DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.11.027

文章编号: 1000-5404(1999)11-0846-03

免疫酶斑点法(IEDA)检测白色念珠菌芽管特异性抗原的临床研究

谢 卫红,叶庆俏,廖兴元 (第三军医大学附属西南医院皮肤科,重庆 400038)

【提要】 目的: 试图寻求一种较理想的系统性念珠菌病的血清学诊断方法。方法: 制备白色念珠菌芽管特异性抗体,采用 IEDA对临床病人血清中的相应抗原进行检测。结果:① 检测的最低敏感浓度为 0.25μg/ml;② 以 14例系统性念珠菌病患者为实验组,以 15例浅表白念感染者,11例其它疾病患者及 20位正常人为对照组,检测的敏感性为 71.4%,特异性为 100%。结论: 该方法敏感性较高,特异性强,且具有简便经济的特点。有助于系统性念珠菌病的诊断,尤其适宜在基层医院普及应用。

关键词 IEDA;白色念珠菌;芽管特异性抗原
中图法分类号 R392.11; R519.3 文献标识码 A

系统性念珠菌病发病率逐渐增高,由于此病缺乏特异临床症状和体征,血培养阳性率低,常需血清学检查协助诊断。为了寻求较理想的系统性念珠菌病的血清学诊断方法,本实验制备了白色念珠菌芽管特异性抗体,采用免疫酶斑点法(Immuno enzyme dot assay, IEDA)对临床病人血清中的白色念珠菌芽管特异性抗原进行检测,评价其对于系统性念珠菌病诊断的价值。

1 材料与方法

1.1 菌株

所用实验菌株为西南医院皮肤科真菌室保存菌种白色念珠菌 1933株,试验前经重新培养、分离、鉴定后转种于沙博氏固体培养基,置 4°C冰箱备用。

1.2 免疫动物抗原的制备

参考 Sundstrom的方法[1],将经沙博氏固体、液体培养基各培养 1d的白色念珠菌采用 GSB培养基 25°C振荡培养,即得静止相白色念珠菌孢子,然后再采用 199倍培养基 37°C培养白色念珠菌菌丝相,后者经高速离心,即得到所需抗原。

1.3 白色念珠菌菌丝相抗血清制备

用灭活的白色念珠菌菌丝相免疫新西兰大白兔,采用皮下多点注射和腹腔注射的方法,每周 1次,每次注菌约 5×10^2,时间 5月余。

1.4 芽管特异性抗体的制备与提纯

采用灭活的白色念珠菌孢子吸收白色念珠菌菌丝相抗血清,即得到芽管特异性抗血清,然后采用硫酸铵盐析法和 DEAE纤维素柱层析法纯化,经 PEG20000浓缩。用 751紫外分光光度计测蛋白浓度,置 -20°C冰箱保存。

1.5 芽管特异性抗体的鉴定

1.5.1 间接免疫荧光试验 抗原为白色念珠菌菌丝相和孢子相,I抗为白色念珠菌菌丝相抗血清和芽管特异性抗体,II 抗为羊抗兔 IgG荧光抗体,每次试验均设阴性对照。

1.5.2 免疫活性的鉴定 采用琼脂双向免疫扩散试验。

1.6 白色念珠菌芽管特异性抗原的提取及免疫活性的测定

1.6.1 抗原的提取 参考 Smail[2]的方法,采用 DTT提取法。

1.6.2 芽管特异性抗原免疫活性的测定 采用琼脂双向免疫扩散试验检测。

1.7 临床病人分组

A组: 系统性念珠菌病患者 14人,其中伴发白血病患者 5名,伴发恶性肿瘤患者 7名,伴发 SLE患者 2名;其中白色念珠菌血培养阳性者 11人,尿液及痰中镜检均发现大量白色念珠菌(经分离鉴定证实)3次以上者 10例,活性证实者 2例。B组: 浅表性白色念珠菌感染者 15人,其中念珠菌女阴道炎 10例,擦烂红斑 3例,鹅口疮 2例。诊断标准参考王高松所编《医学真菌学》[4],均在患处培养分离出了白色念珠菌。C组: 其它疾病患者 11例,其中结核病人 3例,恶性肿瘤病人 5例,白血病患者 2例,SLE病人 2例,均无白色念珠菌感染证据。D组: 正常对照组 20人,血清取自于本院血库献血员。以 A组为实验组,B组、C组及 D组为对照组。

免疫酶斑点法检测血清中白色念珠菌芽管特异性抗原,采用改良过碘酸钠氧化法制备酶结合物,进行免疫酶斑点法的检测。

2 结果

2.1 白色念珠菌芽管特异性抗体的鉴定结果,见图 1

2.1.1 间接免疫荧光试验 用兔抗白念菌丝相抗血清做I抗,孢子和芽管表面均可见荧光,采用芽管特异抗体 I抗,仅在芽管表面有荧光。

2.1.2 芽管特异性抗体纯度鉴定 醋酸纤维素薄膜电泳显示为一条沉淀线。

2.1.3 芽管特异性抗体免疫活性的鉴定 琼脂双向免疫

作者简介: 谢卫红,女,33岁,主治医师,硕士,现在广州军区总医院皮肤科,广州 510000

收稿日期: 1999-07-20;修回日期: 1999-10-31

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

扩散实验显示芽管特异性抗体与芽管特异性抗原之间出现沉淀线,沉淀效价 1∶16



图 1　芽管特异性抗体鉴定　(只有芽管表面荧光显色)　(箭头所示)

Fig 1　Detection of germ tube specific antibody of C. albicans (only germ tubes are stained)　(arrow)

2.2　芽管特异性抗原免疫活性的鉴定

琼脂双向免疫扩散试验显示芽管特异性抗原与芽管特异性抗体间出现沉淀线,说明具免疫活性.

2.3　IEDA检测血清中芽管特异性抗原结果

2.3.1　采用方阵滴定法选择包被抗体与酶结合物工作浓度分别为 6.25μg/ml及 25μg/ml.

2.3.2　敏感性　IEDA法检测芽管特异性抗原的最低敏感浓度为 0.25μg/ml.

2.4　IEDA检测临床病人芽管特异性抗原的结果

14例系统性白色念珠菌病患者中有 10例阳性,阳性率为 71.4%,在 15例浅表性白色念珠菌感染患者,11例其它疾病患者和 20例正常人血清中均未测出芽管特异性抗原,特异性为 100%,见表 1.

表 1　IEDA检测临床病人血清中芽管特异性抗原的结果

Tab 1　Result of IEDA detecting germ tube specific antigen of Candida albicans in serum of patients

	Systemic candidiasis	Superficial candida infection	Other disease	Normal
Number	14	15	11	20
Number of positive	10	0	0	0
Positive rate	71.4%	0	0	0

3　讨论

临床上,系统性念珠菌病缺乏特异的症状、体征,微生物学血培养阳性率低[3]。近年来在血清学诊断方面虽取得一些进展,但仍存在一定问题,检测抗体的方法存在较高的假阳性和假阴性,且抗体的产生需一定时日,不能做到早期诊断。研究者发现[4,5]白色念珠菌孢子可存在于正常人体,在正常人群和浅表念珠菌感染患者血清中可检测出甘露聚糖抗原,故甘露聚糖抗原的检测不能完全区别系统性念珠菌病、浅表念珠菌感染和正常人,特异性较差。由于甘露聚糖抗原蓄积在肝脾并被肝脾迅速清除,还可从尿中排出体外[6],因此在血清中浓度较低且不稳定,常不能被检出,故存在敏感性低的问题。白色念珠菌菌丝相是它的致病相,往往只在患者深部感染的组织中发现。白色念珠菌孢子出芽形成芽管,芽管继续延长形成菌丝,芽管是菌丝的最初形态,在白色念珠菌的致病过程中起十分重要的作用。因此,检测存在于菌丝相上的特异抗原可望有较大诊断价值[7]。Sundstrom发现芽管特异性抗原是蛋白质。还有不少作者证实了芽管特异性抗原的存在,本实验制备了芽管持异性抗体,搜集了临床病例,采用免疫酶斑点法对血清中的芽管特异性抗原进行检测,评价其对系统念珠菌病的诊断价值.

免疫酶斑点法是用硝酸纤维素薄膜 NCP作为载体进行酶联免疫试验的方法。最先由 Herbrink 报道[8],可用于病毒,细菌和寄生虫等抗原和抗体的检测,具有简便、经济等优点。国内程氏[9]用于检测系统念珠菌感染运动模型血清中的甘露聚抗原的阳性率为 45%,检测的最低敏度性为 0.5μg/ml。本研究用 IEDA检测系统性念珠菌病患者的敏感性为 71.4%,最低敏感浓度约为 250 ng/ml,以浅表性白色念珠菌感染病人 15例,其它疾病患者 11例和正常人 20例作为对照组,IEDA检测的特异性高达 100%。因此作者认为 IEDA检测芽管特异性抗原敏度性较高,特异性强,且具有操作简便、直观经济的特点.因此有助于系统性念珠菌病的诊断,较适宜在基层医院普及应用.

参考文献

[1] Sundstorm P M, Kenny G E. Characterization of antigens specific to the surface of germ tube of Candida albicans by immunoflurorescant[J]. Infect Immun, 1984, 43(3): 850-855.

[2] Smail E H, Jones J M. Demonstration and solubilization of antigens expressed primarily on the surface of Candida albicans germ tubes[J]. Infect Immune, 1984, 45(1): 74-81.

[3] Bougnoux M, Dupont C, Mateo J, *et al*. Serum is more suitable than whole bload for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR[J]. J Clin Microbiol, 1999, 31(4): 925-930.

[4] 王高松.临床真菌学[M].上海:上海复旦大学出版社,

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

1986. 22- 35.

[5] Greenfield R A, Troutt D L, Rickard R C. Comparison of antibody antigen and metabolite assays in rat models of systemic and gastrointestinal candidiasis[J]. J Clin Microbiol, 1988, 26(3): 409- 417.

[6] Bougnoux M E, Hill C, Moissenet D, *et al*. Comparison of antibody antigen and metabolite assays for hospitalized patients with disseminated or peripheral candidiasis[J]. J Clin Microbiol, 1990, 28(5): 905- 917.

[7] Kappe R, Muller J. Rapid clearance of Candid albicans mannan antigens by liver and spleen in contrast to prolonged circulation of Cryptocollus reformans antigens[J]. J Clin Microbiol, 1991, 29(8): 1665- 1669.

[8] Herbrink P, Van Bussel F J, Wamaar S O, et al. The antigen spot test (AST): a highly sensitive assay for the detection of antibodies[J]. J Immunol Methods, 1982; 48(3): 293- 299.

[9] 程良金,叶庆俯,刘荣卿,等.免疫酶斑点法检测念珠菌感染抗原血症的初步研究[J].中华皮肤科杂志, 1992; 25(4): 242- 245.

(编辑 冷怀明)

Clinical observation of detecting germ tube specific antigen of *Candid albicans* by IEDA

XIE Wei-hong, YIE Qin-yu, LIAO Yuan-xin (Department of Dermatology, Southwestern Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract Objective: To find a better serologic diagnostic method for systemic candidiasis. Methods: Germ tube specific antibody of *Candida albicans* was prepared and used to detect corresponding antigen in serum of patients by IEDA. Results: ① The lowest sensitive concentration was 0.25 ng/ml; ② The sensitivity of this method was 71.4%. There was no germ tube specific antigen detected in sera of 15 patients with superficial candidiasis, 11 with other diseases and 20 normal controls. The specificity was 100%. Conclusion: This method has high sensitivity and the method is simple. So IEDA can be helpful to the diagnosis of systemic candidiasis.

Key words IEDA; Candida albicans; Germ tube specific antigen

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net