

· 技术与方法 ·

双抗原夹心 ELISA 法检测烟曲霉硫氧还蛋白还原酶抗体

陈 笑¹, 李芳秋^{2*}

¹南京医科大学附属江宁医院检验科, 江苏 南京 211100; ²东部战区总医院解放军临床检验医学研究所, 江苏 南京 210002

[摘要] 目的: 建立检测烟曲霉硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase GlT, TR)特异性抗体的双抗原夹心 ELISA 法, 同时对其临床应用进行评价。方法: 利用基因工程技术制备重组 TR 作为包被抗原和酶标记抗原, 采用棋盘滴定法优化双抗原夹心 ELISA 法的反应条件, 并考察 ELISA 法的敏感性、特异性以及重复性。用双抗原夹心 ELISA 法测定 273 例住院患者(侵袭性曲霉病 50 例、侵袭性念珠菌病 46 例、念珠菌定植 82 例、细菌感染 95 例)以及 200 例健康人血清, 并与实验室前期建立的间接 ELISA 法检测 TR 抗体的结果进行比较。结果: 双抗原夹心 ELISA 法工作条件为 TR 抗原包被浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$, 酶标抗原 1:500 稀释; 封闭液含 50 g/L 脱脂奶粉溶液的 PBS-T, 待测血清稀释度为 1:100。患者血清检测结果显示, 高、中、低 3 份血清批内变异系数(CV)分别为 11.2%、11.8%和 12.3%; 不同批次重复测定 6 次, 其批间 CV 分别为 10.9%、12.1%和 13.5%。重组抗原对血清中相应抗体的阻断率为 94.4%。通过 ROC 曲线确定吸光度的 cut-off 值为 0.126。检测侵袭性曲霉病的敏感性和特异性分别为 80.0%(40/50)和 95.5%(404/423), 敏感性高于检测 TR 抗体的间接 ELISA 法(83.3% vs. 72.2%)。结论: 建立了双抗原夹心 ELISA 法检测烟曲霉 TR 特异性抗体, 可提高侵袭性曲霉病的诊断率, 具有临床应用价值。

[关键词] 侵袭性念珠菌病; 血清学诊断; 硫氧还蛋白还原酶; 抗体; 双抗原夹心 ELISA 法

[中图分类号] R446.61

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2019)07-1067-04

doi:10.7655/NYDXBNS20190727

A double - antigen sandwich ELISA for detecting antibody to *Aspergillus fumigatus* thioredoxin reductase

Chen Xiao¹, Li Fangqiu^{2*}

¹Clinical Laboratory, the Affiliated Jiangning Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 211100; ²Institute of Medical Laboratory Sciences of PLA, General Hospital of Eastern War Zone, Nanjing 210002, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to establish an immunological method for detecting specific antibody to *Aspergillus fumigatus* thioredoxin reductase (TR) in human sera, and evaluate its value in clinical prospect. **Methods:** The double-antigen sandwich ELISA for detecting TR antibody was applied with recombinant TR as coating and enzyme-labelled antigen. Reaction conditions were optimized by chessboard titration, and the sensitivity, specificity and repeatability for the ELISA were determined. Sera from 273 inpatients (50 cases with invasive aspergillosis, 46 cases with invasive candidiasis, 82 cases with *Candida* colonization and 95 cases with bacterial infection) and 200 healthy volunteers were collected and tested by the sandwich ELISA. The experiments results were compared with the previous results of indirect ELISA. **Results:** The TR was labeled with horseradish peroxidase (HRP) by the reformative sodium periodate method and the optimized condition were as follows: the coating concentration of TR was 1.0 $\mu\text{g/mL}$, the dilution of enzyme-labelled antigen was 1:500, the blocking buffer was PBS-T containing 50 g/L dried skimmed milk, test serum was diluted to 1:100. The intra- and inter-assay coefficients of variation for the developed ELISA were 11.2%, 11.8%, 12.3% and 10.9%, 12.1%, 13.5%, respectively. The blocking rate of sera with recombinant antigen was 94.4%. The absorbance value of 0.126 was chosen as cut-off value according to the ROC curve. The sensitivity of the sandwich ELISA for diagnosis of invasive aspergillosis was 80.0% (40/50), higher than that of indirect ELISA (83.3% vs. 72.2%) and the specificity was 95.5%(404/423) in this condition. **Conclusion:** A double-antigen sandwich ELISA for detecting the specific antibody to *Aspergillus fumigatus* TR was established successfully, which

[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); 南京市卫生局基金(YKK18200)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jiangningxiaoxiao@126.com

can be potentially applied in clinical diagnosis setting of invasive aspergillosis.

[Key words] invasive aspergillosis; serodiagnosis; thioredoxin reductase; antibody; double-antigen sandwich ELISA

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(07): 1067-1070]

细菌感染在重症监护室很常见,但侵袭性真菌感染的发病率也在上升^[1]。其中侵袭性曲霉病(invasive aspergillosis, IA)是第二常见的侵袭性真菌感染类型。IA在血液恶性肿瘤、造血干细胞移植等免疫力低下患者中发病率极高并可导致高病死率^[2-3]。IA的诊断至关重要,而传统培养敏感性极低,且曲霉生长速度慢,培养周期长。目前真菌感染的血清学诊断是研究的热点。实验室前期利用免疫蛋白组学分析筛选鉴定出一批烟曲霉全菌蛋白,其中有些蛋白可用作血清学诊断的敏感指标,亦可用于检测血清中的相应抗体,其中烟曲霉硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase GlT, TR)可与IA患者血清发生强烈反应^[4]。前期实验室通过制备的TR蛋白建立了检测IA患者血清中相应抗体的间接ELISA法,并评估其诊断价值^[4]。在此基础上,本研究建立双抗原夹心ELISA法检测IA患者血清中TR抗体,评价其临床应用价值。

1 对象和方法

1.1 样本来源

IA诊断标准依据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)^[5]。收集2009年1月至2014年12月50例血培养和(或)组织病理学检查为曲霉感染的IA患者血清,其中男36例,女14例,中位年龄51岁(21~87岁)。对照血清采集自南京军区总医院2011年8月至2015年12月的非IA患者223例,血培养结果包括:临床确诊为侵袭性念珠菌病(invasive candidiasis, IC)46例[其中男28例,女18例,中位年龄45岁(19~79岁)],念珠菌定植82例[仅痰培养阳性,男51例,女31例,中位年龄58岁(18~78岁)],细菌血症95例[其中21例葡萄球菌,18例大肠埃希菌,15例肺炎克雷伯菌,10例链球菌,9例肠球菌,7例黏质沙雷菌,6例其他革兰阳性球菌,5例铜绿假单胞菌和4例其他革兰阴性杆菌;男58例,女37例,中位年龄55岁(16~81岁)],以及200例健康体检者[男121例,女79例,中位年龄56岁(20~82岁)]。所有血

清均于采血后24 h内离心收集,保存于-70℃备用。

重组烟曲霉TR蛋白由实验室前期通过基因工程技术制备及纯化^[6],辣根过氧化物酶(HRP,上海国源公司),小牛血清(杭州四季青公司),Model 680型酶联仪(美国Bio-Rad公司)。

1.2 方法

1.2.1 HRP标记TR的制备

按照改良过碘酸钠标记法标记。将HRP 5 mg溶于0.2 mol/L pH5.6 醋酸盐缓冲液0.5 mL;加入新鲜配制的0.1 mol/L NaIO₄ 0.25 mL,混匀后4℃孵育30 min。加入2.5%乙二醇0.5 mL混匀,室温放置30 min。加入TR 5 mg,用1.0 mol/L pH 9.5碳酸盐缓冲液(CBS)调pH至9.0,混匀,4℃过夜。加入NaHB₄ 0.1 mL后混匀,4℃孵育2 h后对0.01 mol/L pH7.4 PBS透析,4℃过夜。加入适量中性甘油后小量分装备用。

1.2.2 双抗原夹心ELISA测定

以重组烟曲霉TR为包被抗原,HRP标记的TR为检测抗原,采用棋盘滴定法确定最佳反应条件。重组TR抗原用0.1 mol/L CBS(pH9.6)稀释,每孔100 μL包被微孔板,4℃过夜。次日用0.01 mol/L PBS-T(含0.05% Tween-20的PBS)洗板5次,每次3 min;每孔加入封闭液(含5.0 g/L脱脂奶粉的0.01 mol/L PBS-T)100 μL,37℃孵育1 h;用PBS-T洗板5次,每次3 min。将待测血清用含1%小牛血清的PBS以1:100稀释,加入微孔反应板100 μL/孔,各稀释度均设复孔,37℃孵育50 min;用PBS-T洗板5次,每次3 min;加入HRP标记TR(1:500),每孔100 μL,37℃孵育30 min,同上洗涤;加入底物液TMB-H₂O₂ 100 μL显色,37℃孵育15 min;加入1 mol/L H₂SO₄ 50 μL终止反应。于酶联仪上用测试波长450 nm、参比630 nm读取吸光度值。

1.3 统计学方法

采用SPSS 20.0统计软件进行处理。非正态分布的资料用中位数(四分位数)[$M(P_{25}, P_{75})$]表示。组间样本比较采用Kruskal-Wallis检验;组间率和两种检验方法间的比较用卡方检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。绘制ROC曲线,用曲线下面积(AUC)评估TR抗体作为诊断指标的可能性。

2 结果

2.1 ELISA 条件优化

取5例确诊IA患者的混合血清为阳性对照,健康人的混合血清为阴性对照,用棋盘滴定法对实验条件进行优化,选定重组TR抗原浓度为1.0 μg/mL,待测样本稀释度为1:100,HRP标记TR浓度为1:500。

2.2 cut-off值的确定

测定50例IA患者、223例非IA患者和200例健康者血清(1:100稀释),以不同的吸光度值制作ROC曲线(图1),计算AUC。TR抗体的AUC(95%可信区间)为0.884(0.812~0.956)。当吸光度值为0.126时,特异性为95.5%,敏感性最高,为80.0%。故选择0.126为cut-off值。

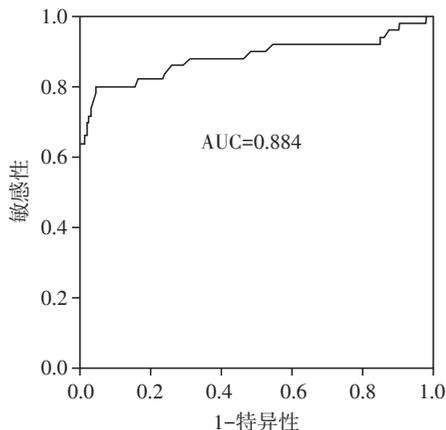


图1 双抗原夹心ELISA法检测TR抗体的ROC曲线
Figure 1 ROC curves for TR antibody of double-antigen sandwich ELISA

2.3 重复性考察

取TR抗体阳性且抗体滴度分别为高、中、低的3份血清平行测定15次,其批内变异系数(CV)分别为11.2%、11.8%和12.3%;不同批次重复测定15次,其批间CV分别为10.9%、12.1%和13.5%。

2.4 阻断试验

选取TR抗体阳性的血清,1:100稀释,并加入TR重组蛋白至终浓度为0、0.5、1.0、2.0、4.0 μg/mL,37℃孵育1h后进行夹心法ELISA测定。结果显示,当TR重组蛋白终浓度达到4.0 μg/mL时,吸光度值从1.842降至0.103,阻断率为94.4%,提示检测结果具有特异性(图2)。

2.5 TR抗体的检测结果

采用双抗原夹心ELISA法检测50例确诊为IA的患者,其中检测出TR抗体的患者共计40例(80.0%),其吸光度值的中位数(四分位数)为0.336

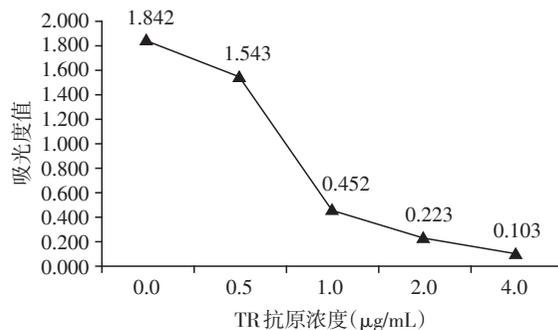


图2 双抗原夹心ELISA法阻断试验结果

Figure 2 Results of block tests of double-antigen enzyme-linked immunosorbent assay

(0.129, 1.414);检测223例非IA患者和200例健康对照者血清的吸光度值中位数(四分位数)分别为0.089(0.076, 0.103)和0.066(0.054, 0.082)。将IA组、非IA组和健康对照组分别进行比较发现,IA组TR抗体水平显著高于非IA组($U=1\ 568.000, P < 0.001$)和健康对照组($U=879.500, P < 0.001$),差异均具有统计学意义。此外,检测TR抗体的阳性预测值和阴性预测值分别为67.8%和97.6%。

双抗原夹心法检测的50例IA患者血清标本中有36例在实验室前期进行了间接ELISA的检测。分析后发现两种方法之间不存在显著差异($P > 0.05$),两种方法检测TR抗体的总符合率为83.3%,阳性符合率为96.2%,阴性符合率为50.0%,一致性系数Kappa值为0.526(表1)。

表1 两种ELISA法TR抗体检测结果

Table 1 Results of TR antibody by the two types of ELISA (n)

双抗原夹心ELISA法	间接ELISA法		合计
	阳性	阴性	
阳性	25	5	30
阴性	1	5	6
合计	26	10	36

3 讨论

目前IA的实验室诊断方法主要包括传统方法和血清学方法。传统方法包括直接显微镜检查、组织病理学检查以及培养。直接显微镜检查适用于多种标本,且可快速得到实验结果,但敏感性低^[7]。组织病理学检查发现曲霉并培养出病原体是诊断IA的金标准,但曲霉培养阳性率极低,且真菌生长缓慢,往往在感染后期才能得到阳性结果。常用的血清学诊断包括检测真菌半乳甘露聚糖(GM试验)

和(1-3)- β -D葡聚糖(G试验)。大多数曲霉的细胞壁中含有半乳甘露聚糖,目前GM试验被广泛应用于诊断曲霉的侵袭性感染。但有研究表明不同基础疾病曲霉感染时该法的敏感性差异较大且应用抗生素、透析时会引起假阳性,导致GM试验的结果存疑^[8-9]。G试验主要用于泛真菌感染的检测,并不能鉴定真菌种属,缺乏特异性。IA患者病死率高居不下的主要原因是真菌感染的诊断困难^[10]。因此急需一种新的诊断手段能够早期、快速明确曲霉的侵袭性感染,以便指导临床医生进行预防性和治疗性应用抗真菌药物,从而避免过迟或过度使用具有不良反应的抗真菌药物导致患者预后不良。

本研究利用前期制备的烟曲霉TR蛋白作为包被抗原和酶标记抗原,建立检测IA患者血清中TR抗体的双抗原夹心ELISA法,并考察其方法学。结果表明,双抗原夹心法的敏感性、特异性以及精密度均可满足临床实验室要求。同时利用新建方法检测临床样本,以曲霉血培养和(或)组织病理学检查作为金标准,IA检测的敏感性和特异性分别为80.0%(40/50)和95.5%(404/423),表明可将双抗原夹心ELISA法作为IA的辅助诊断手段。夹心法检测抗TR抗体的阴性预测值为97.6%,说明若夹心法检测为阴性结果,可基本排除曲霉侵袭性感染,避免抗真菌药物的不合理使用。

本研究中检测的50例IA患者血清标本中有36例在前期进行了间接ELISA法的检测。卡方检验表明双抗原夹心ELISA法与间接法不存在显著差异($P > 0.05$),但夹心法和间接法的阳性符合率较高,阴性符合率低,这可能是由于本实验两种方法比较时选取的样本例数较少,导致实验结果未能体现夹心ELISA法高敏感性的优势。且两种方法TR抗体的一致性系数Kappa值为0.526,具有中等一致性,这可能也是由夹心法具有更高的敏感性导致。此外,夹心法可同时检测患者血清中的IgM和IgG抗体,因此夹心法检测抗体效果更佳,可将两种ELISA法联合检测用于辅助诊断曲霉的侵袭性感染,提高诊断敏感性,并为临床医生用药提供依据。

本实验后续准备收集不同病程的患者血清,用该方法检测患者血清中的TR抗体,进一步探索该方法能否用于侵袭性曲霉病的早期诊断,以弥补传统方法耗时、敏感性低的缺陷。

[参考文献]

- [1] Durga CS, Gupta N, Soneja M, et al. Invasive fungal infections in critically ill patients: a prospective study from a tertiary care hospital in India [J]. *Drug Discov Ther*, 2018, 12(6):363-367
- [2] Nicolle MC, Benet T, Thiebaut A, et al. Invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies: incidence and description of 127 cases enrolled in a single institution prospective survey from 2004 to 2009 [J]. *Haematologica*, 2011, 96(11):1685-1691
- [3] Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ, et al. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001 - 2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) database [J]. *Clin Infect Dis*, 2010, 50(8):1091-1100
- [4] 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
- [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] 史利宁,邵世和,李芳秋,等. 烟曲霉硫氧还蛋白还原酶重组蛋白的原核表达及抗原性分析[J]. *临床检验杂志*, 2011, 29(8):599-601
- [7] Morace G, Borghi E. Fungal infections in ICU patients: epidemiology and the role of diagnostics [J]. *Minerva Anesthesiol*, 2010, 76(11):950-956
- [8] Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis [J]. *Clin Infect Dis*, 2006, 42(10):1417-1427
- [9] Fortun J, Martin-Davila P, Alvarez ME, et al. False-positive results of *Aspergillus galactomannan* antigenemia in liver transplant recipients [J]. *Transplantation*, 2009, 87(2):256-260
- [10] 胡悦,黄静,田家伟,等. 变应性支气管肺曲霉病合并侵袭性肺曲霉病临床特点分析[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(12):1826-1828

[收稿日期] 2019-01-29