文章编号:1000-5404(2007)20-1979-03

论著

斑点免疫金渗滤法检测抗荚膜组织胞浆菌抗体的研究

王 璞[1],陈保文[2],徐 苗[2],王国治[2] ([1]重庆医科大学附属第一医院肺科,重庆 400016;[2]中国药品生物制品检定所菌苗室,北京 100050)

提 要:目的 研究快速检测荚膜组织胞浆菌抗体的方法。**方法** 荚膜组织胞浆菌素纯蛋白衍生物(P-HTPM)为包被抗原,以葡萄球菌A蛋白(SPA)标记的免疫胶体金为检测标记物,采用斑点免疫金渗滤试验(DIGFA)检测荚膜组织胞浆菌(HC)免疫小鼠血清中抗HC抗体以及其他真菌免疫血清中抗体。**结果** DIGFA检测20份HC小鼠免疫血清,结果全为阳性,与ELISA检测结果一致,敏感性为100%。检测8份正常小鼠血清出现1份假阳性,特异性为87.5%。检测其他真菌免疫血清结果为:念珠菌属和马尔尼菲青霉菌免疫血清结果全为阴性;8份皮炎芽生菌血清出现1份阳性,9份副球孢子菌血清出现2份阳性。**结论** 斑点免疫金渗滤法检测抗HC抗体有较高的敏感性和特异性,快速简便。经临床标本扩大验证后将对荚膜组织胞浆菌病的快速诊断有应用价值。

关键词: 荚膜组织胞浆菌;斑点免疫金渗滤法;荚膜组织胞浆菌抗体
中图法分类号: R379.9;R446.61 **文献标识码:** A

Detection of anti-histoplasma antibody in sera of immunized mice by dot immunogold filtration assay

WANG Pu[1], CHEN Bao-wen[2], XU Miao[2], WANG Guo-zhi[2] ([1]Department of Pulmonary Diseases, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016;[2]National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To study a new and rapid method for detection of anti-histoplasma antibody by dot immunogold filtration assay (DIGFA). **Methods** DIGFA was developed by coating purified protein derivative of histoplasmin (P-HTPM) on nitrocellulose membrane as membrane antigen and labeling SPA with colloidal gold. Anti-histoplasma antibodies in sera from mice immunized with Histoplasma were detected by DIGFA. **Results** All immunizedsera with Histoplasma were positive by DIGFA as well as the results detected by ELISA. The sera immunized respectively with Monilia and Penicillium marneffei were negtive by DIGFA while 1 of 8 immunizedsera with Blastomyces dermatitidis and 2 of 9 immunizedsera with Paracoccidioides brasiliensis were found to be positive. **Conclusion** DIGFA was a valuable and rapid method to detect histoplasmaantibody in serum.

Key words: Histoplasma; dot immunogold filtration assay; histoplasma antibody

荚膜组织胞浆菌病(Histoplasmosis, HP)为全世界范围内流行的一种传染性系统性真菌病,由双相型真菌荚膜组织胞浆菌(Histoplasma capsulatum, HC)引起。HC是二类传染性病原菌,机体感染HC后常隐匿起病,无明显症状,少部分机体因吸入菌量大,机体免疫力低下而发展成为HP。HP在国外多见,国内少见报道。但近年来文献报道我国部分地区有较高的HC感染率,HP的发病率也有增多趋势,而国内临床医务工作者对该病的认识普遍不足,存在高漏诊率和高误诊率现象,播散型HP常因未得到及时正确的治疗而死亡。加强对HP快速诊断的研究成为必要,以期能尽量减少国内较高的漏诊误诊现状,降低该病的病死率。从荚膜组织胞浆菌中提取的荚膜组织胞浆菌纯蛋白衍生物(purified protein derivative of histoplasmin, P-HTPM)是我国新近自主研制成功的纯蛋白制剂,本研究以此作为抗原,建立斑点免疫金渗滤法(dot immunogold filtration assay, DIGFA)快速检测免疫小鼠血

基金项目: 国家高技术研究发展"863"计划(2004AA2Z3452)
Supported by the National "863" Key Research Project of China (2004AA2Z3452)

作者简介: 王 璞(1970-),女,重庆市人,博士研究生,主治医师,主要从事肺部疾病诊治方面的研究。电话:13206011331,E-mail:miss_miao@163.com
通讯作者: 王国治,电话:(010)67061751,E-mail:tbtestlab@163.net

收稿日期: 2007-03-05;**修回日期:** 2007-05-11

清中 HC 抗体，报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 真菌菌种 荚膜组织胞浆菌（HC），编号 ATCC 12700，购自美国；皮炎芽生菌（Blastomyces dermatitidis，BD）、巴西副球孢子菌（Paracoccidioides brasiliensis，PB）及马尔尼菲青霉菌（Penicillium marneffei，PM）购自中国医学科学院皮肤病研究所；白色念珠菌、近平滑念珠菌、克柔念珠菌及热带念珠菌由中国药品生物制品检定所提供。

1.1.2 主要试剂 包被抗原：P-HTPM 原液，每支 1 ml，1 mg/ml，由中国药品生物制品检定所研制[1]；羊抗人 IgG，购自北京中杉金桥生物技术公司。

1.1.3 动物 BALB/c 雌性小鼠，8～10 周龄，购自中国药品生物制品检定所实验动物中心。

1.1.4 斑点免疫金渗滤法的渗滤装置（反应盒） 由上海奥普生物医药有限公司赠予。

1.1.5 免疫金工作液 已制备好的葡萄球菌蛋白 A（SPA）致敏的免疫胶体金稀释液，由上海奥普生物医药有限公司赠予。

1.2 方法

1.2.1 小鼠免疫血清的制备 HC 免疫原的制备同文献[2]，将其他真菌种接种到沙保罗斜面培养基，25 ℃培养 2～4 周，用生理盐水洗涤菌体，用同样方法制备成免疫原。将上述免疫原分别与佛氏不完全佐剂充分乳化后免疫小鼠，HC 免疫原免疫小鼠 20 只，其余真菌免疫原各免疫小鼠 6～10 只，头颈部或腹股沟处皮下注射，0.2 ml/只，每 2 周免疫 1 次，5 次免疫后 5～7 d 摘除眼球取全血，制备免疫血清，分装 1.5 ml EP 管，-20 ℃贮存。ELISA 初步测定 HC 免疫小鼠血清中抗 HC 抗体的效价[2]，获得阳性血清，同时筛选出高、中、低效价的阳性血清。

1.2.2 抗原固相膜的制备 用 0.01 mol/L pH 7.2 的 PBS 缓冲液稀释 P-HTPM 抗原成 0.2、0.1、0.05、0.02、0.01 mg/ml 的溶液，分别取上述抗原稀释液 2 μl 点样在反应盒的硝酸纤维（NC）膜正中，作为检测（T）点，在 T 点靠外区域的 NC 膜上点样纯化羊抗人 IgG 作为质控（C）点。检测高中低效价的 HC 免疫血清各 2 份和 8 份正常小鼠血清，确定最适抗原量。

1.2.3 不同 pH 值的 PBS 缓冲液对结果的影响 确定最适抗原包被量后，分别配制 pH 为 6.0、6.4、7.2、8.0 的 PBS 缓冲液稀释抗原并固相在 NC 膜上，检测高中低效价的 HC 免疫血清各 3 份，确定最适 pH 值。

1.2.4 不同添加剂的 PBS 缓冲液对检测结果的影响 分别用含终浓度为 10% 甘油、3% 乙醇、10% 甲醇和 0.002 5% Tween20 的最适 pH 值的 PBS 缓冲液，稀释抗原并固相在 NC 膜上，检测 3 份 HC 免疫血清。

1.2.5 DIGFA 检测血清 8 份正常小鼠血清、20 份 HC 小鼠免疫血清和不同真菌的小鼠免疫血清作为待检品。当反应盒的 NC 膜上 T 点和 C 点都显现紫红色判为阳性；只有 C 点呈现紫红色则判为阴性；只有 T 点呈现紫红色时需要重新检测。每份标本重复检测 3 次。

2 结果

2.1 高中低效价阳性血清的测定

通过 ELISA 方法测定免疫小鼠血清中抗 HC 抗体，筛选出高中低效价阳性血清各 2 份，其 D（492）值分别为 2.325、2.148；1.212、1.634；0.973、0.944。

2.2 最适抗原包被量的确定

在点样抗原浓度为 0.2、0.1、0.05、0.02 mg/ml 的反应盒中，随点样抗原浓度的降低其阳性结果显色也逐渐变浅淡；各浓度抗原均能检测高中低效价的 HC 免疫血清，0.02 mg/ml 时检测结果显色清晰，显色的深浅与 ELISA 的 D（492）值相符合，D（492）值越大，显色越深，即效价越高显色越明显（图 1）。抗原浓度为 0.01 mg/ml 时，经 ELISA 检测出的低效价阳性血清不能被 DIGFA 检出；8 份阴性血清在抗原浓度为 0.2、0.1、0.05 mg/ml时出现 2 份假阳性，而在抗原浓度为 0.02 mg/ml 时仅出现 1 份假阳性。综上，确定抗原最适包被浓度为 0.02 mg/ml。



A：高效价；B：中效价；C：低效价

图 1 DIGFA 检测血清结果

2.3 不同 pH 值的 PBS 缓冲液对检测结果的影响

pH 值为 6.0、6.4、7.2、8.0 的 PBS 缓冲液稀释抗原后分别制备的反应盒，均能检出高中低效价的阳性血清。从肉眼观察：不同 pH 值的 PBS 缓冲液稀释抗原时检测结果显色无明显差异；pH 7.2 时各组显色相对深一些，NC 膜的背景也更干净，提示 pH 7.2 的 PBS 缓冲液更好。

2.4 不同添加剂的 PBS 缓冲液对检测结果的影响

含终浓度 3% 乙醇、10% 甲醇和 0.002 5% Tween20 这 3 种添加剂的 PBS 缓冲液稀释抗原所制备的反应盒检测，其阳性结果显色基本一致，显色均较好；含 10% 甘油的 PBS 缓冲液稀释抗原所制备的反应盒其阳性检测结果显色浅淡，不如前三者。

2.5 DIGFA 检测 HC 及其他真菌免疫小鼠血清

P-HTPM 为包被抗原的 DIGFA 检测 20 份 HC 小鼠免疫血

清,结果全为阳性,与 ELISA 检测结果一致,其敏感性为 100%(20/20);检测 8 份正常小鼠血清,出现 1 例假阳性,特异性为 87.5%。P-HTPM 抗原与皮炎芽生菌和副球孢子菌有交叉反应,假阳性率分别为 14.3%(1/7)、22.2%(2/9)。检测马尔尼菲青霉菌免疫血清和常见深部感染真菌之念珠菌属的免疫血清,所有检测标本结果全为阴性。见表 1。

表 1　DIGFA 检测不同真菌免疫的小鼠血清

组别	总例数	阳性例数	阴性例数	阳性率(%)
荚膜组织胞浆菌	20	20	0	100
皮炎芽生菌	7	1	6	14
副球孢子菌	9	2	7	22
马尔尼菲青霉菌	9	0	9	0
白色念珠菌	7	0	7	0
克柔念珠菌	8	0	8	0
近平滑念珠菌	8	0	8	0
热带念珠菌	8	0	8	0
正常小鼠血清	8	1	7	12

3　讨论

我国有无 HP 流行曾有争议,以前该病国内罕见,但自 20 世纪 80 年代以来,共有 17 个省市陆续出现 HP 患者,且呈现患者渐增、区域渐扩大的趋势,文献[3-5]报道以云南省和湖北省的病例多见,证明我国确实存在 HC 感染人群和 HP 散发流行。荚膜组织胞浆菌素纯蛋白衍生物(P-HTPM)由国内首次自主研制成功,其蛋白纯度大于 85%,以该制剂为变态反应原的皮肤试验的动物研究表明:1 μg/ml 的 P-HTPM 稀释液能诱导致敏豚鼠的皮肤反应,与国外同类制品等效,P-HTPM 有望成为新的体内诊断制品应用于 HC 感染的诊断[1]。在此基础上,本实验将 P-HTPM 作为抗原应用于血清学方法,建立了快速检测 HC 抗体的斑点免疫金渗滤法,并对其敏感性和特异性进行了研究。

免疫胶体金技术是一种 20 世纪 80 年代发展起来的新的固相标记免疫测定技术,通过金颗粒来放大免疫反应系统,使反应结果在固相载体上直接显示出来,用来检测抗原或抗体,目前已广泛应用于医学临床检验中,如早孕、乙肝、寄生虫、性病及病毒、细菌感染性疾病的检测。此技术常包括免疫金电镜染色法、胶体金染色免疫印迹法、斑点免疫金渗滤法(DIGFA)和胶体金免疫层析法等,其中 DIGFA 是目前应用较多的方法之一。确诊 HC 感染的方法是真菌的培养分离,但需要 2~6 周。本实验结果显示:DIGFA 能在数分钟内检测出高中低效价血清中抗 HC 抗体,显色明显、均匀,结果易于观察和判断,且有很高的敏感性。提示 DIGFA 对于减少 HP 的漏诊有着重要的价值;尤其是对播散型 HP 而言,快速的诊断能使患者尽早得到正确的治疗,从而可以大大降低病死率。该法结合组织胞浆菌素皮肤试验,可应用于 HC 感染的大规模流行病学调查,经过临床验证后有望作为 HP 的辅助诊断方法。

真菌是 HIV 感染者常见的条件致病菌,其中最常见的是念珠菌,其次为新生隐球菌、马尔尼菲青霉菌(PM)和荚膜组织胞浆菌(HC)等[6,7]。PM 也是双相型真菌,可引起全身性感染,已被美国疾病控制中心认为是 AIDS 患者的重要条件致病菌[8],这两种真菌引起的疾病在临床和病理表现上很相似,易误诊[9,10]。本研究 DIGFA 检测血清抗体显示 HC 与 PM 无交叉反应,可用于这两种真菌感染的鉴别诊断。与 HC 同属于双相型真菌的 BD 和 PB,在该方法中存在交叉反应,与文献[11]报道相符。

国内 HP 发病有增多,但仍属少见疾病,目前没有任何一种准确的快速诊断方法筛选出 HP 患者,收集和获取患者血清困难,所以本实验以免疫血清为研究对象,初步的实验结果为今后临床标本的检测提供了可靠的基础数据。P-HTPM 为抗原的 DIGFA 检测 HC 抗体的有效性和可行性还有待于今后临床研究的进一步验证。

参考文献:

[1] 陈保文, 沈小兵, 苏　城, 等. 荚膜组织胞浆菌素纯蛋白衍生物的制备[J]. 中国生物制品学杂志, 2006, 19(6): 617-618, 622.

[2] 王　璞, 陈保文, 罗永艾, 等. ELISA 检测抗荚膜组织胞浆菌抗体方法的建立[J]. 临床检验杂志, 2007, 25(2): 87-89.

[3] 赵蓓蕾, 施　毅, 印　洁, 等. 我国部分地区组织胞浆菌感染的流行病学调查[J]. 医学研究生学报, 2003, 16(3): 199-202.

[4] 李　杰, 李　霞, 桂希恩, 等. 湖北省 12 例疑似组织胞浆菌病的确证研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2003, 36(8): 469-470.

[5] 李云宾. 播散性组织胞浆菌病 5 例临床分析[J]. 海南医学, 2005, 16(1): 92, 155.

[6] Couppie P, Roussel M, Thual N, *et al*. Disseminated histoplasmosis: an atypical ulcerous form in an HIV-infected patient[J]. Ann Dermatol Venereol, 2005, 132(2): 133-135.

[7] Duong T A. Infection due to Penicillium marneffei, an emerging pathogen: review of 155 reported cases[J]. Clin Infect Dis, 1996, 23(1): 125-130.

[8] 吴绍熙. 艾滋病患者中偶见的真菌病[J]. 国外医学: 皮肤性病学分册, 1996, 22(2): 65-68.

[9] 邓卓霖, 马　韵. 马尔尼菲青霉病与组织胞浆菌病的鉴别诊断[J]. 中华医学检验杂志, 1999, 22(5): 313-315.

[10] 缪作华, 何　珏. 九例误诊为组织胞浆菌病的马尔尼菲青霉病的临床病理分析[J]. 赣南医学院学报, 2002, 22(5): 499-501.

[11] Guimaraes A J, Pizzini C V, De-Matos-Guedes H L, *et al*. ELISA for early diagnosis of histoplasmosis[J]. J Med Microbiol, 2004, 53(Pt 6): 509-514.

(编辑　龙　亮)