

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.09.012

白色念珠菌的快速检测技术开发*

石星亮¹, 余一海¹, 陈 静², 谭有将², 梁德智³

1. 广东省佛山市顺德区北滘医院检验科, 广东佛山 528311; 2. 广东省佛山市顺德区创新设计研究院, 广东佛山 528311; 3. 广东省佛山市顺德区墨赛生物科技有限公司, 广东佛山 528311

摘 要:目的 利用白色念珠菌单克隆抗体建立一种快速检测临床标本中白色念珠菌的方法。方法 利用免疫层析技术, 采用双抗夹心法制作成检测白色念珠菌的检测卡。利用标准菌株及临床标本对检测卡的最低检测限、交叉反应进行评估。与荧光 PCR 核酸扩增法进行试验对比, 评估其灵敏度、特异度。结果 该方法的最低检测限为 10^4 cfu/mL, 对可能造成交叉反应的临床常见的菌株, 如热带念珠菌、克柔氏念珠菌、曲霉、金黄色葡萄球菌等真菌和细菌进行检测, 均无交叉反应。该检测卡的灵敏度及特异度分别为 80.00% 和 97.00%, 与荧光 PCR 核酸扩增法进行对比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), Kappa 值为 0.737, 两种方法一致性一般。结论 该研究建立了一种灵敏度、特异度、准确度较高的, 能快速检测临床标本中白色念珠菌的方法, 对于有临床症状而快速检测结果为阴性的标本, 建议进行荧光 PCR 核酸扩增法检测。

关键词: 白色念珠菌; 免疫层析技术; 双抗夹心法

中图分类号: R446.5

文章编号: 1672-9455(2020)09-1189-03

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Development of rapid testing technology for *Candida albicans**

SHI Xingliang¹, YU Yihai¹, CHEN Jing², TAN Youjiang², LIANG Dezhi³

1. Department of Clinical Laboratory, Shunde Beijiao Hospital, Foshan, Guangdong 528311, China;

2. Innovative Design Institute, Foshan, Guangdong 528311, China;

3. Musai Biotechnology Co., Ltd, Foshan, Guangdong 528311, China

Abstract: **Objective** A rapid method for the detection of *Candida albicans* in clinical specimens was established by using monoclonal antibody for *Candida albicans*. **Methods** Using immunochromatography technology and double antibody sandwich method, a detection card for *Candida albicans* was made. Standard strains and clinical specimens were used to evaluate the minimum detection limit, cross-reaction of the test card. The sensitivity, specificity and statistical significance of the method were evaluated by comparing with the fluorescence PCR nucleic acid amplification method. **Results** The minimum detection limit of this method was 10^4 cfu/mL. There was no cross-reaction among common clinical fungi and bacteria, such as *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Aspergillus*, *Staphylococcus aureus*. The sensitivity and specificity of the card were 80.00% and 97.00% respectively, comparing with the fluorescence PCR nucleic acid amplification method, the differences had statistically significant ($P < 0.05$), the Kappa value was 0.737. The consistency between them was ordinary. **Conclusion** A method with high sensitivity, specificity and accuracy for rapid detection of *Candida albicans* in clinical specimens is established. For the specimens with clinical manifestations and negative rapid detection, it is recommended to conduct fluorescence PCR nucleic acid amplification method.

Key words: *Candida albicans*; immunochromatography technology; double antibody sandwich method

近年来, 真菌感染, 尤其是侵袭性真菌感染的发病率呈逐年上升趋势, 而白色念珠菌作为条件致病菌, 是临床上最常见的致病菌。但是, 目前检测白色念珠菌主要以常规培养为主, 此过程耗时费力, 且检

出率相对较低。因此, 快速、准确地从临床标本中检测白色念珠菌对疾病的早期诊断及治疗极为重要。本研究开发了一种能快速准确检测临床血清中的白色念珠菌抗原的方法, 现报道如下。

* 基金项目: 广东省佛山市科技局医学类科技攻关项目(2017AB003183)。

作者简介: 石星亮, 男, 主管技师, 主要从事临床检验研究。

1 材料与方法

1.1 标本来源 100 份健康体检者的血清标本及 10 份经荧光 PCR 核酸扩增法确认的白色念珠菌阳性的标本为广东省佛山市顺德区北滘医院临床送检标本。

1.2 仪器与试剂 白色念珠菌单克隆抗体及抗原购自广州万翎生物科技有限公司;羊抗鼠 IgG 购自洛阳市佰泰科生物技术有限公司;红色微球购自上海辉质生物科技有限公司;NC 膜(型号 HF135)购自美国 Milipore 公司;白色念珠菌标准菌株 ATCC10231 购自广东环凯微生物科技有限公司;其他化学试剂为分析纯或者化学纯。美国 BioDot 公司 XYZ3060 三维喷点平台购自百道贸易(上海)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 红色微球标记抗体结合垫制备 参考文献[1]的方法制作时间分辨荧光抗体结合垫,于相对湿度(RH)为 30%~40%的环境下保存备用。

1.3.2 包被抗体 NC 膜制备 参考文献[1]的方法制作 NC 反应膜,于 RH 为 30%~40%的环境下保存备用。

1.3.3 试剂卡组装 参考文献[1]的方法制作检测的试剂卡,放入铝箔袋中,加入干燥剂,密封后于 2~8℃保存备用。

1.3.4 标本检测 取 80 μL 临床血清标本,滴加到检测试剂卡中,试剂卡常温反应 10 min,如果同时出现 T 线和 C 线,则为阳性;如果仅出现 C 线则为阴性。

1.3.5 性能评估 使用空白血清将白色念珠菌抗原经过一系列梯度稀释后进行检测以评估其最低检测限;在空白血清中分别加入热带念珠菌、克柔氏念珠菌、曲霉、新生隐球菌、光滑念珠菌、近平滑念珠菌、青霉、毛霉、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、淋病奈瑟菌、醋酸钙不动杆菌、肺炎克雷伯菌、甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、产气杆菌、枸橼酸杆菌,系列稀释抗原进行检测以评估其有无交叉反应。使用试剂条检测 100 份健康体检者的血清标本及 10 份经荧光 PCR 核酸扩增法确认的白色念珠菌阳性的标本,评估其灵敏度和特异度。灵敏度=真阳性/(假阴性+真阳性)×100%,特异度=真阴性/(假阳性+真阴性)×100%。

1.4 统计学处理 采用 SPSS23.0 软件进行数据处理及统计分析,计数资料以例数或百分率表示,比较采用配对 χ^2 检验和 Kappa 一致性检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 最低检测限 使用健康体检者血清将白色念珠

菌标准菌株 ATCC10231 进行一系列稀释,当稀释水平为 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 cfu/mL 时,结果分别为-、-、-、-、+、+、++ ,见图 1。

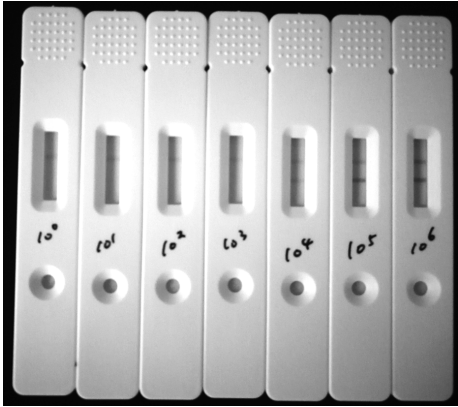


图 1 检测卡的最低检测限测试

2.2 交叉反应 在健康体检者血清中分别加入热带念珠菌、克柔氏念珠菌、曲霉、新生隐球菌、光滑念珠菌、近平滑念珠菌、青霉、毛霉、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、淋病奈瑟菌、醋酸钙不动杆菌、肺炎克雷伯菌、甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、产气杆菌、枸橼酸杆菌,利用试剂条进行检测,检测结果均为阴性。

2.3 检测性能 使用试剂条检测了 100 份健康体检者(荧光 PCR 核酸扩增法检测阴性)的血清标本及 10 份经荧光 PCR 核酸扩增法确认的白色念珠菌阳性标本,检测结果见表 1,灵敏度为 80.00%,特异度为 97.00%。经配对 χ^2 检验,荧光 PCR 核酸扩增法与本研究方法检测结果差异有统计学意义($P<0.05$);经一致性检验结果显示,Kappa 值为 0.737,在 0.40~0.75 范围内,两种方法一致性一般。

表 1 检测卡的准确性测试(n)

本研究方法	荧光 PCR 核酸 扩增法检测阳性	荧光 PCR 检测核酸 扩增法检测阴性	合计
阳性	8	3	11
阴性	2	97	99
合计	10	100	110

3 讨 论

真菌检验方法包括直接涂片镜检、真菌培养鉴定、真菌药物敏感试验、真菌感染组织活检、真菌的免疫学试验及分子生物学检测等。各种方法都有其各自的优缺点:直接镜检法快速、直接、成本低,但是检出率较低,已无法满足临床的需求^[2-3];活组织检查法对确诊有很大的帮助,但是该方法对临床医生的技术水平要求较高,无法在基层医院进行推广^[4-5];真菌培养虽然为深部真菌感染的确诊实验,但是该法的培养阳性率低,在播散性念珠菌病血培养阴性患者中可高达

50%,故诊断应结合涂片镜检、组织活检、血清学和分子生物学检查结果^[6];血清学检测,如 3- β -D 葡聚糖试验(G 试验)和半乳甘露聚糖试验(GH 试验)是近年来发展起来的一种新的检验技术,得到了快速的应用,血清学检测灵敏度和特异度均在 80%以上。但血清学诊断假阳性、假阴性结果普遍存在,故不能仅凭血清学试验结果作为确诊的依据^[7];分子生物学检测是近年发展最为迅速的检测方法,有研究采用肽核酸荧光原位杂交技术(PNA-FISH)对血培养阳性的白色念珠菌和(或)光滑念珠菌进行检测的灵敏度和特异度分别为 99%~100%和 100%^[8-10],但是由于成本等种种原因,该方法还不能在国内进行大力推广,也限制了它的使用。因此,成本较低、准确性较高的真菌检测技术则有被市场认可及开发的前景。

白色念珠菌是临床最常见的机会性感染病原体^[11-14]。本研究中快速测试卡的最低检测限为 10⁴ cfu/mL,最低检测水平较低,可以降低假阴性率,避免出现漏检;无交叉反应,不受其他真菌和细菌的影响。王缚鲲等^[15]报道的检测方法灵敏度和特异度分别为 71.1%和 96.0%,而本研究中的白色念珠菌快速检测卡检测灵敏度和特异度分别为 80.00%和 97.00%,灵敏度和特异度都得到一定提高,同时降低了漏诊率和误诊率。本研究中有 2 例假阴性、3 例假阳性,说明本研究中的方法还是存在漏检和误检,有必要通过荧光 PCR 核酸扩增法进行检测。两种方法测定结果差异有统计学意义($P < 0.05$),Kappa 值未能达到 0.75,未能达到较好的判断标准,表明本研究中的方法与荧光 PCR 核酸扩增法仍存在差距,但由于本研究开发的快速检测卡可以在 10 min 内对白色念珠菌作出检测,具有方便、快捷的优势。本次研发通过优化快速检测卡标记过程中的每一个细节,检测结果灵敏度、特异度较高,适合应用于临床快速检测,能够满足临床医生的检验需求,值得向临床推广。

本次研发过程采用了医院、研究院、公司三方联合研发的模式,在保证研发质量的同时,又可保证研发的实用性,提高研发效率,节约成本。

参考文献

[1] 马宏声,谭有将,李文超,等.新型半定量精斑检测试纸条的研制及法医学应用[J].中国法医学杂志,2019,34(1):40-43.

[2] 章强强.我国真菌感染的实验室检测现状[J].诊断学理论与实践,2016,15(1):1-4.

[3] 陶家驹.侵袭性肺真菌感染诊治的现状与前景[J].中国全科医学,2007,10(7):524-526.

[4] SHEA Y R, MURRAY P R, BARON E J B, et al. Algorithms for detection and identification of fungi. Manual of Clinical Microbiology [M]. 9th. Washington DC: ASM Press, 2007: 1745-1761.

[5] HALDANE D J, ROBART E. A comparison of calcofluor white, potassium hydroxide, and culture for the laboratory diagnosis of superficial fungal infection[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 1990, 13(4): 337-339.

[6] 钟南山,叶枫.深部真菌感染:新的挑战与展望[J].中华结核和呼吸杂志,2006,29(5):289-290.

[7] 李尔然,姜艳霞,王昆,等.血清半乳甘露聚糖试验对侵袭性肺曲霉感染的诊断价值[J].中国医科大学学报,2015,44(10):865-869.

[8] GUIMARRAES T, NUCCI M, MENDONCA J S, et al. Epidemiology and predictors of a poor outcome in elderly patients with candidemia[J]. Int J Infect Dis, 2012, 16(6): e442-e447.

[9] HU Y, ZHANG J, LI X, et al. Penicillium marneffei infection: an emerging disease in main land China[J]. Mycopathologia, 2013, 175(1/2): 57-67.

[10] DEMKIN V V, KOSHECHKIN S I, SLESAREV A. A novel real-time PCR assay for highly specific detection and quantification of vaginal lactobacilli[J]. Mol Cell Probes, 2017, 32: 33-39.

[11] HEBECKER B, NAGLIK J R, HUBE B, et al. Pathogenicity mechanisms and host response during oral Candida albicans infections[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2014, 12(7): 867-879.

[12] 廖万清,陈敏.侵袭性真菌病的诊断:现状与展望[J].菌物学报,2011,30(1):5-11.

[13] LIU X P, FAN S R, PENG Y T, et al. Species distribution and susceptibility of Candida isolates from patient with Vulvovaginal candidiasis in Southern China from 2003 to 2012[J]. J Mycol Med, 2014, 24(2): 106-111.

[14] 莫翼军,翁儿,郭飞,等.白色念珠菌快速免疫层析法的临床应用[J].中国卫生检验杂志,2016,26(9):1254-1255.

[15] 王缚鲲,冉向阳,陈晶,等.检测抗白色念珠菌烯醇化酶 IgG 抗体免疫胶体层析试纸的制备[J].解放军医药杂志,2018,30(11):106-109.