

# 白色假丝酵母免疫荧光检查的初步探讨\*

吴绍熙 郭宁如

张元和

(中国医学科学院皮肤病研究所, 江苏·泰州) (蚌埠医学院, 安徽·蚌埠)

白色假丝酵母 (*Candida albicans*) 的免疫荧光检查, 国内外的一些报道结果很不一致<sup>[1,2]</sup>, 为了探讨此法的临床应用价值进行了初步研究, 并与常规法作了比较, 现简要报告如下:

## 材料与方 法

### 一、菌悬液的制备

将白色假丝酵母的 37℃ 24 小时培养物以无菌生理盐水洗下, 制成浓度为 5000 万个/毫升的菌悬液 20 毫升(由比浊法测定菌量), 加入 1% 福尔马林, 60℃ 灭活 30 分钟后, 接种于沙氏葡萄糖蛋白胨琼脂培养基上, 37℃ 培养 24 小时, 观察有无此菌生长。如果无菌生长, 可将菌体用无菌生理盐水冲洗三次, 再加入无菌生理盐水使菌悬液含菌量仍为 5000 万个/毫升。

### 二、抗原制备

将灭菌液体石蜡 10 毫升, 羊毛脂 6 毫升, 卡介苗 80 毫升 (5 毫克/毫升), 置无菌烧杯内, 加白色假丝酵母悬液 16 毫升, 青霉素和链霉素各 100 单位/毫升, 用注射器抽打, 使成白色乳状液体, 以无颗粒为度, 即成抗原。

### 三、免疫动物

取 4 只体重约 2.5—3 公斤的雄性家兔, 分两组, 第一组在两足垫各注射抗原 1.5 毫升; 第二组在背部皮下注射三点, 每点注射抗原 1 毫升。

### 四、抗白色假丝酵母血清效价的测定

用试管凝集法测试 4 只免疫一周兔的血清, 每只兔的血清分装 8 个试管, 依次双倍稀释为 1:10, 1:20……1:640 的浓度, 第 8 管为对

照。分别于各管中加入菌悬液 (10 亿个/毫升, 60℃ 灭活 30 分钟), 混匀, 置 37℃ 24 小时。结果见表 1。

表 1 兔抗血清效价测定\*(免疫一周后)

抗血清稀释度	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280
兔 号								
1	+++	+++	++	++	++	++	++	-
2	+++	+++	++	++	++	++	++	-
3	+++	+++	++	++	++	++	++	-
4	+++	+++	+++	++	++	++	++	-

\* 表中“+++”强阳性, “++”阳性, “-”阴性。

试验兔在免疫后 2 周分别由心脏采血 50 毫升, 其血清效价见表 2。

表 2 兔抗血清效价测定(免疫 2 周后)

抗血清稀释度	1:20*	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2660
兔号								
1	+++	+++	++	++	++	++	-	-
2	+++	+++	++	++	++	++	-	-
3	+++	+++	++	++	++	++	-	-
4	+++	+++	++	++	++	++	-	-

\* 因 1:20 抗血清稀释度时即为强阳性, 故未做 1:10 抗血清浓度测试。

将上述血清加入叠氮钠, 使其最终浓度为 1:5000。

### 五、临床材料的检查

将假丝酵母性阴道炎患者的阴道分泌物, 接种于沙氏葡萄糖琼脂斜面上, 27℃ 大培养, 待出现可凝酵母样菌落后转种至 1% 吐温 80

\* 本室吕桂霞、孙厚华等同志参加部分技术工作, 特此致谢。

的大米琼脂小培养上。次日观察。凡顶端形成厚壁孢子者为阳性,否则为阴性。另以沾有分泌物的棉拭子涂片二张,一张作革兰氏染色检查,有菌丝和孢子或只有孢子者为阳性,否则为阴性;一张作免疫荧光检查。具体做法:将阴道分泌物作1厘米直径涂点,晾干、火焰固定。在其上滴一滴白色假丝酵母免疫血清,放湿盒内37℃ 30—60分钟。取出涂片用pH8 PBS冲洗5分钟,晾干后用1:2羊抗兔荧光抗体的抗血清复染。再于湿盒中37℃放30—60分钟,用pH8 PBS冲洗5分钟,晾干后滴缓冲甘油一滴,盖盖玻片。在荧光发生器光源照射下镜检,菌体外包有明亮的黄绿色圈者为阳性,无此结构者为阴性。

### 试验结果

18例标本作直接镜检、培养检查及免疫荧光检查的结果比较

表3 直接镜检、培养检查及免疫荧光检查的结果比较

标本号	直接镜检培养				免疫荧光检查	备注
	革兰氏染色		大培养	小培养		
	菌丝	孢子				
1	-	+	-	-	-	口腔涂片标本(+)
2	-	+	+	+	+	
3	+	+	+	-	+	
4	+	+	+	+	+	
5	+	-	+	-	+	
6	+	-	+	-	-	
7	-	-	-	-	-	
8	+	+	+	+	+	
9	-	-	+	+	+	
10	-	-	+	-	+	
11	-	-	-	-	-	
12	+	-	+	-	+	
13	+	+	-	-	+	
14	-	-	-	-	-	
15	+	+	+	-	+	
16	-	-	+	-	-	
17	-	-	+	-	-	
18	+	+	+	+	+	
总计	阳性数 9/18	8/18	13/18	5/18	11/18	
	阳性率 50%	44.4%	72.2%	27.7%	61.1%	

光检查的结果比较见表3。

另外,如以小培养形成顶端厚壁孢子为准,与免疫荧光检查进行对比结果见表4。

表4 免疫荧光检查与真菌形态检查对比结果

真菌形态检查		免疫荧光检查		X <sup>2</sup> 测定
		+	-	
顶端厚壁	+	5	0	P<0.05
孢子形成	-	6	7	

从表4结果看,经统计学处理后, $p<0.05$ ,说明免疫荧光检查的阳性结果,在鉴定白色假丝酵母方面,结合小培养中顶端厚壁孢子形成方面具有一定价值。

### 讨论

对白色假丝酵母的鉴定曾从生化特性、免疫血清检查、菌落特征和菌体结构的观察以及动物接种等方面进行。免疫血清鉴定方面,由于抗原的特异性较差,仅能提示有本菌感染却难以定出菌型<sup>[2,3]</sup>。至于生化反应、动物接种等方面虽然比较可靠,却手续繁琐,需时长,对早期诊断不利难以推广。为此,我们在观察了假菌丝末端形成典型厚壁孢子对白色假丝酵母鉴定的基础上<sup>[4]</sup>,摸索出免疫荧光鉴定方法,并以直接涂片作革兰氏染色镜检、培养及免疫荧光检查等三种方法作对比观察。从18例的结果看,直接涂片法仅50%找到菌丝、孢子;在沙氏葡萄糖蛋白胨琼脂大培养上,72.2%有酵母样菌生长;在1%吐温80大米琼脂小培养上,仅27.7%有顶端厚壁孢子形成;而免疫荧光检查则61.1%阳性。初步认为,直接涂片革兰氏染色检查法虽较简便,阳性率却不够高。沙氏葡萄糖蛋白胨琼脂大培养法阳性率虽高,但仅说明有酵母样菌而不能确定属何种,更不能说明哪些菌属白色假丝酵母。为此,需作1%吐温80大米琼脂小培养来协助鉴定,因而手续繁琐。免疫荧光法阳性率虽不高,但方法简便,需时短(半天即得结果),但特异性较低,如6例(33.3%)非白色假丝酵母的酵母样菌也呈阳性。因此,此法仅能作为一种快速的辅助手段,

若与培养法尤其是 1% 吐温 80 大米琼脂小培养联用,在鉴定本菌时则有一定应用价值。

### 参 考 文 献

〔1〕 中国人民解放军第二军医大学微生物教研室荧光组

等:中华皮肤科杂志, 2: 81, 1980。

〔2〕 Ray, T. L. et al.: *Intern. J. Dermatol*, **17**:685, 1978.

〔3〕 Cemaish, J.S. et al.: *J. Invest Dermatol*, **50**: 125, 1963.

〔4〕 吴绍熙等:微生物学通报, 1: 22, 1979。