

抗烟曲霉果胶裂解酶 A 抗体检测 对侵袭性曲霉病诊断价值的评估^{*}

商秀娟^{1,2}, 张国勇², 刘倩², 陈笑², 李芳秋² (1. 江苏大学医学院, 江苏镇江 212013; 2. 南京军区南京总医院解放军检验医学研究所中心实验科, 南京 210002)

摘要:目的 建立检测抗烟曲霉果胶裂解酶 A(pectate lyase A, PlyA) 抗体的 ELISA 方法, 评估其对侵袭性曲霉病(invasive aspergillosis, IA) 的诊断价值。方法 用重组 PlyA 作为包被抗原, 建立检测人抗 PlyA IgG 抗体的间接 ELISA 方法。检测 97 例 IA 患者、80 例非 IA 患者和 200 例体检健康者血清。将所得结果与抗烟曲霉硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase, TR) 抗体和抗烟曲霉二肽基肽酶 V(dipeptidyl peptidase V fragment, DPPV) 抗体结果比较。结果 抗 PlyA IgG 抗体 ELISA 方法的批内变异系数为 5.3%, 批间变异系数为 10.9%。诊断 IA 的敏感度为 62.9%, 特异度为 90.4%。非中性粒细胞缺乏 IA 患者和中性粒细胞缺乏组患者阳性率分别为 72.3% 和 43.8% ($\chi^2=7.493, P<0.05$)。抗 PlyA, 抗 TR, 抗 DPPV 抗体检测的阳性率分别为 62.9%, 60.8% 和 66.0%, 三者差异无统计学意义($\chi^2=0.562, P>0.05$); 三种方法联合检测的阳性率可达到 92.8%。结论 成功建立了检测抗 PlyA IgG 的 ELISA 方法; 抗体检测对非粒细胞减少 IA 患者的诊断价值均优于粒细胞减少 IA 患者; 联合三种抗体检测可提高诊断敏感度。

关键词: 烟曲霉; 果胶裂解酶 A; IgG 抗体; ELISA

中图分类号: R379; R392.11 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2016)01-005-04
doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.01.002

Evaluation of Diagnostic Value of Antibody Against *Aspergillus Fumigatus* Pectate Lyase A for Invasive Aspergillosis

SHANG Xiu-juan^{1,2}, ZHANG Guo-yong², LIU Qian², CHEN Xiao², LI Fang-qiu²
(1. School of Medicine of Jiangsu University, Jiangsu Zhenjiang 212013, China;
2. Institute of Medical Laboratory Sciences of PLA, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing 210002, China)

Abstract: Objective To establish an ELISA for detecting antibody against *Aspergillus fumigatus* pectate lyase A (anti-PlyA), and evaluate its diagnostic value for invasive aspergillosis (IA). **Methods** An indirect ELISA for IgG antibody against PlyA was established using PlyA as coating antigen. The serum from 97 IA patients, 80 non-IA patients and 200 healthy donors were tested, the results were compared with anti-DPPV (antibody against *Aspergillus fumigatus* dipeptidyl peptidase V fragment) and anti-TR (antibody against *Aspergillus fumigatus* thioredoxin reductase). **Results** The intra-assay coefficients of variation of the ELISA method for detecting anti-PlyA was 5.3%, and inter-assay coefficients of variation was 10.9%. The sensitivity and specificity of diagnosis of IA were 62.9% and 90.4%, respectively. The positive rates of anti-PlyA in non-neutropenic and neutropenic IA patients were 43.8% and 72.3%, respectively ($\chi^2=7.493, P<0.05$). There was no significant difference between the positive rates of anti-PlyA (62.9%), anti-TR (60.8%), and anti-DPPV (67.0%) ($\chi^2=0.562, P>0.05$). When combined anti-PlyA, anti-TR, and anti-DPPV, the diagnostic sensitivity for IA patients increased to 92.8%. **Conclusion** An ELISA for detecting anti-PlyA was successfully established. The diagnostic value of these three kinds of antibody was superior in non-neutropenic IA patients to that in neutropenic IA patients. The combined detection of three antibodies could provide higher sensitivity.

Keywords: *aspergillus fumigatus*; pectate lyase A; IgG; ELISA

侵袭性曲霉病(invasive aspergillosis, IA)指曲霉属真菌侵入人体组织、血液,并在其中生长繁殖,引起组织损害、器官功能障碍、炎症反应的病理改变及病理生理过程,主要发生在免疫低下的人群^[1]。近年来,虽然抗真菌药物和其他治疗手段在持续进步,IA的发病率及病死率仍然很高^[2]。早期诊断对改善IA的预后至关重要,但是目前的IA诊断方法存在检测周期长、敏感性低、缺乏统一标准等缺点,尚不能满足临床需要。

本课题组前期研究发现烟曲霉果胶裂解酶A(PlyA)可与IA患者血清发生免疫反应^[3]。PlyA是一种分泌蛋白,生物信息学分析显示该蛋白与人

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81302536),南京军区医学科技创新重点课题(10Z027)。
作者简介:商秀娟(1990—),女,硕士研究生,主要从事医学微生物学研究。
通讯作者:李芳秋, E-mail: njlifq@163.com。

源蛋白无同源性,与其它真菌蛋白的同源性较低,可作为 IA 的一种诊断标志物,因此我们对该蛋白进行了原核表达及纯化^[4]。本研究利用前期实验制备的重组 PlyA 蛋白为包被抗原,成功建立了检测抗 PlyA 的 ELISA 方法,并初步评估了该指标对 IA 的诊断价值。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选择 2008 年 3 月~2012 年 11 月期间,经病理组织学检查和(或)合格胸腔积液、培养曲霉阳性的确诊或拟诊 IA 患者 97 例。其中非中性粒细胞缺乏患者 65 例,男性 49 例,女性 16 例,包括慢性阻塞性肺疾病(COPD)等慢性肺病 19 例,重症肺炎 2 例,肾病 4 例,系统性红斑狼疮 5 例,糖尿病 8 例,肺结核 4 例,肺癌 4 例,溺水 3 例,皮炎 2 例,肝硬化 2 例,胃和胆囊手术、食管癌、HIV 感染、骨折、发热及烧伤各 1 例,无原发性疾病 6 例。中性粒细胞缺乏症患者 32 例,男性 21 例,女性 11 例,包括急性粒细胞性白血病 6 例,再生障碍性贫血和骨髓增生异常综合征各 3 例,淋巴瘤 9 例,慢性淋巴细胞性白血病和急性淋巴细胞性白血病各 2 例,慢性粒细胞性白血病 4 例,阵发性血红蛋白尿、系统性淀粉样变、系统性血管炎各 1 例。中性粒细胞缺乏症患者的中性粒细胞计数 $<0.5 \times 10^9/L$ 。IA 诊断标准参照欧洲癌症治疗研究组织/真菌病研究组(the european organization for research and treatment of cancer/mycoses study group, EORTC/MSG)的制定标准分为确诊和临床诊断^[5]。200 例体检健康者作为对照组,男性 130 例,女性 70 例。40 例细菌血症患者和 40 例念珠菌血症作为非 IA 患者组。采集静脉血分离血清,−80℃冰箱保存。

1.2 仪器与试剂 重组烟曲霉 PlyA 由本实验室制备与纯化^[4]。ELISA 板条购自美国 COSTA 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗人 IgG 抗体购自南京川博公司;标本稀释液购自北京贝尔公司;ELISA 洗涤液、底物液 A 液和 B 液、终止液为上海科华有限公司产品;其他试剂均为分析纯;Bio-Rad Model 680 型酶标仪(伯乐公司)。

1.3 方法

1.3.1 ELISA 检测方法的建立:采用间接 ELISA 方法检测 IA 患者血清中抗 PlyA IgG 类抗体,方阵滴定法选择最佳反应条件。待测血清用标本稀释液作 1:500 稀释。具体操作流程如下:将 PlyA 用 0.05 mol/L CBS 包被液(pH9.6)稀释,每孔 100 μ l 加入微孔板,4℃过夜;次日以 ELISA 洗涤液洗涤 3 次,每次 2 min。每孔加 100 μ l 50 g/L 脱脂奶粉溶液(PBS-T 配制),37℃温育 1 h;洗板后

将待测血清以 1:500 稀释,加入微孔反应板(100 μ l/孔),37℃温育 45 min;洗板后加 HRP 标记羊抗人 IgG 抗体(100 μ l/孔),37℃温育 45 min;洗板后加入 HRP 底物显色液 A 和 B 各 50 μ l,37℃避光反应 10 min,显色反应后加入 50 μ l 终止液(1 mol/L H_2SO_4)终止反应;测试波长 450 nm,参比波长 630 nm 读取吸光度(A)值。

1.3.2 阻断试验:选择抗 PlyA 抗体阳性的血清,分别作 1:500,1:1 000,1:2 000 稀释,加入 PlyA 重组蛋白抗原至终浓度为 8 μ g/ml,4 μ g/ml,2 μ g/ml 和 0 μ g/ml,37℃温育 45 min 后,ELISA 检测。

1.3.3 人血清抗 PlyA 抗体的测定及临界值的确定:对 97 例 IA 患者和 280 例对照组血清样本作 1:500 稀释,检测抗 PlyA 抗体水平。绘制 ROC 曲线,用曲线下面积(AUC)评估抗 PlyA 抗体的诊断价值。

1.3.4 抗烟曲霉 TR,DPPV 抗体测定:根据实验室前期建立的检测抗 TR,DPPV 抗体的 ELISA 方法,对 97 例 IA 患者血清样本进行检测,两种抗原的包被浓度分别为 0.7 μ g/ml 和 1.0 μ g/ml,临界值分别为 0.514 和 0.542^[6,7]。

1.4 统计学分析 实验数据采用 SPSS 16.0 统计软件处理。计数资料以例数和百分率表示;组间率的比较用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ELISA 方法的建立 选择确诊 IA 患者和体检健康者的混合血清,用方阵滴定法对包被抗原浓度和酶标二抗浓度进行优化。包被抗原最适浓度为 1 μ g/ml;酶标二抗最适浓度为 1:6 000。

2.2 精密度 对 3 份 ELISA 结果阳性的 IA 患者血清标本平行测定 20 次,批内 CV%=5.3%;每日检测 2 次,连续测定 10 天,批间 CV%=10.9%。

2.3 阻断试验 阻断结果显示,不同稀释度的血清加入 PlyA 抗原后,吸光度值迅速下降,随抗原浓度增加,吸光度值变小。阻断率为 92.1%~97.4%。

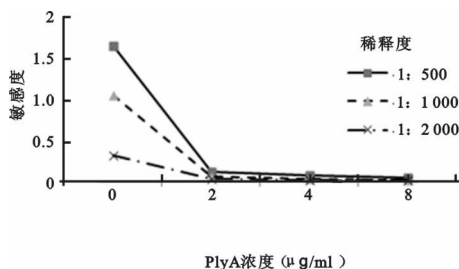


图1 ELISA 阻断试验结果

2.4 临界值的确定 依据97例确诊IA患者血清和280例对照组血清抗PlyA检测结果绘制ROC曲线(见图2),AUC=0.852,说明该方法有良好的诊断价值。以0.451为临界值,该方法诊断IA的敏感度为62.9%,特异度为90.4%。

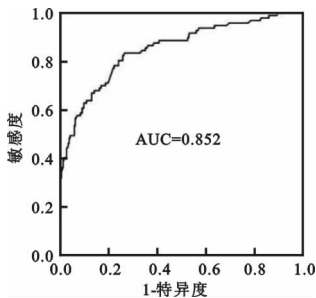


图2 间接ELISA检测人血清抗PlyA的ROC曲线

2.5 血清抗PlyA测定结果 对97例IA患者血清和280例对照组血清分别作1:500稀释,间接ELISA测定抗PlyA抗体水平。

在IA患者组中血清抗PlyA的阳性率为62.9%(61/97),其中65例非中性粒细胞缺乏IA患者的阳性率为72.3%(47/65),32例中性粒细胞缺乏IA患者的阳性率为43.8%(14/32),非中性粒细胞缺乏IA患者的阳性率显著高于中性粒细胞缺乏IA患者,差异有统计学意义($\chi^2=7.493, P<0.05$),非IA患者的阳性率为21.3%(17/80),健康对照组的阳性率为6.0%(12/200),IA组的阳性率高于健康对照组和非IA患者对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。

2.6 抗PlyA,抗DPPV和抗TR三种抗体阳性率的比较 见表1。分析结果显示,三种方法中抗DPPV抗体检测的阳性率最高(66.0%),其次为抗PlyA抗体(62.9%),抗TR抗体检测的阳性率最低(60.8%),三者差异无统计学意义($\chi^2=0.562, P>0.05$)。三种检测方法在非中性粒细胞缺乏患者组中的阳性率均显著高于中性粒细胞缺乏患者组。在联合诊断中,我们定义三种检测方法中任何一种方法检测值为阳性,即可判定为阳性结果。联合诊断中97例IA患者有90例检测结果为阳性,诊断的阳性率可提高到92.8%。

表1 抗PlyA抗体、抗DPPV和抗TR抗体IA诊断的阳性率[n(%)]

分组	n	抗PlyA	抗DPPV	抗TR	联合检测
IA患者组	97	61(62.9)	64(66.0)	59(60.8)	90(92.8)
非中性粒细胞缺乏组	65	47(72.3)	49(75.4)	47(72.3)	64(98.5)
中性粒细胞缺乏组	32	14(43.8)	15(46.9)	12(37.5)	26(81.3)

3 讨论 侵袭性曲霉病(IA)的确诊标准包括宿

主因素、临床症状、微生物学检查和组织病理学检查。尽管组织病理学是诊断金标准,但是受到活检取材的限制,并不适用于危重病患者,微生物学检查也是IA诊断的条件之一,其中GM试验已被欧洲癌症研究治疗组织和美国真菌病研究组(EORTC/MSG)包括在IA的评判标准中^[5],其对于中性粒细胞减少的IA患者有较高诊断价值,但对非中性粒细胞减少的IA患者诊断价值不大^[8,9]。近年来血清中抗体的检测受到关注,尤其在非粒细胞缺乏的患者中可能发挥重要的价值。

烟曲霉PlyA是一种分泌蛋白,可刺激人体产生免疫反应,其在曲霉感染中的具体功能仍不清楚。Upadhyay等^[10]研究发现烟曲霉PlyA可与人体上皮细胞外基质中的纤维蛋白原发生亲和反应,提示PlyA可能参与了曲霉与宿主细胞之间的黏附。Singh等^[11]报道PlyA可与过敏性支气管肺曲霉病患者的血清发生免疫反应。本课题组前期利用培养14天的烟曲霉分泌蛋白进行二维电泳,并与6例IA患者的混合血清进行免疫印迹反应,筛选出17种免疫优势抗原,首次报道了PlyA可与IA患者血清发生免疫反应,有作为IA诊断标志物的潜力^[3]。

本研究建立了检测烟曲霉PlyA抗体的ELISA方法,并检测了大量临床血清样本,结果显示该方法的敏感度可达62.9%,特异度也达到90.4%。其中非中性粒细胞缺乏的IA患者的抗体水平显著高于中性粒细胞缺乏的IA患者($P<0.05$),说明该方法对非中性粒细胞缺乏患者的诊断价值更大。在抗TR和抗DPPV抗体检测中同样显示非中性粒细胞缺乏患者的阳性率高于中性粒细胞缺乏患者的阳性率,我们推测中心粒细胞缺乏患者免疫系统受损,对外源蛋白刺激产生的抗体少或不产生抗体。

为了评估抗PlyA抗体对IA的诊断价值,本研究将97例IA患者血清抗PlyA与抗DPPV,抗TR检测结果进行了比较。结果显示,三种指标的阳性率分别为62.9%,60.8%和67.0%,其中抗DPPV阳性率高于其他两种抗体,但差异无统计学意义。三种方法联合检测,只要一种指标阳性就判为抗烟曲霉抗体阳性,97例IA患者的抗体总阳性率为92.8%,非中性粒细胞缺乏患者组中抗体阳性率达到98.5%,这充分说明联合诊断更能提供更敏感的诊断结果。

综上所述,我们建立了抗PlyA抗体检测的ELISA方法,评估了该方法的敏感度和特异度,作为一种辅助诊断方法,可以为IA的诊断提供帮助。(下转11页)

- document M100-S22, 2012.
- [5] Kasbekar N. Tigecycline: a new glycylcycline antimicrobial agent[J]. Am J Health Syst Pharm, 2006, 63(13): 1235-1243.
 - [6] Wyeth Pharmaceuticals, Inc. Department of Health & Human Services[J]. Available from: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/applletter/2009/021821s013.
 - [7] Kelesidis T, Karageorgopoulos DE, Kelesidis I, et al. Tigecycline for the treatment of multidrug resistant *Enterobacteriaceae*: a systematic review of the evidence from microbiological and clinical studies[J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 62(5): 895-904.
 - [8] Veleba M, Schneiders T. Tigecycline resistance can occur independently of the ramA gene in *Klebsiella pneumoniae* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(8): 4466-4467.
 - [9] Ko WC, Lee NY, Su SC, et al. Oligonucleotide array-based identification of species in the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex in isolates from blood cultures and antimicrobial susceptibility testing of the isolates [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(6): 2052-2059.
 - [10] Lin YC, Sheng WH, Chang SC, et al. Application of a microsphere-based array for rapid identification of *Acinetobacter spp.* with distinct antimicrobial susceptibilities[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(2): 612-617.
 - [11] Arian Akan O, Uysal S. In vitro activity of tigecycline against multiple resistant *Acinetobacter baumannii* and carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates [J]. Mikrobiyol Bul, 2008, 42(2): 209-215.
 - [12] Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P, et al. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(9): 3298-3304.
 - [13] Torrico M, González N, Giménez MJ, et al. Influence of media and testing methodology on susceptibility to tigecycline of *Enterobacteriaceae* with reported high tigecycline MIC [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(6): 2243-2246.

收稿日期: 2015-07-16

修回日期: 2015-10-20

(上接 7 页)

参考文献:

- [1] Barton RC. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis: from diagnosis to prediction of outcome[J]. Scientifica (Cairo), 2013(2013): 459405.
- [2] Perfect JR. Fungal diagnosis: how do we do it and can we do better? [J]. Curr Med Res Opin, 2013, 29(4): 3-11.
- [3] Shi LN, Li FQ, Huang M, et al. Immunoproteomics based identification of thioredoxin reductase GliT and novel *Aspergillus fumigatus* antigens for serologic diagnosis of invasive aspergillosis[J]. BMC Microbiol, 2012(12): 11.
- [4] 张国勇, 刘倩, 李芳秋, 等. 烟曲霉果胶裂解酶 A 重组蛋白的原核表达及抗原性分析[J]. 临床检验杂志, 2015, 33(2): 108-110.
Zhang GY, Liu Q, Li FQ, et al. Prokaryotic expression and antigenic analysis of recombinant pectate lyase A of *Aspergillus fumigatus* [J]. Chin J Clin Lab Sci, 2015, 33(2): 108-110.
- [5] De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group[J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(12): 1813-1821.
- [6] Shi LN, Li FQ, Lu JF, et al. Antibody specific to thioredoxin reductase as a new biomarker for serodiagnosis of invasive aspergillosis in non-neutropenic patients[J]. Clin Chim Acta, 2012, 413(9/10): 938-943.
- [7] 韩丹丹, 李芳秋, 史利宁, 等. 血清抗烟曲霉二肽基肽酶 V 肽段 IgG 类抗体 ELISA 法的建立及初步应用[J]. 临床检验杂志, 2014, 32(4): 241-244.
Han DD, Li FQ, Shi LN, et al. Establishment and preliminary application of an ELISA method for detecting serum IgG antibody against *Aspergillus fumigatus* dipeptidyl peptidase V fragment [J]. Chin J Clin Lab Sci, 2014, 32(4): 241-244.
- [8] Sarfati J, Monod M, Recco P, et al. Recombinant antigens as diagnostic markers for aspergillosis[J]. Diag Microbiol Infect Dis, 2006, 55(4): 279-291.
- [9] Sambatakou H, Guiver M, Denning D. Pulmonary aspergillosis in a patient with chronic granulomatous disease: confirmation by polymerase chain reaction and serological tests, and successful treatment with voriconazole [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2003, 22(11): 681-685.
- [10] Upadhyay SK, Gautam P, Pandit H, et al. Identification of fibrinogen-binding proteins of *Aspergillus fumigatus* using proteomic approach[J]. Mycopathologia, 2012, 173(2/3): 73-82.
- [11] Singh B, Oellerich M, Kumar R, et al. Immuno-reactive molecules identified from the secreted proteome of *Aspergillus fumigatus* [J]. J Proteome Res, 2010, 9(11): 5517-5529.

收稿日期: 2014-08-06

修回日期: 2015-08-11