

念珠菌病血清学诊断的研究进展

中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所

李荣玲 张荣珍 综述 郭可大 审

念珠菌病是一种条件致病性真菌病。近年来随着广谱抗菌素的长期大量使用、激素和免疫抑制剂的运用、肿瘤病人的放疗和化疗及其它获得性免疫功能低下病人的增多(如艾滋病等),念珠菌病的发病率和死亡率均明显增高,已逐步引起临床医生的重视。但是,由于念珠菌可在正常人体内存在,健康人带菌率口咽为5.5%、粪便为4.6%、皮肤为0.2%、尿为0.2%[1],念珠菌栖生状态的出现,给侵袭性念珠菌病的诊断带来了困难。早期诊断获得充分治疗的病人仅占15~40%[2]。虽然真菌监测培养(fungal surveillance cultures)有助于预测侵袭性念珠菌病,但尸检证明播散性念珠菌的病人56%血培养阴性[2]。这就需要研究条件致病性真菌病的快速、特异、敏感的诊断法。因此,目前人们努力从事真菌免疫学的研究。通过分析重要抗原的免疫化学特性并加以纯化,使抗原的特异性提高,从而更利于敏感性较高的酶免分析(enzyme immunoassay EIA)及放免分析(radioimmunoassay RIA)。研究单克隆抗体既可使有关的抗血清标准化,又可通过亲和层析纯化抗原。直接测抗原也取得了重大成果。由于酶标和放射性同位素标记是近几年才用于真菌血清学中的,所以还无成套试剂用于常规诊断。

一、检测抗体:

检测抗体的方法首先用于念珠菌病的免疫学诊断。已研究了一系列方法,包括菌体凝集、琼脂扩散(agar-gel diffusion)、乳胶凝集(latex agglutination LA)、对流免疫电泳(counterimmuno-electrophoresis CIE)、间接免疫荧光(indirect immunofluorescence)、间接血凝(passive hemagglutination)、放免分析(radioimmunoassay RIA)、酶免分析(enzyme immunoassay EIA),但以上几种方法很难进行效果比较。原因在于:各自研究的病人数量不同、诊断标准不同、抗原制备不同、实验技术不同以及预期资料和回顾资料的利用也不同。最常用的方法是对流免疫电泳(CIE)、免疫

扩散(ID)、乳胶凝集(LA)和菌体凝集。综合已报道的材料可以看出:CIE、ID、LA有80%以上的病人敏感,CIE可能比ID的敏感性更强些。个别报道[3]LA对侵袭性念珠菌病人只有50%具有特异性,但总的看来这三种方法的特异性亦大于80%。菌体凝集实验的敏感性和特异性均较差。

已发现热灭活的菌体[4]或菌体提取物[5]做为抗原进行放免测定时,健康人、病原栖生及感染个体抗体水平大部分重叠,找不出诊断侵袭性念珠菌病的唯一可靠水平。酶免试验测得正常人具有抗甘露聚糖(mannan)的抗体[6]。所有的白血病患者,除免疫功能低下或感染(非念珠菌性感染)外,也能测到抗甘露聚糖的抗体[7]。由此可以得出:只有用高度特异的抗原,才能适合高度敏感的分析方法。

甘露聚糖是念珠菌细胞壁的主要成分,抗甘露聚糖的抗体是凝集抗体,正常人也能查到,对深部及全身性念珠菌病的诊断不特异。制备表面抗原的过程中,甘露聚糖富含在内,以致难以找到合适的抗原测病人体内的抗体。有人提出深部念珠菌病人体内存在抗胞浆抗原的抗体的学说[8],所以在ID和CIE中通常使用胞浆抗原,但胞浆抗原是细胞破碎得到的也含有甘露聚糖成分。除去胞浆抗原中甘露聚糖成分[8~10]以减少正常人和念珠菌栖生者出现假阳性,由此所得的抗体是否更能反应侵袭性仍有争论。

Macdonald & Odds[11, 12]用一种由念珠菌产生的胞外羧基蛋白酶(Exocellular Carboxyl Proteinase ECCP)作抗原,用CIE法测抗体表明:侵袭性念珠菌病人的血清与ECCP反应的滴度比与胞浆抗原反应的滴度高,并有11%胞浆抗体阴性病人的血清与ECCP反应能产生沉淀线[11]。这些新抗原对侵袭性念珠菌病的诊断是否更具特异性,有待进一步研究。

非感染状态下,念珠菌大多以酵母相存在于体表和与体表相通的器官内。侵袭性念珠菌病时,体内出现了念珠菌的假菌丝。因此,另一条途径就是探讨菌

丝抗原在侵袭性念珠菌病中的特异性[10]。虽然在酵母相和菌丝相之间的抗原差异的研究中, Hopfer RL 等人用五种抗原、CIE方法对79例癌症病人念珠菌感染进行了分析, 发现病人血清与酵母相胞浆抗原反应的敏感性(73)比与菌丝相胞浆抗原反应的敏感性(59)高。两者的特异性差别不显著, 前者为87后者为89, 诊断价值均为76%。对照用的是表浅念珠菌感染病人和无念珠菌感染症状者的血清[13]。最近 Diane LB and Jim EC [14, 15]用单克隆抗体 H₂、C₂与不同时期出芽生长的白色念珠菌反应, 金胶标记, 透视电镜观察发现, 白色念珠菌在生长过程中, 表面抗原的表达和分布随形态改变而变化, 且受环境和营养因素的影响。也许这正是人们对念珠菌抗体的作用、细胞介异的免疫作用和宿主抗念珠菌感染认识不一致的原因。可设想, 找出念珠菌致病状态时特有的抗原, 并提取、纯化用于较敏感的免疫学诊断, 对排除正常人和念珠菌栖生个体由于抗体重叠出现的假阳性可能具有重要的临床价值。

人们希望鉴定、纯化特异、敏感的抗原测病人体内的抗体。然而, 免疫功能受损的病人产生的抗体甚微, 检查中可出现27~70%的假阴性[13, 16~18]。此外大多数病人病程长短不明, 检查时间若不恰当, 抗体未完全产生, 也可出现阴性反应。这样用阴性反应排除该病就不妥。烧伤病人与心脏外科术后病人[19]也可出现假阳性。因此, 除查抗体外还需使用其它方法。

二、检测抗原:

直接检测病人体内的抗原, 特别是多糖——甘露聚糖(mannan)抗原是一重要手段。甘露聚糖是念珠菌细胞壁的主要成分, 由核心部分和外链部分组成[20]。核心是酵母、植物、哺乳动物糖蛋白所共有的结构蛋白。外链一般构形是直链 α 骨架上带有许多 α -1,2和 α -1,3连接的低聚糖侧链。侧链的长度、1,3键的位置和磷酸二酯键的替换决定抗原的特异性。

血清型别与甘露聚糖有关。白念的A、B型首先就是通过凝集反应研究的。A型通常易分离到。加拿大大量临床标本中血清A型占74%, 已发现血清A型对5-氟胞嘧啶(5-FC)敏感, B型约50%原发耐受5-FC。1970年有人报道了血清C型。用凝集吸附反应区别不同种念珠菌, 把所得的表面因子列成表, 进一步表明了A、B型间的差异。A型带有6因子, B型带有13b因子。同时还表明热带念珠菌(*C. tropicalis*)的表面因子与白念A型密切相关, 类星形念珠

菌(*C. stellatoidea*)的表面因子与白念B型密切相关。定量沉淀反应也表明: 热带念珠菌的甘露聚糖与白念A型关系密切, A型血清经B型菌吸收后仍能与热带念珠菌的甘露聚糖反应。这就意味着热带念珠菌的甘露聚糖与白念A型甘露聚糖的关系比B型与A型的更密切。类星形的甘露聚糖与白念B型血清能反应, 但不如白念A型或B型本身的甘露聚糖与B型血清反应强。因此, 类星形念珠菌与白念B型在血清学上并非毫无差别。

从乙酰解(acetolysis)、甲基化裂解(methylation-fragmentation)、半抗原抑制(hapten inhibition)三种分析可知: 白色念珠菌的血清学差异由甘露聚糖中甘露己糖侧链排列顺序变化所致。A型的显性半抗原是一条1,2连接的低聚糖直链, 直链的末端是1,3连接。B型的更复杂, 没有1,3末端而是在1,3连接点周围连有单个的C₁、C₂、C₃侧支。

为了详细说明甘露聚糖的构形 Saznki & Fukazawa 1982年提出了白念A型甘露聚糖的树状结构学说。树的主干由蛋白组成, 主分枝由1,6-甘露二糖1,2-甘露糖和1,6-甘露糖残基借 α 键互相交错连接形成, 次级分枝再与甘露二糖残基连接。A型甘露聚糖的型特异部位在末端分枝上。它是由四个 α -1,2键和一个末端 α -1,3键的甘露己糖残基组成, 并借关键的 β -1,6键与某些次级分枝的低聚糖相连。

血清中甘露聚糖的存在首先是由 Axelsen & Kirkpatrick 1973年在一个慢性粘膜念珠菌病的病人血清中发现的。自从1973年用平面火箭电泳测血中甘露聚糖以来, 人们一直在设计敏感而简单的实验方法, 如HAI、RIA、酶免疫抑制试验、夹心法酶免试验。

两种因素使血中甘露聚糖的检测变复杂。第一, 甘露聚糖低于常规血清学实验检测水平(ng/ml)。第二, 免疫功能受抑制的病人, 甘露聚糖与抗体形成可溶性免疫复合物, 检测前必须使免疫复合物解离。目前主要通过煮沸法使免疫复合物解离。煮沸时血清中加入Na₂EDTA的稀释液防止蛋白凝固, 离心得到含甘露聚糖的上清。将上清加入兔抗白念胞壁IgG包被的酶标板内, 再加过氧化物酶标记的抗体测甘露聚糖含量。临床可测范围在3~200ng/ml, 这种夹心酶免分析3~4小时即能完成。

要有效地测血中甘露聚糖必须使用高敏分析法。实际上酶免与放免分析已达高敏, 因为它们比血凝抑制试验和对流免疫电泳敏感很多倍。但仅此还不够,

由于50~70%的播散性念珠菌病病人在用酶免或放免试验检测解离的甘露聚糖时呈阳性反应,所以还需其它更敏感的免疫学方法和技术。把多种菌的特异性酶标抗体合为一体,如把白念A、B型及其它念珠菌的抗体混合,然后测血中甘露聚糖,在一定程度上能提高检测能力。

值得注意的是:一、免疫血清或恢复期病人血清制成的混合物用以上方法分析是否更恰当还不清楚,并且恢复期病人血清制成的混合物有可能测到与甘露聚糖不同的循环抗原。例如, Araj 等人测到一种白念胞浆抗原。这种抗原以一种耐热蛋白形式出现在癌症病人血清中。此外,多种菌抗体代替单个菌抗体,单克隆抗体代替多克隆抗血清可能对现有的分析系统有所改进。二、甘露聚糖检测的敏感性,特异性和临床价值,还没在大规模的人群研究中证实。有人强调血中甘露聚糖的存在很可能是侵袭性念珠菌病,应该引起临床医生注意,应该用统一试剂进行大规模研究,以确定血中甘露聚糖的检出是否提示病人需要治疗。同时也需要进一步证实血中甘露聚糖的分析是否有助于区别短暂的念珠菌血症与侵袭性念珠菌病。循环抗原浓度能否作为抗真菌治疗成功与否的指标,也有待进一步证实。

三、结语

侵袭性念珠菌病的诊断,目前仍无统一、可靠的标准方法。用乳胶凝集试验和沉淀反应测抗体,仅对免疫功能健全的病人适用而对免疫功能受损的病人不适合;酶免试验和放免试验虽对两者均适用,但念珠菌属抗体在健康人、念珠菌栖生者及感染病人体内均可测到,因此效果评定困难。直接检测病人体内的抗原已取得一定成果。以免疫复合物形式存在于病人体内的抗原,可用不同的方法迅速使其解离出来。单克隆抗体已用于抗原分析。我们认为还需进一步做以下探讨:一、纯化和提取与感染有关的特异性抗原,用于检测有诊断意义的抗体;二、寻找理想的混合抗体,检测病人体内的抗原;三、单克隆抗体的研究和应用;四、改进实验方法和技术,如将生物素-亲和素用于真菌血清学诊断,以提高实验的敏感性;五、回顾性临床研究及前瞻性临床研究等。只有研制出成套的具有代表性和临床意义的标准试剂和方法,才能使诊断标准化并且具有可靠性。

参 考 文 献

1. 秦启贤,等. 念珠菌条件致病性的进一步探讨 I. 健康和住院病人念珠菌带菌率调查. 上海医学 1983; 4: (4) 196.
2. Myerowitz RL, et al. Disseminated candidiasis: changes in incidence, underlying diseases, and pathology. *Am J Clin Pathol* 1977; 68: 29.
3. Dee TH, et al. Sensitivity, specificity, and predictive value of anti-Candida serum precipitin and agglutinin quantification: comparison of counterimmunoelectrophoresis and latex agglutination. *J Clin Microbiol* 1981; 13: 750.
4. Cobb SJ, et al. Determination of antibody levels to *Candida albicans* in healthy and hospitalized adults using a radioimmunoassay. *J Clin Pathol* 1978; 31: 1161.
5. Kohler R, et al. Detection of IgG *Candida* antibodies by solid-phase radioimmunoassay and comparison with agar-gel diffusion. *Am J Med Sci* 1979; 278: 49.
6. Lehmann PF, et al. Comparison by ELISA of serum anti-*Candida albicans* mannan IgG levels of a normal population and in diseased patients. *Mycopathologia* 1980; 70: 89.
7. Meckstroth KL, et al. Detection of antibodies and antigenemia in leukemic patients with candidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Infect Dis* 1981; 144: 24.
8. Ellsworth JH, et al. Comparative serological and cutaneous reactivity of candidal cytoplasmic proteins and mannan separated by affinity for concanavalin A. *J Clin Microbiol* 1977; 5: 91.
9. Syverson RE, et al. Cell wall antigens in soluble cytoplasmic extracts of *Candida albicans* as demonstrated by crossed immunoelectrophoresis with concanavalin A. *J Immunol Methods* 1977; 18: 149.
10. Syverson RE, et al. Increasing the predictive value positive of the precipitin test for the diagnosis of deep-seated candidiasis. *Am J Clin Pathol* 1978; 70: 826.
11. Macdonald F, et al. Purified *Candida albicans* proteinase in the serological diagnosis of systemic candidosis. *JAMA* 1980; 243: 2409.
12. Macdonald F, et al. Inducible proteinase of *Candida albicans* in diagnostic serology and in the pathogenesis of systemic candidosis. *J Med Microbiol* 1980; 13: 423.
13. Hopfer RL, et al. Detection by counterimmunoelectrophoresis of anti-*Candida* precipitins in sera from cancer patients. *Am J Clin Pathol* 1979; 72: 215.
14. Diane LB, et al. Ultrastructural and biochemical studies of two dynamically express-

- ed cell surface determinants on candida albicans. Infect Immun 1986; 51: 327.
15. Diane LB, et al. Variability in expression of cell surface antigens of candida albicans during morphogenesis. Infect Immun 1986; 51: 337.
 16. Filice G, et al. Immunodiffusion and agglutination tests for Candida in patients with neoplastic disease: inconsistent correlation of results with invasive infections. J Infect Dis 1977; 135: 349.
 17. Myerowitz RL, et al. Diagnostic value of Candida precipitins determined by counter-immunoelectrophoresis in Patients with acute leukemia. A Prospective study. Am J Clin Pathol 1979; 72: 963.
 18. Guinan ME, et al. The Candida precipitin test in an immunosuppressed population. Cancer 1979; 43: 299.
 19. Murray IG. Serological evidence of Candida infection after open-heart surgery J Med Microbiol 1969; 2: 463.
 20. Ballou C. Structure and biosynthesis of the mannan component of the yeast cell envelope. Adv Microb Physiol 1976; 14: 93.

疾病监测年报统计与脱机联网电子计算机程序的研究

章扬熙* 覃肖军** 周亚男***

根据国家医学发展规划第六项任务,在全国范围内,各省、市开展了疾病监测工作。通过各疾病监测点,系统、动态地收集医学人口学、流行病学等资料,为研制卫生防疫的对策和措施并评价其效果,提供了科学依据。卫生部统一规定的疾病监测年报表计十五种约六十余张,一万多个数据及统计量。应用手工编制与汇总年报表,既效率低,又易出错,不利于信息的分析与及时反馈。为此,我们研制了疾病监测年报统计与脱机联网电子计算机程序,获得成功。

所谓脱机联网程序,就是把基层卫生防疫站所建立的有关疾病监测的数据文件磁带(作为媒介),脱机送交上级站来用电子计算机编制汇总报表的有关程序。应用这个程序既可以避免手工编制报表时可能产生的差错,又可免去通常应用电子计算机汇总报表时需再次键盘输入大量数据的麻烦,从而保证了汇总报表的高速度和高质量。

本程序软件系用BASIC算法语言编写,在Sharp PC-1501机上运行通过,这种机型具有体积小、携带方便、价格低廉、功耗小以及易于掌握等特点,所以适用于基层普及应用。

本程序包括建立数据文件程序与编制年报表程序两个部分,数据文件是以紧凑格式建立的,这样做一

方面可节省磁带,另一方面也可当将数据输入主机时节省内存。数据文件程序包括输入、初改、核对、修改、自检、写带几个部分,可以保证所建立的数据文件准确无误。由于数据文件是以12位紧凑格式的一维字符串数组形式建立的,所以在编制报表时,事先要将其分解,分解程序已设计在编制报表程序之中。各报表均以二维数组的形式来表达,以便计算及输出。为了节省内存,有的二维数组经重复使用,来编制多种不同的报表。

本程序不仅可以把传染病卡片、死亡卡片、人口资料以数据文件的形式存入磁带,实现信息贮存微积化,而且可以自动编制全部疾病监测年报统计表、寿命表和去某病死因寿命表;不仅能用于各基层卫生防疫站编制本地区疾病监测年报表,也能使上级卫生防疫站利用各基层站送来的数据文件磁带直接编制汇总的年报表和寿命表,而无需再次键入数据,经实用证明,应用本程序编制报表或汇总报表均十分迅速方便,显著地提高了工作效率。

* 辽宁省卫生防疫站

** 辽宁省凤城县卫生防疫站

*** 丹东市卫生防疫站