

综述

免疫磁珠分离技术在病原微生物检测中的应用

盛跃颖,陈敏

(上海市疾病预防控制中心,上海 200336)

摘要: 本文综述了免疫磁珠分离技术的基本原理、主要影响因素及其在病原微生物检测领域中的应用,重点介绍了该技术与传统的分离培养技术、PCR技术、免疫学技术联合使用后,可以更有效地分离各种标本中的病原体,提高实验室对致病微生物的检出率,缩短检测时间,为病原体检测提供了一种新的技术路线。

关键词: 免疫磁珠分离技术;病原;微生物

中图分类号: R392-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8456(2011)05-0478-04

Application of immunomagnetic beads separation techniques in microbiology

Sheng Yueying, Chen Min

(Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China)

Abstract: The article reviewed the basic principle and main influencing factors of immunomagnetic beads separation techniques (IMBS) and its application in microbiology. An emphasis was put on introducing the conjunction of IMBS with other methods, such as standard culture methods, polymerase chain reaction and immunoassays, to make the detection of pathogenic organisms more effective, to increase the detection rate and reduce turaround time. IMBS techniques provided a new technical strategy for diagnostic microbiology.

Key words: Immunomagnetic beads separation techniques; pathogen; microbiology

免疫磁珠分离技术 (immunomagnetic beads separation techniques, IMBS) 是一种利用经过修饰的磁性微球作为载体进行目标物捕获及富集的技术^[1]。该技术的关键点是特异性的免疫磁珠的制备。近年来该技术被广泛应用于生化产品的分离纯化、细胞的分离提纯及微生物检测领域等,尤其在病原微生物分离检测方面的应用日益广泛,已出现了针对不同病原菌的商品化免疫磁珠检测试剂盒,该技术已逐步应用到相关实验室的日常检测工作中。本文将简述免疫磁珠分离技术的基本原理,探讨其在病原微生物领域的研究进展及应用。

1 免疫磁珠分离技术的基本原理

在微生物检测领域,IMBS技术采用的主要方案是将针对特定病原微生物的多抗或单抗偶联到磁珠微球体上,将该修饰后的磁珠与待检标本混合后,通过抗原抗体反应,若标本中存在靶物质,即可形成磁珠-目标微生物复合物。在外部磁力作用下,通过该复合物在磁场中的运动,将目标微生物从标本中分离出来。该方法也称为直接法。另一种为

间接法,磁珠上包被的是第二抗体(如羊抗兔 IgG)。在标本中先加入第一抗体(如兔 IgG),若存在目标微生物,可先与第一抗体结合,形成目标微生物-第一抗体复合物,再加入免疫磁珠,通过第二抗体与第一抗体的相互作用,从而捕获该复合物,在磁力作用下,达到分离的效果。

2 IMBS 技术应用时的主要影响因素

2.1 免疫磁珠的质量

免疫磁珠的质量包括如采用磁珠的品质结构与直径大小,包被磁珠所用的抗体等。磁珠的微球核心是顺磁性粒子,目前多采用铁及其氧化物,其外层包裹有高分子材料,可带有化学的功能基团,能与具有生物活性的蛋白质等发生结合,如免疫蛋白、生物酶、核酸等^[2]。其中包被磁珠的特异性抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体。其中单克隆抗体的主要特点是特异性好,非特异性吸附少,但一种单克隆抗体只能捕获具有相应特定抗原簇位点的目标微生物,可能会造成漏检。若采用多种单克隆抗体同时包被磁珠,可适度解决该问题,但成本将提高。与单克隆抗体相比,多克隆抗体的特异性较差,但用其制备的磁珠可通过目标微生物表面的不同抗原位点对其进行捕获,优点是制备较为方

收稿日期:2010-11-25

基金项目:上海市卫生局课题资助(2009186)

作者简介:盛跃颖 女 硕士 E-mail:yysheng@sdc.sh.cn

便,价格便宜。

2.2 目标菌、杂菌及磁珠的比例

免疫磁珠对目标菌的捕获率可受标本中目标菌和杂菌比例的影响。唐倩倩等^[3]比较不同的目标菌 *E. coli* O157:H7-免疫磁珠浓度对比对免疫磁珠捕获率的影响,得出当目标菌与免疫磁珠的浓度配比为 1:30 时,捕获率近 100%,即所有的目标菌可被捕获到。而在总体积不变、免疫磁珠的加入量固定的情况下,随着加入的杂菌枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 比例的增加,捕获率出现先下降后上升的情况。在实际应用时一般在不同标本中加入固定量的免疫磁珠,由于各个标本间目标菌和杂菌的浓度不同,即使排除其他影响因素,其捕获率也是在变化的,针对不同标本都要获得 100% 的捕获率只是一种理想状态。

2.3 待测标本的性状及其他影响因素

由于包被有特异抗体的免疫磁珠与靶目标结合的过程,其实是一种抗原抗体的反应,因此磁珠与标本的孵育时间、反应的 pH 值、温度、标本的性状等都会对该过程产生影响。其中待测标本的性状对磁珠捕获能力的影响很大。原始标本性质的差异、选用增菌液的不同、增菌时间的长短,都会影响免疫磁珠与目标微生物相互作用时的微环境,影响这一特异性吸附的过程。如肉糜等标本中存在的大量脂质,可对特异性吸附反应产生干扰,使检测的灵敏度降低,甚至造成假阴性。同样,对于粪便标本,标本中的各种未消化的食物、杂质等成分,即使经增菌液稀释后,仍可能会对免疫磁珠的特异性吸附反应产生影响。

3 IMBS 技术在病原微生物检测中的应用

IMBS 技术能将病原微生物从大量杂质背景中分离出来,提高对目标微生物的检出率,缩短检测时间,显示出独特的优势。如针对大肠埃希菌(血清型 O26, O111, O157 等)、沙门菌、单核细胞增生李斯特菌、军团菌的免疫磁珠已被商业化,副溶血性弧菌、创伤弧菌、念珠菌等其他病原体的免疫磁珠也被相继开发,应用到各种科研及实验室检测工作中^[4-6]。

根据获得免疫磁珠-目标微生物复合物后的后续检测手段不同,可将该技术的应用分为以下 4 种主要方式。

3.1 用于分离培养

与磁珠相连的目标微生物,如致病菌,其生长不会受到抑制或影响,可继续进行传统的分离培养,这也是 IMBS 技术可应用于微生物检测与鉴定

的关键点之一。不少研究显示利用该技术进行样品的前处理后可显著提高常规检测方法的灵敏度。

目前已有很多成功的实例。如对于 *E. coli* O157, 赵文彬等^[7]的研究显示利用该方法可将 *E. coli* O157 的检出限由 200 CFU/g 提高到 2 CFU/g, 并缩短检测时间 1 d, 是该菌病原学分离的推荐方法。GB/T 4789—2008《食品卫生微生物学检验》已将免疫磁珠捕获法作为 *E. coli* O157:H7 检验的可选方法之一。

对于沙门菌, Tatarvhy 等^[8]为了进一步提高实验室的工作效率, 引入了免疫磁珠和 XLD 平板, 建立了一种检测食品中鼠伤寒沙门菌的新方法, 并与美国 FDA 标准化细菌检测手册 (*Bacteriological Analytical Manual*, BAM) 中的检测方法进行比较。该实验设计在各种食品标本(包括鸡蛋沙拉等低污染食品、中污染的西红柿等及高污染的牛肉糜)中分别加入 2~48 CFU 的鼠伤寒沙门菌。取一定量标本加入缓冲蛋白胨水经 6 h 增菌后, 进行免疫磁珠捕获, 并接种于 XLD 平板培养(该方法简称 6IX 法)。结果显示对于低污染和中污染标本, 6IX 法对鼠伤寒沙门菌的检出率接近 97%, 并比 BAM 标准方法提早 2 d 完成检测; 对高污染的牛肉糜标本, 检出率为 49%, 比 BAM 标准方法快 1~2 d。可见, 将 IMBS 技术合理地应用于病原体传统分离培养的步骤中可建立一种新的技术路线, 提高实验室的工作效率。

3.2 分子生物学检测

免疫磁珠分离技术除了能很好地与常规培养方法结合外, 也可与聚合酶链反应 (PCR) 等分子生物学技术联合运用, 利用后者快速、灵敏度和特异性高等特点, 达到快速检测的目的。对于一些无法用培养法进行检测的微生物, 目前对其主要检测技术为 PCR 技术, 若能在样品处理步骤中增加免疫磁珠分离技术, 一方面可以富集目标微生物, 提高检测灵敏度, 另一方面可以达到纯化的目的, 减少样品中可能存在的 PCR 抑制物对 PCR 技术的影响, 因此, 近年来利用免疫磁珠分离技术联合 PCR 或实时 PCR (real-time PCR) 技术的方案 (IMBS-PCR, IMBS-real-time PCR) 也日益成为该技术的发展应用热点之一。

如对于分离培养时间较长的军团菌, 在检测各种水样标本有无军团菌时, Yáñez 等^[9]先利用免疫磁珠分离技术对水样中目标菌进行捕获与富集, 再用实时荧光定量 PCR 技术检测军团菌的 dotA 基因 (defective organelle trafficking gene), 判断标本中有无目标菌。传统培养法需 7~10 d, 该方法可大大缩短检测所需时间。同样, 对于一些培养条件比较特

殊的细菌,如弯曲菌,厌氧菌等,通过 IMBS-PCR 技术,可不经或经短时间的微需氧或厌氧增菌培养后进行快速检测。有研究利用该方案检测肉类中的产毒素型产气荚膜梭菌,灵敏度可达 10 CFU/g,检测时间缩短至 10 h^[10]。

此外,在对病毒的检测方面,研究者利用抗病毒表面蛋白的单抗或多抗,开发了能捕获病毒颗粒的免疫磁珠,并对其应用时各个影响因素(孵育温度,时间等)进行了初步评估,证明了利用免疫磁珠技术可捕获病毒颗粒并用于各种检测的可行性。如 Park 等^[11]制备了针对诺如病毒(norovirus)的 G I -1 和 G II -4 外膜蛋白的多克隆抗体,与磁珠偶联获得了相应的免疫磁珠后,采用 IMBS 技术与荧光逆转录 PCR 联用(IMBS-real-time RT-PCR),对人为污染已知量的诺如病毒的草莓进行检测,结果表明其检出限可低至 3~7 个 RT-PCR 单位。杨万等^[12]利用该技术方案成功检测水中轮状病毒,全过程需时约 5 h,检测限为 1×10^4 拷贝/ml,检测结果与细胞病变试验的检测结果显示有良好的线性相关关系。对接种已知量的轮状病毒的污水处理厂水样的检测实验表明,该法可用于各种水样中轮状病毒的检测。

3.3 免疫学检测

采用免疫学方法对免疫磁珠-微生物复合物中的微生物表面抗原进行直接检测,省去了费时的培养步骤,这也是一种可供选择的技术路线。传统免疫学方法的步骤较为繁琐,而 Leon-Velarde 等^[13]利用自动免疫磁珠分选仪,使免疫磁珠富集过程和酶免疫测定步骤成功结合且完全自动化。其步骤是先在各个试管中分别加入针对肠炎沙门菌肠炎亚种的免疫磁珠(Dynal 公司),再联有辣根过氧化物酶(HRP)的羊抗沙门菌抗体及显色底物。整个检测过程中,加入标本后,若存在目标菌,即可分离形成免疫磁珠-目标菌-酶标抗体的复合物,该复合物经仪器自动转移到含有底物的试管中,经酶催化显色反应后可通过肉眼判断实验结果。采用该方法对于禽类环境标本中的肠炎沙门菌肠炎亚种进行检测,其方法的检出限在 $10^4 \sim 10^6$ CFU/ml。应用该方法检测 850 份禽类环境标本,并与传统方法进行比较,计算出该方法的灵敏度和特异性分别为 98.4% 和 96.8%。整个检测步骤可将经典方法所需 4~6 d 的检测时间,缩短至 48 h 内,大大减少了实验室的人力和物力资源,可在短时间内对大量样品进行目标菌的筛查。

目前已有商品化的试剂盒将 IMBS 技术与其他快速技术联用后,应用于不同标本中病原微生物的检测,使检测过程更为简便、快速、规范。如采用商

业化的 IMBS-PCR-ELISA 试剂盒及 IMBS-real-time PCR 试剂盒检测散装牛奶中的鸟分枝杆菌副结核亚种,两种方法的检出限均达到 20 CFU/ml^[14],可应用于实验室的检测。

为了解免疫磁珠技术与其他一些商业化的快速检测技术相比有无优势,Islama 等^[15]采用了 Dynal 公司的大肠杆菌 O157 免疫磁珠试剂盒(dynabeads anti-*E. coli* O157)与 BioMerieux 公司的基于全自动酶联免疫分析仪的大肠杆菌 O157 免疫浓缩检测试剂盒(immuno-concentration *E. coli* O157 kit,ICE)平行检测 637 份动物粪便和 360 份肉类标本。结果显示与 VIDAS ICE 技术相比,免疫磁珠分离法更为灵敏、廉价。采用手工操作法虽不需要购买昂贵仪器,但缺点是手工操作费时,易出现标本间的交叉污染。

3.4 其他检测技术

近年来,IMBS 技术灵活地与其他各类检测技术联用,充分发挥各技术的优势,应用于各类研究、检测及监测工作中。如与固相细胞计数法(solid-phase cytometry, SPC)联用后,可不经培养,直接对与免疫磁珠相连的致病菌进行计数。有研究者应用 IMBS-SPC 技术直接对全血中的念珠菌属进行计数,检出限低至每毫升血中 1 个细胞,并将检测时间缩短至 4 h^[16]。有研究者将 IMBS 技术与傅里叶变换红外分光镜(fourier-transform infrared spectroscopy, FT-IR)结合使用,尝试对沙门菌进行血清分型,既将标本中的沙门菌用免疫磁珠捕获后转到疏水性网膜上,真空干燥后用 FT-IR 技术检测。与磁珠结合的沙门菌具有特征性的红外光谱,但由于磁珠干扰的存在,该技术不能精确鉴定沙门菌的血清型^[17]。

4 结语

IMBS 技术作为一种较新的免疫学技术,其本身也存在一些较难克服的问题。首先是免疫磁珠本身的质量,特别是对于多克隆抗体包被的磁珠,由于多抗效价批次间易出现波动,可直接影响免疫磁珠对目标菌的捕获率。其次是在不同的标本性状及杂菌污染程度下,免疫磁珠和目标微生物相互作用会受到影响,会降低该技术的灵敏度和特异性。如杂菌污染较多的牛肉类制品,并不适用于 IMBS 技术的检测^[8]。

但与传统培养法相比,IMBS 技术仍具有一定的优势。一方面该技术能在扩大取样量的基础上对目标微生物进行特异性捕获与富集,另一方面,其可灵活地与其他检测方法联合使用。因此 IMBS 技术已逐步被国内外多个标准检测方案所采用,在病原微生物检测领域具有良好的应用前景。

参考文献

- [1] OLSVIK O, POPOVIC T, SKJERVE E, et al. Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology [J]. Clin Microbiol Rev, 1994, 7 (1): 43-54.
- [2] 何磊, 郭雅飞, 李智洋, 等. 免疫磁珠的制备 [J]. 化工时刊, 2008, 22 (7): 5-6.
- [3] 唐倩倩, 王剑平, 叶尊忠, 等. 免疫磁分离技术在 *E. coli* O157: H7 检测中的应用 [J]. 光谱学与光谱学分析, 2009, 29 (10): 2614-2618.
- [4] 张凡飞, 杉山宽治, 西尾智裕, 等. 利用免疫磁珠法分离环境及食品中产生 TDH 副溶血性弧菌的研究 [J]. 中国卫生监督杂志, 2004, 11 (1): 7-9.
- [5] JADEJA R, JANES M E, SIMONSON J G. Immunomagnetic separation of *Vibrio vulnificus* with anti-flagellar monoclonal antibody [J]. J Food Prot, 2010, 73 (7): 1288-1293.
- [6] VANHEE L M, MEERSEMAN W, LAGROU K et al. Rapid and direct quantification of viable *Candida* species in whole blood by use of immunomagnetic separation and solid-phase cytometry [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48 (4): 1126-1131.
- [7] 赵文彬, 周克捷, 林红玉, 等. 应用免疫磁珠法分离大肠杆菌 O157: H7 [J]. 现代预防医学, 2000, 27 (3): 331-332.
- [8] TATAVARTHY A, PEAK K, VEGUILLA W, et al. An accelerated method for isolation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium from artificially contaminated foods, using a short pre-enrichment, immunomagnetic separation, and xylose-lysine-desoxycholate agar (6IX method) [J]. J Food Prot, 2009, 72 (3): 583-590.
- [9] YÁÑEZ M A, CARRASCO-SERRANO C, BARBERÁ V M, et al. Quantitative detection of *Legionella pneumophila* in water samples by immunomagnetic purification and real-time PCR amplification of the *dotA* gene [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71 (7): 3433-3441.
- [10] YANG Z Y, SHIM W B, KIM K Y, et al. Rapid detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meat samples using immunomagnetic separation polymerase chain reaction (IMBS-PCR) [J]. Agric Food Chem, 2010, 58 (12): 7135-7140.
- [11] PARK Y, CHO Y H, JEE Y, et al. Immunomagnetic separation combined with real-time reverse transcriptase PCR assays for detection of norovirus in contaminated food [J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74 (13): 4226-4230.
- [12] 杨万, 何苗, 李丹, 等. 免疫磁珠分离与实时定量 PCR 技术联合检测水中轮状病毒的研究 [J]. 环境科学, 2009, 30 (5): 1368-1375.
- [13] LEON-VELARDE C G, ZOSHERAFATEIN L, ODUMERU J A. Application of an automated immunomagnetic separation-enzyme immunoassay for the detection of *Salmonella enterica* subspecies enterica from poultry environmental swabs [J]. J Microbiol Methods, 2009, 79 (1): 13-17.
- [14] METZGER B C, KHASCHABI D, SCHÖNBAUER M, et al. Automated high-throughput immunomagnetic separation-PCR for detection of *Mycobacterium avium* Subsp. paratuberculosis in bovine milk [J]. Int J Food Microbiol, 2006, 110 (3): 201-208.
- [15] ISLAMA M A, HEUVELINKA A E, TALUKDERV K A, et al. Immunoconcentration of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 from animal faeces and raw meats by using Dynabeads anti-*E. coli* O157 and the VIDAS system [J]. Int J Food Microbiol, 2006, 109 (1-2): 151-156.
- [16] VANHEE L M, MEERSEMAN W, LAGROU K, et al. Rapid and Direct Quantification of Viable *Candida* Species in Whole Blood by Use of Immunomagnetic Separation and Solid-Phase Cytometry [J]. Clin Microbiol, 2010, 48 (4): 1126-1131.
- [17] De LAMO-CASTELLVÍ S, MÄNNING A, RODRÍGUEZ-SAONA L E. Fourier-transform infrared spectroscopy combined with immunomagnetic separation as a tool to discriminate *Salmonella* serovars [J]. Analyst, 2010, 135 (11): 2987-2992.

《中国食品卫生杂志》编委会名单

主任委员: 严卫星

副主任委员: 陈君石 刘秀梅

委员:

陈国忠(福建)	陈君石(北京)	丛黎明(浙江)	戴昌芳(广东)	邓峰(广东)	高卫平(陕西)
高志贤(天津)	顾清(天津)	顾振华(上海)	关联欣(山西)	郭红卫(上海)	郭丽霞(山西)
郭子侠(北京)	郝敬贡(新疆)	何来英(北京)	胡小红(湖南)	胡晓杼(江苏)	黄建生(北京)
姬红蓉(青海)	稽超(北京)	计融(北京)	金培刚(浙江)	金少华(安徽)	李宁(北京)
李蓉(北京)	李援(辽宁)	李冠儒(辽宁)	李西云(云南)	李小芳(北京)	林玲(四川)
林升清(福建)	刘华(陕西)	刘玮(江西)	刘毅(北京)	刘秀梅(北京)	刘砚亭(天津)
罗雪云(北京)	马福海(宁夏)	南庆贤(北京)	倪方(北京)	钱蔚(广东)	石阶平(北京)
孙长颢(黑龙江)	孙秀发(湖北)	唐细良(湖南)	唐振柱(广西)	田惠光(天津)	涂晓明(北京)
汪思顺(贵州)	王历(新疆)	王跃进(河北)	王竹天(北京)	魏海春(海南)	吴雯卿(甘肃)
吴永宁(北京)	徐海滨(北京)	严隽德(江苏)	严卫星(北京)	杨钧(青海)	杨国柱(吉林)
杨明亮(湖北)	杨小玲(重庆)	叶玲霞(安徽)	易国勤(湖北)	于国防(山东)	张丁(河南)
张理(山东)	张强(甘肃)	张立实(四川)	张连仲(内蒙古)	张荣安(河北)	张伟平(河南)
张永慧(广东)	赵生银(宁夏)	周树南(江苏)	周双桥(辽宁)		