

# 血源播散性念珠菌感染的血清学快速诊断

袁著英 孟令珂 李天玲 朱九林\* 孙广莲 刘菊华

(山东省医学科学院基础所微生物室, 济南)

**摘要** 血源播散性念珠菌感染的诊断是靠血培养, 由于念珠菌在血液中停留时间短暂, 血培养的阳性率不高, 早期诊断很困难。本文报告用气相色谱法和酶联免疫吸附法检测患者血清中念珠菌细胞壁甘露聚糖抗原 (Mn-Ag), 结果表明患者血清中 Mn-Ag 浓度明显高于正常人血清, 两者有显著性差异。用念珠菌感染动物 24 小时在血清中即可检测到 Mn-Ag, 血清中 Mn-Ag 浓度的升高, 在一定程度上代表着感染的念珠菌菌数的增加和该菌感染力的加强。因此, 检测 Mn-Ag 是早期诊断血源播散性念珠菌感染的快速和特异的方法。

**关键词** 气相色谱法; 酶联免疫吸附法; 甘露聚糖抗原 (Mn-Ag); 血源播散性念珠菌

近几年来念珠菌感染的发病率明显增加, 波及各年龄组和人体各组织器官, 受到国内外医学界的广泛重视。念珠菌感染属条件致病菌的深部感染, 多为继发感染。而本病缺乏典型临床表现, 早期诊断很困难。经许多学者研究, 寻求到一些早期诊断的方法<sup>[1-4, 9]</sup>。本文介绍气相色谱法和酶联免疫吸附法快速诊断血源播散性念珠菌感染的结果, 现报告如下:

## 材料与 方法

### (一) 材料

1. 试剂: 盐酸羟胺、甲醇、醋酐、吡啶和乙酸乙酯均为分析纯试剂(北京化工厂)。包被液: 0.1mol/L pH9.5 碳酸缓冲液。洗涤液: 0.5mol/L pH8.0 Tris-HCl 缓冲液含 1% Tween-20。稀释液: 0.01mol/L pH7.4 PBS 含 1% Tween-20。底物液: pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲液(临用时取 25ml 底物液加 20mg 邻苯二胺和 30 $\mu$ l 过氧化氢)。终止液: 2mol/L 硫酸。葡

萄球菌 A 蛋白酶标记物 (HRP-protein A 上海生物制品研究所生产, 批号 880201)。念珠菌甘露聚糖抗原及其抗体 (上海医科大学微生物学教研室提供)。

2. 仪器: DG-1 型酶标测定仪 (南京华东电子管厂出品); 96 孔聚乙烯微量酶标板 (天津有机玻璃厂); SIGMA2000 型毛细柱气相色谱仪 (美国铂金埃默公司); HP3900A 数据处理系统 (美国惠普公司); OV-210 玻璃毛细管色谱柱 (山东省化学研究所)。

3. 菌种: 白色念珠菌标准菌种 (中国科学院微生物研究所真菌室提供)。

4. 念珠菌感染患者血清 3 例, 正常人血清 20 例。

### (二) 方法

1. 气相色谱法 (GC):

(1) 念珠菌感染动物实验: 取 3 只体重

• 本院中心实验室

1.5kg 日本大耳白家兔(山东省农科院畜牧研究所),耳静脉注射白色念珠菌生理盐水悬液。菌液浓度用血球计数器计算。1号兔注射 0.5ml (3 亿/ml), 2号兔注射 0.3ml (1 亿/ml), 3号兔注射 0.4ml (7 亿/ml), 分别于感染前后取血, 感染后第 1、2、3 天连续采血, 以后每 3 天采血一次, 分离血清置 -30℃ 冰箱备用。

(2) 样品处理: 取患者血清和正常人血清及感染前后的动物血清各 0.2ml, 分别加入 6N 盐酸 0.5ml, 置 70℃ 水浴中水解 12 小时, 冷冻干燥过夜。再加 0.3ml 盐酸羟胺 (50mg/ml), 2ml 甲醇, 密封, 80℃ 醇解 1 小时, 取醇解物吹干, 加 0.4ml 醋酐, 0.1ml 无水吡啶, 密封, 95℃ 加热 1 小时, 使样品乙酰化后用氮气吹干, 再加 0.4ml 醋酸乙酯振摇提取 3 分钟, 1000r/min 离心 10 分钟。取上清液封装于安瓿内以备测定<sup>[5]</sup>。分别用甘露聚糖, 蒸馏水代替样品血清, 按同样方法制作标准管及空白管。

(3) 色谱条件: 柱温 200℃, 进样器温度 250℃, 检测器温度 250℃, 气体流速: 氢气 20 ml/min, 空气 20ml/min, 载气(高纯氮) 10ml/min, 进样量 1μl。

## 2. 酶联免疫吸附法 (ELISA):

(1) 待测血清处理: 将待测血清用 pH7.4 PBS 作 1:5 稀释。水浴 80℃ 2 小时破坏血清中抗 Mn-Ag 抗体。

(2) 标准曲线制作: 取甘露聚糖抗原用稀释液稀释, 浓度为每毫升含 100、50、25、12.5、6.25、3.125、3.125、1.56 和 0.78 μg。包被板上每孔 200 μl, 每个浓度包被 2 孔, 放 4℃ 冰箱过夜 (12 小时以上), 然后弃去板内液体, 用洗涤液洗板 3 次, 每次 3 分钟, 弃去洗液, 空干, 每孔加入抗甘露聚糖抗体, 每孔 200 μl, 37℃ 孵育 2 小时, 再用同法洗涤 3 次, 空干, 每孔加入 200 μl HRP-protein A, 37℃ 孵育 2 小时, 同法洗 3 次, 空干, 加底物液, 每孔 200 μl, 37℃ 30 分钟, 取出立即加终止液, 每孔 50 μl。用酶标测定仪在 492nm 测 OD 值, 取各浓度的 2 孔 OD 值平均值, 作标准曲线 (如图 1)。

(3) 待测血清中 Mn-Ag 的检测: 将处理

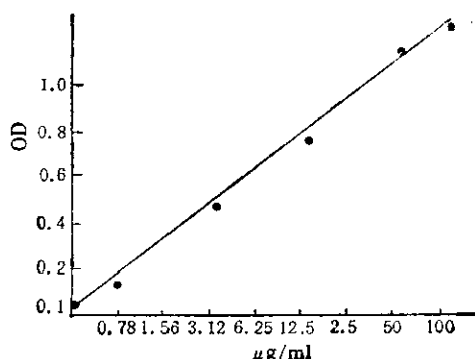


图 1 甘露聚糖抗原标准曲线

好的待测血清用稀释液作 1:10 稀释。血清最终稀释度为 1:50。包被板上每份血清包被 2 孔, 其他步骤同上, 测得每份血清 2 孔 OD 值的平均值, 在标准曲线上求得待测血清中 Mn-Ag 的含量。

## 结 果

### (一) 气相色谱法检测结果

用气相色谱法检测, 白色念珠菌感染家兔前后血清中 Mn-Ag 的动态变化如表 1。3 只家兔感染后第一天均可检测到 Mn-Ag, 第二天出现高峰, 以后下降, 第 9 天后有的再次出现高峰, 有的已死亡, 出现个体差异。与 Weiner 报道一致<sup>[5]</sup>。用此法检测 3 例念珠菌感染患者血清中 Mn-Ag 浓度范围在 465—675 μg/ml, 此结果与 Marier<sup>[6]</sup> 报道相似。正常人血清中 Mn-Ag 浓度平均为 297.87 ± 77.81 μg/ml。患者 Mn-Ag 平均为 631.42 ± 224.65 μg/ml。说明患者血清中 Mn-Ag 浓度明显高于正常人。

表 1 家兔感染白色念珠菌后血清中甘露聚糖抗原的动态变化 (μg/ml)

兔号	感染前	感染后 (d)						
		1	2	3	6	9	14	20
1	75*	302	1075	250	75	300	1175	3250
2	75	75	250	175	400	350	死亡	
3	88	250	200	100	死亡			

\* 白色念珠菌 (3 亿/ml) 耳静脉注射 0.5ml

### (二) 酶联免疫吸附法检测结果

酶联免疫吸附法检测念珠菌感染动物前后

血清中 Mn-Ag 的结果与气相色谱法基本一致。检测 3 例患者血清中 Mn-Ag 的结果也与气相色谱法一致。检测的 20 例正常人血清中 Mn-Ag 的范围在 52.65—187.2  $\mu\text{g/ml}$ 。说明两种方法检测结果是一致的可靠的。

## 讨 论

甘露聚糖常与蛋白质组成甘露聚糖-蛋白质的复合体,主要分布在念珠菌细胞壁的外层,并向外游离脱落,故易在血清中检测到。血清中甘露聚糖的升高与念珠菌感染有关。甘露聚糖在体内还可与免疫球蛋白结合成抗原抗体复合物而被清除掉<sup>[7]</sup>。说明甘露聚糖在血清中并非一直处于游离状态存在。所以在念珠菌感染动物后,会出现动物血清中 Mn-Ag 的浓度有上升、下降再次上升的现象。血清中 Mn-Ag 的浓度升高,在一定程度上代表了念珠菌数量的增多和念珠菌感染力的增强。故利用气相色谱法和酶联免疫吸附法检测血清中甘露聚糖的浓度可达到早期诊断血源播散性念珠菌感染的目

的。该两种方法特异、快速,可为深部念珠菌感染的诊断和防治提供可行的办法。

动物实验提示我们,临床上采用双份血清法可提高诊断效果。因念珠菌属的菌株表面结构相似,具有共同的抗原物质,不论采用哪种血清学检测方法都只能诊断出是念珠菌的感染,而无法区别该属菌种间感染的差异。利用红外光谱检测也证实了这一点。但也有个别例外,如新型隐球菌属酵母样真菌表面无 Mn-Ag,可与念珠菌区别<sup>[8]</sup>。

## 参 考 文 献

1. Greenfield RA et al.: *J Lab Clin Med*, 101(5): 758, 1983.
2. 李梦东等: 传染病学进展, 科学技术文献出版社重庆分社, 124 页, 1986.
3. 林飞卿等: 中国免疫学杂志, 3(1): 11, 1987.
4. Maliwan R et al.: *Arch Pathol Lab Med*, 108(1): 108, 1984.
5. Weiner MH et al.: *J Infect Dis*, 140(7): 989, 1979.
6. Marier et al.: *J Clin Microbio*, 16(1): 123, 1982.
7. Reiss E et al.: *Clin Chem*, 28(2): 306, 1982.
8. 王家俊等: 中华皮肤科杂志, 20(1): 1, 1987.
9. 裘著英等: 中华医学杂志, 67(8): 455, 1987.