

白色念珠菌烯醇化酶抗原双抗体夹心法的建立及应用

赵会海, 贺政新, 李芳, 高鹏, 王佳钰, 王芳芳, 秦立霞

联勤保障部队第 980 医院检验科, 河北 石家庄 050082

【摘要】 目的 建立定量检测白色念珠菌烯醇化酶抗原的双抗体夹心法, 为后续定量检测念珠菌性阴道炎患者阴道分泌物中的烯醇化酶抗原提供方法学基础。方法 用方阵滴定法确定最佳包被抗体浓度和最佳酶标二抗浓度, 建立检测白色念珠菌烯醇化酶抗原的 ELISA 法, 用该法检测白色念珠菌标准菌株 SC5314 培养上清中烯醇化酶抗原的浓度, 初步探索应用于诊断外阴阴道念珠菌病。结果 最佳包被抗 Eno 单抗浓度为 4.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 酶标二抗 HRP 标记的抗烯醇化酶多抗最佳稀释倍数为 1 : 1 000。在第 12 小时时白色念珠菌培养上清中的烯醇化酶抗原开始检出, 随着培养时间的延长, 其上清中 Eno 抗原的浓度也随着逐渐增高, 第 48 小时时达到峰值后趋于稳定。阴道分泌物上清中烯醇化酶抗原浓度随着真菌培养菌落计数的增加其浓度也在增加, 有很好的相关性。结论 成功建立了定量检测白色念珠菌烯醇化酶抗原的双抗体夹心 ELISA 方法, 可应用于评价念珠菌性阴道炎患者阴道分泌物中的烯醇化酶抗原的水平。

【关键词】 念珠菌性阴道炎; 白色念珠菌; 烯醇化酶; 双抗体夹心酶联免疫吸附试验

【中图分类号】 R711.31 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2023)24-3600-04

Development and application of an double-antibody sandwich ELISA method for the detection of enolase from *Candida albicans*. ZHAO Hui-hai, HE Zheng-xin, LI Fang, GAO Peng, WANG Jia-yu, WANG Fang-fang, QIN Li-xia. Department of Clinical Laboratory, the 980th Hospital of Joint Logistics Support Force of Chinese PLA, Shijiazhuang 050082, Hebei, CHINA

【Abstract】 Objective To establish an double-antibody sandwich ELISA method for the detection of enolase from *Candida albicans* and provide the basis for the subsequent quantitative detection of enolase (Eno) antigen in vaginal secretions of patients with *Candida* vaginitis. **Methods** The optimal concentrations of coating anti-body and enzyme-labeled secondary antibody were determined with the square matrix titration. An ELISA method was established to detect the enolase antigen of *Candida albicans*. The concentration of enolase antigen in culture supernatant of standard strain SC5314 was detected by this method, and preliminary exploration was applied to the diagnosis of Vulvovaginitis candidiasis (VVC). **Results** The optimal concentration of Eno was 4.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the optimal dilution ratio of HRP-labeled anti-enolase polyclonal antibody was 1 : 1 000. The enolase antigen in the supernatant of *Candida albicans* culture began to be detected at the 12th hour. With the extension of culture time, Eno antigen concentration in the supernatant increased gradually, reaching a peak at the 48th hour and then stabilizing. The concentration of enolase antigen in the supernatant of vaginal secretions increased with the increase of fungal colony count, and there was a good correlation. **Conclusion** A double-antibody sandwich ELISA method for detecting enolase antigen of *Candida albicans* was established successfully, which can be used to evaluate the level of enolase antigen in vaginal secretions of patients with *Candida* vaginitis.

【Key words】 Vulvovaginitis candidiasis (VVC); *Candida albicans*; Enolase; Double-antibody sandwich ELISA

念珠菌性阴道炎(vulvovaginal candidiasis, VVC)是妇科炎症中最常见的一个疾病种类。有许多研究文献表明,在女性的一生中至少会发生一次 VVC,40%~50%的女性有多次感染的病史^[1-2]。引发 VVC 疾病的念珠菌主要是白色念珠菌,占比为 85%~95%^[3-6]。

与细菌性阴道炎比较,VVC 没有特殊的症状和体征,临床医生无法单纯依靠患者的查体结果和病史做出诊断,往往需要结合实验室的检查结果。当前,对 VVC 最主要的实验室检查手段有阴道分泌物常规分

析和真菌培养。尽管大部分 VVC 患者根据这两项检测可以得到有效诊治,但临床上误诊的概率仍达到了 34%^[7-9],阴道分泌物真菌培养与常规分析经常出现结果不一致的情况,使得临床医生时常感到困惑。此外,真菌培养诊断周期需要 3~4 d,无法满足快速诊断的要求。由此可见,尽管一般认为 VVC 可以通过常规实验室检测完成诊断,但临床对新的诊断技术仍然有非常迫切的需求。

念珠菌烯醇化酶(enolase, Eno)主要存在于细胞浆

基金项目:河北省卫健委医学科学研究重点课题计划项目(编号:20180918)。

第一作者:赵会海(1982—),男,副主任技师,主要研究方向:临床微生物学。

通讯作者:秦立霞(1986—),女,主管技师,主要研究方向:临床生物化学和微生物学, E-mail:94266613@qq.com。

中,是催化糖酵解过程中的一种关键酶。念珠菌中存在大量的念珠菌烯醇化酶蛋白,其重量占总重量的 0.7%~2%。研究表明烯醇化酶可以释放到细胞外,且与念珠菌的生长状态相关^[10-11]。本研究通过建立双抗夹心酶联免疫吸附反应(ELISA),检测白色念珠菌烯醇化酶抗原,并用于定量检测 VVC 患者阴道分泌物中的 Eno 抗原,可为临床提供一种新的快速简便的诊断 VVC 的方法。

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂 菌株:白色念珠菌 SC5314 (购自中国医学细菌典藏管理中心);主要试剂:白色念珠菌重组烯醇化酶蛋白、抗烯醇化酶单克隆抗体、HRP 标记抗烯醇化酶多克隆抗体(本实验室制备保存^[12])、5%脱脂奶粉、显色液和终止液(北京万泰生物药业公司)、Tween-20 购自上海碧云天生物技术有限公司、酶联反应板购自广州洁特公司、YPD 培养液(自配)、碳酸盐包被缓冲液(自配)、PBST 洗涤液(自配)。

1.2 标本来源 收集联勤保障部队第九八〇医院 2022 年 6~9 月份门诊患者 15 例,经临床医生诊断为外阴阴道念珠菌病,年龄 18~55 岁,平均 36.5 岁,临床用药情况不详。由临床医生借助扩阴器于患者阴道后穹窿处用专用无菌拭子采集阴道分泌物后立即送检。在无菌拭子管中加入 1 mL 生理盐水与采集的分泌物样本充分震荡混匀后,取 10 μ L 稀释 10 倍,吸取稀释后的标本 5 μ L 接种于沙保罗培养基,35 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后菌落计数(CFU/mL),用珠海美华 MA120 全自动细菌药敏鉴定仪鉴定为白色念珠菌;剩余标本离心后收集上清,-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存待检。

1.3 仪器 HF-1600C 型生物安全柜(上海力申);高速低温离心机(德国 Sigma);二氧化碳培养箱(日本三洋);DNM-9602 型酶标仪(北京普朗新)。

1.4 方法

1.4.1 确定烯醇化酶抗原包被抗体和酶标二抗最佳稀释浓度 采用方阵滴定法确定烯醇化酶抗原包被抗体和酶标二抗最佳稀释浓度。具体操作:将抗烯醇化酶单抗用 0.05 mmol/L 碳酸盐缓冲液倍比稀释,涡旋混匀,每孔加样 100 μ L 包被酶联反应板,盖封板膜封闭,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜后弃去包被液,PBST [含 0.05% Tween-20 的磷酸盐缓冲液(PBS)]洗板 3 次,每次 3 min;加 5%脱脂奶粉封闭,每孔加样 100 μ L,反应板盖封板膜,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜后弃去包被液,PBST (含 0.05% Tween-20 的 PBS)洗板 3 次,3 min/次;加入待测重组烯醇化酶抗原,每孔加样 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,PBST 洗板 3 次,每次 3 min;用抗体稀释液稀释抗烯醇化酶多抗(HRP 标记),每孔加样 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后 PBST 洗板 3 次,每次 3 min;每孔加底物液 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min 后,加 2 mol/L H₂SO₄ 终止液

50 μ L 终止反应,于酶标仪上设定测试波长为 450 nm、参比波长为 630 nm 读取吸光度(A)值。

1.4.2 确定抗烯醇化酶抗原多抗(HRP 标记)稀释度 将抗烯醇化酶抗原单抗(0.83 mg/mL)用碳酸盐缓冲液按照 1:1 000~1:32 000 倍比稀释,涡旋混匀,100 μ L/孔包被酶联反应板;本实验白色念珠菌重组烯醇化酶蛋白浓度为 1.3 mg/mL,将其稀释成 1.3 μ g/mL 作为待测样本;将 HRP 标记的抗烯醇化酶抗原多抗用 PBS 溶液分别稀释为 1:1 000、1:2 000、1:5 000、1:10 000,其余操作见方阵滴定法。

1.4.3 确定抗烯醇化酶抗原单抗浓度 将抗烯醇化酶抗原单抗(0.83 mg/mL)用碳酸盐缓冲液分别按照 1:100、1:200、1:500、1:1 000 稀释。将白色念珠菌重组烯醇化酶蛋白用 PBS 溶液稀释为 10 ng、5 ng、2.5 ng、2 ng、1.5 ng、1 ng、0.5 ng,其余操作见方阵滴定法。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。线性回归分析采用拟合曲线,相关性采用 Pearson 分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 最佳抗烯醇化酶抗原多抗(HRP 标记)稀释度 根据以上方阵滴定法确定最佳抗烯醇化酶抗原多抗(HRP 标记)稀释度为 1:1 000 和最佳抗烯醇化酶抗原单抗稀释度为 1:200 (浓度为 4.15 μ g/mL)。

2.2 标准曲线的建立 将重组烯醇化酶抗原浓度依次稀释为 20 ng/mL、10 ng/mL、5 ng/mL、2 ng/mL、1 ng/mL 和 0.5 ng/mL。以 y 轴作为标准重组烯醇化酶抗原含量,x 轴为吸光度值,用 SPSS25.0 统计软件进行线性回归分析,标准线性拟合曲线方程为 $y = 0.050 5x + 0.114 5$,决定系数 $R^2 = 0.997$ ($F = 152 8, P < 0.01$),见图 1。

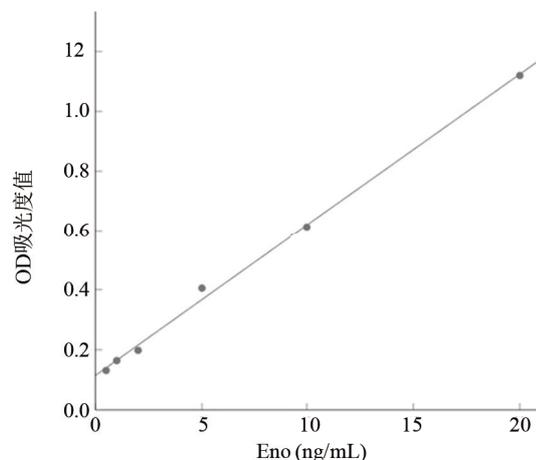


图 1 双抗体夹心酶联免疫法定量检测烯醇化酶抗原标准曲线
Figure 1 Standard curve for quantitative detection of enolase antigen using double-antibody sandwich ELISA

2.3 白色念珠菌 SC5314 培养上清液的制备和 Eno 抗原浓度测定 将 SC5314 从 -80 $^{\circ}$ C 冰箱取出后恢复至

室温,接种于沙保罗培养基置于二氧化碳培养箱 35℃ 培养 24~48 h 后获得单个菌落。用牛鲍计数板计数调整菌液浓度为 2.9×10^7 CFU/mL。将菌悬液 500 μ L 加入到 50 mL YPD 培养液中,35℃ 培养。在培养的不同时间段里(分别为 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h 和 120 h)取出 1 mL 培养液,用牛鲍计数板进行计数后 4℃ 10 000 g 离心 5 min,吸取上清-20℃ 冰箱保存。YPD 培养液作为空白对照,利用上述检测体系对培养上清中 Eno 抗原进行测定。培养第 12 小时上清中的烯醇化酶抗原开始检出,浓度为 2.23 ng/mL,随着培养时间的延长,其上清中 Eno 抗原的浓度也随着逐渐增高,到培养时间到 48 h 时,培养上清中 Eno 浓度达到了最高值,浓度为 38.70 ng/mL,然后 Eno 浓度开始趋于稳定,见图 2。

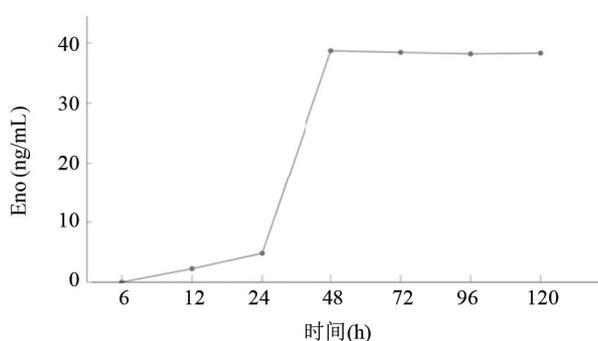


图2 YPD培养液中白色念珠菌Eno浓度随培养时间的变化

Figure 2 Variation of Eno concentration of *Candida albicans* in YPD medium with culture time

2.4 外阴阴道念珠菌病患者阴道分泌物培养后菌落计数及其上清液Eno浓度的测定 在无菌拭子管中加入 1 mL 生理盐水与采集的阴道分泌物样本充分震荡混匀后,取 10 μ L 稀释 10 倍,吸取稀释后的标本 5 μ L 接种于沙保罗培养基,35℃ 培养 24 h 后菌落计数,同时将剩余标本离心后收集上清液测定 Eno 浓度,见表 1。

表1 不同患者阴道分泌物菌落计数及上清液Eno浓度测定

Table 1 Bacterial colony count of vaginal secretions and Eno concentration determination in different patients

例数	菌落计数(CFU/mL)	吸光度值	Eno (ng/mL)
1	2.0×10^5	0.386	5.38
2	1.5×10^5	0.285	3.38
3	1.2×10^5	0.273	3.14
4	4.2×10^5	1.131	20.13
5	0.3×10^5	0.114	0
6	2.2×10^5	0.401	5.67
7	1.4×10^5	0.275	3.18
8	5.4×10^5	1.734	32.07
9	0.2×10^5	0.097	0
10	3.6×10^5	0.943	16.41
11	4.8×10^5	1.276	23.00
12	0.6×10^5	0.145	0.6
13	1.8×10^5	0.351	4.68
14	2.8×10^5	0.463	6.90
15	3.0×10^5	0.513	7.89

2.5 阴道分泌物上清液Eno浓度与真菌培养结果的相关性 将-80℃ 保存的上清液恢复至室温,用上述检测体系根据标准曲线方程 $Y=0.050 5X+0.114 5$ 对上清液中 Eno 抗原进行测定,经 Pearson 相关性分析结果显示与真菌培养结果呈正相关(相关系数为 0.957, $P<0.01$),随着真菌培养菌落计数的增加其 Eno 浓度也增加,见图 3。

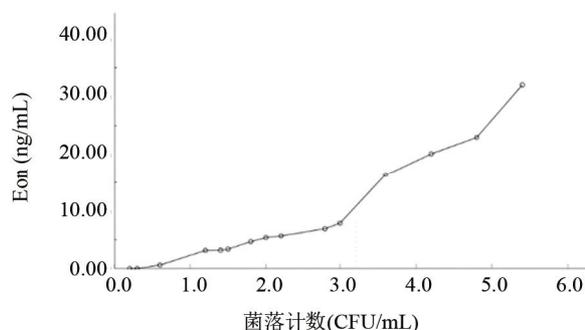


图3 阴道分泌物上清液真菌培养菌落计数和Eno浓度的变化趋势图
Figure 3 Trends of bacterial colony count and Eno concentration in supernatant of vaginal secretions

3 讨论

念珠菌属(*Candida species*)是最常见的条件致病菌之一,其所致疾病在侵袭性真菌病中占首位。念珠菌可共栖于正常人群的皮肤、黏膜、生殖道、肠道等部位,是一种条件致病菌,只有当宿主的免疫系统受损或菌群失调时,才会引起感染。宿主相关环境因素的变化可刺激诱导白色念珠菌从酵母相向菌丝相转换,形成的菌丝具有黏附宿主细胞表面和组织穿透的能力,其致病过程主要包括以下几个阶段:黏附、侵袭、扩散、组织损伤等。念珠菌病的早期诊断对临床治疗非常关键,但感染的非特异性又使得其早期诊断变得非常困难,以致延误了最佳的抗真菌治疗时间,影响患者预后。白色念珠菌是引起成年女性阴道炎的常见真菌,大部分女性一生中会都经历 VVC,而其中多数人可能会发生多次反复感染。念珠菌性阴道炎的实验室诊断有阴道分泌物的常规镜检、微生物培养及检测白色念珠菌特异性酶的活性等,这些方法存在不同的检测弊端,比如检出周期长、阳性率低,无法判断感染真菌的种类及治疗效果^[13]。

Eno 由 440 个氨基酸组成,分子量为 45~48 kD,是糖酵解途径所必需的胞内酶。烯醇化酶在念珠菌中含量丰富(0.7%~2.0%),研究显示烯醇化酶只在侵袭性感染时大量表达,同时刺激机体产生抗体。免疫蛋白组织学研究显示可在患者体内检测到 30 余种免疫反应蛋白。以上表明烯醇化酶具有很强的免疫原性,可刺激诱导患者机体产生强烈的体液免疫应答,产生高滴度的抗体,是白色念珠菌的一个免疫优势抗原。当前国内外对 Eno 的应用主要集中在检测其抗体上,而

对抗原检测的应用价值研究极少。其主要原因可能有两方面,一是在分子生物学欠发达时期,特异性的单克隆抗体较难获得;二是病原体抗原与宿主免疫系统的互动可能导致抗原被清除,不便于检测。

女性生殖道环境相对封闭,其与宿主的免疫系统接触可能仅限于黏膜免疫系统。此类环境有利于感染病原体抗原的聚集,不易被机体清除,是发展抗原检测技术的理想标本。VVC在女性群体中发病广泛,而现有的实验室检测手段存在不同的缺陷,无法完全满足临床需求。建立更加快速有效的实验室诊断手段,必将大大提高临床诊治VVC的效率。

本部分建立了白色念珠菌烯醇化酶抗原双抗体夹心法,通过对白色念珠菌标准菌株SC5314培养上清Eno抗原浓度的定量检测,初步评价了该ELISA检测体系,为后续VVC的快速诊断提供了基础。

对外阴阴道念珠菌病患者阴道分泌物上清液Eno的测定进行了初步探索,结果显示随着真菌培养菌落计数的增加其Eno浓度也在增加,有很好的相关性。下一步将继续收集临床VVC标本进一步评价其在快速诊断中的作用。

参考文献

- [1] Luo LL, Li W, Chen J. Research progress in diagnosis and treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis [J]. Mod Med J, 2017, 45(12): 1844-1847.
罗兰兰, 李卫, 陈娟. 复发性外阴阴道假丝酵母菌病诊治研究进展[J]. 现代医学, 2017, 45(12): 1844-1847.
- [2] Denning DW, Kneale M, Sobel JD, Rautemaa-Richardson R. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review [J]. Lancet Infect Dis, 2018, 18(11): e339-e347.
- [3] Lei Y, Chen XF, Yan L, et al. Identification of 289 isolates of VVC pathogens and sensitivity of the pathogens to 9 antifungal drugs [J]. Mycosystema, 2019, 38(8): 1306-1313.
雷岩, 陈晓菲, 晏亮, 等. 289株VVC致病菌的菌种分布和对9种抗真菌药物敏感性[J]. 菌物学报, 2019, 38(8): 1306-1313.
- [4] Li QH, Li H, Lin T, et al. Analysis of strain distribution and drug sensitivity test of Candida in 93 female patients with genital tract infection[J]. China Journal of Leprosy and Skin Diseases, 2017, 33(12): 717-719.
李前辉, 李鹤, 林涛, 等. 93例女性生殖道感染念珠菌菌种分布及药敏结果分析[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2017, 33(12): 717-719.
- [5] Yan L, Deng SW, Pan WH, et al. Distribution of pathogenic bacteria of vulvovaginal candidiasis in China and research status of *in vitro* drug sensitivity [J]. Chin J Mycology, 2018, 13(1): 46-52.
晏亮, 邓淑文, 潘炜华, 等. 我国外阴阴道念珠菌病致病菌菌种分布及体外药敏研究现状[J]. 中国真菌学杂志, 2018, 13(1): 46-52.
- [6] De Bernardis F, Graziani S, Tirelli F, et al. Candida vaginitis: virulence, host response and vaccine prospects [J]. Med Mycol, 2018, 56 (suppl_1): 26-31.
- [7] Aguin TJ, Sobel JD. Vulvovaginal candidiasis in pregnancy [J]. Curr Infect Dis Rep, 2015, 17(6): 462.
- [8] Watson CJ, Fairley CK, Grando D, et al. Associations with asymptomatic colonization with Candida in women reporting past vaginal candidiasis: an observational study [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2013, 169(2): 376-379.
- [9] Wang DJ, Wu WJ. Research progress of vulvovaginal candidiasis [J]. Lab Med, 2016, 31(8): 721-727.
王东江, 吴文娟. 外阴阴道念珠菌病研究进展[J]. 检验医学, 2016, 31(8): 721-727.
- [10] Wang TT, He ZX, Wang FK. Research progress of Candida albicans enolase [J]. Chin J Clin Lab Sci, 2017, 35(4): 293-295.
王廷廷, 贺政新, 王缚鲲. 白念珠菌烯醇化酶的研究进展[J]. 临床检验杂志, 2017, 35(4): 293-295.
- [11] Wang FK, Ran XY, Chen J, et al. Preparation of chromatography test paper for detection of anti-Candida albicans enolase IgG antibody by using immune gold colloid [J]. Medical & Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2018, 30(11): 106-109.
王缚鲲, 冉向阳, 陈晶, 等. 检测抗白色念珠菌烯醇化酶IgG抗体免疫胶体金层析试纸的制备[J]. 解放军医药杂志, 2018, 30(11): 106-109.
- [12] He ZX, Chen X, He ZG, et al. Preparation, screening and identification of monoclonal antibodies against *Saccharomyces cerevisiae* enolase [J]. Chin J Cell Mol Imm, 2014, 30(2): 176-178.
贺政新, 陈兴, 贺占国, 等. 酿酒酵母烯醇化酶单克隆抗体的制备、筛选与鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30(2): 176-178.
- [13] Sobel JD. Recurrent vulvovaginal candidiasis [J]. Am J Obstet Gynecol, 2016, 214(1): 15-21.

(收稿日期:2023-04-13)