

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/569

G01N 33/571 C07K 1/36



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02808809.3

[43] 公开日 2004年6月16日

[11] 公开号 CN 1505759A

[22] 申请日 2002.4.23 [21] 申请号 02808809.3

[30] 优先权

[32] 2001.4.25 [33] US [31] 09/841,188

[86] 国际申请 PCT/AU2002/000507 2002.4.23

[87] 国际公布 WO2002/088741 英 2002.11.7

[85] 进入国家阶段日期 2003.10.24

[71] 申请人 罗克比生物医学有限公司

地址 澳大利亚西澳大利亚

[72] 发明人 约翰·沃明顿 丹尼斯·巴兰坦

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书2页 说明书30页 附图10页

[54] 发明名称 念珠菌的检测

[57] 摘要

本发明涉及诊断念珠菌感染的方法和用具。尤其是，本发明涉及通过测量抗受试者生物样品中念珠菌胞质抗原的抗体的水平来诊断念珠菌感染的方法，所述受试者为念珠菌感染的易感或疑似者。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种诊断念珠菌感染的方法，包括以下步骤：
 - a) 从受试者获取生物学样品，所述受试者是对念珠菌感染易感或疑似者，并
 - b) 测定该生物学样品中抗念珠菌胞质抗原的抗体的水平。
2. 权利要求1的方法，其中步骤b)通过选自下组的以下技术来进行：酶联免疫分析(ELISA 或 EIA)，双配体结合(夹心技术)，荧光测定，化学发光试验，免疫层析，放射免疫扩散或放射免疫分析(RIA)。
3. 权利要求1的方法，其中步骤b)通过ELISA 或化学发光试验来进行。
4. 权利要求1-3之一的方法，其利用念珠菌所表达的抗原。
5. 权利要求4的方法，其中所述抗原是胞质抗原。
6. 权利要求4或5的方法，其中所述抗原被固定在惰性表面，包埋在胶体中，或偶联至为所述抗原提供颜色、荧光或放射活性的分子。
7. 权利要求1-6之一的方法，其中所述生物学样品选自：骨髓，血浆，脊髓液，淋巴液，来自呼吸道、肠道、或泌尿生殖道的皮肤的外切片，泪，唾液，乳汁，血液；全血和血清，血细胞，肿瘤或器官。
8. 权利要求7的方法，其中所述生物学样品是血清。
9. 一种评估念珠菌感染的预后的方法，包括测定生物学样品中抗念珠菌胞质抗原的抗体水平的步骤。
10. 一种检测念珠菌抗体的存在或不存在的方法，包括以下步骤：
 - a) 将可能包含念珠菌抗体的生物学样品与分离的胞质念珠菌抗原接触；和
 - b) 检测所述抗体与抗原的反应。
11. 权利要求10的方法，还包括检测其它抗体与其它念珠菌抗原的反应的步骤。
12. 权利要求11的方法，其中所述其它抗体对抗细胞壁抗原或纯化的免疫显性抗原(烯醇化酶)。
13. 一种诊断念珠菌感染的方法，包括以下步骤：
 - a) 从受试者获取生物学样品，所述受试者是对念珠菌感染易感或疑似者，并

b) 测定该生物学样品中抗念珠菌胞质抗原的抗体的水平，以及测定抗细胞壁抗原和/或免疫显性抗原(烯醇化酶)的抗体的水平。

14. 一种用于检测生物学样品中念珠菌抗体的存在或不存在的试剂盒，包括：

- 5
- a) 生物学样品收集装置；
 - b) 念珠菌胞质抗原；和
 - c) 用于检测所述样品中所述抗体与抗原的反应的用具。

15. 权利要求 14 的试剂盒，还包括缓冲试剂和离子盐。

16. 一种制备胞质抗原的方法，包括利用氯仿抽提除去脂蛋白的步骤。

念珠菌的检测

5 技术领域

本发明涉及诊断念珠菌(*Candida*)感染的方法和用具。尤其是,本发明涉及诊断念珠菌感染的敏感而快速的方法。

背景技术

念珠菌是最常见的口腔或阴道真菌感染的致病因素。但在过去数十年中,念珠菌已经成为医院病人致命感染中最显著的病因。具有讽刺意味的是,这些“侵袭性”或“全身性”念珠菌感染的不断增加已经成为现代医学的一个发展方向。那些目前经历了重大损伤、手术、癌症和器官移植而存活下来的病人都对致命的念珠菌感染易感。在美国,念珠菌现在是医院血液感染的第4大原因。

15 全身性念珠菌感染的主要问题是缺乏确定的临床指征或症状。治疗主要依赖于怀疑而不是确切的诊断。即使目前已有抗真菌药物,如氟康唑(*fluconazole*),全身性念珠菌感染仍有很高的死亡率(30-70%)。这种高死亡率主要是由于感染的快速发作和快速致死所致。由于缺乏准确的诊断,这种感染常常被人忽视,等到发现时已经错过了有效治疗的时机。这使得
20 临床医师持这样一种观点,认为念珠菌感染通常只能通过尸检进行诊断。基于这种状况,急需一种能早期诊断念珠菌感染以制定合适的治疗方案,从而降低死亡率的快速诊断试验。

诊断念珠菌感染的主要困难是,念珠菌与机体为共生关系,仅从机体表面或开口处分离出念珠菌并不能诊断感染。从血液或深部组织培养念珠
25 菌仍然是诊断全身性念珠菌感染的主要方法。但是,培养出阳性结果需要数日,至此再开始针对该感染进行有效治疗已经太迟。而且,由于来自体表部位的污染,可能出现假阳性结果。最重要的是,在经尸检证实的全身性念珠菌病病例中血液培养最多有50%为阴性,因此没有诊断价值。

核磁共振(NMR)和同位素扫描已被用于检测组织和器官中的念珠菌感
30 染。但这些方法不能用于早期诊断。

最近证实,对念珠菌代谢物阿拉伯糖醇进行的分析可作为诊断工具。但由于阿拉伯糖醇由人体产生,进一步临床研究的价值有待确认。

5 聚合酶链式反应(PCR)已经用于诊断侵袭性念珠菌感染。但由于与上述相同的原因,即念珠菌是普遍存在的微生物,以及由于表面污染造成的假阳性很常见,PCR尚未能将其自身确立为诊断念珠菌的有效方法。

10 免疫分析是已确立的诊断多种类型传染病的方法。免疫分析具有以下优势:它们快速,且试验模式能标准化。可将免疫分析设计成检测念珠菌抗原,或宿主针对念珠菌抗原具有反应性的抗体。目前已有数种商品化免疫分析可用于检测血清或其它体液中的念珠菌抗原。但这些分析缺乏敏感性和/或特异性。

15 目前基于对免疫显性念珠菌抗原的检测开发出了多种免疫分析法。念珠菌甘露聚糖是具有较高免疫原性的细胞壁抗原。但由于念珠菌与机体为共生关系,大多数个体具有抗念珠菌甘露聚糖的抗体,因此这种抗原在全身性感染的诊断中的用途有限。本申请人现在惊讶地发现,比以前所用更有效区别念珠菌的方法是检测胞质抗原。这种诊断试验的优势在于,诊断该胞质抗原的抗体仅在应答实际感染时产生。申请人还阐明,将胞质抗原与其它抗原联合应用可以很好地预测念珠菌感染。

相应地,本发明克服或至少缓解了目前与诊断念珠菌感染有关的问题。

发明简述

20 本发明最主要一方面公开了一种简单快速诊断念珠菌感染的方法。这种诊断念珠菌感染的方法可用于筛选大量可能有感染的样品。

相应地,本发明一方面提供了一种诊断念珠菌感染的方法,包括以下步骤:

25 a) 从受试者获取生物学样品,该受试者对念珠菌感染易感或为疑似,并

b) 测定该生物学样品中抗念珠菌胞质抗原的抗体的水平。

30 抗体水平可用已知的免疫学技术进行测量,这些技术包括酶联免疫分析(ELISA或EIA),双配体结合法(夹心技术),荧光检测试验,化学发光试验,免疫层析,放射免疫扩散或放射免疫分析(RIA)。特别优选ELISA,免疫层析或化学发光法,因为它们快速、敏感、特异性高,而且很容易自动化以用于大规模。这些方法还能进行定量测定。

所述诊断方法利用了念珠菌所表达的抗原，尤其胞质抗原。在本发明诊断方法的一些实施方案中，可将本文所述从念珠菌分离出的抗原固定在惰性表面，包埋在胶体中，或者可以与赋予该抗原的颜色、荧光或放射活性的分子进行偶联。

5 本发明另一方面提供了评估念珠菌感染的预后的方法，包括测定生物学样品中抗念珠菌胞质抗原的抗体的水平。

本领域技术人员可以理解，本文公开的技术可用于任何类型的生物学样品。优选该生物学样品选自：骨髓，血浆，脊髓液，淋巴液，来自呼吸道、肠道、或泌尿生殖道的皮肤的外切片，泪，唾液，乳汁，血液；全血
10 和血清，血细胞，肿瘤或器官。最优选生物学样品是血清。

可用本发明的方法进行分析的生物学样品也可以通过拭子、分流术或类似方式获得。生物学样品可以直接分析，或者可在分析前进行处理，如浓度或 pH 调整。

本发明第三方面还提供了检测念珠菌抗体的存在或不存在的方法，包
15 括以下步骤：

a) 将可能包含念珠菌抗体的生物学样品与分离的胞质念珠菌抗原接触；和

b) 检测所述抗体与抗原的反应。

本发明另一优选实施方案中，诊断试验联合利用了其它念珠菌抗原与
20 胞质抗原。尤其利用了细胞壁抗原(包括甘露糖)和/或纯化的免疫显性抗原(烯醇化酶)。

相应地，本发明第四方面提供了一种诊断念珠菌感染的方法，包括以下步骤：

a) 从受试者获取生物学样品，该受试者对念珠菌感染易感或为疑似，
25 并

b) 测定该生物学样品中抗念珠菌胞质抗原的抗体的水平，以及测定抗细胞壁抗原和/或免疫显性抗原(烯醇化酶)的抗体的水平。

本发明的诊断试剂和诊断用具还可具体表现为诊断实验室所用的试剂盒，或者在中央收集中心经过适应和自动化后用于分析大量样品。

30 相应地，本发明第五方面提供了一种用于检测生物学样品中念珠菌抗体的存在或不存在的试剂盒，包括：

- a) 生物学样品收集装置;
- b) 胞质念珠菌抗原; 和
- c) 用于检测所述样品中所述抗体与抗原的反应的用具。

适当的缓冲试剂和离子盐也可包括在试剂盒中。

- 5 本发明第六方面提供了一种制备胞质抗原的方法，包括利用氯仿抽提除去脂蛋白的步骤。

附图说明

图 1 显示经考马斯兰染色的 SDS-PAGE，其中念珠菌胞质抗原组分的主要蛋白带在 55kDa, 35 - 45kDa 区，30kDa 和 20kDa。

- 10 图 2 显示为对应于烯醇化酶抗原预期大小的 48kDa 的单个考马斯兰带。

图 3 显示澄清的细胞壁抗原制剂经考马斯兰染色的凝胶。在 90kDa - 200kDa 有一个很宽的染色区。

图 4 显示在多份血清中筛选抗念珠菌胞质抗原制剂的结果。

- 15 图 5 显示抗念珠菌抗原-胞质，细胞壁和免疫显性抗原三者的抗体反应性，其利用阴性对照血清。

图 6 显示了抗念珠菌抗原-胞质，细胞壁和免疫显性抗原三者的抗体反应性，其利用浅表念珠菌病病人的血清。

图 7 显示抗念珠菌抗原-胞质，细胞壁和免疫显性抗原三者的抗体反应性，其利用全身性念珠菌病病人的血清。

- 20 图 8 显示在不同血液培养病人中本申请抗原检验值(95% CI)的误差条。

图 9 显示血液培养阳性和阴性病人中，用本申请抗原检验所测定的平均念珠菌抗体值(95% 置信区间)的误差图。

图 10 示侵袭性念珠菌病和健康对照中本申请抗原检验数据的误差条。

所用的缩写

EDTA	乙二胺四乙酸
EIA	酶免疫分析
ELISA	酶联免疫吸附试验
RIA	放射免疫分析
BSA	牛血清白蛋白
DMSO	二甲亚砜
β -Me	β -巯基乙醇

TMB 3,3', 5,5'-四甲基-联苯胺

优选实施方案详述

除非另外指明，本发明的实施利用本领域常规的分子生物学，细胞生物学和免疫分析技术。这些技术是本领域技术人员熟知的，在文献中有详细全面的解释。参见，例如，Harlow 和 Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual" (1988); Maniatis, Fritsch & Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1982); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1986); "Immobilised Cells 和 Enzymes" (IRL Press, 1986); B. Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning" (1984); Sambrook, et al., "Molecular Cloning: a Laboratory Manual" (1989) and Ausubel, F. et al., 1989-1999, "Current Protocols in Molecular Biology" (Green Publishing, New York).

在描述本发明时，按照下述定义使用以下术语。

本文中，“生物学样品”是指从个体分离出的组织或流体样品，包括但不限于，骨髓，血浆，血清，脊髓液，淋巴液，皮肤的外切片，呼吸道，肠道，或泌尿生殖道，泪液，唾液，乳汁，血液；全血和抗凝全血，血细胞，肿瘤或器官，还包括体内细胞培养组成成分样品，包括但不限于将细胞在细胞培养基中培养之后的培养基，推定被念珠菌感染的细胞，重组细胞，和细胞成分。

“人类组织”是指可能构成实体的人类细胞集合物。该术语还涵盖人类细胞，如血细胞或人类细胞系的悬浮液。

本文中，“包含”是指“包括但不限于”。

应清楚理解，尽管本文引用了多篇现有技术文献，但这样的引用并非承认所引用的任一篇文献成为澳大利亚或其它任何国家的本领域已知技术的一部分。

本领域技术人员应认同，本发明可以应用任何多种不同的免疫分析方法。例如，本文公开的念珠菌抗原可用于抗体捕获试验，抗原捕获试验(其中抗原/抗体复合物形成“特殊”类型的抗原)或双抗体夹心试验。

用于制备抗原的技术

本文中术语“念珠菌抗原”是指本文中用到的三种念珠菌抗原的任何一种，即细胞壁抗原(包括甘露糖)，总胞质抗原(无甘露糖)或纯化的免疫显性抗原(烯醇化酶)。术语“念珠菌抗原”的应用表示涉及或利用了所有三种

抗原。多种技术可用于制备念珠菌抗原，包括生物化学提取，柱层析，凝胶分级分离，基因克隆，差异沉淀，过滤，透析或离心；但是，优选的技术为本文所述。简短说，这些技术涉及对念珠菌细胞进行机械裂解、化学裂解、或酶裂解，然后通过离心、过滤和透析将不溶的细胞壁与可溶的胞质组分分离。对细胞壁组分进行化学处理，以便释放细胞壁抗原，然后进行离心和透析。对细胞的可溶性胞质提取物进行过滤和有机提取。通过 ConA 亲和层析分离甘露糖蛋白(mannoprotein)。通过阴离子和阳离子亲和层析从可溶性胞质提取物中纯化出免疫显性烯醇化酶抗原。本领域技术人员将赞同，其他技术，或者上述技术的修饰或改变可以在不背离本发明精神的前提下用于本发明。

用于制备和标记抗体的技术

本文公开的抗念珠菌抗原的抗血清可以在宿主动物，如兔或绵羊中产生。含有该抗体的血清组分可通过标准技术分离。该抗血清可用于本发明后文描述的多种实施方案中，或者可利用电泳、高速离心等方法进一步纯化该血清，从而获得更敏感且特异性更强的抗体。最后，可用本领域技术人员已知的杂交-骨髓瘤技术制备大量的高度特异性单克隆抗体。

本发明一些实施方案应用了抗念珠菌抗原的抗体，它被固定在纤维素、琼脂糖，Sephadex 或玻璃珠或其它类似的不干扰后续反应的惰性表面(如金属、塑料或陶瓷)。吸附，Br-CN 活化或其它本领域已知技术可用于固定抗体。

本发明的其它实施方案应用与以下分子偶联的抗念珠菌抗原的抗体：生色(强着色)分子，enzochromic(一种酶，通过添加试剂而产生颜色)分子，fluorochromic (荧光)分子或 luminogenic (发光)分子。

抗体与酶的偶联利用本领域已知技术进行(参见, Avrameas, S. and Uriel, J., in Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences, vol. 262, p. 2543, (1966) ; Nakane, P. K. and Pierce, G. B., in Journal of Histochemistry and Cytochemistry, vol. 14, p. 929, (1966) ; Nakane, P. K., in Methods in Enzymology, vol. 37, p. 133, (1975))。

可以使用的生色分子是 2,3-二硝基苯(DNB)盐，二硝基苯酚(DNP)和甲基橙和丁基橙。其它合适的生色试剂为本领域已知。可与抗体偶联的 Enzochromic 分子是借助相应试剂而产生颜色的酶。实例如与硝基苯磷酸

(NPP)反应而产生颜色的碱性磷酸酶(ALP),与葡萄糖反应而产生颜色的葡萄糖氧化酶,以及D-半乳糖吡喃糖苷。这些和其它实例都是本领域已知的。荧光试剂的实例如2,4-二硝基氟苯和“对碘苯磺酰化(pipsyl)”衍生物。发光分子可通过Branchini等(Biochem. Biophys. Res. Commun. 97, 334 [1980])所述方法与抗体偶联。术语“生色”在后文中包括“enzochromic”,“荧光的(fluorochromic)”和“发光的(luminogenic)”分子。

本发明的一些实施方案还应用了带有放射性元素标记的念珠菌抗体。 I^{125} 利用氯胺-T方法偶联是一个常见实例,也可以利用本领域已知的其它方法。

10 用于固定和标记抗原的技术

抗原分子可通过本领域已知的各种方法被固定在固体载体上,所述方法包括共价偶联,直接吸附,物理捕获以及吸附在被蛋白质包被的表面上。描述这些方法的文献可参见Silman, I. H.和Katchalski, E. in Annual Review of Biochemistry, Vol. 35, p. 873 (1966); Melrose, G. J. H., in Review of Pure and Applied Chemistry, Vol. 21, p. 83, (1971); and Cuatrecasas, P.和 Anfinsen, C. B., in Methods in Enzymology, Vol. 22, (1971)。

Lai等(German OS No. 2,539,657,美国专利4,066,512)公开了吸附至蛋白质包被表面的方法。在此方法中,首先将微孔膜的内表面和外表面用下述不溶于水的蛋白包被,如玉米蛋白,胶原蛋白,纤维蛋白原,角蛋白,谷蛋白,聚异亮氨酸,聚色氨酸,聚苯丙氨酸,聚酪氨酸,或亮氨酸与p-氨基苯丙氨酸的共聚物。如此包被使膜能给固定各种各样的生物活性蛋白,包括酶,抗原,和抗体。微孔结构是指其总体积的50%以上是25 nm - 25 μ m的孔,优选25 nm - 14 μ m的孔。在本文的大多数应用中使用25 nm - 5 μ m的孔径。未被包被的微孔膜有70 - 75%的体积为孔空间。这些孔允许液体流过膜。例如,被玉米蛋白包被以后,孔空间减少5 - 10%,结果该结构中仍有较高比例的体积为孔空间,允许液体流过这些孔。这种结构有很大的表面积与容纳在这些孔中的任何溶液相接触。

如此包被的、具有固相抗原或抗体的膜为固相抗原或抗体提供了一种简便且易于操作的载体。其整体结构允许通过简单的机械手段将结合成分从未结合成分中取出。

非特异性结合可通过插入第二阶段的固定步骤来最小化，在所述第二阶段的固定步骤中，一种免疫化学中性蛋白被固定在滤膜上。固定化作用因此在本发明优选实施方案的两个阶段中发生：第一阶段是，将所需免疫化学成分固定，第二阶段接续第一阶段，是将免疫化学中性蛋白如胎牛血清或牛 γ 球蛋白随后固定。术语免疫化学中性是指试验中的特异性成分。任何蛋白，只要不与试验中的成分或其中一种试剂发生免疫化学组合，就可视为免疫化学中性，即使这种蛋白在另一种系统中为免疫化学反应性也是如此。

当所检测的物质是抗体时，偶联物的免疫化学反应性组分必须是能与待测抗体进行免疫化学结合的抗体。这样的抗体可通过用该抗体，或者用产生待测抗体的动物的血清中免疫球蛋白组分免疫动物来获得。例如，当待测抗体是人的抗体时，可从用人免疫球蛋白(抗体)免疫的山羊的血清中获得抗人抗体的山羊抗体。酶组分可以是能催化用本领域技术人员已知的任何方法可以检测的反应、且在与抗体偶联后仍保留其活性的任何酶。优选辣根过氧化物酶，因为它便于和适于广泛多种应用。众所周知，该酶在过氧化氢存在的条件下催化多种有机化合物氧化。很多这样的有机底物是生色的，即通过氧化发生颜色改变。

本发明发现，形成偶联物时所用的酶制剂的纯度对非特异性结合的程度有影响。酶制剂的纯度越高，非特异性结合越少。造成该减少的部分原因是，酶的比活性增加，使所需的偶联蛋白的总量减少。如此一来，非特异性结合的机会也就减小了。在优选实施方案中发现，高纯度过氧化物酶制剂的应用，使对照样品与已知阳性物质相比，颜色反应的量显著减少。

用于念珠菌抗体检测的技术

抗体捕获技术

经本文公开的技术所制备的念珠菌抗原被固定，优选被固定在惰性表面，如 PVC，纸或类似的吸水表面上。然后使所固定的念珠菌抗原与怀疑含有念珠菌抗体的样品接触。在水性样品如血液或尿液的情况下，对溶液进行缓冲处理，使离子盐处在便于念珠菌抗体-念珠菌抗原相互作用的最佳浓度。例如，TRIS 或硼酸盐缓冲的磷酸盐(pH 7.5-9.0)和离子强度约 0.010-0.5 是合适的缓冲剂和离子盐。然后使其上附有念珠菌抗原或念珠菌抗原-念珠菌抗体复合物的惰性表面与偶联有发色分子的抗念珠菌抗原之抗体接触。

5 优选念珠菌抗原在缓冲至约 pH 7.5-9.0 且离子强度相当于约 0.01M-0.1M NaCl 的溶液中。用水或者用适当的表面活性剂如 Tween 20 小心清洗以除去过量的着色抗体，然后直接观察或加入显色剂以后观察惰性表面的颜色，荧光或发光。惰性表面上的颜色指示所固定的念珠菌抗原与溶液中念珠菌抗体复合物的相互作用。可进行对照实验以比较颜色。

通过应用带有放射性元素标记的念珠菌抗原，观察溶液中活性的损耗或者固体支持物上吸收的放射活性，可以使该技术适于临床应用。该实施方案灵敏度很高，快速，适于大量样品的分析。

酶联免疫吸附试验-ELISA

10 使含有念珠菌抗体的溶液与固定化念珠菌抗原接触并发生反应，其中的念珠菌抗体与酶偶联，此酶与显色试剂在适于念珠菌抗原和念珠菌抗体反应的缓冲环境和离子盐条件下能形成颜色，所述的固定化念珠菌抗原则优选固定在惰性表面，如 PVC，纸条或玻璃珠表面。Enzochromic 偶联的念珠菌抗体的量足以饱和固定化抗体表面约 50% 的反应位点。使带有抗体-念珠菌抗原酶复合物的惰性表面与经缓冲的、疑有念珠菌的样品接触，所述样品具有未知量的念珠菌抗体。加入显色试剂后，观察纸条上所形成的固定化抗体-念珠菌抗原-酶复合物的颜色，与未经含有念珠菌抗体的样品处理的对照纸条进行比较。经样品处理的惰性表面上颜色的淡化表示该未知样品中存在念珠菌抗体。

20 通过使样品与固定化酶接触，优选在可以离心的试管中接触，并通过分光光度法观察显色反应，可以使这种方法适于临床应用。该实施方案非常敏感且快速。

放射免疫扩散-沉淀反应

25 将念珠菌抗原之一悬浮在软化的凝胶状介质如琼脂或琼脂糖中，介质中还有缓冲剂和盐，pH 介于约 6.0-9.0 之间，离子强度约 0.01M-0.5M，为抗原-抗体相互作用所需的最佳条件。美国专利 4,259,207 所述的悬浮介质是一个合适的实例。将混合物铺展在检测板上使之变硬，或者，优选将混合物倾入盘状容器如 Octolony 板中。将少量样品置于固化凝胶上，优选置于中央孔中，将平板或盘静置，优选静置数小时。这期间，样品可扩散至周围区域。如果存在念珠菌抗体，它与包埋的念珠菌抗原反应，导致在加样点周围形成放射状不透明区域。可设置对照以便进行比较。必要时，标

30

本中念珠菌抗体的量可通过控制温度、时间以及样品大小，并将放射区域的大小与一已知浓度进行比较来度量。

放射免疫分析

本发明的念珠菌抗原可以被固定在惰性表面如分离柱中的玻璃珠上。

- 5 使一定比例的念珠菌抗原与放射性元素(优选 I^{125})偶联，并以一定量与固定化念珠菌抗原发生反应，所述一定量足以饱和 50% 的结合位点。使固定化念珠菌抗原-酶复合物与怀疑含有念珠菌抗体的样品接触，该样品已缓冲在 pH 6-9，其总离子盐约为 0.05-0.5M，这是形成念珠菌抗原-抗体复合物所需的最佳反应条件。将念珠菌抗体从所述抗原上洗脱，测定洗脱物的放射活
10 性。与对照相比活性有损失表示样品中有念珠菌抗体。

血凝反应

念珠菌抗体可通过标准的血凝反应技术进行分析，其中使用与抗体对应的念珠菌抗原作为致敏剂。

- 应理解，上文所述利用显色试剂分析念珠菌抗体的方法主要应用于缺
15 乏训练有素的人员或精密的仪器的场合。但是，用放射性元素代替生色的偶联分子，可以使这些方法适用于需要分析大量样品的临床应用。

还应理解，术语“颜色”并非仅指可见电磁波这样的窄范围，而是包括能够用标准的分光光度仪(如分光光度计)、以及吸收和发射比色仪在紫外光(uv)和红外光(ir)范围内进行检测的波长范围。

- 20 尽管本发明的方法是应用于生物流体自身，但在检测前，将流体进行培养(优选检测前在念珠菌选择性培养基上进行培养)，可以改进所述方法的敏感性和特异性。

- 还可以用裂解剂如等渗溶液、声波、或溶菌酶对生物样品进行预处理，导致念珠菌抗体被释放至细胞外环境中，以此提高敏感性。例如，美国专
25 利 4,166,765 公开了对含有细菌的生物样品进行裂解的适当方法。任何不干扰后续酶活性的裂解剂都可以采用。

具体表现为试剂盒形式的试验

本发明的诊断方法和用具可以具体表现为由个人使用、在其家中自我诊断念珠菌的试剂盒的形式。

- 30 所述试剂盒包含采样用具，对应于念珠菌抗体的念珠菌抗原，以及检测样品与念珠菌抗原之间的反应的用具。

在适于临床应用的实施方案中，基于产物与反应物的大小差异和电荷分布差异的电泳分离技术(如等电聚焦或区带电泳)也可以用于将产物与反应物分离。通过电泳分离出的产物，可以通过相对于标准品的特征性位置而检测，或者通过颜色或免疫化学特征来鉴定。表面带有电荷的树脂珠也可以用来分离产物和反应物。

在本发明一个优选实施方案的免疫分析中，用于检测反应的用具是一种凝胶状介质，其中悬浮着与抗体对应的念珠菌抗原。这种凝胶状介质装在透明的玻璃或塑料容器中，它包含形成念珠菌抗原-抗体复合物所需的最佳缓冲环境和离子盐。当从加样点中心呈放射状产生透明区时，表示发生了反应。

在本发明另一优选方案的免疫分析中，用于检测反应的用具是与念珠菌抗体对应的念珠菌抗原，它与一种生色团偶联，装在密封的无菌包装中，该包装中还有缓冲剂和离子盐。进行分析时，包装袋中的内容物用试剂盒中配备的带有刻度的试管加水稀释。该实施方案中还包括固定在惰性表面上的与念珠菌抗体对应的抗原。进行分析时，使固定了念珠菌抗原的惰性表面与样品接触，然后与偶联生色团的念珠菌抗-IgA 抗体、蛋白 A 或蛋白 G 的溶液接触。观察惰性表面的颜色，其能指示念珠菌。

在一个特别优选的实施方案中，本发明的试剂盒采用免疫层析检验条的形式。有多个专利涉及对开发和制备免疫层析检验条具有重要价值的技术，形式，试剂和材料。例如，美国专利 5,075,078，国际专利申请 W095/16207，美国专利 5,654,162 和欧洲专利 0810436A1。用这些专利中公开的装置进行的分析方法基本相同。将特异于分析物(通常为一种抗体[Ab]，但并非必然)的配体固定在膜(如硝酸纤维素)上。使检测试剂(通常为偶联至乳胶或胶状金属上的抗体)沉积(但保持未结合的状态)在偶联垫中。将样品(尿，血浆，全血，等)加入样品垫，它快速浸湿至偶联垫，使检测试剂被溶解。检测试剂开始随着膜条前沿的样品流一起移动。样品中的分析物被偶联在检测试剂上的抗体束缚。当样品流经固定了捕获试剂的区带时，分析物检测试剂复合物被捕获。所显示的颜色与样品中分析物的量成比例。

在本例中，可以在上述原则保持不变的情况下，用免疫层析检验条装置来检测抗体，而不是检测分析物本身。在这类情况中，固定在膜、样品垫、试剂垫或其它有孔介质上的是本文公开的抗原，而不是抗体。关于开

发这类装置，包括使抗原/抗体与硝酸纤维素等结合的方法以及检测这类结合物质的方法，已有大量文献。参见，例如 Towbin et al. 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350, 其全文引入本文作参考。

5 本发明参考这里的优选实施方案进行了描述，但应该理解，在不背离本发明精神的前提下可以进行各种修改。而且，以下实施例仅为举例说明，不应理解为以任何方式限制本发明。本文引用的所有专利和文献都是具体引入作参考。

实施例 1 制备念珠菌抗原

制备以下三种念珠菌抗原：

- 10
- 1) 细胞壁抗原(包括甘露糖);
 - 2) 总胞质抗原(甘露糖已损耗); 和
 - 3) 纯化的免疫显性抗原(烯醇化酶)。

从阴道真菌病患者得到一株白色念珠菌(*Candida albicans*)临床分离株。用 API 20C Auxonagram strip (API System S. A., France)证实该种念珠菌的身
15 份。将此白色念珠菌分离物命名为 KEMH5。

在 200ml YEPD 培养基(1% 酵母提取物, 2% 蛋白胨, 2% D-葡萄糖)中接种该分离物作为起始培养物, 30°C 通气培养 24h。然后用起始培养物接种已在类似条件下在 23L Bio-Flo Fermenter IV System (New Brunswick Scientific, Edison, NJ)中保温的 10L YEPD 培养基。

20 念珠菌培养物从 BioFlo 发酵系统中收获, 并利用 Pellicon filtration cassette (Millipore, USA)与培养基分离。浓缩的细胞通过在 500ml 离心瓶中于 1,660 x g 和 4°C 离心 15min 而与残余的培养基分离。弃去上清, 将沉淀的细胞重悬于蛋白提取缓冲液(20mM bis-Tris, pH 6.5)中。然后将酵母细胞如上述离心, 重悬并汇总以备进一步处理。

25 用 Dynamillo (WAB, Switzerland)将念珠菌细胞机械破碎。持续研磨直至 99% 的细胞破碎。收集可溶性念珠菌细胞提取物, 分散在 50ml 离心管中。提取物在 8,517 x g 和 4°C 离心 12h, 以使不溶性细胞壁沉淀。回收含有可溶性胞质抗原组分
30 的上清, 使之通过 0.45µm 的滤膜。

然后用等体积的冷氯仿抽提过滤物。4°C 以 1,036 x g 离心 15min 后, 吸
30 出上层水相, 转移至透析管。将可溶性胞质蛋白组分在柱结合缓冲液(20mM

Tris/HCl, pH 7.4, 0.5M NaCl, 1mM MnCl₂·4H₂O, 1mM CaCl₂)中透析 12 小时以备层析。

可溶性胞质抗原组分经 Con A-Sepharose 层析耗尽了污染的可溶性细胞壁甘露糖蛋白。将透析过的胞质抗原组分滤过 0.45μm 滤膜。取 50ml 透析
5 提取物以 4ml/min 的流速加载至已在结合缓冲液中平衡的 Con A-Sepharose 柱(2.6 x 12.5 cm)。收集未结合的直通(flow-through)组分(非-糖基化蛋白)。结合的甘露糖蛋白用结合缓冲液中的 0.5M α-甲基甘露糖苷进行洗脱。此步骤在进行下一轮之前进行, 它可以使层析柱在保存前得到清洁。

将可溶性胞质抗原组分用 20mM Tris·Cl, pH7.4 透析过夜。用 Bio-Rad®
10 (Bradford)显微分析方法按照厂家说明书评测溶液中蛋白的量。一部分胞质抗原提取物用 SDS-PAGE 进行分析。

如图 1 所示, 观察到数条主蛋白带, 大小从约 20kDa 至约 60kDa 不等。主要的染色带为 55kDa, 还有 4 条带在 35 - 45kDa 的区域, 30kDa 和 20kDa。与此截然相反的是, 未经有机提取和 Con A-Sepharose 层析的最初粗制裂解
15 物经考马斯兰染色出现大量的染色带。

对烯醇化酶抗原的纯化按照与可溶性念珠菌胞质抗原相同的方式进行, 不同的是它不进行 Con A-Sepharose 层析。而是在透析并滤过 0.20μm 注射器滤膜(醋酸纤维素)后, 将滤过的提取物装载至已经填充了 Pharmacia Biotech Source 15Q 季铵阴离子交换剂的 Pharmacia Biotech XK 50/20 层析柱
20 (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden)中。在层析之前, 该层析柱用柱结合缓冲液'A'(20mM bis-Tris, pH 6.5)平衡。对粗制提取物进行的阴离子交换层析用 Bio-Rad Econo system (Bio-Rad Laboratories, USA)进行控制和记录。结合的蛋白用缓冲液'B' (缓冲液'A'中 1M NaCl, pH 6.5)的盐梯度从该层析柱中洗脱。所回收的分级分离的蛋白通过酶活性试验进行分析。

25 活性烯醇化酶将 D(+)-2-磷酸甘油酸(PGA)水解为磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)。PEP 的生成可通过测定 240nm 的分光光度值来监控。将 20μl 蛋白溶液与 1ml 烯醇化酶底物溶液(50mM Tris-HCl pH 7.4, 2.7mM 乙酸镁, 1.0mM EDTA, 1.2mM D(+)-2-磷酸甘油酸)在石英杯中混合, 以 1 min 的间隔记录吸光值的变化。比活性被定义为: 每分钟每 mg 蛋白将 1μmol PGA 转化为 PEP
30 的量。用 Bio-Rad® (Bradford)显微分析方法评测溶液中蛋白的量。

选出具有烯醇化酶活性的洗脱组分, 在 25℃对 hpH_2O 透析 12h。回收经过透析的组分并使之滤过 0.20 μm 注射器滤膜。滤过物通过真空蒸发 5 小时而浓缩十倍。浓缩的样品用结合缓冲液 'A' (10mM 乙酸钠, pH 4.7) 透析, 紧接着加载至装填有甲基磺酸酯阳离子交换剂的 Pharmacia Biotech Mono S 5 HR10/10 层析柱(Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden)。用 Bio-Rade Biologic system 进行阳离子交换层析。结合的蛋白用缓冲液 'B' (缓冲液 'A' 中 1M NaCl, pH 4.7) 的盐梯度从该层析柱中洗脱。具有烯醇化酶活性的组分利用上述酶活性试验进行鉴定。

图 2 显示了对应于烯醇化酶抗原预期大小的 48kDa 的单个考马斯兰带。
10 通过烯醇化酶试验鉴定证实该 48kDa 抗原是糖酵解酶烯醇化酶。

对细胞壁抗原的纯化如下进行: 如上述离心后, 收集沉淀的不溶性细胞壁。将细胞壁用 hpH_2O 洗涤, 然后经 6,000 rpm 离心收集。将该步骤重复三次, 或者直至上清不再混浊。这确保将任何残余的可溶性胞质抗原从细胞壁制剂中除去。经洗涤的细胞壁沉淀然后重悬于含 1% v/v $\beta\text{-Me}$ 的 10mM 15 磷酸缓冲液 pH7.4 中, 在摇床上 37℃保温 30 分钟以便使细胞壁抗原溶解。然后将样品于 8,000 rpm 离心 5min, 弃去沉淀。将上清转移至干净试管中, 再离心(5min, 8,000 rpm)。含有溶解的细胞壁抗原的上清然后在 hpH_2O 中 4℃透析 48h (换水 4 次), 或直至不再闻到气味。透析后, 将样品以 8,000 rpm 离心 5min, 共离心三次, 以便除去任何残余的特殊物质。

20 澄清后的细胞壁抗原制剂用 SDS-PAGE 进行分析。所得经考马斯兰染色的凝胶如图 3 所示。在 90 kDa - 200 kDa 观察到成片染色宽条带。缺乏分离的蛋白条带是甘露糖蛋白的典型特征, 因为不同数目的甘露糖基团附加在蛋白骨架上导致了分子量的多样化。

实施例 2 酶联免疫吸附试验(ELISAS)

25 收集 1998 - 2000 的各种念珠菌感染病人的血清。阴性对照(对照)血清 (n=20)来自 Red Cross Blood Bank, Perth, Australia 的 19 - 25 岁年龄组的健康男性。复发外阴阴道念珠菌病(WC)的病人的血清(n=13)来自 King Edward Memorial Hospital, Perth, Australia。口腔念珠菌病病人的血清(n=108)来支 Clinipath Ltd 和 UWA Dental School, Perth, Australia。全身性念珠菌病病人 30 (n=28)的血清(n=39)来自 Princess Margaret Hospital, Perth, Australia 和 Prince of Wales Hospital, Sydney, Australia。

对口腔和阴道念珠菌感染病人，通过体检以及通过培养来自相关机体部位的念珠菌来证实感染。对全身性感染病人，通过阳性血液培养或活组织检查来证实感染。在所有病例中，病人的免疫状态是未知的。

来自浅表念珠菌病或全身性念珠菌病病人的血清用包被念珠菌胞质抗原的盘经 ELISA 进行筛选。每种抗原制剂的蛋白含量用商品化试验(BioRad)以 BSA 为标准品进行测定。进行了一系列 ELISA 来确定对每种抗原而言的最佳包被浓度(数据未显示)。所述最佳包被浓度是能最明显区别阳性和阴性对照血清的浓度。每种抗原的最佳包被浓度经测定为 2 μ g/ml。

将一个 96 孔 C8 条微滴板(Greiner GmbH, Germany)用如实施例 1 所述制备的念珠菌细胞壁抗原，胞质抗原，或纯化的烯醇化酶抗原来包被。将 2.0 μ g/ml 的抗原溶液取 50 μ l 用包被缓冲液(0.1M NaHCO₃, pH 9.3)稀释，并加入各个孔中。微滴板于 4 $^{\circ}$ C 保温 12h，然后平衡至室温。然后移出包被液，将微滴板拍干。将板倒扣在纸巾上以便排水。另一种方法是将过量的包被液用自动洗板仪(Dynatech Laboratories, Chantilly VA, USA)吸出。重要的是不要在该阶段洗板。

每孔加 300 μ l 封闭液(PBS pH 7.3, 2% (w/v) BSA (ICN, Australia), 0.01% (w/v) Tween 20)，25 $^{\circ}$ C 保温 90min。移出封闭液，将板拍干。将板倒扣在纸巾上以便排水，再次拍干。在该阶段，微滴板既可以马上使用，也可以干燥后保存。需要干燥的微滴板被倒置在可密封的容器(如装食品的塑料容器)中，与数个装有硅胶干燥剂的小袋一起放置 48 小时。装入大约 20 个干燥剂小袋就足以干燥 6 个包被的 ELISA 微孔盘。将已经干燥的板与一个干燥剂小袋密封在经加热封口的包裹中并带上标签。将板贮存于 4 $^{\circ}$ C 备用。装有板的包裹在开封前平衡至室温。

人类检验血清用封闭溶液稀释为 1/100，按照 50 μ l 等份试样分配至多个孔中，37 $^{\circ}$ C 保温 30min。将第一抗体溶液吸出，孔用 PBS-Tween 20 洗 6 次。将微滴板倒置在纸巾上，排水 10min。然后将板拍干。

将已经在封闭溶液中稀释至 1/10,000 的 100 μ l 辣根过氧化物酶抗-人 IgG 偶联物分配至每个孔中。将第二抗体溶液 37 $^{\circ}$ C 保温 30min。然后将第二抗体溶液吸出，孔用 PBS-Tween 20 洗 6 次。将微滴板倒置在纸巾上排水 10min，然后将板拍干。将微滴板再次倒置在纸巾上，排水 5min。然后将板拍干。需要特别小心，以确保除去任何残余的第二级偶联物，因为业已证

实，残余的偶联物是引起结果波动的主要因素(Dynatech Laboratories Inc, USA)。

5 每孔加 100 μ l TMB 液体底物溶液，25 $^{\circ}$ C 显色 10min。加入 100 μ l 1M 磷酸或 1M H₂SO₄ 来终止反应。用 MRX 自动读板仪测定每孔在 450nm 的吸光值，以 620nm 为参考。

10 每一免疫分析进行平行三份，采用吸光值的均值。吸光值在图 4 中为散点图。分析了三组被念珠菌感染的病人。第一组为全身性念珠菌病病人(Systemics)，第二组为口腔念珠菌病病人(Oral)，第三组为外阴阴道念珠菌病人(VVC)。血库血清(对照)来自 19-25 岁年龄组的、罹患无法测出或亚临床的念珠菌感染的危险较低的男性，用这样的血清作为对照。吸光值(OD₄₅₀ = 0.22)的界限是阴性对照血清的均值。根据这些数据，胞质抗原 ELISA 的灵敏度为 89%，特异性为 95%。这高于有关其它针对念珠菌的血清学检验的报道值(Zoller et al., 1991. J. Clin. Micro. 29: 1860-1867)。

15 为了提高念珠菌 ELISA 的灵敏度，采用了多重抗原。它们是细胞壁，胞质和天然烯醇化酶(如上所述)。

20 多重抗原的应用提高了念珠菌 ELISA 的灵敏度。它还能更好地区分浅表感染和全身性感染。在 ELISA 中采用了 6 种阴性对照血清(从 19-25 岁年龄组的男性获得的血清)，以及分别包被了三种念珠菌抗原的微滴盘孔。每种血清中抗三种抗原之一的抗体滴度都低于临界线(图 5)。这条线是根据对照病人血清的平均抗体滴度与念珠菌病病人血清的平均抗体滴度的比较而指定的临界线。图中 Y 轴上的值是吸光度界限除以受检血清吸光度的比例。

25 然后，6 例浅表念珠菌病病人的血清在该 ELISA 中进行反应。同样将每份血清的吸光值除以界限的吸光值(图 6)。浅表念珠菌病病人血清的特征性抗体应答是抗细胞壁抗原制剂的高滴度(临界值的 1.5-2 倍)。抗完整胞质抗原制剂的抗体反应性在大多数病例中为阳性(临界值的 1-1.5 倍)。相反，抗烯醇化酶抗原的抗体滴度低于或等于临界滴度。抗内部念珠菌抗原(胞质和烯醇化酶)的抗体的滴度与浅表感染的严重程度之间具有相关性(数据未显示)。但所分析的 6 例病人的感染严重程度是未知的。

30 取自全身性念珠菌病(经血清培养阳性证实)病人的 6 份血清用 ELISA 进行分析。结果见图 7。在全身性念珠菌病病人的情况中，针对细胞壁抗原

制剂的抗体应答为阳性(临界值的 1.5-2 倍)。抗内部念珠菌抗原(胞质和烯醇化酶)的抗体滴度也是阳性(临界值的 1.5-2.5 倍)。

结论

5 本文所述念珠菌甘露聚糖已经耗尽的胞质抗原制剂可用于鉴定有念珠菌感染的病人。用包被该抗原的微滴盘进行 ELISA 的灵敏度和特异性大于其它念珠菌诊断试验的灵敏度和特异性。而且, 本文所述的 ELISA 分析形式与现有其它念珠菌诊断试验所采用的形式相比, 更易于操作, 更有效 (robust)且更快速。该 ELISA 形式还具有能够定量的优点。这使得能在一个时间段内监控病人, 并记录抗念珠菌抗原的抗体滴度应答的变化。该试验
10 长时间监控针对念珠菌抗原的抗体滴度的能力, 在测定病人针对抗真菌药物的应答以及在病人总体存活前景方面具有预后价值。胞质抗原制剂的另一优点是, 为制备该抗原所开发的方法比现有其它方法(例如, 与 Zoller et al., 1991, 上文所述方法相比)更简单更快速。

实施例 3 法国临床评估

15 对实施例 1 和 2 所述三重抗原检验试剂盒的临床评估在法国 University of Grenoble Faculty of Medicine, Grenoble 的寄生虫学和医学微生物学系 (Department of Parasitology 和 Medical Mycology), 用保存的血清进行。

分析了两组病人的血清: 一组为血培养阳性, 另一组为血培养阴性。如果可能, 在检验阳性血培养之前, 当时和之后第一天采血。将血培养阴性组进一步分为三个亚组: 有念珠菌定居且血清学阳性的病人, 有念珠菌
20 定居但血清学阴性的病人, 以及没有念珠菌定居且血清学阴性的病人。血清来自 1998 - 2000 年住院的病人。

三重抗原 ELISA 检验(“本申请的抗原检验”)按照实施例 2 所述进行。作为界值标准的血清通过将无念珠菌感染史的 19 - 25 岁年龄组男性的血清
25 汇总而获得。

表 1 显示本申请的抗原检验在 19 例阳性血培养病人中有 15 例为阳性。

表 1

法国研究中所用的本申请三重抗原检验

病人组	病人 ID	血清 ID	念珠菌种	相对于首次阳性培养之日的血清天数	本申请三重 Ag Ab	本申请三重 AgAb/临界 (0.46) 比	本申请三重 Ag 分值 (0.46 临界值)	血清学免疫荧光 IFI	IEP Pasteur	IEP FSK	Ag emic
念球菌血症	AMI	C1	C.g	-4	1.597	3.5	+++	+++			
	AMI	C2		+3	1.519	3.3	+++	++	+++	+++	
	BRIG	C3	C.a	-2	0.385	0.8	-	-			
	BRIG	C4		+10	0.325	0.7	-	-			
	COE	C5	C.t	-13	0.406	0.9	-	-			
	COE	C6		+1	0.734	1.6	+	+++			
	COE	C7		+29	0.632	1.4	+	-			
	COH	C8	C.g	-14	0.597	1.3	+	-			
	COH	C9		+9	0.661	1.4	+	-			
	COH	C10		+65	0.391	0.9	-	-			
	COM	C11	C.g	+1	1.806	3.9	+++	+	+++	++	
	COM	C12		+19	1.862	4.0	+++	++	++	+++	
	CON	C13	C.g	-27	0.732	1.6	+	-			+
	CON	C14		+1	0.5	1.1	(+)	-			++
	CON	C15		+8	0.367	0.8	-	-			++
	DA SI	C17	C.a	+2	1.805	3.9	+++	+	++++	++	
	DA SI	C18		+70	1.277	2.8	++	++	++	(+)	
	FER	C19	C.a	-35	0.693	1.5	+	-			
	FER	C20		+2	0.368	0.8	-	-			
	FER	C21		+16	0.229	0.5	-	-			
	FON	C22	C.a	-46	0.51	1.1	(+)	-			
	FON	C23		+3	1.899	4.1	+++	+++			
	FON	C24		+27	1.854	4.0	+++	+++			
	HAM	C25	C.a	+1	1.083	2.4	++	+	+	+	
	HAM	C26		+31	1.168	2.5	++	+	++	(+)	
	HEN	C27	C.t	+2	0.324	0.7	-	-			
	HEN	C28		+7	0.646	1.4	+	-			
	HEN	C29		+40	0.432	0.9	-	-			
	KHA	C30	C.a	-13	0.332	0.7	-	-			
	KHA	C31		+2	1.553	3.4	+++	+			
	KHA	C32		+27	1.393	3.0	+++	+			
	LON	C33	C.a	-2	0.341	0.7	-	-			
	LON	C34		+6	0.447	1.0	(+)	-			
	LON	C35		+61	0.35	0.8	-	-			
	MAN	C36	C.a	-28	0.505	1.1	(+)	-			
	MAN	C37		+5	0.288	0.6	-	-			
	MAN	C38		+72	0.199	0.4	-	-			
	NI	C39	C.t & C.k	+3	0.223	0.5	-	-			
	NI	C40		+9	0.368	0.8	-	++	+	+	

病人组	病人 ID	血清 ID	念珠菌种	相对于首次阳性培养之日的血清天数	本申请三重 Ag Ab	本申请三重 AgAb/临界 (0.46) 比	本申请三重 Ag分值 (0.46 临界值)	血清学免疫荧光 IFI	IEP Pasteur	IEP FSK	Ag-emie
	PAS	C41	C.a	+5	0.865	1.9	+	+	++	+	
	PASe	C42		+32	1.279	2.8	++	+	++	++	+
	PIL	C43	C.p	-2	0.495	1.1	(+)	-			
	PIL	C44		+51	0.831	1.8	+	+			
	RAM	C45	C.t	+5	1.414	3.1	+++	++			
	RAM	C46		+23	1.114	2.4	++	+			
	NOI	C47	?	0	0.611	1.3	+	+++			
有菌群定居但念珠菌血清学为阴性的住院病人	ABE	D21	无资料	无资料	0.748	1.6	+	+			
	FRE	D22	无资料	无资料	0.454	1.0	-	-			
	BEN	D23	C.a	尿	0.331	0.7	-	-			
	BER	D24	C.t	mouth/facal/broncal/	0.463	1.0	-	-			
	BOM	D25	C.a	fae	1.046	2.3	++	++			
	CAP	D26	无资料	无资料	0.658	1.4	+	-			
	CAR	D27	C.a	气管	0.933	2.0	++	+			
	CHE	D28	C.t	尿	1.376	3.0	+++	-			
	FER	D29	C.a	尿/粪便	0.363	0.8	-	-			
	GIN	D30	C.g	尿/粪便	0.663	1.4	+	-			
	PER	D31	C.a	胸导管	0.378	0.8	-	-			
	没有菌群定居但念珠菌血清学为阴性的住院病人	BEN	D32	C. spp	尿	0.469	1.0	-	-		
BON		D33	-		0.44	1.0	-	-			
CIA		D34	C.a	尿	0.92	2.0	++	++			
DAVID											
CAR		D35	-		0.651	1.4	+	-			
PEL		D36	-		0.752	1.6	+	-			
DI M		D37	-		0.489	1.1	(+)	-			
FEU		D38	-		0.633	1.4	+	-			
FOG		D39	C.a	胸导管	1.095	2.4	++	+			
MOR		D40			0.38	0.8	-	-			
GO	D41			0.677	1.5	+	-				

病人组	病人 ID	血清 ID	念珠菌种	相对于首次阳性培养之日的血清天数	本申请三重 Ag Ab	本申请三重 AgAb/临界 (0.46) 比	本申请三重 Ag 分值 (0.46 临界值)	血清学免疫荧光 IFI	IEP Pasteur	IEP FSK	Ag-emie
有菌群定居但念珠菌血清学为阳性的住院病人	ALL	D42	C. spp	尿	1.177	2.6	++	+			
	BAR	D43	C.g, C.a, C.t	septic shock urine/mo	1.375	3.0	+++	+++			
	BOE	D44	C.g	uth	1.096	2.4	++	++			
	BUI	D45	无资料	无资料	1.125	2.4	++	++			
	COL	D46	无资料	无资料	1.062	2.3	++	+++			
	DAG	D47	无资料	无资料	0.705	1.5	+	-			
	BE	D48	C.a & C.t	mouth/trachea	1.123	2.4	++	+++			
	GEN	D49	无资料	无资料	1.426	3.1	+++	++++			
	GEN	D50	无资料	无资料	1.489	3.2	+++	++++			
	LEC	D51	无资料	无资料	1.668	3.6	+++	++++			
	LECr	D52	无资料	无资料	1.62	3.5	+++	++++			

说明:

念珠菌培养种

	本申请 Ab	IFI	IEP Pasteur	IEP FSK	Ag-emie
C.a = 白色念珠菌	<10 = -	<20 = -	1 arc = +	1 arc = +	1/2 dil = + 1/4 dil =
C.g = C. glabrata	10-20 = +	20 = +	2 arc = ++	2 arc = ++	++
C.k = 乳酒念珠菌	20-30 = ++	40 = ++	3 arc = +++	3 arc = +++	
C.p = 近平滑念珠菌	30-40 = +++	80 = +++	4 arc = ++++	4 arc =	
C.t = 热带念珠菌		160 = ++++		++++	
		320 = +++++			

在 12 例子首次血培养阳性日之前或当日采血的病人中，8 例有阳性(或低阳性)结果。当与法国小组所采用的其它血清学检验相比时，19 例病人经免疫荧光(IFI)血清学检验测定有 12 例为阳性。他们用本申请的抗原检验测定，除一例外，全部为阳性。一例病人经本申请的抗原检验测定为阳性，
5 但经 IFI 测定为阴性。所有 5 例经 IEP Pasteur, IEP FSK 或 Ag-emie 血清学检验测定为阳性的病人经本申请的抗原检验测定也为阳性。

有可能的是，一部分经本申请的检验和 IFI 检验测定都为阴性的病人，由于中线污染(central line contamination)，有短时间的念珠菌血症。

11 例已知有定居、但血清学阴性的病人中，有 6 例经本申请的抗原检验测定为阳性。2 例阳性病人经 IFI 测定也为阳性。10 例血清学阴性的非定居住院病人中，6 例经本申请的抗原检验测定为阳性，其中 2 例阳性病人经 IFI 测定也是阳性。9 例有定居且血清学阳性的病人经本申请的抗原检验测定全部为阳性。这些数据与 9 例经 IFI 测定为阳性的病人中的 8 例进行比较。唯一 1 例 IFI 阴性样品经本申请的抗原检验为低阳性。

15 对这些数据进行的统计学分析见图 8 和表 2。

表 2

目录	均值(单位)	95 % 置信区间
念珠菌血症患者	21.79 ^{a,b}	16.25-27.33
有定居+阴性血清学	14.55 ^{a,c}	9.67-19.42
非-定居+阴性血清学	14.2 ^{b,d}	10.68-17.72
有定居+阳性血清学	27.27 ^{c,d}	23.12-31.43

a. $p = 0.71$

b. $p = 0.58$

c & d. $p < 0.01$

20 在念珠菌血培养阳性的念珠菌血症病人中，经本申请的抗原检验测出的念珠菌抗体水平的均值为 21.79 (16.25-27.33 95 % CI)。用独立样本 T-检验分析，念珠菌血症组与念珠菌血清学阴性的定居组之间的 p 值为 0.71。念珠菌血症组与念珠菌血清学阴性的非定居组之间的 p 值为 0.58。

25 对阴性血培养病人而言，念珠菌血清学阴性组的病人，经本申请的抗原检验测定，一般具有较低的念珠菌抗体水平。平均抗体水平在定居组为 14.55 个单位(9.67-19.42, 95 % CI)，在非定居组为 14.2 个单位(10.68-17.72, 95

% CI)。这些水平显著($p < 0.01$)低于具有阳性念珠菌定居培养结果和阳性念珠菌血清学的病人的平均抗体水平, 平均 27.27 (23.12-31.43, 95 % CI)。这些明确示于图 8 的误差条中。

总体上, 本申请的抗原检验与所用的其它检验具有良好的一致性。经本申请的抗原检验测定的抗体滴度与经其它检验测定的阳性水平之间也具有很好的一致性, 即经本申请的抗原检验测定具有强阳性结果的病人用其它检验测定也具有类似的结果(例如, 病人 AMI, COM, DA SI, FON, PAS 和 RAM)。类似地, 经本申请的抗原检验测定为阴性或弱阳性的病人, 经其它检验测定也是阴性或弱阳性(例如, 病人 BRIG, FER, HEN, LON 和 MAN)。值得注意的是, 一部分血培养阴性的病人经本申请的抗原检验测定为阳性, 这证明了本申请的抗原检验的高灵敏度。

实施例 4 西班牙临床评估

类似于实施例 3 的临床评估由教授 Guillermo Quinds, MD, PhD, Maria Dolores Moragues, PhD, 和 Jose Ponton, PhD(免疫学、微生物学和寄生虫学系, Faculty of Medicine, University of Pais Vasco, Bilbao, 西班牙)进行。

回顾研究的血清来自 11 例病人(表 3 - 病人 1.1-1.32), 他们经阳性血培养确定, 或者经组织学以及阳性组织活检确定, 患有侵袭性念珠菌病。“血培养阴性”组由 12 例病人(表 4 - 病人 2.2-2.53)的血清组成, 这 12 例病人是根据有患侵袭性念珠菌病的危险但血培养阴性的原则选出的。每例病人测定 3 - 5 份血清。经微生物学证实有念珠菌病的病人在阳性血培养之前、当时、和之后采血。血培养阴性组在住院期间的不同时间采血。除了住院病人的血清以外, 来自 3 例健康供血者的血清也接受了检验(表 5)。事先还检测了 5 例病人的新鲜血清, 其中 2 例病人为念珠菌血培养阳性, 3 例不是阳性(表 5)。

表 3

血液培养阳性的病人

病人	提取日	三重 Ag	Platelia Ag	Platelia Ab	西班牙抗-B	西班牙抗-GT	念珠菌物种及结果
1.01	-21	+	+	+	++++	+	白色念珠菌
1.01	-11	+	+	+	++++	++	
1.01	0	+	+	+	++++	++	
1.01	7	+	++	++	+++	+++	
1.01	13	+++	+	++	+++	+++	
1.11	-1	+++	++	+++	++++	++	<i>C. glabrata</i>
1.11	8	+++	++	+++	++++	+++	
1.11	21	+++	+	+	+++	+++	
1.11	29	+++	+	+++	++++	++++	
1.17	-11	+++	++	+++	++++	-	白色念珠菌
1.17	-4	+++	+	+++	+++	+	
1.17	0	+++	+	++	+++	+	
1.17	3	+	+	+	+++	+	
1.17	5	+	+	+	+++	+	
							Exitus d15
1.18	-6	++	(+)	+	+++	-	近平滑念珠菌
1.18	2	++	+	+	++	-	
1.18	6	+	+++	+++	+++	-	
1.18	13	+	+++	-	+	+	
							Exitus d13
1.19	-3	-	-	-	+	-	白色念珠菌
1.19	0	-	+	-	+	-	
1.19	4	-	+	-	+	-	
1.19	7	+	+	-	++	-	
							Exitus d7
1.22	-11	+	+	+	+	+	白色念珠菌
1.22	-7	+	+	-	+	+	
1.22	0	+	+	+	++	+	
1.22	2	+	+	+	+	+	
1.22	7	+	+	+	+	+	
							Dischage d7
1.25	-2	-	+	-	++	-	白色念珠菌
1.25	1	+	-	+	+++	-	
1.25	4	+	-	-	++	-	
1.25	14	+	(+)	-	++	-	
1.25	26	+	+	-	++	-	
1.26	-9	-	+	(+)	++	-	近平滑念珠菌
1.26	-5	+	+	+	+++	-	
1.26	0	+	+	+	+++	-	
1.26	9	+	++	+	+++	-	
1.26	16	+	+	+	++	-	
1.30	-25	+	(+)	?		+?	白色念珠菌
1.30	-4	+	+	+++		++++	
1.30	0	+	-	+++		++++	
1.30	3	+	-	?		+?	
1.30	56	+	+	?		-?	
							Exitus d70
1.31	-4	++	-	++		+?	白色念珠菌
1.31	-1	+	+	++		++++	
1.31	6	++	(+)	++		++++	
1.31	13	++	-	++		++++	
							Exitus d32
1.32	-19	-	-	+		-	近平滑念珠菌
1.32	-17	-	+	+		-	
1.32	0	-	-	+		-	
1.32	7	-	+	+		-	
1.32	15	-	+	+		-	
							Discharge d33

评分:

本申请的 Ab	Platelia Ag	Platelia Ab	西班牙 B-Ab	西班牙 GT Ab
0-10 =-	< 0.5 =-	< 1 =-	< 20 =-	< 20 =-
10-20 = +	0.5-5 = +	1-10 = +	20-80 = +	20-200 = +
20-30 = ++	5-10 = ++	10-20 = ++	80-600 = ++	200-600 = ++
>30 = +++	> 10 = +++	> 20 = +++	600-5000 = +++	600-1200 = +++
			> 5000 = ++++	> 1200 = ++++

表 4

血液培养阴性的病人

病人	提取日	本申请的 Ag	Platelia Ag	Platelia Ab	西班牙抗-B	西班牙抗-GT
2.2	1	++	+			-
2.2	5	++	+			-
2.2	6	++	+			(+)
2.4	1	+	(+)			ND
2.4	15	++	+			ND
2.4	17	+	+			ND
2.7	1	+	-	+	+	-
2.7	4	++	+	+	+++	-
2.7	8	+	+	+	+++	-
2.7	11	+	+	+	+++	-
2.7	15	+	+	+	+++	-
2.10	1	+	-		+++	-
2.10	3	++	-		+++	-
2.10	7	++	-		+++	-
2.10	11	++	-		++++	-
2.10	15	++	-		+++	-
2.14	1	++	(+)	+	+++	-
2.14	3	++	-	+	+++	-
2.14	6	++	-	+	+++	-
2.14	9	++	(+)	+	+++	-
2.14	12	++	+	+	+++	-
2.18	1	-	-			-
2.18	4	+	+			-
2.18	8	+	-			-
2.18	12	+	+			-
2.18	22	+	+			+
2.26	1	+	-			-
2.26	9	+	+			+
2.26	16	+	-			+
2.26	23	+	+			+
2.26	30	+	+			+
2.49	1	-	-			-
2.49	11	+	-			-
2.49	15	-	-			-
2.49	18	-	-			(+)
2.19	27	+	-			+

2.50	1	+	(+)			+
2.50	9	+	+			(+)
2.50	15	+	-			+
2.50	22	+	-			+
2.50	26	+	-			+
2.51	1	-	-			-
2.51	11	-	-			(+)
2.51	18	-	+			-
2.51	22	-	+			-
2.51	29	+	-			-
2.52	1	+	-			(+)
2.52	8	+	-			-
2.52	11	+	-			(+)
2.52	15	+	-			(+)
2.52	18	+	-			(+)
2.53	1	+	-			-
2.53	8	+	-			-
2.53	11	+	+			(+)
2.53	18	+	-			-
2.53	22	+	-			-

评分:

Rockeby Ab	Platelia Ag	Platelia Ab	西班牙 B-Ab	西班牙 GT Ab
0-10 =-	< 0.5 =-	< 1 =-	< 20 =-	< 20 =-
10-20 = +	0.5-5 = +	1-10 = +	20-80 = +	20-200 = +
20-30 = ++	5-10 = ++	10-20 = ++	80-600 = ++	200-600 = ++
>30 = +++	> 10 = +++	> 20 = +++	600-5000 = +++	600-1200 = +++
			> 5000 = ++++	> 1200 = ++++

表 5

新病人和供血者对照

病人	提取日	血液培养	本申请的 结果	Platelia Ag	Platelia Ab	西班牙抗-B	西班牙抗-GT
B 供者 1	N/A	-	-	ND	ND	ND	ND
B 供者 2	N/A	-	-	ND	ND	ND	ND
B 供者 3	N/A	-	-	ND	ND	ND	ND
新病人							
1	N/A	-	-	ND	ND	ND	ND
2	N/A	-	(+)	ND	ND	ND	ND
3	N/A	Asperg	+	ND	ND	ND	ND
4	?	C. g	+	ND	ND	ND	ND
4	?	C. g	+++	ND	ND	ND	ND
5	?	C. a	++	ND	ND	ND	ND
5	?	C. a	+++	ND	ND	ND	ND

说明:

培养物物种	本申请的 Ab
C. a=白色念珠菌	0-10 = -
C. g=C. glabrata	10-20 = +
	20-30 = ++
	> 30 = +++

5 表 6 概括了西班牙研究中分为两组的病人的原始数据，一组为血培养阳性，另一组为血培养阴性。在血培养阳性组中，8/11 的病人在变成血培养阳性之前经本申请的抗原检验测定为阳性。最终有 10/11 的病人经本申请的抗原检验测定为阳性。仅 1 例病人(1.32)仍为阴性。该病人经 Spanish germ tube 抗体检验也是阴性，经 Platelia (BioRad)甘露聚糖抗原检验仅为瞬时阳性。还有可能该病人有短暂的念珠菌血症。

表 6
西班牙数据概述

	本申请的三重 Ag	Platelia Ag	Platelia Ab	西班牙抗-B	西班牙抗-GT
培养物阳性的病人					
阴性结果	1	0	1	0	4
培养前阳性	8	11	9	8	6
培养后阳性	2		1	0	1
所检病人总数	11	11	11	8	11
培养阴性的病人					
阴性结果	0	3	0	0	6
阳性结果	12	9	2	3	5
所检病人总数	12	12	2	3	11
病人 ID					
1.01	pos	pos	pos	pos	pos
1.11	pos	pos	pos	pos	pos
1.17	pos	pos	pos	pos	pos
1.18	pos	pos	pos	pos	(pos)
1.19	(pos)	pos	neg	pos	neg
1.22	pos	pos	pos	pos	pos
1.25	pos	pos	(pos)	pos	neg
1.26	pos	pos	pos	pos	neg
1.30	pos	pos	pos	ND	pos
1.31	pos	pos	pos	ND	pos
1.32	neg	pos	pos	ND	neg
病人 ID					

2.02	pos	pos			neg
2.04	pos	pos			
2.07	pos	pos	pos	pos	neg
2.10	pos	neg		pos	neg
2.14	pos	(pos)	pos	pos	neg
2.18	pos	pos			(pos)
2.26	pos	pos			pos
2.49	pos	neg			(pos)
2.50	pos	(pos)			pos
2.51	(pos)	pos			neg
2.52	pos	neg			neg
2.53	pos	(pos)			neg

经本申请的抗原检验测定，所有 12 例血培养阴性病人都为念珠菌抗体阳性。相比之下，9/12 的病人经 Platelia 甘露聚糖抗原检验鉴定为阳性，而 5/11 的病人经 Spanish Germ tube 抗体检验鉴定为阳性。血培养阴性病人组的主要问题是，缺乏对诊断的其它证实。

5 总体上，本申请的抗原检验与西班牙组所用的其它检验具有良好的一致性。经本申请的抗原检验测定为强阳性的病人(即，病人 1.11, 1.17, 1.18 和 1.31)，用其它检验测定也为强阳性。同样，经本申请的抗原检验测定为阴性或弱阳性的病人，经其它检验测定也通常是阴性或弱阳性。例如，病人 1.19, 1.22, 1.25, 1.26, 1.32, 2.18, 2.26, 2.49, 2.50, 2.51, 2.52 和 2.53。

10 在分析新鲜血清时(表 5)，本申请的抗原检验与该血清是否血培养阳性或阴性具有良好一致性。

对这些数据的统计分析见图 9 和表 7。从图 9 的误差图示可看出，经 Syscan3 检测，血培养阳性组病人的念珠菌抗体水平(平均 25.86, 95 % CI: 16.28-35.44) 高于血培养阴性组病人的水平(平均 17.30, 95 % CI: 13.42-21.19)。用独立样本 T-检验比较这些均值发现，两组的统计学显著性差异 $p = 0.087$ 。

表 7

本申请的抗原检验分值的均值和均值的 95 % 置信区间

类别	均值(单位)	95 % 置信区间
血清培养阳性	25.86*	16.28-35.44
血清培养阴性	17.30*	13.42-21.19

* $p = 0.087$

实施例5 澳大利亚临床评估

侵袭性念珠菌病病人血清来自澳大利亚医院(1997-1998),这些病人具有血液学恶病质(n=24)。对照血清来自无念珠菌感染史的18-25岁年龄组男性(n=20)。病人血清用实施例2所述本申请的抗原检验来测定。每例血清平行测定三份,取平均读数。将每例血清的平均吸光度读数除以本申请抗原检验所配“临界”标准血清的读数。再将该数值乘以10,得到一个任意单位(arbitrary unit)值。

本申请的抗原检验以20个单位(临界标准血清值的两倍)或更多单位作为判定阳性样品的标准时的结果见表8。

10

表8

本申请的抗原检验以20个单位为界限时的结果

	侵袭性念珠菌病	健康对照	总计
检验阳性	20	0	20
检验阴性	4	20	24
总计	24	20	44

以20个单位为界限的本申请抗原检验的特异性为100%,灵敏度为83.3%。阳性预测值为83.3%,阴性预测值为100%。当该检验判定阳性的值设为10个单位或1倍于血清吸光度临界值时,该检验的特异性降低,但灵敏度增加(表9)。特异性为90%,灵敏度为87.5%。阳性预测系数增至91.3%,阴性预测因素降低至85.7%。

15

表9

本申请的抗原检验以10个单位为界限时的结果

	侵袭性念珠菌病	健康对照	总计
检验阳性	21	2	23
检验阴性	3	18	21
总计	24	20	44

用侵袭性念珠菌病病人血清进行本申请抗原检验的结果见表10。仅有1例阴性结果来自血培养阳性的病人。4例阴性样品中2例来自有中线污染的病人。4例阴性检验结果中的3例为被近平滑念珠菌感染的病人,另1例为被白色念珠菌感染的病人。

20

表10

用本申请的抗原检验法来检验侵袭性念珠菌病病人的血清

病人	Ab (420 nm)	单位	结果	分离部位	念珠菌物种
A	1.69	61	阳性	血培养	近平滑念珠菌
B	0.15	5	阴性	血培养	近平滑念珠菌
C	1.16	42	阳性	腹腔	季也蒙念珠菌
D	1.85	67	阳性	血培养	白色念珠菌
E	1.16	42	阳性	血培养	白色念珠菌
F	1.49	54	阳性	腹腔	<i>Candida glabrata</i>
G	0.56	20	阳性	腹腔	近平滑念珠菌
I	1.24	45	阳性	导管	白色念珠菌
K	0.98	35	阳性	食管	白色念珠菌
L	3.46	124	阳性	腹腔	白色念珠菌
M	0.19	7	阴性	中线	白色念珠菌
N	1.44	52	阳性	外伤	白色念珠菌
P	0.55	20	阳性	痰	<i>Candida glabrata</i>
Q	1.12	40	阳性	痰	热带念珠菌
R	1.02	37	阳性	中线	白色念珠菌
S	0.88	32	阳性	血培养	白色念珠菌
T	1.6	58	阳性	血培养	<i>Candida glabrata</i>
U	0.22	8	阴性	中线	近平滑念珠菌
V	0.55	20	阳性	尿	近平滑念珠菌
W	0.31	11	阴性	腹腔	近平滑念珠菌
X	0.59	21	阳性	中线	白色念珠菌
Y	0.85	31	阳性	血培养	白色念珠菌
Z	1.06	38	阳性	支气管	白色念珠菌
ZA	1.05	38	阳性	尿	热带念珠菌

侵袭性念珠菌病组和健康对照组的本申请抗原检验数据如图 10 和表 11 的误差条图所示。在图 10 中，侵袭性念珠菌病组的均值(31.45 单位)高于健康供血者组的均值(7.52 单位)。该差异具有统计学显著性($p < 0.01$)。侵袭性念珠菌病组的均值的 95% 置信区间(23.57-39.33 单位)也高于健康供血者组的(6.92-8.12 单位)。

表 11

侵袭性念珠菌病病人和健康供血者的均值和均值的 95% 置信区间

组	均值(单位)	均值的 95% CI(单位)
侵袭性念珠菌病	31.45	23.57-39.33
健康供血者	7.52	6.92-8.12

在该研究中，用本申请的抗原检验测定来自侵袭性念珠菌病病人、浅表念珠菌病(口腔或阴道)病人，和健康男性对照者的血清。由于是共生生物，

健康个体有可以测到的抗念珠菌抗原的抗体滴度。为了区别与正常和感染有关的抗体水平，提供了一个临界标准血清。将待测血清的吸光度除以临界标准血清吸光度，再乘以 10，得到一个任意单位值。用 20 或更多个单位的值作为阳性检验的指标时，能最好地区分侵袭性念珠菌病病人与健康对照(阳性预测值 83%，阴性预测值 100%)。如果判定样品为阳性所用的值低于 10 个单位(即，临界标准值)，则阳性预测值略增至 87.5%，但阴性预测值降至 90%。

仅 1 例血培养阳性病人经本申请的抗原检验测定为阴性结果。4 例阴性血清中 2 例来自有中线污染的病人。这也反映了这些病人体内的暂时感染，这种感染可能不激发抗体应答。有趣的是，4 例阴性检验中 3 例由近平滑念珠菌感染所致。这种生物常常与生物膜结合，这样的膜可将该生物屏蔽在宿主免疫应答之外。

结论是，本申请的抗原检验是一种快速、可靠且便于操作的检验。它在诊断侵袭性念珠菌感染和严重浅表念珠菌感染方面具有良好的灵敏度和特异性。

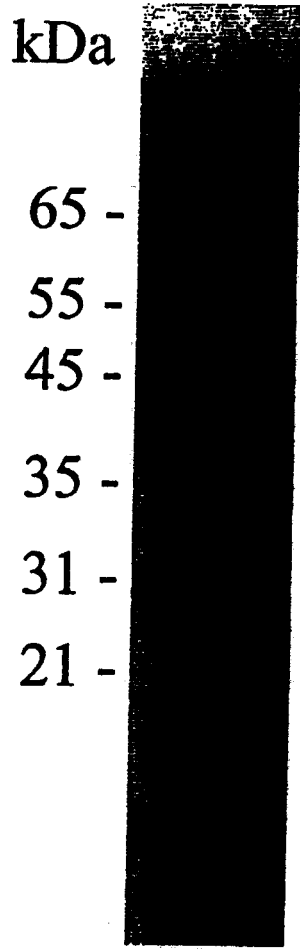


图 1

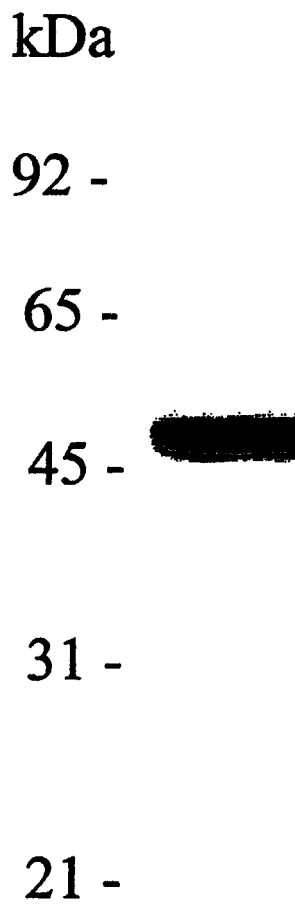


图 2

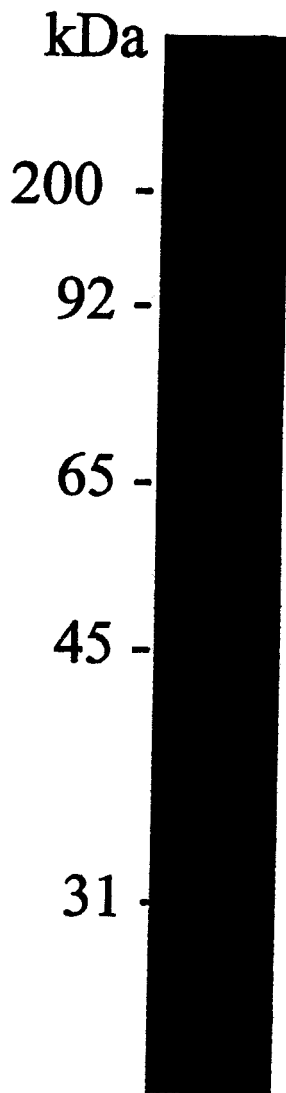


图 3

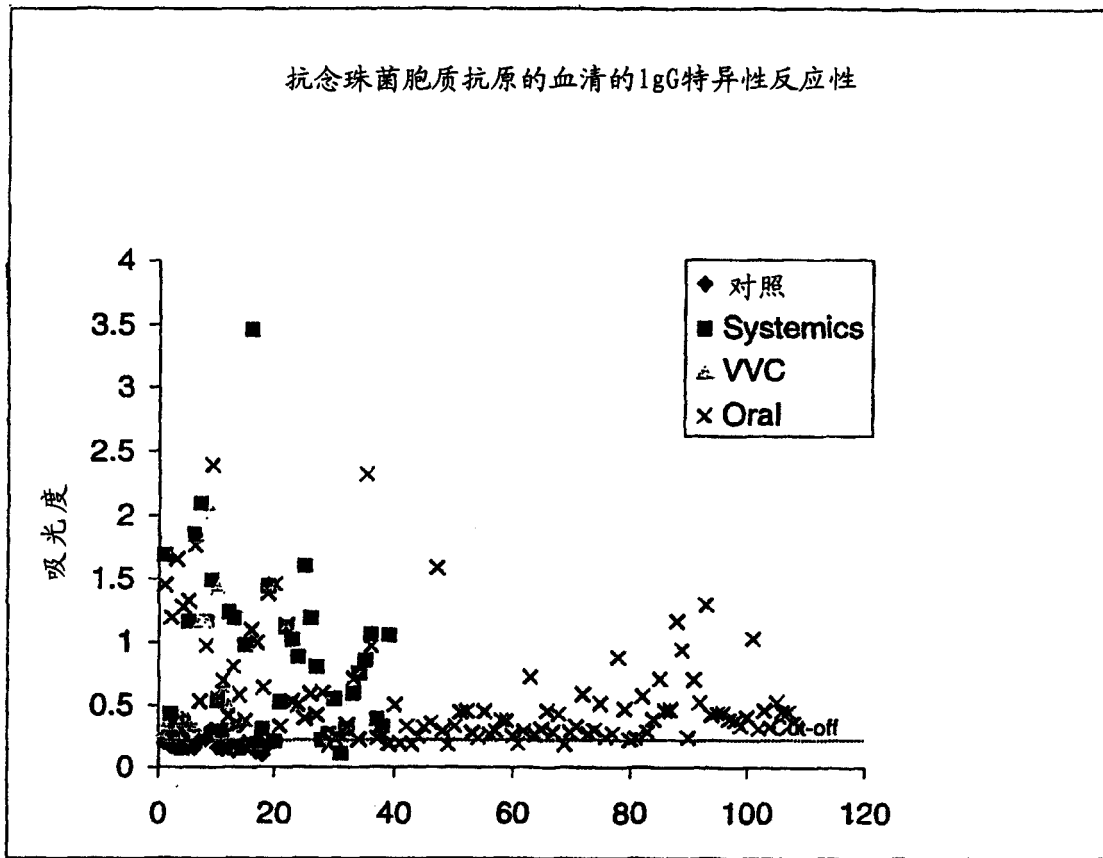


图 4

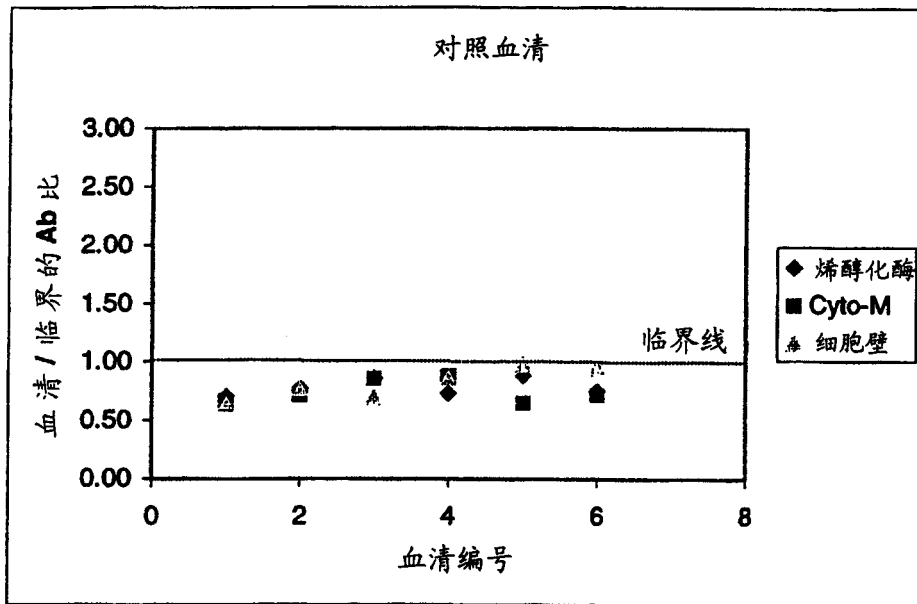


图 5

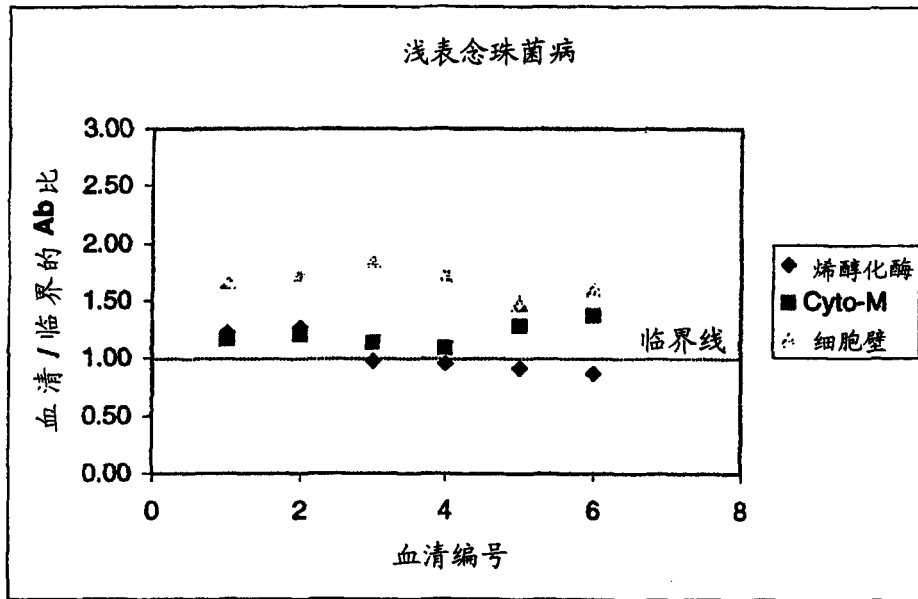


图 6

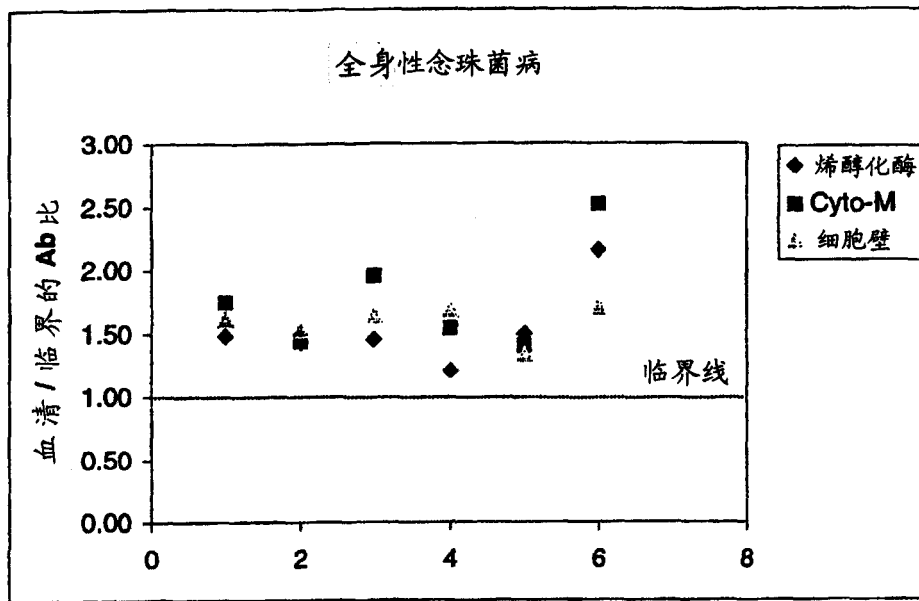


图 7

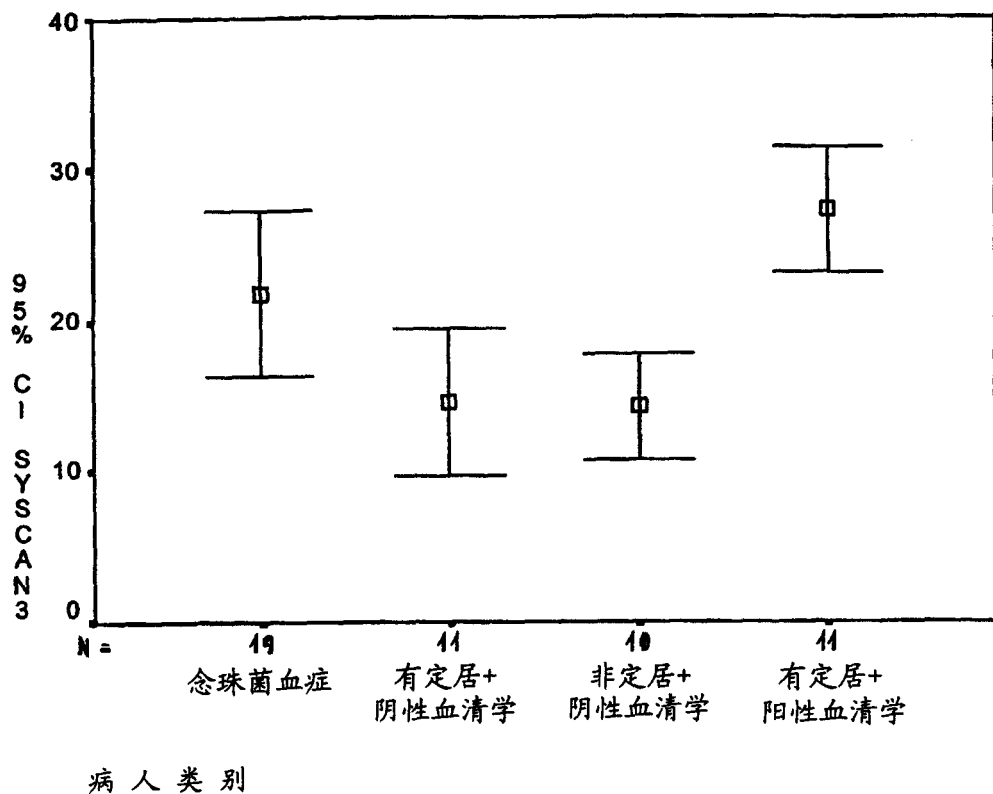


图 8

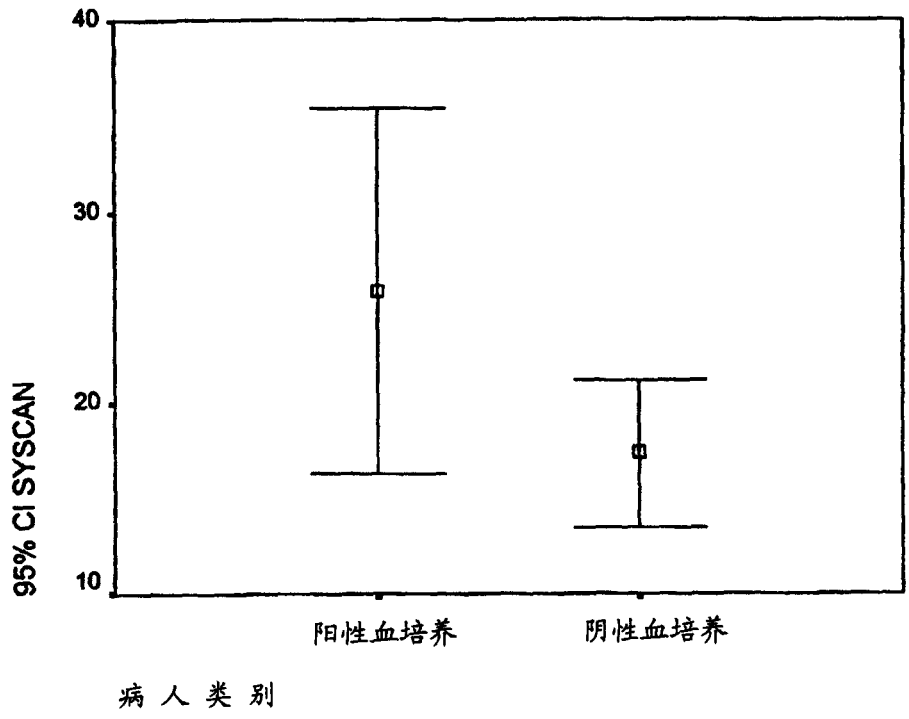


图 9

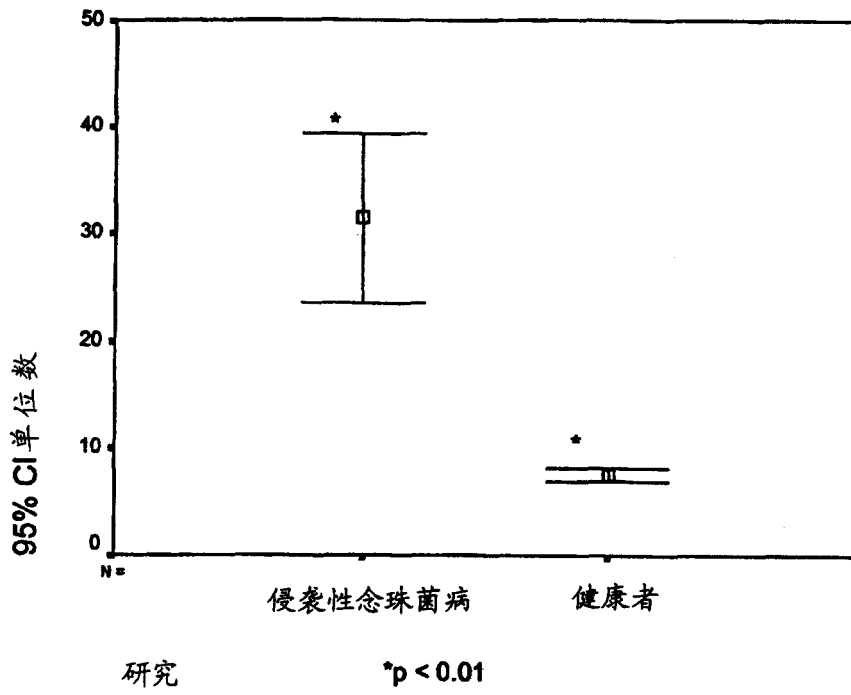


图 10

专利名称(译)	念珠菌的检测		
公开(公告)号	CN1505759A	公开(公告)日	2004-06-16
申请号	CN02808809.3	申请日	2002-04-23
[标]申请(专利权)人(译)	罗克比生物医学有限公司		
申请(专利权)人(译)	罗克比生物医学有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	罗克比生物医学有限公司		
发明人	约翰·沃明顿 丹尼斯·巴兰坦		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/40 G01N33/48 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/569 G01N33/571 G01N33/573 C07K1/36		
CPC分类号	G01N33/56961 G01N33/571 C07K14/40 G01N2333/40 A61P31/10		
优先权	09/841188 2001-04-25 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及诊断念珠菌感染的方法和用具。尤其是，本发明涉及通过测量抗受试者生物样品中念珠菌胞质抗原的抗体的水平来诊断念珠菌感染的方法，所述受试者为念珠菌感染的易感或疑似者。

