

分类号 _____

密级 _____

UDC _____

编号 _____

南方医科大学

硕士学位论文

血清烟曲霉抗体检测方法的建立及其临床应用评价

Establishment of serum anti-Aspergillus fumigatus antibody

detection method and its clinical evaluation

赵燕

导师姓名 王艳芳

专业名称 临床检验诊断学

培养类型 专业型硕士

论文提交日期 2023年11月

南方医科大学 2020 级硕士学位论文

血清烟曲霉抗体检测方法的建立 及其临床应用评价

**Establishment of serum anti-*Aspergillus fumigatus*
antibody detection method and its clinical evaluation**

课题来源： 国家自然科学基金资助项目（81873974）

学 位 申 请 人	赵 燕
导 师 姓 名	王艳芳
专 业 名 称	临床检验诊断学
培 养 类 型	专业型硕士
培 养 层 次	全日制硕士研究生
所 在 学 院	第二临床医学院

答辩委员会主席	温旺荣 教授
答辩委员会成员	邓祖军 教授
	余 楠 主任技师
	彭 亮 教授
	刘利东 主任技师

2023 年 11 月 12 日 广州

血清烟曲霉抗体检测方法的建立 及其临床应用评价

硕士研究生：赵燕

指导教师：王艳芳

摘要

背景与目的：

烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*) 是重要的条件致病菌，广泛存在于环境中，是人体呼吸道中的常见定植真菌。烟曲霉在肺部能引起过敏性支气管肺曲霉病、慢性肺曲霉病 (chronic pulmonary aspergillosis, CPA) 及侵袭性肺曲霉病 (invasive pulmonary aspergillosis, IPA) 等，CPA 的早期诊断和治疗是挽救患者生命的关键，随着患者免疫力的下降，一旦进展为 IPA，致死率极高。然而，CPA 的临床表现不具有特征性，诊断困难，烟曲霉抗体检测虽然已被纳入 CPA 诊断标准，但目前的烟曲霉抗体检测试剂盒的诊断能力仍是不足的，无法满足临床需要。本研究的目的是制备能与烟曲霉特异性抗体结合的天然烟曲霉糖蛋白抗原，建立一种相较于现行商品化试剂盒能更加特异、灵敏地诊断 CPA 的血清烟曲霉抗体检测方法，最终进行临床诊断性实验评价。

方法：

首先，通过无水乙醇沉淀法分别从烟曲霉菌丝体裂解上清、培养上清中制备裂解糖蛋白和分泌糖蛋白，鉴定这两种抗原与特异性兔抗烟曲霉多克隆抗体、15 株小鼠抗烟曲霉单克隆抗体、3 例曲霉 IgG 抗体阳性的曲霉病患者血清的结合能力。然后，基于间接 ELISA 实验方法，将烟曲霉裂解糖蛋白和分泌糖蛋白分别作为包被抗原，建立和优化检测烟曲霉抗体的实验条件；通过检测 49 例 CPA 患者的 51 份血清及 85 份健康人血清中的烟曲霉抗体，绘制受试者工作特征曲线 (receiver operator characteristic curve, ROC 曲线)，比较曲线下面积 (area under curve, AUC)，筛选出最优的烟曲霉抗体检测体系，同时与商品化曲霉 IgG 抗体检测试剂盒的结果进行比较。最终，纳入 49 例 CPA 患者作为病例组，纳入 60

例 CPA 高危人群、9 例其他类型真菌、15 例细菌感染患者作为对照组，用筛选出的最优烟曲霉抗体检测体系及商品化曲霉 IgG 抗体检测试剂盒进行检测和诊断性实验评价。另外，基于最优自建烟曲霉抗体检测体系的检测结果，比较不同性别、不同年龄段健康人之间、健康人、CPA 高危人群、CPA 患者之间的烟曲霉抗体水平差异。

结果：

1. 经过 SDS-PAGE 分离和糖蛋白染色，本研究制备获得的烟曲霉裂解糖蛋白和分泌糖蛋白分子量均主要分布在 43-250kDa 间。将烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白均包被为 0.5 μ g/ml 进行间接 ELISA 反应，最低能与 0.078 μ g/ml 的兔抗烟曲霉粗提蛋白多克隆抗体结合；与 15 株小鼠抗烟曲霉单克隆抗体的结合反应中，烟曲霉裂解糖蛋白主要结合其中 6 株单克隆抗体（编号为 F1、F4、F6、F8、F10、F16），而分泌糖蛋白主要结合其中 4 株单克隆抗体（编号为 F1、F4、F9、F11）；将曲霉 IgG 抗体阳性患者血清稀释 1600 倍后，与烟曲霉裂解糖蛋白和分泌糖蛋白仍具有结合。

2. 将制备所得的烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白分别作为烟曲霉抗体间接 ELISA 检测体系的包被抗原建立检测方法，优化实验条件，将在 CPA 患者及健康人血清中的检测结果绘制 ROC 曲线进行比较，AUC 最大值为 0.655 [0.559, 0.750] ($P=0.003$)，此时的烟曲霉抗体检测体系实验条件为：选择烟曲霉分泌糖蛋白作为包被抗原，包被浓度为 0.2 μ g/ml，将待测血清稀释 600 倍、HRP-羊抗人 IgG 稀释 3000 倍进行检测。选取最优自建烟曲霉抗体检测体系的吸光度 (A_{450}) 截断值为 0.3 时，特异度为 96.5%，灵敏度为 19.6%，在 CPA 患者中的阳性率为 17.6%(9/51)。最优自建体系的 AUC 优于商品化曲霉 IgG 抗体检测试剂盒(0.655 vs. 0.420)，两种检测方法在 CPA 患者中的检测结论较一致($Kappa$ 值为 0.752)，但最优自建体系特异度更好 (96.5% vs. 63%)。

3. 纳入 CPA 患者作为病例组，CPA 高危人群、其他类型真菌、细菌感染患者作为对照组进行临床评价时，以 0.3 为最优自建烟曲霉抗体检测体系的 A_{450} 值的截断值，特异度为 83.3%，灵敏度为 17.6%，9 例其他类型的真菌感染中仅 2 例检测为阳性，15 例细菌感染患者血清中仅 1 例为阳性。而商品化曲霉 IgG 抗体试剂盒的特异度为 63.0%，在对照组中的阳性率为 22.6% (19/84)。另外，基

于自建烟曲霉抗体检测体系检测结果进行分析，CPA 确诊患者血清烟曲霉抗体水平显著高于 CPA 疑诊患者、CPA 高危人群、健康人群 ($P<0.001$)；非 CPA 人群中，女性健康人群血清中烟曲霉抗体的水平高于男性 ($P=0.027$)，中老年健康人组与青壮年组无明显差异，出现慢性肺部器质性病变的患者人群血清烟曲霉抗体整体水平高于健康人群体 ($P=0.002$)。

结论：

本研究制备了能与烟曲霉特异性抗体结合的烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白；采用烟曲霉分泌糖蛋白作为包被抗原成功建立了一种烟曲霉抗体检测方法，进一步收集 CPA 患者作为病例组，具有肺部结构问题的高危人群、健康人、其他细菌真菌肺部感染的患者作为对照组，对检测体系进行评价，结果显示：与商品化曲霉 IgG 抗体检测试剂盒相比，自建烟曲霉抗体检测体系具有较好的特异度，但灵敏度稍差，下一步仍需要继续对体系的实验条件进行优化。

关键词：烟曲霉 慢性肺曲霉病 烟曲霉糖蛋白抗原 烟曲霉抗体检测 ELISA

Establishment of serum anti-*Aspergillus fumigatus* antibody detection method and its clinical evaluation

Name: Zhao Yan

Supervisor: Wang Yan-fang

ABSTRACT

Background and purpose:

Aspergillus fumigatus is an important opportunistic pathogen that widely exists in the environment, colonization of *A. fumigatus* is common in human respiratory tract. *A. fumigatus* can cause allergic bronchopulmonary aspergillosis, chronic pulmonary aspergillosis (CPA), and invasive pulmonary aspergillosis (IPA) in the lungs. Early diagnosis and treatment of CPA are the essential to save patients' live. In immunocompromised hosts, the mortality rate is extremely high, when it progresses to IPA. However, there is no specific clinical manifestation to diagnose CPA. Although anti-*A. fumigatus* antibody detection has been included in the diagnostic criteria for CPA, the diagnostic ability of current anti-*Aspergillus* antibody kits is still insufficient to meet clinical needs. The purpose of this study is to establish an anti-*A. fumigatus* antibody test in serum for CPA using *A. fumigatus* glycoprotein antigens with better specificity and sensitivity than commercial kits, and clinical performance was further evaluated with clinical samples.

Methods:

First, glycoproteins were prepared from *A. fumigatus* mycelium lysate and culture supernatant by anhydrous ethanol precipitation method. The binding ability of the two antigens was identified by specific rabbit anti-*A. fumigatus* polyclonal antibody, 15 isolates of mouse anti-*A. fumigatus* monoclonal antibodies and 3 patient sera with anti-*Aspergillus* IgG antibody positive. Then, based on the indirect ELISA experimental method, *A. fumigatus* lysate and secreted glycoproteins were used as coating antigen

respectively to establish and optimize the experimental conditions for detecting anti-*A. fumigatus* antibodies. For selecting the optimal anti-*A. fumigatus* antibody detection system, 51 serum samples from 49 CPA patients and 85 serum samples from healthy donors were tested for anti-*A. fumigatus* antibody to draw the receiver operator characteristic curve (ROC) and compared the area under curve (AUC) with the commercial anti-*Aspergillus* IgG antibody detection kit. The optimal experimental test was confirmed. Finally, 49 cases of CPA patients were selected as the case group, 60 cases of high-risk individuals for CPA, 9 cases of fungal infections with non-*Aspergillus*, and 15 cases of patients with bacterial infections were included as the control group. The selected optimal self-built anti-*A. fumigatus* antibody test and commercial anti-*Aspergillus* IgG antibody detection kit were used for detection and diagnostic experimental evaluation. In addition, based on the results of the optimal self-built anti-*A. fumigatus* antibody detection system, we compared to find the differences of anti-*A. fumigatus* antibody levels between healthy people with different genders and ages, and between healthy people and high-risk groups of CPA.

Results:

1. After SDS-PAGE separation and glycoprotein staining, the molecular weights of the lysate glycoprotein and secreted glycoprotein of *A. fumigatus* prepared in this study are mainly distributed in the range of 43-250kDa. The *A. fumigatus* lysate glycoprotein and secreted glycoprotein were coated as 0.5 µg/ml for making indirect ELISA reaction, the binding minimum concentration of rabbit anti-*A. fumigatus* crude protein polyclonal antibody was 0.078 µg/ml; In the binding reactions with mouse anti-*A. fumigatus* monoclonal antibodies, the *A. fumigatus* lysate glycoprotein mainly bound to 6 monoclonal antibodies (designated as F1, F4, F6, F8, F10, F16), while the secreted glycoprotein mainly bound to 4 monoclonal antibodies (designated as F1, F4, F9, F11). When the anti-*Aspergillus* IgG antibody positive sera was diluted 1600 times, it still combined with the *A. fumigatus* lysate glycoprotein and secreted glycoprotein.

2. The prepared *A. fumigatus* lysate glycoprotein and secreted glycoprotein were respectively used as the coating antigen to establish anti-*A. fumigatus* antibody indirect

ELISA detection system, adjusted the experimental conditions, and drew the ROC curve by the detection results of those systems in the sera of patients with CPA and healthy people. The maximum AUC was 0.655 [0.559, 0.750] ($P=0.003$), when the experimental condition of anti-*A. fumigatus* antibody detection system was as following: *A. fumigatus* secreted glycoprotein was coated in a concentration of 0.2 $\mu\text{g/ml}$, The patients serum to be tested was diluted 600 times and goat anti-human IgG antibody conjugated with HRP was diluted 3000 times for detection. When the cut-off value of absorbance (A_{450}) of the optimal self-built anti-*A. fumigatus* antibody detection system was 0.3, the specificity was 96.5%, and the sensitivity was 19.6%, the positive rate in patients with CPA was 17.6% (9/51). The AUC of the optimal self-built system was better than the commercial anti-*Aspergillus* IgG antibody detection kit (0.655 vs. 0.420). The detection results of the two methods were consistent in patients with CPA ($Kappa$ value was 0.752), but the specificity of the optimal self-built system was better (96.5% vs. 63%).

3. When the patients with CPA were selected as the case group, and the high-risk group of CPA, patients with other types of fungi and bacterial infections were selected as the control group for clinical evaluation, with 0.3 as the cut-off value of A_{450} , the specificity of the optimal self-built anti-*A. fumigatus* antibody detection system was 83.3%, and the sensitivity was 17.6%, only 2 out of 9 patients with other types of fungal infections tested positive, and only 1 out of 15 patients with bacterial infections tested positive in serum. The specificity of the commercial anti-*Aspergillus* IgG antibody detection kit was 63.0%, and the positive rate in the control group was 22.6% (19/84). In addition, based on the analysis of the results of the optimal self-built anti-*A. fumigatus* antibody detection system, the levels of serum of proved patients with CPA were significantly higher than those in suspected patients with CPA, high-risk groups with CPA, and healthy individuals ($P<0.001$); In the non-CPA population, the levels of anti-*A. fumigatus* antibody in the serum of healthy female persons were higher than those in male ($P=0.027$), and there was no significant difference between the middle-aged and elderly healthy population. The level of anti-*A. fumigatus* antibody in the

patients serum with chronic pulmonary organic lesions was higher than healthy population ($P=0.002$).

Conclusion:

In this study, *A. fumigatus* lysate glycoprotein and secreted glycoprotein which can bind to anti-*A. fumigatus* specific antibodies were prepared, a detection method of anti-*A. fumigatus* antibody was successfully established by using *A. fumigatus* secreted glycoprotein. Serum samples from CPA patients, high-risk groups with lung structural problems, healthy individuals, and patients with other bacterial and fungal lung infections were collected for evaluation of the detection system. The results showed that compared with commercial anti-*Aspergillus* IgG antibody detection kits, the optimal self- built anti-*A. fumigatus* antibody detection system had better specificity, but slightly lower sensitivity, The next step still needs to continue optimizing the experimental conditions of the system.

KEYWORDS: *Aspergillus fumigatus*; Chronic pulmonary aspergillosis; *A. fumigatus* glycoprotein antigen; Anti-*A. fumigatus* antibody detection; ELISA.

目 录

前言.....	1
第一部分 烟曲霉糖蛋白抗原的制备及鉴定	5
1. 材料.....	5
1.1 烟曲霉菌株.....	5
1.2 烟曲霉抗体.....	5
1.3 血清.....	6
1.4 主要试剂、耗材.....	6
1.5 主要仪器.....	7
2. 方法.....	8
2.1 烟曲霉糖蛋白抗原的制备和鉴定.....	8
2.2 烟曲霉糖蛋白的抗原性鉴定.....	10
2.3 烟曲霉糖蛋白抗原与曲霉 IgG 抗体阳性血清的反应	11
3. 结果.....	12
3.1 烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白的制备和定量	12
3.2 烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白的性质鉴定	13
3.3 烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白的抗原性鉴定	14
3.4 烟曲霉糖蛋白抗原与烟曲霉 IgG 抗体阳性患者血清结合良好	17
4. 讨论.....	18
第二部分 烟曲霉抗体间接 ELISA 检测体系的建立.....	22
1. 材料.....	22
1.1 烟曲霉抗原.....	22
1.2 血清.....	22
1.3 主要试剂、耗材.....	23
1.4 主要仪器.....	24
2. 方法.....	24
2.1 样本收集和补充检测血清曲霉 IgG 抗体	24
2.2 烟曲霉抗体间接 ELISA 检测体系实验条件的初步筛选	24
2.3 烟曲霉抗体间接 ELISA 检测体系实验条件的确定	25
2.4 统计分析.....	25
3. 结果.....	26
3.1 纳入样本特征.....	26
3.2 烟曲霉抗体间接 ELISA 检测体系实验条件的初步选择	29
3.3 最优烟曲霉抗体间接 ELISA 检测体系实验条件的确定	31

3.4 最优自建烟曲霉抗体检测体系与商品化试剂盒的比较	32
4. 讨论.....	34
第三部分 烟曲霉抗体检测体系的临床应用评价	36
1. 材料.....	36
1.1 烟曲霉抗原.....	36
1.2 血清.....	36
1.3 主要试剂、耗材.....	38
1.4 主要仪器.....	38
2. 方法.....	38
2.1 临床评价样本的收集和检测.....	38
2.2 烟曲霉抗体检测体系的临床应用评价.....	39
2.3 分组比较.....	39
2.4 统计分析.....	39
3. 结果.....	40
3.1 纳入样本特征.....	40
3.2 烟曲霉抗体检测体系的临床应用评价.....	41
3.3 健康人血清中烟曲霉抗体水平的分组比较	41
3.4 健康人、CPA 高危人群及 CPA 患者血清烟曲霉抗体水平比较	42
4. 讨论.....	44
全文总结与展望	47
参考文献.....	49
附录 1 液体配置方法	56
附录 2 中英文缩写对照	59

前言

曲霉菌 (*Aspergillus*) 是一种广泛存在于环境中的条件致病菌, 是人体呼吸道、消化道中的常见定植真菌^[1]。烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*, *A. fumigatus*) 生长迅速, 短期内能产生大量粘附能力极强的孢子, 是曲霉属最主要的致病菌^[2], 在真菌感染中的发病率仅次于念珠菌, 另外, 黄曲霉 (*A. flavus*)、土曲霉 (*A. terreus*)、黑曲霉 (*A. niger*)、构巢曲霉 (*A. nidulans*) 等也有引起感染的报道^[3]。

大部分烟曲霉分生孢子进入人体后, 首先要经历上呼吸道的粘液、纤毛的黏附清除, 即使突破上皮防御作用进入下呼吸道后, 也会被巨噬细胞等先天免疫细胞有效清除, 仅少部分逃逸的烟曲霉孢子能够在人体上呼吸道黏膜、肺泡等部位存活, 引起慢性炎症反应^[3-5]。当宿主免疫力进一步降低时, 沉积于肺泡上皮的烟曲霉分生孢子可出芽生长侵入血管壁, 能够引起致死率极高的侵袭性感染^[6], 除呼吸道外, 鼻窦、皮肤、中枢神经系统等其他部位均有发生烟曲霉侵袭性感染的报道^[7-10]。

根据患者免疫系统的状态和基础疾病的不同, 患者发生各类肺曲霉病的风险是不一致的^[11]。过敏性支气管肺曲霉菌病 (allergic bronchopulmonary aspergillosis, ABPA) 几乎只发生在支气管哮喘和囊性肺纤维化患者人群, 致死率相对较低^[12]; 患有慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD)、支气管扩张、支气管肺癌、肺结核等慢性肺部疾病的患者是慢性肺曲霉病 (chronic pulmonary aspergillosis, CPA) 的高发人群^[13], 这些患者往往伴随着轻微至中度的免疫功能受损, 另外, 长期酗酒和糖尿病患者血糖控制不佳也是发生 CPA 的危险因素^[14]。当患者免疫功能进一步受损, CPA 可发展为侵袭性肺曲霉菌病 (invasive pulmonary aspergillosis, IPA), 5 年死亡率高达 75%-80%^[14, 15]。对于患有艾滋病、中性粒细胞减少、长期使用糖皮质激素治疗、血液系统恶性肿瘤或移植后进行抗免疫排斥治疗的免疫功能重度受损患者, 易发生侵袭性曲霉病 (invasive aspergillosis, IA) ^[16-20], 据统计, 急性白血病患者中 IA 的发病率为 15.4%至 50%, 致死率达 70%以上^[17]。

烟曲霉感染发病隐匿, 大部分患者的症状、体征及影像学表现不具有特异性,

早期诊断极为困难，CPA 的诊断依赖有经验的医生对患者的基础疾病、临床表现、影像学表现、实验室检查结果进行综合判断^[14]。CPA 患者最常见的症状是咳嗽、咯血、咳痰和发热，最常见的影像学异常是空洞、结节、实变、胸膜增厚等^[21,22]，与细菌感染及其他类型真菌感染难以鉴别，仅少数患者具有特征性的曲霉球、曲霉空洞表现^[23]。目前的实验室检查中，白细胞计数、血细胞沉降率、超敏 C 反应蛋白、肝素结合蛋白、降钙素原等实验室检测指标升高常提示感染发生^[24]，但这些指标同样无法区分细菌、真菌感染，而且非特异性炎症、烧伤、手术应激反应等也可引起这些指标的升高。在真菌感染的实验室检查中，(1-3)- β -D-葡聚糖检测是较常用的辅助诊断项目，但(1-3)- β -D-葡聚糖是大部分真菌的细胞壁共有成分，无法特异地区分烟曲霉感染与其他类型真菌感染^[25]。

有创的肺组织病理活检通常被认为是肺部真菌感染的诊断金标准^[26]，但是对于 CPA，当肺部活检证据表明烟曲霉菌丝的存在时，往往意味着患者的基本情况较差，已经发生了严重的感染，可能已经进展为亚急性侵袭性肺曲霉病（以前称为慢性坏死性肺曲霉病）^[14]，无法实现早期治疗。对于免疫力严重降低的患者来说，开展经验性、预防性抗真菌治疗是必要的，微生物培养也是真菌感染诊断的重要辅助检查，血液、肺泡灌洗液和呼吸道痰液样本中培养出曲霉菌能为临床开展 IA 治疗提供指导^[26]，但 CPA 患者大部分是免疫力轻微至中度受损的患者，微生物培养手段很难区分烟曲霉的呼吸道定植和感染^[27]，对临床诊断 CPA 和进行抗真菌用药的指导意义有限^[28,29]。

近年来，随着对烟曲霉感染的进一步认识和深入研究，烟曲霉免疫诊断技术不断发展。曲霉半乳甘露聚糖（galactomannan, GM）抗原检测是目前应用较为广泛的曲霉感染血清学检测手段，但指南中仅推荐用于 IA 的诊断^[30,31]，GM 抗原检测对 CPA 的诊断特异度较差，不同研究中，GM 抗原检测在 CPA 患者人群中诊断灵敏度范围从 30%~100%不等，特异性为 38%~98%^[25]。

烟曲霉作为人体常见的定植真菌，即使未导致感染的发生，但机体不断与烟曲霉接触的过程中也在不断地产生免疫应答。对于曲霉抗体检测，不同研究中对不同类型曲霉病患者的曲霉抗体检测阳性率从 23%至 100%不等，部分非曲霉病人群的曲霉抗体检测结果也是阳性的^[14,32-37]。研究表明，健康人血清中具有一定水平的烟曲霉抗体，在仅发生烟曲霉定植的人群中，10%以上个体血清曲霉 IgG

抗体检测为阳性^[37]。实验室前期对采集大量健康人的血浆汇集制备纯化而得的静脉注射免疫球蛋白（intravenous immunoglobulin, IVIG）进行了抗真菌抗体的研究，发现在 IVIG 中具有可与兔抗烟曲霉特异性抗体竞争在烟曲霉天然抗原上的结合表位的抗体^[38]。但健康人血清中烟曲霉特异性抗体的水平相对较低，实验室前期对健康人血清的烟曲霉 IgG 抗体水平进行了研究，健康人血清检测吸光度值均在 0.3 以下^[39]。因此，采用烟曲霉抗体检测技术对 CPA 进行诊断时，需要优化检测条件和调整截断值^[32]，以实现与非曲霉感染人群的区分。

烟曲霉在人体内的免疫过程十分复杂，曲霉病诊断管理指南中肯定了曲霉特异性 IgG 抗体检测对 CPA 的诊断价值^[14, 30]，但患者血清中所存在烟曲霉抗体往往是多价抗体，不同制备方法获得的烟曲霉抗原与这些多价混合抗体的结合并不一致。烟曲霉细胞壁中多糖含量占 90%以上^[40]，糖蛋白在烟曲霉细胞壁和分泌代谢物中广泛存在，是曲霉病免疫诊断技术开发的重要靶标^[41]。2017 年 ESCMID-ECMM- ERS 联合制定的曲霉病诊断管理指南将曲霉 IgG 抗体检测纳入到 CPA 辅助诊断推荐指标^[30]，国产曲霉抗体检测试剂盒中，丹娜(天津)生物科技股份有限公司的商品化曲霉 IgG 抗体试剂盒应用广泛，但临床应用中仍有其局限性，不同研究中对曲霉感染的诊断性能差异较大，目前的曲霉抗体检测体系仍不能满足临床诊断的需要。

开发更加特异、灵敏的烟曲霉抗体检测体系是必要的。实验室前期进行过许多开发烟曲霉抗体检测体系的尝试，烟曲霉特异性甘露聚糖蛋白（Afmp）是一种烟曲霉菌丝细胞壁抗原成分^[42]，具有较好的免疫原性，实验室前期通过 Afmp 基因的不同保守区序列表达获得了 Afmp1p、Afmp2p、Afmp4p、Afmp1cr、Afmp2cr 等重组抗原，曾采用 Afmp1p、Afmp1cr、Afmp2cr 尝试建立烟曲霉特异性抗体的 ELISA 检测方法^[43, 44]，但未能获得成熟的烟曲霉特异性抗体检测体系。原因可能在于：虽然烟曲霉细胞壁糖蛋白是烟曲霉感染人体后产生免疫应答的最主要免疫原，但前期制备的重组蛋白抗原为毕赤酵母表达系统表达获得，蛋白折叠方式及提供的抗原表位与原始烟曲霉抗原具有一定区别，仅能结合患者血清中的少部分曲霉抗体。

除重组蛋白表达技术外，课题组前期还进行过采用噬菌体展示技术制备烟曲霉模拟多肽抗原的尝试。噬菌体展示技术理论上来说可以将外源多肽以融合蛋白

形式展示于噬菌体表面，同时保持相对独立的空间构象及生物活性，能够模拟其他抗原或半抗原的抗原表位^[45]，课题组前期研究中采用噬菌体模拟肽技术制备了曲霉 GM 的模拟多肽抗原，能够较特异地结合实验室制备的特异性兔抗烟曲霉多克隆抗体及小鼠抗烟曲霉单克隆抗体^[46]，但与曲霉感染患者血清中的烟曲霉抗体结合不佳，未能进行更进一步的体系建立。

综上所述，制备天然抗原依然是烟曲霉抗体检测方法开发过程中获取包被抗原的主要方法，本研究拟纯化制备烟曲霉生长过程中可能诱发患者免疫应答的天然结构性糖蛋白及分泌性糖蛋白，将其作为烟曲霉抗体检测的原料，开发能更好地诊断 CPA 的烟曲霉抗体间接 ELISA 检测体系，并且纳入临床样本对建立的体系进行诊断性评价。为此，进行了三个部分的研究，具体如下：

第一部分，制备烟曲霉糖蛋白抗原。采用无水乙醇沉淀法从烟曲霉菌丝体裂解上清和培养上清中制备烟曲霉裂解糖蛋白和分泌糖蛋白^[47-49]，并采用实验室前期制备的特异性兔抗烟曲霉多克隆抗体、小鼠抗烟曲霉单克隆抗体以及曲霉 IgG 抗体阳性的曲霉病患者血清鉴定这两种糖蛋白抗原结合烟曲霉特异性抗体的能力，为后续进行烟曲霉抗体间接 ELISA 检测体系的开发建立基础。

第二部分，建立烟曲霉抗体间接 ELISA 检测体系。调整烟曲霉糖蛋白抗原的包被浓度、待测血清稀释度、酶标抗体浓度等实验条件，随机收集 CPA 患者作为病例组，健康人作为对照组，对建立的烟曲霉抗体检测体系进行初步评价，筛选出最优的自建烟曲霉抗体间接 ELISA 检测体系，并与商品化曲霉 IgG 抗体检测试剂盒对比。

第三部分，对本研究建立的最优烟曲霉抗体间接 ELISA 检测体系进行临床应用评价。纳入 CPA 患者血清作为病例组，将无曲霉感染证据的 CPA 高危人群（慢性肺部器质性病变患者）、其他真菌、细菌感染患者等更符合临床实际应用的人群血清作为对照组，进行诊断性试验评价，同步与商品化曲霉 IgG 抗体检测试剂盒进行比较。另外，基于最优自建烟曲霉抗体检测体系的检测结果，比较不同性别、不同年龄段健康人之间，健康人与 CPA 高危人群、CPA 患者人群之间的血清烟曲霉抗体水平差异。

第一部分 烟曲霉糖蛋白抗原的制备及鉴定

制备能与目标抗体特异性结合的包被抗原是建立烟曲霉抗体间接 ELISA 检测体系的基础。烟曲霉细胞壁中多糖含量占 90%以上，主要包括几丁质、1,3- β -葡聚糖、半乳甘露聚糖、1,3- α -葡聚糖和半乳糖氨基半乳聚糖等，细胞壁糖蛋白成分的糖链随着烟曲霉菌丝生长而逐渐延长，分泌释放，这些糖蛋白质是烟曲霉重要的病原体相关的分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)，可激活宿主免疫反应^[50]。无水乙醇沉淀法是提取真菌多糖成分常用的方法，可以较特异地分离沉淀含有多糖的糖蛋白抗原，被应用于多种真菌免疫诊断试剂盒的开发^[47-49]。

本部分研究旨在从烟曲霉天然培养物中制备和纯化烟曲霉生长代谢过程中产生的结构性糖蛋白（裂解糖蛋白）和分泌性糖蛋白（分泌糖蛋白），鉴定其与烟曲霉特异性抗体的结合能力，验证这两种天然烟曲霉糖蛋白作为建立烟曲霉抗体间接 ELISA 检测体系的包被抗原的潜力，为下一步研究提供原料基础和支持。

1. 材料

1.1 烟曲霉菌株

烟曲霉 ATCC46645 菌株购自美国菌株保藏中心 (American type culture collection, ATCC)。

1.2 烟曲霉抗体

兔抗烟曲霉多克隆抗体：兔抗烟曲霉粗提蛋白多克隆抗体，由实验室前期采用烟曲霉粗提蛋白免疫家兔制备。

小鼠抗烟曲霉单克隆抗体（共 15 株，抗体编号为：F1-F2, F4-F6, F8-F17）：实验室前期采用烟曲霉菌丝体裂解上清作为免疫原，对 BalB/c 小鼠进行皮下注射免疫后采用杂交瘤技术获得，以辛酸硫酸铵沉淀法纯化自小鼠腹水。15 株小鼠抗烟曲霉单克隆抗体中，F1、F4 抗体株为较特异的烟曲霉抗体，仅与念珠菌有微弱交叉；F2、F5、F12、F15、F17 为烟曲霉特异性抗体；余抗体株主要结合

曲霉属抗原，但与其他类型真菌有一定交叉。抗体性质方面，F1、F4、F6、F8、F9、F10、F11、F16 为 IgM 抗体，其余为 IgG 抗体，且均为 IgG1 亚类；其中 F1、F4、F9、F11 抗体结合表位含糖蛋白的糖基-蛋白共价键，余抗体主要结合部位为蛋白表位^[51]。

1.3 血清

混合健康人血清：由南方医科大学珠江医院检验科提供，为 2011 年收集 563 位健康体检中心就诊的成年健康人血清混合而得，冻存于-30℃。

曲霉 IgG 抗体阳性血清：由北京中日友好医院呼吸与危重症医学部临床微生物与感染实验室、南方医科大学珠江医院检验科提供，采用丹娜(天津)生物科技股份有限公司生产的曲霉 IgG 抗体检测试剂盒检测确认曲霉 IgG 抗体为阳性（检测浓度>120 AU/ml）。

注：本研究采用的血清已通过南方医科大学珠江医院临床研究中心伦理审查，批件号：2021-KY-075-01。

1.4 主要试剂、耗材

主要试剂：沙保氏真菌培养平板购自广州迪景微生物科技公司；糖蛋白染色试剂盒为中科（瑞泰）生物科技有限公司产品；辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase, HRP）标记的山羊抗小鼠 IgG 购自安诺伦（北京）生物科技有限公司；正常兔 IgG 购买自 Sigma-Aldrich 公司；牛血清白蛋白（bovine serum albumin, BSA）和 HRP 标记的山羊抗兔 IgG、山羊抗人 IgG 购自美国 Sigma 公司；TMB 显色液（TMB color liquid, TMB）购自北京博奥龙免疫技术有限公司；山羊血清购自浙江天杭生物科技股份有限公司；10% TGX 预制胶购自 Bio-Rad 公司；酪蛋白钠盐、葡萄糖、蛋白胨、Tween20、碳酸钠、碳酸氢钠、磷酸二氢钠、十二水合磷酸氢二钠、氯化钠、Proclin 300、苯酚红、明胶、蔗糖、硫柳汞、无水乙醇、甲醇、重蒸苯酚、活性炭、浓盐酸、浓硫酸、冰醋酸、甘氨酸、三羟甲基氨基甲烷（Tris base）、十二烷基硫酸钠（SDS）、30%丙烯酰胺、四甲基乙二胺、甘油、考马斯亮蓝 R250、溴酚蓝等生化试剂均为进口分装或国产分析纯化。

液体准备：沙氏肉汤培养基、0.05%Tween20-水溶液、葡萄糖标准液（20mg/ml）、

5%苯酚溶液、20×PBS、1×PBS、0.1% PBST、0.5% PBST、0.1%TBST、样品稀释液（0.1%BSA-1×PBS 溶液）、抗原包被液（0.05M 碳酸盐缓冲液）、0.25%酪蛋白封闭液、20%山羊血清简易酶稀释液、0.3M H₂SO₄ 溶液、10% AP、1.5M Tris-HCl (pH 8.8)、1M Tris-HCl (pH 6.8)、5×电泳缓冲液、5×转印缓冲液、6×loading buffer、5%脱脂牛奶、考马斯亮蓝染色液、考马斯亮蓝脱色液、糖蛋白染色固定液（50%甲醇）、糖蛋白染色脱色液（3%醋酸溶液）、糖蛋白染色阴性及阳性参照物的配置方法详见附录 1。

耗材：50ml 离心管、0.45μm 细菌滤器、2ml 冻存管购自广州昂飞生物科技有限公司；一次性铝箔真空包装袋购买自晟利（南京）化学科技有限公司；一次性各规格塑料吸管、EP 离心管、定性滤纸等耗材购自上海生工生物有限公司；10kDa 超滤离心管购自德国默克公司；神奇滤布购自北京智杰方远科技有限公司；无菌培养容器透气封口膜购自广州市普博仪器有限公司；96 孔聚苯乙烯微孔板购自厦门怡佳美实验器材公司；各规格加样枪头购自生工生物工程有限公司及广州万莱康生物科技有限公司；一次性无菌棉签、一次性接种环、各规格一次性注射器、改良牛鲍细胞计数板、各规格锥形瓶、玻璃瓶、玻璃量筒、玻璃试管、小青瓶、玻璃平皿、玻璃刻度吸管、玻璃移液管、玻璃漏斗、比色皿均源自南方医科大学珠江医院中心实验室。

1.5 主要仪器

大型落地摇床、微生物培养箱、二级生物安全柜、磁力搅拌器为 Thermo Fisher 公司产品；紫外分光光度计为天根生化科技（北京）有限公司（TIANGEN）产品；台式离心机为德国 Hettich 公司产品；样品快速研磨仪为上海净信实业发展有限公司产品；真空离心浓缩仪为德国 CHRIST 公司产品；微型桌面离心机为上海智岩科学仪器有限公司产品（Scanspeed mini）；洗板机、酶标仪为 Bio-Tek 公司产品；电子天平为德国赛多利斯公司产品；pH 仪为梅特勒-托利多公司产品；蛋白电泳仪、湿转仪、化学发光成像系统为美国 Bio-Rad 公司产品；恒温水浴锅、脱色摇床为英国 GRANT 公司产品；恒温金属浴为杭州米欧仪器有限公司产品；显微镜型号为 Leica DM2500；涡旋振荡器为美国 Scientific Industries 公司产品；单式真空（充气）包装机为浙江鼎业机械包装设备有限公司产品（DZQ400/2D）。

2. 方法

2.1 烟曲霉糖蛋白抗原的制备和鉴定

2.1.1 烟曲霉分生孢子的制备

将烟曲霉 ATCC46645 菌株接种于沙保氏真菌培养平板，28℃培养 3-5 天，待产孢丰富时，在平板上加入适量 0.05% Tween20-水溶液，无菌棉签轻轻刮取孢子，悬浮在 1×PBS 缓冲液中，将悬液用双层神奇滤布滤去菌丝，获得分生孢子悬液，混匀后用一次性无菌吸管吸取适量菌液于显微镜下观察，确认镜下无明显菌丝结构即可开始计数^[52]，取 10μl 分生孢子悬液稀释 100 倍，采用改良牛鲍计数板计数分生孢子浓度，4℃保存备用。

2.1.2 烟曲霉菌丝体裂解上清及培养上清的制备

将烟曲霉分生孢子悬液加入沙氏肉汤培养基中，使培养基中分生孢子终浓度为 1×10^6 /ml，35℃摇床 150rpm 振荡培养 24-48h 后，用双层神奇滤布分离菌丝体及培养上清：培养上清用无菌的 2000ml 大锥形瓶收集；菌丝体采用 1×PBS 清洗 10 遍后分装入 2ml 研磨管，每管加入数颗直径为 0.1mm、0.5mm 的研磨陶瓷珠及 1 颗直径 5mm 的玻璃珠，置于组织研磨仪中进行研磨（研磨参数设定为 65Hz，10min），反复研磨确保研磨充分，14000rpm 离心 20min 后用注射器吸取研磨上清经 0.45μm 细菌滤器过滤，并利用真空离心浓缩仪对过滤后的烟曲霉裂解上清进行浓缩。采用双缩脲反应（bicinchoninic acid assay, BCA）法对烟曲霉菌丝体裂解上清浓度进行定量。

2.1.3 烟曲霉糖蛋白抗原的提取与纯化

（1）初步提取：将上述 2.1.2 制备的菌丝体裂解上清、培养上清中分别加入 3 倍体积无水乙醇，磁力搅拌混匀后塑料膜封口置于 4℃静置沉淀 36-48h，待出现明显灰白色沉淀后用 50ml 离心管分次离心（5500rpm，5min），弃去上清，用 15ml 超纯水重溶沉淀物。再次加入 3 倍体积无水乙醇 4℃静置 3h 沉淀糖蛋白成分，离心弃上清后用 5ml 无水乙醇将沉淀反复震荡洗涤 3 遍，最后离心弃去上清，得到粗提的烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白沉淀。

（2）吸附纯化：用 15ml 超纯水溶解粗提的烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白沉淀，加入 1/10 体积活性炭粉末，颠倒混匀，待溶液颜色呈现均质不透明黑色

后置于涡旋振荡器上持续震荡 2-3h 吸附杂质及色素；吸附结束后，离心(5500rpm, 5min) 分离活性炭粉末，注射器吸取上层澄清透明的溶液，所得溶液经 0.45 μ m 细菌滤器过滤彻底除去活性炭粉。

(3) 浓缩：将纯化所得的澄清溶液置入 10kDa 超滤离心管，离心收集超滤离心管上层液体 (5000g, 10min)，即得到浓缩后的烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白溶液。

2.1.4 烟曲霉糖蛋白抗原的多糖成分定量测定

采用苯酚-硫酸法测定糖链部分浓度以代表纯化浓缩所得的烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白浓度^[53]。取预先配置好的 20mg/ml 葡萄糖标准液，稀释配置浓度为 1 μ g/ml, 2 μ g/ml, 4 μ g/ml, 8 μ g/ml, 16 μ g/ml 的梯度葡萄糖标准液；取 10 μ l 烟曲霉糖蛋白抗原溶液原液加入 1ml 超纯水中作为待测样本（稀释 100 倍）。

分别吸取 1ml 上述不同浓度的葡萄糖溶液、稀释好的烟曲霉裂解糖蛋白溶液、分泌糖蛋白溶液、超纯水（空白对照）加入洁净小青瓶中，向瓶中加入 0.5ml 5%苯酚溶液，立即用玻璃移液器加入 2.5ml 浓硫酸，充分摇匀，常温放置 30min 充分反应。

使用紫外分光光度计 (TIANGEN) 测定 490nm 波长处吸光度 (A_{490})，以葡萄糖溶液的浓度为纵坐标， A_{490} 值为横坐标，绘制标准曲线，得到线性回归方程，将稀释后所测得吸光度值代入方程并乘以稀释倍数，得到烟曲霉糖蛋白抗原原液的浓度。

2.1.5 烟曲霉糖蛋白抗原的性质鉴定

为鉴定制备获得的烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白的性质及分子量分布差异，采用 10% SDS-PAGE 凝胶对烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白进行分离、染色，同时设置烟曲霉菌丝体裂解上清作为对照。烟曲霉菌丝体裂解上清上样量为 30 μ g/孔，烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白的上样量为 10 μ g/孔，糖蛋白染色阴性、阳性参照物的上样量为 5 μ g/孔，上样前将抗原及阴性、阳性参照 95 $^{\circ}$ C 加热 5min，120V 电泳 1h；分离后分别进行考马斯亮蓝染色和糖蛋白染色，步骤如下所示：

(1) 考马斯亮蓝染色：将电泳后的 SDS-PAGE 凝胶置于考马斯亮蓝染色液中，于脱色摇床室温下染色 1h (80rpm)；染色结束后弃去染色液，倒入考马斯亮蓝脱色液，置于摇床室温下脱色 3h (80rpm)，脱色液需完全覆盖凝胶块，反

复漂洗，期间需更换脱色液 4-5 次，直至凝胶背景蓝色完全脱去。

(2) 糖蛋白染色：采用糖蛋白染色试剂盒（中科（瑞泰）生物科技有限公司）对电泳后的 SDS-PAGE 凝胶进行染色，全程于室温脱色摇床上操作(80rpm)，简要步骤：①超纯水漂洗 SDS-PAGE 凝胶 1 次；②用 50ml 50%甲醇固定 30min；③超纯水漂洗两遍，每次 10min；④氧化 15min；⑤超纯水漂洗 3 次，每次 5min；⑥染色 20min；⑦还原 15min；⑧3%醋酸溶液漂洗 3 次，每次 10min。

染色完成后采用 Bio-Rad 化学发光成像系统进行拍照，Image Lab 5.0 软件对所得图像进行编辑整理。

2.2 烟曲霉糖蛋白的抗原性鉴定

2.2.1 间接 ELISA 法

(1) 烟曲霉糖蛋白抗原与兔抗烟曲霉粗提蛋白多克隆抗体的结合反应

采用兔抗烟曲霉粗提蛋白多克隆抗体对烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白的抗原性进行鉴定。以 0.05M 碳酸盐缓冲液进行稀释，将烟曲霉糖蛋白抗原包被在 96 孔聚苯乙烯微孔板上，烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白包被浓度为 0.5 μ g/ml，每孔 50 μ l，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜后弃液拍干，每孔加入 0.25%酪蛋白封闭液 300 μ l，37 $^{\circ}$ C 快速封闭 2h 后弃去封闭液、拍干，常温风干 10min，用铝箔袋真空密封保存于 4 $^{\circ}$ C。

取烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白板条，恢复至室温，用样品稀释液稀释兔抗烟曲霉粗提蛋白多克隆抗体，从 10 μ g/ml 开始对倍稀释，同法稀释正常兔 IgG 作为对照，50 μ l/孔加样，37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 1h 后，以 0.1%PBST 洗板 5 次，拍干后加入以 20%山羊血清简易酶稀释液稀释 2000 倍的 HRP-羊抗兔 IgG，50 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 30min，0.1%PBST 洗板 10 次后拍干，加入 50 μ l TMB 显色液避光显色 10min，最终加入 50 μ l 0.3M H₂SO₄ 终止显色，用酶标仪检测 A₄₅₀ 值。

(2) 烟曲霉糖蛋白抗原与小鼠抗烟曲霉单克隆抗体的结合反应

采用间接 ELISA 法，包被烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白抗原，与小鼠抗烟曲霉单克隆抗体（F1-F2，F4-F6，F8-F17）反应，以验证其抗原性：

烟曲霉糖蛋白抗原包被浓度为 5 μ g/ml，用样品稀释液将小鼠抗烟曲霉单克隆抗体稀释为 20 μ g/ml 进行加样，50 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 1h 后，以 0.1%PBST

洗板 5 次，拍干后加入以 20%山羊血清简易酶稀释液稀释 3000 倍的 HRP-羊抗小鼠 IgG，50 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 30min，0.1%PBST 洗板 10 次后拍干，加入 50 μ l TMB 显色液避光显色 10min，最终加入 50 μ l 0.3M H₂SO₄ 终止显色，用酶标仪检测 A₄₅₀ 值。

2.2.2 免疫印迹法

首先采用 10% SDS-PAGE 对烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白抗原进行分离：上样量 0.5 μ g/孔，120V 电泳 70min。将电泳后的凝胶进行转印，从正极到负极依次放置纤维垫、滤纸、聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜、凝胶、滤纸、纤维垫，除去气泡后夹紧，固定于转印槽中，倒入预冷的转印缓冲液，冰上 200mA 转印 75min。转印后的 PVDF 膜用含 5%脱脂奶粉室温下封闭 2h 后，适当裁剪并标记。接下来，加入 0.1%TBST 稀释的兔抗烟曲霉粗提蛋白多克隆抗体，稀释为 2 μ g/ml，设置正常兔 IgG 作为对照，常温孵育 2h。0.1%TBST 洗膜 5 遍后，与以 20%山羊血清简易酶稀释液稀释 5000 倍的 HRP-羊抗兔 IgG 室温摇床上孵育 1h，洗膜 5 遍。最后将 ECL 显色液 A、B 液 1: 1 混合显色，采用 Bio-Rad 成像系统进行曝光拍照。

2.3 烟曲霉糖蛋白抗原与曲霉 IgG 抗体阳性血清的反应

2.3.1 间接 ELISA 法

采用经丹娜(天津)生物科技有限公司研制的曲霉 IgG 抗体检测试剂盒检测验证的曲霉 IgG 抗体阳性 (检测浓度>120 AU/ml) 的患者血清 a、b、c，验证烟曲霉糖蛋白抗原与人血清中的曲霉抗体的结合能力，抗原包被浓度为 0.5 μ g/ml，设置混合健康人血清作为对照。简要步骤：用样品稀释液将血清从 1:100 开始对倍稀释，以 50 μ l/孔加样，37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 1h 后，以 0.1%PBST 洗板 5 次，拍干后加入以 20%山羊血清简易酶稀释液稀释 5000 倍的 HRP-羊抗人 IgG，50 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 30min，0.1%PBST 洗板 10 次后拍干，加入 50 μ l TMB 显色液避光显色 10min，最终加入 50 μ l 0.3M H₂SO₄ 终止显色，用酶标仪检测 A₄₅₀ 值。

2.3.2 免疫印迹法

首先采用 10% SDS-PAGE 对烟曲霉糖蛋白抗原进行分离：上样量 0.5 μ g/孔，120V 电泳 70min。将电泳后的凝胶进行转印，从正极到负极依次放置纤维垫、

滤纸、PVDF膜、凝胶、滤纸、纤维垫，除去气泡后夹紧，固定于转印槽中，倒入预冷的转印缓冲液，冰上200mA转印75min。转印后的PVDF膜用含5%脱脂奶粉室温下封闭2h后，适当裁剪并标记。接下来，加入0.1%TBST稀释600倍的曲霉IgG抗体阳性患者a、患者c血清（设置2份健康人血清作为对照），常温孵育2h。0.1%TBST洗膜5遍后，与以20%山羊血清简易酶稀释液稀释5000倍的HRP-羊抗人IgG室温摇床上孵育1h，洗膜5遍。最后将ECL显色液A、B液1:1混合显色，采用Bio-Rad成像系统进行曝光拍照。

3. 结果

3.1 烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白的制备和定量

经BCA法定量获得的烟曲霉菌丝体裂解上清浓度为1.7mg/ml，将制备的裂解上清和培养上清通过无水乙醇纯化沉淀和超滤离心浓缩，利用苯酚-硫酸法对烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白的糖链成分进行定量。测定不同浓度的葡萄糖稀液在波长490nm处的吸光度 A_{490} ，以 A_{490} 作为x轴，葡萄糖溶液标准品浓度作为y轴，作图得到标准曲线（图1-1），该曲线的线性回归方程为： $y=2.2594x-0.8855$ ($R^2=0.9988$)，得到烟曲霉糖蛋白溶液浓度的计算公式： $C(\mu\text{g/ml})=100\times(2.2594\times A_{490}-0.8855)$ ，最终制备得到裂解糖蛋白溶液中的糖链成分浓度为1mg/ml、烟曲霉分泌糖蛋白溶液中的多糖成分浓度为1.375mg/ml，将糖链成分浓度作为后续研究中的参考抗原浓度。

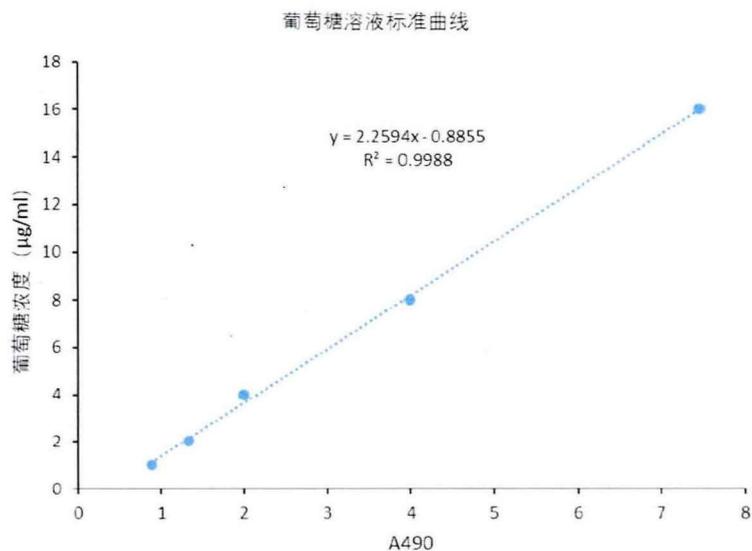


图 1-1 葡萄糖溶液标准曲线（苯酚-硫酸法）

Figure 1-1 Standard curve for determination of glucose solution by phenol-sulfuric acid method

3.2 烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白的性质鉴定

采用 SDS-PAGE 对烟曲霉糖蛋白进行分离和性质鉴定，分别进行考马斯亮蓝染色和糖蛋白染色（图 1-2），并与烟曲霉菌丝体裂解上清进行对比：

（1）烟曲霉裂解糖蛋白纯化自烟曲霉菌丝体裂解上清，考马斯亮蓝染色显示其条带分布范围基本与纯化前保持一致（图 1-2A 泳道 2），但经无水乙醇沉淀纯化和浓缩后明显富集了全细胞裂解上清中的糖蛋白成分，经糖蛋白染色后，可见在分子量在 150-250kDa 间的大分子糖蛋白条带（图 1-2B 泳道 2）。

（2）烟曲霉分泌糖蛋白在考马斯亮蓝染色后可见在 50-75kDa 间两条明显条带（图 1-2A、B 泳道 3），在 150-250kDa 间也具有与大分子糖蛋白条带。另外，考马斯亮蓝染色显示出的 20kDa 附近的模糊条带，在糖蛋白染色时不着色，考虑可能为小分子蛋白或糖基过短，无法达到糖蛋白染色试剂盒的显色下限。

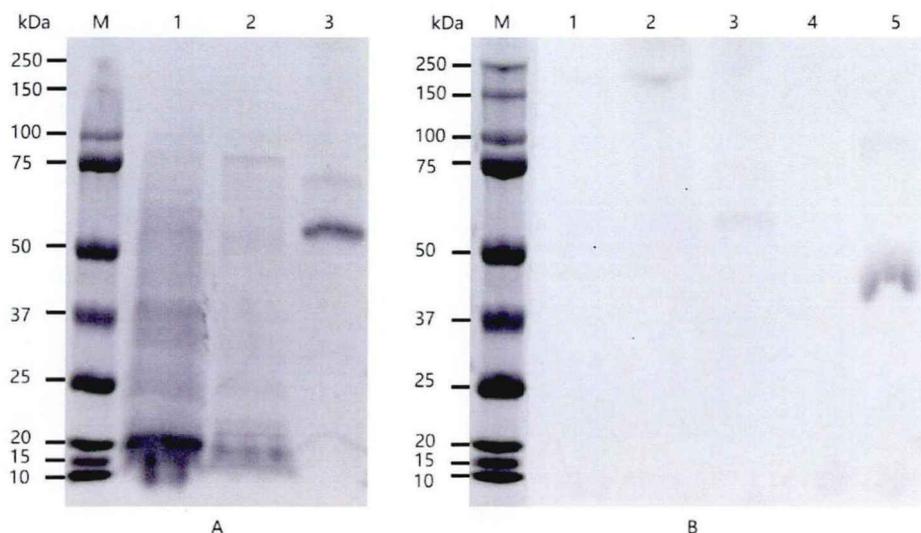


图 1-2 烟曲霉抗原 SDS-PAGE 图像：考马斯亮蓝染色（A），糖蛋白染色（B）

Figure 1-2 SDS-PAGE image of *A. fumigatus* antigens

A: Coomassie brilliant blue staining; B: Glycoprotein staining.

注：M：蛋白 Marker；泳道 1：烟曲霉菌丝体裂解上清；泳道 2：烟曲霉裂解糖蛋白；泳道 3：烟曲霉分泌糖蛋白；泳道 4：糖蛋白染色阴性参照（大豆胰蛋白酶抑制剂）；泳道 5：糖蛋白染色阳性参照（辣根过氧化物酶）

3.3 烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白的抗原性鉴定

3.3.1 烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白能与兔抗烟曲霉多克隆抗体结合

采用间接 ELISA 法，通过与兔抗烟曲霉粗提蛋白多克隆抗体的结合实验，验证烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白的抗原性，结果显示：烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白这 2 种天然抗原以 $0.5\mu\text{g/ml}$ ， $50\mu\text{l/孔}$ 包被时，与兔抗烟曲霉粗提蛋白多克隆抗体呈现剂量依赖性结合（图 1-3A），兔抗烟曲霉粗提蛋白多克隆抗体的结合下限达 $0.078\mu\text{g/ml}$ ，与正常兔 IgG 则无类似的结合反应（图 1-3B）。

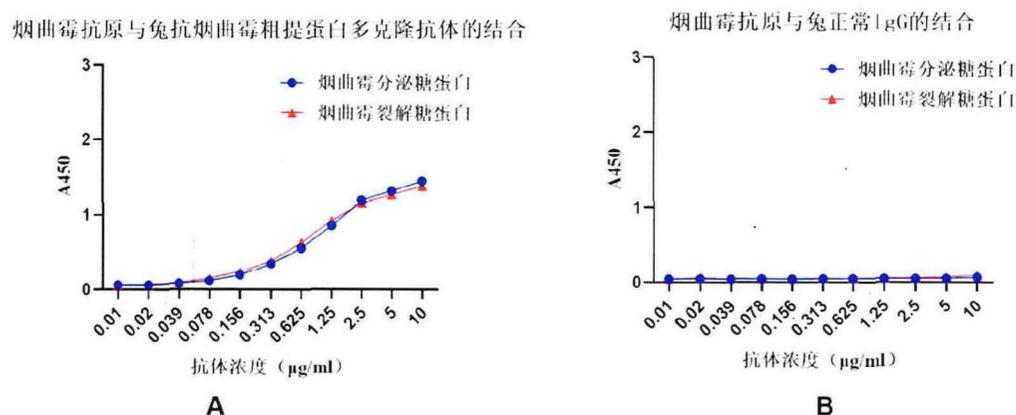


图 1-3 烟曲霉糖蛋白抗原与兔抗烟曲霉粗提蛋白多克隆抗体的结合情况：间接 ELISA 法

Figure1-3 Binding of *A. fumigatus* glycoprotein antigens to rabbit anti-*A. fumigatus* crude protein polyclonal antibody: indirect ELISA method

注：烟曲霉糖蛋白抗原包被浓度均为 0.5µg/ml，以 P/2.1N>1 判断结合下限，P 为实验孔

A450 值，N 为空白对照孔 A450 值

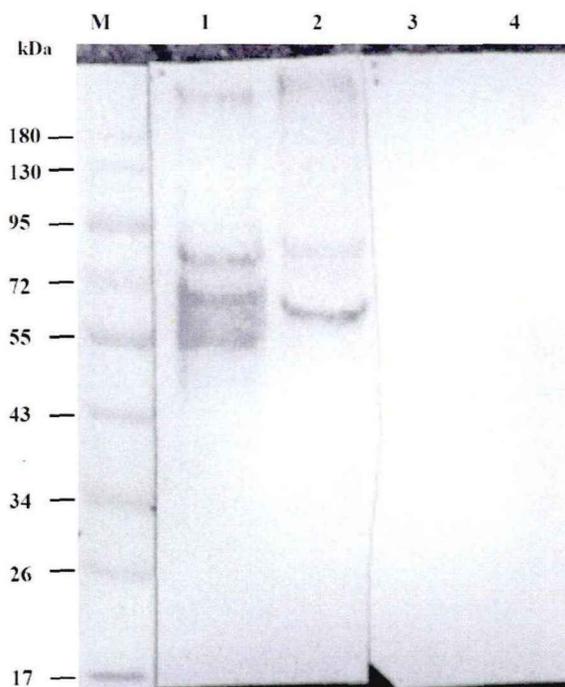


图 1-4 烟曲霉糖蛋白抗原与兔抗烟曲霉粗提蛋白多克隆抗体的结合情况：WB 法

Figure1-4 Binding of *A. fumigatus* glycoprotein antigens to rabbit anti-*A. fumigatus* crude protein polyclonal antibody: Western Blot

注：(1) 烟曲霉糖蛋白抗原上样量均为 0.5µg/孔；(2) 包被蛋白：M: 蛋白 Marker；泳道

1、3：烟曲霉裂解糖蛋白；泳道 2、4：烟曲霉分泌糖蛋白；（3）一抗浓度为 2 μ g/ml；泳道 1、2 为兔抗烟曲霉粗提蛋白多克隆抗体，泳道 3、4 为正常兔 IgG；（4）二抗：1:5000 稀释的 HRP-羊抗兔 IgG

采用免疫印迹法，通过与兔抗烟曲霉粗提蛋白多克隆抗体的结合验证烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白的抗原性，结果显示：兔抗烟曲霉粗提蛋白多克隆抗体与烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白在 43kDa 以上区域具有明显结合条带（图 1-4 泳道 1、2）。

3.3.2 烟曲霉糖蛋白抗原与多株小鼠抗烟曲霉单克隆抗体具有明显结合

采用间接 ELISA 法，通过与小鼠抗烟曲霉单克隆抗体的结合验证烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白的抗原性，结果显示：烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白与多株小鼠抗烟曲霉单克隆抗体有结合（表 1-1），在 15 株小鼠抗烟曲霉单克隆抗体中，烟曲霉裂解糖蛋白主要结合 F1、F4、F6、F8、F10、F16，而分泌糖蛋白主要结合 F1、F4、F9、F11。

表 1-1 烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白与小鼠抗烟曲霉单克隆抗体的结合情况

Table 1-1 Binding of *A. fumigatus* lysate glycoprotein and secreted glycoprotein to mouse anti-*A.*

fumigatus monoclonal antibodies

抗体编号	A ₄₅₀		抗体编号	A ₄₅₀	
	烟曲霉 分泌糖蛋白	烟曲霉 裂解糖蛋白		烟曲霉 分泌糖蛋白	烟曲霉 裂解糖蛋白
F1	<u>2.591</u>	<u>2.379</u>	F11	<u>1.713</u>	0.208
F2	0.13	0.269	F12	0.097	0.168
F4	<u>1.952</u>	<u>2.229</u>	F13	0.119	0.19
F5	0.101	0.149	F14	0.137	0.229
F6	0.462	<u>1.672</u>	F15	0.104	0.239
F8	0.478	<u>2.105</u>	F16	0.493	<u>2.049</u>
F9	<u>1.636</u>	0.18	F17	0.122	0.185
F10	0.212	<u>1.93</u>	B	0.083	0.081

注：“B”为空白对照（样品稀释液）；“A₄₅₀”表示酶标仪在 450nm 波长处的吸光度值。

3.4 烟曲霉糖蛋白抗原与烟曲霉 IgG 抗体阳性患者血清结合良好

3.4.1 间接 ELISA 法

采用经曲霉 IgG 抗体检测试剂盒（丹娜（天津）生物科技有限公司）检测确定曲霉 IgG 抗体阳性的 3 份曲霉病患者血清（a、b、c）对烟曲霉糖蛋白抗原进行间接 ELISA 法结合性验证，采用混合健康人血清混合后作为对照。结果显示：烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白与曲霉 IgG 抗体检测阳性的患者血清在 800 倍稀释度以内具有较强的结合，患者 a 血清稀释 1600 倍后仍具有较强的结合（图 1-5）；混合新鲜健康人血清在低稀释度时与 2 种烟曲霉糖蛋白抗原也具有一定程度的结合。

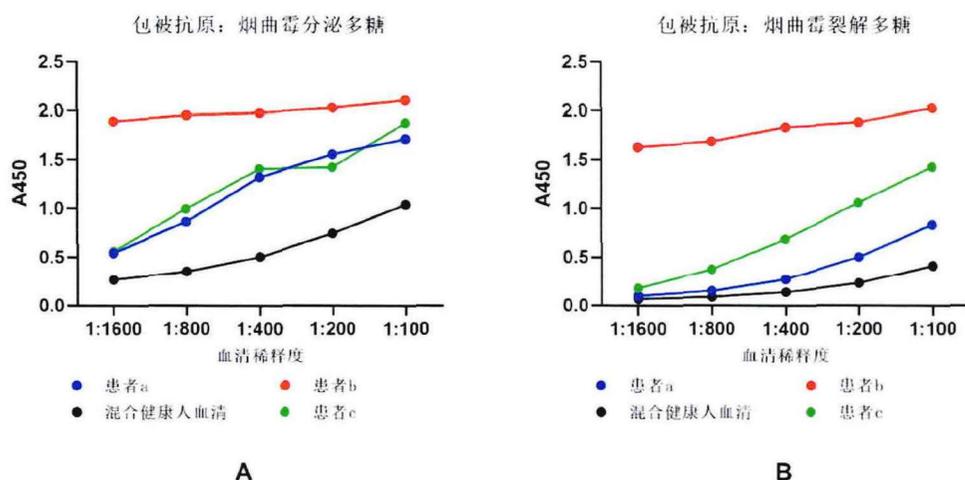


图 1-5 烟曲霉糖蛋白抗原与烟曲霉 IgG 抗体阳性人血清的结合情况

Figure 1-5 Binding of *A. fumigatus* glycoprotein antigens to anti-*Aspergillus* IgG positive serum from human

3.4.2 免疫印迹法

进行免疫印迹法验证时，烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白与曲霉 IgG 抗体阳性患者 a 血清在 43kDa 以上有 4 个明显结合条带（图 1-6A 泳道 1、2），与患者 c 血清结合相对较弱（图 1-6A 泳道 3、4），而在 2 份健康人血清在 1:600 稀释时，仅在 1 份中在 72-95kDa 见 1 条微弱结合条带（图 1-6B 泳道 5、6）。

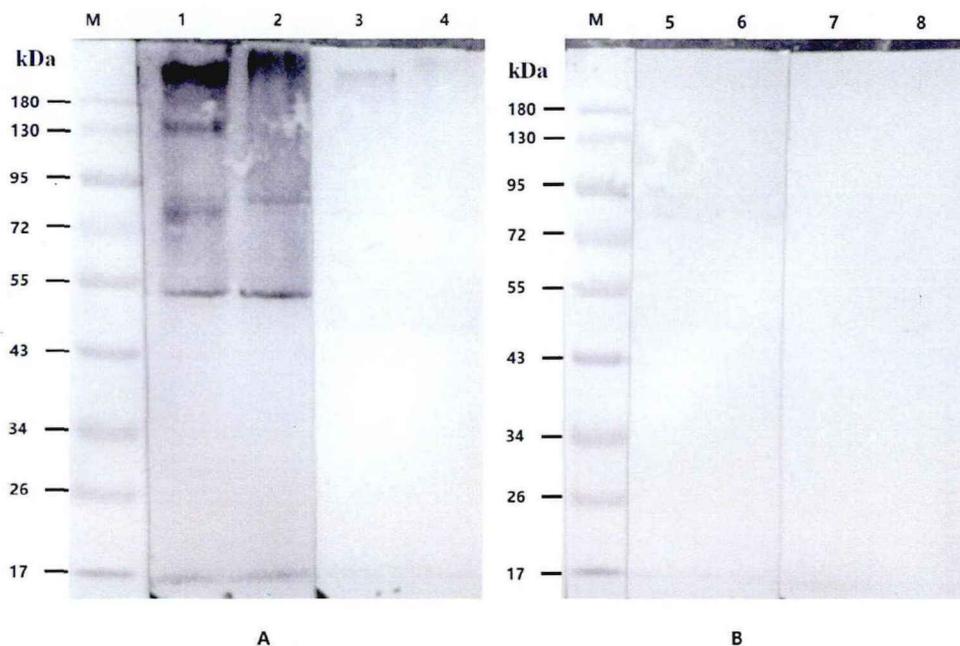


图 1-6 免疫印迹法：烟曲霉糖蛋白抗原与曲霉 IgG 抗体阳性血清及健康人血清的结合
Figure 1-6 West-blot: Binding of *A. fumigatus* glycoprotein antigens to anti-*Aspergillus* IgG positive serum from patients and healthy individuals

注：(1) 烟曲霉糖蛋白上样量均为 0.5 μ g/孔；(2) 包被蛋白：M 为蛋白 Marker；泳道 1、3、5、7 为烟曲霉裂解糖蛋白，泳道 2、4、6、8 为分泌糖蛋白；(3) 一抗：待测血清（稀释 600 倍），泳道 1、2 为曲霉 IgG 抗体阳性患者 a 血清，泳道 3、4 为曲霉 IgG 抗体阳性患者 c 血清，泳道 5-6、7-8 为健康人血清；(3) 二抗：HRP-羊抗人 IgG（稀释 5000 倍）

4. 讨论

肺部的结构损害将为外界环境中的烟曲霉分生孢子提供有利的停留和定植环境，随着宿主天然免疫屏障受损和免疫力下降，能发生致死性的感染。COPD 及支气管扩张等疾病高发于中老年人，环境中的污染物、粉尘等有害物质、吸烟等不良生活习惯是诱发呼吸道恶性肿瘤及过敏性疾病的重要因素^[54]。

近年来，随着化疗药物、免疫抑制剂、糖皮质激素的广泛应用，IA 的危害不断被重视，相应地，这些药物的使用会导致患者对烟曲霉的抵御能力进一步下降。相比于 IA，CPA 的致死率相对较低，但一旦 CPA 侵袭进展为 IPA，死亡率骤升^[15]。CPA 的临床症状、体征和影像学表现不具有特异性，很难被早期识别。肺组织活检进行病理学检查、真菌培养、分子生物学检测能为 CPA 提供准确的诊断，

但活检取材部位的选择对结果影响很大,阳性率不高,且由于活检的有创性,临床上很难依靠肺组织活检对 CPA 患者进行诊断和针对性治疗^[55]。已发表的系列研究中,CPA 患者呼吸道标本的培养阳性率为 56-81%^[14],但根据 2017 年 ESCMID-ECMM-ERS 联合制定的曲霉病诊断管理指南,即使支气管肺泡灌洗液、痰液等标本中培养出烟曲霉,也很难将烟曲霉定植和感染区分开来,不能作为 CPA 的诊断依据,多次培养阳性虽然能相应地增加提示意义^[30],但真菌生长相对细菌缓慢,在有限的住院时长内,很难多次开展培养检测。随着烟曲霉免疫诊断技术的发展,许多医院开始开展血清 GM 抗原检测,但研究显示,其应用价值更多地体现在 IA 的诊断上^[30],可以指导临床对免疫力重度受损的患者开展经验性和预防性抗真菌治疗;血清 GM 抗原检测在 CPA 中的敏感性仅为 13.1%^[25],在支气管肺泡灌洗液标本中检测时 GM 抗原检测的敏感性和特异性具有一定提升,但仍然存在无法与烟曲霉的呼吸道定植区分的缺陷。

曲霉抗体检测是目前 CPA 诊断中能开展的最快速、最具提示意义的辅助诊断手段,指南建议所有怀疑 CPA 或亚急性侵袭性曲霉菌病的患者均应检测曲霉 IgG 抗体或曲霉沉淀素^[14]。除常见的间接 ELISA 检测方法外,还有一些研究基于免疫扩散或免疫电泳对曲霉抗体检测方法进行了开发,但这些方法均尚未得出诊断 CPA 的性能的明确结论^[56,57]。2017 年 ESCMID-ECMM-ERS 联合制定的曲霉病诊断管理指南将德国 Serion 公司、法国 Omega 公司和 Bio-Rad 公司以及中国的丹娜(天津)生物科技股份有限公司研发的曲霉 IgG 抗体检测试剂盒的检测结果作为曲霉病诊断推荐参考证据,然而,在不同的研究中,这些烟曲霉抗体检测方法对 CPA 诊断的敏感性、特异性存在显著差异,仍然无法满足临床需求^[30]。

本实验室前期采用不同的方法制备烟曲霉抗原,尝试开发烟曲霉抗体检测体系,但无论是重组烟曲霉特异性甘露聚糖蛋白抗原还是烟曲霉 GM 模拟多肽抗原,均未能成功建立诊断效能优良的烟曲霉抗体检测方法。本部分研究获取烟曲霉抗体检测体系包被抗原的思路重新聚焦到天然抗原,最终通过体外培养提取和纯化了 2 种烟曲霉糖蛋白抗原,天然抗原虽然是混合物,难以获得高纯度的单一成分,但能提供更多的抗体结合表位。

烟曲霉在生长过程中,细胞壁上的糖链会不断延长,释放到细胞外,烟曲霉菌丝体研磨裂解获得的裂解上清中可能含有一些分泌糖蛋白的共同成分。本研究

制备的烟曲霉裂解糖蛋白和分泌糖蛋白在 SDS-PAGE 凝胶电泳分离后, 通过特殊染色观察, 二者在 150-250kDa 间具有显色相似的糖蛋白条带, 这提示烟曲霉裂解糖蛋白与分泌糖蛋白中确实具有共同成分。另外, 制备获得的烟曲霉裂解糖蛋白与分泌糖蛋白也显示出独特的成分, 烟曲霉分泌糖蛋白在 SDS-PAGE 分离后在 50-75kDa 间具有两条明显条带, 而在裂解糖蛋白中未发现类似分子量的物质, 但是, 考虑到糖蛋白成分在烟曲霉菌丝体和外泌物质中的富集程度不一致, 受限于提取方法和糖蛋白染色试剂盒检测灵敏度, 无法显色浓度过低或糖基过短的糖蛋白, 本研究制得的两种烟曲霉糖蛋白是否含有特定的糖蛋白成分仍然是不确定的, 这也是不同制备方法获得的天然抗原结合烟曲霉特异性抗原的能力不一致的原因之一。

我们分别采用 ELISA 法和 WB 法反复检验了烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白结合烟曲霉特异性抗体的能力。进行间接 ELISA 检测时, 2 种烟曲霉糖蛋白抗原在同浓度包被下与实验前期制备的兔抗烟曲霉多克隆抗体结合曲线几近一致, 兔抗烟曲霉多克隆抗体的结合下限均为 $0.078\mu\text{g/ml}$, 与正常兔 IgG 则无交叉结合。经过 WB 法的验证, 发现兔抗烟曲霉多克隆抗体与 2 种抗原的结合条带均有在 43kDa 以上的结合条带, 但条带位置却是不完全一致, 这也进一步证明了研究制备获得的烟曲霉裂解糖蛋白与分泌糖蛋白能提供不同的抗体结合位点, 这意味着分别采用烟曲霉裂解糖蛋白和分泌糖蛋白建立烟曲霉抗体检测方法, 检测结果可能是不一致的。。

烟曲霉裂解糖蛋白与分泌糖蛋白能结合不同的抗体, 这一结论在与小鼠抗烟曲霉单克隆抗体的结合实验中也同样得到了验证, 烟曲霉裂解糖蛋白主要结合 F1、F4、F6、F8、F10、F16, 而分泌糖蛋白主要结合 F1、F4、F9、F11。

鉴于课题组前期制备的烟曲霉 GM 模拟多肽抗原与特异性兔抗烟曲霉多克隆抗体及小鼠抗烟曲霉单克隆抗体结合良好, 但与曲霉感染患者血清中的烟曲霉抗体结合不佳。本部分研究还采用经商品化曲霉 IgG 抗体检测阳性的曲霉病患者血清对制备获得的烟曲霉抗原进行抗原性验证, 本部分研究制备获得的烟曲霉裂解糖蛋白与分泌糖蛋白与曲霉感染患者血清中的烟曲霉抗体结合良好, 具有作为烟曲霉抗体检测体系的包被抗原的潜力。

另外, 免疫印迹结果表明, 烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白与 1 份健康人血

清在 72-95 kDa 间具有微弱结合，这与间接 ELISA 方法结果是可以相互印证的，而且这一结果也再次证明部分健康人清中具有烟曲霉特异性抗体，与实验室前期在 IVIG 中的研究结果相符。实际上，对于健康人血清中的烟曲霉特异性抗体的研究早有由来，有研究对烟曲霉沉淀素检测的阴性健康人参比血清中的烟曲霉沉淀素抗体水平进行了报道，不同个体的健康人血清中的烟曲霉沉淀素水平存在较大差异^[58]。这提示下一步建立烟曲霉抗体检测体系时，必须对阴性参照血清进行谨慎选择，需要通过优化实验条件，区分健康人和真正的 CPA 患者。

总而言之，本部分研究成功制备了烟曲霉裂解糖蛋白与分泌糖蛋白，这 2 种烟曲霉天然抗原与实验室前期制备的特异性烟曲霉抗体及曲霉 IgG 抗体阳性患者血清均能明显结合，能为 CPA 患者血清中的烟曲霉特异性抗体提供有效的结合表位，为后续建立烟曲霉抗体间接 ELISA 检测方法奠定了基础。

第二部分 烟曲霉抗体间接 ELISA 检测体系的建立

本文第一部分的研究从烟曲霉天然培养物中成功制备获得了能与特异性烟曲霉抗体结合的烟曲霉裂解糖蛋白及分泌糖蛋白,为本部分建立烟曲霉抗体间接 ELISA 检测体系提供了原料。

酶联免疫吸附检测技术是特定靶标蛋白质定量的金标准,结果较为快速、稳定且易于分析。间接 ELISA 法作为最常用的抗体检测方法,被广泛用于细菌、病毒、寄生虫等免疫辅助诊断技术的开发和研究,但无可避免地,变更间接 ELISA 法的实验条件会对结果造成很大的影响,优化实验条件、降低血清本底和非特异性交互反应对结果的影响十分必要。

因此,本部分研究旨在基于间接 ELISA 检测方法,对烟曲霉裂解糖蛋白及分泌糖蛋白的包被浓度、待测血清稀释度、酶标抗体稀释度等实验条件进行调整,通过纳入 CPA 患者血清及健康人血清进行检测,建立受试者工作特征曲线(receiver operator characteristic curve, ROC 曲线),筛选出最优的烟曲霉抗体检测体系,并与丹娜(天津)生物科技股份有限公司研发的商品化曲霉 IgG 抗体检测试剂盒进行比较和初步评价。

1. 材料

1.1 烟曲霉抗原

烟曲霉裂解糖蛋白、烟曲霉分泌糖蛋白:采用无水乙醇沉淀法分别从烟曲霉菌丝体裂解上清和培养上清中提取纯化(详见第一部分)。

1.2 血清

1.2.1 曲霉 IgG 抗体阳性血清:采集自肺曲霉感染患者,由北京中日友好医院呼吸与危重症医学部临床微生物与感染实验室、南方医科大学珠江医院检验科提供,采用丹娜(天津)生物科技股份有限公司生产的曲霉 IgG 抗体检测试剂盒检测确认曲霉 IgG 抗体为阳性(检测浓度 >120 AU/ml)。

1.2.2 健康人血清:由南方医科大学珠江医院检验科提供,为 2022 年 10 月-

2022年11月随机收集的85份健康人血清。

1.2.3 CPA 患者血清：由南方医科大学珠江医院检验科提供，依据 2017 年 ESCMID-ECMM- ERS 联合制定的曲霉病的诊断管理指南制定纳排标准。

纳入标准：(1) 慢性肺部病程>3 个月，伴有慢性咳嗽、呼吸困难、咯血等下呼吸道感染的临床症状。(2) 影像学证据：满足慢性肺曲霉病肺部持续、稳定、缓慢进展的胸部影像学检查，如：进行性空洞浸润、真菌球、空腔周围纤维化、斑片影等。(3) 病原学证据：①曲霉 IgG 抗体检测阳性；②活检证据：肺组织病理检查见曲霉菌丝、培养出曲霉或烟曲霉 PCR 检测到烟曲霉序列；③在支气管肺泡灌洗液、胸水、下呼吸道分泌物培养分离到烟曲霉生长；④血清 GM 试验检测阳性 ($GMI \geq 1$) 或支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中 GM 试验检测 $GMI \geq 0.8$ 。

诊断标准：当同时满足纳入标准的 (1) + (2) + (3) 中的①或②时，分类为 CPA 确诊患者；当满足 (1) + (2) + (3) 中的③或④时，分类为 CPA 疑似患者。

排除标准：(1) 具有明显免疫缺陷患者：①1 月内接受过或正在接受免疫抑制剂治疗；②持续使用糖皮质激素治疗达 3 周以上；③2 月内出现过大于 10 天以上的外周血中性粒细胞减少；④发生血液系统恶性肿瘤；⑤3 个月内采用 T 细胞或 B 细胞免疫抑制剂治疗；⑥进行器官或骨髓移植；⑦患有艾滋病或其他免疫缺陷性疾病。(2) 排除实验室或样本污染等情况。

注：本研究采用的血清已通过南方医科大学珠江医院临床研究中心伦理审查，批件号：2021-KY-075-01。

1.3 主要试剂、耗材

主要试剂：曲霉 IgG 抗体检测试剂盒购买自丹娜(天津)生物科技股份有限公司；HRP 标记的山羊抗人 IgG、TMB 显色液、20%山羊血清简易酶稀释液、样品稀释液 (0.1%BSA-1×PBS 溶液)、0.25%酪蛋白封闭液、0.1% PBST、抗原包被液 (0.05M 碳酸盐缓冲液)、终止液 (0.3M H_2SO_4 溶液)。试剂来源详见第一部分 1.4，液体配置方法详见附录 1。

耗材：一次性各规格 EP 离心管、96 孔聚苯乙烯微孔板、各规格加样枪头、

各规格玻璃瓶、玻璃量筒、玻璃试管、小青瓶、玻璃平皿。耗材来源详见第一部分 1.4。

1.4 主要仪器

涡旋振荡器、桌面微型离心机、洗板机、酶标仪、电子天平、恒温水浴锅、磁力搅拌器、单式真空（充气）包装机，设备信息及来源详见第一部分 1.5。

2. 方法

2.1 样本收集和补充检测血清曲霉 IgG 抗体

参照本部分中 1.2 所示的样本纳排方法进行样本纳入和收集，保存至 -20°C ，采用购买自丹娜(天津)生物科技股份有限公司的曲霉 IgG 抗体检测试剂盒对初步纳入样本进行曲霉 IgG 抗体的补充检测，简要实验步骤：

(1) 样本稀释：用样本稀释液 (R5) 将待测血清稀释 1000 倍（即在 1ml R5 稀释液中加入 $1\mu\text{l}$ 待测血清）；(2) 加样孵育：第一孔设置为空白对照，依次加入 5 个水平的标准品、质控品 A、质控品 B、稀释好的待测血清， $100\mu\text{l}/\text{孔}$ ， 37°C 水浴孵育 1h；(3) 洗板：采用 1x 洗涤液洗板 3 次，每洗 1 次拍干 1 次；(4) 再次孵育：加入酶标抗体 R3， $100\mu\text{l}/\text{孔}$ ， 37°C 水浴孵育 30min；(5) 再次洗板：采用 1x 洗涤液洗板 3 次，每洗 1 次拍干 1 次；(6) 显色：加入底物液 (R6)， $100\mu\text{l}/\text{孔}$ ，避光显色 15min；(7) 终止显色、读数：每孔加入 $50\mu\text{l}$ 终止液 (R7) 终止显色，用酶标仪检测 A_{450} 值；(8) 定量计算：以曲霉 IgG 抗体浓度为横坐标， A_{450} 值为纵坐标，横坐标取对数，做曲线回归方程，根据标准曲线计算待测样本中曲霉 IgG 抗体浓度。

2.2 烟曲霉抗体间接 ELISA 检测体系实验条件的初步筛选

首先采用曲霉 IgG 抗体阳性的曲霉感染患者 a、b、c 的血清进行梯度稀释，设置 3 份健康人血清作为对照，对抗烟曲霉抗体检测间接 ELISA 体系的抗原包被浓度、酶标抗体稀释度、待测血清稀释度进行选择，最终选取操作便捷、节省原料、能较明显区分曲霉 IgG 抗体阳性的患者血清与健康人血清的实验条件作

为大批量血清样本烟曲霉抗体检测的实验条件。

ELISA 板条制备：将烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白以 0.05M 碳酸盐缓冲液稀释包被在 96 孔聚苯乙烯微孔板上，包被浓度为 1 μ g/ml、0.5 μ g/ml、0.2 μ g/ml、0.1 μ g/ml，每孔 50 μ l，4 $^{\circ}$ C 过夜后弃液拍干，每孔加入 0.25% 酪蛋白封闭液 300 μ l，37 $^{\circ}$ C 快速封闭 2h 后弃去封闭液拍干，常温风干 10min，用铝箔袋真空密封保存于 4 $^{\circ}$ C。

间接 ELISA 简要步骤：将板条取出恢复至室温备用，用样品稀释液将人血清进行 1:400、1:600、1:800、1:1000 稀释，50 μ l/孔进行加样，37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 1h 后，以 0.1%PBST 洗板 5 次，拍干后加入以 20% 山羊血清简易酶稀释液稀释 5000 倍、3000 倍的 HRP-羊抗人 IgG，50 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 30min，0.1%PBST 洗板 8 次后拍干，加入 50 μ l TMB 显色液避光显色 10min，最终加入 50 μ l 0.3M H₂SO₄ 终止显色，用酶标仪检测 A₄₅₀ 值。

2.3 烟曲霉抗体间接 ELISA 检测体系实验条件的确定

根据 2.2 对烟曲霉抗体检测间接 ELISA 体系的包被浓度、待测血清稀释度进行初步选择后，调整酶标抗体稀释度，初步建立多种烟曲霉抗体间接 ELISA 检测体系，对纳入的 CPA 患者血清、健康人血清进行检测，绘制 ROC 曲线，根据曲线下面积 (area under curve, AUC) 大小选择最优的烟曲霉抗体间接 ELISA 检测体系实验条件，将其确定为后续研究中的实验体系。

2.4 统计分析

获得的检测结果为吸光度值 (A₄₅₀)，为计量资料，采用 Excel 对数据进行汇总管理和作图，用 IBM SPSS Statistics 21 对数据进行统计分析、绘制 ROC 曲线，选取约登指数最大处的 A₄₅₀ 值^[32]或根据实际情况选取合适的截断值，进行诊断性试验评价，不同检测方法之间结果一致性的比较采用 Kappa 检验。

统计方法基本原则：所有统计推断采用双侧检验，检验水准取 $\alpha=0.05$ ，参数的可信区间估计采用 95% 可信区间。

3. 结果

3.1 纳入样本特征

共收集到来自 49 例 CPA 患者的 51 份血清（患者 13 和患者 35 在住院期间进行了多次采血，收集的 2 份血清采血时间间隔 3 天以上），85 份来自健康体检中心的健康人血清样本。采用商品化曲霉 IgG 抗体检测试剂盒对病例组和对照组血清补充检测曲霉 IgG 抗体：49 例 CPA 患者中，10 例患者血清曲霉 IgG 抗体检测为阳性（表 2-1），1 例肺组织活检查见曲霉菌丝，依照诊断标准确诊为 CPA 患者，余 38 例为疑诊患者。

表 2-1 CPA 患者的曲霉 IgG 抗体检测结果（商品化试剂盒）

Table 2-1 Results of anti-*Aspergillus* IgG antibody by commercial kit in patients with CPA

类别	编号	基础疾病	GM 抗原	曲霉 IgG 抗体	
			GMI	浓度 (AU/ml)	
确诊	患者 01	支气管肺癌	2.545	217.29	(+)
确诊	患者 02	支气管扩张	1.22	223.00	(+)
疑诊	患者 03	肺结核、支气管扩张	2.449	65.71	(-)
疑诊	患者 04	鼻咽癌术后	0.885	67.59	(-)
疑诊	患者 05	支气管肺癌	2.188	67.91	(-)
疑诊	患者 06	哮喘	1.779	14.79	(-)
确诊	*患者 07	慢性肺曲霉病	1.681	93.82	灰区
疑诊	患者 08	COPD	3.786	54.02	(-)
确诊	患者 09	COPD	3.933	473.58	(+)
疑诊	患者 10	支气管肺癌	1.354	26.06	(-)
疑诊	患者 11	支气管肺癌	1.902	18.17	(-)
疑诊	患者 12	特发性肺纤维化	1.262	29.60	(-)
疑诊	患者 13a	支气管肺癌、COPD	1.396	24.63	(-)
	患者 13b	支气管肺癌、COPD	-	23.55	(-)
疑诊	患者 14	支气管肺癌	3.313	51.29	(-)
疑诊	患者 15	支气管肺癌	1.04	26.87	(-)

类别	编号	基础疾病	GM 抗原	曲霉 IgG 抗体	
			GMI	浓度 (AU/ml)	
疑诊	患者 16	肺结核	0.964	15.33	(-)
确诊	患者 17	COPD、肺结核	1.486	133.99	(+)
疑诊	患者 18	COPD	2.560	88.24	灰区
疑诊	患者 19	COPD	1.656	13.43	(-)
疑诊	患者 20	支气管扩张	2.268	42.97	(-)
疑诊	患者 21	支气管扩张	4.841	64.94	(-)
疑诊	患者 22	COPD	3.189	44.10	(-)
确诊	患者 23	支气管扩张	1.698	497.36	(+)
疑诊	患者 24	哮喘	1.236	27.97	(-)
疑诊	患者 25	COPD	3.846	34.59	(-)
确诊	患者 26	COPD	2.332	235.89	(+)
疑诊	患者 27	COPD	2.04	27.51	(-)
疑诊	患者 28	COPD	1.089	103.59	灰区
疑诊	患者 29	曲霉菌肺炎	3.434	26.62	(-)
疑诊	患者 30	COPD	1.066	32.07	(-)
确诊	患者 31	慢性肺曲霉病	1.822	469.38	(+)
疑诊	患者 32	曲霉菌肺炎	3.909	67.75	(-)
疑诊	患者 33	COPD	2.087	28.37	(-)
疑诊	患者 34	支气管扩张	2.569	56.90	(-)
确诊	患者 35a	支气管哮喘	4.459	142.61	(+)
	患者 35b	支气管哮喘	-	138.14	(+)
疑诊	患者 36	支气管肺癌	3.515	15.51	(-)
疑诊	患者 37	曲霉菌肺炎	4.84	14.69	(-)
确诊	患者 38	肺纤维化	4.214	367.71	(+)
疑诊	患者 39	肺脓肿	7.986	23.38	(-)
疑诊	患者 40	支气管肺癌 (占位)	9.388	25.57	(-)
疑诊	患者 41	COPD	1.026	67.94	(-)

类别	编号	基础疾病	GM 抗原	曲霉 IgG 抗体	
			GMI	浓度 (AU/ml)	
疑诊	患者 42	COPD	2.096	94.71	灰区
确诊	患者 43	COPD	1.737	251.63	(+)
疑诊	患者 44	曲霉菌肺炎	1.716	32.00	(-)
疑诊	患者 45	曲霉菌肺炎	2.069	54.28	(-)
疑诊	患者 46	COPD	5.122	29.95	(-)
疑诊	患者 47	曲霉菌肺炎	5.015	15.99	(-)
疑诊	患者 48	曲霉菌肺炎	2.098	40.80	(-)
疑诊	患者 49	COPD	1.715	89.55	灰区

注：“GM 试验”为采用 Bio-Rad 公司曲霉 GM 检测试剂盒 (Platelia Aspergillus Ag) 测得，GMI 为该试剂盒制定方法计算获得的指数， $GMI = \frac{\text{样本吸光度值}}{\text{两 cut off 质控孔吸光度值}}$ ，血清 GMI 大于 0.5 为“GM 抗原检测阳性”，GMI 约大，患曲霉感染的风险越高；曲霉 IgG 抗体浓度为根据曲霉 IgG 抗体检测试剂盒标准品作出的标准曲线对曲霉 IgG 抗体检测的吸光度值的定量转化；“灰区”为根据试剂盒要求，定义为浓度在 80-120 AU/ml 之间的结果描述；“COPD”为慢性阻塞性肺疾病；*患者 07 肺穿刺活检查见曲霉菌丝

在本研究纳入的 49 例 CPA 患者中，大部分患者具有慢性肺部病变基础，36.7% 的患者为 COPD 患者(表 2-2)，曲霉 IgG 抗体检测阳性率为 20.4%(10/49)，而 GM 抗原检测阳性率高达 95.9%，6 例 (12.2%) 患者在痰培养中培养出烟曲霉生长。另一方面，这些 CPA 患者中包含 9 例支气管肺癌患者，仅 1 例曲霉 IgG 抗体明显升高，这些患者在就诊前已进行过化疗或手术治疗，一般情况较差。有 7 例患者虽然曲霉 IgG 抗体检测为阴性，但临床诊疗过程中高度怀疑曲霉菌感染，并进行了针对性的抗真菌用药。

表 2-2 CPA 患者特征

Table 2-2 Characteristics of patients with CPA

		N=49	n (%)
年龄 (均>30 岁, 平均年龄 67.27 岁)			
性别			
男性		32 (65.3%)	女性 17 (34.7%)

基础疾病

COPD	18 (36.7%)	继发性肺结核	4 (8.2%)
高血压	14 (28.6%)	损毁肺	4 (8.2%)
糖尿病	9 (18.4%)	脑梗死	4 (8.2%)
肾功能不全	5 (10.2%)	肺结节	3 (6.1%)
肺恶性肿瘤	9 (18.4%)	新型冠状病毒感染	3 (6.1%)
支气管扩张	6 (12.2%)	支气管哮喘	3 (6.1%)
冠心病	6 (12.2%)	肺脓肿	2 (4.1%)
肝功能不全	5 (10.2%)	肺纤维化	2 (4.1%)
重症肺炎	5 (10.2%)	肺栓塞	1 (1.7%)

曲霉菌相关检测

血清 GM(GMI>1.0)	47 (95.9%)	痰培养曲霉生长	6 (12.2%)
曲霉 IgG 抗体 (浓度>120AU/ml)			10 (20.4%)

3.2 烟曲霉抗体间接 ELISA 检测体系实验条件的初步选择

采用曲霉 IgG 抗体阳性的曲霉病患者 a、b、c 血清进行梯度稀释检测，同时设置混合健康人血清作为对照，对间接 ELISA 实验条件的抗原包被浓度和血清稀释度进行初步选择（图 2-1）。结果显示：曲霉 IgG 抗体阳性的患者 a 血清在不同浓度包被的烟曲霉裂解糖蛋白、分泌糖蛋白的检测体系中，检测 A_{450} 值均较高（图 2-1 A、B），患者 b、c 则与烟曲霉分泌糖蛋白结合更强（图 2-1 C-F），混合健康人血清与烟曲霉分泌糖蛋白的结合在低血清稀释度和高抗原包被浓度时，也具有较高的吸光度（图 2-1 G、H）。建立体系需要适当降低本底，选定烟曲霉裂解糖蛋白抗原包被浓度 $0.5\mu\text{g/ml}$ ，分泌糖蛋白抗原包被浓度 $0.2\mu\text{g/ml}$ ，血清稀释 600 倍的实验条件进行下一步评估。

第二部分 烟曲霉抗体间接 ELISA 检测体系的建立

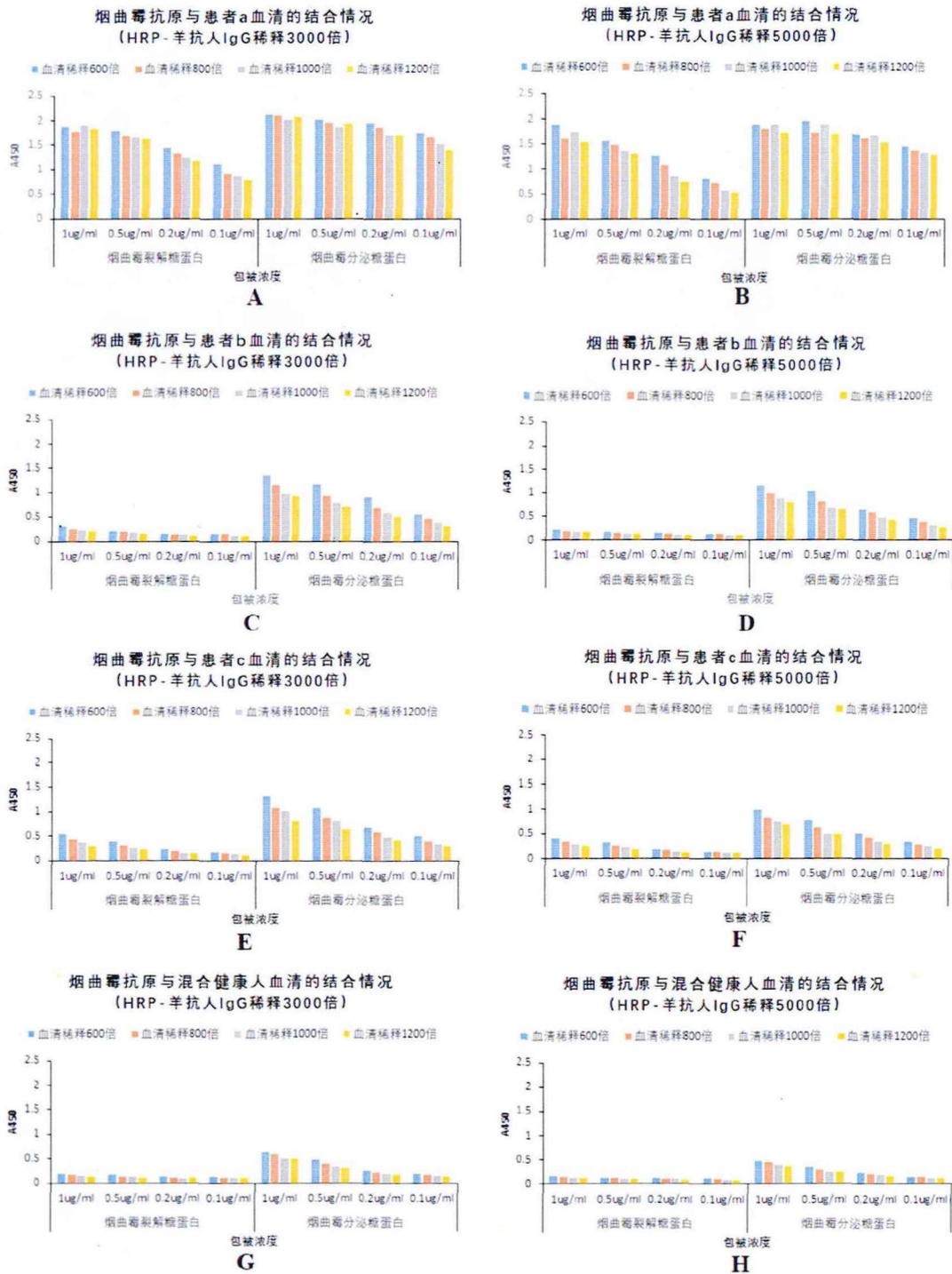


图 2-1 血清稀释倍数、抗原包被浓度、HRP-羊抗人 IgG 稀释度的初步选择

Figure 2-1 Preliminary selection of serum dilution ratio, antigen coating concentration, and goat anti-human IgG antibody conjugated with HRP dilution ratio

3.3 最优烟曲霉抗体间接 ELISA 检测体系实验条件的确定

采用 3.2 中选定的实验条件，调整酶标抗体浓度，建立了 4 种烟曲霉抗体间接 ELISA 检测体系，对病例组（CPA 患者）和对照组（健康人）血清进行检测，得到 ROC 曲线（图 2-2），根据 AUC 选取最优的检测体系。当将烟曲霉分泌抗原包被为 0.2 $\mu\text{g/ml}$ ，将酶标抗体 HRP-羊抗人 IgG 稀释 3000 倍建立方法进行检测时，获得的 AUC 最大（表 2-3），为 0.620 [0.527, 0.714] ($P=0.014$)，其他三种方法的 AUC 均无统计学意义。至此，得到了最佳的烟曲霉特异性抗体检测体系实验条件，即：采用烟曲霉分泌糖蛋白作为包被抗原，包被浓度为 0.2 $\mu\text{g/ml}$ ，待测血清稀释 600 倍、酶标抗体 HRP-羊抗人 IgG 稀释 3000 倍进行检测。

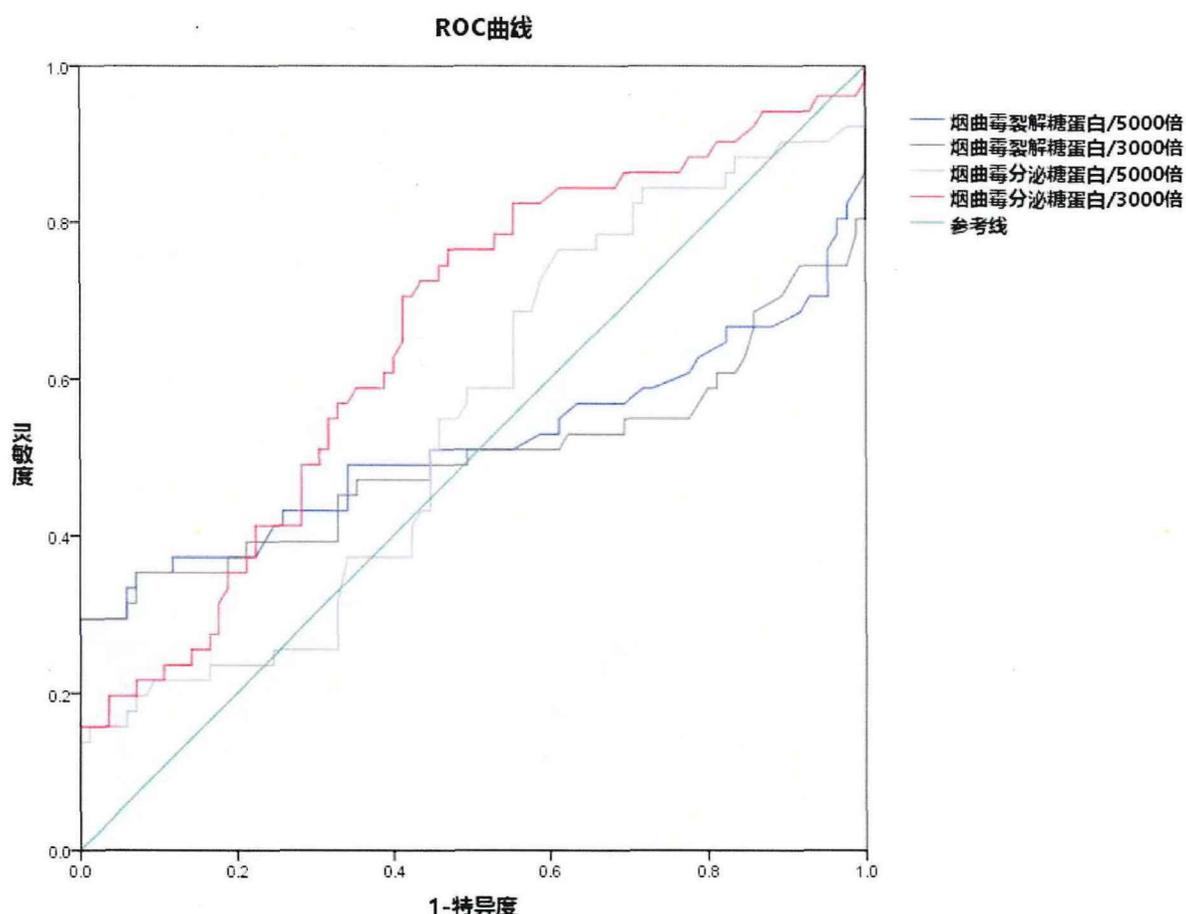


图 2-2 不同的自建烟曲霉抗体检测体系的 ROC 曲线

Figure 2-2 ROC curves of different self-built anti-*A. fumigatus* antibody detection systems

注：烟曲霉裂解糖蛋白包被为 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ；烟曲霉分泌糖蛋白包被为 0.2 $\mu\text{g/ml}$ ；3000 倍、

5000 倍为酶标抗体 HRP-羊抗人 IgG 的稀释度

采用最优的自建烟曲霉抗体检测体系进行诊断性实验评价, 约登指数最大值为 0.294, 此时 A_{450} 的截断值为 0.127 时, 特异度为 58.8%, 灵敏度为 70.6%, 为适应临床检测实际情况, 该截断值是不合适的, 易造成大量假阳性结果, 分析 ROC 曲线上其他截断值所对应的特异度、灵敏度 (表 2-4) 发现: A_{450} 的截断值为 0.3 时, 特异度为 96.5%, 灵敏度为 19.6%, 在 CPA 患者人群中的检测阳性率为 17.6% (9/51), 健康人中也有 3 例检测为阳性 (3.5%)。

表 2-3 不同的自建烟曲霉抗体检测体系的 AUC

Table2-3 AUC of different self-built anti-*A. fumigatus* antibody detection systems

包被抗原	HRP-羊抗人 IgG 稀释度	AUC [95%CI]	标准误	P
烟曲霉裂解糖蛋白 (0.5 μ g/ml)	5000 倍 3000 倍	0.515 [0.396, 0.634] 0.548 [0.447, 0.650]	0.061 0.052	0.772 0.345
烟曲霉分泌糖蛋白 (0.2 μ g/ml)	5000 倍 3000 倍	0.497 [0.378, 0.617] 0.655 [0.559, 0.750]	0.061 0.049	0.961 0.003

注: 检验水准取 0.05

表 2-4 不同的最优自建烟曲霉抗体检测体系截断值对应的诊断性能

Table2-3 Performance corresponding to different cut-off values on the optimal self-built anti-*A. fumigatus* antibody detection system

A_{450} 截断值	0.127*	0.149	0.203	0.300	0.436	0.499
特异度	58.8%	68.2	84.7%	96.5%	98.8%	100%
灵敏度	70.6%	52.9	25.5%	19.6%	15.7%	13.7%

注: 0.127 为约登指数最大处对应的 A_{450} 截断值

3.4 最优自建烟曲霉抗体检测体系与商品化试剂盒的比较

采用商品化曲霉 IgG 抗体检测试剂盒同步对 CPA 患者和健康人样本检测与最优自建体系进行比较, ROC 曲线如图 2-3, AUC 为 0.455 [0.348, 0.559], 劣于本研究建立的最优自建体系 (0.455 vs. 0.655) (表 2-5)。

表 2-5 商品化曲霉 IgG 抗体检测试剂盒与最优自建烟曲霉抗体检测体系的 AUC 比较

Table2-5 The AUC of commercialized anti-*Aspergillus* IgG antibody detection kit and the optimal self-built anti-*A. fumigatus* antibody detection system

包被抗原	AUC [95%CI]	标准误	P
自建最优烟曲霉抗体检测体系	0.655 [0.559, 0.750]	0.049	0.003
商品化曲霉 IgG 抗体检测试剂盒	0.455 [0.348, 0.563]	0.055	0.382

注：检验水准取 0.05

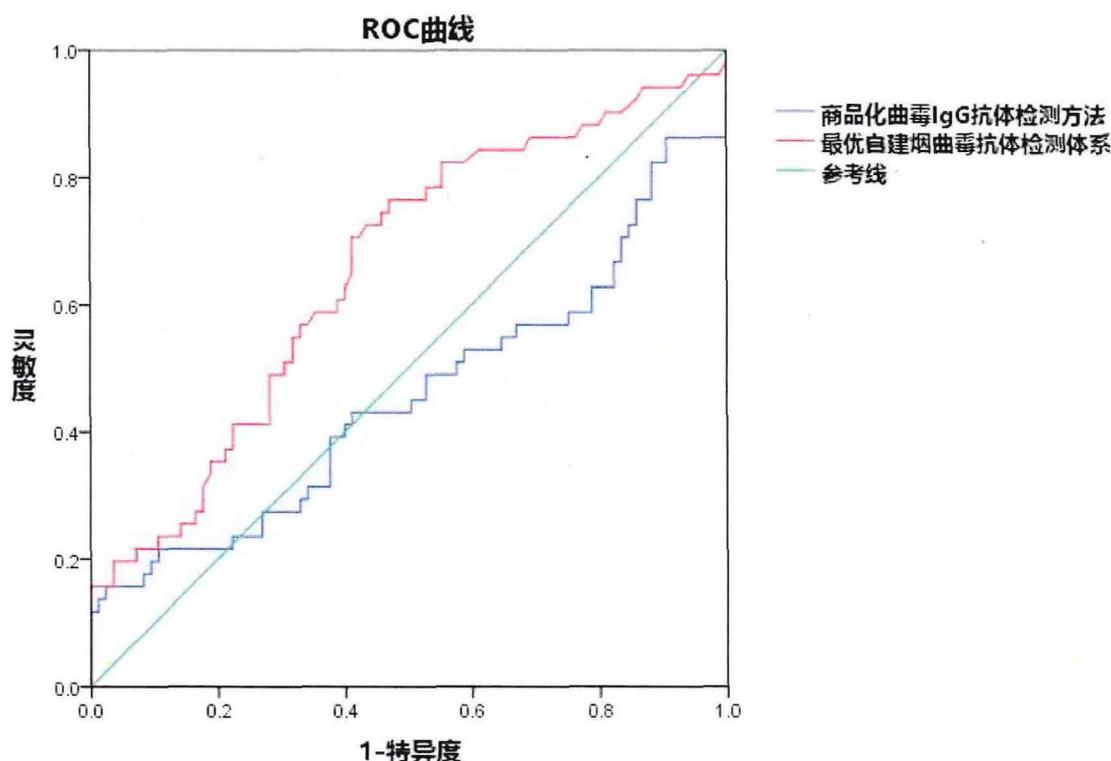


图 2-3 采用商品化曲霉 IgG 抗体检测试剂盒和最优自建烟曲霉抗体检测体系的 ROC 曲线

Figure 2-3 The ROC curve obtained by using commercialized anti-*Aspergillus* IgG antibody detection kit and the optimal self-built anti-*A. fumigatus* antibody detection system

依据试剂盒标准，特异度为 63.0%，灵敏度为 39.3%，在 CPA 患者人群中的检测阳性率为 21.6% (11/51)，在健康人中的阳性率为 17.6% (15/85)，另外还有 20.0% (17/85) 的健康人血清检测结果处于试剂盒规定的灰区范围。对两种方法进行一致性检验 (表 2-6)，两种曲霉抗体检测方法在病例组中的检测较一致，Kappa 值为 0.752 ($P < 0.001$)，但自建烟曲霉抗体检测体系在健康人血清中的假阳性率更低 (3.5% vs. 17.6%)。

表 2-6 最优自建体系与商品化曲霉 IgG 抗体检测试剂盒的一致性检验

Table 2-6 Consistency test between the optimal self-built anti-*A. fumigatus* antibody detection system and commercialized anti-*Aspergillus* IgG antibody detection kit

	Kappa 值	渐进标准误	近似值	P
对照组	0.049	0.092	0.655	0.513
病例组	0.752	0.117	5.411	<0.001

注：检验水准取 0.05

4. 讨论

第一部分的研究表明烟曲霉裂解糖蛋白及分泌糖蛋白均具有作为烟曲霉抗体检测体系包被抗原的潜力，经过对实验条件的筛选，最终发现，对 CPA 患者进行诊断的最优自建烟曲霉抗体检测体系所采用的包被抗原为烟曲霉分泌糖蛋白。实际上，本研究纳入的参比商品化试剂盒在研发过程中所采用的包被抗原也是从烟曲霉培养物中纯化所得的 GM 抗原，这可能提示引起 CPA 患者免疫应答产生抗体的主要免疫原是烟曲霉定植生长过程中产生的分泌代谢物，烟曲霉细胞壁结构性糖蛋白与外泌的分泌性糖蛋白虽然含有部分相同的成分，但采用分泌性糖蛋白作为烟曲霉抗体检测的包被抗原，更能获得高效的诊断体系。

有研究显示，曲霉菌 IgG 抗体检测（丹娜）在 CPA 诊断中的敏感度和特异度分别为 84.1%和 89.6%^[36]，而血清 GM 检测的敏感度仅 13.43%^[25]。然而，在病例组中，相比文献报道的阳性率，本研究纳入的 CPA 患者人群阳性率相对较低（20.4%），敏感性差，而 GM 抗原检测阳性率高达 95.6%，与其他研究中报道的数据不符，这考虑与本研究纳入样本的过程为回顾性地收集临床样本有关，纳入的病例组包括少部分曾进行过化疗的支气管肺肿瘤患者，此外还包括一些已经进行了抗真菌治疗的患者，并且我们对病例进行初筛的过程中，参考的是 GM 抗原检测和微生物培养的结果纳入了 CPA 疑诊患者，这会对 ROC 曲线和诊断评价的结果造成一定程度的影响。

在基于间接 ELISA 方法对于烟曲霉检测体系进行开发时，参比血清的选择是重要的。实验室前期曾对健康人群血清中烟曲霉 IgG 抗体水平进行研究结果表明，健康人群体烟曲霉 IgG 抗体检测结果均处于一个较低的水平^[39]，考虑到

CPA 的好发人群为中老年患者，本研究未纳入未成年的健康人血清作为对照组血清。

将研究获得的最优烟曲霉抗体间接 ELISA 检测体系及商品化曲霉 IgG 抗体检测试剂盒检测 CPA 患者血清及健康人血清的结果绘制 ROC 曲线，发现自建体系的 AUC 是优于商品化曲霉 IgG 抗体检测试剂盒的，选取自建体系的 A_{450} 截断值为 0.3 时，特异度可达 96.5%。但是，无论是自建的烟曲霉抗体检测体系还是商品化曲霉 IgG 抗体检测试剂盒，在健康人的检测中都具有阳性检测结果，这考虑为烟曲霉定植的影响，遗憾的是，很难通过追溯病史去界定区分这些健康个体是否发生了烟曲霉定植。环境中的污染物、粉尘等有害物质的累积及吸烟等不良生活习惯可造成肺部的潜在性损害，这将为外界环境中的烟曲霉分生孢子提供有利的停留和定植环境，这种改变轻微时并不表现出患病，但可能造成血清中烟曲霉抗体的水平改变。

在临床实际应用中，曲霉抗体检测体系多应用于高危患者，而非健康人群。随着宿主年龄的增长，患 COPD 及支气管扩张等疾病等肺部器质性损害疾病的风险大大增加，随着这种风险的增加，这些高危患者血清的烟曲霉抗体水平可能发生改变，但这需要进一步的研究证明。另外，在健康人发展为慢性肺部器质性病变的过程中，即使尚未发生曲霉感染，但不同年龄、性别的健康人血清中的特异性抗烟曲霉抗体水平是否具有差异也是值得研究的方面。

不同的病原体间常具有交叉抗原的存在，曲霉菌感染现有的辅助诊断手段中，已有许多研究证明 GM 试验与马尔尼菲篮状菌、青霉菌等的交叉反应，因此，下一步研究将对最优自建烟曲霉检测体系在 CPA 患者、CPA 高危人群、其他类型真菌及细菌感染患者中的鉴别诊断能力进行评价。

第三部分 烟曲霉抗体检测体系的临床应用评价

在前两部分的研究中，我们制备了烟曲霉裂解糖蛋白和分泌糖蛋白抗原，并采用烟曲霉分泌糖蛋白抗原建立了诊断 CPA 患者特异性较好的烟曲霉抗体间接 ELISA 检测方法，本部分研究将对建立的烟曲霉抗体进行临床应用评价。

CPA 高发于患有 COPD、支气管扩张、支气管肺癌、肺结核等慢性肺部疾病患者人群，CPA 患者的临床表现、影像学表现及常见的实验室感染指标的检测结果与其他类型的真菌、细菌感染无法区分。因此，本部分研究纳入了无曲霉感染证据的 COPD、支气管扩张、支气管肺癌、肺结核等慢性肺部疾病患者，念珠菌、隐球菌、阿萨西毛孢子菌、镰刀菌等临床相对常见真菌感染患者以及常见细菌血流感染的患者作为对照组，采用更加符合临床实际的样本对自建的烟曲霉抗体检测体系进行诊断性实验评价，并采用商品化曲霉 IgG 抗体检测试剂盒同步进行检测对比。

另外，本部分研究还将基于最优自建烟曲霉抗体检测体系的检测结果，比较不同性别、年龄的健康人之间，健康人与 CPA 高危人群、CPA 患者之间的烟曲霉抗体水平差异。

1. 材料

1.1 烟曲霉抗原

烟曲霉分泌糖蛋白：采用无水乙醇沉淀法分别从烟曲霉培养上清中提取纯化（详见第一部分）。

1.2 血清

1.2.1 曲霉 IgG 抗体阳性患者血清 a：作为自建烟曲霉抗体检测体系阳性参照血清，采集自肺曲霉感染患者，由北京中日友好医院呼吸与危重症医学部临床微生物与感染实验室提供，详见第二部分 1.2。

1.2.2 CPA 患者血清、健康人血清：由南方医科大学珠江医院检验科提供，详见第二部分 1.2。

1.2.3 CPA 高危人群血清：为单纯慢性肺部器质性病变患者，由南方医科大学珠江医院检验科提供。

纳入标准：具有 3 个月以上慢性咳嗽、咳痰等症状的慢性阻塞性肺疾病、慢性支气管炎、支气管扩张、特发性肺纤维化、陈旧性肺结核、毁损肺或矽肺的非急性感染期患者。

排除标准：(1) 具有发热、寒战等明显急性感染症状；(2) 伴有白细胞计数、降钙素原等感染指标升高；(3) 在静脉血、支气管肺泡灌洗液、支气管刷、下呼吸道分泌物培养分离到烟曲霉生长；(4) 血清 GM 试验检测阳性 ($GMI \geq 1$) 或 BALF 中 GM 试验检测 $GMI \geq 0.8$ ；(5) 血清、BALF 或脑脊液隐球菌荚膜抗原检测阳性。

1.2.4 其他类型真菌或细菌感染血清：由南方医科大学珠江医院检验科提供。

临床特征：(1) 新近出现发热、咳嗽、咳痰或原有呼吸道疾病症状加重，并出现脓性痰，伴或不伴胸痛；(2) 具有肺实变体征和闻及湿啰音等。

影像学或实验室检查：(1) 胸部 X 线检查显示片状、斑片状浸润阴影或间质性改变，伴或不伴胸腔积液；(2) 白细胞 $> 10 \times 10^9/L$ 或 $< 4 \times 10^9/L$ ，伴或不伴细胞核左移；(3) 具有降钙素原、血沉、超敏 C 反应蛋白等感染指标的升高。

病原学证据（细菌）：在单次脑脊液或 2 次以上静脉血培养报告金黄色葡萄球菌、溶血葡萄球菌、屎肠球菌、粪肠球菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、变形杆菌生长。

病原学证据（真菌）：(1) 在静脉血、脑脊液、BALF、分泌物、组织等临床样本中单次培养或在连续两次以上合格痰液标本中培养出荚膜组织胞浆菌、马尔尼菲篮状菌、毛霉菌、球毛壳菌、镰刀菌、隐球菌等致病真菌生长；(2) 在静脉血中连续两次以上培养出念珠菌、阿萨西毛孢子菌；(3) 血清或脑脊液隐球菌荚膜抗原检测试验阳性；(4) 经组织病理或无菌体液的 PCR 检测出以上常见致病真菌。

纳入标准：满足临床特征+影像学或实验室检查+至少 1 项病原学证据。

排除标准：排除在静脉血、脑脊液、BALF、分泌物、组织等临床样本中单次培养或在连续两次以上合格痰液标本中同时培养出曲霉属真菌生长的患者。

注：本研究采用的血清已通过南方医科大学珠江医院临床研究中心伦理审查，

批件号：2021-KY-075-01。

1.3 主要试剂、耗材

主要试剂：HRP 标记的山羊抗人 IgG、TMB 显色液、20%山羊血清简易酶稀释液、样品稀释液(0.1%BSA-1×PBS 溶液)、0.25%酪蛋白封闭液、0.1% PBST、抗原包被液(0.05M 碳酸盐缓冲液)、终止液(0.3M H₂SO₄ 溶液)。试剂来源详见第一部分 1.4，液体配置方法详见附录 1。

耗材：一次性各规格 EP 离心管、96 孔聚苯乙烯微孔板、各规格加样枪头、各规格玻璃瓶、玻璃量筒、玻璃试管、小青瓶、玻璃平皿。耗材来源详见第一部分 1.4。

1.4 主要仪器

涡旋振荡器、桌面微型离心机、洗板机、酶标仪、电子天平、恒温水浴锅、磁力搅拌器、单式真空(充气)包装机(设备信息及来源详见第一部分 1.5)。

2. 方法

2.1 临床评价样本的收集和检测

2.1.1 样本收集

参照本部分 1.2 对血清进行纳入和收集，保存于-20℃。

2.1.2 采用最优自建烟曲霉抗体间接 ELISA 体系进行检测

采用本研究第二部分确定的最优烟曲霉抗体检测体系，具体如下：

ELISA 板条制备：将烟曲霉分泌糖蛋白以 0.05M 碳酸盐缓冲液稀释包被在 96 孔聚苯乙烯微孔板上，包被浓度为 0.2μg/ml，每孔 50μl，4℃过夜后弃液拍干，每孔加入 0.25%酪蛋白封闭液 300μl，37℃快速封闭 2h 后弃去封闭液拍干，常温风干 10min，用铝箔袋真空密封保存于 4℃。

间接 ELISA 简要步骤：将板条取出恢复至室温备用，用样品稀释液将人血清进行 1:600 稀释，50μl/孔进行加样，37℃水浴孵育 1h 后，以 0.1%PBST 洗板 5 次，拍干后加入以 20%山羊血清简易酶稀释液稀释 3000 倍的 HRP-羊抗人 IgG，

50 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C水浴孵育 30min, 0.1%PBST 洗板 8 次后拍干, 加入 50 μ l TMB 显色液避光显色 10min, 最终加入 50 μ l 0.3M H₂SO₄ 终止显色, 用酶标仪检测 A₄₅₀ 值。

2.1.3 采用商品化曲霉 IgG 抗体检测试剂盒进行检测

简要实验步骤:

(1) 样本稀释: 用样本稀释液 (R5) 将待测血清稀释 1000 倍 (即在 1ml R5 稀释液中加入 1 μ l 待测血清); (2) 加样孵育: 第一孔设置为空白对照, 依次加入 5 个水平的标准品、质控品 A、质控品 B、稀释好的待测血清, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 1h; (3) 洗板: 采用 1x 洗涤液洗板 3 次, 每洗 1 次拍干 1 次; (4) 再次孵育: 加入酶标抗体 R3, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 30min; (5) 再次洗板: 采用 1x 洗涤液洗板 3 次, 每洗 1 次拍干 1 次; (6) 显色: 加入底物液 (R6), 100 μ l/孔, 避光显色 15min; (7) 终止显色、读数: 每孔加入 50 μ l 终止液 (R7) 终止显色, 用酶标仪检测 A₄₅₀ 值; (8) 定量计算: 以曲霉 IgG 抗体浓度为横坐标, A₄₅₀ 值为纵坐标, 横坐标取对数, 做曲线回归方程, 根据标准曲线计算待测样本中曲霉 IgG 抗体浓度。

2.2 烟曲霉抗体检测体系的临床应用评价

根据本部分 2.1 的检测结果, 进行诊断性试验评价。

2.3 分组比较

基于第二部分中对健康人血清的检测结果及本部分 2.1 的检测结果, 对纳入的人群进行分组比较: (1) 按性别对健康人进行分组; (2) 将健康人按年龄分组为 19-45 岁的青壮年组及年龄>45 岁的中老年组; (3) 将健康人、CPA 高危人群、CPA 疑诊人群、CPA 确诊人群进行比较。

2.4 统计分析

获得的检测结果为吸光度值 (A₄₅₀) 和浓度转换值, 为计量资料, 采用 Excel 对数据进行汇总管理和作图, 用 IBM SPSS Statistics 21 对数据进行统计分析。

统计方法基本原则: 所有统计推断采用双侧检验, 检验水准取 $\alpha=0.05$, 参数

的可信区间估计采用 95%可信区间。当数据满足正态分布和方差齐性或单组样本量>100 时,采用 t 检验或方差分析 (ANOVA) 进行组间比较,尽可能采用参数统计方法,当数据不满足正态分布和方差齐性时,采用非参数统计方法 (Wilcoxon 检验),对率和构成比的比较采用卡方 (χ^2) 检验进行比较。

3. 结果

3.1 纳入样本特征

本部分研究纳入 49 例 CPA 患者作为病例组 (51 份血清,患者 13 和患者 35 在住院期间进行了多次采血,收集的 2 份血清采血时间间隔 3 天以上),其中 11 例为确诊患者,38 例为疑诊患者 (表 3-1)。共收集到 CPA 高危人群及其他细菌、真菌感染患者共计 84 例作为对照组:60 例为单纯具有慢性肺部器质性病变的非感染活动期患者 (CPA 高危人群),其中 48.3%来自 COPD 患者,33.3%来自支气管肺癌或未明确病变性质的肺部占位患者,13.3%来自支气管扩张患者,这些患者的血清 GM 试验检测值均为阴性 ($GMI < 0.8$);其他种类真菌感染患者共收集到 9 例 (念珠菌、皮炎外瓶霉、毛霉各 2 例,荚膜组织胞浆菌、球毛壳菌、镰刀菌各 1 例);细菌感染患者 15 例 (肺炎克雷伯菌感染 4 例,大肠埃希菌、葡萄球菌各 3 例,肠球菌 2 例,铜绿假单胞菌、变形杆菌、诺卡菌各 1 例)。

表 3-1 纳入人群基本特征

Table 3-1 Characteristics of the included population

分组	类别	合计	亚组	组内人数
病例组	CPA 患者	49	确诊	11
			疑诊	38
对照组	单纯慢性肺部器质性病变患者	60		
	其他种属真菌病患者	9		
	细菌性感染患者	15		
健康人	健康人	85	男性	32
			女性	53
			19-45 岁	67
			>45 岁	18

本部分研究未将健康人血清样本纳入对照组,但将对 85 例健康人血清的烟曲霉抗体检测结果进行分组分析,其中男性为 32 例,女性为 53 例,按年龄分组:67 例为 19-45 岁间的青壮年,18 例为 45 岁以上的中老年 (表 3-1)。

3.2 烟曲霉抗体检测体系的临床应用评价

采用本研究自建的最优烟曲霉抗体检测体系及商品化曲霉 IgG 抗体检测试剂盒对 CPA 患者、CPA 高危人群、其他种属真菌病患者、细菌性感染患者血清进行检测，以 0.127 为 A₄₅₀ 值的截断值，特异度为 32.1%，灵敏度为 68.6%。以 0.3 为 A₄₅₀ 值的截断值，特异度为 83.3%，灵敏度为 17.6%；在无曲霉感染证据的 CPA 高危人群中，20% (12/60) 检测为阳性；9 例其他类型的真菌感染中，2 例检测为阳性；15 例细菌感染患者血清中，仅 1 例的检测 A₄₅₀ 值在 0.3 以上

而商品化曲霉 IgG 抗体检测试剂盒的 AUC 为 0.450 [0.346, 0.554]，按试剂盒说明书进行评价，特异度为 63.0%，灵敏度为 40.7%，在对照组中的阳性率为 22.6% (19/84) (表 3-2)。

表 3-2 最优自建体系与商品化曲霉 IgG 抗体检测试剂盒的诊断性能比较

Table 3-1 Comparison of diagnostic performance between the optimal self-built system and commercialized anti-*Aspergillus* IgG antibody detection kit

检测体系	特异度	灵敏度	对照组阳性率
最优自建烟曲霉抗体检测体系 (以 0.3 为截断值)	83.3%	17.6%	17.8%
商品化曲霉 IgG 抗体检测试剂盒	63.0%	40.7%	22.6%

3.3 健康人血清中烟曲霉抗体水平的分组比较

对不同性别、年龄的健康人血清中烟曲霉抗体水平进行分组比较，发现：采用最优自建体系检测，男性健康人的平均 A₄₅₀ 值为 0.117 [0.091, 0.142]，女性健康人的平均 A₄₅₀ 值为 0.148 [0.125, 0.172]，两组之间具有统计学差异 ($P=0.027$, *Wilcoxon* 检验) (图 3-1A)；青壮年组的平均 A₄₅₀ 值为 0.140 [0.119, 0.161]，中老年组为 0.122 [0.089, 0.156]，两组间不具有统计学差异 ($P=0.375$, *Wilcoxon* 检验) (图 3-1C)。但采用商品化试剂盒检测结果进行分析时，在健康人性别分组之间的差异不具有统计学意义 (图 3-1B)。

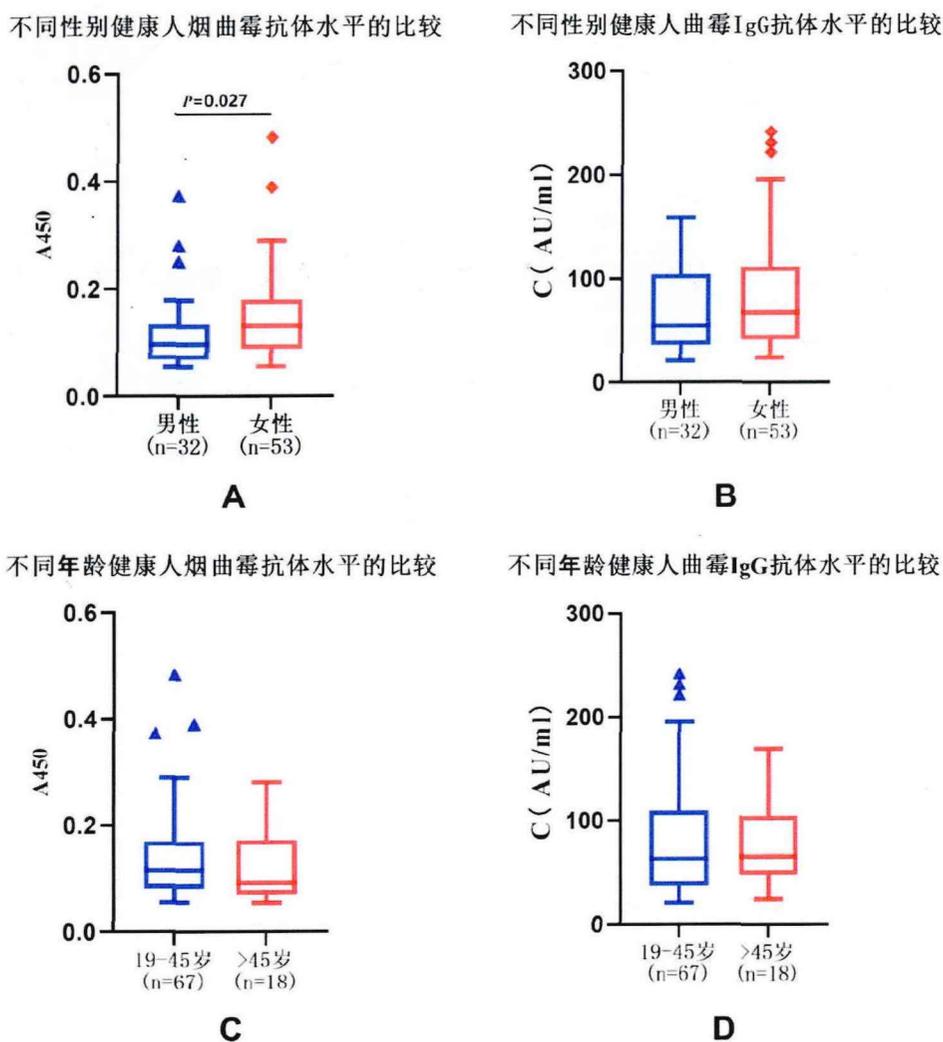


图 3-1 不同性别、年龄的健康人血清中曲霉抗体水平进行分组比较

Figure 3-1 Grouping comparison of serum anti-*Aspergillus* antibody levels in healthy individuals of different genders and ages

注：箱体中间线，代表了数据的中位数；箱体的上下底，分别是数据的四分位数（Q1、Q3）；最小观察值(下边缘)=Q1-1.5IQR（四分位间距）；最大观察值（上边缘）=Q3+1.5IQR；

C 为曲霉 IgG 抗体的浓度，单位为 AU/ml

3.4 健康人、CPA 高危人群及 CPA 患者血清烟曲霉抗体水平比较

采用最优自建体系进行检测，收集到的 60 份 CPA 高危人群血清烟曲霉抗体的平均值为 0.219 [0.168, 0.270]，85 份健康人血清的烟曲霉抗体平均检测值为

0.136 [0.119, 0.154], CPA 疑诊人群的平均值为 0.148 [0.112, 0.183], CPA 确诊人群的平均值为 0.552 [0.325, 0.779]。分组进行比较发现: 采用最优自建体系或商品化试剂盒检测时, CPA 确诊患者的血清曲霉抗体水平均显著高于其他 3 组人群 ($P < 0.001$, $LSD-t$ 检验), CPA 疑诊患者显著高于发生了慢性肺部器质性病变的 CPA 高危患者 ($P = 0.028$, $LSD-t$ 检验)。另外, 在采用最优自建体系检测结果进行分析时, CPA 高危患者的血清烟曲霉抗体水平高于健康人群体 ($P = 0.002$, $LSD-t$ 检验) (图 3-2)。

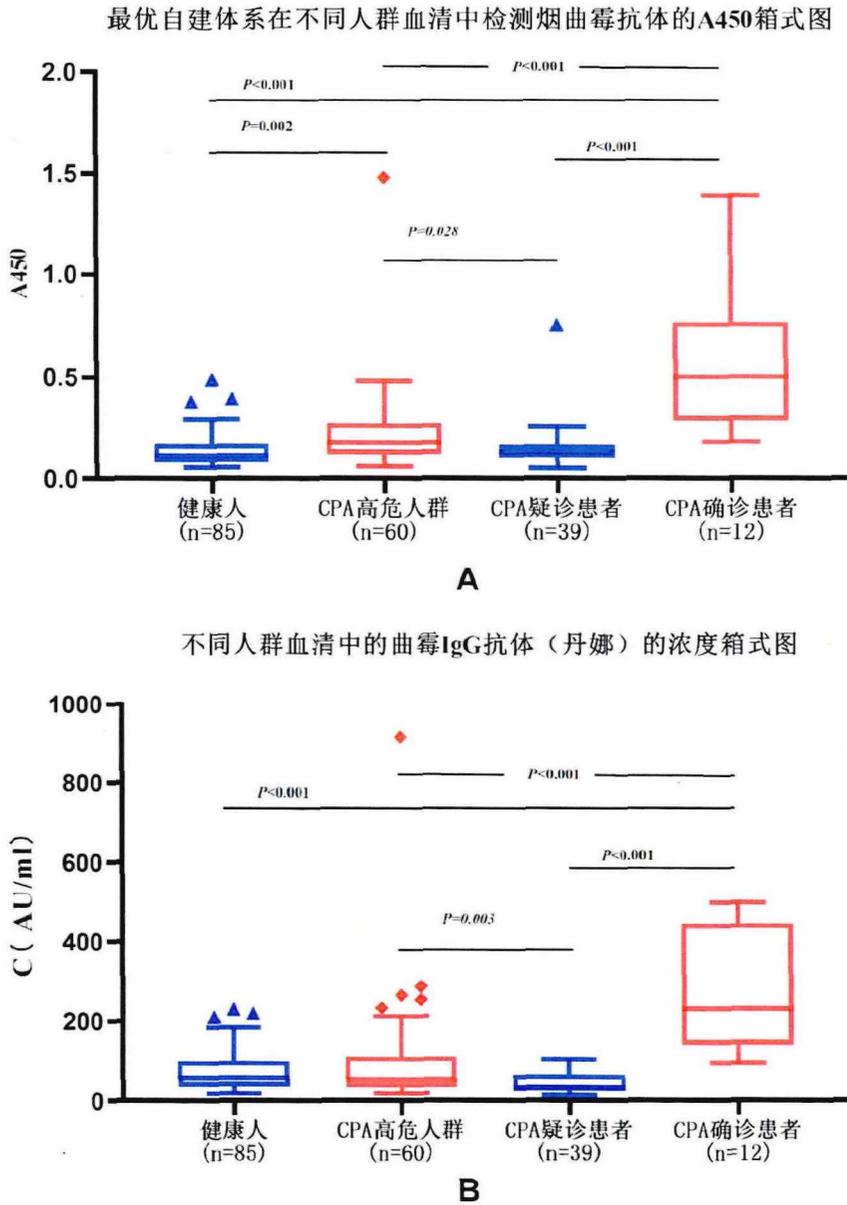


图 3-2 不同人群的曲霉抗体水平比较

Figure 3-2 Comparison of levels of anti-*Aspergillus* antibody among different groups

注：箱体中间线，代表了数据的中位数；箱体的上下底，分别是数据的四分位数（Q1、Q3）；最小观察值(下边缘)= $Q1-1.5IQR$ ；最大观察值(上边缘)= $Q3+1.5IQR$ ；C为曲霉 IgG 抗体的浓度，单位为 AU/ml

4. 讨论

在前两部分的研究中，我们制备了烟曲霉裂解糖蛋白和分泌糖蛋白抗原，采用烟曲霉分泌糖蛋白抗原建立了诊断 CPA 患者特异性较好的烟曲霉抗体间接 ELISA 检测方法，并且初步评价了自建体系对 CPA 患者和健康人群的鉴别能力，但 CPA 高发于患有 COPD、支气管扩张、支气管肺癌、肺结核等慢性肺部疾病患者，难以从临床表现、影像学表现及常见的实验室感染指标的检测结果显示鉴别 CPA 患者、CPA 高危患者、其他类型的真菌、细菌感染，开发烟曲霉抗体检测体系的目的是应用于临床诊断，本部分研究进行了更符合临床实际的评价。

经过本部分的研究，发现在实际应用中，无论是自建的烟曲霉抗体检测体系还是商品化曲霉 IgG 抗体检测试剂盒，在 CPA 患者人群中的检测阳性率均仅为 20%左右，这考虑为纳入人群的影响，具有病理活检证据的 CPA 患者在临床实际中比较少见的，本研究纳入部分 CPA 疑诊患者进行分析评价，这考虑为造成两种曲霉抗体检测方法阳性率偏低的主要原因。而且，本研究纳入的 CPA 患者人群中具有部分曾接受过化疗的支气管肺癌患者，这些人群往往伴随着轻微至中度的免疫功能受损，产生抗体的能力偏低。

曲霉感染的诊断是困难的，目前临床上出病理活检之外并没有其他非常确定的诊断手段，这也正是本研究建立曲霉抗体检测体系的价值所在。虽然在纳入 CPA 高危人群的过程中排除了具有烟曲霉阳性培养及 GM 抗原检测阳性的患者，但这些人可能发生了隐匿的曲霉感染或定植，对结果也会造成一定的影响。另外，CPA 病例也可由其他曲霉菌引起，除烟曲霉外，黄曲霉、土曲霉、黑曲霉、构巢曲霉等也有引起感染的报道^[3]，本研究开发烟曲霉抗体检测体系的时候，采用的是提取自烟曲霉培养上清的分泌糖蛋白抗原，与其他种的曲霉菌引起的 CPA 患者血清中的曲霉特异性抗体结合性可能较差，这需要采用感染来源明确的血清进行研究，在临床上很难实现，后续可构建合适的动物模型进行进一步的研究。

对照组中,自建烟曲霉抗体检测体系在未发现曲霉感染证据的慢性肺部疾病人群(CPA 高危人群)的检测阳性率为 20% (12/60),考虑到患者肺部基础疾病及免疫力的下降易为烟曲霉定植生长提供条件,这些患者虽然短期内没有发生曲霉急性感染,但长期慢性的病程中,可能曾经发生过曲霉感染或潜伏感染。另外,临床治疗手段也可能导致烟曲霉抗体检测的假阳性,对于怀疑免疫力下降且伴随着血浆蛋白失衡的慢性肺部疾病患者,临床治疗中常采用补充 IVIG 的手段使患者免疫状态更加趋向正常,临床实际中,因为 IVIG 价格昂贵和用药剂量的建议,很少出现大量输入外来免疫球蛋白的情况,但这种治疗手段也会对患者血清中烟曲霉抗体的水平造成一定的影响。IVIG 中含有一定水平烟曲霉特异性抗体,虽然其在患者体内的具体作用机制仍不十分明确,但补充 IVIG 可能改善和预防致死性曲霉感染的发生^[59]。

至于自建的烟曲霉抗体检测体系对 CPA 与其他种类真菌、细菌等病原体引起的感染的鉴别能力,本研究收集到的 9 例其他类型真菌感染患者中仅包含 1 例荚膜组织胞浆菌感染患者,这例患者血清烟曲霉抗体检测结果是强阳性的,但受样本数量限制,无法判断荚膜组织胞浆菌与烟曲霉在人体内的反应是否能够产生交叉抗体。而细菌感染人群中并未发现明显的交叉抗体,烟曲霉抗体检测体系区分 CPA 患者和细菌感染的特异性较好,有研究中表明了铜绿假单胞菌的细菌代谢物对烟曲霉分生孢子的体外生长具有抑制作用^[60],但是在人体内的相互作用及对机体免疫应答的影响尚需要更深入的研究。

综上所述,本研究采用天然烟曲霉分泌糖蛋白建立的烟曲霉抗体间接 ELISA 检测体系在应用于临床鉴别时,具有一定的诊断潜力,特异性较好,但敏感性较差,相比于现行的商品化曲霉 IgG 抗体检测试剂盒,诊断性能并未表现出明显优越性,后续研究中将对筛选出的烟曲霉抗体间接 ELISA 检测方法的实验条件进行进一步优化,开发更佳的烟曲霉抗体检测体系。

另外,在对健康人进行分组比较时,将性别作为分组依据发现女性健康人群体针对烟曲霉分泌糖蛋白的抗体水平高于男性健康人群体($P=0.027$),这可能与女性更容易接触二手烟及家庭空气污染有关,有研究表明,被动吸烟、家庭空气污染、遗传与激素等因素是非吸烟人群发生肺癌及肺结节的危险因素,女性接触二手烟的比例明显高于男性(64% vs. 38%)^[54],在中国许多家庭仍在使用固体

燃料，女性是家庭烹饪的主体，而固体燃料和烹饪是家庭空气污染的重要来源^[61]。

随着年龄增长，环境污染物、粉尘以及吸烟等不良生活习惯对肺部的作用是持续的，虽然中老年健康人不表现出曲霉感染的症状，我们推测这种肺部结构的轻微改变可能为烟曲霉定植提供基础。但按年龄进行分组时，青壮年组与中老年组并不具有统计学差异，这与我们的推测不符，但与实验室前期研究结果是相符的，实验室前期研究中对烟曲霉 IgG 抗体检测吸光度的比较，13 岁-40 岁、40 岁-60 岁年龄组之间并不存在明显区别^[39]。这意味着，在没有明显 CPA 危险因素影响情况下，健康人群年龄增长对血清中烟曲霉抗体的水平影响是较小的，甚至随着中老年人免疫系统的退化衰老，个体血清中的烟曲霉抗体水平可能降低。

有研究表明，血清 GM 抗原水平与 COPD 急性加重（acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary, AE-COPD）的累积发病显著相关^[62]，已有研究提出曲霉特异性 IgG 抗体与肺移植后真菌相关并发症和慢性肺同种异体移植物功能障碍是相关的^[63]，这些研究提示，烟曲霉抗体检测除了在 CPA 辅助诊断方面的作用外，还可能与慢性肺部疾病本身的进展相关，本研究对烟曲霉抗体的这一作用进行了初步探索。本研究中，我们证明了虽然在一些健康人、CPA 高危人群的血清中也具有一定水平的烟曲霉抗体，但 CPA 确诊患者的血清烟曲霉抗体水平是显著高于 CPA 疑诊人群、CPA 高危人群及健康人群的，并且，在自建体系的检测结果分析中，已经发生明显肺部器质性病变的 CPA 高危患者人群，其血清烟曲霉抗体水平高于健康人群（ $P=0.002$ ），这说明在未出现明显的免疫力降低时，即使尚未发生曲霉感染，肺部器质性病变的存在依然造成机体血清烟曲霉抗体的升高，烟曲霉抗体检测对患者基础疾病进展可能具有一定的预测作用，但这种作用尚需更加深入的研究证明。

全文总结与展望

烟曲霉作为临床真菌感染中最常见的丝状真菌,导致的侵袭性真菌病致死率高、预后极差,因此,在 CPA 尚未侵袭进展时及时诊断、早期治疗是挽救曲霉病患者生命的关键。烟曲霉抗体检测对 CPA 具有较好的诊断价值,但目前的烟曲霉抗体检测方法无法满足临床需要,本研究旨在开发对 CPA 具有更佳的诊断效能的烟曲霉抗体检测方法,主要研究成果如下:

1.从烟曲霉菌丝体裂解上清及培养上清中制备了裂解糖蛋白、分泌糖蛋白抗原,这2种烟曲霉糖蛋白抗原既含有相同的成分,又能提供独特的抗原表位,能与兔抗烟曲霉多克隆抗体、小鼠抗烟曲霉单克隆抗体、曲霉 IgG 抗体阳性人血清特异结合。

2.采用烟曲霉分泌糖蛋白抗原建立了一种特异性较好的烟曲霉抗体检测体系,该体系在 CPA 患者和健康人中初步进行评估时, AUC 优于商品化曲霉 IgG 抗体检测试剂盒。

3.在采用 CPA 高危人群及难鉴别的其他类型真菌、细菌感染人群血清作为对照组进行临床样本评价时,采用烟曲霉分泌糖蛋白建立的最优烟曲霉抗体间接 ELISA 检测体系在其他真菌、细菌感染患者中特异性较好,特异度优于商品化曲霉 IgG 抗体检测试剂盒,具有一定的应用前景,具有更进一步对体系实验条件进行优化的价值。

4. CPA 确诊患者的血清烟曲霉抗体水平显著高于 CPA 疑诊人群、CPA 高危人群及健康人群;非 CPA 人群中,女性健康人群体血清中烟曲霉抗体水平显著高于男性,中老年健康人与青壮年健康人组则不具有明显差异;对于已经发生明显肺部器质性病变的 CPA 高危人群,其血清烟曲霉抗体水平高于健康人群。

本研究也具有一些不足,建立的烟曲霉抗体检测体系灵敏度较差,且临床评价中纳入的样本数量较少,仍需进一步进行实验条件优化和评估,在纳入样本时需尽量对对照组进行倾向性评分匹配;另外,本研究仅采用血清样本进行了烟曲霉抗体检测体系的开发和诊断价值评估,下一步还可研究在血浆或全血等样本中的检测价值。

总而言之,本研究发现天然提取的烟曲霉分泌糖蛋白抗原具有建立烟曲霉抗

体检测体系和用于辅助诊断 CPA 的潜力，为下一步进行体系的优化和开发提供了方向。另外，本研究还有一个新的发现，具有慢性肺部疾病的 CPA 高危患者血清烟曲霉抗体水平高于健康人群，但烟曲霉抗体与疾病出现、进展是否相关仍需要进一步研究。

参考文献

- [1] Fosses VM, Waymack JR. Aspergillosis[M], 2022.
- [2] Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis[J]. *Clin Microbiol Rev*, 1999, 12(2): 310-50. DOI:10.1128/CMR.12.2.310.
- [3] Sugui JA, Kwon-Chung KJ, Juvvadi PR, et al. *Aspergillus fumigatus* and related species[J]. *Csh Perspect Med*, 2014, 5(2): a19786. DOI:10.1101/cshperspect.a019786.
- [4] Mackel JJ, Steele C. Host defense mechanisms against *Aspergillus fumigatus* lung colonization and invasion[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2019, 52: 14-9. DOI:10.1016/j.mib.2019.04.003.
- [5] Ibrahim-Granet O, Philippe B, Boleti H, et al. Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages[J]. *Infect Immun*, 2003, 71(2): 891-903. DOI:10.1128/IAI.71.2.891-903.2003.
- [6] Filler SG, Sheppard DC. Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells[J]. *Plos Pathog*, 2006, 2(12): e129. DOI:10.1371/journal.ppat.0020129.
- [7] Tyagi I, Taneja HC. Rhinocerebral invasive aspergillosis[J]. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*, 1998, 50(1): 26-32. DOI:10.1007/BF02996763.
- [8] Powell CR, Allshouse M, Bethel KJ, et al. Invasive aspergillosis of the scrotum[J]. *J Urol*, 1998, 159(4): 1306-8.
- [9] Thakur BK, Bernardi DM, Murali MR, et al. Invasive cutaneous aspergillosis complicating immunosuppressive therapy for recalcitrant pemphigus vulgaris[J]. *J Am Acad Dermatol*, 1998, 38(3): 488-90. DOI:10.1016/s0190-9622(98)70512-2.
- [10] Swift AC, Denning DW. Skull base osteitis following fungal sinusitis[J]. *J Laryngol Otol*, 1998, 112(1): 92-7. DOI:10.1017/S0022215100140009.
- [11] Kanj A, Abdallah N, Soubani AO. The spectrum of pulmonary aspergillosis[J]. *Respir Med*, 2018, 141: 121-31. DOI:10.1016/j.rmed.2018.06.029.
- [12] Agarwal R, Muthu V, Sehgal IS, et al. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis[J]. *Clin Chest Med*, 2022, 43(1): 99-125. DOI:10.1016/j.ccm.2021.12.002.

- [13] Denning DW, Page ID, Chakaya J, et al. Case Definition of Chronic Pulmonary Aspergillosis in Resource-Constrained Settings[J]. *Emerg Infect Dis*, 2018, 24(8). DOI:10.3201/eid2408.171312.
- [14] Denning DW, Cadranel J, Beigelman-Aubry C, et al. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management[J]. *Eur Respir J*, 2015, 47(1): 45-68. DOI:10.1183/13993003.00583-2015.
- [15] Salzer HJ, Cornely OA. Awareness of predictors of mortality may help improve outcome in chronic pulmonary aspergillosis[J]. *Eur Respir J*, 2017, 49(2). DOI:10.1183/13993003.02520-2016.
- [16] Denning DW, Evans EG, Kibbler CC, et al. Guidelines for the investigation of invasive fungal infections in haematological malignancy and solid organ transplantation. British Society for Medical Mycology[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1997, 16(6): 424-36. DOI:10.1007/BF02471906.
- [17] Cattaneo C, Gramegna D, Malagola M, et al. Invasive pulmonary aspergillosis in acute leukemia: a still frequent condition with a negative impact on the overall treatment outcome[J]. *Leuk Lymphoma*, 2019, 60(12): 3044-50. DOI:10.1080/10428194.2019.1613535.
- [18] Garcia-Vidal C, Peghin M, Cervera C, et al. Causes of death in a contemporary cohort of patients with invasive aspergillosis[J]. *Plos One*, 2015, 10(3): e120370. DOI:10.1371/journal.pone.0120370.
- [19] Cornillet A, Camus C, Nimubona S, et al. Comparison of epidemiological, clinical, and biological features of invasive aspergillosis in neutropenic and nonneutropenic patients: a 6-year survey[J]. *Clin Infect Dis*, 2006, 43(5): 577-84. DOI:10.1086/505870.
- [20] Marr KA, Carter RA, Crippa F, et al. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients[J]. *Clin Infect Dis*, 2002, 34(7): 909-17. DOI:10.1086/339202.
- [21] Hou X, Zhang H, Kou L, et al. Clinical features and diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis in Chinese patients[J]. *Medicine*, 2017, 96(42): e8315.

DOI:10.1097/MD.00000000000008315.

- [22] Zhong H, Wang Y, Gu Y, et al. Clinical Features, Diagnostic Test Performance, and Prognosis in Different Subtypes of Chronic Pulmonary Aspergillosis[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2022, 9: 811807. DOI:10.3389/fmed.2022.811807.
- [23] Alexander BD, Lamoth F, Heussel CP, et al. Guidance on Imaging for Invasive Pulmonary Aspergillosis and Mucormycosis: From the Imaging Working Group for the Revision and Update of the Consensus Definitions of Fungal Disease from the EORTC/MSGERC[J]. *Clin Infect Dis*, 2021, 72(Suppl 2): S79-88. DOI:10.1093/cid/ciaa1855.
- [24] Al-Nawas B, Krammer I, Shah PM. Procalcitonin in diagnosis of severe infections[J]. *Eur J Med Res*, 1996, 1(7): 331-3.
- [25] 李天义, 汤春梅, 潘育文, 等. 血清烟曲霉IgG、G试验及半乳甘露聚糖对慢性肺曲霉病的诊断价值[J]. *分子影像学杂志*, 2022, 45(03): 442-6.
- [26] Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA, et al. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium[J]. *Clin Infect Dis*, 2020, 71(6): 1367-76. DOI:10.1093/cid/ciz1008.
- [27] Denning DW, Riniotis K, Dobrashian R, et al. Chronic cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: case series, proposed nomenclature change, and review[J]. *Clin Infect Dis*, 2003, 37 Suppl 3: S265-80. DOI:10.1086/376526.
- [28] Camuset J, Nunes H, Dombret M, et al. Treatment of chronic pulmonary aspergillosis by voriconazole in nonimmunocompromised patients[J]. *Chest*, 2007, 131(5): 1435. DOI:10.1378/chest.06-2441.
- [29] Nam HS, Jeon K, Um SW, et al. Clinical characteristics and treatment outcomes of chronic necrotizing pulmonary aspergillosis: a review of 43 cases[J]. *Int J Infect Dis*, 2010, 14(6): e479-82. DOI:10.1016/j.ijid.2009.07.011.
- [30] Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdagli S, et al. Diagnosis and management of Aspergillus diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS

- guideline[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2018, 24 Suppl 1: e1-38. DOI:10.1016/j.cmi.2018.01.002.
- [31] Shin B, Koh WJ, Jeong BH, et al. Serum galactomannan antigen test for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis[J]. *J Infect*, 2014, 68(5): 494-9. DOI:10.1016/j.jinf.2014.01.005.
- [32] Sehgal IS, Choudhary H, Dhoria S, et al. Diagnostic cut-off of *Aspergillus fumigatus*-specific IgG in the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis[J]. *Mycoses*, 2018, 61(10): 770-6. DOI:10.1111/myc.12815.
- [33] Weig M, Frosch M, Tintelnot K, et al. Use of recombinant mitogillin for improved serodiagnosis of *Aspergillus fumigatus*-associated diseases[J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(5): 1721-30. DOI:10.1128/JCM.39.5.1721-1730.2001.
- [34] Du C, Wingard JR, Cheng S, et al. Serum IgG responses against *Aspergillus* proteins before hematopoietic stem cell transplantation or chemotherapy identify patients who develop invasive aspergillosis[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2012, 18(12): 1927-34. DOI:10.1016/j.bbmt.2012.07.013.
- [35] Kappe R, Rimek D. Antibody detection in patients with invasive aspergillosis[J]. *Mycoses*, 2004, 47 Suppl 1: 55-9. DOI:10.1111/j.1439-0507.2004.01035.x.
- [36] Li H, Rui Y, Zhou W, et al. Role of the *Aspergillus*-Specific IgG and IgM Test in the Diagnosis and Follow-Up of Chronic Pulmonary Aspergillosis[J]. *Front Microbiol*, 2019, 10. DOI:10.3389/fmicb.2019.01438.
- [37] Shinfuku K, Suzuki J, Takeda K, et al. Validity of Platelia *Aspergillus* IgG and *Aspergillus* Precipitin Test To Distinguish Pulmonary Aspergillosis from Colonization[J]. *Microbiol Spectr*, 2023, 11(1): e343522. DOI:10.1128/spectrum.03435-22.
- [38] Wang Y, Liu Y, Jiang S, et al. Antifungal antibodies present in intravenous immunoglobulin derived from China[J]. *Braz J Microbiol*, 2023, 54(1): 81-92. DOI:10.1007/s42770-022-00894-z.
- [39] 郝卫, 钟善传, 徐华, 等. 健康人血清中烟曲霉菌特异性IgG水平及其意义[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2003(12): 64.

- [40]Fontaine T, Simenel C, Dubreucq G, et al. Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(36): 27594-607. DOI:10.1074/jbc.M909975199.
- [41]Fontaine T, Latge JP. Galactomannan Produced by *Aspergillus fumigatus*: An Update on the Structure, Biosynthesis and Biological Functions of an Emblematic Fungal Biomarker[J]. *J Fungi (Basel)*, 2020, 6(4). DOI:10.3390/jof6040283.
- [42]Yuen KY, Chan CM, Chan KM, et al. Characterization of AFMP1: a novel target for serodiagnosis of aspergillosis[J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(11): 3830-7. DOI:10.1128/JCM.39.11.3830-3837.2001.
- [43]杨梅, 王卓娅, 郝卫, 等. 双抗原夹心ELISA法检测烟曲霉Afmp1cr/Afmp2cr抗体[J]. *南方医科大学学报*, 2014, 34(05): 646-50.
- [44]Chan CM, Woo PC, Leung AS, et al. Detection of antibodies specific to an antigenic cell wall galactomannoprotein for serodiagnosis of *Aspergillus fumigatus* aspergillosis[J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(6): 2041-5. DOI:10.1128/JCM.40.6.2041-2045.2002.
- [45]陈益国. 金葡菌肽聚糖模拟肽疫苗候选保护性作用的初步研究[D]: 南方医科大学, 2011.
- [46]刘俞谷. 抗烟曲霉单克隆抗体的制备及结合表位分析[D]: 南方医科大学, 2021.
- [47]刘春龙. 曲霉菌半乳甘露聚糖抗原提取工艺优化[J]. *科技创新与应用*, 2017(27): 52-3.
- [48]Stynen D, Sarfati J, Goris A, et al. Rat monoclonal antibodies against *Aspergillus galactomannan*[J]. *Infect Immun*, 1992, 60(6): 2237-45. DOI:10.1128/iai.60.6.2237-2245.1992.
- [49]郝卫, 潘玉先, 廖志勇, 等. 1组曲霉单克隆抗体的制备与鉴定[J]. *中国真菌学杂志*, 2008(03): 129-33.
- [50]房文霞, 金城. 烟曲霉细胞壁的组分、组装及其功能概述[J]. *菌物学报*, 2018, 37(10): 1307-16.

- [51] 蒋苏苏. 曲霉抗原捕获方法的建立及其在侵袭性曲霉病诊断中的初步应用[D]: 南方医科大学, 2023.
- [52] Kirkman-Brown J, Björndahl L. Evaluation of a disposable plastic Neubauer counting chamber for semen analysis[J]. *Fertil Steril*, 2009, 91(2): 627-31. DOI:10.1016/j.fertnstert.2007.11.076.
- [53] Rasouli M, Ostovar-Ravari A, Shokri-Afra H. Characterization and improvement of phenol-sulfuric acid microassay for glucose-based glycogen[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014, 18(14): 2020-4. DOI:10.4314/tjpr.v13i7.24.
- [54] KAWAGUCHI T, ANDO M, SASAKI H, et al. Long Exposure of Environmental Tobacco Smoke Associated with Activating EGFR Mutations in Never-Smokers with Non-Small Cell Lung Cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(1): 39-45. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-10-1773.
- [55] Dobias R, Stevens DA, Havlicek V. Current and Future Pathways in Aspergillus Diagnosis[J]. *Antibiotics (Basel)*, 2023, 12(2). DOI:10.3390/antibiotics12020385.
- [56] LONGBOTTOM JL, PEPYS J, CLIVE FT. DIAGNOSTIC PRECIPITIN TEST IN ASPERGILLUS PULMONARY MYCETOMA[J]. *The Lancet (British edition)*, 1964, 1(7333): 588.
- [57] Baxter CG, Denning DW, Jones AM, et al. Performance of two Aspergillus IgG EIA assays compared with the precipitin test in chronic and allergic aspergillosis[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2013, 19(4): E197-204. DOI:10.1111/1469-0691.12133.
- [58] Richardson MD, Llewellyn PA, Warnock DW. Antibody to Aspergillus fumigatus antigens in normal sera: influence on positive-negative discrimination in ELISA[J]. *J Immunoassay*, 1984, 5(3-4): 205-20. DOI:10.1080/01971528408063008.
- [59] Liu X, Cao W, Li T. High-Dose Intravenous Immunoglobulins in the Treatment of Severe Acute Viral Pneumonia: The Known Mechanisms and Clinical Effects[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1660. DOI:10.3389/fimmu.2020.01660.
- [60] Ostapska H, Le Mauff F, Gravelat FN, et al. Co-Operative Biofilm Interactions

- between *Aspergillus fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa* through Secreted Galactosaminogalactan Exopolysaccharide[J]. *Journal of fungi (Basel)*, 2022, 8(4): 336. DOI:10.3390/jof8040336.
- [61] Tsai LL, Chu NQ, Blessing WA, et al. Lung Cancer in Women[J]. *Ann Thorac Surg*, 2022, 114(5): 1965-73. DOI:10.1016/j.athoracsur.2021.09.060.
- [62] Yoshimura K, Suzuki Y, Inoue Y, et al. Utility of serum *Aspergillus*-galactomannan antigen to evaluate the risk of severe acute exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Plos One*, 2018, 13(6): e198479. DOI:10.1371/journal.pone.0198479.
- [63] Beeckmans H, Van Roy E, Kaes J, et al. *Aspergillus*-Specific IgG Antibodies are Associated With Fungal-Related Complications and Chronic Lung Allograft Dysfunction After Lung Transplantation[J]. *Transpl Int*, 2023, 36: 10768. DOI:10.3389/ti.2023.10768.

附录 1 液体配置方法

1. 沙氏肉汤培养基: 10g 蛋白胨, 20g 葡萄糖溶于 950ml 去离子水, 用稀盐酸调 pH 值至 5.6, 超纯水定容至 1L, 115°C 高压灭菌后保存于 4°C。
2. 0.05% Tween20-水溶液: 用 1ml 注射器吸取 0.5ml Tween20 加入蒸馏水中充分摇匀定容至 1L, 经 0.45 μ m 细菌滤膜过滤后装入高压灭菌过的无菌玻璃瓶保存于 4°C。
3. 葡萄糖标准液 (20mg/ml): 量取 110°C 干燥恒重的葡萄糖纯品 1g, 加入蒸馏水中完全溶解, 定容至 50ml 备用。
4. 5% 苯酚溶液: 精确称取重蒸苯酚 5g, 加超纯水充分溶解后定容至 100ml, 置于棕色瓶中室温避光保存。
5. 20 \times PBS: 称取 4.56g NaH₂PO₄, 58.02g Na₂HPO₄·12H₂O, 175.3g NaCl, 超纯水溶解后定容至 1L, 121°C 高压灭菌常温保存, 应用时稀释成 1 \times PBS。
6. 0.1% PBST: 在 1 \times PBS 缓冲液中加入 0.1% Tween20 (v/v), 混匀后常温保存。
7. 0.5% PBST: 在 1 \times PBS 缓冲液中加入 0.5% Tween20 (v/v), 混匀后常温保存。
8. 样品稀释液 (0.1% BSA-1 \times PBS 溶液): 取 BSA 粉 3g 用适量 1 \times PBS 缓冲液充分溶解, 定容至 100ml, 配置为 3% BSA-1 \times PBS 溶液, 经 0.45 μ m 细菌滤膜过滤后装入高压灭菌过的无菌玻璃瓶; 用无菌量筒量取 30ml 的 3% BSA-1 \times PBS 溶液, 加入 1 \times PBS 缓冲液定容至 900ml, 装入无菌玻璃瓶保存于 4°C。
9. 抗原包被液: 即 0.05M 碳酸盐缓冲液, 称取 1.59g Na₂CO₃, 2.93g NaHCO₃, 超纯水溶解后定容至 1L, 现用现配。
10. 0.25% 酪蛋白封闭液: 称取 Tris base 1.21g, 明胶 2g, 蔗糖 20g, 酪蛋白 2.5g, 硫柳汞 0.2g, 加入适量超纯水加热至 56°C 充分溶解, 定容至 1L 后高压灭菌, 温度下降至 60°C 后加入 5ml Tween20, 保存于 4°C。
11. 20% 山羊血清简易酶稀释液: 取羊血清 200ml, 苯酚红 3ml, 5ml Tween20, Proclin 300 1ml, 用 1 \times PBS 定容至 1L, 4 度保存备用。

12. 终止液：即 0.3M H₂SO₄ 溶液，用玻璃量筒量取 16.7ml 浓硫酸，加入 983.3ml 超纯水中，混匀后常温保存。
13. 10% AP：称取 1g 过硫酸铵 (AP) 充分溶解于 10ml 蒸馏水中，无菌 EP 管分装后冻存于 -20°C。
14. 1.5M Tris-HCl (pH 8.8)：称取 18.17g 三羟甲基氨基甲烷 (Tris)，去离子水充分溶解，稀 HCl 调 pH 值为 8.8，定容至 100ml，高压灭菌备用。
15. 1M Tris-HCl (pH 6.8)：称取 12.11g 三羟甲基氨基甲烷 (Tris)，超纯水充分溶解，用稀盐酸调 pH 值为 6.8，定容至 100ml，高压灭菌备用。
16. 5×电泳缓冲液：称取 15.1g 三羟甲基氨基甲烷 (Tris)，94g 甘氨酸，5g 十二烷基硫酸钠溶于 1L 超纯水，4°C 保存，应用时稀释成 1×电泳缓冲液。
17. 6×loading buffer：量取 1M Tris-HCl (pH 6.8) 3.5ml，3ml 甘油，0.6ml β-羟基乙醇，称取 1g 十二烷基硫酸钠，1.2mg 溴酚蓝，蒸馏水溶解后定容至 10ml，无菌 EP 管分装后冻存于 -20°C，使用前复融配置成 1×使用。
18. 10×TBS (pH 7.5)：称取 12.1g 三羟甲基氨基甲烷 (Tris)，40g NaCl，充分溶解，稀 HCl 调 pH 值至 7.5，去离子水定容至 500ml。121°C 高压灭菌备用。应用时稀释成 1×TBS。
19. 0.1% TBST：TBS 缓冲液中加入 0.1% (v/v) Tween20。
20. 免疫印迹封闭液 (5% 脱脂奶粉-TBST 溶液)：称取脱脂奶粉 2g，加入至 40ml 0.1% TBST 中，充分混匀。
21. 考马斯亮蓝染色液：称取考马斯亮蓝 R250 0.25g，分析级甲醇 50ml，冰醋酸 10ml，去离子水 40ml，充分溶解后经定性滤纸过滤，常温避光保存，使用前需再次用定性滤纸过滤一遍。
22. 脱色液：量取分析级甲醇 92ml，冰醋酸 16ml，超纯水 92ml 充分混匀，避光保存。
23. 糖蛋白染色固定液 (50% 甲醇)：量筒量取 250ml 甲醇与 250ml 超纯水混匀，常温保存。
24. 糖蛋白染色脱色液 (3% 醋酸溶液)：量筒量取 15ml 冰醋酸，加入 485ml 超纯水混匀，常温保存。

25. 糖蛋白染色参照物：将糖蛋白试剂盒中的阴性参照（大豆胰蛋白酶抑制剂）和阳性参照（辣根过氧化物酶）小管快速离心 30min，粉末沉至管底之后加入 1ml 1×loading buffer，分装为每 EP 管 25 μ l，保存于-80 $^{\circ}$ C，上样前复融并 95 $^{\circ}$ C加热处理 5min 后使用。
26. 洗涤液工作液(丹娜)：根据试剂盒说明书，将 20ml R4 浓缩洗涤液(20x)用 380ml 超纯水稀释为 1x 洗涤液工作液，可暂存于 4 $^{\circ}$ C。

附录 2 中英文缩写对照

缩写	英文全称	中文全称
ABPA	allergic bronchopulmonary aspergillosis	变应性支气管肺曲霉病
AE-COPD	acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary	慢性阻塞性肺疾病急性加重
AP	ammonium persulfate	过硫酸铵
ATCC	American type culture collection	美国菌株保藏中心
AUC	area under curve	曲线下面积
BALF	broncho-alveolar lavage fluid	支气管肺泡灌洗液
BCA	bicinchoninic acid assay	双缩脲反应
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
°C	celsius degree	摄氏度
COPD	chronic obstructive pulmonary disease	慢性阻塞性肺疾病
CPA	chronic pulmony aspergillosis	慢性曲霉菌病
d	day	天
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
GM	galactomannan	半乳甘露聚糖
h	hour	时
HRP	horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
Hz	hertz	赫兹
IA	invasive aspergillosis	侵袭性曲霉病
IFA	indirect immunofluorescence	间接免疫荧光
IFD	invasive fungal disease	侵袭性真菌病
IgG	immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
IgM	immunoglobulin M	免疫球蛋白 M
IPA	invasive pulmonary aspergillosis	侵袭性肺曲霉病
IQR	interquartile range	四分位间距

附录 2 中英文缩写对照

缩写	英文全称	中文全称
IVIG	intravenous immunoglobulin	静脉注射人免疫球蛋白
kDa	k Dalton	千道尔顿
M	molecules per liter	摩尔每升
mA	milli ampere	毫安
mg	milligram	毫克
min	minute	分钟
ml	milliliter	毫升
mm	millimeter	毫米
nm	nanometer	纳米
PBS	phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PVDF	polyvinylidene difluoride	聚偏二氟乙烯
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns	病原体相关分子模式
ROC 曲线	receiver operator characteristic curve	受试者工作特征曲线
rpm	revolutions per minute	转每分
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
SDS-PAGE	sodium salt-polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
TBS	tris-buffered saline solution	TBS 缓冲液
TMB	TMB color liquid	TMB 显色液
μg	microgram	微克
μl	microliter	微升
μm	micrometer	微米
V	volt	伏
WB	western blot	免疫印迹