대한의진균학회지 제 1권 제 1호 1996
Kor J Med Mycol Vol. 1, No. 1, 1996

■원 저■

침습성 칸디다증의 면역학적 진단

국립보건원 세균질환부 병원감염과, 전남의대 임상병리학교실*

김봉수 · 이영선 · 조인선 · 김동한 · 박기덕 · 신종희*

=Abstract=

Comparison of Immunological Methods for Diagnosis of Invasive Candidiasis

Bong Su Kim, Yeong Seon Lee, In Seon Cho, Dong Han Kim, Kee Duk Park and Jong Hee Shin*

Laboratory of Nosocomial Pathogens, Department of Microbial Diseases, National Institute of Health, Seoul, Korea and Chonnam University Medical School, Kwangju, Korea*

Background: The early diagnosis of invasive candidiasis is the most important for reducing of morbidity and mortality rates in the immunocopromised patients. The study of antigen detection was performed by Cand-Tec kit, but antibody detection by Western blot, had not been reported .

Objective: We reviewed 62 cases of suspected invasive candidiasis(10),immunocompromised patients with leukemia, leukopenia, pneumonia, et al(44) and normal colonization control(8) in the urine and sputum for the immunological diagnosis of invasive candidiasis by Cand-Tec and Western blot assays.

Methods: The antigen and antibody detection were done by both Cand-Tec kit and Western blot assay, in the sera of the patients collected from several hospitals.

Results: The sera from 4(40%) and 8(80%) of 10 suspected invasive candidiasis had a threshold positive titers of ≥ 1:4 by latex agglutination (Cand-Tec) and the results of positive antibody to the immunodominant antigen (47KDa) of *Candida spp.* by Western blot assay, each other. Both antigen and antibody were detected from 21(47%) of 44 patients in the immunocompromised group and 1(12%) of 8 cases with normal flora, separately, but the antibodies from 3(18%) of 16 healthy controls were detected by Western blot analysis, only.

Conclusion: This study confirm that the Western blot method of detecting antibody against immunodominant antigen(47KDa) of *Candida spp.* was more effective than antigen detection by Cand-Tec method for immunodiagnosis of invasive candidiasis.

Key Words: Cand-Tec, Western blot, Invasive candidiasis.

서 론

과거에는 인체의 피부나 점막에 기생하는 칸디다균은 정상균총으로만 여겨 크게 문제시 되지 않았다. 그러나 최근 10여년 동안 각종 항암제, 면역억제제, 스테로이드제제의 사용증가와 후천성면역결핍증, 마약 등의 대두로 면역 억제 환자들의 수가 증가함에 따라 심부조직까지 침습한 심부성 칸디다증이 증가추세를 이루고 있다. 이런 칸디다증의 진단은 병변으로 부터 직접 칸디다를 증명하는 생검을 통한 방법이 유용하

†별책요청 저자: 김봉수, 서울 은평구 녹번동 5 국립보건원 세균질환부 병원감염과, 우편번호 122-020

지만, 많은 각종 면역 억제자들에게는 가능하지 않으며, 대표적인 임상적 특징도 없고, 혈액배양도 56%의 음성을 나타내어 Pre-mortem 진단이 15-40%에 불과하다[1-2] 라텍스응집반응, 면역침강반응, 역면역전기영동 방법을 통한 혈청학적 면역진단방법은 분명한 칸디다증이 아님에도 불구하고 침강 항체가 검출된다. 역면역전기영동 경우 감수성이 80%로 높으나 특이성이(29%) 매우 낮아 심부성 칸디다증의 혈청학적 진단에 어려움이 많다.[2] 효소면역측정법(ELISA)에 의한 항체 검출률도 50-60%로[3] 낮으며, Cand-Tec에 의한 항원 검출률도 40-50%로 감수성과 특이성이 떨어진다[4]. 한편 칸디다의 대사물질의 일종인 D-arabinitol을 gas chromatography에 의해 검출하는 경우, 특이성은 93%으로 높으나 감수성이 13%로 저하되어 침습성 칸디다증 조기진단에 어려움이 있다[1]. 그러나 면역학적으로 우세한 칸디다 항원(47KDa)은 세포 내에 존재하여, 칸디다균주가 숙주 조직을 침습할 경우 세포 외로 방출되어 침습성 칸디다증을 유발시킴으로써 정상인과 구분될 수 있으며 감수성(50%)과 특이성(86%)이 높고, 이를 정제하여 사용할 경우 감수성과 특이도가 각각 81.5%와 96.4%로 상승한다.[2] 따라서 47KDa항원에 대한 항체반응은 칸디다증 환자의 생존시 강하게 나타나지만 치명적 단계에는 약하거나 거의 나타나지 않아 칸디다증의 진단, 치료 경과추적 및 예후 까지 관찰 할 수 있다.[5] 본 연구는 침습성 칸디다증 환자를 비롯한 면역억제환자들의 혈청을 대상으로 칸디다항원(47KDa)에 대한 항체검출은 Western blot법으로, 칸디다 항원 검출은 라텍스응집반응법(Cand-Tec)으로 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 임상가검물: 전남대학교 병원, 마산고려병원, 연세의료원의 내원 환자 및 건강인의 혈청과 균주를 대상으로 실험하였다.

실험대상 환자들은 암, 폐렴, 간염 등의 기저질환으로 이미 면역이 저하되어 구강, 식도, 간, 비장 등의 조직으로부터 칸디다균이 검출된 환자군을 침습성 칸디다증의 의심군(10명)으로, 백혈병, 백혈구감소증, 폐렴, 신장이식 환자 등을 면역억제환자군(44명)으로, 그밖의 파킨슨병, 종양, 백혈병, 패혈증등의 증세를 지닌 환자들의 뇨나 객담에 칸디다균이 정착된 8명의 대조군과, 건강인(16명)을 음성대조군으로 각각 분류하였다. 한편 임상가검물(뇨, 혈액, 객담 등)로 부터 분리된 균주들의 생화학적 동정은 Vitek system(Madonnell Douglas Health System Co.)을 이용하였다.

2) 가토혈청: *Candida albicans* ATCC 36801 (serotype A)을 SDA에 37°C , 24시간 배양한 후 4,000xg, 10분간 원심분리하여 획득한 침전물을 glass bead(0.45mm)로 마쇄한 후 상등액을 모아 4℃, 38,000xg에서 1.5시간 초고속원심분리하고 membrane filter(0.22μm)로 추출한 항원을[6]New Zealand white rabbit (1.8～2.0kg)에 면역시켜 가토혈청을 제조하였다.

2. 칸디다 항원 측정

Lew 등[7]의 방법에 따라 환자의 혈청을 PBS-Tween(0.05%)으로 5배 희석하고 0.2M Na_2EDTA 용액 (pH7.4)을 0.1배 넣어 충분히 혼합하여 121℃에 5분동안 열처리 한 후 15,000rpm에서 30분간 원심분리한 상등액을 Phillips 등[8]의 방법대로 칸디다 항원 latex응집반응(Cand-Tec)에 사용하여 역가를 측정하였으며 1:4 이상의 역가일 때 양성으로 판정하였다.

3. 칸디다 항체 측정

1) SDS-PAGE: Laemmli방법[9]에 따라 10% sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide gel의 각 well 당 50μl 항원을 걸어 30～40mA에 3～4시간 전기영동을 실시하였다. 이때 사용된 항원은 가토 면역용 항원과 동일하며 *C. albicans* ATCC 36801 이외 *C. tropicalis* ATCC 14056, *C. parapsilosis* ATCC 10232의 항원도 *C. albicans*와 동일한 방법으로 제조하여 사용하였다.

2) Western blot: Matthews 와 Burnie[10] 방법에 따라 제조된 항원에 cracking buffer를 넣고 100℃에서 5분간 가열 한 후 SDS-PAGE를 실시하고 Towbin 등[11] 의 방법에 따라 nitrocellulose paper (0.45μm)에 옮긴 다음 5%(w/v) skim milk-phosphate buffered saline (pH 7.4)용액에 넣어 단백질 결합부위를 차단시킨 후 0.05% Tween 20-PBS 용액으로 세척하였다. 1:100으로 희석된 환자의 혈청을 넣고 2시간동안 실온에서 반응시킨 후 세척시킨 다음 1:30,000으로 희석된 AP-conjugated goat anti-human IgG에서 1시간 동안 반응시키고

PBS-Tween용액으로 5회 세척하였다. Carbonate buffer (pH 9.8)에서 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate(BCIP)와 4-nitro blue tetrazolium chloride (NBT)의 기질을 15분 동안 반응시킨 후 증류수로 세척하여 반응을 중지시켰다.

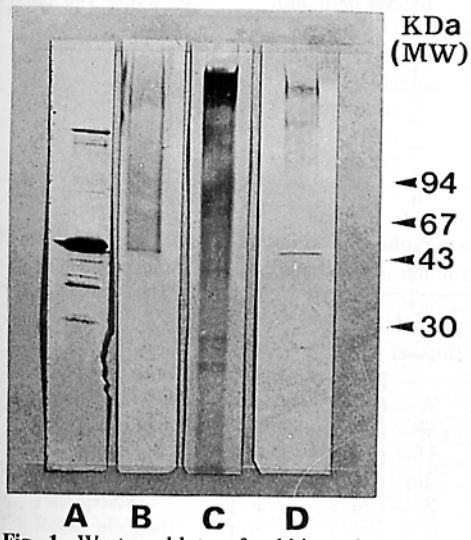

Fig. 1. Western blots of rabbit antiyeast serum against the *S. cerevisiae* enolase(Sigma) (A), *cytoplasmic* antigen of *C. albicans* ATCC 36801(B), *C. albicans* ATCC 36801 obtained by exposure to sera from *Candida* colonization(C), and invasive candidiasis with leukemia(D). Molecular mass standards for proteins were expressed on the right, in kilodaltons.

결 과

1. 침습성 칸디다증 의심군의 항원, 항체 검출

암, 폐렴, 백혈병 등의 기저질환을 지닌 면역억제환자들의 간, 비장에서 진균농이 검출되고 식도, 구강에서 칸디다균이 검출된 침습성 칸디다증 의심환자 10명에 대한 혈청내 항원, 항체 반응을 실시한 결과는 Table 1및 Fig. 1과 같다. Western blot법에 의한 항체 반응이 8명(80%)에서 나

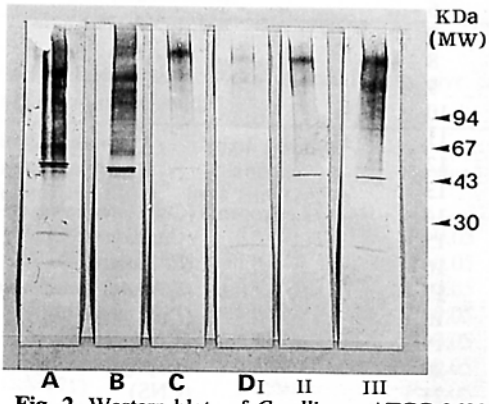

Fig. 2. Western blots of *C. allicans* ATCC 36801 obtained by exposure to sera from patients at risk of invasive candidiasis. Molecular mass standards for proteins on the right, in kilodaltons. A, B: sera from patients with leukopenia. C: sera form patient with iliac vein rupture and acute renal failure. D_{I-III}: sera collected serially from patient with leukemia.

Table 1. Results of antibody and antigen tests for ten patients with episodes of suspected invasive candidiasis

No. of case	Underlying disease	Antibody detected by western blot(antigen responsed)	Antigen detected by Cand-Tec(≧1:4)
1	Obstructive jaundice, gastritis and Esophageal candidiasis	+ *(C. parapsilosis)*	—
2	Esophageal candidiasis and ulcer	+ *(C. tropicalis)*	+
3	Malignant lymphoma, fungal pneumonia and Aspergillosis pneumonia	+ *(C. tropicalis & C. parapsilosis)*	+
4	Chronic renal failure	+ *(C. albicans)*	—
5	Acute leukemia, fungal abscess of liver and spleen, oral candidiasis	+ *(C. albicans)*	+
6	Pancreatic cancer, septic shock, bacterial or fungal pneumonia	+ *(C. albicans)*	—
7	Acute gastritis, acute malete leukemia, chronic hepatitis and oral canididiasis	+ *(C. albicans)*	—
8	Unstable angina, R/O mitral infarction	— *(C. albicans)*	+
9	Acute respiration failure, aspiration pneumonia	— *(C. parapsilosis)*	—
10	Leukopenia	+ *(C. albicans)*	—

타났고, Cand-Tec에 의한 항원반응은 4명(40%)에서 1:4 이상의 역가를 나타내어 양성으로 판정하였다. Fig. 1의D에서 보듯이 백혈병 환자의 Western blot법에 의한 구강 칸디다증 진단은 Fig. 1의 C에서 정상균총 대조군에서는 없는 47KDa 항혈청이 뚜렷이 나타났으며, 이것은 Fig. 1의 B에

Table 2. Resuts of antibody and antigen tests for 45 patients with immunocompromised episodes

No. of case	Underlying disease	Antbody test results by Western blot	Antigen test results by Cand-Tec (≧1:4)
1	Acute leukemia	+	—
2	"	+	—
3	"	—	—
4	"	—	+
5	"	—	—
6	"	+	—
7	"	+	+
8	"	—	—
9	"	—	—
10	"	+	—
11	"	+	+
12	"	+	+
13	"	—	+
14	Leukopenia (*Cryp. neoformans*)	+ (IgG) — (IgM)	+
15	" (*Candida spp.*)	+ (〃) — (〃)	—
16	" (*E. sakazakii*)	— (〃) — (〃)	+
17	" (*Sphmon. paucimobliz*)	— (〃) — (〃)	+
18	" (*Pseu. cepacia*)	+ (〃) — (〃)	+
19	" (*E. cloacae*)	— (〃) — (〃)	—
20	" (*Staphylococcus*)	— (〃) — (〃)	—
21	" (CNS)	— (〃) — (〃)	+
22	" (CNS)	+ (〃) — (〃)	—
23	" (CNS)	+ (〃) + (〃)	+
24	" (*Staph. aureus*)	+ (〃) + (〃)	—
25	" (*Bacilli*)	+ (〃) — (〃)	—
26	" (CNS)	— (〃) — (〃)	—
27	Pneumonia & acute hepatitis.	+	—
28	Pneumonia & renal allograft	+	+
29	Pneumonia & acute resp. failure	—	+
30	Pneumonia	—	+
31	Pneumonia & acute resp. failure	—	—
32	Pneumonia & malig. lymphoma	+	+
33	Renal allograft	—	+
34	"	—	—
35	"	—	+
36	"	—	+
37	"	—	+
38	"	—	—
39	Traumatic SAH	+	—
40	"	+	—
41	Anal sphirtec inpturo	+	+
42	ARDS & SLE	—	+ (*Pichia ohmeri*)
43	COPD & acute exacer batron, pulmonale	—	—
44	Gastric carcinoma & NIDDM, essential hypertension	+	—
45	Unstable angina	+	—

* Cryp.: *Cryptococcus,* E.: *Enterobacter,* Sphmon.: *Sphaeromonas,* Pseu.: *Pseudomonas,* Staph.: *Staphylococcus,* CNS: central nervous system, SAH: Sugarachnoid hemorrhage systemic arterial hypertension, ARDS & SLE: adult respiratory distress syndrome acute respiratory distress syndrome & slit lamp, examination St.Louis encephalitis, COPD: chronic obstructive pulmonary disease, NIDDM: non-insulin-dependent diabetes mellitus.

Table 3. Results of antibody and antigen tests for 8 cases with episodes of normal flora in urine and sputum

No. of case	Age/sex	Underlying disease	Antibody test results by Western blot (antigen responsed)	Antigen test results by Cand-Tec(≧1:4)
1.	74/M	Parkinson's ds. Tsutsugamushi ds.	— (*C. albicans*)	—
2.	71/M	Bladder tumor	— (*C. parapsilosis*)	—
3.	64/M	Benign prostatic hypertrophy	— (*C. albicans*)	—
4.	62/M	Acute hepatitis - B	+ (*C. tropicalis*)	—
5.	14/F	Acute leukemia	— (*C. albicans*)	+
6.	49/F	Lymphoma	— (*C. albicans*)	—
7.	40/M	R/O Sepsis	— (*C. albicans*)	—
8.	35d/M	Chylothorax	— (*C. albicans*)	—

Table 4. Comparison of antibody and antigen results for 62 patients with episodes of risk for invasive candidiasis, suspected invasive candidiasis, immunocompromised and colonization

Group	No. of patients	No.of positive antibody by Western blot(%)	No.of positive antigen by Cand-Tec(%)	P-value*
Suspceted invasive candidiasis	10	8 (80)	4 (40)	$P>0.05$
Immunocompromised patients	44	21 (47)	21 (47)	$P>0.05$
Leukemia	13	8 (62)	5 (38)	$P>0.05$
Leukopenia	12	6 (50)	6 (50)	$P>0.05$
Pneumonia	6	3 (50)	4 (67)	$P>0.05$
Renal allograft	6	0 (0)	4 (67)	$P>0.05$
Others	7	5 (71)	2 (29)	$P>0.05$
Normal colonization	8	1 (12)	1 (12)	$P>0.05$
Healthy controls	16	3 (18)	0 (0)	$P>0.05$

* Fisher's exact test

Table 5. Distribution of identified strains from clinical specimens of immunocompromised patients by Vitek system

Organisms	No. of identified strains (%)	Isolation site			
		Urine	Blood	Sputum	Other
C. albicans	12 (50)	3	7	1	1
C. tropicalis	6 (25)	4		2	
C. parapsilosis	5 (21)	3	2		
Pichia ohmeri	1 (4)	1			
Total	24	11	9	3	1

서 *C. albicans*의 세포내 항원(47KDa)에 대한 가토 항혈청과의 면역반응과 일치한 band을 보여주었다. 한편, Fig. 1의A에서 *Saccharomyces(S.) cerevisiae*의 *enolase*항원과 같은 47KDa band를 나타난 것으로 보아 *C. albicans*의 47KDa 항원이 enolase임을 알 수 있었다.

2. 면역억제 환자군의 항원, 항체 검출

백혈병, 백혈구 감소증, 폐렴 등 여러 면역억제 환자들의 혈청내 칸디다 항원 및 항체를 검출한 결과는 Table 2 및 Fig. 2와 같다. 백혈병, 백혈구 감소증 및 다른 면역억제 환자 에서의 47KDa 항원에 대한 항체검출 양성에는 총 44명 중 21명(47%)이 Cand-Tec으로 항원이 검출된 21명(47%)과 같았고, 신장이식환자(renal allograft)의 경우 Western blot법에 의한 항체 검출이 전혀 나타나지 않았는데 Cand-Tec에 의한 항원검출은 6명 중 4명(67%)에서 나타나 Cand-Tec법이 높은 위양성률을 보여주었다(Table 4).

Fig.2에 나타난 Western blot법에 의한 항체 검

출은 Fig.2의 A,B의 백혈구 감소증 환자에서 뚜렷하게 47KDa 항원에 대한 항체 band를 나타내 심부성 칸디다증을 의심할 수 있었고, 장파열 및 급성신장 기능 장애자에서는 약하게 나타났다 (Fig.2-C).

Fig.2의 D 백혈병 환자에서는 연속 3번 채혈된 혈청, 즉 D_I의 채혈 후 10일과 14일이 지난 D_{II}, D_{III}에서 47KDa 항원에 대한 강한 항체 band를 보여주어, 적어도 3회 계속 일정한 간격을 두고 혈청 내 47KDa 항원에 대한 항체 검출을 실시할 경우 확실한 침습성 칸디다증으로 진단이 가능할 것이다.

3. 칸디다 정상균총군 및 건강인의 항원, 항체 검출

칸디다 감염의 징후없이 소수의 칸디다균이 뇨나 객담에서 분리된 정상균총 대조군에서의 혈청으로부터 항원 및 항체를 검출한 결과는 Table 3과 같다. Western blot법에 의한 항체검출이나 Cand-Tec에 의한 항원검출이 8명 중 각각 1명(12%)에서 나타나 낮은 검출률을 나타냈다. 한편 건강인의 혈청내 항원, 항체 검출을 보면, Table 4에 나타나듯이 Western blot법에 의한 항체 검출률이 18%(3/16)인데 비해 Cand-Tec에 의한 항원 검출은 전혀 없었다.

4. 침습성 칸디다증의 면역진단 방법 비교

침습성 칸디다증 위험군과 면역억제환자군의 혈청 중 항원, 항체를 Cand-Tec과 Western blot법으로 측정 비교한 결과는 Table 4와 같다.

Table 4에서 보듯이, 백혈병 환자 13명, 백혈구 감소증 환자 12명 및 기타 면역억제환자 19명 등 총 44명의 면역억제 환자군의 혈청 중 항체, 항원은 Western blot법과 Cand-Tec법에 의해 각각 21명(47%)에서 검출되어 동일한 감수성을 나타냈다. 그러나 그중에서 폐렴 및 신장이식 환자 12명의 경우에서는 Cand-Tec에 의한 항원 검출률이(67%) Western blot법의 항체 검출률(0~50%)보다 높게 나타났다.

더욱 신장이식 환자(renal allograft)의 경우 항체가 전혀 검출되지 않았는데 비해 Cand-Tec에 의한 항원 검출은 4명(67%)에서 나타나 높은 위양성 반응을 나타냈다. 따라서 Cand-Tec에 의한 면역진단 방법보다 Western blot법의 특이항원(47KDa)에 대한 항체 반응 검사가 칸디다증 조기진단 방법으로 더 효과적인 것으로 나타났다.

고 찰

침습성 칸디다증의 면역진단방법으로 Counterimmunoelectrophoresis(CIE), immuno-diffusion(ID), ELISA 및 Latex 응집반응은 감수성과 특이성이 다 낮거나, 감수성이 높으면 특이성이 낮아, 위양성률과 위음성률이 높게 나타났다. 최근 5-6년 이래 심부성 칸디다증의 진단은 정상균총으로 존재하던 칸디다균이 심층조직으로 침습할 때 세포내 특이항원(47KDa)이 외부로 방출되어 정상균총 환자와 구분할 수 있는 특이성이 높은 Western blot방법이 이용되고 있다.[12] 이 방법으로써 칸디다 특이 항원에 대한 항체 검출을 할 경우 정상인들이 지닌 칸디다 세포벽 구성요소에 대한 항체가와 달라 침습성 칸디다증 환자의 항체 검출률을 70%이상 높여주고 있다. 또한 이 항체의 검출 여부에 따라 침습성 칸디다증 환자의 생존 가능성도 파악 할 수 있고, 항 진균제의 계속적인 사용과 치료 효과 판정에도 중요한 지표 역할을 할 수 있을 것이다.

본 연구에서 검사를 실시한 10명의 침습성 칸디다증 의심환자 중 8명(80%)에서 항체가 검출되었다 (Table 1). 이것은 Matthews등[13]이 보고한 92명의 침습성 칸디다증 환자 중 74명의 항체가 나타난 검출률(80%)과 Chakrabarti등[14]의 실험에서 17명의 Candidemia환자 중 14명의 항체검출률(82.4%)과 거의 같게 나타났다. 한편 *C. albicans*의 enolase는 *S. cerevisiae*의 enolase와 일치하며, 높은 면역항원을 지니고 있어 Murine model을 통해 칸디다균의 독성이 증명되었듯이 본 연구에서도 Fig. 1의 A와 B에서 enolase와 같은 크기의 항원(47KDa)에 대한 immunoblotting (Western blot)결과가 나타났다. 또 백혈구 감소증 환자의 경우 2차 항체 alkaline-phosphatase-conjugated goat anti-human IgM과 IgG의 반응은 IgM의 IgG로의 전이가 점점 어렵고, 항체들의 활성변화가 사망과 직접 관련이 있다고[1]하여 실시하였다. Matthews[1]의 보고에서는 전신성 칸디다증 환자 20명 중 15명은 사망했는데 이들은 모두 IgG와 IgM의 반응이 없었는데 비해 생존자 5명 중에서 4명만 IgM과 IgG에서 47KDa band에 반응을 나타내었으며, 백혈병 환자의 경우 4명의 생존자 중 1명만 IgG와 IgM의 항체를 생성하고 나머지 3명은

IgM 항체만이 생성되었다(Table 2). 본 실험에서는 13명의 백혈구 감소증 환자에서 IgG와 IgM을 동시에 검사한 결과 그중 2명(15%)만 IgG와 IgM에 반응을 하고 5명(38%)은 IgG에만 반응을 나타내었다.

한편 Cand-Tec에 의한 항원 검출의 감수성은 Lemieux등[4]의 보고에서 침습성 칸디다증 환자의 57%보다 낮은 40%의 결과가 나타났으며, rheumatoid factor을 지닌 건강인의 경우 20명 중 1명으로 5%의 감수성을 나타낸 것에 비해 본 실험에서는 건강인 16명이 모두 검출되지 않았다. Fig. 2의 D에서 백혈병 환자의 연속 3회 걸쳐 실시한 항체 검출결과에서 보듯이 지속적인 Cand-Tec에 의한 항원검출과 Western blot 법에 의한 항체 검출을 실시해야 침습성 칸디다증을 확진할 수 있을 것으로 사료되며, 침습성 칸디다증 의심환자와 면역억제 환자들의 Cand-Tec에 의한 항원검출률이 각각 40%, 47%로 나타난 것으로 보아 일반적으로 칸디다균을 검사할 때에는 신속한 Cand-Tec에 의한 항원검사를 실시한후 의심되는 환자의 혈청을 Western blot법으로 항체를 검사 확인하는 것이 칸디다증 진단에 효과적이라고 생각한다.

결 론

침습성 칸디다증 환자의 혈청내 Cand-Tec에 의한 항원검출률은 40%(4/10)인데 비해 Western blot에 의한 칸디다 특이항원(47KDa)에 대한 항체 검출율은 80%(8/10)을 나타내므로 신장이식 환자들에서는 위양성율이(67%) 높은 라텍스(Cand-Tec) 응집반응보다는 감수성과 특이성이 좋은 Western blot방법을 침습성 칸디다증의 면역진단 방법으로 권장하고자 한다.

참 고 문 헌

1. Matthews RC, Burnie JP, Tabaqihali S. *Immunoblot analysis of the serological response in systemic candidosis.* Lancet 1984; 22/29: 1415-1418
2. Louis de R, Leona DM, Janes WK, et al. *Comparison of enzyme immunoassay and gas-liquid chromatography for the rapid diagnosis of invasive candidiasis in cancer patients.* J Clin Microbiol 1985; 21(6): 972-979
3. van Deventer AJM, van Vliet HJA, Hop WCJ, et al. *Diagnostic value of anti-Candida enolase antibodies.* J Clin Microbiol 1994; 32(1): 17-23
4. Lemieux C, ST-Germain G, Vincelette J, et al. *Collaborative evaluation of antigen detection by a commercial latex agglutination test and enzyme immunoassay in the diagnosis of invasive candidiasis.* J Clin Microbiol 1990; 28(2): 249-253
5. Franklyn KM, Warmington JR, Ott AK, et al. *An immunodominant antigen of Candida albicans shows homology to the enzyme enolase.* Immunol Cell Biol 1990; 68: 173-178
6. Burnie JP, Matthews RC, Fox A, et al. *Use of immunoblotting to identify antigenic differences between the yeast and mycelial phases of Candida albicans.* J Clin Pathol 1985; 38:701-706
7. Lew M, George A, Siber R, et al. *Enhanced detection with an enzymelinked immunosorbent assay of Candida mannan in antibody containing serum after heat extraction.* J Infect Dis 1982; 145(1)
8. Phillips P, Dowd A, Jewesson, et al. *Nonvalue of antigen detection immunoassays for diagnosis of candidemia.* J Clin Microbiol 1990; 28(1): 2320-2326
9. Laemmli UK, *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4.* Nature 1970; 227: 680-685
10. Matthews R, Burnie J. *Diagnosis of systemic cadidiasis by an enzyme linked dot immunobinding assay for a circulating immunodominant 47-Kilodalton antigen.* J Clin Microbiol 1988; 26(3): 459-463
11. Towbin H, Gordon J. *Immunoblotting and dot immunobinding current status and outlook.* J Immuno Methods 1984; 72: 313-340
12. Matthews R, Burnie J. *Cloning of a DNA sequence encoding a major fragment of the 47 kilodalton stress protein homologue of Candida albicans*, FEMS Microbiology Letters 1989: 60: 25-30
13. Matthews RC, Burnie JP, Tabaqchali S, *Isolation of immunodominant antigens from sera*

of patients with systemic candidiasis and characterization of serological response to Candida albicans. J Clin Microbiol 1987; 25(2): 230-237

14. Chakrabarti A, Roy P, Kumar et al. *Evaluation of three serological tests for detection of anti-candidal antibodies in diagnosis of invasive candidiasis*. Mycopathologia 1994; 126: 3-7

15. Mason AB and Buckley HR, *Enolase activity associated with C.albicans cytoplasmic antigen*. Yeast 1989; 5: S231-240

16. Walsh TJ. Hathorn JW, Sebel JD, et al. *Detection of circulating candida enolase by immunoassay in patients with cancer and invasive candidiasis*. N Eng J Med 1991; 324: 1026-31