10倍(2×10^4 CFU/mL)。王志英等^[31]结合了qPCR以及侧向层析技术(LFAs)建立了一种便携式集成微流控技术于快速诊断GBS,在一体式设备上对采样拭子进行DNA富集纯化、基于重组酶聚合酶扩增反应(RPA)的扩增,最终结果由LFA的

颜色反应读出。在对甘肃47份临床样本的检测中,其灵敏度和特异性均达到了100%,其DNA LOD为 10^3 copies/mL。较传统PCR灵敏度有明显优势,适合于基层快速诊断,但使用过程中的反复冻融会影响酶、引物、模板的活性和结构的稳定性。

2.3 环介导等温扩增技术(LAMP)

LAMP是一种新型的体外等温扩增特异核酸的检测技术。其原理是根据目的基因不同区间设计多对引物,在链置换DNA聚合酶(*Bst* DNA聚合酶)的作用下恒温催化链置换反应(30~60 min)发生,最终扩增产物为花椰菜结构的双链DNA混合物。LAMP技术可与荧光染料、侧向层析、紫外光照射等多种方法结合实现阳性结果的可视化^[32]。贺婷等^[33]对链球菌属保守基因*ruf*(调节上游因子基因)的6个特异性区域设计了4条特异引物,建立了快速准确测定链球菌性乳房炎的LAMP方法。经过各方面条件优化,链球菌DNA的检测敏感性达到52 fg/ μ L,是普通PCR方法的10倍,且与其他常见乳房炎致病菌不存在交叉污染。郭旭光等^[34]根据无乳链球菌*fbxB*基因上的6个区域设计了相应的6个特异性引物,在恒温条件下扩增60 min,建立了一种检测无乳链球菌的新型实时荧光环介导的等温扩增技术,采用荧光染料SYTO-9取代传统LAMP白色沉淀物的主观判断标准,并配套荧光定量PCR仪实时动态监测,极大地提高了准确性和灵敏度,DNA LOD可达300 pg/ μ L。

LAMP技术较PCR技术由于其针对目标序列的环引物的设计显著提高了扩增效率、缩短检测时长,且设备简单、成本低。但是,LAMP技术对于引物设计和选择的要求非常严格,且有可能产生非特异性扩增,出现假阳性的概率较高^[34]。

3 免疫学检测方法

免疫学检测方法是基于抗原抗体特异性结合的原理,通过无乳链球菌表面的特异抗原刺激机体产生相应的特异性抗体从而达到诊断的目的。本文主要介绍ELISA、胶体金免疫层析技术和乳胶凝集试验这3种免疫学检测方法。

3.1 酶联免疫吸附技术(ELISA)

ELISA的检测原理是通过酶联抗体与样本中的靶物结合,通过酶染色、修饰标记(如荧光)等将无色反应物可视化,可直接肉眼观察颜色变化进行定性分析,也可利用分光光度计测量颜色吸光度指标做定量分析^[35],其主要包括间接ELISA、竞争ELISA、双抗夹心ELISA。Bu等^[36]以纯化的Sip蛋白作为包被抗原建立了一种间接ELISA检测无乳链球菌,用该方法检测的45例临床牛乳腺炎病例,阳性结果与

PCR 结果 100%一致。特异性抗血清结果表明该间接 ELISA 技术灵敏度高、特异性强,可为无乳链球菌的流行病学研究提供可靠的检测方法。张新艳^[37]借助杂交瘤技术制备罗非鱼无乳链球菌 Sip 融合蛋白单克隆抗体,建立双抗体夹心 ELISA 技术对 2011—2013 年间漳州地区自然分离到的 60 株致病菌进行检测,结果与双重 PCR 检测结果呈 98.33%符合率,检测限达到 0.85×10^6 CFU/mL。曾子轩等^[38]利用 3A9 抗体建立的双抗体夹心 ELISA 法在 50 CFU/mL 的低浓度下感染 12 h 之后仍检测出了高水平的无乳链球菌特异性抗原,为罗非鱼链球菌病的早期检测提供了方法。

ELISA 技术操作简单、不需要分离样品,却兼具敏感性、特异性、稳定性,适合于规模化的流行病学调查。但是,ELISA 对试剂的专一选择性要求高,难以同时分析多种成分,而且由于其对结构类似的化合物易发生交叉反应,故易出现假阳性,操作人员或环境影响也可能导致结果不准确。

3.2 胶体金免疫层析技术 (GICT)

GICT 是目前应用最广泛的一种快速检测技术,其原理是以胶体金颗粒作为示踪标记物或显色剂,样品滴入后在硝酸纤维素膜提供的侧向流动力下移动,与喷涂在其上的抗体、载体结合,所形成的抗原抗体复合物不断累积,最后使胶体金呈现肉眼可见的颜色变化。Sayed 等^[39]以引起奶牛乳腺炎的五种病原菌金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、无乳链球菌和化脓性链球菌的特异性抗原制备的多克隆抗体开发的 5 组合胶体金侧向层析试剂盒,其检测最低浓度为 10^3 CFU/mL,且能在 10 min 内得到结果。布日额等^[40]开发了无乳链球菌 PI-2a 菌毛亚单位 BP 的单克隆抗体,并以此建立了针对快速检测奶牛乳房炎的胶体金标记免疫层析试剂盒,该试纸条灵敏度达到 10^6 CFU/mL 且与人工培养的金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门菌、副结核杆菌等无交叉反应,具有较高的特异性。

胶体金免疫层析技术操作流程简单快捷,保证高效的同时也兼顾灵敏度、特异性。对专业仪器依赖性低、对操作人员、使用场景要求低,且样品范围广、成本低廉,对由无乳链球菌感染引起的流行病的现场检测可提供有效的技术支持。但其快速定性的特性也导致了其无法满足临床定量化的要求,有时会出现假阴性^[41],仍需与其他检测技术配合使用。

3.3 乳胶凝集试验 (LAT)

LAT 的原理是通过乳胶颗粒吸附抗 GBS 荚膜多糖抗体与相应抗原结合产生肉眼可见的凝集现象从而做出诊断判定的方法,用于临床快速诊断无乳链球菌

病。Hogan 等^[42]利用乳胶凝集试验检测从 98 例散装牛奶中分离的无乳链球菌,其敏感性和特异性分别为 97.6%和 98.2%。Shahaway 等^[43]对传统直接乳胶凝集法进行改善,建立了富集后乳胶凝集法。对埃及某医院纳入的 200 名孕妇患者每位采集 3 份阴道样品并分为 3 组:第 1 组采取传统微生物培养法,直接接种于 SBS 显色琼脂培养基上;第 2 组分别在增菌肉汤中富集 5、24 h 后再进行乳胶凝集试验检测抗原;第 3 组直接进行乳胶凝集试验检测 GBS 抗原。其结果表明富集 5 h 后的乳胶凝集法敏感度为 66%,低于 SBS 培养基组的 83%、但远高于直接乳胶凝集试验 4.3% 的灵敏度,可作为紧急诊断的一种便捷方法;而富集 24 h 的乳胶凝集法敏感度可达到 95.7%,可用于替代传统培养检测法。乳胶凝集试验简便快速,特异性强,灵敏度高,不需要仪器设备,成本低,故而在临床和生产实践中得到广泛的应用。但是其易发生交叉反应,还需其他方法辅助检测。

4 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS)

MALDI-TOF-MS 技术是近年来快速发展的一种将表型分析与分子分析结合起来的微生物诊断技术,其原理是通过采集细菌特异性蛋白指纹图谱与数据库中已知的参考菌株图谱进行分析比较,实现待测菌株在属、种水平准确和直接的鉴定结果^[44]。Tanno 等^[45]开发了一种基于 MALDI-TOF MS 技术的快速检测孕妇无乳链球菌的方法,对 178 份孕妇阴道/直肠拭子中分离出的 126 份无乳链球菌疑似样本进行检测,与传统培养方法相比,经 TOF 峰分析后, MALDI 检测无乳链球菌的敏感性和特异性达到 100% (34/34) 和 88.0% (81/92),使用 qPCR 对 MALDI 检测阳性而传统培养法结果为阴性的 11 份样品进行复验,其中 4 份存在无乳链球菌的特异性基因,这提示 MALDI-TOF MS 技术具有较高的灵敏度,可作为临床 GBS 筛查的替代方案。Alnakip 等^[46]基于 MALDI-TOF-MS 技术对 38 株链球菌株进行鉴定(其中 8 株为无乳链球菌疑似株),结果显示与 16S rRNA 测序鉴定结果一致,且通过对比评价 MALDI-TOF MS 蛋白质组学图谱与 16S rRNA 基因测序获得的系统发育树状图, MALDI-TOF MS 在种内和亚种水平上为某些链球菌提供了更优越的鉴别能力,检测时间、检测成本均降低,进一步验证了其高效性与可靠性。

MALDI-TOF MS 技术具有处理方法简便、鉴定结果快速、准确性高、灵敏度高、高通量和成本低等主要优点。但是其设备复杂、对实验室条件要求高,

较难推广于基层兽医的使用中。此外,由于依赖于数据库,对于缺乏参考光谱的细菌,该方法无法鉴定。不良的菌株、样品、基质极易造成污染对结果产生严重影响^[47]。

5 生物传感器技术

生物传感器是一种将生化反应过程中产生的化学或生物信号转换成另一个可量化的电信号、光信号等的装置^[48]。Gersson等^[49]开发了一种电化学免疫生物传感器,来快速检测罗非鱼源的无乳链球菌,其原理是该生物传感器上的单一抗体利用抗原抗体的特异性结合,选择性地将无乳链球菌固定在丝网印刷电极(SPCE)表面,随后通过与包被于SPCE表面的链霉亲和素-辣根过氧化物酶(HRP)偶联复合物结合进一步放大电化学信号,通过记录电流信号实现定量检测。利用该方法检测哥伦比亚不同罗非鱼养殖场的6份水样,结果显示存在无乳链球菌,与养殖场的病死鱼临床组织病理学检查结果一致,而传统微生物法和分子生物学技术均未检测出,进一步凸显其强大潜力^[49]。Ghasemi等^[50]制备了一种磁性纳米粒子-荧光量子点的免疫磁性光学探针,将免疫磁分离技术与光学生物传感器结合起来,该磁性纳米颗粒与抗无乳链球菌单克隆抗体具有高度特异性,从而分离、检测不同样品中的无乳链球菌。相较于传统细菌培养技术和分子生物技术更快速高效,可在不到10 min内检测到PBS缓冲液中10 CFU/mL的细菌,奶样中的LOD为10² CFU/mL并且无需对临床样本进行预处理,在临床医学和畜牧业均有广阔的应用前景。生物传感器技术灵敏度高、特异性强、检测效率高,对于操作人员的专业化要求低、仪器试剂简单,也可提供定性、半定量或实时定量监控的结果,且正朝着微型化、自动化、便携式方向发展。

6 总结与展望

无乳链球菌对公共健康、畜牧生产、水产养殖等均有巨大危害,建立快速、准确、灵敏的检测方法是当务之急。相较传统培养技术,套式PCR法、qPCR法、ddPCR等方法大幅缩短了检测时间,同时在灵敏度和准确性上也占据优势,实现了从单纯定性到定量的质变,但它对实验人员和仪器要求高,限制了其在基层的推广应用。免疫学检测方法适合临床快速诊断,但灵敏度、准确性有待提高。近年来发展起来的新型检测技术如生物传感器等有望成为高效的替代手段,未来需朝着简便、快速、适用性强、易于推广的方向发展。

参考文献:

- [1] 陈晶,马骏,范钊玮,等.无乳链球菌致病性研究进展[J].中国畜牧兽医,2024,51(3):1277-1285.
- [2] NUCCITELLI A, RINAUDO C D, MAIONE D. Group B *Streptococcus* vaccine: state of the art [J]. Ther Adv Vaccines, 2015, 3 (3): 76-90.
- [3] CHEN M, LI L P, WANG R, et al. PCR detection and PFGE genotype analyses of streptococcal clinical isolates from tilapia in China [J]. Vet Microbiol, 2012, 159 (3/4): 526-530.
- [4] 骆巧,吕倩,罗正中,等.奶牛场无乳链球菌传播途径新发现[J].中国奶牛,2020(4):22-24.
- [5] 王丹,杨峰,李新圃,等.奶牛乳房炎病原菌诊断技术研究进展[J].中国畜牧兽医,2017,44(6):1811-1817.
- [6] 刘龙海.奶牛乳房炎无乳链球菌血清型分布、耐药性及其相关基因的研究[D].兰州:中国农业科学院,2017.
- [7] LIU Y, LIU J. Group B *Streptococcus*: virulence factors and pathogenic mechanism [J]. Microorganisms, 2022, 10 (12): 2483.
- [8] 张行,李新圃,杨峰,等.无乳链球菌研究进展[J].中国兽医学报,2020,40(4):864-872.
- [9] 杜琳,周雪,赵红梅,等.华北地区牛源无乳链球菌的分离鉴定及生物学特性[J].微生物学通报,2016,43(3):567-574.
- [10] JOHNSON J S, SPAKOWICZ D J, HONG B Y, et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis [J]. Nat Commun, 2019, 10 (1): 5029.
- [11] 尹金花,李政毅,吴兴,等.牛源无乳链球菌分离鉴定与耐药性分析[J].动物医学进展,2022,43(9):40-43.
- [12] KIM M, OH H S, PARK S C, et al. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2014, 64 (Pt 2): 346-351.
- [13] CLAEISSON M J, WANG Q, O'SULLIVAN O, et al. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions [J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38 (22): e200.
- [14] 刘凯,顾小龙,张立梅,等.奶牛乳房炎性无乳链球菌药敏试验及毒力基因检测[J].中国兽医学报,2021,41(5):999-1003.
- [15] BRODEUR BERNARD R, BOYER M, CHARLEBOIS I, et al. Identification of group B *Streptococcal* Sip protein, which elicits cross-protective immunity [J]. Infect Immun, 2000, 68 (10): 5610-5618.
- [16] 胥志超,张波,钟婉莹,等.无乳链球菌毒力基因的分布及其与耐药性和MLST的关系[J].中国病原生物学杂志,2018,13(11):1216-1220.
- [17] 罗娅莎,张矣桐,张亮,等.基于cfb和scpb基因的无乳链球菌PCR检测方法比较及临床应用[J].中华临床实验室管理电子杂志,2021,9(1):38-41.
- [18] 阚威,樊杰,武小虎,等.奶牛乳房炎无乳链球菌的分离及PCR鉴定[J].中国兽医学报,2014,34(8):1261-1266.
- [19] 贾玉萍,周东顺,万仁忠,等.巢式PCR检测无乳链球菌16S rRNA方法的建立及应用[J].农业生物技术学报,2005(5):123-126.

- [20] 邵辰, 易弋, 黎娅, 等. 罗非鱼无乳链球菌巢式 PCR 检测方法的建立 [J]. 淡水渔业, 2016, 46 (2): 40-44.
- [21] ALBUQUERQUE R C, MORENO A C R, DOS SANTOS S R, et al. Multiplex-PCR for diagnosis of bacterial meningitis [J]. Braz J Microbiol, 2019, 50 (2): 435-443.
- [22] FURFARO L L, CHANG B J, PAYNE M S. A novel one-step real-time multiplex PCR assay to detect *Streptococcus agalactiae* presence and serotypes Ia, Ib, and III [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2017, 89 (1): 7-12.
- [23] 夏颖, 陈颖彬, 马亚宾, 等. 河北省奶牛乳房炎主要致病菌多重 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国兽医学报, 2019, 39 (11): 2195-2199.
- [24] 叶方钰, 刘爽, 王权, 等. 奶牛乳房炎三种主要链球菌多重 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国兽医科学, 2023, 53 (2): 182-188.
- [25] CAI H, BELL-ROGERS P, PARKER L, et al. Development of a real-time PCR for detection of *Mycoplasma bovis* in bovine milk and lung samples [J]. J Vet Diagn Invest, 2005, 17 (6): 537-545.
- [26] BREEDING K M, RAGIPANI B, LEE K D, et al. Real-time PCR-based serotyping of *Streptococcus agalactiae* [J]. Sci Rep, 2016, 6: 38523.
- [27] 郑添予, 于龙政, 徐晓琪, 等. 牛源乳房链球菌、无乳链球菌、停乳链球菌三重实时荧光定量 PCR 法的建立及初步应用 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2022 (12): 69-73.
- [28] 李慧调, 潘建章, 方群. 数字 PCR 技术的发展及应用 [J]. 化学进展, 2020, 32 (5): 581-593.
- [29] ZENG Y F, CHEN C M, LI X Y, et al. Development of a droplet digital PCR method for detection of *Streptococcus agalactiae* [J]. BMC Microbiol, 2020, 20 (1): 179.
- [30] 陈胜胜. 奶牛乳房炎四种致病菌 PCR 核酸免疫层析试纸条检测方法的建立及应用 [D]. 南京: 南京农业大学, 2020.
- [31] WANG Z, YAN B, NI Y, et al. A portable, integrated microfluidics for rapid and sensitive diagnosis of *Streptococcus agalactiae* in resource-limited environments [J]. Biosens Bioelectron, 2024, 247: 115917.
- [32] SOROKA M, WASOWICZ B, RYMASZEWSKA A. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): the better sibling of PCR? [J]. Cells, 2021, 10 (8): 1931.
- [33] 贺婷, 左宗辉, 杨蓉, 等. 链球菌性乳房炎 LAMP 可视化检测方法的建立 [J]. 中国动物检疫, 2014, 31 (4): 85-89.
- [34] GUO X G, ZHUANG Y R, WEN J Z, et al. Evaluation of the real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Streptococcus agalactiae* [J]. Biosci Rep, 2019, 39 (5): BSR20190383.
- [35] MATSON R S. ELISA essentials: surfaces, antibodies, enzymes, and substrates [J]. Methods Mol Biol, 2023, 2612: 19-31.
- [36] BU R E, WANG J L, DEBROY C, et al. Development of an indirect ELISA for bovine mastitis using Sip protein of *Streptococcus agalactiae* [J]. Iran J Vet Res, 2015, 16 (3): 283-287.
- [37] 张新艳. 罗非鱼无乳链球菌双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立 [J]. 福建农业学报, 2014, 29 (6): 570-574.
- [38] 曾子轩, 蒋薇, 罗雨昕, 等. 应用双抗体夹心 ELISA 检测罗非鱼感染无乳链球菌后组织和血清中抗原变化 [J]. 广西畜牧兽医, 2023, 39 (1): 7-11.
- [39] SAYED R H, SOLIMAN R T, ELSAADY S A. Development of a lateral flow device for rapid simultaneous multiple detections of some common bacterial causes of bovine mastitis [J]. J Adv Vet Anim Res, 2023, 10 (2): 292-300.
- [40] 布日额, 吴金花, 锡林高娃, 等. 牛乳腺炎无乳链球菌 PI-2a 菌毛岛屿 BP 亚基单克隆抗体胶体金标记试纸条制备 [J]. 中国人兽共患病学报, 2020, 36 (1): 45-49.
- [41] TAKAYAMA Y, MATSUI H, ADACHI Y, et al. Detection of *Streptococcus agalactiae* by immunochromatography with group B streptococcus-specific surface immunogenic protein in pregnant women [J]. J Infect Chemother, 2017, 23 (10): 678-682.
- [42] HOGAN J S, SMITH K L, TODHUNTER D A, et al. Sensitivity and specificity of latex agglutination tests used to identify *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* isolated from bulk tank milk [J]. Am J Vet Res, 1988, 49 (9): 1537-1539.
- [43] EL SHAHAWAY A A, EL MAGHRABY H M, MOHAMMED H A, et al. Diagnostic performance of direct latex agglutination, post-enrichment latex agglutination and culture methods in screening of group B streptococci in late pregnancy: a comparative study [J]. Infect Drug Resist, 2019, 12: 2583-2588.
- [44] 宋丹靓敏, 陈晴, 周梦瑶, 等. MALDI-TOF MS 与 16S rDNA 方法对乳酸菌鉴定分析比较 [J]. 中国乳品工业, 2021, 49 (10): 4-7.
- [45] TANNO D, SAITO K, OHASHI K, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-Time-of-Flight mass spectrometry with Time-of-Flight peak analysis for rapid and accurate detection of group B *Streptococcus* in pregnant women [J]. Microbiol Spectr, 2022, 10 (3): e0173221.
- [46] ALNAKIP M E A, RHOUMA N R, ABD-ELFATAH E N, et al. Discrimination of major and minor streptococci incriminated in bovine mastitis by MALDI-TOF MS fingerprinting and 16S rRNA gene sequencing [J]. Res Vet Sci, 2020, 132: 426-438.
- [47] TO K N, CORNWELL E, DANIEL R, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for the identification of group B *Streptococcus* [J]. BMC Res Notes, 2019, 12 (1): 85.
- [48] 贺越, 王辉, 陈睿鹏, 等. 光学和电化学生物传感器对奶牛重要疾病诊断的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50 (2): 827-837.
- [49] VÁSQUEZ G, REY A, RIVERA C, et al. Amperometric biosensor based on a single antibody of dual function for rapid detection of *Streptococcus agalactiae* [J]. Biosens Bioelectron, 2017, 87: 453-458.
- [50] GHASEMI R, MIRAHMADI-ZARE S Z, NASR-ESFAHANI M H, et al. Optical biosensing of *Streptococcus agalactiae* based on core/shell magnetic nanoparticle-quantum dot [J]. Anal Bioanal Chem, 2019, 411 (25): 6733-6743.